

Caracterización de pigmentos por espectrofotometría en una cepa de *Dunaliella viridis*, aislada de las salinas de Ecuasal

Characterization of pigments by spectrophotometry in a strain of *Dunaliella viridis*, isolated from the Ecuasal salt ponds

Leonardo García^{1,*}, Shirley Moncayo² & María de los Ángeles Pastuzo¹

¹ Investigador, Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Guayaquil.

² Docente de la Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Guayaquil Av. Raúl Gómez Lince s/n y Av. Juan Tanca Marengo, Guayaquil, Ecuador.

Recibido 27 de septiembre 2016; recibido en forma revisada 15 de noviembre 2016, aceptado 3 de diciembre 2016
Disponible en línea 31 de diciembre 2016

Resumen

En este trabajo se evaluó el crecimiento y la producción de pigmentos de una cepa de microalga halotolerante *Dunaliella viridis* (UGB-SE-3001), aislada en las salinas de ECUASAL, en la provincia de Santa Elena, Ecuador. Se realizaron cultivos discontinuos con medio Johnson a diferentes concentraciones de NaCl (0.1 M, 0.5 M, 1 M, 2 M, 3 M y 4.5 M). Las condiciones del cultivo fueron: pH de 7.5, 24±2°C, fotoperiodo de 12:12, aireación constante, irradiancia bilateral a 284 µmol/m²s. Los tratamientos con mayor producción celular fueron 0.5 M con 2.72±0.15E+07 cel/mL, seguido del tratamiento 1 M con 2.21±0.2E+07 cel/mL. El tratamiento con mayor producción de pigmentos fue 1 M con 9.98±1.08 µg/mL de clorofila *a*, 3.44±1.54 µg/mL de clorofila *b* y 4.10±0.57 µg/mL de carotenos. El rango de concentración salina óptima para el crecimiento de *Dunaliella viridis* (UGB-SE-3001) está entre 0.5 M y 1 M; mostrando una correlación negativa entre salinidad, densidad celular y producción de pigmentos a partir de la concentración salina 0.5 M.

Palabras Claves: *Dunaliella viridis*, espectrofotómetro, pigmentos, Santa Elena.

Abstract

In this work we evaluated the growth and pigment production of a strain of the halotolerant microalgae *Dunaliella viridis* (UGB-SE-3001), isolated from ECUASAL salt ponds, in the province of Santa Elena, Ecuador. For this purpose, discontinuous cultures on Johnson medium at different concentrations of NaCl (0.1 M, 0.5 M, 1 M, 2 M, 3 M and 4.5 M) were achieved. The culture conditions were pH 7.5, 24±2°C, photoperiod 12:12, constant aeration and bilateral irradiance at 284 µmol/m²s. The treatments that yielded a higher cell production were 0.5 M with 2.72 ± 0.15E+07 cells/mL, followed by 1 M treatment with 2.21 ± 0.2E+07 cells/mL. The treatment with a higher pigment production was 1 M with 9.98 ± 1.08 µg/mL chlorophyll *a*, 3.44 ± 1.54 µg/mL chlorophyll *b* and 4.10 ± 0.57 µg/mL carotene. The optimum salt concentration range for growth of *Dunaliella viridis* is between 0.5 M and 1 M; it is displayed a negative correlation between salinity, cellular density and pigment production from 0.5 M salt concentration.

Keywords: *Dunaliella viridis*, spectrophotometer, pigments.

Introducción

La biomasa microbiana representa una fuente potencial de recursos renovables para la producción de compuestos con valor añadido de importancia biotecnológica. La biomasa proveniente de microalgas produce metabolitos secundarios con aplicación en la industria farmacéutica, complementos nutricionales,

cosmetología, además se emplea principalmente en acuicultura, alimentación humana, agricultura y la producción de una amplia gama de biocombustibles (Richmond, 2004).

Los pigmentos naturales son biomoléculas presentes en la biomasa de microalgas, entre los que se encuentran carotenoides, ficobilinas y clorofilas, las

* Correspondencia del autor:
E-mail: lgarsaenz12@gmail.com



cuales pueden corresponder hasta con el 0.50 % a 1.50% del peso seco de la biomasa microalgal (Becker, 1994; Streit *et al.*, 2015).

