

Bol. Centro Invest. Biol. 32(1): 1 - 12

EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRATO
Y CLORURO DE SODIO SOBRE LA DENSIDAD
CELULAR Y CONTENIDO DE PIGMENTOS Y
PROTEÍNAS DE *DUNALIELLA VIRIDIS*

MAYELA YÉPEZ¹ Y EVER MORALES²

¹Centro de Investigaciones Biológicas, Facultad de Humanidades y Educación, La Universidad del Zulia, Apartado 526, Maracaibo 4001-A, Estado Zulia, Venezuela

²Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias, La Universidad del Zulia, Apartado 526, Maracaibo 4001-A, Estado Zulia, Venezuela

RESUMEN.- El estudio de las condiciones de cultivo de la microalga halotolerante *Dunaliella viridis* permite su utilización como fuente de metabolitos de interés comercial y de alimento de peces e invertebrados en ambientes controlados. Se reporta el efecto de NaNO₃ (1.0, 5.0, 10.0 mM) y NaCl (1.5, 2.5, 3.5, 4.0, 5.0 M) sobre la densidad celular y contenido de proteínas y pigmentos de una cepa de *Dunaliella viridis*, aislada de las salinas de las Cumaraguas (estado Falcón, Venezuela). La mayor velocidad de crecimiento ($\mu = 0.33 \text{ div/día}$) y la máxima densidad celular ($4.48 \times 10^6 \text{ cel ml}^{-1}$) se obtuvo en los cultivos con NaCl 1.5 M y NaNO₃ 5.0 mM. El contenido total de carotenos, clorofila y proteínas se incrementó con el aumento de la salinidad hasta 4.0 M NaCl, encontrando los máximos valores de proteínas y pigmentos a 10 mM NaNO₃ y 4.0 M NaCl. Los análisis realizados demostraron que la concentración de 1.5 M NaCl es la óptima para el crecimiento de *Dunaliella* a las tres concentraciones de NaNO₃ estudiadas. *Recibido:* 16 Febrero 1998, *aceptado:* 06 Abril 1998.

Palabras claves: *Dunaliella viridis*, pigmentos, proteínas, crecimiento, nitrato, salinidad, Venezuela

EFFECT OF NITRATE AND SODIUM CHLORIDE CONCENTRATIONS ON CELL DENSITY AND PRODUCTION OF PIGMENTS AND PROTEINS IN *DUNALIELLA VIRIDIS*

ABSTRACT.- Study of the culture conditions of the halotolerant microalga, *Dunaliella viridis*, permits its use as a source of metabolites for commercial purposes, and as feed for fish and invertebrates in controlled environments. We report the effect of NaNO_3 (1.0, 5.0, 10.0 mM) and NaCl (1.5, 2.5, 3.5, 4.0, 5.0 M) upon cellular density and protein and pigment content of a variety of *Dunaliella viridis*, isolated from the saltflats of Cumaraguas, Falcón State, Venezuela. The fastest growth rate ($\mu = 0.33$), and the maximum cellular density (4.48×10^6 cel/ ml) were obtained in cultures with 1.5 M of NaCl and 5.0 mM of NaNO_3 . The total carotene, chlorophyll and protein content increased with an increase in salinity to 4.0 M NaCl, but maximum protein and pigment content was obtained at 10 mM NaNO_3 and 4.0 M NaCl. The analyses demonstrated that the concentration of 1.5 M NaCl is optimal for the growth of *Dunaliella viridis* in the three NaNO_3 concentrations studied. *Received:* 16 February 1998, *accepted:* 06 April 1998.

Key words: *Dunaliella viridis*, pigments, proteins, growth, nitrate, salinity, Venezuela.

INTRODUCCIÓN

Dunaliella viridis constituye una microalga clorofita caracterizada por crecer conjuntamente con *Dunaliella salina* en ambientes hipersalinos con elevada irradiación solar. Ambas carecen de pared celular y responden a los cambios de presión osmótica del medio externo (Ginzburg 1987). Todas las especies de *Dunaliella* son potencialmente productoras de metabolitos de importancia comercial (Ben-Amotz y Avron 1983, Gilmour y Hard 1992).

