

# Cultivo de cepas de *Dunaliella salina* (Teodoresco 1905) en diferentes medios bajo condiciones de laboratorio

Culture of strains of *Dunaliella salina* (Teodoresco 1905) in different media under laboratory conditions

ANA S. CIFUENTES, MARIELA GONZALEZ, OSCAR PARRA y MIGUEL ZUÑIGA

Departamento de Botánica, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas,  
Universidad de Concepción, Casilla 2407, Concepción, Chile

## RESUMEN

Se cuantificó el contenido de pigmentos (clorofila "a" y carotenoides totales) y la densidad celular en siete cepas chilenas de *Dunaliella salina* (Teodoresco 1905) y en *Dunaliella bardawil* (Avron & Ben-Amotz 1980a), en fase estacionaria de crecimiento, cultivadas en tres medios de diferente composición nutricional (PES, ES y J/1). Los cultivos se realizaron en tubos de ensayo con 15 ml de medio, a densidad de flujo fotónico de 60 y 30  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  desde arriba y abajo, respectivamente, temperatura de  $20 \pm 3^\circ\text{C}$  y fotoperíodo 12:12. En todas las cepas, los mayores contenidos de carotenoides totales por célula y las menores densidades celulares se obtuvieron en medio PES ocurriendo lo contrario en medio J/1. A pesar de las diferencias encontradas en el contenido de pigmentos por célula en estos dos medios, el rendimiento promedio de carotenoides totales por volumen de cultivo fue similar en ambos medios. La cepa más carotenogénica fue CONC-007 con valores de 97,5  $\text{pg c\acute{e}l}^{-1}$  y 59,5  $\text{mg l}^{-1}$  en medio PES + 20% NaCl. Aunque la cepa CONC-006 acumuló el mayor contenido de carotenoides totales por célula en medio PES (124  $\text{pg c\acute{e}l}^{-1}$ ), la concentración de pigmentos por litro fue inferior, debido a la menor capacidad de carga en éste y en los otros medios de cultivo utilizados. La cepa CONC-001 de Antofagasta fue la menos carotenogénica. *D. bardawil* mostró un contenido de carotenos similar al promedio del resto de las cepas chilenas. Se discute la utilización de los medios PES, ES y J/1 en el cultivo de *D. salina* en condiciones de laboratorio y su proyección en el cultivo a escala industrial.

**Palabras clave:** *D. salina*, carotenoides, cultura media.

## ABSTRACT

Pigment content (chlorophyll "a" and total carotenoids) and cell density in seven Chilean strains of *Dunaliella salina* and in *Dunaliella bardawil* grown in three media with different nutritional composition (PES, ES and J/1) were quantified at stationary phase of growth. The strains were grown in test tubes with 15 ml of medium, under a photon flux density of 60 and 30  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ , from above and below, respectively, at a temperature of  $20 \pm 3^\circ\text{C}$  and a photoperiod 12:12 (L:D). In all the strains, the highest total carotenoids content per cell and the lowest cell density were obtained in PES medium; the contrary occurred in J/1 medium. In spite of the differences in pigment content per cell obtained in PES and in J/1, the mean yield of total carotenoid per volume was similar in both media. CONC-007 was the most carotenogenic strain with values of 97,5  $\text{pg c\acute{e}l}^{-1}$  and 59,5  $\text{mg l}^{-1}$  in PES + 20% NaCl. Although the strain CONC-006 accumulated the highest total carotenoids per cell in PES (124  $\text{pg c\acute{e}l}^{-1}$ ), the concentration of these pigments per liter was lower than in the other strains because of the inferior cell density of this strain in PES and in any of the media assessed. The strain CONC-001 from Antofagasta was the least carotenogenic (6.4 a 49.7  $\text{pg c\acute{e}l}^{-1}$ ). *D. bardawil* exhibited a carotenoids content similar to the mean of the other Chilean strains (13.9 a 49.8  $\text{pg c\acute{e}l}^{-1}$ ). The utilization of PES, ES and J/1 in the cultivation of *D. salina* under laboratory conditions is discussed, as well as the potential use of these media in cultures at industrial scale.

**Key words:** *D. salina*, carotenoids, culture media.

## INTRODUCCION

La mayoría de los medios de cultivo para *Dunaliella* han sido formulados en base a estudios sobre el cultivo de especies fitoplanctónicas afines, con algunas modificaciones de acuerdo a las necesidades de investigación (Gibor 1956, Mc Lachlan 1960,

Johnson et al. 1968, Van Auken & Mc Nulty 1973). Mc Lachlan (1959, 1960, 1964) realizó estudios de crecimiento en numerosas especies de algas marinas unicelulares, entre ellas algunas del género *Dunaliella*, utilizando medios artificiales y naturales enriquecidos y concluyó que, en general, las algas verdes, a diferencia de otras algas, crecen bien

en ambas clases de medios. Anteriormente, Provasoli et al. (1957) había señalado que las clorofitas parecían más adaptables que otros grupos de algas a una amplia variedad de condiciones de laboratorio. Ginzburg (1987) y Borowitzka & Borowitzka (1988) reunieron la información existente sobre los componentes nutricionales y las condiciones requeridas para el crecimiento de especies de *Dunaliella*.