La clorofila se utiliza como un colorante natural en las industrias farmacéuticas y de alimentos, por tener propiedades nutraceuticas como anti-inflamatorio, antioxidante, profiláctico, retraso del envejecimiento, antiagregante y vasoconstrictor plaquetario (Ramírez-Mérida *et al.*, 2014). Además, dietas asociadas al consumo de clorofila *a* muestran una reducción en el riesgo de cáncer (Balder *et al.*, 2006).

Los carotenoides son pigmentos de tipo terpenoide, utilizados como colorantes en alimentos, fármacos, cosméticos y como suplementos nutricionales. Además, previenen las enfermedades causadas por la acumulación de radicales libres (Cañazares y Perales, 2013).

Las microalgas clorofitas del género *Dunaliella* han sido objeto de numerosos estudios, debido a su fácil cultivo por su condición halotolerante y por sintetizar compuestos bioactivos, entre ellos, pigmentos como la clorofila *a* y *b*, y un amplio rango de carotenoides y xantofilas, incluyendo β -caroteno y luteína (Quintana *et al.*, 1999; Borowitzka y Siva, 2007).

La producción de estos pigmentos puede optimizarse mediante variaciones en las condiciones de cultivo, las cuales incluyen aumento de las concentraciones salinas, temperaturas extremas, elevada intensidad luminosa y limitación de nutrientes (Yépez y Morales, 1998; Mora *et al.*, 2002; Gómez y González, 2005).

La escasa información de trabajos realizados en cepas nativas halotolerantes de interés comercial justifican la presente investigación, cuyo objetivo fue evaluar el crecimiento y la producción de pigmentos de *Dunaliella viridis* en diferentes salinidades.

Materiales y Métodos

La presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Guayaquil. Se realizó el aislamiento de *Dunaliella viridis* (Fig. 1) a partir de una muestra de agua colectada en las piscinas de Ecuatoriana de Sal y Productos Químicos C.A. (ECUASAL), ubicadas en el cantón Salinas, en la provincia de Santa Elena, Ecuador (80°57'75" W 2°13'80" S). Los métodos utilizados en el aislamiento fueron una combinación de diluciones seriadas y rayado en agar por desgaste en medio Johnson a una concentración de NaCl 1.75 M. La identificación morfológica y fisiológica de la cepa aislada se realizó en base a las claves taxonómicas realizadas para el género *Dunaliella* por Borowitzka y Siva (2007).

Se evaluó la variable de salinidad en seis concentraciones distintas (0.1 M, 0.5 M, 1 M, 2 M, 3 M, 4.5 M). Se realizaron cultivos discontinuos por triplicado en el medio Johnson (1968) modificado por

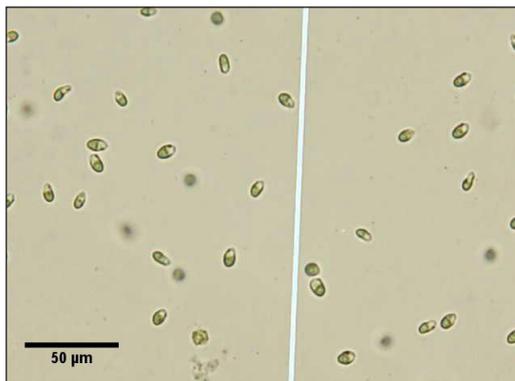


Figura 1. *Dunaliella viridis* (UGB-SE-3001), vista al microscopio óptico 40X.

Borowitzka (1988), el cual presenta una concentración de nitratos de 10 mM; el volumen inicial fue de 250 mL, mantenidos a $24 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperiodo de 12:12 horas (Luz-Oscuridad), aireación constante e irradiancia bilateral de $284 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, con un inóculo inicial de 5×10^5 cel/mL. Los cultivos se mantuvieron hasta observar la fase de muerte celular (entre 14 y 19 días). La densidad celular se determinó mediante conteos cada 48 horas en un hematocitómetro Neubauer. La velocidad de crecimiento y el tiempo de duplicación de los cultivos se calcularon en la fase de crecimiento exponencial (Becker, 1994).