Aunque *D. viridis* no acumula cantidades significativas de β -caroteno, es capaz de alcanzar densidades celulares más elevadas y producir más carotenoides oxigenados que *D. salina* en cultivos de laboratorio (Moulton y Burford 1990).

Ginzburg (1987) reconoció la carencia de información sobre la interacción de la salinidad y proteínas de *Dunaliella*. Hasta el presente, sólo se ha reportado la detección de una proteína específica (140 - 10 KDa) en cultivos de *Dunaliella parva* a 3.5 M de NaCl, la cual parece estar relacionada con la osmorregulación y ser inducida a concentraciones superiores a 2.0 M de NaCl.

Se ha demostrado que las microalgas producen aumento o disminución de sus metabolitos con potencial industrial cuando son cultivadas bajo condiciones de suficiencia o deficiencia de nutrientes (Wikfors 1986, Fabregas *et al.* 1986). Se requiere estudiar la concentración de nitrato, por ser el nitrógeno uno de los elementos que más influye en la composición bioquímica de las microalgas (Abalde *et al.* 1995). La falta de conocimiento de estudios fisioecológicos de estirpes autóctonas de microalgas halotolerantes de interés comercial en Venezuela y en especial de *D. viridis*, conllevan a que el propósito de este estudio sea evaluar el crecimiento y producción de proteínas y pigmentos en cultivos discontinuos de *D. viridis* a elevadas salinidades y diferentes concentraciones de nitrato.

MATERIALES Y MÉTODOS

La microalga *Dunaliella viridis* fue colectada en las salinas de las Cumaraguas, estado Falcón, Venezuela, mediante técnicas establecidas por Stein (1975). Esta salina se caracteriza por presentar una temperatura promedio de 35 ± 5 °C, un pH de 8 y una salinidad para el momento de la colecta de la muestra de 293 gr.l⁻¹ de NaCl (5.0 M).

La microalga se aisló en agar preparado con agua de mar

enriquecida con el medio de cultivo f/2 (Guillard 1975) y los cultivos mantenidos en un gabinete ambiental con fotoperíodo de 12:12 h a $49 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 23°C . Los cultivos se iniciaron previa adaptación en medio de cultivo Johnson, modificado por Borowitzka y Brown (1974), utilizando diferentes concentraciones de NaCl (1.5, 2.5, 3.5, 4.0 y 5.0 M).

Para determinar la influencia de la concentración de NaNO_3 y NaCl sobre el crecimiento de *D. viridis* se diseñaron tres series de experimentos con 1.0, 5.0 y 10.0 mM de NaNO_3 para cada una de las concentraciones de NaCl indicadas, por triplicado, en matraces de 1000 ml de capacidad con un volumen de cultivo de 600 ml. Los cultivos discontinuos se iniciaron con un inóculo de 1.5×10^6 cel ml^{-1} procedentes de un cultivo en fase exponencial. A todos los experimentos se les suministró aireación constante e iluminación bilateral equivalente a una intensidad luminosa de $235 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 h. Los cultivos se mantuvieron durante 22 días a una temperatura de $27 \pm 3^\circ\text{C}$ y a pH 7-7.6.

Para determinar la densidad celular se tomaron muestras diarias de los cultivos de 1.5 ml, fijadas posteriormente con formaldehído al 1 % (v/v) disuelto en NaCl a una concentración igual a la del medio de cultivo estudiado (Silva *et al.* 1987). El recuento celular por cada tres réplicas se realizó empleando un hematocitómetro con un rayado de Neubaver. La tasa de crecimiento se calculó por la siguiente ecuación: $\mu: \text{Ln } X_1 - \text{Ln } X_0 / t_1 - t_0$, donde t_1 , t_0 corresponden al tiempo final e inicial de la fase logarítmica y X_1 , X_0 corresponden a la densidad celular final e inicial de la fase logarítmica (Lobban *et al.* 1988).

