



# Efecto del estrés por nitrógeno y salinidad en el contenido de β-caroteno de la microalga *Dunaliella tertiolecta*

Effect of nitrogen and salinity stress on the β-carotene content of the microalgae *Dunaliella tertiolecta*

**Jonathan García Morales<sup>1</sup>, José Antonio López Elías<sup>1</sup>, Diana Medina Félix<sup>2</sup>, Norma García Lagunas<sup>3</sup>, Diana Fimbres Olivarría<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup> Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad de Sonora, Colosio S/N, 83000 Hermosillo, Sonora México.

<sup>2</sup> UES, Universidad Estatal de Sonora, Av. Ley Federal del Trabajo S/N, 83100 Hermosillo, Sonora México.

<sup>3</sup> CONACYT, Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad de Sonora, Colosio S/N, 83000 Hermosillo, Sonora México.

## RESUMEN

Las microalgas del género *Dunaliella* son cultivadas con la finalidad de obtener compuestos antioxidantes, principalmente carotenoides. En este estudio se analizó el crecimiento, biomasa y contenido de β-caroteno de *Dunaliella tertiolecta* cultivada en condiciones de estrés por nitrógeno y salinidad. Se comparó el efecto de la salinidad a 35, 45 y 55 UPS, cada una en combinación con los medios F, F/8 y F/16; como control se usó el medio F a 35 UPS. Se utilizó un diseño factorial 3x3 a nivel de matraces de 250 mL. Se realizaron conteos celulares para determinar la fase de crecimiento estacionaria, en la cual se tomaron muestras para realizar el análisis proximal y determinar el contenido de β-caroteno. Se observó que la limitación de nitrógeno en el medio de cultivo afecta negativamente la densidad celular, sin embargo, la concentración de biomasa y materia orgánica tienden a incrementar, no siendo así en el contenido de β-caroteno. Por otro lado, el aumento en la salinidad favoreció el incremento de este pigmento. Por lo anterior, se concluyó que las condiciones más adecuadas para la obtención de β-caroteno, es el medio F a 45 UPS a partir del cual se obtuvieron rendimientos aproximados de 90 mg L<sup>-1</sup>.

**Palabras clave:** *Dunaliella tertiolecta*, β-caroteno, limitación de nitrógeno, salinidad.

## ABSTRACT

The *Dunaliella* genus is cultivated to obtain antioxidant compounds, mainly carotenoids. In this study we analyzed growth, biomass and β-carotene content of *Dunaliella tertiolecta* cultivated under nitrogen and salinity stress. The salinity effects at 35, 45 and 55 UPS were compared, each one in combination with the F, F/8 and F/16 media; the F medium at 35 UPS was utilized as control. The experiment was carried out by the implementation of a 3x3 factorial design, using 250 mL flasks. Cell counts were done to determine the stationary growth phase, in which samples were taken for proximal analysis and determine the β-carotene content. It was observed that nitrogen limitation in culture media causes a negative effect on the cellular density and the β-carotene content; however, biomass and organic matter augmented under these conditions. On the other hand, the increase in

salinity promoted high concentrations of the pigment. Based on the above findings, it was concluded that the most suitable conditions for the β-carotene production, is F medium at 45 UPS with yields of approximately 90 mg L<sup>-1</sup>.

**Keywords:** *Dunaliella tertiolecta*, β-carotene, nitrogen limitation, salinity.

## INTRODUCCIÓN

La acuacultura se define como el conjunto de técnicas y conocimientos aplicados para el desarrollo y producción controlada de diversos organismos acuáticos de interés económico (Singh *et al.*, 2005; Moffitt y Cajas, 2014). Algunas actividades en acuacultura consisten en la modificación del medio en el que se desenvuelven los organismos, con la intención de estresarlos e inducirlos a que produzcan biocompuestos de interés (Moffitt y Cajas, 2014).

Dentro de los organismos que son aprovechados por la acuacultura para la producción de biocompuestos se encuentran las microalgas. Estos microorganismos son capaces de sintetizar compuestos bioactivos como los antioxidantes, que pueden ser utilizados como complementos alimenticios (Sui *et al.*, 2019). Diversos estudios han reportado que la manipulación de las condiciones del cultivo de ciertas especies de microalgas favorecen la producción de compuestos orgánicos de interés (Rao *et al.*, 2006; Yeesang y Cheirsilp, 2011; Yeh y Chang, 2012), tales como los carotenos, ficolíbulinas, xantofilas, entre otros (Rema y Gouveia, 2005; Yaşar y Şevket, 2006; Abd El-Baky *et al.*, 2007).

Actualmente se conocen alrededor de 600 carotenoides de origen natural, de los cuales el β-caroteno es uno de los más abundantes e importantes debido a su alta actividad antioxidante y por ser precursor de vitamina A; estos compuestos antioxidantes actúan como protectores de la clorofila y del daño celular provocado por radicales libres (Nimse y Pal, 2015).

Los carotenoides son ampliamente utilizados principalmente en las industrias farmacéutica, nutracéutica y cosmética, debido a sus propiedades anticancerígenas, antioxidantes, antiinflamatorias y antiproliferativas (Rema y Gouveia, 2005; Yaşar y Şevket, 2006). Las microalgas son

\*Autor para correspondencia: Diana Fimbres Olivarría

Correo electrónico: diana.fimbres@unison.mx

Recibido: 23 de mayo de 2019

Aceptado: 6 de diciembre de 2019

ampliamente aceptadas para consumo humano, por lo que se han desarrollado técnicas muy específicas para lograr la obtención de bioproductos de manera eficiente, como los carotenoides. Dentro de las microalgas que se han utilizado para la obtención de compuestos antioxidantes destacan tres géneros: *Chlorella*, *Dunaliella* y *Spirulina* (Chen et al., 2016; Ismaiel et al., 2016; Singh et al., 2016).