Los pigmentos fueron estimados obteniendo por triplicado alícuotas de 5 mL, en el último día de la fase exponencial (día 11 para 0.1 M, día 13 para 0.5 M y día 15 para los demás tratamientos). La alícuota se centrifugó a 4000 rpm durante 15 minutos, y del pellet obtenido se extrajeron los pigmentos con una solución de acetona al 90% (Wegmann y Metzner, 1971). Las muestras se dejaron reposar a 4°C en oscuridad absoluta hasta observar la completa extracción de los pigmentos. Se centrifugaron las muestras a 4000 rpm durante 15 minutos para separar la biomasa del extracto, el cual se evaluó en un espectrofotómetro THERMO SCIENTIFIC GENESYS 10vis a tres longitudes de ondas: 664 nm, 647 nm, 480 nm, para medir clorofila *a*, clorofila *b* y carotenos respectivamente. La cuantificación de clorofilas y carotenos se realizó mediante las fórmulas propuestas por Jeffrey y Humphrey (1975) y Strickland y Parsons (1972), respectivamente.

Para determinar diferencias significativas entre los tratamientos, tanto para el crecimiento celular y la producción de pigmentos, se utilizó el Análisis de Varianza (ANOVA) y el test de comparaciones múltiples de Scheffé del programa estadístico QED Statistics, con un rango de significancia de $p < 0,05$.

Resultados

Los cultivos en las diferentes salinidades evaluadas tuvieron una duración de 18 días a excepción del tratamiento 0.1 M, cuya cinética duró 13 días.

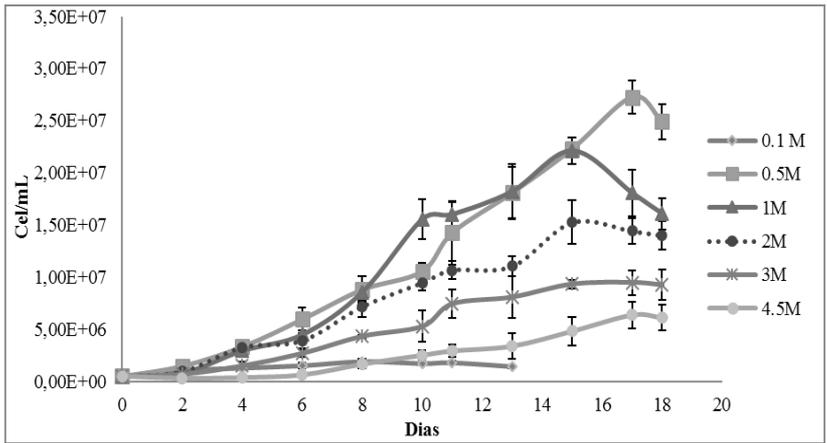


Figura 2. Cinéticas de crecimiento de *Dunaliella viridis* en los tratamientos evaluados.

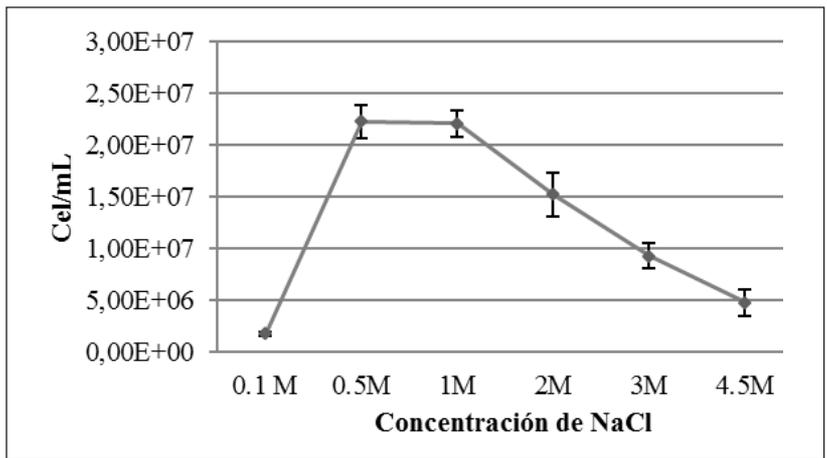


Figura 3. Máximas densidades celulares alcanzadas por *Dunaliella viridis* (UGB-SE-3001), en las salinidades evaluadas.

