

EFFECT OF THE NATURAL ZEOLITE CLINOPTILITE ON THE
GROWTH OF *DUNALIELLA SALINA* (TEODORESCO, 1905)
CULTIVATED IN PHOTOBIOREACTOR MULTICAMERA
OSCILLATING

EFFECTO DE LA ZEOLITA NATURAL CLINOPTILITA SOBRE EL
CRECIMIENTO DE *DUNALIELLA SALINA* (TEODORESCO, 1905)
CULTIVADA EN UN FOTOBIORREACTOR DE MÚLTIPLES
CÁMARAS OSCILANTES

¹Euler Gallego Cartagena, ²Leydis Yohana Herrera Britto, ³Lena Judith Manjarrez
Rodríguez y ⁴Carmiña Lucía Vargas Zapata

¹Centro de Investigación, Universidad de La Guajira-Colombia Km 5 vía Riohacha-Maicao.
²Facultad de Ciencias Básicas, Programa de Biología, Universidad del Magdalena-Colombia.
³Facultad de Ciencias Básicas, Programa de Biología, Universidad del Magdalena-Colombia.
⁴Grupo de investigación "Biología de Nutrientes", Facultad de Ciencias Básicas, Universidad
del Atlántico-Colombia, km 7 Antigua vía Barranquilla-Puerto Colombia.

ABSTRACT

We studied the growth and production of pigment of microalgae *Dunaliella salina* cultivated in photobioreactor multicamera oscillating outside laboratory conditions to evaluate the effect of different concentrations of zeolite (ZC). Growth was evaluated by cell count and pigment content was performed by spectrophotometric techniques. The results indicate that the concentration of 50 mgL⁻¹ of ZC produced a better stimulus on the growth of the microalga reaching maximum cell density (MDC) of 5.51 ± 0.45 x 10⁶ celmL⁻¹, growth rate (μ) 0.37 ± 0.03 divday⁻¹ and duplication time (Td) of 1.87 ± 0.02 days. Likewise, produced a greater increase in the total chlorophyll and carotenoids in the logarithmic phase of values 15.554 ± 0.77 and 0.50 ± 0.01 µgmL⁻¹, respectively. Chloroplastic pigments concentration per volume of culture has a significant correlation with maximum cell density of *D. salina* treatments based on zeolite at all stages of growth with $r_{MDC, \text{chla.tot}} = 0.89$ y una $r_{MDC, \text{carot.tot}} = 0.926$ at a level of significance ($p < 0.01$). The results demonstrated the feasibility of using this product as a suitable substrate for the growth of the microalga, being an innovative alternative and less costly to obtain significant metabolites.

Key words: Microalgal biomass, photobioreactor, microalgal biotechnology, *Dunaliella salina*, pigment, clinoptilite natural zeolite.

Correspondence to author

1 eulergc@gmail.com 2 herrerabritto@gmail.com 3 lejumar@yahoo.com

4 carminaluvarza@yahoo.com

Manuscrito recibido el 05 de julio de 2013, aceptado el 26 de agosto de 2013.

RESUMEN

Se estudió el crecimiento y la producción de pigmentos de la microalga *Dunaliella salina* cultivada en fotobiorreactor de múltiples cámaras oscilantes en condiciones fuera de laboratorio a fin de evaluar el efecto de diferentes concentraciones de zeolita (ZC). El crecimiento fue evaluado mediante conteo celular y el contenido de pigmentos se realizó mediante técnicas espectrofotométricas. Los resultados indican que la concentración de 50 mgL⁻¹ de ZC produjo un mejor estímulo sobre el crecimiento de la microalga alcanzando una máxima densidad celular (MDC) de $5.51 \pm 0.45 \times 10^6$ celmL⁻¹, tasa de crecimiento de (μ) 0.37 ± 0.03 div/día⁻¹ y tiempo de duplicación de (Td) de 1.87 ± 0.02 días. Así mismo, produjo un mayor aumento en la clorofila total y carotenoides en la fase logarítmica, con valores de 15.554 ± 0.77 y 0.50 ± 0.01 μ gmL⁻¹, respectivamente. La concentración de pigmentos cloroplásticos por volumen de cultivo presenta una correlación significativa con la máxima densidad celular de *D. salina* en función de los tratamientos con zeolita en la fase de crecimiento logarítmica con un $r_{\text{MDC, chla.tot}} = 0.89$ y una $r_{\text{MDC, carot.tot}} = 0.926$ a un nivel de significancia de ($p < 0.01$). Los resultados demostraron la factibilidad de utilizar este producto 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: Biomasa microalgal, fotobiorreactor, biotecnología microalgal, *Dunaliella salina*, pigmentos, zeolita natural clinoptilita.