La habilidad de *Dunaliella salina*, y otros taxa halofílicos del género, para adaptarse a altas salinidades, que van desde un poco superiores a la del agua de mar hasta niveles de saturación (Gibor 1956, Brown & Borowitzka 1979, Loeblich 1982, Roubicek et al. 1986) ha permitido su mantención en medios de cultivo con alto contenido de sal, libres de especies potencialmente competitivas y de otros contaminantes biológicos. Además de la salinidad, *D. salina* también es capaz de tolerar un amplio rango de condiciones ambientales, incluyendo altas intensidades luminosas, altas temperaturas, un amplio rango de pH y deficiencias de nitrógeno y/o fósforo (Lerche 1937, Loeblich 1982, Ben-Amotz & Avron 1983, Borowitzka et al. 1984). Estas características han facilitado su cultivo en medios de variada composición nutricional.

Por otra parte, esta especie ha sido muy estudiada por su capacidad para producir grandes cantidades de betacaroteno en condiciones de crecimiento subóptimas y se ha determinado el rango de condiciones que generan una máxima producción de este pigmento (ver Borowitzka & Borowitzka 1988). A través del cultivo de *D. salina* a escala industrial, se han establecido las concentraciones mínimas de nutrientes necesarias para obtener condiciones de crecimiento y carotenogénesis adecuadas. Roubicek et al. (1986) señalaron la conveniencia de utilizar agua salina subterránea o salobre, a menudo disponible en áreas semiáridas y áridas con abundante radiación solar, o de agua geotérmica industrial, en el cultivo de especies halofílicas. Ben-Amotz (1980) indicó que el agua de mar aporta la mayoría de los requerimientos para un crecimiento óptimo de *Dunaliella* y que no es necesario agregar vitaminas ni extracto de suelo al medio de cultivo. Avron & Ben-Amotz (1980a, 1980b) cultivaron la es-

pecie *D. bardawil* con óptimos resultados, tanto en un medio artificial como en agua de mar enriquecida e indicaron la composición de ambos medios para la producción de glicérol y carotenos en cultivos a escala industrial. Por otra parte, Borowitzka (1988) formuló un medio de cultivo artificial para *Dunaliella*, (J/1), modificado del medio Johnson original (Johnson et al. 1968).

Las diferentes cepas chilenas de *D. salina* aisladas de la zona norte del país (Cifuentes et al. 1992) han sido mantenidas en una variedad de medios de cultivo de los cuales se seleccionaron dos medios naturales enriquecidos: agua de mar enriquecida de Provasoli, PES (Mc Lachlan 1973) y solución Erdschreiber, ES (Starr 1964) y un medio artificial: Johnson modificado por Borowitzka, J/1 (Borowitzka 1988). El medio PES es un medio natural enriquecido, con una pequeña cantidad de nitrógeno a la forma de nitrato y fósforo a la forma de glicerofosfato. El medio Johnson tiene una gran oferta de nitrógeno y fósforo inorgánicos (N-NO<sub>3</sub>, P-PO<sub>4</sub>) y el medio ES es un medio natural enriquecido con N-NO<sub>3</sub> y P-PO<sub>4</sub> que coinciden con las que Avron & Ben-Amotz (1980a) señalaron como óptimas para el cultivo de *D. bardawil*. Con estos medios se ha obtenido un amplio espectro de resultados de crecimiento y carotenogénesis, estimados cualitativamente por el color de los cultivos de las diferentes cepas.

El objetivo de este estudio fue cuantificar y comparar los resultados de crecimiento (densidad celular) y carotenogénesis (contenido de carotenos y clorofila "a") en fase estacionaria entre cepas cultivadas en un mismo medio y de una misma cepa, en medios distintos. A modo de comparación, se incluyó la especie *D. bardawil*<sup>1</sup> proveniente de Israel.

#### MATERIALES Y METODOS

El estudio se realizó utilizando cultivos unialgales y clonales de 7 cepas chilenas de

<sup>1</sup> *D. bardawil* es un nomen nudum de *D. salina* Teod. (Borowitzka & Borowitzka, 1988) como lo son todas las cepas que se tornan rojas debido a la producción de grandes cantidades de betacaroteno bajo condiciones ambientales extremas (Massyuk, 1973; Loeblich, 1982).

*D. salina*: CONC-001, CONC-003, CONC-004, CONC-005, CONC-006, CONC-007 y CONC-008 y la especie *D. bardawil* de Israel. La cepa CONC-001 proviene de la laguna La Rinconada, de Antofagasta, y las chilenas restantes del Salar de Atacama (Cifuentes et al. 1992).

El diseño experimental consistió de 32 tratamientos con 4 réplicas cada uno. Las cepas fueron cultivadas simultáneamente en los medios: i) agua de mar enriquecida de Provasoli (Provasoli 1963, 1968, Mc Lachlan 1973) con un suplemento de 20% de NaCl (PES + 20% NaCl), ii) solución Erdschreiber (Starr 1964) con adición de 12,5% de NaCl (ES + 12,5 % NaCl), iii) solución Erdschreiber con 20% de NaCl (ES + 20% NaCl) y iv) medio Johnson modificado por Borowitzka (Borowitzka 1988) con 15% de NaCl (J/1 + 15% de NaCl). La Tabla 1 indica la composición de estos medios y la concentración final de cada compuesto. Concentraciones de 12,5 y 15% de NaCl son equivalentes en medio ES (natural enriquecido) y J/1 (artificial), respectivamente. Esta concentración de sal corresponde a la óptima para el crecimiento de la cepa CONC-001 (Parra et al. 1990) y en ella se mantiene la mayor parte de los cultivos de las diferentes cepas de *D. salina* y otras especies halofílicas del género. Un suplemento de 20% de NaCl (ca. 3,5 M) corresponde a una salinidad en la que todas las cepas presentan un crecimiento aceptable asociado con una mayor carotenogénesis.

