

## **INFLUENCIA DE LA SALINIDAD Y LA IRRADIANCIA SOBRE EL CRECIMIENTO Y COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA DE UNA NUEVA CEPA DE *Dunaliella salina*, PROVENIENTE DE LAS SALINAS DE ARAYA, VENEZUELA**

### **INFLUENCE OF SALINITY AND IRRADIANCE ON GROWTH AND BIOCHEMICAL COMPOSITION OF A NEW STRAIN of *Dunaliella salina* FROM THE ARAYA SALT WORKS, VENEZUELA**

MIGUEL GUEVARA, RAFAEL PINTO, JOSÉ VILLARROEL, ELVIRA HERNÁNDEZ, ROBERTO DÍAZ, BELICE GOTERA, RORAYSI CORTEZ

*Universidad de Oriente, Instituto Oceanográfico de Venezuela, Departamento de Biología Pesquera,  
Laboratorio de Biotecnología de Microalgas, Cumaná, Venezuela  
E-mail: miguevara2003@yahoo.es*

#### **RESUMEN**

*Dunaliella salina* es una microalga utilizada para la producción de metabolitos de alto valor industrial y farmacéutico. Se evaluó el efecto combinado de la irradiancia y salinidad sobre el crecimiento, producción de pigmentos y composición bioquímica de una cepa *D. salina* aislada de las salinas de Araya, a fin de contribuir con el conocimiento de las respuestas fisiológicas de esta cepa ante cambios en las condiciones de su entorno. Se buscó, además, incrementar la variedad de especies microalgales nativas que puedan servir como fuentes de bioproducción para compuestos bioactivos, biomasa y metabolitos de aplicación en la industria de alimentos funcionales, farmacéuticos y biomedicina. Se realizaron cultivos discontinuos de la cepa de *D. salina* durante 22 d en medio f/2 Guillard (0,88 mmol.L<sup>-1</sup> de nitrógeno) a 27 ± 2°C, pH de 7,8; fotoperíodo 12 h luz: 12 h oscuridad, aireación continua (150 mL.L<sup>-1</sup>) y en dos diferentes salinidades (40 y 250 UPS) e irradiancias (195 y 295 μmolphotons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>). Diariamente, se evaluó el crecimiento poblacional y al final del ensayo se determinaron los contenidos de biomasa, pigmentos, proteínas, lípidos y carbohidratos, así como el tamaño celular. La tasa de crecimiento de la nueva cepa de *D. salina* disminuyó al aumentar la salinidad y la irradiancia. Sin embargo, el tamaño celular, biomasa, contenidos de proteínas, lípidos, carbohidratos, carotenoides totales y β-caroteno aumentaron al incrementarse la irradiancia y la salinidad. Además, se evidenció la potencialidad que posee esta cepa para ser cultivada para la producción de β-caroteno.

**PALABRAS CLAVE:** Microalgas, pigmentos, hipersalino, biotecnología.

#### **ABSTRACT**

*Dunaliella salina* is a microalga used for the production of metabolites of high industrial and pharmaceutical value. The combined effect of irradiance and salinity on growth, pigment production and biochemical composition of this strain were evaluated in order to contribute to the knowledge of the physiological responses of this new isolate of *D. salina* from Araya saltworks, to changes in the conditions of its environment. It was also intended to increase the variety of native microalgae species which can serve as sources of bioproduction for bioactive compounds, biomass and metabolites of application in pharmaceuticals and biomedical industries. Batch cultures of the strain of *D. salina* were conducted for 22 d at f/2 medium Guillard (0.88 mmol.L<sup>-1</sup> of nitrogen) at 27 ± 2°C, pH 7.8; photoperiod 12 h light: 12 h darkness, continuous aeration (150 mL.L<sup>-1</sup>) in two salinities (40 and 250 UPS) and irradiances (195 and 295 μmolphotons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>). Population growth was evaluated daily and at the end of the trial the contents of biomass, pigments, proteins, lipids, carbohydrates and cell size were determined. The growth rate of the new strain of *D. salina* decreased with increasing salinity and irradiance. However, cell size, biomass, content of proteins, lipids, carbohydrates, total carotenoids and β-carotene increased with increasing irradiance and salinity. In addition, the potential of this strain for the production of β-carotene was shown.

**KEY WORDS:** Microalgae, pigments, hypersaline, biotechnology.

#### **INTRODUCCIÓN**

El cultivo de las microalgas para la producción de metabolitos de interés industrial ha tomado auge en los últimos años. La biotecnología microalgal ha hecho grandes avances y varias especies de microalgas de los géneros *Botryococcus*, *Chlorella*, *Dunaliella*, *Haematococcus* y *Spirulina* se cultivan para

producir proteínas, astaxantina, polisacáridos, vitaminas, minerales, esteroides, β-caroteno, glicerol, productos químicos finos y otros compuestos biológicamente activos (Raja *et al.* 2007, Wijffels *et al.* 2013).

