



INFLUENCIA DE LA INTENSIDAD LUMINOSA SOBRE EL CRECIMIENTO DE DOS CEPAS DE *Dunaliella salina* AISLADAS DE SALINAS VENEZOLANAS

Antulio Prieto Arcas¹ y Cruz Gómez Andrade²

¹Departamento de Biología, Escuela de Ciencias². Postgrado Biología Aplicada, Núcleo de Sucre, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.
e-mail: alprietom@hotmail.com

RESUMEN

Se estudió el crecimiento de dos cepas de la microalga *Dunaliella salina* mantenidas en el laboratorio a fin de evaluar el efecto de dos tipos de intensidades luminosas sobre los parámetros de crecimiento. Los cultivos se realizaron en viales de 500 ml con agua de mar a 270 ‰, una concentración de nutrientes de 4 mM, pH entre 7 y 7,5 y un fotoperíodo de 12:12. Los resultados indican que las mayores densidades y tasas de crecimiento se alcanzaron en ambas cepas a 10000 lux, sin embargo la cepa Boca Chica mostró un crecimiento mayor que la cepa Coche en ambas intensidades luminosas. Las máximas densidades celulares para Boca Chica y Coche fueron $8,06 \times 10^6$ y $9,76 \times 10^5$ cel/ml respectivamente obtenidas a 10000 lux, en comparación con las de $2,53 \times 10^6$ y $3,10 \times 10^5$ alcanzadas a 20000 lux respectivamente. Las cepas analizadas mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) en los parámetros de crecimiento (K y TD) a una misma intensidad de luz. Todas las curvas de crecimiento presentaron su mayor ajuste con un modelo logístico polinomial.

PALABRAS CLAVES

Dunaliella salina, microalga, luz, Boca Chica, Coche.

ABSTRACT

The growth of two strains (Coche and Boca Chica) of the microalgae *Dunaliella salina* was studied in laboratory with the aim of to evaluate the effect of two types of light intensity (10000 and 20000 lux) over growth parameters. The cultures were performed in bottles in water with 270 units of salinity, concentration of nutrients of

4 mM, pH between 7 and 7,5, and a light cycle of 12:12. Result indicated that higher densities and growth rates were obtained in both strains to 10000 lux, however the strain Boca Chica showed an increment higher than the strain Coche in both light intensities. The maximum cellular densities for Boca Chica and Coche were $8,06 \times 10^6$ and $9,76 \times 10^5$ cel/ml respectively. The analyzed strains showed significant differences ($P < 0,05$) in the population parameters (K and TD) in a same light intensity. All the curves of growth presented its better adjusted with a polynomial logistical pattern.

KEYWORDS

Dunaliella salina, microalgae, light, Boca Chica, Coche.

INTRODUCCIÓN

Las microalgas son organismos microscópicos que poseen una maquinaria fotosintética capaz de convertir la energía solar en biomasa con una eficiencia de 2 a 5 veces mayor que las plantas superiores (Thomas *et al.*, 1984). Estos microorganismos presentan unas tasas altas de producción, adaptabilidad a distintas condiciones ambientales y se encuentran presentes en cualquier medio acuático donde exista una fuente de carbono, nutrientes y luz suficiente, junto con los márgenes apropiados de temperatura (Shelef & Soeder, 1980). Estas características son la base fundamental para producir cultivos masivos de distintos tipos de microalgas con el fin de ser utilizadas como alimentos de organismos acuáticos, particularmente durante los primeros estadios larvales de peces y moluscos.

La microalga *Dunaliella salina* (Teodorescu, 1905) pertenece al orden Dunaliellales, clase Chlorophyceae, de la cual se conocen alrededor de 19 especies con diferentes variedades y formas. Siendo algas verdes (Clorofíceas) unicelulares y biflageladas, se encuentran entre las más estudiadas por interés para los cultivos masivos. La especie se encuentra en la naturaleza tanto en aguas dulces como en hipersalinas (Suárez *et al.*, 2000). *D. salina* es un alga fotosintética que convierte el dióxido de carbono de la atmósfera en energía y material celular debido a la clorofila de la célula, pigmento que esta enmascarado por la coloración anaranjada del betacaroteno presente (Borowitzka & Borowitzka, 1988).