Algunos autores han demostrado que bajo condiciones de estrés, como la limitación de nutrientes y/o altos valores de salinidad, se puede estimular la producción de carotenoides en las especies de *Dunaliella* (Salguero et al., 2003; García González et al., 2005; Lamers et al., 2010).

A pesar de las investigaciones existentes con respecto a la obtención de carotenoides a partir del género *Dunaliella*, se hace evidente la necesidad de explorar el mayor número de condiciones de cultivo que combinadas permitan la obtención de una adecuada concentración de biomasa rica en estos compuestos a un menor costo. Debido a lo anterior, el objetivo de la presente investigación consistió en analizar el efecto del estrés por nitrógeno y salinidad en el contenido de β-caroteno de la microalga *Dunaliella tertiolecta*, con la finalidad de obtener biomasa rica en estos compuestos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Diseño experimental, selección de la cepa y condiciones de cultivo

La microalga marina *Dunaliella tertiolecta* fue obtenida del cepario del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS). El bioensayo se llevó a cabo bajo condiciones controladas de temperatura ( $20\pm1^{\circ}\text{C}$ ) e iluminación ( $274\pm52.5 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ seg}^{-1}$ ). Se utilizó un diseño factorial  $3 \times 3$  en el que se evaluaron tres salinidades (35, 45 y 55 UPS) y tres concentraciones de nitrógeno, mediante la modificación del contenido de  $\text{NaNO}_3$  del medio F/2 de Guillard & Ryther (1962), donde el medio F contenía: 150 g  $\text{L}^{-1}$ , el medio F/8: 18.75 g  $\text{L}^{-1}$  y el medio F/16: 9.375 g  $\text{L}^{-1}$ . Cada tratamiento se evaluó por cuadruplicado.

El cultivo microalgal se inició en matraces Erlenmeyer de 250 mL, conteniendo 150 mL de medio de cultivo. Cada uno de los medios fue inoculado con una concentración inicial de 100,000 cél  $\text{mL}^{-1}$ .

### Concentración celular

Para la determinación de la concentración celular diariamente se tomó un 1 mL de muestra de cada uno de los tratamientos, la cual se colocó en una cámara de Neubauer de 0.1 mm y se le agregó lugol para fijarla y facilitar su conteo en un microscopio compuesto (Andersen, 2005). Los días de cosecha se establecieron durante la fase estacionaria. El número de células por mililitro se obtuvo aplicando la siguiente ecuación:

$$\text{No. Cél } \text{mL}^{-1} = (\# \text{ células totales} / \# \text{ cuadros contados}) \times 10,000$$

### Determinación de biomasa

Se tomaron muestras en la fase estacionaria para determinar el peso seco, materia orgánica y cenizas mediante métodos gravimétricos (López Elías et al., 2013). Para la determinación del peso seco se filtraron por duplicado 50 mL de cultivo en filtros GF/C de fibra de vidrio de 47 mm de diámetro previamente calibrados; después se colocaron en una estufa convencional (THELCO® LABORATORY OVEN Precision Scientific, modelo 130) a 60 °C por 24 horas y una vez secos se pesaron en una balanza analítica (METTLER, modelo AJ100). Posteriormente los filtros se colocaron en una mufla (Felisa®, modelo 3 60D) a 480 °C por 8-12 horas para la obtención de cenizas; los filtros se pesaron de nuevo y finalmente mediante la diferencia de peso seco y cenizas se obtuvo la materia orgánica.

### Extracción y cuantificación de β-Caroteno

Para la extracción de carotenos se filtraron por duplicado 20 mL de cultivo (fase estacionaria), para ello se utilizaron filtros GF/C de 25 mm de diámetro; posteriormente se depositaron en tubos para centrífuga de 15 mL y se añadieron 10 mL de acetona al 90 % (v/v). Después de 24 horas en oscuridad y en condiciones de refrigeración, los tubos se centrifugaron a 5,000 gravedades durante 10 minutos (Thermo Scientific™, modelo HeraeusTM™ Multifuge™ X1R). Se recuperó el sobrenadante de cada una de las muestras y se leyó su absorbancia a una longitud de 450 nm en un lector para microplacas (IMark™, modelo BIO-RAD). Para llevar a cabo la cuantificación se realizó una curva de calibración utilizando β-caroteno (SIGMA C9750) como estándar (0.6 mg  $\text{mL}^{-1}$ ).

### Análisis estadístico

Los datos de la concentración celular se trataron con estadística descriptiva, además, se realizó un análisis de varianza de dos vías para determinar las diferencias entre los tratamientos en cuanto a la concentración celular, biomasa seca, cenizas, materia orgánica y contenido de β-caroteno. En los casos en donde se encontraron diferencias significativas, se empleó la prueba *a posteriori* de Tukey ( $p\leq0.05$ ) (Zar, 1999). Para el análisis estadístico se utilizó el programa STATISTICA para Windows (Statsoft, 1995).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El resumen de los análisis estadísticos (ANOVA de dos vías) para todas las variables analizadas se muestran en la Tabla 1.