Una de las microalgas más utilizadas por su importancia comercial en la obtención de compuestos bioactivos es *Dunaliella salina*; los

organismos de esta especie contienen entre 50 y 60% de proteínas en células verdes y alrededor de 30% para células rojas-naranjas con un alto contenido de carotenoides (Fimbres *et al.* 2010). Esta especie presenta además en su composición un porcentaje considerable de pigmentos como clorofila, así como un amplio rango de carotenoides y xantofilas incluyendo  $\beta$ -caroteno y luteína, los cuales por su actividad provitamínica tienen aplicación tanto en la industria alimentaria como en la farmacéutica (Hejazi *et al.* 2002).

*Dunaliella salina* se puede encontrar en una amplia gama de hábitats marinos, como los océanos, los lagos de salmuera, marismas y lagunas saladas cerca del mar, sobre todo en los cuerpos de agua que contienen más de 2 M de cloruro de sodio y altos niveles de magnesio (Ben-Amotz 2004). Esta especie es capaz de adaptarse a altas salinidades y tolerar un amplio rango de condiciones ambientales, incluyendo altas intensidades luminosas y temperaturas, así como deficiencias de nitrógeno y/o fósforo (López *et al.* 2013).

La disponibilidad de nutrientes y la luz son los principales factores que influyen sobre la fisiología de las microalgas. Mientras los nutrientes son necesarios para la síntesis de biomasa, la irradiancia y calidad de luz determina la cantidad de energía disponible para actividades metabólicas (Vásquez *et al.* 2013), incluso las microalgas pueden adaptarse a cambios de irradiancia, originando variaciones considerables en su composición bioquímica y metabolismo (Sánchez-Saavedra y Voltolina 2002).

Con base en lo anterior, la evaluación de microalgas de importancia comercial se lleva a cabo con la finalidad de obtener las condiciones óptimas que permitan optimizar la producción de biomasa en los cultivos, mediante la manipulación de la luz, pH, nutrientes, salinidad, temperatura, entre otros factores que pueden influir en el crecimiento y composición bioquímica de las mismas (Bermúdez *et al.* 2002). A fin de contribuir con el conocimiento de las respuestas fisiológicas de una cepa nativa *D. salina*, aislada de Araya, ante cambios en las condiciones de su entorno, se propuso evaluar el efecto combinado de la irradiancia y salinidad sobre su crecimiento, producción de pigmentos y composición bioquímica; buscando además, incrementar la variedad de especies de microalgas nativas, de interés comercial, que puedan servir como fuentes de bioproducción para compuestos bioactivos, biomasa y metabolitos de aplicación en la industria de alimentos funcionales, farmacéuticos y biomedicina.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Aislamiento e identificación de la cepa de *Dunaliella salina*

La cepa de *D. salina* fue aislada a partir de muestras de agua provenientes de las salinas de Araya, estado Sucre, Venezuela (10° 37' N; 64° 17' W), siguiendo la técnica de rayado en placas con agar (Andersen 2005). Para su identificación, se usaron criterios morfológicos, fisiológicos y ultraestructurales, siguiendo recomendaciones de Masyuk (1973). Después de su aislamiento, la cepa se ha mantenido en el Banco de Germoplasma de Algas de la Universidad de Oriente, Venezuela, con el código BGAUDO-20, bajo condiciones controladas de laboratorio (23  $\pm$  1°C, 100  $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , fotoperiodo de 12 h luz: 12 h oscuridad) en medio f/2 Guillard (Guillard 1975) a 37 y 250 UPS.

### Condiciones de cultivo

La cepa de *D. salina* se sometió a un periodo de aclimatación durante 30 d, en el cual la microalga se cultivó en medio f/2 Guillard (0,88  $\text{mmol.L}^{-1}$  de nitrógeno) a 27  $\pm$  2°C, pH de 7,8; fotoperiodo 12 h luz: 12 h oscuridad, aireación continua (150  $\text{mL.L}^{-1}$ ) y en dos diferentes salinidades (40 y 250 UPS) e irradiancias (195 y 295  $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). Posteriormente, se realizaron por triplicado, durante 22 d, cultivos discontinuos (2,5 L) a las mismas condiciones señaladas anteriormente, usando un inóculo de 10<sup>5</sup>  $\text{cel.mL}^{-1}$ .

### Parámetros de crecimiento, tamaño, biomasa celular y composición bioquímica

La evaluación de la densidad celular se realizó cada 24 h, para lo cual se tomaron muestras (1 mL), por triplicado de cada tratamiento, y se fijaron con 50  $\mu\text{L}$  de una solución de lugol al 10% para realizar el recuento celular por microscopía óptica, utilizando un hematocitómetro Neubauer de 0,01 mm de profundidad. Con los datos obtenidos se elaboraron las curvas de crecimiento y a partir de éstas se determinaron las tasas instantáneas de crecimiento (K), siguiendo las recomendaciones en Madigan *et al.* (1999).