INTRODUCCION

En las últimas cuatro décadas, las microalgas fotosintetizadoras 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 (Paniagua-Michel y Sasson, 1995; Gavrilescu y Chisti, 2005; Mendiola, 2007). Sin embargo, los rendimientos de cultivos a gran escala de microalgas fototróficas no son tan eficientes comparados con los de microorganismos heterotróficos. No obstante, el cultivo industrial de las microalgas se encuentra en los albores de su desarrollo, estado que motiva a los algólogos por el desarrollar procesos biotecnológicos innovativos que incrementen la eficiencia productiva de los microorganismos fototróficos (Chaumont, 1993).

Entre los esfuerzos investigativos que buscan 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), y zeolitas (Nieves, 2000; Leal et al., 2003), actúan como sustancias estimulantes del crecimiento poblacional de determinadas especies de microalgas en cultivos. También se ha experimentado con otros compuestos bastante efectivos y de amplio espectro los cuales favorecen a muchas especies pero son costosos y no asequibles comercialmente.

Dunaliella salina, microalga sintetizadora 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 buscado 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 se corresponden con 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 (Guevara et al., 2005).

Con respecto a investigaciones sobre el uso de partículas de zeolitas a bajas concentraciones -20 a 60 mgL⁻¹- en cultivos de *D. salina*, no se ha evidenciado literatura científica. El propósito de este estudio fue probar el efecto de una zeolita clinoptilita (ZC) 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 un fotobiorreactor de cámaras múltiples 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.

MATERIALES Y METODOS

Obtención de la cepa

La cepa de *D. salina* se aisló a partir de muestras de aguas colectadas de las piscinas artificiales de las salinas de Manaure, ubicada en el litoral costero del municipio de Manaure (11° 46' 31.8" N; 72° 27' 30.5" O). Las muestras de agua natural de las salinas fueron colectadas en el fondo y superficie de los estanques, en frascos de vidrio de 500 ml de capacidad, previamente esterilizados y rotulados, introducidos hasta alcanzar 300 ml. Las muestras fueron colectadas al inicio de enero de 2011 que coincide con la época de sequía tardía, alta irradiación solar, una temperatura de la capa superficial de aproximadamente 60°C y salinidad de 4 UPS. El material colectado se almacenó en una nevera tipo thermo y fue trasladado al laboratorio del área de microbiología del Instituto de Estudios Ambientales y Aprovechamiento de Agua de la Universidad de La Guajira (INESAG). Para obtener cultivos monoalgales de *D. salina* se combinaron dos métodos de aislamiento: el pipeteo capilar y rayado en placas de agar, según Moreno y Albarraçin (2012).

Material zeolítico utilizado

El material zeolítico utilizado provino de la empresa TERKIM S.A.S., ubicada en la ciudad de Santa Fé de Bogotá. El mineral corresponde a una clinoptilita natural de la familia heulandita, con el nombre comercial Zeoter-P. Las muestras fueron sometidas a un pretratamiento que consistió en la esterilización de 100 g de zeolita en autoclave, a una temperatura de 120°C/2 horas y posterior secado en estufa a una temperatura de 60°C/24 horas (Nieves, 2000).