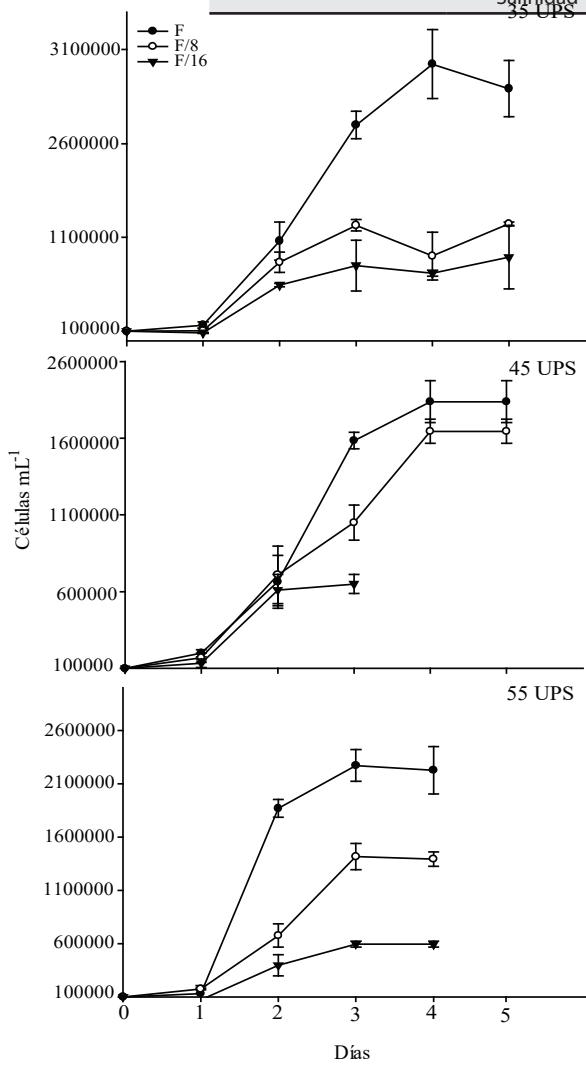
### Concentración celular

La microalga presentó el típico comportamiento sigmoidal de los microorganismos en las cinéticas de crecimiento (Peleg et al., 2007) (Figura 1). Con respecto al efecto de la salinidad y el nitrógeno en el crecimiento, se observó que las microalgas cultivadas en las tres salinidades y concentraciones de nitrógeno presentaron un incremento celular hacia el día tres en todos los medios de cultivo, para posteriormente mantenerse constantes y finalmente descender (Figura 1).

**Tabla 1.** Resumen del ANOVA de dos vías de la concentración celular, biomasa seca, cenizas, materia orgánica y  $\beta$  caroteno de *Dunaliella tertiolecta* cultivada en tres medios de cultivo (F, F/8 y F/16) y tres salinidades (35, 45 y 55 UPS).

**Table 1.** Summary of two-way ANOVA for cellular concentration, dry biomass, ash, organic matter content and  $\beta$ -carotene content of *Dunaliella tertiolecta* cultivated in three culture media (F, F/8 and F/16) and three salinities (35, 45 and 55 UPS).

Análisis	Variables	Grados de libertad	F	p
Concentración celular	Salinidad	2	3.75	>0.05
	Medio	2	182.83	0.01
	Salinidad * Medio	4	14.00	0.01
Biomasa seca	Salinidad	2	31.35	0.01
	Medio	2	393.15	0.01
	Salinidad * Medio	4	105.00	0.01
Cenizas	Salinidad	2	56.20	0.01
	Medio	2	121.60	0.01
	Salinidad * Medio	4	100.70	0.01
Materia orgánica	Salinidad	2	194.91	0.01
	Medio	2	1293.22	0.01
	Salinidad * Medio	4	92.82	0.01
$\beta$ -caroteno	Salinidad	2	8.6216	0.001
	Medio	2	439.1668	0.000
	Salinidad * Medio	1	343.2016	0.000



La densidad celular más alta se observó en las microalgas cultivadas a 35 UPS en el medio F ( $2.94 \times 10^6 \pm 4.51 \times 10^5$  cél  $\text{mL}^{-1}$ ), durante el día 3 en el desarrollo de la cinética de crecimiento (fase estacionaria), encontrándose diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre esta y los tratamientos limitados en nitrógeno (Tabla 2). Por otro lado, en los cultivos expuestos a 45 UPS se observó un incremento del crecimiento celular durante la fase estacionaria en el medio F, con  $1.83 \times 10^6 \pm 1.36 \times 10^5$  cél  $\text{mL}^{-1}$ , mientras que los medios F/8 y F/16 mostraron concentraciones celulares inferiores; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los medios F y F/8 bajo estas condiciones de salinidad.

Finalmente, las microalgas cultivadas a 55 UPS alcanzaron la máxima densidad celular durante la fase estacionaria en el medio F ( $2.2 \times 10^6 \pm 2.2 \times 10^5$  cél  $\text{mL}^{-1}$ ), mientras que los cultivos limitados presentaron concentraciones celulares de  $1.39 \times 10^6 \pm 6.8 \times 10^5$  cél  $\text{mL}^{-1}$  (F/8) y  $5.93 \times 10^5 \pm 2.7 \times 10^4$  cél  $\text{mL}^{-1}$  (F/16), encontrándose diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre los tres medios de cultivo (Tabla 2).