La determinación de la biomasa seca se realizó al final del ensayo mediante el sistema de filtración Millipore®, para lo cual se filtraron 5 mL, por quintuplicado, de cada cultivo a través de filtros de fibra de vidrio de Whatman GF/C (1,2  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro), y posteriormente se lavaron con 5 mL de formiato de amonio, 0,5  $\text{mmol.L}^{-1}$  (pH 7,5) y secados hasta masa constante a tratamiento de 60°C.

La longitud de las células de *D. salina* se determinó al final del ensayo, midiendo un total de 100 células de cada tratamiento, usando un microscopio óptico con micrómetro ocular incorporado, bajo un aumento de 400X.

Las muestras para los análisis bioquímicos (5 mL, por triplicado) se recolectaron al final del ensayo, se centrifugaron a 4.000 rpm durante 15 min y los *pellets* resultantes se conservaron a -20°C, hasta el momento de los análisis bioquímicos. Los pigmentos se extrajeron a partir de los *pellets* de las microalgas, utilizando una mezcla acetona: agua (90%). La determinación se realizó por espectrofotometría, usando las ecuaciones descritas en Strickland y Parsons (1960) y Jeffrey y Humphrey (1975) para la cuantificación de carotenoides totales y clorofila *a*, respectivamente.

La identificación y cuantificación del  $\beta$ -caroteno se realizó de acuerdo a Romero *et al.* (2008), mediante cromatografía de líquidos de alta eficacia, HPLC, a una longitud de onda de 440 nm, haciendo uso de un patrón comercial de  $\beta$ -caroteno (Sigma St Louis, Mo, USA.) que permitió calcular el factor de respuesta y el tiempo de retención, identificar el pico correspondiente a dicho caroteno en los cromatogramas de las fracciones separadas y calcular su concentración en ng.mL<sup>-1</sup>. Esta concentración, al dividirse por la densidad celular correspondiente a 1 mL y multiplicarse por 1000, quedó expresada en pg.cel<sup>-1</sup> (Vidussi *et al.* 1996). Se utilizó un HPLC analítico marca HP, serie 1050 con detector UV-Visible, equipado con una columna de acero inoxidable de 10 cm x 4,6 mm de diámetro interno, empacada con C8 MOS Hypersil (5  $\mu$ m de tamaño de partícula). Los pigmentos se eluyeron sucesivamente con acetona:metanol (50:50) durante 1 min; metanol por 18 min y acetona:metanol (75:25) por 1 min a un flujo de 1 mL.min<sup>-1</sup>. El volumen de inyección fue de 20  $\mu$ L.

Los proteínas se analizaron de acuerdo Lowry *et al.* (1951), los lípidos según Bligh y Dyer (1959) y Marsh y Weinstein (1966) y los carbohidratos por el método descrito en Dubois *et al.* (1956), utilizando como estándares albúmina bovina, tripalmitina y D-glucosa, respectivamente.

#### Análisis estadísticos

Los datos de los parámetros de crecimiento, talla, biomasa, y contenidos de pigmentos, proteínas, lípidos y carbohidratos se analizaron usando un ANOVA doble (irradiancias y

salinidades) a un nivel del 0,05% de confiabilidad (Sokal y Rohlf 1995).

## RESULTADOS

### Parámetros de crecimiento, tamaño y biomasa celular

El crecimiento de *D. salina* mostró diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre las distintas salinidades e irradiancias y su interacción. El aumento de la salinidad conjuntamente con la irradiancia produjo un descenso de la densidad celular desde  $1,6 \pm 0,02 \times 10^6$  cel.mL<sup>-1</sup> (40 UPS y  $195 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) hasta  $0,3 \pm 0,02 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup> (250 UPS y  $295 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Similarmente, la tasa de crecimiento instantáneo disminuyó al aumentar la salinidad e irradiancia. La longitud celular mostró diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) solo en las salinidades, observándose que las células de *D. salina* se hicieron más grandes ( $19,4 \pm 0,72 \mu\text{m}$ ) en la mayor salinidad probada (Tabla 1).

La biomasa celular fue influenciada significativamente ( $P < 0,05$ ) por la salinidad y la irradiancia y su interacción, encontrándose que al aumentar la salinidad e irradiancia, este parámetro se incrementó, llegando a alcanzar un valor máximo de  $1478,1 \pm 0,87 \text{ pg.cel}^{-1}$  a 250 UPS y  $295 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (Tabla 1).

