

Evaluación del efecto de la salinidad y concentración de nitrógeno en la producción de lípidos totales de *Dunaliella* sp.

Assesment of the effect of salinity and nitrogen concentration in the
total lipids production of *Dunaliella* sp.

Shirley Moncayo Baño

Universidad de Guayaquil, Facultad de Ciencias Naturales, Laboratorio de Biotecnología.
Av. Raúl Gómez Lince s/n y Av. Juan Tanca Marengo (Campus Mapasingue)

Recibido 5 de agosto 2014; recibido en forma revisada 16 de septiembre 2014, aceptado 6 de noviembre 2014
Disponible en línea 5 de enero 2015

Resumen

La capacidad de la microalga *Dunaliella* de incrementar su contenido lipídico bajo condiciones de estrés impuestas por estímulos físicos o químicos, la convierte en uno de los géneros más estudiados para la producción de lípidos. El objetivo de este estudio fue determinar la influencia de diferentes concentraciones de NaCl (0,1 M y 2 M) y nitrógeno (2mM y 20 mM) en relación con un medio control (NaCl 0,5 M y 10 mM NO₃⁻) en la producción de lípidos de una cepa nativa de *Dunaliella* sp. Las mayores densidades celulares se obtuvieron con la salinidad 0,5 M (2,7 ± 0,15 x10⁷ cel/mL) y con la concentración de nitrógeno 20 mM (3,29 ± 0,21 x 10⁷ cel/mL). El mayor porcentaje de lípidos por gramo de biomasa (13,99%) y por litro de cultivo (7,83%) entre los tratamientos de salinidad se alcanzaron con 2 M NaCl. Entre los tratamientos de nitrógeno, el mayor porcentaje de lípidos por gramo de biomasa (16,88%) y por litro de cultivo (8,10%) se alcanzaron con 20 mM NO₃⁻. Los resultados sugieren que las altas salinidades y concentraciones de nitrógeno influyeron en la producción de lípidos de *Dunaliella* sp.

Palabras claves: *Dunaliella*, lípidos, nitrógeno, salinidad.

Abstract

The ability of *Dunaliella* to increase the lipid content under stress conditions imposed by physical or chemical stimuli, makes it one of the most studied genera for lipid production. The aim of this study was establish the influence of different concentrations of sodium chloride (0,1 M and 2 M) and nitrogen (2 mM and 20 mM) in relation to a control medium (0,5 M NaCl and 10 mM NO₃⁻) in the production of total lipids from a native strain of *Dunaliella* sp. The highest cellular density was obtained with the salinity 0,5 M (2,7 ± 0,15 x10⁷ cel/mL) and the nitrogen concentration 20 mM (3,29 ± 0,21 x 10⁷ cel/mL). The high lipid per gram of biomass (13,99%) and liter of culture (7,83%) among salinity treatments were obtained with the molarity 2 M NaCl. Among nitrogen treatments, the highest lipids per gram of biomass (16,88%) and per liter of culture (8,10%) were reached in 20 mM NO₃⁻. The obtained results suggest that the high salinities and nitrogen concentrations influence the lipid production of *Dunaliella* sp.

Keywords: *Dunaliella*, lipids, nitrogen, salinity.

Introducción

Las microalgas son organismos unicelulares fotosintéticos que están constituidas por diversos componentes químicos, entre los que se encuentran los carotenoides, ficobilinas, proteínas, lípidos, polisacáridos, vitaminas, minerales, esteroides y otros compuestos biológicamente activos (Fimbres, 2010). Los lípidos han recibido una creciente atención, puesto que algunas microalgas sintetizan ácidos grasos apropiados para la producción de biodiesel (Alvear et

al., 2011) y ácidos grasos poli-insaturados como el ácido araquidónico (AA,20:4ω-6), eicosapentaenoico (EPA, 20:5ω-3), docosahexaenoico (DHA,20:6ω-3), entre otros, los cuales se consideran importantes en la dieta y salud de animales y humanos (López et al., 1998).

La producción de lípidos a partir de cultivos de microalgas presenta una serie de ventajas sobre otras fuentes vegetales oleaginosas tradicionales. Sus

* Correspondencia del autor:
E-mail: shirmoncayob@hotmail.com



cultivos pueden utilizar terrenos estériles, requieren menores cantidades de agua y son flexibles ante el tipo y la calidad de ésta, por lo que prosperan convenientemente en aguas marinas, dulces, salobres y residuales. No necesitan herbicidas o pesticidas químicos (Garibay et al., 2009). La producción de aceites de microalgas por hectárea de cultivo (136 900 Litros/Ha) (Alvear et al, 2010), supera a los obtenidos de cultivos tradicionales de plantas oleaginosas convirtiéndose en una alternativa a los requerimientos de aceites necesarios para la producción de biocombustibles.