La densidad celular al inicio de los experimentos fue entre 1000 a 3000 cél ml<sup>-1</sup>. Los cultivos se mantuvieron en tubos de ensayo (15 ml) colocados oblicuamente sobre repisas de vidrio transparente y fueron iluminados con tubos fluorescentes de luz fría, con una densidad de flujo fotónico de 60 y 30 µEm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, desde arriba y abajo, respectivamente. La temperatura de la sala de cultivo fue de 20 ± 3°C y el fotoperíodo de 12:12.

Después de 60 días de cultivo (i.e., fase estacionaria de crecimiento) se determinó el contenido de carotenos totales y clorofila "a" en las cuatro réplicas de cada tratamiento experimental, mediante espectrofotometría en extractos de acetona al 90% según Wegmann & Metzner (1971). La densidad celular se estimó mediante conteo (en el cultivo con la densidad óptica más cercana al

TABLA 1

Composición de los medios usados en los cultivos de *D. salina*

Composition of media used in the cultures of *D. salina*

| Adición   | PES <sup>(*)</sup>     | ES <sup>(*)</sup> | J/1 <sup>(**)</sup> |
|---|------------------------|-------------------|---------------------|
| NaCl  | 2,0-4,0 M              | 2,0-4,0 M         | 2,0-4,0 M           |
| NaNO <sub>3</sub>   | 0,65 mM                | 1,2 mM            |                     |
| KNO <sub>3</sub>  |                        |                   | 9,9 mM              |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>   |                        |                   | 0,25 mM             |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>  |                        | 0,14 mM           |                     |
| Na <sub>2</sub> glicerofosfato x 5H <sub>2</sub> O                                  | 0,026 mM               |                   |                     |
| MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O   |                        |                   | 7,4 mM              |
| MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O   |                        |                   | 2,0 mM              |
| KCl   |                        |                   | 2,7 mM              |
| CaCl <sub>2</sub> x H <sub>2</sub> O  |                        |                   | 1,4 mM              |
| NaHCO <sub>3</sub>  |                        |                   | 0,5 mM              |
| Na <sub>2</sub> EDTA x 2 H <sub>2</sub> O   | 7,8 µM                 |                   | 5,0 µM              |
| Vitamina B-12   | 1,6 µg l <sup>-1</sup> |                   |                     |
| Tiamina   | 8,0 µg l <sup>-1</sup> |                   |                     |
| Biotina   | 0,8 µg l <sup>-1</sup> |                   |                     |
| Buffer TRIS   | 0,66 mM                |                   |                     |
| Extracto de suelo   |                        | 50 ml             |                     |
| FeCl <sub>3</sub> x 6 H <sub>2</sub> O  | 0,7 µM                 |                   | 9,0 µM              |
| H <sub>2</sub> BO <sub>3</sub>  | 72,0 µM                |                   | 10,0 µM             |
| CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O  |                        |                   | 0,2 µM              |
| CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O  |                        |                   | 0,2 µM              |
| CoSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O  | 0,07 µM                |                   |                     |
| ZnCl <sub>2</sub>   |                        |                   | 0,3 µM              |
| ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O   | 0,3 µM                 |                   |                     |
| MnSi <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O   |                        |                   | 0,2 µM              |
| MnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O   |                        | 2,3 µM            |                     |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>34</sub> x 4H <sub>2</sub> O |                        |                   | 0,3 µM              |

(\*) Medio de cultivo natural enriquecido.

(\*\*) Medio de cultivo artificial.

promedio de las densidades ópticas de las réplicas) en cámaras Utermöhl de 1 ml con un microscopio invertido K. Zeiss (6-8 conteos por tratamiento).

Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa Systat (Wilkinson 1991). Las diferencias en la producción de carotenos entre cepas y medios de cultivo se determinaron por medio de análisis de varianza seguido de comparaciones múltiples (Test de Tukey y Ajuste de Bonferroni) sobre los datos de carotenoides totales (mg l<sup>-1</sup>, pg cél<sup>-1</sup>) transformados a logaritmo natural. Mediante regresión lineal simple se estableció la relación entre carotenoides totales (mg<sup>-1</sup>), carotenoides totales (pg cél<sup>-1</sup>) y la razón carotenoides totales: clorofila "a".

## RESULTADOS

Las cepas de *D. salina* y *D. bardawil*, presentaron diferencias significativas (P <

0,001) en el contenido promedio de carotenoides totales en y entre medios de cultivo (Tabla 3) bajo condiciones uniformes de luz, temperatura, fotoperíodo y salinidad. En medio PES se observó activa carotenogénesis desde el inicio de los cultivos, que se mantuvieron siempre anaranjados a rojizos. En medio ES, inicialmente se observó coloración verde, que se tornó anaranjada a partir del inicio de la fase de crecimiento estacionaria (ca. 25 días). Al contrario, en medio J/1 siempre se observó una coloración verde intensa, aun en fase estacionaria tardía (ca. 6 meses).

