

## Crecimiento y biomasa de *Dunaliella* sp. cultivada en medios limitantes en nitrógeno

Diana Fimbres Olivarría<sup>1</sup>

Lauro Rufino Mercado Castillo<sup>2</sup>

Álvaro Murguía López<sup>3</sup>

José Antonio López Elías<sup>4</sup>

### RESUMEN

Las microalgas se han empleado en la alimentación del ser humano y en la acuicultura para alimentar diversos organismos marinos, es por ello que el objetivo de la investigación fue evaluar la producción de biomasa de *Dunaliella* sp. en medios limitantes en nitrógeno. Los cultivos se realizaron en garrafones con 15 L, por cuadruplicado en condiciones de laboratorio en medios limitantes de nitrógeno (f/4, f/6 y f/8) en comparación con un medio control (f/2). Los cultivos fueron crecidos por 10 días con aireación e iluminación constante, diariamente se realizaron conteos celulares, medición de luz, temperatura y pH. La biomasa fue determinada en la fase logarítmica final y estacionaria. Se encontró que las concentraciones celulares fueron mayores en el medio control con un promedio de  $1.2 \times 10^6$  cél/mL, mientras que en los medios limitantes (f/6 y f/8) se alcanzó

en promedio una concentración entre 0.5 y  $0.3 \times 10^6$  cél/mL. La producción de biomasa aumentó de 100 a 436 pg/cél conforme disminuyó la cantidad de nitrógeno en el cultivo. Se concluye que en los medios limitantes de nitrógeno, las células incrementan su biomasa en comparación con el control.

*Palabras clave:* medios de cultivo, *Dunaliella*, biomasa, medio limitante en nitrógeno

### ABSTRACT

Microalgae are used as food for human being and in aquaculture to feed diverse marine organisms. The aim of this investigation was evaluated biomass production of *Dunalella* sp. in limited nitrogen mediums. Cultures were carried out on quadruplicate 15 L carboys, under laboratory conditions with mediums limited in N (f/4, f/6 y f/8)

<sup>1</sup> Estudiante del Posgrado en Biociencias del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora. Correo electrónico diana.fimbreso@a2004.uson.mx

<sup>2</sup> Técnico Académico general del DICTUS, participante en congresos nacionales e internacionales. Actualmente técnico del laboratorio de microalgas del DICTUS.

<sup>3</sup> Técnico Académico general del DICTUS, con publicaciones a nivel nacional, participante en congresos nacionales e internacionales. Actualmente Encargado del cepario de microalgas del DICTUS.

<sup>4</sup> Profesor investigador titular C del DICTUS, perfil promep, con publicaciones diversas a nivel nacional e internacional, formación de estudiantes a nivel licenciatura y maestría en ciencias. Actualmente Presidente de la Academia de Acuicultura.

compared with a control medium (f/2). The cultures were grown for 10 days with aeration and constant illumination. The cell density, light intensity, temperature and pH were measured daily. The biomass was determined in the final log and stationary phases. It was found that the highest cell concentrations were recorded in the control with an average of  $1.2 \times 10^6$  cells/mL, while the mediums f/6 and f/8 reached an average concentration between  $0.5$  and  $0.3 \times 10^6$  cells/mL. Biomass production at the end of the cultures increased from 100 to 436 pg/cell while nitrogen concentration decreased. In conclusion N limited medium produced more biomass than a control medium.

Keywords: Culture medium, *Dunaliella*, biomass, medium limited in N.

## INTRODUCCIÓN

El fitoplancton marino tiene un papel clave en la productividad de los océanos constituyendo la base de la cadena alimenticia (Thurman y Trujillo, 1997; Miranda y col., 1998). Así mismo, las microalgas constituyen la base nutritiva de los organismos cultivados en las primeras etapas de vida (Bermudez y col., 2002).

Las microalgas contienen una amplia variedad de componentes químicos entre los que se encuentran los carotenoides, ficobilinas, ácidos grasos, polisacáridos, vitaminas, minerales, esteroides y otros compuestos biológicamente activos (Rema y Gouveia, 2005; Yaşar y Şevket, 2006), por lo que han sido utilizadas durante mucho tiempo para la alimentación animal y humana (García-González y col., 2005). En base a lo anterior, la evaluación de microalgas de importancia comercial se lleva

a cabo con la finalidad de obtener las condiciones óptimas que permitan alcanzar una mayor 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 (Bermudez y col., 2002).