Uno de los géneros de microalgas más investigados es *Dunaliella*, una microalga clorofícea halotolerante, cuyo contenido de lípidos pueden constituir entre el 6 al 28% del peso seco celular según las condiciones del hábitat (Mohapatra, 2006). *Dunaliella* presenta características que facilitan su cultivo. Su crecimiento óptimo en altas concentraciones de salinidad impide la contaminación de los cultivos con microorganismos predadores y competidores como bacterias, hongos y otras especies de microalgas (Ben-Amotz et al., 1991). Además se puede utilizar para su cultivo agua de mar evitando la competencia por el agua dulce (Sánchez, 2000).

El estudio de cepas nativas de microalgas es importante, pues están mejor adaptadas a condiciones climáticas locales como temperatura, luminosidad y salinidad, facilitando su cultivo a gran escala, disminuyendo así los costos de producción. Además poseen resistencia a microorganismos regionales lo que permite que los cultivos posean una mayor tolerancia a la contaminación.

La presente investigación tiene como finalidad aportar con estudios sobre el potencial biotecnológico de una cepa nativa de *Dunaliella* en la producción de lípidos y determinar si las concentraciones de nitrógeno y la salinidad influyen en el contenido lipídico celular, haciéndola una fuente viable de materia prima para la industria.

Materiales y Métodos

Área de Estudio

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad de Guayaquil.

Material Biológico

Se utilizó la cepa UGB-SE-3001 de *Dunaliella* sp. (Fig. 1) aislada de una piscina de Ecuatoriana de Sal y Productos Químicos C. A. (ECUASAL) de Monteverde en la provincia de Santa Elena y que pertenece a la colección de cepas microalgales del Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad de Guayaquil

Condiciones Generales de Cultivo

Los cultivos fueron de tipo discontinuo, a una temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, pH 7,5, con una agitación

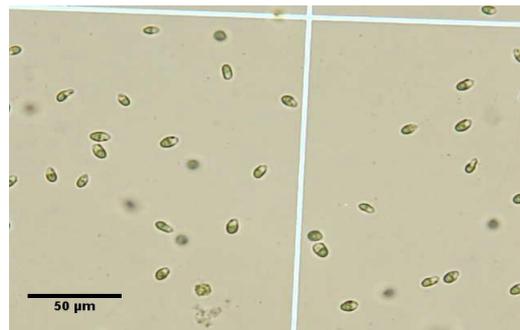


Figura 1. *Dunaliella* sp. vista al microscopio óptico aumento 40X.

por aireación constante y una intensidad lumínica bilateral de $285 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, generada por lámparas fluorescentes de luz blanca y con un fotoperiodo 12:12 luz: oscuridad.

Medio de Cultivo

Se utilizó como control el medio Johnson (Johnson, 1968) con una concentración de cloruro de sodio 0,5 M y 10 mM de nitrato de potasio como fuente de nitrógeno. La salinidad fue elegida por resultar óptima para el crecimiento de *Dunaliella* sp. en estudios previos (García y Moncayo, 2013). La concentración de nitrato (10mM) utilizada corresponde a la molaridad de nitrato de potasio del medio Johnson original. A partir de este medio control se eligieron dos valores por encima y debajo del control. Para los ensayos de salinidad se utilizaron las concentraciones de Cloruro de Sodio (NaCl) 0,1 M y 2,0 M con una concentración de nitrato de potasio (KNO_3) 10 mM (1,0 g/L). Para los ensayos de nitrógeno se utilizaron las concentraciones de KNO_3 2 mM (0,2 g/L) y 20 mM (2,0 g/L) con una salinidad de 0,5 M de cloruro de sodio. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Caracterización fisiológica de los cultivos

Crecimiento

Se cultivó *Dunaliella* sp. en botellas de vidrio de 500 mL de capacidad con 250 mL de medio de cultivo Johnson modificado a cada variable a evaluar por triplicado, inoculadas con $5,0 \times 10^5$ cel/mL, en las condiciones previamente explicadas.

La densidad celular se estimó cada 48 horas por conteo celular usando una cámara de Neubauer. La velocidad de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (td) se estimaron en la fase exponencial de los cultivos utilizando las siguientes fórmulas (Becker, 1994):

$$\mu = (\text{Ln } X_1 - \text{Ln } X_0) / (t_1 - t_0),$$

donde t_1 , t_0 corresponden al tiempo final e inicial de la fase exponencial y X_1 , X_0 corresponde a la densidad celular final e inicial de la fase exponencial

$$t_d = \text{Ln } 2 / \mu, \text{ donde Ln } 2 = \text{Logaritmo natural de } 2.$$

Producción, cosecha y secado de biomasa

Se realizaron cultivos de 4000 mL de *Dunaliella* sp. en botellones plásticos transparentes, bajo las mismas condiciones utilizadas en los ensayos de crecimiento. La biomasa se cosechó mediante centrifugación luego de 40 días de cultivo, excepto los tratamientos 0,1 M de NaCl y 2 mM de KNO₃ que se cosecharon a los 10 días y a los 33 días respectivamente debido a que presentaron fase de muerte celular. La biomasa se lavó con una solución de NaCl al 1% (Takagi et al., 2006) y se secó en estufa a 60°C. La concentración y productividad de la biomasa seca obtenida se determinó mediante las siguientes ecuaciones. (Alvear et al., 2011).