Al comparar la producción de carotenoides por célula entre medios de cultivo, los mayores valores se obtuvieron con el medio PES + 20% NaCl, con variaciones entre  $41,9 \pm 5,2$  pg cel<sup>-1</sup> (cepa CONC-008) y  $124,6 \pm 21,7$  pg cel<sup>-1</sup> (cepa CONC-006) (Tabla 2). En este medio de cultivo, en cuanto a producción de carotenos por célula, se diferenciaron los siguientes grupos: cepa CONC-006 > cepa CONC-003 = cepa CONC-005 = cepa CONC-007 > cepa CONC-001 = cepa CONC-004 = cepa CONC-008 = *D. bardawil* (P < 0,001). Los demás medios de cultivo presentaron una producción de carotenoides

TABLA 2

Contenido promedio ( $\pm$  desviación estándar) de carotenoides en siete cepas chilenas de *D. salina* y en *D. bardawil* en fase estacionaria de crecimiento en diferentes medios de cultivo. (a) Carotenoides totales por célula (pg cel<sup>-1</sup>), (b) Carotenoides totales por volumen (mg l<sup>-1</sup>) y (c) Razón entre carotenoides totales y clorofila "a" (g g<sup>-1</sup>)

Mean content ( $\pm$  standard deviation) of carotenoids in seven Chilean strains of *D. salina* and *D. bardawil* in stationary phase of growth in different culture media. a. Total carotenoids per cell (pg cell<sup>-1</sup>) b. Total carotenoids per volume (mg l<sup>-1</sup>) c. Total carotenoids to chlorophyll "a" ratio (g g<sup>-1</sup>)

a. Carotenoides totales (pg cel<sup>-1</sup>)

| Cepa               | PES + 20% NaCl | ES + 20% NaCl | ES + 12,5% NaCl | J/1 + 15% NaCl |
|--------------------|----------------|---------------|-----------------|----------------|
| CONC-001           | 49,7 (6,5)     | 10,7 (2,3)    | 6,4 (1,0)       | 8,5 (1,9)      |
| CONC-003           | 97,2 (7,3)     | 21,3 (3,2)    | 14,4 (1,7)      | 15,1 (0,8)     |
| CONC-004           | 55,2 (6,3)     | 28,7 (6,0)    | 18,5 (1,5)      | 9,9 (1,5)      |
| CONC-005           | 79,6 (14,3)    | 38,2 (7,1)    | 27,6 (3,2)      | 12,0 (1,9)     |
| CONC-006           | 124,6 (21,7)   | 23,7 (5,4)    | 21,6 (4,7)      | 15,6 (1,6)     |
| CONC-007           | 97,5 (29,1)    | 42,4 (5,6)    | 27,6 (3,3)      | 10,5 (0,8)     |
| CONC-008           | 41,9 (5,2)     | 22,0 (2,5)    | 15,0 (0,9)      | 13,7 (0,9)     |
| <i>D. bardawil</i> | 49,8 (3,6)     | 19,8 (2,8)    | 16,0 (2,0)      | 13,9 (1,2)     |

b. Carotenoides totales (mg l<sup>-1</sup>)

| Cepa               | PES + 20% NaCl | ES + 20% NaCl | ES + 12,5% NaCl | J/1 + 15% NaCl |
|--------------------|----------------|---------------|-----------------|----------------|
| CONC-001           | 24,9 (3,3)     | 14,1 (3,1)    | 10,2 (1,7)      | 22,2 (4,9)     |
| CONC-003           | 43,8 (3,3)     | 27,4 (4,1)    | 18,8 (2,2)      | 28,7 (1,4)     |
| CONC-004           | 53,0 (6,0)     | 31,5 (6,6)    | 20,2 (1,6)      | 23,8 (3,6)     |
| CONC-005           | 35,8 (6,4)     | 31,7 (5,9)    | 20,7 (2,4)      | 24,0 (3,8)     |
| CONC-006           | 28,7 (5,0)     | 16,8 (3,8)    | 14,3 (3,1)      | 29,7 (3,0)     |
| CONC-007           | 59,5 (17,7)    | 31,8 (4,2)    | 20,7 (1,5)      | 24,2 (1,9)     |
| CONC-008           | 29,4 (3,6)     | 30,8 (3,4)    | 20,5 (1,2)      | 27,5 (1,8)     |
| <i>D. bardawil</i> | 32,9 (2,4)     | 28,6 (4,0)    | 19,2 (2,4)      | 27,8 (2,3)     |

c. Razón carotenoides totales: clorofila "a" (g g<sup>-1</sup>)

| Cepa               | PES + 20% NaCl | ES + 20% NaCl | ES + 12,5% NaCl | J/1 + 15% NaCl |
|--------------------|----------------|---------------|-----------------|----------------|
| CONC-001           | 10,9 (0,8)     | 6,9 (1,3)     | 3,5 (1,0)       | 2,0 (0,5)      |
| CONC-003           | 18,5 (1,0)     | 7,4 (2,0)     | 4,5 (0,9)       | 2,3 (0,4)      |
| CONC-004           | 14,6 (2,0)     | 8,5 (2,1)     | 4,8 (0,4)       | 2,4 (0,5)      |
| CONC-005           | 15,4 (1,7)     | 6,6 (1,6)     | 3,9 (0,4)       | 2,2 (0,4)      |
| CONC-006           | 13,4 (1,7)     | 7,0 (2,0)     | 3,2 (0,7)       | 2,0 (0,5)      |
| CONC-007           | 33,9 (3,9)     | 8,5 (1,4)     | 5,8 (0,8)       | 2,8 (0,7)      |
| CONC-008           | 17,9 (1,4)     | 8,7 (1,5)     | 3,4 (0,6)       | 2,1 (0,5)      |
| <i>D. bardawil</i> | 16,4 (1,0)     | 7,0 (0,6)     | 3,9 (0,6)       | 2,3 (0,4)      |