Uno de los géneros de microalgas más utilizados por su importancia comercial en la obtención de compuestos bioactivos es *Dunaliella*; los organismos de éste género contienen entre 50 y 60% de proteína en células verdes en base al peso seco y alrededor de 30% para células rojas con un alto contenido de carotenoides. Las especies de *Dunaliella* presentan 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 (Hernández-Nazario y col., 1999). Para obtener una mayor producción de biomasa en estos organismos, se recomiendan los cultivos semicontinuos, en los cuales se mejora la eficiencia en la productividad y la composición bioquímica debido a la tasa de renovación de agua y de los nutrientes (Bermudez y col., 2002).

Diversos estudios han demostrado que la producción de carotenoides en *Dunaliella* puede optimizarse mediante variaciones de salinidad, intensidad luminosa, temperatura y limitación de nutrientes (Guevara y col., 2005). Uno de los nutrientes más importantes en el crecimiento de las microalgas, es el nitrógeno (Serpa-Ibáñez y Calderón-Rodríguez, 2006), por lo que es importante

evaluar la influencia de éste elemento en el crecimiento poblacional y composición bioquímica de las células (Bermudez y col., 2002). La presente investigación tuvo como objetivo evaluar el crecimiento y la biomasa celular en cultivos masivos de *Dunaliella* sp. bajo condiciones de laboratorio, empleando medios de cultivo limitantes en nitrógeno para producir células con mayor biomasa, que pueden ser fuente de compuestos antioxidantes.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La especie seleccionada para esta investigación fue la microalga marina *Dunaliella* sp. Los cultivos se mantuvieron por cuadruplicado en el laboratorio de acuicultura del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora en garrafones de 20 litros de capacidad, conteniendo 15 litros de cultivo con aireación, temperatura e iluminación constantes. Los medios de cultivo utilizados fueron el medio f/2 de Guillard y Ryther (1962) como medio control (nitratos: 75 mg/L) y los medios f/4 (37.5 g/L), f/6 (25 g/L) y f/8 (18.75 g/L) como medios limitantes en nitrógeno; el resto de los componentes (minerales y vitaminas) se mantuvieron en las mismas concentraciones que en el medio f/2. Los cultivos crecidos con los medios f/2 y f/4 se inocularon con 50,000 cél/mL, mientras que f/6 y f/8 fueron inoculados con

40,000 y 30,000 cél/mL respectivamente, debido a que la limitación mayor de N, provocó que no se alcanzaran a tener concentraciones celulares elevadas. Los cultivos fueron mantenidos por 10 días, diariamente se realizaron conteos celulares, además se midieron luz, temperatura y pH, al final de la fase logarítmica y en la fase estacionaria se estimó la biomasa en picogramos por célula (pg/cél). La temperatura fue medida con un termómetro de mercurio convencional (-20 a 110°C), la iluminación con un fotómetro marca Extech Instruments y el pH con un potenciómetro portátil marca Hanna Instruments pHep, previamente calibrado con buffers de 7.0 y 10.0. Los conteos celulares se llevaron a cabo con un hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad en un microscopio compuesto a 10x y muestras fijadas con lugol al 1% (Andersen, 2005). La biomasa se determinó gravimétricamente, por diferencia de peso entre el filtro sin y con muestra de microalga secada en una estufa de laboratorio convencional a 60°C por 6-8 horas (Sorokin, 1973), para lo cual se filtraron por duplicado entre 150 y 250 mL de cultivo en

filtros GFC de fibra de vidrio previamente precaliбрados. En la determinación de cenizas se usó una mufla a 480°C por 8 horas, y la materia orgánica fue obtenida mediante la diferencia del peso seco y las cenizas. La información de la concentración celular fue tratada con estadística descriptiva (pro-

*Uno de los géneros de microalgas más utilizados por su importancia comercial en la obtención de compuestos bioactivos es Dunaliella; los organismos de éste género contienen entre 50 y 60% de proteína en células verdes en base al peso seco y alrededor de 30% para células rojas con un alto contenido de carotenoides.*

medio, desviación estándar), además se realizó un análisis de varianza de dos vías (medios de cultivo y edad) para determinar las diferencias entre tratamientos en cuanto a la concentración celular y la biomasa seca. El análisis de pendientes se llevó a cabo utilizando una comparación de regresión lineal simple (Zar, 1999).