### Contenido de pigmentos

El contenido de pigmentos presentó diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre las diferentes salinidades e irradiancias y su interacción. El incremento de la salinidad y de la irradiancia produjo una disminución del contenido de clorofila *a*, observándose sus mayores valores ( $30,4 \pm 0,7 \text{ pg.cel}^{-1}$ ) a 40 UPS y  $195 \mu\text{mol photons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Lo contrario se observó con los carotenoides totales,  $\beta$ -caroteno y la relación carotenoides/clorofila *a*, los cuales alcanzaron sus valores máximos de  $58,6 \pm 0,41 \text{ pg.cel}^{-1}$ ;  $27,8 \pm 1,4 \text{ pg.cel}^{-1}$  (1,9% con base a masa seca) y 10,1; respectivamente en la mayor salinidad e irradiancia evaluada (Tabla 2).

### Contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos

Los componentes bioquímicos analizados en los cultivos de *D. salina* mostraron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre las distintas salinidades e irradiancias y su interacción. Se observa que el incremento de la salinidad e irradiancia produjo un aumento en la acumulación de las proteínas, lípidos y carbohidratos, los cuales alcanzaron los mayores

contenidos de  $383,9 \pm 2,57$  pg.cel<sup>-1</sup> (26% con respecto a la masa seca);  $241,1 \pm 0,96$  pg.cel<sup>-1</sup> (16% con respecto a la masa seca) y  $742,9 \pm 2,48$

pg.cel<sup>-1</sup> (50% con respecto a la masa seca), respectivamente en 250 UPS y  $295 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (Tabla 2).

Tabla 1. Parámetros de crecimiento, talla y biomasa celular de una cepa de *Dunaliella salina*, aislada de las salinas de Araya, Venezuela, cultivada en diferentes salinidades (40 y 250 UPS) e irradiancias (195 y 295  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). Subíndices iguales en una misma fila indican diferencias no significativas ( $P < 0,05$ ).

Salinidad (UPS)	40		250	
	195	293	195	293
Irradiancias ( $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ )				
Dmax (cel.L <sup>-1</sup> x 10 <sup>6</sup> )	$1,6 \pm 0,02^a$	$1,0 \pm 0,03^b$	$0,5 \pm 0,03^c$	$0,3 \pm 0,02^d$
K (div.días <sup>-1</sup> )	$0,3 \pm 0,03^a$	$0,4 \pm 0,02^b$	$0,2 \pm 0,02^c$	$0,1 \pm 0,01^d$
Longitud ( $\mu\text{m}$ )	$9,7 \pm 0,31^a$	$10,4 \pm 0,58^a$	$18,4 \pm 2,91^b$	$19,4 \pm 0,72^b$
Biomasa (pg.cel <sup>-1</sup> )	$112,3 \pm 1,52^a$	$118,3 \pm 3,90^b$	$1402,6 \pm 8,79^c$	$1478,1 \pm 0,87^d$

Tabla 2. Contenido de pigmentos, proteínas, lípidos y carbohidratos (pg.cel<sup>-1</sup>) de una cepa de *Dunaliella salina* aislada de las salinas de Araya, Venezuela, cultivada en diferentes salinidades (40 y 250 UPS) e irradiancias (195 y 295  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). Subíndices iguales en una misma fila indican diferencias no significativas ( $P < 0,05$ ).

Salinidad (UPS)	40		250	
	195	293	195	293
Irradiancias ( $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ )				
Clorofila <i>a</i>	$30,4 \pm 0,70^a$	$12,4 \pm 0,80^b$	$6,2 \pm 0,15^c$	$5,8 \pm 0,27^d$
Carotenoides totales	$1,2 \pm 0,15^a$	$3,2 \pm 0,10^b$	$5,3 \pm 0,08^c$	$58,6 \pm 0,41^d$
β-caroteno	$0,1 \pm 0,01^a$	$1,2 \pm 0,05^b$	$2,2 \pm 0,10^c$	$27,8 \pm 1,40^d$
Carotenoides/Clorofila <i>a</i>	0,04	0,30	0,90	10,10
Proteínas totales	$40,5 \pm 0,66^a$	$39,8 \pm 1,72^b$	$363,5 \pm 2,95^c$	$383,9 \pm 2,57^d$
Lípidos totales	$11,1 \pm 0,20^a$	$16,3 \pm 0,38^b$	$224,1 \pm 2,00^c$	$241,1 \pm 0,96^d$
Carbohidratos totales	$29,2 \pm 0,90^a$	$33,2 \pm 0,61^b$	$546,2 \pm 1,90^c$	$742,9 \pm 2,48^d$

## DISCUSIÓN

La cepa de *D. salina*, al ser expuesta a estrés salino y lumínico, modifica su contenido de pigmentos, proteínas, carbohidratos y lípidos, así como su tamaño y parámetros de crecimiento, lo cual ha sido previamente reportado para esta especie por otros autores (Ginzburg y Ginzburg 1981, Loeblich 1982, Al-HaSan *et al.* 1987).