La extracción de pigmentos se efectuó en fase estacionaria, con acetona y éter, previa centrifugación de 5 ml de cada cultivo. La estimación de la clorofila total se determinó según la fórmula de Stein (1975) y para la cuantificación de carotenoides se utilizó el coeficiente de extinción molar del β -caroteno en éter de 2500 a 450 nm (Dolphin 1970). Las proteínas se determinaron siguiendo el

método de Lowry modificado por Ben-Amotz (1987), utilizando albúmina de suero bovino como estándar. El análisis de clorofila total, carotenoides y proteínas por triplicado se hizo durante la fase exponencial y estacionaria de cada cultivo.

Los análisis estadísticos se realizaron por el método de Análisis de Varianza, comparando los promedios obtenidos de las densidades celulares y de los contenidos de clorofila total, carotenoides y proteínas de los cultivos de la microalga en fase estacionaria, utilizando el Análisis de rango múltiple (Scheffe). Los valores de clorofila, carotenoides y proteínas se obtuvieron a partir del sexto día de iniciados los cultivos hasta el final del experimento realizando las determinaciones respectivas cada dos días.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El incremento de la densidad celular de *D. viridis* estuvo relacionada con la concentración de nitrato y disminución de la salinidad. La máxima densidad celular de 5.9×10^6 cél/ml, se produjo a 1.5 M de NaCl y a 5.0 mM de NaNO₃. No se observaron diferencias significativas hasta 4.0 M NaCl (Fig. 1, Tabla 1).

A la concentración de 1.0 mM de NaNO₃ se presentó una diferencia altamente significativa ($P < 0.01$) entre las salinidades hasta 5.0 M NaCl (Tabla 1), alcanzando la máxima densidad celular a la concentración de 1.5 M NaCl (Fig. 2). Se obtuvo resultados semejantes a 10.0 mM de NaNO₃ registrando una diferencia altamente significativa ($P < 0.01$) entre las diferentes salinidades (Tabla 1).

Se encontró una mayor tasa de crecimiento a 1.5 M de NaCl, que disminuyó al aumentar la concentración de NaCl (Tabla 1). En este experimento, se obtuvo una tasa de crecimiento de 0.30 div/día a 2.5 M NaCl que supera a la reportada ($\mu = 0.17$ div/día) por Moulton y Burford (1990) en cultivos de *D. viridis* a 2.4 M NaCl y 10.0 mM de NaNO₃ (Fig. 3).

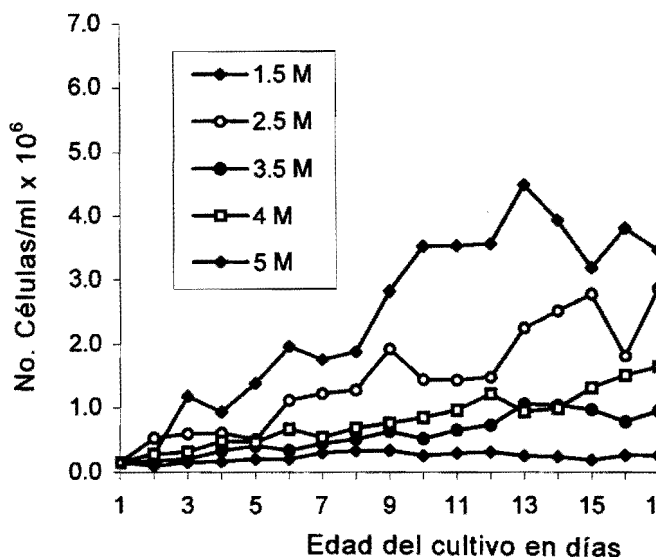


FIGURA 1. Efecto de la concentración de NaCl sobre el crecimiento de *Dunaliella viridis* en presencia de 5.0 mM NaNO_3 .