TABLA 3

Comparación de la producción de carotenoides totales en: (a) concentración celular ( $\text{pg cel}^{-1}$ ) y (b) volumen de cultivo ( $\text{mg l}^{-1}$ ) entre cepas de *D. salina* cultivadas en diferentes medios de cultivo. Datos transformados a logaritmo natural para mantener el supuesto de homocedasticidad

Comparison of production of total carotenoids in: (a) cellular concentration ( $\text{pg cel}^{-1}$ ) and (b) culture volume ( $\text{mg l}^{-1}$ ) among strains of *D. salina* cultured in different media. Data transformed to natural logarithm to maintain the assumption of homoscedasticity

| a. Carotenoides totales ( $\text{pg cel}^{-1}$ ) |        |    |        |         |         |
|--|--------|----|--------|---------|---------|
| FUENTE   | SS     | DF | MS     | F       | P       |
| Entre cepas                                      | 10.605 | 7  | 1.515  | 64.710  | < 0.001 |
| Entre medios                                     | 54.552 | 3  | 18.184 | 776.700 | < 0.001 |
| Cepa medio                                       | 6.489  | 21 | 0.309  | 13.198  | < 0.001 |
| Residuo  | 2.248  | 96 | 0.023  |         |         |
| b. carotenoides totales ( $\text{mg l}^{-1}$ )   |        |    |        |         |         |
| FUENTE   | SS     | DF | MS     | F       | P       |
| Entre cepas                                      | 4.815  | 7  | 0.688  | 29.383  | < 0.001 |
| Entre medios                                     | 8.646  | 3  | 2.882  | 123.093 | < 0.001 |
| Cepa medio                                       | 2.945  | 21 | 0.140  | 5.991   | < 0.001 |
| Residuo  | 2.248  | 96 | 0.023  |         |         |

inferior, con fluctuaciones entre  $42,4 \pm 5,6$   $\text{pg cel}^{-1}$  (cepa CONC-007) en medio ES + 20% NaCl y  $6,4 \pm 1,0$   $\text{pg cel}^{-1}$  (cepa CONC-001 en medio ES + 12,5% NaCl). En general, en todas las cepas estudiadas, los menores contenidos de carotenoides por célula se obtuvieron con los medios de cultivo ES + 12,5% NaCl y J/1 + 15% NaCl, con valores extremos en la cepa CONC-001 ( $6,4 \pm 1,0$   $\text{pg cel}^{-1}$  y  $8,5 \pm 1,9$   $\text{pg cel}^{-1}$ , respectivamente).

Por otra parte, al comparar el contenido promedio de carotenoides de las cepas por volumen de cultivo, los mayores valores se obtuvieron en medio PES + 20% NaCl ( $59,5 \pm 17,7$   $\text{mg l}^{-1}$  en la cepa CONC-007 y  $53,0 \pm 6,0$   $\text{mg l}^{-1}$  en la cepa CONC-004), encontrándose contenidos significativamente menores y similares entre sí en los medios de cultivo J/1 + 15% NaCl y ES + 12,5% NaCl (Tabla 2). En medio PES + 20% NaCl pudieron diferenciarse, desde mayor a menor producción, los siguientes grupos: cepa CONC-007 = cepa CONC-004 > cepa CONC-003 > cepa CONC-005 = cepa CONC-006 = cepa CONC-008 = *D. bardawil* > cepa CONC-001 ( $P < 0,001$ ).

La razón carotenoides totales: clorofila "a" fue superior en medio PES + 20% NaCl con las máximas razones en la cepa CONC-007 ( $33,9 \pm 3,9$ ), la cual se diferenció significativamente del resto de las cepas ( $P < 0,001$ ). La razón carotenoides totales: clorofila "a" fue mucho menor en los demás medios de cultivo, con razones similares entre cepas en los medios ES + 20% NaCl ( $P > 0,01$ ) y J/1 + 15% NaCl ( $P > 0,01$ ).

A través del análisis de regresión lineal de los datos, independiente del medio de cultivo y de las cepas, se obtuvieron coeficientes de regresión significativos entre el contenido de carotenoides totales por volumen y el contenido de carotenoides totales por célula ( $r^2 = 0,447$ ,  $P < 0,001$ , Fig. 1) y entre el contenido de carotenoides totales por volumen y la razón carotenoides totales: clorofila "a" ( $r^2 = 0,534$ ,  $P < 0,001$ , Fig. 2).