$$CB = \frac{PB}{V_{cultivo}}$$

Donde: CB= Concentración de biomasa (mg/L), PB= Peso biomasa seca (mg) y V =Volumen del cultivo (L)

$$PB = \frac{CB}{t_{cultivo}}$$

Donde: PB= Productividad de biomasa (mg/L.día), CB= Concentración de biomasa (mg/L), t_{cultivo} = Días de cultivo

Extracción y productividad de lípidos

Los lípidos totales fueron extraídos empleando el método modificado de Bligh & Dyer (1959) por triplicado, utilizando metanol, cloroformo y agua como solventes en una relación 2:2:1. La fase orgánica formada por los lípidos extraídos se cuantificó gravimétricamente y se expresó en miligramos. Posteriormente se determinó la cantidad de lípidos producidos por célula expresada en picogramos (pg), el porcentaje de lípidos obtenido por litro de cultivo y por gramo de biomasa y la productividad de los lípidos mediante la siguiente fórmula (Alvear et al. 2011).

$$PL = \frac{LT}{V_{cultivo} \times T_{cultivo}}$$

Donde:

PL= Productividad de lípidos (mg/L.día), LT= Lípidos totales (mg), V_{cultivo}= Volumen del cultivo para muestra Bligh & Dyer (L), t_{cultivo} = Días de cultivo

Análisis estadístico

Para determinar diferencias significativas entre tratamientos se realizó el análisis de varianza (ANOVA) de una vía y el test de comparaciones múltiples de Tukey con un rango de significancia de 95%.

Resultados

Crecimiento

Cinéticas de crecimiento: variables de salinidad

El mayor crecimiento de *Dunaliella* sp. la produjo la concentración control (0,5 M) con una densidad celular máxima de 2,7 ± 0,15 x10⁷ cel/mL, seguida

de la concentración 2 M, con una densidad celular máxima de 1,5 ± 0,21 x10⁷ cel/mL. El crecimiento de *Dunaliella* sp. en la concentración salina 0,1 M fue casi nulo, alcanzando una densidad celular máxima de 0,19 ± 0,03 x 10⁷ cel/mL (Fig. 2).

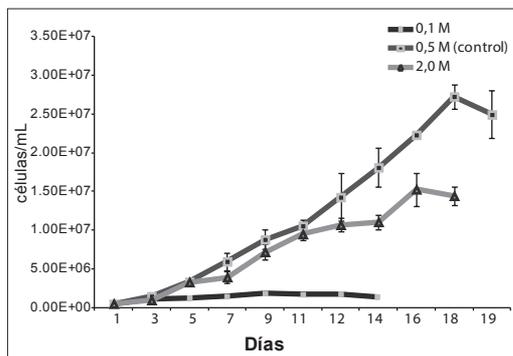


Figura 2. Crecimiento de *Dunaliella* sp. en diferentes concentraciones de cloruro de sodio

Los parámetros de crecimiento obtenidos en la fase exponencial de los cultivos evaluados a diferentes salinidades determinaron que la menor velocidad de crecimiento (0,17 ± 0,01 div/día) y el mayor tiempo de duplicación (4,15 ± 0,46 días) fueron conseguidos por el tratamiento 0,1 M de NaCl. La mayor velocidad de crecimiento (0,24 ± 0,003 div/día) y el menor tiempo de duplicación (2,94 ± 0,04 días) se alcanzaron con el tratamiento 0,5 M (p<0.05) (Tabla 1).

Estadísticamente se encontraron diferencias significativas solo entre las salinidades 0,1 M y el medio control 0,5 M (p<0.05).

Tabla 1. Velocidades de crecimiento (μ) y tiempos de duplicación (td) de *Dunaliella* sp. en diferentes concentraciones de cloruro de sodio. (p<0,05)

Tratamiento	μ (div/día)	td (días)
0,1 M	0,17 ± 0,01 ^a	4,15 ± 0,46 ^a
0,5 M	0,24 ± 0,003 ^b	2,94 ± 0,04 ^b
2,0 M	0,23 ± 0,009 ^b	3,04 ± 0,12 ^b

Cinéticas de crecimiento: variables de nitrato

Los cultivos presentaron un crecimiento inicial homogéneo los primeros días de cinética. El cultivo con el tratamiento 2 mM de nitrato presentó la menor densidad celular obteniendo una máxima de 1,57 ± 0,27 x10⁷ cel/mL. El tratamiento control (10 mM) alcanzó una densidad celular máxima de 2,7 ± 0,15 x10⁷ cel/mL. A diferencia de los cultivos anteriores, el cultivo evaluado en la concentración de KNO₃ 20 mM no presentó fase de muerte celular, y su fase exponencial continuó hasta alcanzar la densidad celular de 3,29 ± 0,21 x 10⁷ cel/mL (Fig. 3).