El crecimiento poblacional de *D. salina* disminuyó significativamente al aumentar la salinidad y la irradiancia en los cultivos. Resultados similares fueron encontrados por Cowan *et al.* (1992), quienes demostraron que las condiciones hipersalinas (1,5-4 M de NaCl) disminuyen el crecimiento celular de esta microalga. De igual forma, Serpa y Calderón (2005), Dipak y Lele (2005), García *et al.* (2007) y Hosseinzadeh *et al.* (2012) evidenciaron disminución del crecimiento de diferentes cepas de *D. salina* al ser expuestas a altas salinidades.

El tamaño y la masa celular de *D. salina* se vieron incrementados con el aumento de la salinidad. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por García *et al.* (2007), quienes

encontraron que estas variables tienden a incrementarse en esta microalga al aumentar la salinidad del medio de cultivo. Fimbres *et al.* (2010) sostiene que el incremento en el tamaño y masa celular también puede ser debido a la deficiencia de nitrógeno, situación que pudiera estar ocurriendo en esta investigación, dado que los cultivos de la nueva cepa de *D. salina* se hizo en un medio con deficiencia de nitrato (0,88 mmol.L<sup>-1</sup>). Estos cambios en *D. salina* expuesta a altas salinidades están bien documentados y se deben al proceso de osmoregulación, mediante el cual las células regulan el incremento de soluto en el medio a través de la síntesis interna de glicerol (Avron y Ben-Amotz 1992, Raja *et al.* 2007). De hecho, la acumulación de glicerol en esta alga está regulada por la actividad de agua externa en lugar del efecto de un soluto específico (Shariati y Lilley 1994). En esta condición, el glicerol actúa como un soluto compatible que protege a las enzimas tanto de la inactivación como de la inhibición (Telfer 2002).

Las mayores concentraciones de clorofila *a* se obtuvieron en cultivos expuestos a bajas salinidades e irradiancias. Masuda *et al.* (2003) indicaron que bajas irradiancias inducen en las

células de *D. salina* el incremento de clorofila *a* con el fin de aumentar su capacidad de captación de luz. Por otra parte, los contenidos de carotenoides totales y  $\beta$ -caroteno mostraron una tendencia inversa a la clorofila *a*.

Los mayores contenidos de carotenoides totales ( $58,6 \pm 0,41$  pg.cel<sup>-1</sup>) se obtuvieron bajo las condiciones más estresantes evaluadas (250 UPS y 295  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). Marín *et al.* (1998) al evaluar una cepa de *D. salina*, procedente de una zona cercana al área de donde se aisló la cepa en estudio, encontraron contenidos de carotenoides totales entre 0,8-1,6 pg.cel<sup>-1</sup>. Está marcada diferencia en la acumulación de este pigmento puede deberse a las condiciones de cultivo utilizadas, dado que estos autores cultivaron a esta cepa de *D. salina* en niveles inferiores de salinidad (90-210 UPS) e irradiancia (80  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ).

La tendencia del incremento en la acumulación de pigmentos carotenoides en *D. salina* expuesta a altas salinidades e irradiancias pareciera ser un aspecto fisiológico común de esta especie, sin importar su origen geográfico (Cifuentes *et al.* 2001, Fazeli *et al.* 2005). Los contenidos de carotenoides aquí cuantificados son superiores a los de Romero *et al.* (2008), quienes reportan en *D. salina* cepa Coche, 24,8 pg.cel<sup>-1</sup>. Sin embargo, contenidos superiores de este pigmento han sido obtenidos en otras cepas de *D. salina*, por ejemplo Aguilar *et al.* (2004) y Guevara *et al.* (2005) reportaron valores en carotenoides totales de 124 pg.cel<sup>-1</sup> en *D. salina* (cepa Perú) y 106 pg.cel<sup>-1</sup> en *D. salina* (cepa Coche), respectivamente. Ellos señalan que al realizar cultivos de *D. salina* en condiciones ambientales extremas se puede lograr la obtención de mayores concentraciones en carotenoides. El incremento de los carotenoides en conjunto con la irradiancia han sido atribuidos a la síntesis de pigmentos fotoprotectores, como las xantofilas, diadinoxantinas y diatoxantinas los cuales juegan un rol fundamental en la prevención de daños al aparato fotosintético expuesto a elevadas irradiancias (Lavaud *et al.* 2002, Serpa y Calderón 2006).