## DISCUSION

Los tres medios de cultivo utilizados en este estudio han demostrado ser de gran utilidad, en nuestro laboratorio, tanto en la mantención de las diferentes cepas de *D. salina* como en diversas experiencias de cultivo. Así, el medio PES ha sido muy útil para obtener cultivos unialgales de *D. salina* a partir

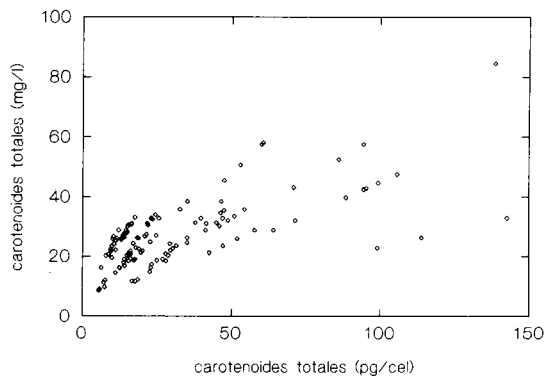


Fig. 1: Relación entre el contenido de carotenoides totales por célula ( $\text{pg cel}^{-1}$ ) y contenido de carotenoides totales por volumen ( $\text{mg l}^{-1}$ ) en cepas de *D. salina* y *D. bardawil* cultivadas en diferentes medios ( $r = 0,668$ ,  $P < 0,001$ ).

Relation between total carotenoids per cell ( $\text{pg cel}^{-1}$ ) and total carotenoids per volume ( $\text{mg l}^{-1}$ ) in strains of *D. salina* and *D. bardawil* cultured within different media ( $r = 0,668$ ,  $P < 0,001$ ).

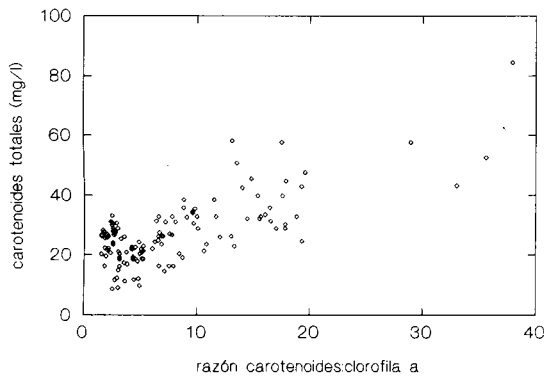


Fig. 2: Relación entre la razón carotenoides totales: clorofila "a" y el contenido de carotenoides totales ( $\text{mg l}^{-1}$ ) en cepas de *D. salina* y *D. bardawil* cultivadas en diferentes medios ( $r = 0,731$ ,  $P < 0,001$ ).

Relation between total carotenoid to chlorophyll "a" ratio and total carotenoids ( $\text{mg l}^{-1}$ ) in strains of *D. salina* and *D. bardawil* within different culture media ( $r = 0,668$ ,  $P < 0,001$ ).

de muestras de terreno, ya que otros taxa algales u otras especies de *Dunaliella* (*D. viridis* (Teodoresco 1905)), *D. pseudosalina* (Massyuk & Radchenko 1973) no crecen en este medio o su crecimiento es muy deficiente. Esto último ha sido discutido por Cifuentes et al. (1992), específicamente en lo que respecta a los diferentes requerimientos de fosfato que Moulton & Burford (1992) encontraron para *D. salina* y *D. viridis*. Por otro lado, experiencias de cultivos realizadas en nuestro laboratorio señalan que el glicerofosfato (fuente de P en PES), utilizado en un amplio rango de concentraciones, es menos apropiado que el fosfato inorgánico para el crecimiento de *D. salina* (datos no publicados). Resultados similares obtuvo Mc Lachlan (1964) en *D. tertiolecta* (Butcher 1959). En medio PES, *D. salina* alcanza bajas densidades celulares después de una fase exponencial corta, unida a la más alta carotenogénesis celular cuantificada en nuestro laboratorio.

El medio J/1 ha sido útil en estudios nutricionales. Los medios de cultivo artificiales permiten eliminar la complejidad y variabilidad intrínseca del agua de mar natural y ensayar condiciones de crecimiento muy diferentes a las existentes en la naturaleza logrando, por ejemplo, altas densidades celulares en cortos períodos de tiempo (Provasoli

et al. 1957). En este medio, los cultivos de *D. salina* pueden ser mantenidos durante varios meses a altas densidades celulares, sin signos de deficiencia nutricional (intensamente verdes).

El medio ES es un medio que por su fácil formulación y aceptables resultados tanto de crecimiento como de carotenogénesis (Cifuentes et al. 1992) ha sido usado en diversas experiencias de crecimiento en *D. salina* y otras especies halofílicas.

A pesar de las grandes diferencias entre las densidades celulares obtenidas en medio J/1 + 15% NaCl y PES + 20% NaCl, en todas las cepas, el rendimiento de carotenoides por volumen de cultivo no difiere en igual magnitud. Más aún, en algunas cepas es muy similar en ambos medios de cultivo. En medio ES, los resultados fueron intermedios y el mejor rendimiento de carotenoides por volumen de cultivo se obtuvo a la mayor salinidad.