La máxima velocidad de crecimiento (0,24 ± 0,003 div/día) y el menor tiempo de duplicación (2,94 ±

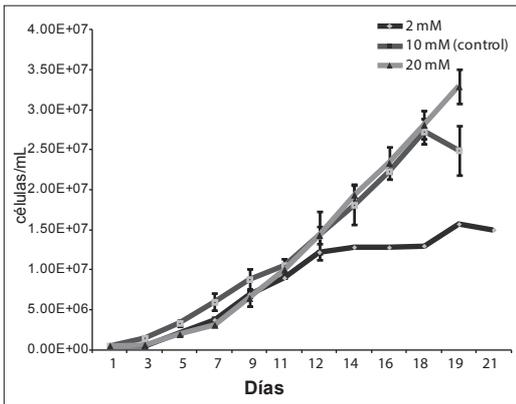


Figura 3. Crecimiento de *Dunaliella* sp. en diferentes concentraciones de nitrato de potasio

0,04 días) se alcanzaron con el tratamiento control y la menor velocidad de crecimiento ($0,19 \pm 0,01$ div/día) y el mayor tiempo de duplicación ($3,62 \pm 0,20$ días) se consiguió con el tratamiento 2 mM de KNO_3 ($p < 0,05$) (Tabla 2).

Tabla 2. Velocidades de crecimiento (μ) y tiempos de duplicación (td) de *Dunaliella* sp. en diferentes concentraciones de nitrato de potasio.

Tratamiento	μ (div/día)	td (días)
2 mM	$0,19 \pm 0,01^a$	$3,62 \pm 0,20^a$
10 mM	$0,24 \pm 0,003^b$	$2,94 \pm 0,04^b$
20 mM	$0,22 \pm 0,004^b$	$2,98 \pm 0,04^b$

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre las densidades celulares y las velocidades de crecimiento alcanzadas con el tratamiento 2 mM y los demás tratamientos ($p < 0,05$). El crecimiento de *Dunaliella* sp. con los tratamientos 10 y 20 mM fue estadísticamente igual.

Caracterización de biomasa

Variables de salinidad

La mayor concentración de biomasa seca obtenida de los cultivos de *Dunaliella* sp. en diferentes salinidades de NaCl se obtuvo en el tratamiento 2 M con $560,07 \pm 128,6$ mg/L y la menor concentración ($198,78 \pm 25,10$ mg/L) se consiguió con el tratamiento 0,1 M. Estadísticamente no se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de biomasa obtenidas en los tratamientos evaluados ($p > 0,05$) (Tabla 3, Fig.4).

Variables de nitrato

El tratamiento 10 mM produjo la mayor concentración de biomasa con $532,62 \pm 134,05$ mg/L y la menor concentración con el tratamiento de KNO_3 20 mM con $482,56 \pm 96,94$ mg/L. Estadísticamente no se

Tabla 3. Concentración y productividad de biomasa seca y duración de los cultivos de *Dunaliella* sp. en concentraciones de cloruro de sodio.

Tratamiento	Concentración de biomasa (mg/L)	Productividad de biomasa (mg/L.día)	Días de cultivo
0,1 M	$198,78 \pm 25,10^a$	$22,08 \pm 2,51^b$	10
0,5 M	$532,62 \pm 134,05^a$	$13,32 \pm 6,70^b$	40
2,0 M	$560,37 \pm 128,6^a$	$14,01 \pm 3,21^b$	40

encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de biomasa en los tratamientos evaluados ($p > 0,05$) (Tabla 4, Fig.4).

Tabla 4. Concentración y productividad de biomasa seca y duración de los cultivos de *Dunaliella* sp. en concentraciones de nitrato de potasio.

Tratamiento	Concentración de biomasa (mg/L)	Productividad de biomasa (mg/L.día)	Días de cultivo
2mM	$500,07 \pm 15,41^a$	$15,15 \pm 0,46^b$	33
10 mM	$532,62 \pm 134,05^a$	$13,32 \pm 6,70^b$	40
20mM	$482,56 \pm 96,94^a$	$12,06 \pm 2,42^b$	40

Productividad de biomasa

El tratamiento 0,1 M NaCl obtuvo la mayor productividad de biomasa entre tratamientos de salinidad ($22,08 \pm 2,51$ mg/L.día) (Tabla 3) y el tratamiento 2 mM obtuvo la mayor productividad entre los cultivos a diferentes concentraciones de nitrato ($15,15 \pm 0,46$ mg/L. día) (Tabla 4). Las pruebas estadísticas no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados ($p > 0,05$).

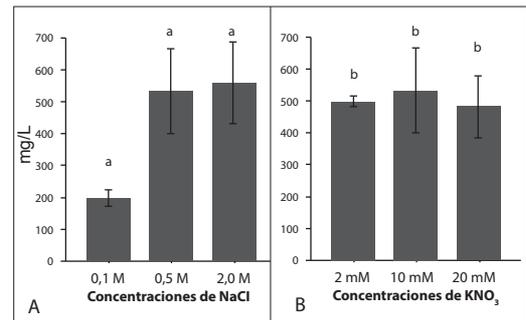


Figura 4. Concentraciones de biomasa seca obtenidas de *Dunaliella* sp. cultivadas en diferentes concentraciones de (A) cloruro de sodio y (B) nitrato de potasio ($p > 0,05$) $n=3$.