En los cultivos de microalgas, el efecto de la luz y la temperatura o la interacción de ambos juegan un papel fundamental sobre la capacidad fotosintética, los parámetros de crecimiento y la densidad celular, debido a que las reacciones que en cada una de ellas ocurren están reguladas por enzimas (Richmond, 1986). En especial la intensidad luminosa es importante porque influye sobre el esquema de síntesis macromolecular (Mortain-Bertrand *et al.*, 1987) y por ende en el metabolismo celular del cual depende la tasa de fijación de carbono.

En Venezuela existen algunos trabajos realizados con microalgas del género *Dunaliella*, en los cuales se ha caracterizado la capacidad carotenogénica de diferentes cepas de *Dunaliella salina* aisladas de las costas Venezolanas (Yépez, 1992; Morales, 1995; Leal, 1996; Marín *et al.*, 1998; Lemus, 2000). También Yépez & Morales (1998) estudiaron el comportamiento de *Dunaliella viridis*, aisladas de las salinas del estado Falcón, en función de la concentración de nutrientes, a distintas salinidades; sin embargo, son pocos los trabajos donde se haya evaluado el comportamiento de cepas autóctonas, ante factores como luminosidad y temperatura con miras a ser utilizadas como alimentos en la acuicultura tropical.

Debido a que son escasos los trabajos con especies de microalgas tropicales, el objetivo fundamental de este trabajo es evaluar el efecto de la intensidad luminosa sobre dos cepas de *D. salina* en condiciones de laboratorio

MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos fueron realizados en el Laboratorio de Acuicultura, extensión Plancton, del Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, Cumaná estado Sucre.

Se utilizaron cultivos unialgales de dos cepas de la microalga *Dunaliella salina*, aisladas de las salinas de la isla de Coche y de Boca Chica en la isla de Margarita (estado Nueva Esparta); ambas forman parte del cepario de microalgas del mencionado laboratorio. Se evaluó el efecto de la intensidad de luz (10000 y 20000 lux), respectivamente medidos con un luxímetro sobre los tratamientos, para ello se colocó un inóculo de 8000 cel/ml de las cepas por separado, en viales que

contenían 500 ml de agua de mar estéril filtrada con filtro Whatman GF/C (0.40 μm) y neutralizada con hipoclorito de sodio 5 % a razón de 0,25 ml/l, posteriormente el hipoclorito se neutralizó con 0,1 ml de tiosulfato de sodio a una concentración salina de 270 ‰ sometidos a un ciclo de 12 horas de luz y 12 de oscuridad, los cuales contenían un medio de cultivo algal con 4 ml/l de NaNO_3 y un pH entre 7 y 7.5 (Fabregas *et al.*, 1984); la temperatura durante el ensayo fue de 25 °C y el fotoperíodo de 12:12 horas. El ensayo se realizó por triplicado en ambiente exterior (condiciones ambientales imperantes).

El número de células iniciales fue obtenido a partir del inóculo de 8000 células/ml, procedentes de cultivos en fase de crecimiento exponencial y con previa adaptación para evaluar el crecimiento. Diariamente se realizaba agitación manual a los cultivos y cada 5 días se hacía el conteo respectivo de células en un hematocitometro de Neubauer de 0.1 mm de profundidad, previa inmovilización con formalina al 1 %.

El ensayo se realizó en un tiempo estimado de 30 días continuos y con los datos obtenidos se construyeron curvas de crecimiento. Los parámetros de crecimiento en los cultivos se obtuvieron utilizando el modelo logístico y las tasas instantáneas (K) entre conteos, utilizando la expresión $K = \log_{10} X_1 - \log_{10} X_0 / 0.301(t_1 - t_0)$; donde X_1 y X_0 son las cuentas al comienzo y al final del intervalo; y el tiempo de duplicación (TD) por la expresión $TD = 1/K$.

Los datos obtenidos de las tasas instantáneas (K) y el tiempo de duplicación (TD) para cada sepa a una misma intensidad de luz, se analizaron mediante un ANOVA de una vía. Finalmente las densidades celulares promedio de cada cultivo se ajustaron a diferentes modelos logísticos de regresión (lineal, exponencial y polinomial) para obtener la curva de mejor correlación (Sokal & Rohlf, 1979).