TABLA 1. Densidades celulares (cél/ml $\times 10^6$) y tiempo de duplicación μ (div.día⁻¹) alcanzada por *Dunaliella viridis* en fase estacionaria con diferentes concentraciones de NaNO_3 y NaCl.

NaCl	1.0 mM NaNO_3		5.0 mM NaNO_3		10.0 mM NaNO_3	
	μ	Densidad celular	μ	Densidad celular	μ	Densidad celular
1.5	0.33	4.48	0.28	5.90	0.69	5.00
2.5	0.06	2.99	0.27	3.48	0.30	1.60
3.5	0.15	1.93	0.27	2.75	0.18	0.88
4.0	0.04	1.19	0.22	2.00	0.12	0.58
5.0	0.05	0.34	0.05	0.32	0.05	0.34

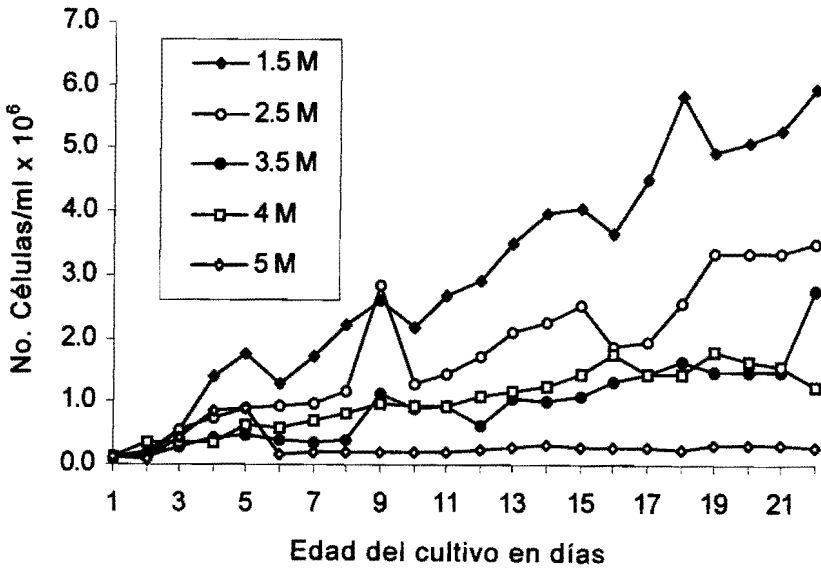


FIGURA 2. Efecto de la concentración de NaCl sobre el crecimiento de *Dunaliella viridis* en presencia de 1.0 mM NaNO₃.

La concentración requerida de NaCl para el crecimiento óptimo de *D. viridis* (1.5 M) es superada por *D. salina*, la cual crece mejor a concentraciones superiores a 2.0 M. Esta característica tiene importancia ecológica, debido a que al aumentar la salinidad en los ambientes hipersalinos comienza a predominar *D. salina*, por ser capaz de tolerar elevadas concentraciones de NaCl hasta 6.0 M (Moulton *et al.* 1987, Jiménez y Niell 1991). Borowitzka y Brown (1974) señalan que cada cepa de *Dunaliella* posee su propio rango de tolerancia, pero este puede ser modificado mediante diferentes condiciones de cultivo. La cepa de *D. viridis* estudiada soporta concentraciones de 5.0 M de NaCl, lo cual confirma que esta especie es halotolerante.