Fazeli et al. (2006) reportaron una concentración celular de  $0.24 \times 10^6$  cél  $\text{mL}^{-1}$  para la especie *D. tertiolecta* cultivada bajo condiciones de estrés salino; estos valores son inferiores a los observados en la presente investigación. Shin et al. (2015) y Le Chevantón et al. (2016) reportaron que la deficiencia de nitrógeno en el medio limita el crecimiento poblacional de las microalgas pertenecientes al género *Dunaliella*. Por otro lado, López Elías et al. (2013) cultivaron *D. tertiolecta* en medios limitados en nitrógeno ( $\text{NaNO}_3$ ) bajo

**Figura 1.** Cinéticas de crecimiento de la microalga *Dunaliella tertiolecta* cultivada en los medios F, F/8 y F/16 a 35, 45 y 55 UPS. Los datos representan los promedios y desviación estándar ( $p < 0.05$ ).

**Figure 1.** Kinetic growth curves from *Dunaliella tertiolecta* cultivated in F, F/8 and F/16 culture media at 35, 45 and 55 UPS. The data represents the mean and standard deviation ( $p < 0.05$ ).

**Tabla 2.** Concentración celular (toma de muestra en fase estacionaria) de *Dunaliella tertiolecta* cultivada en tres medios de cultivo (F, F/8 y F/16) y tres salinidades (35, 45 y 55 UPS). Letras distintas en la misma fila y columna indican diferencias significativas a  $p\leq 0.05$ .

**Table 2.** Cellular concentration (harvest day at stationary phase) of *Dunaliella tertiolecta* cultivated in three culture media (F, F/8 and F/16) and three salinities (35, 45 and 55 UPS). Different letters in the same row and column indicates significant differences at  $p\leq 0.05$ .

Medio	No. Cel. mL <sup>-1</sup>		
	35 UPS	45 UPS	55 UPS
F	$2.94 \times 10^6 \pm 4.51 \times 10^5$	$1.83 \times 10^6 \text{ ce} \pm 1.36 \times 10^5$	$2.22 \times 10^6 \text{ e} \pm 2.22 \times 10^5$
F/8	$1.13 \times 10^6 \text{ bd} \pm 4.02 \times 10^5$	$1.64 \times 10^6 \text{ cd} \pm 7.91 \times 10^5$	$1.39 \times 10^6 \text{ cd} \pm 6.8 \times 10^5$
F/16	$7.20 \times 10^5 \text{ ab} \pm 3.09 \times 10^4$	$6.5 \times 10^5 \text{ ab} \pm 6.31 \times 10^4$	$5.93 \times 10^5 \text{ a} \pm 2.78 \times 10^4$

condiciones de laboratorio (35 UPS) utilizando el medio F/2 de Guillard y Ryther (1962) como control, encontrando que los cultivos expuestos a limitantes en nitrógeno presentaron una disminución en la densidad celular conforme se limita la concentración de nitrógeno en el medio; este comportamiento es similar al observado en la presente investigación (Tabla 2). Debido a que el nitrógeno es un elemento esencial de los constituyentes estructurales de la célula, así como de proteínas, enzimas, clorofila, moléculas de transferencia de energía y ácidos nucleicos, es considerado como uno de los nutrientes más críticos para el crecimiento algal (Kim et al., 2016).

La Figura 2 muestra el promedio de las concentraciones celulares en las tres salinidades entre los medios de cultivo y el promedio de las concentraciones celulares en los tres medios entre las salinidades. Este análisis permitió establecer el factor de mayor influencia en el crecimiento celular de *D. tertiolecta* bajo las distintas condiciones de cultivo utilizadas en la presente investigación.

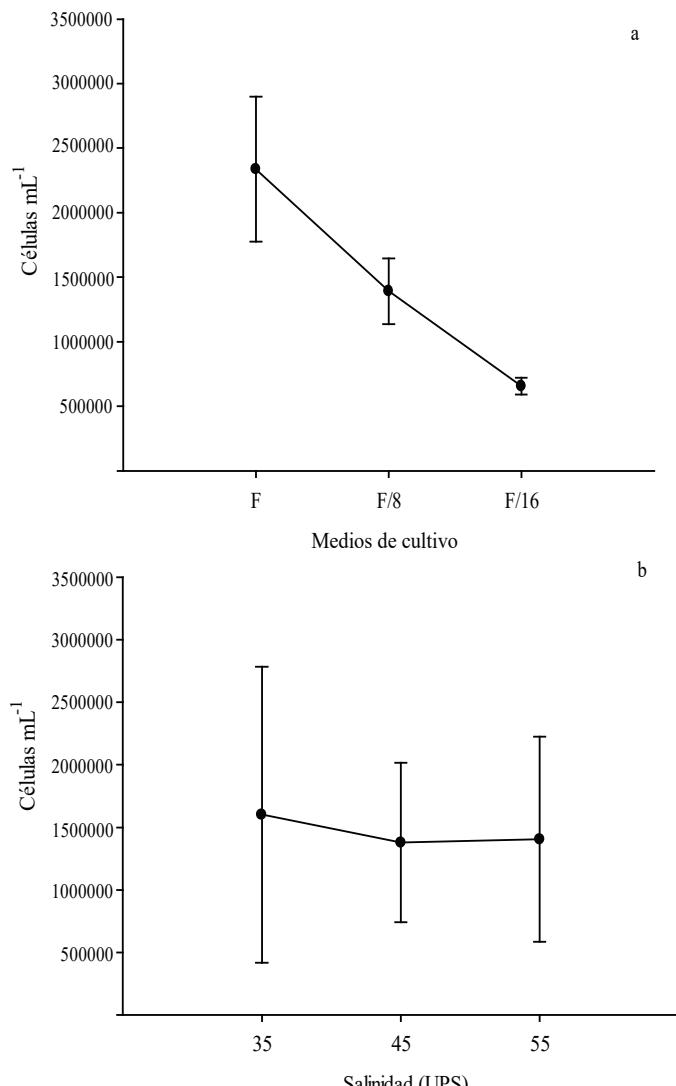
En términos generales para el medio F, considerando las tres salinidades, se obtuvo un crecimiento celular promedio de  $2.28 \times 10^6 \pm 5.23 \times 10^5$  cél mL<sup>-1</sup>, mientras que para el medio F/8 fue de  $1.39 \times 10^6 \pm 3.07 \times 10^5$  cél mL<sup>-1</sup> y para el medio F/16 fue de  $6.54 \times 10^5 \pm 6.72 \times 10^4$  cél mL<sup>-1</sup>, encontrándose diferencias significativas ( $p\leq 0.05$ ) entre los medios (Figura 2a, Tabla 1).