Medio de cultivo

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

Biorreactor utilizado

Se utilizó un Fotobiorreactor de Múltiples Cámaras Oscilantes (FMCO) (Fig. 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 consistió en una estructura metálica rectangular que le proporcionó soporte a dos bandejas, cada una con cabida a 18 cámaras de cultivos. Cada cámara fue construida de material de 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 facilite el intercambio gaseoso con la atmósfera y la cámara. Las dos bandejas con sus respectivas cámaras de cultivo fueron agitadas con motor de ½HP y un variador de frecuencia para regular el movimiento oscilante.

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 biorreactor, consistieron en cinco tratamientos de 20, 30, 40, 50 y 60 mgL⁻¹, con partículas de 1.0 ±0.01 mm de diámetro promedio de ZC. Los tratamientos se hicieron por triplicado, más un tratamiento control sin ZC, sumando un total de 18 cultivos experimentales. El crecimiento de las células de *D. salina* se hizo mediante la técnica de cultivo discontinua (Abalde, 1995). Los parámetros de cultivo aplicados de manera general 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 una intensidad lumínica de 420 ±0.012 μE m⁻² s⁻¹; d) fotoperiodo natural; e) pH inicial de 8.2; f) promedio diario de temperatura ambiental: externa a los cultivos 32 ±0.52°C, interna de los cultivos 28 ±0.02°C; g) cultivos agitados diariamente sólo durante las 12 horas del periodo lumínico solar, con aplicación de 80 oscilaciones/min; h) concentración salina: 1.0 UPS de salinidad; i) concentración inicial de células de *D. salina* 2 x10⁴ ±0.10 celmL⁻¹ (Cifuentes et al., 1996).



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

Determinación de los parámetros de crecimiento

Concentración celular

Para determinar el crecimiento poblacional de *D. salina* en función de las concentraciones de ZC se realizó un recuento celular en el tiempo (diarios a la misma hora) mediante una cámara Neubauer (célulasmL⁻¹) en microscopio óptico binocular, desde el inicio hasta alcanzar la fase temprana estacionaria del cultivo. La densidad celular, tasa específica de crecimiento y tiempo de duplicación se estimaron según la metodología de Andersen (2005).

Determinación de la producción de pigmentos a y b y carotenoides totales

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* y carotenoides totales se calcularon acorde las ecuaciones recomendadas por Guevara et al., (2005).

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 ZC 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 cloroplásticos y las densidades celulares con los tratamientos. El software para el procesamiento de los datos fue SPSS Statistics 17.0.

RESULTADOS

Crecimiento

Los tratamientos de 40, 50 mgL⁻¹ de ZC y el control alcanzaron los mayores valores de máxima densidad celular -MDC- con 5.02 ±0.03, 5.51 ±0.45 y 5.17 ±0.10 x 10⁶ celmL⁻¹ respectivamente; a su vez y de manera apareada los tratamientos de 50 mgL⁻¹ de ZC y el control presentaron el mismo valor de tasa específica de crecimiento (μ), con 0.37 ±0.03 divdía⁻¹ exceptuando al tratamiento de 40 mgL⁻¹ de ZC con una μ = 0.46 ± 0.02 (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros de crecimiento de *D. salina* obtenido de cultivos tratados con partículas de ZC en un FMCO.

Tratamientos (mgL ⁻¹)	MDC ±SD	μ (div/día)	Td (días)
20	3.42 ±0.10 ^{A,B}	0.34 ±0.04 ^A	2.03 ±0.04 ^A
30	3.51 ±0.12 ^{A,B}	0.43 ±0.03 ^B	1.61 ±0.06 ^A
40	5.02 ±0.03 ^{A,B}	0.46 ±0.02 ^B	1.5 ±0.03 ^B
50	5.51 ±0.45 ^{A,C}	0.37 ±0.03 ^A	1.87 ±0.02 ^A
60	3.15 ±0.24 ^{A,B}	0.33 ±0.02 ^A	2.1 ±0.04 ^A
Control	5.17 ±0.10 ^{A,B}	0.37 ±0.03 ^A	1.87 ±0.03 ^A

MDC = Máxima densidad celular x (10⁶ celmL⁻¹)

SD = Desviación estándar. Valores expresados en (\bar{x}) ± SD.