Con respecto al contenido de  $\beta$ -caroteno, Borowitzka *et al.* (1990), Gómez *et al.* (1992), Lamers *et al.* (2010) y Arash *et al.* (2011) señalan que la acumulación de este pigmento por *D. salina* está fisiológicamente relacionada con la alta intensidad de luz y elevadas salinidades. En esta investigación el mayor contenido de  $\beta$ -caroteno (27,8 pg.cel<sup>-1</sup> = 1,9% con respecto a la masa seca = 47% con respecto a los carotenoides totales) se obtuvo a la mayor salinidad e

irradiancia ensayada, valores que son mayores que los obtenidos por Gómez *et al.* (1999), quienes al cultivar en el medio Provasoli las cepas chilenas CONC-001 y CONC-007 de *D. salina* y *D. bardawil*, obtuvieron concentraciones (con respecto al contenido de carotenoides totales) de 41,2; 16,8 y 46,2%, respectivamente. De igual forma, superan los valores obtenidos por Dipak y Lele (2005), quienes reportan 8,28 pg.cel<sup>-1</sup> en *D. salina* cultivada en alta irradiación y temperatura. Sin embargo, contenidos superiores de  $\beta$ -caroteno han sido reportados por Romero *et al.* (2008) en una cepa de *D. salina*, procedente de las salinas de Coche, Venezuela (54,3% con respecto al contenido de carotenoides totales) y por Loeblich (1982) en *D. salina*, UTEX 1644 (94% con respecto al contenido de carotenoides totales). La acumulación de  $\beta$ -caroteno en *D. salina* se cree que está relacionada con el efecto protector de este pigmento contra la producción de oxígeno singlete catalizada por la clorofila bajo alta irradiancia. También se ha propuesto la hipótesis de que el  $\beta$ -caroteno protege a la célula contra los daños de la alta irradiancia, al actuar como pantalla que absorbe el exceso de luz (Ben-Amotz y Avron 1983, 1989).

El aumento de los contenidos celulares de proteínas, lípidos y carbohidratos al incrementar la salinidad y la irradiancia en los cultivos del nuevo aislado de *D. salina* está en concordancia con lo referido por Ben-Amotz *et al.* (1982) y Al-HaSan *et al.* (1987). Estos investigadores observaron mayores valores de estas macromoléculas en cultivos hipersalinos, las cuales alcanzaron cifras de 30%, 18-22% y 11%, respectivamente.

Finalmente, a pesar de que se establecen comparaciones entre el contenido de carotenoides de diferentes cepas de *D. salina*, resulta difícil analizarlas en todos sus aspectos, debido a que las respuestas en el crecimiento de esta microalga, como lo informa Ben-Amotz (1980), están influenciadas por una serie de factores que interactúan entre sí.

Se concluye que el nuevo aislado de *Dunaliella salina*, procedente de las salinas de Araya, Venezuela, incrementa sus contenidos de proteínas, lípidos, carbohidratos, carotenoides totales y  $\beta$ -caroteno al ser cultivada a altas irradiancias y salinidades. Además, se evidenció la potencialidad que posee esta cepa para ser cultivada para la producción de  $\beta$ -caroteno.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR C, GONZÁLEZ M, CIFUENTES A, SILVA