Para la salinidad de 35 UPS, considerando los tres medios de cultivo, se obtuvo un crecimiento celular promedio de  $1.4 \times 10^6 \pm 1.01 \times 10^5$  cél mL<sup>-1</sup>, para el tratamiento de 45 UPS fue de  $1.38 \times 10^6 \pm 5.50 \times 10^5$  cél mL<sup>-1</sup> y para 55 UPS fue de  $1.41 \times 10^6 \pm 7.08 \times 10^5$  cél mL<sup>-1</sup>. No se encontraron diferencias significativas ( $p>0.05$ ) entre salinidades (Figura 2b, Tabla 1).

Los resultados anteriores claramente indican que la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo es el factor determinante en el crecimiento de esta especie, independientemente de la salinidad utilizada.

#### Análisis de la composición proximal

La cantidad de biomasa seca por célula, al inicio de la fase estacionaria (día 3), en los cultivos expuestos a 35 y 55 UPS aumentó significativamente ( $p\leq 0.05$ ) conforme se disminuyó la concentración de nitrógeno en el medio (Tabla 3). Por



**Figura 2.** Promedio de las concentraciones celulares de las salinidades entre medios (a). Promedio de las concentraciones celulares de los medios entre salinidades (b). Las barras representan la desviación estándar de los promedios ( $p<0.05$ ).

**Figure 2.** Average cellular concentration among media salinities (a). Average cellular concentration among media salinities (b). The bars represent standard deviation of mean ( $p<0.05$ )

**Tabla 3.** Contenido de biomasa seca, cenizas y materia orgánica (pg cél<sup>-1</sup>) de la microalga *Dunaliella tertiolecta* cultivada en tres medios de cultivo (F, F/8 y F/16) y tres salinidades (35, 45 y 55 UPS) durante la fase estacionaria. Letras distintas en la misma fila y columna indican diferencias significativas a  $p\leq 0.05$ .

**Table 3.** Dry biomass, ash and organic matter content (pg cell<sup>-1</sup>) of the *Dunaliella tertiolecta* microalgae cultivated in three culture media (F, F/8 and F/16) and three salinities (35, 45 and 55 UPS) during stationary phase. Different letters in the same row and column indicate significant differences at  $p\leq 0.05$ .

Medio	Biomasa seca			Cenizas			Materia Orgánica		
	35 UPS	45 UPS	55 UPS	35 UPS	45 UPS	55 UPS	35 UPS	45 UPS	55 UPS
F	247.57 <sup>a</sup> ±11.26	271.79 <sup>ab</sup> ±19.95	195.18 <sup>c</sup> ±13.03	120 <sup>bd</sup> ±9.06	154.78 <sup>bc</sup> ±19.06	61.51 <sup>a</sup> ±11.61	127.53 <sup>ab</sup> ±8.84	117.01 <sup>a</sup> ±2.38	133.67 <sup>bc</sup> ±7.58
F/8	273.15 <sup>ab</sup> ±32.71	315.45 <sup>b</sup> ±15.93	213.53 <sup>cd</sup> ±17.36	146.81 <sup>bc</sup> ±29.29	185.41 <sup>c</sup> ±11.91	71.62 <sup>a</sup> ±12.65	126.34 <sup>ab</sup> ±5.42	130.04 <sup>abc</sup> ±6.03	141.91 <sup>c</sup> ±7.24
F/16	570.44 <sup>d</sup> ±57.17	293.82 <sup>ab</sup> ±27.70	576.63 <sup>d</sup> ±56.76	347.5 <sup>e</sup> ±52.23	89.66 <sup>ad</sup> ±12.21	249.76 <sup>d</sup> ±47.55	222.94 <sup>e</sup> ±7.43	204.16 <sup>d</sup> ±16.99	326.87 <sup>f</sup> ±11.18

otro lado, la biomasa de los cultivos expuestos a 45 UPS se mantuvo constante independientemente de la concentración de nitrógeno en el medio.

López Sánchez (1999) reportó una concentración de biomasa de 123.58 pg cél<sup>-1</sup> en la microalga *D. salina* cultivada en condiciones controladas de laboratorio; este valor es inferior al observado en la presente investigación en todos los tratamientos analizados.

Estudios previos han demostrado que, en condiciones de cultivo desfavorable, las microalgas tienden a incrementar su tamaño como una estrategia para sobrevivir a las condiciones estresantes a las cuales han sido sometidas. A pesar de que a la fecha no existen investigaciones que expliquen el efecto del nitrógeno sobre el incremento en el tamaño celular, investigadores como López Elías *et al.* (2013) observaron que la especie *D. tertiolecta*, tiende a incrementar su biomasa al limitar la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo, atribuyendo este comportamiento a un proceso de adaptación celular hacia las condiciones deficientes de este nutriente.