Test de Tukey: Los valores que presentan diferente letra suscrita en la misma columna revelan diferencia significativa (p<0,05).

Se observó un incremento acelerado a partir de los seis primeros días, indicando la fase logarítmica. La MDC de la mayoría de los tratamientos se presentó entre los días 13 y 16, en este último periodo alcanzaron su MDC la mayor parte de los tratamientos (Fig. 2).

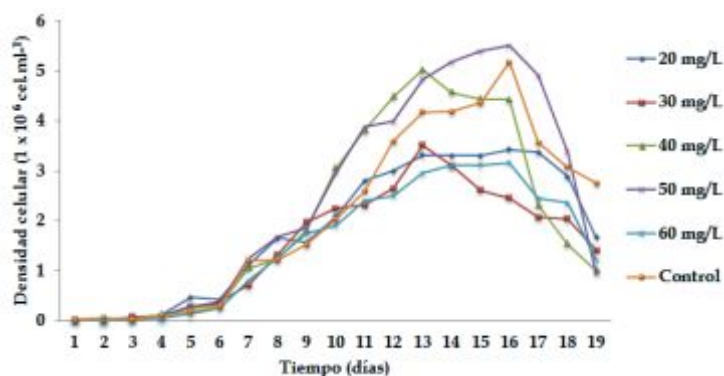


Fig. 2. Crecimiento discontinuo de *D. salina* en función de concentraciones de ZC.

Las poblaciones de *D. salina* en función de los tratamientos con ZC, presentaron varianzas poblacionales iguales (Levene= 4.088; p= 0.343), en tanto que el ANOVA mostró que las

partículas de ZC produjeron efectos sobre el crecimiento de *D. salina* cultivada en FMCO en condiciones de campo abierto ($F=3.56$; $p<0.05$).

La prueba de comparaciones múltiples de Tukey indica que los tratamientos 30 y 50 mgL^{-1} de ZC comparados difieren significativamente: el tratamiento de 50 mgL^{-1} de ZC presenta una densidad celular promedio de *D. salina* mayor que el de 30 mgL^{-1} a un nivel de significancia de 0.05 (Tabla 1).

Concentración de pigmentos

La cepa de *D. salina* alcanzó los valores más elevados de clorofila total y carotenoides totales durante la fase logarítmica en todos los tratamientos. Estos valores fueron directamente proporcionales con las MDC de los respectivos tratamientos. Los tratamientos 50 y 40 mgL^{-1} alcanzaron los mayores contenidos de clorofila total por volúmenes de *D. salina* cultivada con valores de 15.554 ± 0.77 y $12.079 \pm 1.77 \mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente. El tratamiento de 60 mgL^{-1} de ZC produjo el menor contenido de clorofila total con un valor de $5.631 \pm 0.42 \mu\text{g mL}^{-1}$. En cuanto a contenido de carotenoides por volumen el tratamiento de 50 mgL^{-1} presentó un valor de $0.50 \pm 0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$; los tratamientos 20 y 40 mgL^{-1} y la prueba control alcanzaron valores de carotenoides relativamente parecidos, con 0.29 ± 0.013 , 0.39 ± 0.02 , y $0.39 \pm 0.011 \mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente. Los valores más bajos fueron alcanzados con los tratamientos de 30 y 60 mgL^{-1} con 0.15 ± 0.008 y $0.18 \pm 0.013 \mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente (Tabla 2).

Tabla 2. Producción de pigmentos cloroplásticos de *D. salina* durante la fase logarítmica, en función de las concentraciones de ZC.