La mayor densidad celular se observó cuando se empleó una concentración de NaCl 0.5 M con $2.72 \pm 0.15E+07$ cel/mL; mientras que con NaCl 1 M fue de $2.21 \pm 0.2E+07$ cel/mL. Por otra parte, los tratamientos con concentraciones correspondientes a 2 M, 3 M y 4.5 M de NaCl dieron lugar a una densidad celular máxima de $1.52 \pm 0.12E+07$, $0.93 \pm 0.11E+07$, $0.64 \pm 0.12E+07$ cel/mL, respectivamente. La menor densidad celular se produjo con el tratamiento 0.1 M con $0.17 \pm 0.02E+07$ cel/mL (Fig. 2).

Los valores máximos de la densidad celular permiten determinar el rango óptimo de crecimiento, el cual se encuentra entre 0.5 y 1 M. Además, permite observar la correlación existente entre la variable y el crecimiento, siendo la densidad celular inversa a la salinidad a partir de 1 M (Fig. 3).

La velocidad de crecimiento relaciona la densidad celular con el número de días del cultivo. Los tratamientos 0.5 M y 1 M obtuvieron la misma velocidad de crecimiento (0.25 día^{-1}), tiempo de duplicación (2.74 días) y productividad celular. La

concentración 4.5 M de NaCl presentó los valores menos favorables del ensayo (Tabla 1).

El análisis estadístico del crecimiento celular de *Dunaliella viridis* mostró diferencias significativas a un nivel de confianza de $p \leq 0.05$ entre los tratamientos (Tabla 2).

Los tratamientos 0.5 M y 1 M los cuales obtuvieron la mayor densidad celular y el menor tiempo de duplicación, no muestran diferencias significativas entre ellos, diferenciándose de los demás tratamientos a excepción de 2 M.

Producción de Pigmentos

Se realizó el análisis de los pigmentos bioactivos más importantes, evaluando la clorofila-a, clorofila-b y los carotenoides totales. Se observa al tratamiento 1 M con la mayor acumulación de pigmentos con 9.98 ± 1.08 µg/mL de clorofila a, 3.44 ± 1.54 µg/mL de clorofila b y 4.10 ± 0.57 µg/mL de carotenoides. El tratamiento con menor producción pigmentaria en el cultivo fue el tratamiento 0.1 M (Fig. 4).

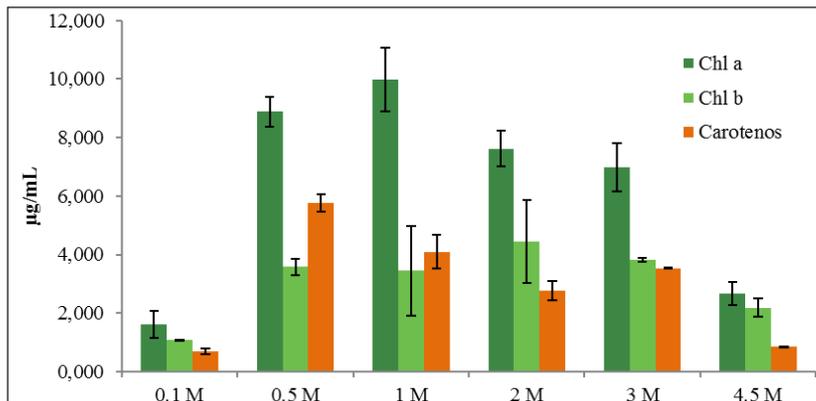


Figura 4. Producción de pigmentos fotosintéticos de *Dunaliella viridis* (UGB-SE-3001).

Los tratamientos con mayor producción de clorofila *a* fueron 0.5 M y 1 M, los cuales no mostraron diferencias significativas entre ellos, pero sí con el resto de tratamientos, a excepción del tratamiento 2 M, el cual presentó similitud con el tratamiento 0.5 M ($p < 0.05$).