Por otro lado, ha sido ampliamente documentado que las condiciones de estrés por salinidad causan un incremento en el volumen celular de las microalgas (Reed *et al.*, 1980; Hellebust e Iftikhar, 1984; García *et al.*, 2012); este efecto ha sido principalmente estudiado en algas verdes del género *Dunaliella* (Serpa Ibáñez y Calderón Rodríguez, 2005; Fazeli *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2018; Wongsnansilp *et al.*, 2019).

La célula microalgal en condiciones naturales, en respuesta a la salinidad, tiende a equilibrar su presión osmótica con respecto al medio que la rodea; este proceso de osmorregulación obliga a la célula a producir solutos orgánicos en su interior, principalmente polioles como el glicerol, el manitol y el sorbitol, así como también azúcares como la manosa y la sacarosa (Abalde *et al.*, 1995). Este incremento en el contenido de solutos y compuestos orgánicos provoca un aumento en el tamaño de cada célula microalgal, lo que puede traducirse en una mayor concentración de biomasa total y materia orgánica, tal como se observó en la presente investigación en los cultivos expuestos a baja concentración de nitrógeno y exceso de salinidad (Tabla 3).

Con respecto al contenido de materia orgánica, al inicio de la fase estacionaria, la concentración más alta se observó en el medio F/16 en las tres salinidades ensayadas, siendo el tratamiento a 55 UPS el que presentó la máxima concentración de materia orgánica ( $326.87 \pm 11.18$  pg cél<sup>-1</sup>) (Tabla 3). Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas ( $p>0.05$ ) entre los medios F y F/8 a 35 UPS. López Sánchez (1999) reportó una concentración de materia orgánica de 70.67 pg cél<sup>-1</sup> en promedio para la microalga *D. salina*, mientras que en la presente investigación se observó el doble de la concentración reportada por este autor, lo cual podría ser debido a la limitación de nutrientes y al estrés por salinidad a la que fue sometida.

El contenido de cenizas aumentó al disminuirse la cantidad de nitrógeno en el medio F a 35 UPS; el valor más alto se observó en el medio F/16 ( $347.5 \pm 56.7$  pg cél<sup>-1</sup>). En el caso de los tratamientos a 45 UPS se observaron diferencias significativas entre los tres medios de cultivo, siendo el F/16 el que presentó una concentración menor ( $89.6 \pm 47.55$  pg cél<sup>-1</sup>). A salinidades de 55 UPS no se encontraron diferencias significativas entre los medios F y F/8, pero sí entre estos y el medio F/16, el cual presentó el valor más alto ( $249.7 \pm 47.5$  pg cél<sup>-1</sup>) (Tabla 3).

#### Análisis del contenido de β-Caroteno

La concentración de β-caroteno (mg L<sup>-1</sup>), al inicio de la fase estacionaria, descendió conforme se disminuyó la concentración de nitrógeno en el medio, siendo el medio F, en las tres salinidades analizadas, el que presentó las concentraciones más altas de este compuesto (Tabla 4).

La máxima concentración de β-caroteno se encontró en los cultivos expuestos a 45 UPS en el medio F ( $86.4 \pm 5.2$  mg L<sup>-1</sup>), observándose diferencias significativas ( $p\leq 0.05$ ) entre este y el resto de las salinidades en los tres medios de cultivo (Tabla 4). Por otra parte, no se detectó la presencia de β-caroteno en el medio F/16 en las tres concentraciones de salinidad. Lo anterior indica que la limitación extrema de nitrógeno en la especie afecta negativamente la producción de β-caroteno, mientras que un exceso en la concentración de salinidad, por arriba de 35 UPS, favorece el aumento de este compuesto.

**Tabla 4.** Contenido de  $\beta$ -caroteno en pg cél $^{-1}$  de la microalga *Dunaliella tertiolecta* cultivada en tres medios de cultivo (F, F/8 y F/16) y tres salinidades (35, 45 y 55 UPS). Letras distintas en la misma fila y columna indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).

**Table 4.**  $\beta$ -carotene content in pg cell $^{-1}$  of the microalgae *Dunaliella tertiolecta* cultivated in three culture media (F, F/8 y F/16) and three salinities (35, 45 y 55 UPS). Different letters in the same row and column indicate significant differences ( $p \leq 0.05$ ).

Medio	Contenido de $\beta$ -caroteno (mg L $^{-1}$ )		
	35 UPS	45 UPS	55 UPS
F	70.4 $\pm$ 7.2 <sup>a</sup>	86.4 $\pm$ 5.2 <sup>b</sup>	55 $\pm$ 5.1 <sup>c</sup>
F/8	6.9 $\pm$ 0.99 <sup>d</sup>	5.02 $\pm$ 0.49 <sup>e</sup>	5.62 $\pm$ 1.9 <sup>de</sup>
F/16	nd	nd	nd

nd: no detectado

nd: not detected

Mediante el proceso de osmorregulación, como se mencionó anteriormente, es posible la acumulación de ciertos compuestos que ayudan a mantener el equilibrio celular. Por lo anterior, la osmorregulación puede ser explotada comercialmente para inducir la síntesis de cantidades elevadas de compuestos orgánicos de valor comercial, tales como el  $\beta$ -caroteno (Abalde et al., 1995).