Tratamiento de ZC (mgL^{-1})	MDC \pm SD	CT ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CTs ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
20	3.42 ± 0.10^A	8.935 ± 0.31^A	0.29 ± 0.013^A
30	3.51 ± 0.12^A	6.593 ± 0.57^A	0.15 ± 0.008^B
40	5.02 ± 0.03^B	12.079 ± 1.77^B	0.39 ± 0.02^C
50	5.51 ± 0.45^C	15.554 ± 0.77^B	0.50 ± 0.01^D
60	3.15 ± 0.24^A	5.631 ± 0.42^A	0.18 ± 0.013^B
Control (0)	5.17 ± 0.10^B	10.142 ± 0.07^C	0.39 ± 0.011^C

CT: Clorofila total, CTs: Carotenoides totales, SD: Desviación estándar, Valores expresados en (\bar{x}) \pm SD.

Test de Tukey: Los valores que presentan diferente letra suscrita en la misma columna revelan diferencia significativa ($p<0,05$).

El índice de correlación de Pearson presentó una correlación significativa entre la MDC y el contenido de clorofila total ($r_{\text{MDC, clorofila total}} = 0.889$, $p<0.01$) y carotenoides totales ($r_{\text{MDC, carotenoides totales}} = 0.926$, $p<0.01$) obtenidos durante la fase logarítmica (Tabla 3).

Tabla 3. Valores de la Correlación de Pearson entre la producción de pigmentos cloroplásticos y las densidades celulares de *D. salina* durante la fase logarítmica.

VARIABLES		Clorofila total	Carotenoides totales
Máxima densidad celular de <i>D. salina</i>	Correlación de Pearson	0.889 (**)	0.926 (**)
	Sig. (bilateral)	0.018	0.008
	N	6	6

DISCUSIÓN

Crecimiento

La cepa de *D. salina* presentó diferencias en las velocidades de crecimiento (μ) y los tiempos de duplicación (T_d) en los tratamientos de diferentes concentraciones de ZC. Las diferencias entre concentraciones de ZC se debieron principalmente al efecto de la zeolita principalmente y no a la respuesta diferencial de la microalga. Durante los primeros cinco días la curva de crecimiento de *D. salina* muestra una estabilidad en el crecimiento. Este comportamiento se relaciona con el acondicionamiento lento del inóculo inicial al medio de cultivo fresco utilizado en la prueba, pues las células requieren de un tiempo para restablecer su complejo enzimático que participa en los procesos de la fotosíntesis y crecimiento celular (Suárez et al., 2002). Durante el inicio de la fase de aceleración fue evidente el incremento de células en división, hecho que se observó posterior al quinto día, período que está relacionado con el aumento logarítmico de las densidades celulares en la mayoría de los tratamientos. La fase logarítmica final, comprendida entre los días 12 y 17, coincidió con la MDC alcanzada por la cepa; las células presentaron crecimiento constante con aparente material intracelular almacenado, rico en metabolitos secundarios y pigmentos cloroplásticos, lo cual hace a esta fase interesante a nivel biotecnológico, y se utiliza como criterio de decisión para el cosechamiento de la biomasa en cultivos masivos.

La mayor parte de los trabajos que tratan cultivos de microalgas con zeolitas refieren el uso de estas sustancias en cultivos de diatomeas (López-Ruiz et al., 1995), aunque en otras investigaciones se plantea la eficiencia de productos zeolíticos en el crecimiento de flagelados fotosintéticos como *Tetraselmis suecica* y *Dunaliella tertiolecta* -clorofitas con características morfológicas y taxonómicas similares a *D. salina*- (López-Ruiz, 1999; Nieves et al., 2000; Leal et al., 2003). Del mismo modo se ha reportado el uso de productos de naturaleza zeolítica con la microalga *Isochrysis* sp. -con características taxonómicas diferentes y morfológicas similares a *D. salina* (Nieves, 2000).