Jiménez y Niell (1991) coinciden con los resultados anteriores, reportando para *D. viridis* un incremento de los pigmentos con el aumento de la salinidad a 3.0 M, mientras que entre 1.0 y 2.0 M de

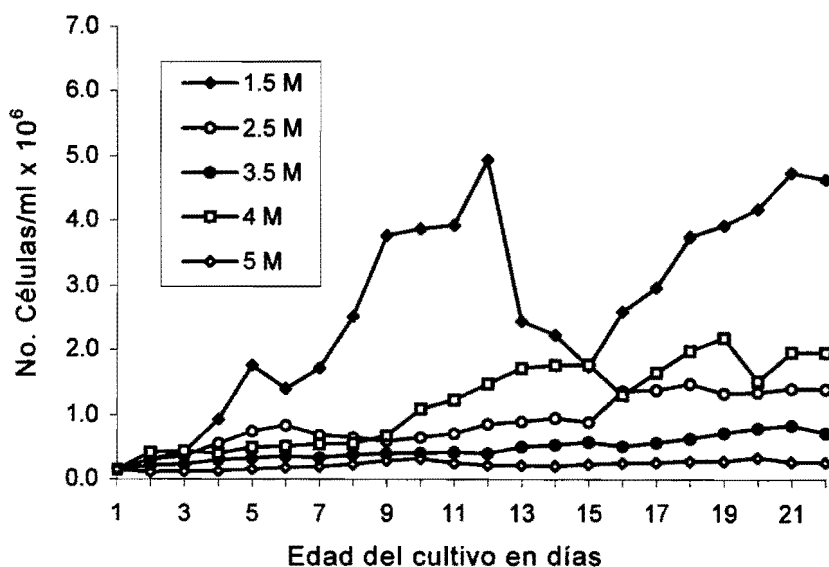


FIGURA 3. Efecto de la concentración de NaCl sobre el crecimiento de *Dunaliella viridis* en presencia de 10.0 mM NaNO₃.

NaCl se observó una disminución. La acumulación de pigmentos no fue promovida, probablemente, debido a la alta cinética de crecimiento a concentraciones de 1.0 y 2.0 M NaCl.

Se encontró altos contenidos de clorofila y carotenos total a 4.0 M de NaCl (Tabla 2). Los resultados son similares a los reportados por Al-Hassan *et al.* (1987) donde se destaca que la clorofila y el caroteno incrementan con la salinidad desde 0.85 hasta 5.0 M NaCl en *D. salina*. Esto demuestra modificaciones en el crecimiento, pigmentos y estructuras de los cloroplastos inducidos por el haloestrés, aunque las funciones fotosintéticas se mantengan activas para mantener la producción del glicerol en respuesta a las elevadas salinidades del medio.

En *D. viridis*, las proteínas incrementaron con el aumento de la salinidad (1.5 - 4.0 M) y de la concentración de NaNO₃. A diferentes

salinidades, el contenido de proteínas no varió a 1.0 y 5.0 mM de NaNO_3 , pero sí encontró diferencias a 10.0 mM de NaNO_3 . Los máximos valores de proteínas fueron encontrados a 10.0 mM de NaNO_3 y a 4.0 M de NaCl (Tabla 2).

TABLA 2. Análisis de rango múltiple (Scheffe) de los contenidos de clorofila total, carotenoides y proteínas en pg/cél^{-1}

	Clorofila total	Carotenoides	Proteínas
1.0 mM NaNO_3	0.82	0.46	17.16
5.0 mM NaNO_3	0.85	0.50	18.45
10.0 mM NaNO_3	1.12	0.68	22.98
1.5 M NaCl	0.52	0.34	15.15
2.5 M NaCl	0.72	0.39	17.53
3.5 M NaCl	0.75	0.46	20.06
4.0 M NaCl	1.73	1.00	25.55

La microalga presentó una baja tasa reproductiva a 4.0 M de NaCl ; no obstante, obtuvo los más altos contenidos de clorofila, caroteno y proteínas. Esto indica la posibilidad de que la productividad primaria de *D. viridis* es relativamente alta a esta salinidad.

Con esta experiencia se determinó que la concentración de 1.5 M de NaCl es la óptima para el crecimiento de *D. viridis* a las tres concentraciones de nitrato de NaNO_3 (Fig. 3). Estos resultados coinciden con los de Borowitzka y Borowitzka (1988), Brown (1977) y Jiménez y Niell (1991), quienes concluyeron que *D. viridis* presenta para su crecimiento un rango de concentración óptimo entre 1.0 y 2.0 M de NaCl .