Caracterización de Lípidos

Variables de salinidad

Las concentraciones de NaCl influyeron en la producción de lípidos de *Dunaliella* sp., observándose

un incremento del porcentaje lipídico al aumentar la salinidad de los cultivos. La concentración salina que produjo el mayor porcentaje de lípidos por gramo de biomasa ($13,93 \pm 0,96\%$) y por Litro de cultivo ($7,83 \pm 0,54\%$) fue 2,0 M, presentando valores estadísticamente iguales ($p > 0,05$) con el tratamiento control 10 mM el cual obtuvo $13,46 \pm 1,04\%$ por gramo de biomasa y $7,22 \pm 0,55\%$ por litro de cultivo. El tratamiento 0,1 M presentó el menor porcentaje de lípidos por gramo de biomasa ($4,73 \pm 0,21\%$) y por litro de cultivo ($0,93 \pm 0,04\%$) siendo diferente estadísticamente con los otros tratamientos ($p < 0,05$). (Fig.5).

La producción de lípidos por célula estuvo en un rango de entre $6,68 \pm 0,30$ pg (0,1 M) y $5,58 \pm 0,39$ pg (2,0 M) (Tabla 5) presentándose similitudes entre los tratamientos evaluados ($p > 0,05$). La mejor productividad de lípidos se obtuvo con el tratamiento 2,0 M ($1,96 \pm 0,14$ mg/L.día) el cual resultó estadísticamente similar ($p > 0,05$) a la productividad alcanzada con la salinidad 0,5 M ($1,80 \pm 0,14$ mg/L. día). La concentración 0,1 M alcanzó la menor productividad con $0,94 \pm 0,04$ mg/L.día siendo diferente estadísticamente con los otros tratamientos ($p < 0,05$) (Tabla 5).

Variables de nitrógeno

La mayor concentración de nitratos evaluada (20 mM) promovió un incremento en la producción de lípidos en *Dunaliella* sp. reportando un porcentaje lipídico de $16,88 \pm 0,47\%$ por gramo de biomasa y un $8,10 \pm 0,22\%$ por Litro de cultivo, siendo significativamente superior a los demás tratamientos ($p < 0,05$). El menor porcentaje de lípidos por gramo de biomasa ($13,46 \pm 1,04\%$) se obtuvo con el tratamiento control 10 mM, el cual tuvo un porcentaje de lípidos similar ($p > 0,05$) al tratamiento 2 mM ($14,22 \pm 0,61\%$). Esta molaridad obtuvo el menor porcentaje de lípidos por litro de cultivo entre los tratamientos evaluados ($7,13 \pm 0,30\%$) (Fig.5).

La mayor cantidad de lípidos producidos por célula ($8,79 \pm 0,38$ pg) se obtuvo con el tratamiento deficiente de nitrógeno 2 mM siendo significativamente superior a los demás tratamientos ($p < 0,05$) (Tabla 6). La mejor productividad lipídica ($2,17$ mg/L.día) la presentó el cultivo con la molaridad 2 mM siendo estadísticamente diferente ($p < 0,05$) solo con la productividad alcanzada con la molaridad 10 mM ($1,80 \pm 0,14$ mg/L.día) (Tabla 6).

Conclusiones

Crecimiento

Influencia de la salinidad

Los parámetros de crecimiento muestran que la salinidad influye en el crecimiento celular de los cultivos de *Dunaliella* sp. La baja salinidad del cultivo 0.1 M de NaCl inhibió el crecimiento celular, comportamiento que pudo deberse a que la cepa estudiada está adaptada a las altas concentraciones de NaCl de las salinas donde fue aislada. Se produjo una decoloración de este cultivo, tornándose amarillento, este comportamiento también ha sido observado en otras microalgas como respuesta a condiciones de estrés (Becker, 1994).

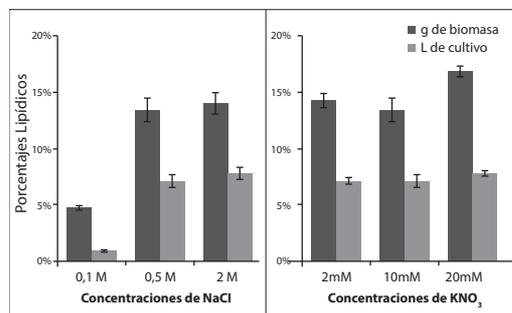


Figura 5. Porcentajes lipídicos presentados por *Dunaliella* sp. cultivada en distintas concentraciones de (A) cloruro de sodio y (B) nitrato de potasio, n=3.

Tabla 5. Caracterización de lípidos en los cultivos de *Dunaliella* sp. en concentraciones de cloruro de sodio ($p < 0,05$) n=3.