El efecto de las zeolitas en la producción de microalgas ha sido escasamente estudiado. Algunos de los reportes mencionados pretenden dilucidar los mecanismos que las favorecen, planteando que estas sustancias presentan propiedades fisicoquímicas como adsorción, catálisis, intercambio iónico, porosidad, entre otras, responsables de los mejores rendimientos en los cultivos de microalgas (López-Ruiz, 1999). El efecto de la ZC sobre los rendimientos alcanzados por *D. salina* se pudo haber dado por un mejor aprovechamiento de los nutrientes aportados por las zeolitas (Leal et al., 2003), además, por la disposición de algunos minerales que parecen favorecer el crecimiento de la microalga en los cultivos (Plasencia et al., 2004). Un efecto que presentaron los cultivos de *D. salina* debido a la adición de ZC fue que su rendimiento aumentaba en función del aumento de la concentración, lo cual concuerda con lo planteado por Nieves (2000), aunque el menor rendimiento se presentó con el tratamiento de 60 mgL⁻¹, entendiéndose que esta concentración probablemente ocasiona una sobresaturación de nutrientes a niveles ligeramente inhibitorios para el crecimiento de la cepa (Arredondo et al., 2004; Fachini et al., 2004).

Con respecto al efecto positivo de la ZC sobre el crecimiento poblacional de *D. salina*, se ha planteado que este puede variar en función del tipo de zeolita, dosis aplicada y especie taxonómica estudiada (Nieves, 2000). Se ha dilucidado que el efecto de los productos zeolíticos no está limitado a un solo grupo taxonómico y es independiente del origen marino o dulceacuícola de la microalga en cultivo y de su demanda de silicatos, lo cual abre un abanico de posibilidades para el desarrollo de investigaciones que propendan en el mejoramiento sostenible de cultivos de microalgas de interés biotecnológico, en especial, aquéllas orientadas a mostrar con precisión el efecto que ocasiona las zeolitas sobre la concentración de metales trazas en la solución nutriente teniendo en cuenta la capacidad adsorptiva y/o desorptiva de su superficie (Fachini et al., 2004). El uso de esta zeolita para estimular el crecimiento poblacional de *D. salina* cultivada en FMCO contribuye en el desarrollo de un modelo de innovación

tecnológica para la diversificación del sector acuícola de Colombia y una alternativa biotecnológica para hacer uso sostenible de un recurso promisorio como esta cepa productora de carotenoides con gran demanda comercial en el mercado internacional, principalmente como materia prima para la elaboración de productos en los sectores de la industria farmacéutica, cosmética y alimenticia.

No siendo objeto de análisis el tipo de biorreactor utilizado, el sistema de agitación del FMCO (Leal y Mancilla, 2001), resultó apropiado para coadyuvar en el efecto de la ZC sobre el crecimiento de *D. salina*. El tipo de agitación turbulento proporcionado por el FMCO –*diferente al del flujo laminar característico de los cultivos movidos mediante el uso de bombas hidráulicas*–, permite homogeneizar la solución de cultivo y genera una activa y azarosa circulación de las partículas de ZC, lo cual además, posibilita potenciar de manera favorable la interacción de diversos factores físicoquímicos y bioingenieriles, que inciden en el proceso fotosintético, metabolismo general y 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 a lo expuesto, se propone continuar con este tipo de estudios para dilucidar los mecanismos físicos y químicos involucrados en la interacción entre las partículas zeolíticas (ZC), el medio de cultivo y las células de *D. salina*, así como extender estas investigaciones a otros tipos de sustancias zeolíticas y especies microalgales de interés industrial.

Producción de pigmentos

La baja producción de carotenoides en relación a los elevados valores de clorofila total obtenidos tanto en la fase logarítmica –*entre los días 8 y 16*– como la estacionaria final –*días 16 hasta el 18*– podrían estar 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). Así mismo, el suministro de nutrientes en niveles óptimos – KNO_3 1.0 g (10 mM) y KH_2PO_4 0.025 g– influye directamente sobre el incremento del contenido de clorofila concomitante al rendimiento poblacional (Serpa y Calderón, 2006). El medio de cultivo utilizado (Borowitzka y Borowitzka, 1988) y las condiciones de pH (8.20 ± 1.20), salinidad a 1 UPS y temperatura de $26.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$, sugeridas por algunos autores mostraron producciones de clorofila total superiores a los carotenoides (Leal, 1996; Gómez, 1997; Guevara et al., 2005).