AGRADECIMIENTO

A Eduardo Espinoza por facilitar el Laboratorio de Bioquímica de la Facultad Experimental de Ciencias, La Universidad del Zulia,

Maracaibo, para la realización del presente estudio. A Gustavo Morales y Arelis de Morales por el análisis estadístico.

LITERATURA CITADA

- ABALDE, J., A. CID, J. P. FIDALGO, E. TORRES Y C. HERRERO. 1995. Microalgas: Cultivo y Aplicaciones. Universidad e da Coruña, La Coruña, 210 pp.
- AL-HASAN, R., 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. J. General Microbiology 133: 2607-2517.
- BEN-AMOTZ, A. 1987. Effect in irradiance and nutrient deficiency of the chemical composition of *Dunaliella bardawil* (Volvocales, Chlorophyta). J. Plant Physiol. 131: 479-487.
- BEN-AMOTZ, A. Y M. AVRON. 1983. Accumulation of metabolites by halotolerant algae and its industrial potential. Ann. Rev. Microbiol. 37: 95-119.
- BOROWITZKA, L. Y A. BROWN. 1974. The salt relation of marine and halophilic species of the unicellular green alga *Dunaliella*. Arch. Microbiology 96: 37-52.
- BOROWITZKA, M. Y L. BOROWITZKA. 1988. Micro Algal Biotechnology. Cambridge Univ. Press, New York, Pp. 27-58.
- BROWN, A. 1977. Compatible solutes and extreme water stress in eukaryotic micro-organisms. Advance in Microbiol. Physiology 17: 181-239.
- DOLPHIN, W. 1970. Photoinduced carotenogenesis in chlorotic *Euglena gracilis*. Plant Physiol. 46: 685-691.

- FABREGAS, J., C. HERRERO, B. CABEZAS, R. LIAÑO Y J. ABALDE. 1986. Response of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* to nutrient concentration and salinity variations in batch cultures. *J. Plant Physiol.* 125: 475-484.
- GILMOURD, D. Y B. HARD. 1992. Natural protoplast *Dunaliella* as a source of protein. *Applied Envir. Microbiol.* 31: 602-604.
- GINZBURG, M. 1987. *Dunaliella*: A green alga adapted to salt. *Advances in Botanical Research* 14: 93-183.
- GUILLARD, R. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. P. 338, *en* W. Smith y M. Chanley (eds.), *Culture of marine invertebrate animals*. Plenum Press, New York.
- JIMÉNEZ, C. Y X. NIELL. 1991. Growth of *Dunaliella viridis*. Theodoresco. Effect of salinity, temperature and nitrogen concentration. *J. Applied Phycology* 3: 319-327.
- LOBBAN, C., D. CHAPMAN Y B. KREMER. 1988. *Experimental phycology a laboratory manual*. Cambridge Univ. Press, New York, 295 pp.
- MOULTON, T. Y M. BURFORD. 1990. The mass culture of *Dunaliella viridis* (Volvocales, Chlorophyta) for oxigenate carotenoids: laboratory and pilot plant studies. *Hidrobiología* 204/205: 401-408.
- MOULTON, T., T. SOMMERT, M. BURFORD Y L. BOROWITZCA. 1987. Competition between *Dunaliella* species at high salinity. *Hydrobiología* 151/152: 106-116.
- SILVA, H., T. CORTIÑAS Y R. ERTOLA. 1987. Effect of hydrodynamic stress on *Dunaliella* growth. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 40: 41-49.

- STEIN, J. 1975. *Physiological Methods. Culture methods and growth measurements.* Cambridge Univ. Press, New York, 365pp.
- WIKFORS, G. 1986. Altering growth and gross chemical composition of two microalgal molluscan food species by varying nitrate and phosphate. *Aquaculture* 59: 1-14.