- M. 2004. Growth and accumulation of total carotenoids in two strains of *Dunaliella salina* Teod. (Chlorophyceae) from the northern and central coast of Peru. *J. Chil. Chem. Soc.* 49(1):69-74.
- AL-HASAN R, GHANNOUM M, SALLAL A, ABU-ELTEEN K, RADWAN S. 1987. Correlative changes of growth, pigmentation and lipid composition of *Dunaliella salina* in response to halostress. *J. Gen. Microbiol.* 133(9):2607-2616.
- ANDERSEN R. 2005. *Algal Culturing Techniques*. Phycological Society of America, USA, pp. 578.
- ARASH F, AKSOZ N, AMIN M. 2011. Effect of salinity on cell growth and  $\beta$ -carotene production in *Dunaliella* sp. isolates from Urmia Lake in northwest of Iran. *Afr. J. Biotechnol.* 10(12):2282-2289.
- AVRON M, BEN-AMOTZ A. 1992. *Dunaliella: Physiology Biochemistry and Biotechnology*. In: AVRON M, BEN-AMOTZ A. (Eds.), CRC Press, USA, pp. 240.
- BEN-AMOTZ A. 1980. Glycerol production in the alga In: SAN PIETRO A. (Ed.) *Biochemical and photosynthetic aspects of energy production*. Academic Press, New York, USA, pp. 191-208.
- BEN-AMOTZ A. 2004. Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products-major Industrial species. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Edited by Amos Richmond, Iowa, USA, pp. 700.
- BEN-AMOTZ A, AVRON M. 1983. On the factors which determine massive  $\beta$ -carotene accumulation in the halotolerant alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiol.* 72(3):593-597.
- BEN-AMOTZ A, AVRON M. 1989. The wavelength dependence of massive carotene synthesis in *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae). *J. Phycol.* 25(1):175-178.
- BEN-AMOTZ A, KATZ A, AVRON M. 1982. Accumulation of  $\beta$ -carotene in halotolerant algae: Purification and characterization of  $\beta$ -carotene-rich globules from *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae). *J. Phycol.* 18(4):529-537.
- BERMÚDEZ J, LODEIROS C, MORALES E. 2002. Producción de biomasa de la microalga marina *Chroomonas* sp., en función del pH, intensidad luminosa y salinidad. *Bol. Investig. Mar. y Cost.* 31(1):167-185.
- BLIGH E, DYER W. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37(8):911-917.
- BOROWITZKA M, BOROWITZKA L, KESSLY D. 1990. Effects of salinity increase on carotenoid accumulation in the green alga *Dunaliella salina*. *J. Appl. Phycol.* 2(2):111-119.
- CIFUENTES A, GONZÁLEZ M, INOSTROZA I, AGUILERA A. 2001. Reappraisal of physiological attributes of nine strains of *Dunaliella* (Chlorophyceae): growth and pigment content cross a salinity gradient. *J. Phycol.* 37(2):334-344.
- COWAN A, ROSE P, HORNE L. 1992. *Dunaliella salina*: a model system for studying the response of plant cell to stress. *J. Exp. Bot.* 43(12):1535-1547.
- DIPAK S, LELE S. 2005. Carotenoid production from microalga, *Dunaliella salina*. *Indian J. Biotechnol.* 4(1):476-483.
- DUBOIS M, GILLES K, HALMILTON J, REBERS P, SMITH F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28(3):350-356.
- FAZELI M, TOFIGHI H, SAMADI N, JAMALIFAR H. 2005. Effects of salinity on  $\beta$ -carotene production by *Dunaliella tertiolecta* DCCBC26 isolated from the Urmia salt lake, north of Iran. *Bioresour. Technol.* 97(18):2453-2456.
- FIMBRES D, MERCADO L, MURGUÍA A, LÓPEZ J. 2010. Crecimiento y biomasa de *Dunaliella* sp. cultivada en medios limitantes en nitrógeno. *Biotecnia.* 12(3):60-66.
- GARCÍA F, FREILE-PELEGRIN Y, ROBLEDO D. 2007. Physiological characterization of *Dunaliella* sp. (Chlorophyta, Volvocales) from Yucatan, Mexico. *Bioresour. Technol.* 98(7):1359-1365.
- GINZBURG M, GINZBURG B. 1981. Interrelationships of light, temperature, sodium chloride and carbon source in growth of halotolerant and halophilic

- strains of *Dunaliella*. Br. Phycol. J. 16(3):313-324.
- GÓMEZ J, RAMAZANOV Z, FONTES A, GARCÍA G. 1992. Photosynthetic characteristics of *Dunaliella salina* (Chlorophyceae, Dunaliellales) in relation to  $\beta$ -carotene content. J. Appl. Phycol. 4(1):11-15.
- GÓMEZ P, GONZÁLEZ M, BECERRA J. 1999. Quantity and quality of  $\beta$ -carotene produced by two strains of *Dunaliella salina* (teodoresco 1905) from the North of Chile. Bol. Soc. Chil. Quim. 44(4):463-468.
- GUEVARA M, LODEIROS C, GÓMEZ O, LEMUS N, NÚÑEZ M, ROMERO L, VÁSQUEZ A, ROSALES N. 2005. Carotenogénesis de cinco cepas del alga *Dunaliella* sp. (Chlorophyceae) aisladas de lagunas hipersalinas de Venezuela. Int. J. Trop. Biol. 53(3-4):331-337.
- GUILLARD R. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: SMITH W, CHANLEY M. (Eds.) Culture of Marine Invertebrate Animals. Plenum Press, New York, USA, pp. 26-60.
- HEJAZI M, DE LAMARLIERE C, ROCHA J, VERMUE M, TRAMPER J, WIJFFELS R. 2002. Selective extraction of carotenoids from the alga *Dunaliella salina* with retention of the viability. Biotech. Bioeng. 79(1):29-36.
- HOSSEINZADEH G, HEJAZI M, NAZERI S, BARZEGARI A. 2012. Characterization of an indigenous isolate, *Dunaliella tertiolecta* ABRINW-G3, from Gavkhooni Salt Marsh in Iran based on molecular and some morpho-physiological attributes. J. Agr. Sci. Tech. 14(7):1579-1590.
- JEFFREY S, HUMPHREY G. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c* and *c*<sub>2</sub> in higher plants, algae and natural phytoplankton. Biochem. Physiol. Pflanz. 167(1):191-194.
- LAMERS P, VAN DE LAAK C, KAASENBROOD P, LORIER J, JANSSEN M, DE VOS R, BINO R, WIJFFELS R. 2010. Carotenoid and fatty acid metabolism in light-stressed *Dunaliella salina*. Biotech. Bioeng. 106(4):638-648.
- LAVAUD J, ROUSSEAU B, GORKOM V, ETIENNE A. 2002. Influence of the diadinoxanthin pool size on photoprotection in the marine planktonic diatom *Phaeodactylum tricorutum*. Plant Physiol. 129(3):1398-1406.
- LOEBLICH L. 1982. Photosynthesis and pigments influenced by light intensity and salinity in the halophile *Dunaliella salina* (Chlorophyta). J. Mar. Biol. Ass. UK, 62(3):493-508.
- LÓPEZ J, FIMBRES D, MEDINA L, MIRANDA A, MARTÍNEZ L, MOLINA D. 2013. Producción de biomasa y carotenoides de *Dunaliella tertiolecta* en medios limitados en nitrógeno. Oyton, 82(1):23-30.
- LOWRY O, ROSEBROUGH H, FARR A, RANDALL R. 1951. Protein measurement with the folin-phenol reagent. J. Biol. Chem. 193(1):265-275.
- MADIGAN M, MARTINKO J, PARKER J. 1999. Brock: Biología de los microorganismos. Prentice May, Madrid, España, pp. 776.
- MARÍN N, MORALES F, LODEIROS C, TAMIGNEAUX E. 1998. Effects of nitrate concentrations on the growth and pigment synthesis of a wild strain of *Dunaliella salina* preadapted to different salinities and cultivated under low illumination. J. Applied Phycol. 10(4):405-411.
- MARSH J, WEINSTEIN D. 1966. Simple charring method for determination of lipids. J. Lipids Res. 7(4):574-592.
- MASUDA T, TANAKA A, MELIS A. 2003. Chlorophyll antenna size adjustments by irradiance in *Dunaliella salina* involve coordinate regulation of chlorophyll *a* oxygenase (*CAO*) and *Lhcb* gene expression. Plant Mol. Biol. 51(5):757-771.
- MASYUK N. 1973. Morphology, taxonomy, ecology and geographic distribution of the Genus *Dunaliella* Teod. and prospects for its potential utilization. Naukova Dumka, Kiev, URSS, pp. 244.
- RAJA R, HEMA S, BALASUBRAMANYAN D, RENGASAMY R. 2007. PCR-Identification of *Dunaliella salina* (Volvocales, Chlorophyta) and its growth characteristics. Microbiol. Res. 162(2):168-176.
- ROMERO L, GUEVARA M, D'ARMAS H, LODEIROS C. 2008. Cuantificación de carotenoides totales y  $\beta$ -caroteno en dos