Los tratamientos 0.1 M y 4.5 M presentaron la menor producción de clorofila *b* y diferencias significativas con los demás tratamientos. El rango de tratamientos entre 0.5 M y 3 M no evidenciaron diferencias significativas entre ellos ($p < 0.05$).

La producción de carotenos alcanzó su máximo valor con el tratamiento 0.5 M el cual se diferenció estadísticamente del resto de tratamientos ($p < 0.05$) (Tabla 3).

Se presentó un incremento a nivel celular de los valores (pg/cel) de los pigmentos fotosintéticos en los tratamientos 0.1 M, 3 M y 4.5 M (Tabla 4).

Discusión

La cepa estudiada en la presente investigación se caracterizó por tener una elevada producción celular, en amplios intervalos de salinidad, superando los valores alcanzados en otras investigaciones (Yépez y Morales, 1998; López, 2008; Serpa y Calderón, 2005). Esto podría deberse a la mayor irradiancia ($284 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) a la que fueron expuestos los cultivos, siendo la luz el factor principal en el crecimiento y productividad en la biomasa microalgal (Richmond, 2004). Además, la concentración de nitratos (10 mM) presente en el medio Johnson fue mayor a las utilizadas por los otros autores (2.5 y 5 mM de nitrato) siendo este nutriente el más importante en la producción de biomasa (Grobbelaar, 2004).

Se observó crecimiento celular en todos los tratamientos evaluados, lo cual demuestra la adaptabilidad de *Dunaliella viridis* a un amplio rango de salinidades, confirmando su carácter halotolerante.

La elevada velocidad de crecimiento observada en *Dunaliella viridis* en concentraciones salinas de 0.5 M y 1 M la convierten en una cepa con alto potencial biotecnológico, pudiendo utilizarse el agua de mar (0.5 M) para sus cultivos, lo que reduciría costos en la producción de biomasa. Además, su tolerancia a elevadas salinidades permitiría un menor grado de contaminación por algas oportunistas en los cultivos.

La producción de pigmentos se relacionó directamente con la densidad celular, por ende, los tratamientos con mayor número de células (0.5 y 1 M) fueron los que registraron mayor producción de pigmentos por volumen de cultivo.

El tratamiento 0.1 M presentó una baja densidad celular ($1.9 \times 10^6 \text{ cel}/\text{mL}$) en comparación con los demás tratamientos, lo que indica que esta concentración no es la adecuada para la producción de biomasa.

Las distintas concentraciones de pigmentos ($\mu\text{g}/\text{mL}$) obtenidas en todas las concentraciones ensayadas en esta investigación fueron superiores a las reportadas por Yépez y Morales (1998), Serpa y Calderón (2005) hasta por más del 80 %. Sin embargo, la mayor productividad mostrada por los mencionados autores se debe a la baja densidad celular alcanzada en sus cultivos.

Se observó que la producción de pigmentos en *Dunaliella viridis* se encuentra influenciada por la concentración de NaCl en los cultivos de dicha especie, posiblemente debido al estrés al cual son sometidas las células bajo condiciones de salinidad. Resultados similares fueron presentados por Al-Hasam (1987) y Yépez y Morales (1998). Este comportamiento pudo deberse a la baja velocidad de crecimiento en los cultivos, que implican un menor costo energético en división celular y acumulación de metabolitos (Jiménez y Niell, 1991).

En los datos obtenidos en el análisis de varianza, se puede observar una marcada influencia de las

Tabla 1. Parámetros de crecimiento de *Dunaliella viridis* (UGB-SE-3001).

	0.1 M	0.5 M	1 M	2 M	3 M	4.5 M
NaCl (g/L)	5,8	29	58	116	174	261
Productividad (cel/mL/día)	0,23E+06	1.10E+06	1.07E+06	0.89E+06	0.54E+06	0.21E+06
Velocidad crecimiento (día ⁻¹)	0,17	0,25	0,25	0,23	0,20	0,15
Tiempo de duplicación (días)	4,15	2,74	2,74	3,04	3,55	4,59

Tabla 2. Análisis de varianza del crecimiento celular de *Dunaliella viridis* (UGB-SE-3001), entre los tratamientos evaluados.