La amortiguación de la alta intensidad lumínica solar incidente sobre las cámaras de cultivo por el uso de polisombra, pudo haber tenido el efecto de producir altos valores en la relación clorofila/carotenoides, por la capacidad adaptativa de la microalga *Dunaliella* de aumentar el número de unidades fotosintéticas –que comprenden los centros de reacción, las moléculas de clorofila-pigmento antena, los pigmentos accesorios y los transportadores de electrones– cuando existe una baja intensidad luminosa. 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, 1987).

Conclusión

El efecto de la ZC sobre la producción de *D. salina* cultivada en FMCO está dado por sus propiedades físicoquímicas como el intercambio iónico que le permite a la cepa disponer y aprovechar algunos macro y micronutrientes del medio para su crecimiento. Este efecto puede variar en función de la concentración de ZC aplicada y las condiciones de cultivo, en especial, el proceso de agitación del biorreactor que permite la circulación homogénea de las partículas en la solución nutriente y la interacción adecuada de parámetros físicoquímicos que afectan el rendimiento poblacional de la cepa.

AGRADECIMIENTOS

Al laboratorio del Instituto de Estudios Ambientales y Aprovechamiento de Agua de la Universidad de la Guajira (INESAG), Facultad de Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad de La Guajira, Facultad de Ciencias Básicas de la Universidad del Magdalena, Grupo de Investigación BIOTA adscrito al Centro de Investigación de la Universidad de La Guajira, Grupo de Investigación BIOLOGIA DE NUTRIENTES adscrito a la Facultad de Ciencias Básicas, Universidad del Atlántico y a la empresa TERKIM S.A.S por facilitar el material zeolítico utilizado en la prueba experimental.

REFERENCIAS

1. Abalde J., 1995. Técnicas de cultivo. En: J.E. Abalde (Ed.), *Microalgas: Cultivo y Aplicaciones*. Illustrated Universidade da Coruna. Servicio de Publicaciones de España.
2. Andersen R., 2005. Parameters of growth in cultures of microalgae. En: R. Andersen (Ed.), *Algal culturing techniques*. Academic Press, China.
3. Arredondo B., S. Leal, y J. López, 2004. Effect of zeolitic products in the nutritive quality of the diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Hidrobiológica*, 14(1): 69-74.
4. Borowitzka M. y L. Borowitzka, 1988. *Dunaliella sp.* Microalgal Biotechnology. Cambridge University, England.
5. Ben-Amotz A. y M. Avron, 1983. On the factors which determine massive β -Carotene accumulation in the halo-tolerant alga *Dunaliella badawil*. *Plant Physiologic*, 72: 593-597.
6. 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.
7. Chaumont D., 1993. Biotechnology of algal biomass production: a review of systems for outdoor mass culture. *Journal of Applied Phycology*, 5: 593-604.
8. 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.
9. Chisti Y., 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25: 294-300.
10. Contreras C., J. Peña., L. Flores y R. Cañizares, 2003. Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. *Interciencia*, 28(008): 450-456.
11. Dipak P. y S. Lele, 2005. Carotenoid production from microalga *Dunaliella salina*. *Indian Journal of Biotechnology*, 4(8): 476-483.
12. Fachini A., M.F. Leal y M.T. Vasconcelos, 2004. Are zeolites capable of modifying the yield of marine microalgae cultures? A case study with *Emiliania huxleyi* and a product of zeolitic nature. *Journal of Aquaculture*, 237: 407-419.
13. Fernández B., G. Dragoner y J. Teixeira, 2010. Light regime characterization in airlift. Photobioreactor for production of microalgae with high starch content. *Applied Biochemical and Biotechnology*, 61: 218-226.