Tratamiento	Lípidos por g de biomasa (mg)	Lípidos por L de cultivo (mg)	Productividad de lípidos (mg/L.día)	Lípidos por célula (pg*)
0,1 M	$47,3 \pm 2,12^a$	$9,40 \pm 0,42^a$	$0,94 \pm 0,04^a$	$6,68 \pm 0,30^b$
0,5 M	$134,6 \pm 10,48^b$	$72,23 \pm 5,58^b$	$1,80 \pm 0,14^b$	$6,39 \pm 0,50^b$
2,0 M	$139,9 \pm 9,6^b$	$78,41 \pm 5,41^b$	$1,96 \pm 0,14^b$	$5,58 \pm 0,39^b$

*1 pg = 1×10^{-9} mg

Tabla 6. Caracterización de lípidos en los cultivos de *Dunaliella* sp. en las concentraciones de nitrato de potasio evaluadas ($p < 0,05$).

Tratamiento	Lípidos por g de biomasa (mg)	Lípidos por L de cultivo (mg)	Productividad de lípidos (mg/L.día)	Lípidos por célula (pg*)
2 mM	$142,2 \pm 6,10^a$	$71,39 \pm 3,05^a$	$2,17 \pm 0,09^{**}$	$8,79 \pm 0,38^a$
10 mM	$134,6 \pm 10,48^a$	$72,23 \pm 5,58^a$	$1,80 \pm 0,14^{**}$	$6,39 \pm 0,50^b$
20 mM	$168,8 \pm 4,75^b$	$81,45 \pm 2,29^b$	$2,03 \pm 0,06^a$	$7,44 \pm 0,20^b$

*1 pg = 1×10^{-9} mg

^a estadísticamente diferentes

La mayor densidad celular de los cultivos de *Dunaliella* sp. se registró a 0,5 M, sin embargo, disminuyó cuando la salinidad aumentó a 2,0 M. Este comportamiento se compara con el observado por Takagi et al. (2006) donde la concentración celular decreció al aumentar la concentración salina de 1 M a 2 M, decrecimiento que no se observó en concentraciones de NaCl menores a 1 M, como los evaluados en la presente investigación 0,1 M y 0,5 M.

El aumento de salinidad produce una disminución en el crecimiento celular debido a que la elevada salinidad incrementa en *Dunaliella* la producción de solutos (especialmente glicerol) necesarios para su osmorregulación, lo que limita su energía para su crecimiento (Serpa y Calderón, 2005).

A pesar de las diferencias mostradas entre las densidades celulares de los tratamientos 0,5 M y 2 M, la velocidad de crecimiento entre ellos fue similar, demostrando que el rango de crecimiento de la cepa de *Dunaliella* sp. evaluada se encuentra entre estas salinidades.

Influencia del nitrógeno

La concentración de nitratos limita el crecimiento de *Dunaliella* sp. e influencia la duración de los cultivos. Las cinéticas mostraron un crecimiento constante y ascendente al inicio de los cultivos, pero a medida que el nitrógeno se asimiló, el crecimiento celular decreció. El cultivo 2 mM de KNO_3 por su baja concentración de nitrógeno fue el primero en entrar en fase de latencia y muerte celular. Los ensayos 10 mM y 20 mM continuaron su crecimiento exponencial con una densidad celular similar hasta el agotamiento del nitrógeno del medio 10mM. El crecimiento continuo del cultivo 20 mM podría deberse a la suficiencia de nitrógeno del medio. El crecimiento de *Dunaliella* sp. en la presente investigación se compara con el de Weldy y Huesemann (2007) que reportaron crecimientos semejantes en los cultivos de *Dunaliella* salina a molaridades 2 mM y 20 mM de nitratos en los primeros días de cinética seguido de un decrecimiento celular del cultivo a 2 mM y un incremento celular continuo en el cultivo 20 mM.

La similitud en las velocidades de crecimiento entre las concentraciones 10 mM y 20 mM puede deberse a que las microalgas utilizan la cantidad de nutrientes necesaria para su crecimiento independientemente de la cantidad de nutrientes del medio (Bermúdez et al., 2004).

Producción de biomasa

A pesar de que no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados, la concentración 0,1 M de NaCl no es la recomendada para la producción de biomasa debido a la baja calidad de biomasa (despigmentación) y menor concentración alcanzada. La concentración 2 M produjo la mayor concentración de biomasa. Este resultado concuerda con lo reportado por Hounslow en 2010 que obtuvo una concentración de biomasa

de 540 mg/L similar a los 560 mg/L de la presente investigación.

La cantidad de biomasa obtenida de las distintas concentraciones de nitrato no presentó diferencias entre tratamientos, apenas un ligero incremento con el tratamiento control 10 mM. A pesar de que el cultivo con una concentración 20 mM obtuvo una mayor densidad celular, su concentración de biomasa fue la menor entre tratamientos, probablemente porque la energía se canaliza hacia la reproducción y no a la acumulación de productos bioactivos.