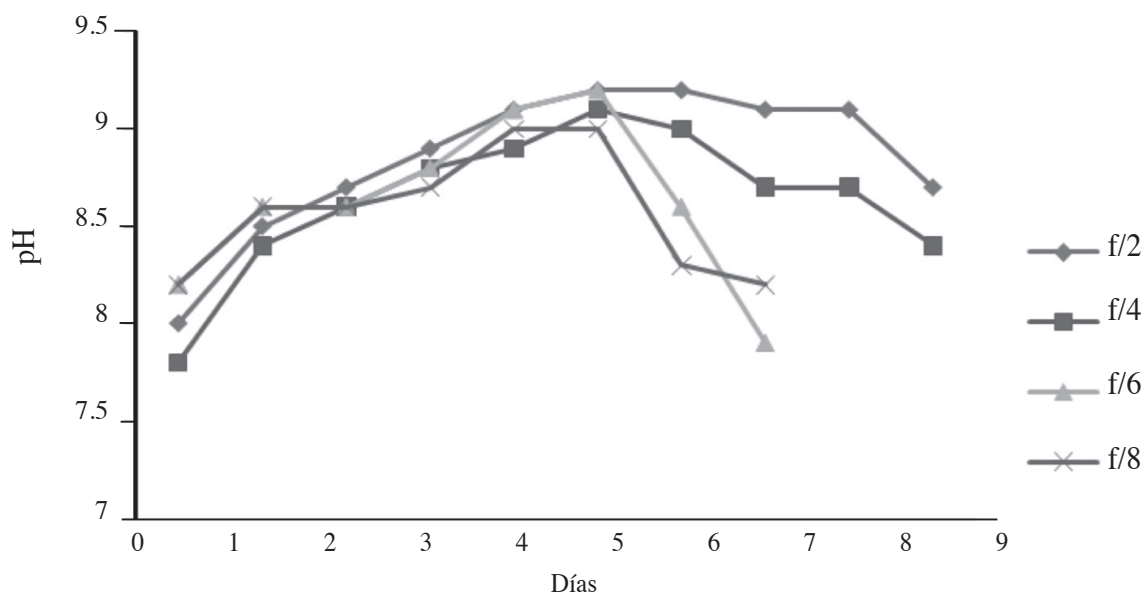
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Temperatura y pH

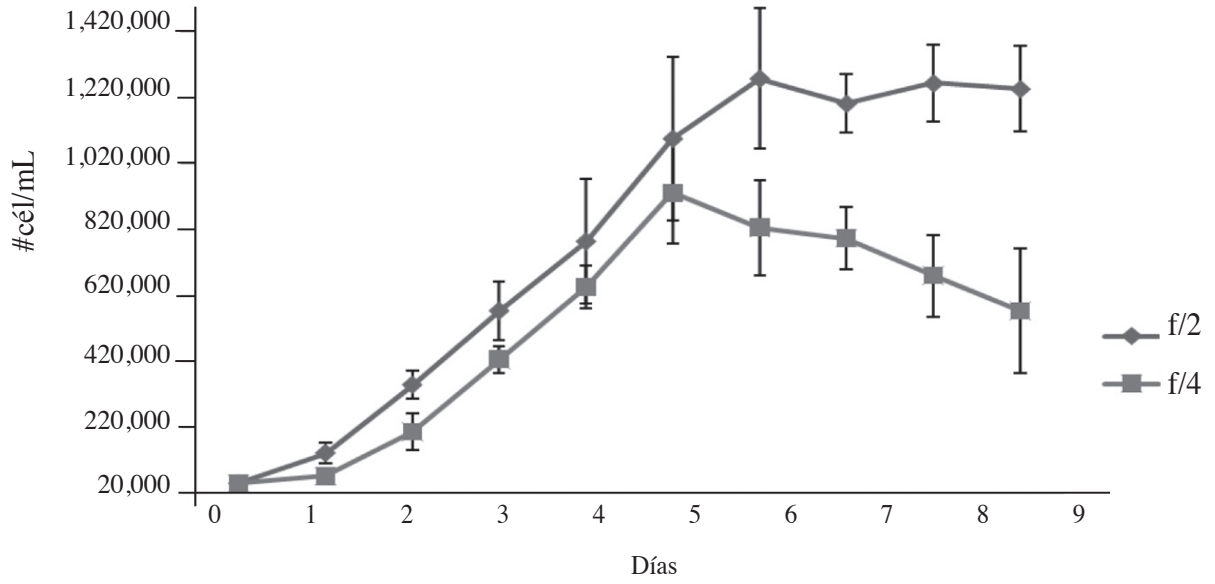
La iluminación en los medios de cultivo se mantuvo constante, mientras que la temperatura varió mínimamente en un rango entre  $26 \pm 1$  °C, lo cual teóricamente no debió tener efectos en el crecimiento, ya que con diversos estudios se ha demostrado que las especies de *Dunaliella* poseen un