Fimbres Olivarría (2011) reportó una concentración de 37 mg L $^{-1}$  de  $\beta$ -caroteno en la microalga *Dunaliella* sp. cultivada en medio F/2 bajo condiciones de laboratorio (35 UPS), este valor corresponde aproximadamente a la mitad de la concentración reportada en la presente investigación para las microalgas cultivadas a 35 UPS en el medio F (70.4  $\pm$  7.2 mg L $^{-1}$ ); lo anterior considerando que el medio F/2 posee la mitad de la concentración de nitrógeno (NaNO<sub>3</sub>) con respecto al medio F.

Por otro lado, la concentración de  $\beta$ -caroteno alcanzada en el medio F/8 por *D. tertiolecta* en las tres salinidades ensayadas fue 2.6 veces menor (~6 mg mL $^{-1}$ , Tabla 4) a lo reportado por Fimbres Olivarría (2011) en el mismo medio de cultivo (F/8, 35 UPS) para la microalga *Dunaliella* sp. (16 mg L $^{-1}$ ). Lo anterior pudo deberse a que se trata de cepas distintas.

Wongsansilp et al. (2019) cultivaron cepas de *D. salina* en luz ultravioleta en una concentración de 40 UPS con la finalidad de evaluar la producción de  $\beta$ -caroteno, encontrando concentraciones desde 1.33 a 2.15 g L $^{-1}$ , estos valores son mayores a los encontrados en el presente estudio, lo que indica que el tipo de iluminación, aunado a una alta concentración de salinidad, favorece la producción de este compuesto.

Por otro lado, Zhu et al. (2018) cultivaron *D. salina* disminuyendo la salinidad del medio hasta 5 UPS, encontrando valores de  $\beta$ -caroteno de 2.01 mg L $^{-1}$ ; estos valores son inferiores a los reportados en la presente investigación (Tabla 4).

En términos generales, a pesar de que el medio F a 35 UPS presentó una mayor concentración celular con respecto al medio F a 45 UPS (Tabla 2), no existieron diferencias significativas en cuanto al contenido de biomasa y materia orgánica

(Tabla 3), pero sí se incrementó 1.2 veces la concentración de  $\beta$ -caroteno del medio F a 45 UPS (Tabla 4).

Con respecto a lo mencionado anteriormente, relacionando las densidades celulares, la biomasa y materia orgánica con las concentraciones de  $\beta$ -caroteno obtenidas a partir de *D. tertiolecta*, se puede concluir que las condiciones de cultivo más adecuadas para la producción de este pigmento es el medio F a 45 UPS, a partir del cual se obtienen rendimientos de alrededor de 90 mg L $^{-1}$ .

## CONCLUSIONES

La limitación de nitrógeno en el medio de cultivo provoca un incremento en la concentración de biomasa y materia orgánica de la microalga *Dunaliella tertiolecta*. Sin embargo, afecta de manera negativa la concentración celular y el contenido de  $\beta$ -caroteno. Por otro lado, el aumento en la salinidad favorece el incremento de este pigmento. Por lo anterior, se concluye que las condiciones más adecuadas para la obtención de  $\beta$ -caroteno, en términos de productividad, es el medio F con una concentración de 45 UPS.

## REFERENCIAS

- Abalde, J., Cid, A., Fidalgo, J. P., Torres, E., Herrero, C. 1995. Microalgas: Cultivo y Aplicaciones. Ed. Universidade da Coruña, 1ra edición. Coruña, España. 210 pp.
- Abd El-Baky, H. H., El-Baz, F. K. y El-Baroty, G. S. 2007. Production of carotenoids from marine microalgae and its evaluation as safe food colorant and lowering cholesterol agents. American-Eurasian Journal of Agriculture and Environmental Science, 2:792-800.
- Andersen, R. A. 2005. Algal culturing techniques. Elsevier Academic Press. USA. 578.
- Chen, Y. X., Liu, X. Y., Xiao, Z., Huang, Y. F. y Liu, B. 2016. Antioxidant activities of polysaccharides obtained from *Chlorella pyrenoidosa* via different ethanol concentrations. International journal of biological macromolecules, 91, 505-509.
- Fazeli, M. R., Hossein, T., Nasrin, S. y Hossein, J. 2006. Carotenoids accumulation by *Dunaliella tertiolecta* (Lake Urmia isolated) and *Dunaliella salina* (Ccap 19/18 & wt) under stress conditions. Journal of Biological Sciences, 14(3): 146-150.
- Fimbres Olivarría, D. 2011. Evaluación del crecimiento, biomasa y producción de carotenoides de *dunaliella* sp. a diferentes concentraciones de nitrógeno. Tesis de Maestría, Universidad de Sonora. Octubre 2011, 57 pp.
- García, N., López Elías J. A., Miranda A., Martínez Porchas M., Huerta N., García A. 2012. Effect of salinity on growth and chemical composition of the diatom *Thalassiosira weissflogii* at three culture phases. Latin American Journal Aquatic Research, 40(2): 435-440.
- García González, M., Moreno, J., Manzano, J. C., Folrencia, F. J. y Guerrero, M. G. 2005. Production of *Dunaliella salina* in biomass rich in 9-cis- $\beta$ -carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor. Journal of Biotechnology, 115(1): 81-90.
- Guillard, R. R. L., y Ryther, J. H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (CLEVE) Gran. Canadian Journal of Microbiology, 8(2), 229–239.