El medio con deficiencia de nitrógeno 2 mM produjo una concentración mayor de biomasa que el tratamiento con suficiencia de nitrógeno 20 mM, a pesar de presentar una menor densidad celular. Esto pudo deberse a que *Dunaliella* tiende a producir compuestos que protegen su integridad celular al encontrarse en condiciones de estrés de nutrientes.

La productividad de biomasa está relacionada inversamente con el tiempo de cultivo. Así se observa que los ensayos que tuvieron menor duración obtuvieron las mayores productividades. Sin embargo, hay que tomar en cuenta otros factores como calidad de biomasa y mayor producción celular que justifiquen la masificación de dichos cultivos.

Producción de lípidos

Influencia de la salinidad

Los resultados de la presente investigación muestran que *Dunaliella* sp. incrementó el contenido de lípidos al aumentar la salinidad de 0,1 M a 0,5 M; sin embargo, la producción lipídica es similar entre las salinidades de 0,5 M y 2 M. Este comportamiento pudo deberse a que ambas salinidades resultaron idóneas para el crecimiento celular de la cepa estudiada, no generándose ninguna condición de estrés que pudiera ocasionar un incremento significativo en la producción de lípidos. Esta similitud concuerda con los resultados de Hounslow (2010), que reportó solo un 3% de diferencia entre los lípidos producidos en ambas salinidades. De igual forma, la cantidad de lípidos por célula reportados por Hounslow en la salinidad 2,0 M (5,64 pg) resultaron similares a los de la presente investigación (5,58 ± 0,39 pg).

El aumento en el porcentaje de lípidos debido a un incremento de salinidad concuerda con autores como Abd El-Baky et al. (2004), Takagi et al. (2006) y Hounslow (2010), sin embargo, los porcentajes obtenidos en sus investigaciones fueron mayores que los encontrados en la presente investigación debido quizás a que las especies de *Dunaliella* evaluadas por ellos fueron *D. salina* y *D. tertiolecta*, que han reportado porcentajes de lípidos por encima del 25%. La baja salinidad de la concentración 0,1 M, provoca un descenso significativo en la productividad de lípidos en los cultivos, sin embargo, produce un aumento en la cantidad de lípidos a nivel celular, debiéndose tal vez a un modo de autoprotección de la célula frente a la condición de estrés. La caracterización de lípidos

en el presente estudio determinó que la concentración salina 2,0 M resulta ideal para la producción de lípidos entre las concentraciones salinas evaluadas, ya que, además de alcanzar los mayores porcentajes de lípidos tanto por peso seco de biomasa evaluada y por volumen de cultivo, tiene la ventaja de que evitaría la contaminación de los cultivos por su elevada salinidad.

Influencia del nitrógeno

Los resultados indican que la concentración de nitrógeno en los cultivos de *Dunaliella* sp. no influyeron de manera significativa en la producción de lípidos entre los tratamientos 2 mM y 10 mM (las menores evaluadas) observándose diferencias entre estas molaridades y el tratamiento 20 mM.

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Gordillo et al. (1998) donde no se encontraron diferencias en la cantidad de lípidos totales producidos por *Dunaliella viridis* en las bajas molaridades de nitrato por él evaluadas (0,5 mM y 5 mM). Además, reporta una producción de lípidos a nivel celular (1,83 pg - 2,58 pg) menor que la del presente trabajo (6,39 pg - 8,79 pg) debido a que sus cultivos se mantuvieron en luminosidad constante, la cual causa, según Gordillo (op. cit.), una fotoinhibición celular que produce una baja producción lipídica.

Weldy y Huesemann (2007) y Abd El-Baky et al. (2004) reportaron mayores porcentajes de lípidos en cultivos de *Dunaliella* con bajas concentraciones de nitratos, en comparación con cultivos con suficiencia de nitrógeno, lo que no coincide con la presente investigación, donde se consiguió un mayor porcentaje de lípidos con la mayor concentración evaluada (20 mM), aunque en el trabajo de Weldy y Huesemann (2007), esta molaridad produjo las mayores productividades lipídicas (mg/L. día) debido a las altas concentraciones de biomasa que provocan la suficiencia de nitrógeno en el medio, situación que pudo influenciar en los altos porcentajes de lípidos en los cultivos con dicha concentración en la presente investigación. La deficiencia de nitrógeno del medio 2 mM originó un incremento significativo en la cantidad de lípidos por célula, incremento que no se refleja en los porcentajes lipídicos generales pero sí en la productividad de lípidos.

Generalmente, la disminución del nitrógeno en los cultivos promueve la acumulación de lípidos pero provoca una baja producción de biomasa. De igual forma, la mayor concentración de nitrógeno origina un mayor crecimiento celular pero genera menores cantidades de lípidos por célula. Por lo anterior expuesto, a nivel de producción, las altas concentraciones de nitrato producirían mayores cantidades de lípidos, debido que originan una mayor densidad celular y por consecuencia, altas concentraciones de biomasa. Así, la concentración 10 mM de nitratos sería la adecuada para la producción de lípidos pues promovió una concentración de biomasa mayor y su porcentaje lipídico fue solo un

2% menor que la concentración 20 mM que produjo la mayor cantidad de lípidos.