amplio rango de tolerancia a la temperatura, con un intervalo óptimo de crecimiento entre 20 y 40 °C (García-González y col., 2000). Por ejemplo, Abu-Rezq y col. (2010), cultivaron dos cepas de *D. salina* a diferentes temperaturas, observando que el patrón de crecimiento decrecía conforme aumentaba la temperatura, lo cual indicó que el rango óptimo para estas microalgas se encuentra entre 20 y 32 °C. En lo que respecta al pH, éste tendió a aumentar del principio al final de los cultivos con un valor inicial de 8.7 y final de 9.0 (Fig. 1), atribuyéndose este aumento al efecto de la fotosíntesis principalmente (Riley y Chester, 1971). Ben-Amotz (1989) afirma que el pH óptimo para el crecimiento de *Dunaliella* se encuentra entre 7.0 y 9.0, lo cual coincide con este estudio en donde el máximo crecimiento se observó un pH cercano a 9.0.

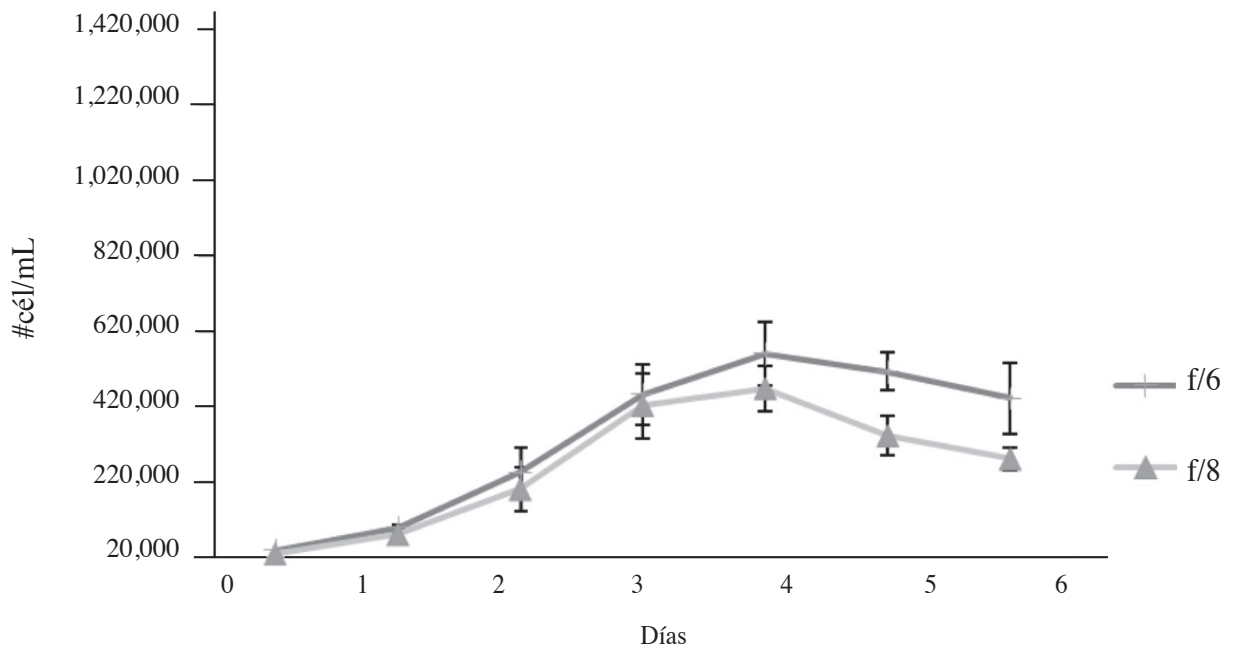
**Figura 1.** Fluctuación diaria del pH en los cultivos crecidos con los medios de cultivo f/2, f/4, f/6 y f/8.