14. Gavrilescu M. y Y. Chisti, 2005. Biotechnology -a sustainable alternative for chemical industry. *Journal of Biotechnology Advances*, 23: 471-499.
15. Gómez L.M., 1997. Cultivo y aplicación de las microalgas *Dunaliella salina* y *Chlorella vulgaris* en Cuba. (Tesis Doctoral, Universidad de La Coruña, La Coruña, España).
16. Ginzburg M., 1987. *Dunaliella*: a green alga adapted to salt. *Advances in Botanical Research*, 14: 93-183.
17. Guevara M., C. Lodeiros y O. Gómez, 2005. Carotenogénesis de cinco cepas del alga *Dunaliella* sp. (*Chlorophyceae*) aisladas de lagunas hipersalinas de Venezuela. *Revista de Biológica Tropical*, 53: 331-337.
18. Leal E., 1996. Efectos de algunos factores ambientales sobre la capacidad carotenogénica de una cepa de *Dunaliella salina* Teodoresco (*Chlorophyceae, Dunaliellales*). (Tesis de Magister, Scientiarum en Ciencias Marinas, Universidad de Oriente. Instituto Oceanográfico de Venezuela, Cumaná).
19. Leal S., G. Delgado., G. Rodríguez., J. López., E. Alfonso y F. Nodas, 2003. Crecimiento de microalgas marinas con diferentes productos zeolíticos. *Investigaciones Marinas*, 24: 57-62.
20. Leal E. y J. Mancilla, 2001. Diseño y construcción de un fotobiorreactor cerrado para la producción intensiva de microalgas. En: *Memorias del II Curso de Microalgas y Cianobacterias: Aislamiento, Cultivo y Fisiología*. 26 de marzo al 6 de abril de 2001, Santa Marta, Colombia. p: 125-130.
21. López-Ruiz J., R. García y M.S. Ferreira, 1995. Marine microalgae cultura: *Chaetoceros gracilis* with zeolitic product ZESTEC-56 and a comercial fertilizer as a nutrient. *Aquacultural Engineering*, 14: 367-372.
22. López-Ruiz J., 1999. Productos de naturaleza zeolítica (PNZ): Cultivo de microalgas marinas. *Aquacultural Engineering*, 15: 13-34.
23. Mendiola J.A., 2007. Extracción de compuestos bioactivos de microalgas mediante fluidos supercríticos. (Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España).
24. Moreno J. y V. Albarracín, 2012. Aislamiento, cultivo e identificación de microorganismos ambientales a partir de muestras naturales. *Reduca (Biología)*. Serie Microbiología, 5(5): 79-93.
25. Niels E., 2008. The technology of microalgal culturing. *Biotechnology Letters*, 30: 1525-1536.
26. Nieves M., 2000. Efecto de productos de naturaleza zeolítica sobre el crecimiento y la calidad dietética de microalgas para la acuicultura. (Tesis Doctoral, Universidad de Colima, México).
27. Nieves M., D. Voltolina., R.J. López., M. Cisneros y P. Piña, 2000. Cultivo de microalgas marinas con medios enriquecidos con productos de naturaleza zeolítica. *Hidrobiológica*, 10: 1-6.
28. Paniagua-Michel J. y A. Sasson., 1995. Moléculas de microalgas de importancia económica. En: K. Alveal, M. Ferrario, E. Oliveira y Sar, E. (Eds.), *Manual de Métodos Ficológicos*, Concepción. Chile.
29. Plasencia A.H., S. Leal, D. Voltolina y R. Curbelo, 2004. Cultivo de la diatomea bentónica *Amphora* cf. *marina* con una zeolita cubana enriquecida. *Investigaciones Marinas*, 25: 151-158.

30. 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: 92-99.
31. Suárez G., T. Romero y D. Hernández. Tamaño de inóculo y crecimiento en *Dunaliella salina* cultivada al aire libre. CIVA 2002. <http://www.civa2002.org>. (accesado en febrero 20, 2010).
32. 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.
33. Tarakhovskaya E.R., Y. Maslov y M.F. Shishova, 2007. Phytohormones in Algae. *Journal of Plant Physiology*, 54(2): 186-194.
34. Wegmann K. y H. Metzner, 2005. Synchronization of *Dunaliella salina* cultures. *Archiv für Mikrobiologie*, 78(12): 360-367.