- cepas de *Dunaliella salina* (Chlorophyta, Volvocales) aisladas de lagunas hipersalinas de Venezuela. Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela. 47(1):67-76.
- SÁNCHEZ-SAAVEDRA M, VOLTOLINA D. 2002. Effects of photon fluence rates of white and blue-green light on growth efficiency and pigment content of three diatom species in batch culture. Ciencias Mar. 28(3):273-279.
- SERPA R, CALDERÓN A. 2005. Efecto del estrés por salinidad en cuatro cepas de *Dunaliella salina* Teod. en el Perú. Ecol. Aplic. 4(1-2):127-133.
- SERPA R, CALDERÓN A. 2006. Efecto de diferentes fuentes de nitrógeno en el contenido de carotenoides y clorofila de cuatro cepas peruanas de *Dunaliella salina* TEOD. Ecol. Aplic. 5(1-2):93-99.
- SHARIATI M, LILLEY R. 1994. Loss of intracellular glycerol from *Dunaliella* by electroporation at constant osmotic pressure: Subsequent restoration of glycerol content and associated volume changes. Plant Cell Environ. 17(12):1295-1304.
- SOKAL R, ROHLF F. 1995. Biometry. FREEMAN W. (Ed.). H. Blume Ediciones, New York, USA, pp. 887.
- STRICKLAND D, PARSONS T. 1960. A Manual of sea water analysis. Bull. Fish. Res. Bd. Canada. 125(1):310.
- TELFER A. 2002. What is  $\beta$ -carotene doing in the photosystem II reaction centre? Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 357(1426):1431-1439.
- VÁSQUEZ A, GUEVARA M, GONZÁLEZ M, CORTEZ R, ARREDONDO-VEGA B. 2013. Crecimiento y composición bioquímica de *Thalassiosira pseudonana* (Thalassiosirales: Thalassiosiraceae) bajo cultivo semi-continuo en diferentes medios y niveles de irradiancias. Int. J. Trop. Biol. 61(3):1003-1013.
- VIDUSSI F, CLAUSTRÉ H, BUSTILLOS J, CAILLIAU C, MARTY J. 1996. Determination of chlorophylls and carotenoids of marine phytoplankton. Separation of chlorophyll *a* from divinyl chlorophyll *a* and zeaxanthin from lutein. J. Plankton. Res. 18(2):237-282.
- WIJFFELS R, KRUSE O, HELLINGWERF K. 2013. Potential of industrial biotechnology with cyanobacteria and eukaryotic microalgae. Curr. Opin. Biotechnol. 24(3):405-413.