**Figura 2.** Concentraciones celulares diarias de los medios de cultivo f/2 y f/4.



**Figura 3.** Concentraciones celulares diarias de los medios de cultivo f/6 y f/8.



### Concentraciones celulares

El crecimiento de los cultivos fue relativamente constante y ascendente hasta el día 5 y 6 en los medios f/2 y f/4, mientras que los otros dos medios ascendieron suavemente y con concentraciones celulares más bajas (Figs. 2 y 3). Las concentraciones celulares alcanzadas en las fases logarítmica final y estacionaria de los tratamientos (f/4, f/6 y f/8) fueron menores en comparación con el medio control (f/2) ( $F=102.78$ ,  $p < 0.0001$ ). La máxima densidad celular en el medio f/2 fueron ligeramente mayores de  $1.2 \times 10^6$  cél/mL, mientras que en el medio f/4 se mantuvo entre  $0.7$  y  $0.8 \times 10^6$  cél/mL y en los medios f/6 y f/8 fluctuó entre  $0.3$  y  $0.5 \times 10^6$  cél/mL (Tabla I). En investigaciones realizadas por Vásquez-Suárez y col. (2007) con *D. salina*, se obtuvieron concentraciones entre  $0.36$  y  $1.6 \times 10^6$  cél/mL, lo cual concuerda con esta investigación.

Al evaluar el desarrollo de los cultivos mediante un análisis de pendiente no se encontraron diferencias significativas ( $P \geq 0.05$ ) en el crecimiento inicial, entre el medio control y los medios f/4, f/6 y f/8, mientras que en el crecimiento final existieron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los medios f/2-f/4 ( $t=2.72$ ) y f/2-f/8 ( $t=2.44$ ).

### Producción de biomasa seca

La producción de biomasa por célula fue aumentando de 100 a 436 pg/cél conforme se disminuía la cantidad de nitrógeno en el medio de cultivo (Tabla II). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Fabregas y col (1985), en donde la producción de biomasa se ve afectada por la concentración de nutrientes.

**Tabla 1.** Concentración celular de los medios de cultivo f/2, f/4, f/6 y f/8 en las fases logarítmica final y estacionaria

Medio	No. Cél/mL	
	Logfinal	Estacionaria
f/2	1,202,125 <sup>e</sup> (±88,412)	1,246,875 <sup>e</sup> (±129,271)
f/4	793,125 <sup>d</sup> (±95,145)	685,416 <sup>d</sup> (±190,153)
f/6	512,812 <sup>c</sup> (±49,438)	442,187 <sup>bc</sup> (±95,571)
f/8	343,125 <sup>b</sup> (±53,234)	281,250 <sup>a</sup> (±28,596)

Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

**Tabla 2.** Peso seco, cenizas y materia orgánica (en picogramos/célula) de los medios de cultivo f/2, f/4, f/6 y f/8 en las fases logaritmo final y estacionaria.