- Hellebust, J.A.y A.Iftikhar. 1984. Osmoregulation in the Extremely Euryhaline Marine Microalga *Chlorella autotrophica*. *Plant Physiology*, 74, 1010-1015.
- Ismaiel, M. M. S., El-Ayouty, Y. M. y Piercy-Normore, M. 2016. Role of pH on antioxidants production by *Spirulina* (*Arthrospira platensis*). *Brazilian journal of microbiology*, 47(2): 298-304.
- Kim, G., Mujtaba, G., y Lee, K. 2016. Effects of nitrogen sources on cell growth and biochemical composition of marine chlorophyte *Tetraselmis* sp. for lipid production. *Algae*, 31(3), 257-266.
- Lamers, P. P., van de Laak, C. C., Kaasenbrood, P. S., Lorier, J., Janssen, M., De Vos, R. C. y Wijffels, R. H. 2010. Carotenoid and fatty acid metabolism in light-stressed *Dunaliella salina*. *Biotechnology and bioengineering*, 106(4): 638-648.
- Le Chevanton, M., Garnier, M., Lukomska, E., Schreiber, N., Cadoret, J. P., Saint-Jean, B. y Bougaran, G. 2016. Effects of nitrogen limitation on *Dunaliella* sp.-*Alteromonas* sp. interactions: from mutualistic to competitive relationships. *Frontiers in Marine Science*, 3, 123.
- López Elías, J. A., Fimbres Olivarría, D., Medina Juárez, L. A., Miranda Baeza, A., Martínez Córdova, L. R. y Molina Quijada, D. M. A. 2013. Producción de biomasa y carotenoides de *Dunaliella tertiolecta* en medios limitados en nitrógeno. *Phyton*, 82:23-30.
- López Sánchez, A. L. 1999. Variación estacional de la producción de biomasa y de la calidad de la composición bioquímica de dos especies de microalgas cultivadas en laboratorio e invernadero. Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora. Departamento de Ciencias Químico Biológicas. Hermosillo, Sonora, México.
- Moffitt, C. M. y Cajas Cano, L. 2014. Blue growth: the 2014 FAO state of world fisheries and aquaculture. *Fisheries*, 39(11):552-553.
- Nimse, S. B. y Pal, D. 2015. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *Rsc Advances*, 5(35), 27986-28006.
- Peleg, M., Corradini, M. G., y Normand, M. D. 2007. The logistic (Verhulst) model for sigmoid microbial growth curves revisited. *Food Research International*, 40(7), 808-818.
- Rao, R.A., Sarada, R., Baskaran V. y Ravishankar, G. A. 2006. Antioxidant activity of *Botryococcus braunii* extract elucidated in vitro models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(13):4593-4599.
- Reed, R. H., J.C. Collins y G. Russell. 1980. The Effects of Salinity upon Cellular Volume of the Marine Red Alga *Porphyra purpurea* (Roth) C.Ag. *Journal of Experimental Botany*, 31(6):1521-1537.
- Rema, P. y Gouveia, L. 2005. Effect of various sources of carotenoids on survival and growth of goldfish (*Carassius auratus*) larvae and juveniles. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 4(7):654-658.
- Salguero, A., de la Morena, B., Vigara, J., Vega, J. M., Vilchez, C. y León, R. 2003. Carotenoids as protective response against oxidative damage in *Dunaliella bardawil*. *Biomolecular Engineering*, 20(4-6), 249-253.
- Serpa Ibáñez, R. F. y Calderón Rodríguez, A. 2005. Efecto del estrés por salinidad en cuatro cepas de *Dunaliella salina* Teodoresco En el Perú. *Ecología Aplicada*, 4(1-2):127-133.
- Shin, H., Hong, S. J., Kim, H., Yoo, C., Lee, H., Choi, H. K. y Cho, B. K. 2015. Elucidation of the growth delimitation of *Dunaliella tertiolecta* under nitrogen stress by integrating transcriptome and peptidome analysis. *Bioresource technology*, 194, 57-66.
- Singh, S., Kate, B. N. y Banerjee, U. C. 2005. Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: an overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, 25(3):73-95.
- Singh, P., Baranwal, M. y Reddy, S. M. 2016. Antioxidant and cytotoxic activity of carotenoids produced by *Dunaliella salina* under stress. *Pharmaceutical biology*, 54(10), 2269-2275.
- Sui, Y., Muys, M., Van de Waal, D. B., D'Adamo, S., Vermeir, P., Fernandes, T. V. y Vlaeminck, S. E. 2019. Enhancement of co-production of nutritional protein and carotenoids in *Dunaliella salina* using a two-phase cultivation assisted by nitrogen level and light intensity. *Bioresource Technology*, 287: 121398.
- Wongsnansilp, T., Yokthongwattana, K., Roytrakul, S. y Juntawong, N. 2019. β-carotene production of UV-C induced *Dunaliella salina* under salt stress. *Journal Pure Applied Microbiology*, 13(1), 193-200.
- Yaşar, D. y Şevket, G. 2006. α-tocopherol and fatty acids of *Spirulina platensis* biomass in glass panel bioreactor. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 9(15):2901-2904.
- Yeesang, C. y Cheirsilp, B. 2011. Effect of nitrogen, salt, and iron content in the growth medium and light intensity on lipid production by microalgae isolated from freshwater sources in Thailand. *Bioresource technology*, 102(3), 3034-3040.
- Yeh, K. L. y Chang, J. S. 2012. Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. *Bioresource technology*, 105, 120-127.
- Zar, J. H. 1999. *Bioestadística*. Prentice-Hall. Englewood Cliffs, New Jersey.
- Zhu, C., Zhai, X., Jia, J., Wang, J., Han, D., Li, Y. y Chi, Z. 2018. Seawater desalination concentrate for cultivation of *Dunaliella salina* with floating photobioreactor to produce β-carotene. *Algal research*, 35, 319-324.