Llama la atención el alto contenido de carotenoides obtenido en medio PES, en todas las cepas ensayadas, si se considera que tanto la densidad de flujo fotónico como la salinidad están muy lejos de los límites de saturación (Loeblich 1982, Van Auken & McNulty 1973, Ben-Amotz & Avron 1983, Borowitzka et al. 1984, Ben-Amotz et al. 1987). Más aún, si se considera que concentraciones similares de nitrato (0,7 mM) o fosfato (0,03 mM) en medio J/1 dieron, en experiencias previas, contenidos de carotenoides por célula menores que los estimados en medio PES a igual salinidad. CONC-007 fue la cepa más carotenogénica con valores de  $97,5 \text{ pg cél}^{-1}$  y  $59,5 \text{ mg l}^{-1}$ , siendo también la que presentó el color más rojizo con la más alta razón entre carotenoides y clorofila "a". Aunque la cepa CONC-006 acumula el mayor contenido de carotenoides por célula ( $124,6 \text{ pg cél}^{-1}$ ), la concentración de éstos por litro es muy inferior ( $28,7 \text{ mg}$ ) debido a la menor capacidad de carga en medio PES. La menor capacidad de carga de los cultivos de esta cepa en éste y en los otros medios ensayados, pareciera estar relacionada con el mayor tamaño celular promedio de esta cepa (Cifuentes et al. 1992). Por el contrario, la cepa de Antofagasta (CONC-001) mostró la menor carotenogénesis, respuesta similar a la encontrada por Cifuentes et al. (1992).

*Dunaliella bardawil* presentó un contenido de pigmentos similar a algunas de las cepas chilenas.

La comparación del nivel carotenogénico de las cepas chilenas de *D. salina* con el de otras señalado en la literatura, tiene restricciones ya que la mayoría de los autores han estimado, específicamente, betacaroteno por métodos diferentes. Es así como, Avron & Ben-Amotz (1980a) indican un máximo entre 50-90 pg de betacaroteno por célula para *D. bardawil* cultivada bajo luz solar directa y sólo 8-16 pg de betacaroteno por célula, en laboratorio. Ben-Amotz & Avron (1983), para la misma especie, estiman un máximo de 40 pg de betacaroteno por célula, bajo condiciones de alta intensidad lumínica y salinidad, con una máxima razón entre betacaroteno y clorofila "a" ( $13 \text{ g g}^{-1}$ ) bajo deficiencia de nitratos. En un trabajo más reciente, Ben-Amotz & Avron (1989), estudiando la dependencia de la longitud de onda en la síntesis masiva de carotenos en *D. bardawil*, obtienen un máximo de 32 pg de betacaroteno por célula y una relación entre betacaroteno y clorofila máxima de 15,3 en células mantenidas bajo luz blanca de ca.  $1000 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Valores semejantes a los obtenidos en este estudio son los encontrados por Moulton & Burford (1990) para *D. salina*, la cual a salinidades de ca.  $200 \text{ g l}^{-1}$  acumula entre 50-150 pg betacaroteno por célula, que equivale a un 10% del peso seco. Por otra parte, Araneda et al. (1992) encontraron que la cepa CONC-007 acumuló el mayor contenido de betacaroteno bajo todas las condiciones ensayadas ( $90-100 \text{ pg cel}^{-1}$ ), siendo 2 a 4 veces más alto que los registrados en la literatura. Estos autores encontraron también que la cepa CONC-001 y CONC-003 acumularon contenidos de carotenoides similares a *D. bardawil*.

La diferencia en la oferta de nutrientes entre medios de diferente composición determina densidades celulares máximas muy distintas, aunque las tasas máximas de crecimiento suelen ser muy similares. Si la luz y el dióxido de carbono no son limitantes, el crecimiento exponencial prevalece a una tasa constante hasta que los nutrientes limitantes hayan sido tomados del medio e incorporados a la biomasa algal. Luego del consumo de los nutrientes (usualmente N y P), el cre-

cimiento todavía continúa, utilizando las reservas intracelulares. Cuando los nutrientes se agotan, se produce una transición abrupta desde la fase exponencial a la estacionaria. Por el contrario, en medios ricos, se produce una fase lineal más prolongada, característica de cultivos en los que la luz se hace limitante después de una determinada densidad celular (Fogg 1966). Estas dos situaciones son válidas para los medios PES y J/1, respectivamente, y explicarían los resultados obtenidos en estos dos medios.

De acuerdo a los resultados y condiciones experimentales ensayadas, el medio PES parece ser adecuado para cultivar *D. salina* con fines comerciales. Este medio podría servir de base para ensayar cultivos continuos o semicontinuos manteniendo la tasa máxima de crecimiento con una alta carotenogénesis, mediante cosecha y reemplazo del medio de cultivo a intervalos de tiempo cortos. El tamaño del inóculo y el tiempo de cosecha óptimos deben ser factores de mayor investigación.

#### AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por el Proyecto 91.32.24-1 de la Dirección de Investigación, Universidad de Concepción, Chile.

#### LITERATURA CITADA

- ARANEDA P, JIMENEZ C & B GOMEZ-SILVA (1992) Microalgae from Northern Chile III. Growth and beta-carotene content of three isolates of *Dunaliella salina* from the Atacama Desert. Revista de Biología Marina de Valparaíso (Chile) 27: 157-162.
- AVRON M & A BEN-AMOTZ (1980a) Alga Strain. United States Patent Plant 4, 511.
- AVRON M & A BEN-AMOTZ (1980b) Production of glycerol, carotenenes and algae meal. United States Patent 4, 199, 895.
- BEN-AMOTZ A (1980) Glycerol production in the alga *Dunaliella*. En: San Pietro A (ed) Biochemical and photosynthetic aspects of energy production: 191-208. New York Academic Press, New York.
- BEN-AMOTZ A & M AVRON (1983) On the factors which determine massive  $\beta$ -carotene accumulation in the halotolerant alga *D. bardawil*. Plant Physiology 72: 593-597.
- BEN-AMOTZ A & M AVRON (1989) The wavelength dependence of massive carotene synthesis in *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae). Journal of Phycology 25: 175-178.
- BEN-AMOTZ A, J GRESSEL & M AVRON (1987) Massive accumulation of phytoene induced by norflurazon in *D. bardawil* (Chlorophyceae) prevents