Medio	Peso seco		Cenizas		MO	
	Logfinal	Estacionaria	Logfinal	Estacionaria	Logfinal	Estacionaria
f/2	100.83 <sup>a</sup> (±11.75)	103.78 <sup>a</sup> (±15.19)	28.32 <sup>a</sup> (±3.77)	31.52 <sup>a</sup> (±3.25)	72.50 <sup>a</sup> (±10.32)	72.25 <sup>a</sup> (±12.30)
f/4	139.03 <sup>b</sup> (±20.9)	288.31 <sup>cd</sup> (±83.4)	54.20 <sup>b</sup> (±15.04)	136.57 <sup>cd</sup> (±65.95)	84.83 <sup>b</sup> (±15.22)	151.74 <sup>d</sup> (±17.75)
f/6	164.28 <sup>b</sup> (±24.69)	318.16 <sup>d</sup> (±69.48)	62.64 <sup>b</sup> (±14.00)	154.37 <sup>d</sup> (±52.44)	101.65 <sup>c</sup> (±12.11)	163.80 <sup>e</sup> (±18.35)
f/8	217.59 <sup>c</sup> (±49.56)	436.44 <sup>e</sup> (±98.11)	104.88 <sup>c</sup> (±35.01)	260.14 <sup>e</sup> (±79.67)	112.71 <sup>c</sup> (±15.32)	176.30 <sup>e</sup> (±20.92)

Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

López-Sánchez en 1999 estudió la variación estacional de la producción de biomasa en dos especies de microalgas (*Dunaliella* y *Chaetoceros*) cultivadas en laboratorio e invernadero, encontrando para *Dunaliella* valores de biomasa (123.58 pg/cél), cenizas (52.91 pg/cél) y materia orgánica (70.67 pg/cél) similares a los reportados en esta investigación para el medio control (103.78±15.19 pg/cél, 31.52±3.25 pg/cél y 72.25±12.30 pg/cél, respectivamente) (Tabla II). Sin embargo, cabe mencionar que a diferencia de este estudio, el mencionado autor utilizó como medio de cultivo el medio f de Guillard y Rhyter (1962). A la fecha no existen reportes que expliquen el incremento de biomasa con respecto a la disminución de nitrógeno en el medio de cultivo; sin embargo, autores como Tillberg y Rowley (1989) y Said (2009), que

estudiaron el efecto de la limitación de fósforo en el medio de cultivo en las especies *Scenedesmus* y *Dunaliella parva*, respectivamente, observaron que esta condición provoca cambios morfológicos y un incremento en el tamaño celular, lo cual indica que la célula utiliza estos cambios como estrategia para poder sobrevivir en un ambiente deficiente de nutrientes. En investigaciones sobre el efecto de la salinidad en el volumen celular y la osmorregulación de las microalgas, autores como Reed y col. (1980) y Hellebust y Iftikhar (1984), han encontrado que el tamaño celular de las algas tiende a incrementarse al aumentar la salinidad del medio de cultivo, mientras que en esta investigación ocurrió un incremento en el tamaño debido a la carencia de nitrógeno en el medio de cultivo.

## CONCLUSIONES

Los medios limitantes en nitrógeno propician un incremento en la biomasa de *Dunaliella* sp., comparada con un medio rico en nutrientes (f/2). Además del incremento en el tamaño de la célula, debe existir una variación en los compuestos bioactivos, que deben ser estudiados a detalle.