Molaridad NaCl	Medias densidad celular (cel/mL)
0.1	1,53E+06 ^a
0.5	1,37E+07 ^c
1	1,23E+07 ^c
2	9,03E+06 ^{bc}
3	5,82E+06 ^{ab}
4.5	2,91E+06 ^a

Las letras iguales en sentido vertical indican que no hay diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre tratamientos.

Tabla 3. Análisis de varianza de la producción de pigmentos de *Dunaliella viridis* (UGB-SE-3001), entre los tratamientos evaluados.

Molaridad NaCl	Producción de pigmentos (µg/mL)		
	Clorofila a	Clorofila b	Carotenoides
0.1	1,61±0.46 ^a	1,07±0.01 ^a	0,70±0.09 ^a
0.5	8,89±0.51 ^{cd}	3,58±0.27 ^{bc}	5,76±0.28 ^d
1	9,98±1.08 ^d	3,44±1.54 ^{bc}	4,10±0.57 ^c
2	7,62±0.59 ^{bc}	4,46±1.41 ^c	2,75±0.33 ^b
3	6,99±0.81 ^b	3,91±0.06 ^{bc}	3,53±0.02 ^c
4.5	2,67±0.38 ^a	2,19±0.30 ^{ab}	0,84±0.02 ^a

Las letras iguales en sentido vertical indican que no hay diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre tratamientos.

Tabla 4. Producción en pg/cel de pigmentos fotosintéticos en las salinidades evaluadas.

Concentración NaCl	Clorofila a	Clorofila b	Clorofilas totales	Carotenos
0.1 M	0,89	0,60	1,49	0,39
0.5 M	0,40	0,16	0,56	0,26
1 M	0,45	0,16	0,61	0,19
2 M	0,50	0,29	0,79	0,18
3 M	0,75	0,41	1,16	0,38
4.5 M	0,55	0,45	1,01	0,17

concentraciones de NaCl sobre la producción de carotenoides, debido a que todos los tratamientos presentaron diferencias significativas entre ellos.

Las condiciones óptimas de crecimiento y producción de pigmentos difieren entre las cepas evaluadas por los distintos autores, por lo cual se justifica la importancia de investigar el comportamiento de cepas nativas, las cuales estarían adaptadas al entorno para posibles cultivos masivos.

Conclusiones

El rango de concentración salina óptima para el crecimiento de *Dunaliella viridis* (UGB-SE-3001) se encuentra entre 0.5 y 1 M.

La baja densidad celular alcanzada con el tratamiento 0.1 M y 4.5 M indica que, salinidades fuera del rango entre 0.5 y 1 M no son adecuados para el crecimiento de la cepa estudiada.

Existe una correlación negativa entre el crecimiento y la producción de pigmentos versus la salinidad a partir de la concentración 0.5 M.

La mayor producción de pigmentos en *Dunaliella viridis* (UGB-SE-3001) se produjo a la concentración salina 1 M. La salinidad fue un factor determinante en la producción de carotenoides. El crecimiento celular y la producción de pigmentos de *Dunaliella viridis* dependerá de la cepa en estudio y de la concentración salina del cultivo.

Recomendaciones

Debido al alto potencial biotecnológico de la cepa estudiada, se recomienda encontrar un medio de cultivo a partir de fertilizantes, el cual reduzca los costos de producción.

Caracterizar los carotenoides y lípidos provenientes de la biomasa de *Dunaliella viridis* por métodos cromatográficos.

Encontrar el método de cultivo a gran escala adecuado para la masificación de esta cepa.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Facultad de Ciencias Naturales y al Departamento de Investigación y Proyectos Académicos de la Universidad de Guayaquil por el financiamiento a través del Proyecto 015-2011, para el desarrollo de este trabajo.