Recomendaciones

Investigar el crecimiento y productividad de lípidos de *Dunaliella* sp. en otras concentraciones de cloruro de sodio y de nitratos a fin de buscar la combinación que resulte óptima para la producción de lípidos.

Identificar la composición de los lípidos obtenidos de *Dunaliella* sp. para determinar su aplicación en la producción de biocombustibles o en la industria alimenticia como fuente de ácidos grasos esenciales.

Analizar nuevas técnicas de extracción de lípidos para probar su eficiencia.

Evaluar distintas microalgas nativas para establecer su contenido de lípidos.

Referencias

- Abd El-Baky, H., K. F. El-Baz & S. G. El-Baroty. 2004. Production of Lipids Rich in Omega 3 Fatty Acids from the Halotolerant Alga *Dunaliella salina*. *Biotechnology* 3 (1):102-108. DOI: 10.3923/biotech.2004.102.108
- Alvear, M., C. Castillo, & D. Henao. 2010. Obtención y comparación de los aceites obtenidos de las microalgas *Dunaliella salina* y *Chlorella nativa* como materia prima para la producción de biodiesel. World Congress & Exhibition Engineering. Argentina
- , ----- & -----, 2011. Evaluación del Ph y concentración de nitrógeno en el cultivo de las microalgas *Dunaliella salina* y *Chlorella nativa* como fuente de aceite vegetal para la producción de biodiesel. Tesis de grado para la obtención del título Ingeniero Químico. Universidad de Cartagena. Colombia
- Becker, E.W. 1994. *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Ben-Amotz, A., A. Shaish, & M. Avron. 1991. The biotechnology of cultivating *Dunaliella* for production of b-carotene rich algae. *Bioresource Technology* 38 (2-3): 233-235
- Bermúdez, J., N. Rosales, C. Loreto, B. Briceño & E. Morales. 2004. Exopolysaccharide, pigment and protein production by the marine microalga *Chroomonas* sp. in semicontinuous cultures. *World journal of microbiology & biotechnology*, 20: 179-183.
- Bligh, E. G. & W. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Journal Biochemical Physiology*. 37 (8): 911-917.
- Fimbres, D., L. Mercado, A. Murguía, L. López. 2010. Crecimiento y biomasa de *Dunaliella* sp. cultivada en medios limitantes en nitrógeno. *BIOTecnica*, 11(3): 58-66.
- García, L. & S. Moncayo. 2013. Aislamiento de *Dunaliella* sp. proveniente de las salinas de ECUASAL y caracterización de sus carotenoides por espectrofotometría. Informe no publicado. Laboratorio de Biotecnología. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad de Guayaquil.
- Garibay, A., R. Vázquez-Duhalt, M. Sánchez, L. Serrano, & A. Martínez. 2009. Biodiesel a partir de microalgas. *BioTecnología* 2009,13(3):38-61. http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_2009_3/Biodiesel.pdf
- Gordillo, F., M. Goutx, F. Figueroa & F. X. Niell. 1998. Effects of light intensity, CO₂ and nitrogen supply on lipid class composition of *Dunaliella viridis*. *Journal of Applied Phycology* 10 (2): 135-144
- Hounslow, E. 2010. Optimum salinity conditions for producing

- lipids from *Dunaliella salina* for biofuels production. Energy Futures DTC. University of Sheffield. 8pp. http://efutures.group.shef.ac.uk/publications/pdf/44_13.%20Emily%20Hounslow%20P.pdf
- Johnson, M., E. Johnson, R. Mac Elroy, H. Speer & B. Bruff. 1968. Effects of salts on the halophilic alga *Dunaliella viridis*. *Journal Bacteriology*. 95 (4):1461- 1468.
- López, D., J. Belarbi, C. Segura & A. Giménez. 1998. Acyl lipids of three microalgae. *Phytochemistry*, 47 (8):1473-1481.
- Mohapatra, P. 2006. Biotechnological approaches to microalga culture. Textbook of environmental biotechnology. IK International Publishing House Pvt. Ltd. New Delhi, India. pp. 167-200.
- Sánchez-Varo, R.M. 2000. Producción de carotenos por *Dunaliella salina*. Biotecnología de microalgas. Monografía. Universidad de Málaga, España. 36 p.
- Serpa, R. & A. Calderón. 2005. Efecto del estrés por salinidad en cuatro cepas de *Dunaliella salina* Teod. en el Perú. *Ecología Aplicada*. 4(2):127-133. <http://estudiosterritoriales.org/articulo.oa?id=34100217>> ISSN 1726-2216.
- Takagi, M., Karseno & T. Yoshida. 2006. Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* Cells. *Journal of Bioscience and bioengineering*. 101(3): 223-226.
- Weldy, C. & M. Huesemann. 2007. Lipid production by *Dunaliella salina* in batch culture: effects of nitrogen limitation and light intensity. U.S. Department of Energy *Journal of Undergraduate Research*. pp. 115-122.