## REFERENCIAS

- Abu-Rezq, T. S., Al-Hooti, S. y Dangly, A. J. 2010. Optimum culture conditions required for the locally isolated *Dunaliella salina*. J. Algal Biomass Utiln, 1(2): 12-19.
- Andersen, R.A. 2005. Algal culturing techniques. Elsevier Academic Press, USA, 578 pp.
- Ben-Amotz, A. y Avron, M. 1989. The biotechnology of mass culturing *Dunaliella* for products of commercial interest. En Algal and Cyanobacterial Biotechnology, ed. R. C. Creswell, T. A. Rees & N. Shah. Longman Scientific and Technical Press U.K., 90-114.
- Bermudez, J.L., Lodeiros, C. y Morales, E. 2002. Biomass production of the marine microalga *Chroomonas* sp. as a function of pH, luminic intensity, and salinity. Bol. Invemar. 31(1): 167-185.
- Fabregas, J., Herrero, C., Cabezas, B. y Abalde, J. 1985. Mass culture and biochemical variability of the marine microalgae *Tetraselmis suecica* Kylin (Butch) with high nutrient concentrations. Aquaculture 49:231-244.
- García-González, M., Manzano, J. C., Moreno, J. y Guerrero, M. G. 2000. Biotecnología del cultivo de *Dunaliella salina* en el litoral andaluz. Spain: Pesca y Acuicultura, Consejería de Agricultura y Pesca, 163 pp.
- García-González, M., Cañavate, J.P., Anguis V., Prieto, A. y Manzano, J.C. 2005. Desarrollo y evaluación de la producción de beta-caroteno por *Dunaliella salina* en la Bahía de Cádiz. Libro de Actas del IX Congreso Nacional de Acuicultura, 347-352.
- Guevara, M., Lodeiros, C. y Gomez, O. 2005. Carotenogénesis de cinco cepas del alga *Dunaliella* sp. (Chlorophyceae) aisladas de lagunas hipersalinas de Venezuela. Rev. Biol. Trop. 53(3-4):331-337.
- Guillard, R.L. y Ryther, J. H. 1962. Studies on marine planktonic diatoms I. *Cyclotella nana* Husted and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. Can. J. Microbiol. 8:229-239.
- Hellebust, J. A. y Iftikhar, A. 1984. Osmoregulation in the Extremely Euryhaline Marine Microalga *Chlorella autotrophica*. Plant Physiol. 74, 1010-1015.
- Hernández-Nazario, L., Quintana-Cabrales, M.M., Morris-Quevedo, H. y Fernández-González, M. 1999. Contenido de algunas vitaminas en cultivos de microalga *Chlorella* sp. Rev. Cubana Aliment. Nutr. 13(1):9-13.
- López-Sánchez, A. L. 1999. Variación estacional de la producción de biomasa y de la calidad de la composición bioquímica de dos especies de microalgas cultivadas en laboratorio e invernadero. Tesis de licenciatura. Departamento de Ciencias Químico Biológicas. Universidad de Sonora. 123.
- Miranda, M.S., Cintra, R.G., Barros, S.B., Mancini-Filho, J. 1998. Antioxidant activity of the



- microalga *Spirulina maxima*. Braz. J. Med. Biol. Res. 31(8):1075-1079.
- Reed, R. H., Collins, J. C. y Russell, G. 1980. The Effects of Salinity upon Cellular Volume of the Marine Red Alga *Porphyra purpurea* (Roth) C.Ag. J. Exp. Bot. 31(6): 1521-1537.
- Rema, P., Gouveia, L. 2005. Effect of Various Sources of Carotenoids on Survival and Growth of Goldfish (*Carassius auratus*) Larvae and Juveniles. J. Anim. Vet. Adv. 4(7):654-658.
- Riley, J. P. y Chester, R. 1971. Introduction to Marine Chemistry. Academic Press. London and New York, 4654.
- Said, H. S. 2009. Changes in Levels of Cellular Constituents of *Dunaliella parva* Associated with Inorganic Phosphate Depletion. Middle-East Journal of Scientific Research, 4 (2): 94-99.
- Serpa-Ibáñez, R. F. y Calderón-Rodríguez, A. 2006. Efecto de diferentes fuentes de nitrógeno en el contenido de carotenoides y clorofila de cuatro cepas peruanas de *Dunaliella salina* Teod. Ecol. Apl. 5:1-2, 93-99.
- Sorokin, C. 1973. Dry weight, packed volume and optical density. En Stein. J. R. Handbook of Physiological Methods. Culture Methods and Growth Measurement. Cambridge University, Press. Cambridge, 448 pp.
- Thurman, H. V., Trujillo, A. P. 1997. Introductory Oceanography. New Jersey: Prentice Hall College. 624.
- Tillberg, J. E., Rowley, J. R. 1989. Physiological and structural effects of phosphorus starvation on the unicellular green alga *Scenedesmus*. International Journal for Plant Biology, 75(3): 315-324.
- Vásquez-Suárez, A., Guevara, M., Salazar, G., Arredondo-Vega, B., Cipriani, R., Lemus, N., Lodeiros, C. 2007. Crecimiento y composición bioquímica de cuatro especies de *Dunaliella* para ser utilizadas en acuicultura. Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas, 41(2):181-194. Universidad de Zulia, Maracaibo, Venezuela.
- Yaşar, Durmaz, Şevket, Gökpınar. 2006.  $\alpha$ -tocopherol and Fatty acids of *Spirulina platensis* Biomass in Glass Panel Bioreactor. Pak. J. Biol. Sci. 9(15):2901-2904.
- Zar, J. H. 1999. Bioestadística Analysis, 4th ed. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey. 663 pp.