Referencias

- Al-Hasan, P., M. Ghannoum, A. Sallal, K. Abu-Elteen y S. Adwan. 1987. Correlative changes in growth pigmentation and lipid composition of *Dunaliella salina* in response to halostress. *Journal General Microbiology*, 133:2607-2517.
- Balder, H. F., J. Vogel, M. C. Jansen, M. P. Weijenberg, P. A. Van Den Brandt, S. Westenbrink, R. Van Der Meer y R. A. Goldbohm. 2006. Heme and chlorophyll intake and risk of colorectal cancer in the Netherlands cohort study. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 15:717-725.
- Becker E. W. 1994. *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. Cambridge University Press.
- Borowitzka, M. y C. J. Siva. 2007. The taxonomy of the genus *Dunaliella* (Chlorophyta, Dunaliellales) with emphasis on the marine and halophilic species. *Journal of Applied Phycology*, 19(5):567-590.
- Cañizares R. y H. Perales. 2013. Producción de carotenoides a partir de las microalgas. *Avance y Perspectiva*, 5(4), CINVESTAV-IPN. México.
- Gómez P. y F. González. 2005. The effect of temperature and irradiance on the growth and carotenogenic capacity of seven strains of *Dunaliella salina* (Chlorophyta) cultivated under laboratory conditions. *Biological Research*, 38:151-162.
- Grobbelar J. 2004. Algal Nutrition-Mineral Nutrition, en *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Ed. A. Richmond. Blackwell Publishing Company. Reino Unido.
- Jeffrey, S. y G. Humphry. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c*₁ and *c*₂ in higher plants, algae and natural population. *Biochemical Physiology Pflanzen*, 167:191-194.
- Jiménez, C. y Z. X. Niell. 1991. Growth of *Dunaliella viridis*. Theodoresco. Effect of salinity, temperature and nitrogen concentration. *Applied Phycology*, 3:319-327.
- Johnson, M. K., E. Johnson, R. Mac Elroy, H. Speer y B. Bruff. 1968. Effects of salts on the halophilic alga *Dunaliella viridis*. *Journal of Bacteriology*, 95:1461-1468.
- López, Y. 2008. Caracterización genética y de metabolitos secundarios de diferentes aislamientos de *Dunaliella salina* bajo condiciones de estrés salino. Tesis de maestría no publicada, Instituto Politécnico Nacional, Reinos, México.
- Mora R., N. Ortiz, Y. Clemente, J. Bermúdez, D. Avendaño y E. Morales. 2002. Efecto del nitrato, irradiancia y salinidad sobre la producción de clorofila *a* de microalgas cultivadas y aisladas en la región noroccidental de Venezuela. *Océanides*, 17(2):73-83.
- Quintana-Cabrales M., L. Hernández-Nazario, H. Morris-Quevedo y M. Fernández-González. 1999. Contenido de algunas vitaminas en cultivos de microalga *Chlorella* sp. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*, 13(1):9-13.
- Ramírez-Mérida, L. G., Q. L. Zepka y E. Jacob-Lopes. 2014. Microalgas y cianobacterias. Aplicación en Medicina. *Revista Médica Electrónica PortalesMédicos.com*, 9(4):149 <http://www.revista-portalesmedicos.com/revista-medica/microalgas-y-cianobacterias-aplicacion-en-medicina/>
- Richmond, A. (Ed.). 2004. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Publishing Company. Reino Unido.
- Serpa, R. y A. Calderón. 2005. Efecto del estrés por salinidad en cuatro cepas de *Dunaliella salina* Teod. en el Perú. *Ecología Aplicada*, 4(2):127-133.
- Streit N., L. Ramírez-Mérida, L. Queiroz-Zepka, E. Jacob-Lopes y M. Queiroz. 2015. Producción de pigmentos naturales (clorofila-a) en biorrefinerías agroindustriales. *Ciencia y Tecnología*, 8(2):29-36.
- Strickland, J. y T. Parsons. 1972. A Practical Handbook of Seawater Analysis. *Bull. Fisheries Research Board of Canada*, 167:1-310.
- Wegmann K. y H. Metzner. 1971. Synchronization of *Dunaliella salina* cultures. *Archiv. für Mikrobiologie*, 78:360-367.
- Yépez, M. y E. Morales. 1998. Efecto de la concentración de nitrato y cloruro de sodio sobre la densidad celular y contenido de pigmentos y proteínas de *Dunaliella viridis*. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas*. Universidad de Zulia, Maracaibo, Venezuela, 32(1):112.