- recovery from photoinhibition. *Journal of Phycology* 23: 176-181.
- BOROWITZKA MA (1988) Algal growth media and sources of algal cultures. En: Borowitzka MA & LJ Borowitzka (eds) *Microalgal Biotechnology*: 456-465. Cambridge University Press, Cambridge.
- BOROWITZKA LJ, MA BOROWITZKA & TP MOULTON (1984) The mass culture of *Dunaliella salina* for fine chemicals: from laboratory topilot plant. *Hydrobiologia* 116/117: 115-121.
- BOROWITZKA MA & LJ BOROWITZKA (1988) *Dunaliella*. En: Borowitzka MA & LJ Borowitzka (eds) *Micro-algal Biotechnology*: 27-58. Cambridge University Press, Cambridge.
- BROWN AD & LJ BOROWITZKA (1979) Halotolerance of *Dunaliella*. En: Levandowky M & SH Hunter (eds) *Biochemistry and Physiology of Protozoa*, vol 1, second edition: 139-190 New York Academic Press, New York.
- CIFUENTES AS, M GONZALEZ, M CONEJEROS, VH DELLAROSSA & OO PARRA (1992) Growth and carotenogenesis en eight strains of *Dunaliella salina* Teodororesco from Chile. *Journal of Applied Phycology* 4: 111-118.
- FOGG GE. ed (1966) *Algal cultures and Phytoplankton Ecology*. University of Wisconsin Press, London. 126 pp
- GIBOR A (1956) The culture of brine algal. *Biological Bulletin Woods Hole* 3: 223-229.
- GINZBURG M (1987) *Dunaliella*: A Green Alga Adapted to Salt. *Advances in Botanical Research* 14: 93-183.
- JOHNSON MK, EJ JOHNSON, RD Mc ELROY, HL SPEER & BS BRUFF (1968) Effects of salt on the halophilic alga *Dunaliella viridis*. *Journal of Bacteriology* 95: 1461-1468.
- LERCHE W (1937) Untersuchungen uber die Entwicklung und Fortpflanzung in der Gattung *Dunaliella*. *Archiv fur Protistenkunde* 88: 236-239.
- LOEBLICH LA (1982) Photosynthesis and pigments influenced bylight intensity and salinity in the halophile *Dunaliella salina* (Chlorophyta). *Journal of the Marine Biological Association, United Kingdom* 62: 493-508.
- Mc LACHLAN J (1959) The growth of unicellular algae in artificial and enriched seawater media. *Canadian Journal of Microbiology* 5: 9-15.
- Mc LACHLAN J (1960) The culture of *Dunaliella tertiolecta* Butcher a euryhaline organism. *Canadian Journal of Microbiology* 6: 367-375.
- Mc LACHLAN J (1964) Some considerations of the growth of marine algae in artificial media. *Canadian Journal of Microbiology* 10: 769-782.
- Mc LACHLAN J (1973) Growth-media-marine. In: Stein JR (ed) *Handbook of Phycological Methods. Culture Methods & Growth Measurements*: 25-51. Cambridge University Press, London.
- MOULTON TP & MA BURFORD (1990) The mass culture of *Dunaliella viridis* (Volvocales, Chlorophyta) for oxigenated carotenoids: laboratory and pilot plant studies. *Hydrobiologia* 204/205: 401-408.
- PARRA OO, M GONZALEZ, VH DELLAROSSA, AS CIFUENTES & M CONEJEROS (1990) Caracterización biológica de una cepa chilena de *Dunaliella salina* potencialmente comerciable. *Archivos de Biología y Medicina Experimentales (Chile)* 23: 141-146.
- PROVASOLI L (1963) Growing marine seaweeds. *Proceedings of the Fourth International Seaweed Symposium*: 9-17. Pergamon Press, New York.
- PROVASOLI L (1968) Media and prospects for the cultivation ofmarine algae. En: Watanabe A & A Hatton (eds) *Cultures and Collections of algae*. Japanese Society of Plant Physiology: 63-75.
- PROVASOLI L, JJA Mc LAUGHLIN & MR DROOP (1957) The development of artificial media for marine algae. *Archiv für Mikrobiologie* 25: 392-428.
- ROUBICEK RV, G CUNNINGHAM, L WHITE-HOSFORD & JT PATTON (1986) Growth characteristics of *Dunaliella salina*. *Nova Hedwigia* 83: 70-74.
- STARR RC (1964) The culture collection of algae at Indiana University. *American Journal of Botany* 51: 1013-1044.
- VAN AUKEN OW & IB Mc NULTY (1973) The effects of environmental factors on the growth of a halophilic species of algae. *Biological Bulletin* 145: 210-222.
- WEGMANN K & H METZNER (1971) Synchronization of *Dunaliella salina* cultures. *Archiv für Mikrobiologie* 78: 360-367.
- WILKINSON L (1990) *SYSTAT: The system for statistics*. Evaston IL. Systat Inc.