RESULTADOS

Todas las dos cepas de *Dunaliella salina* mostraron un crecimiento paulatino típico del modelo logístico durante los días del cultivo; sin embargo es notorio observar que las cepas de Boca Chica a ambas intensidades luminosas alcanzaron mayores crecimientos que las de Coche (Figs. 1 y 2). No obstante el bioensayo demostró que ambas

cepas mostraron un mayor crecimiento a 10000 lux que cuando crecieron a 20000 lux y ninguna presentó fase de latencia en los bioensayos (Figs. 1 y 2). La máxima concentración celular se obtuvo en la cepa Boca Chica a 10000 lux ($8,14 \times 10^6$ cel/ml) y la mínima en la cepa Coche a 20000 lux ($3,1 \times 10^5$ cel/ml) (Cuadros 1 y 2). La máxima tasa de crecimiento algal se observó en la cepa Boca Chica en los primero 5 días de cultivo (Fig. 1).

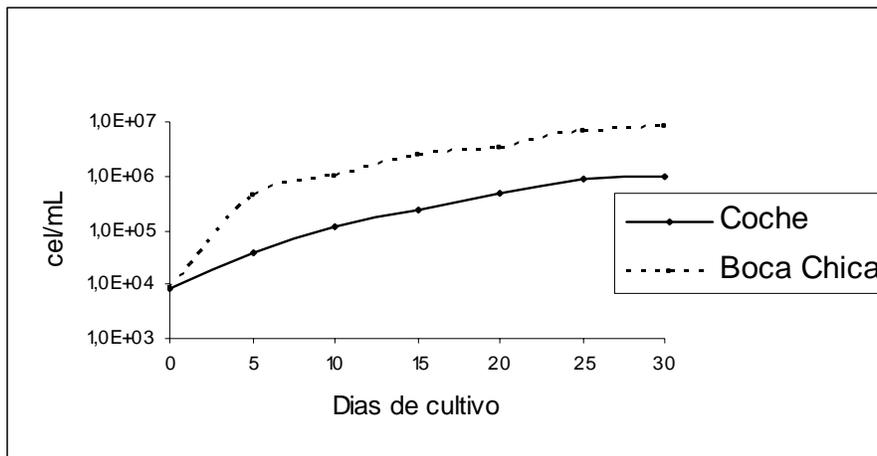


Fig. 1. Crecimiento de dos cepas de la microalga *Dunaliella salina* mantenida a una intensidad luminosa de 10000 lux en condiciones de laboratorio.

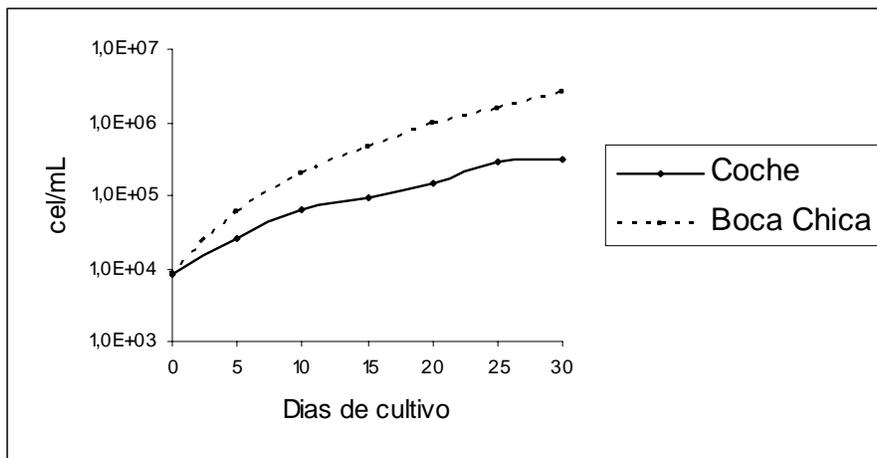


Fig. 2. Crecimiento de dos cepas de la microalga *Dunaliella salina* mantenida a una intensidad luminosa de 20000 lux en condiciones de laboratorio.

Cuadro 1. Parámetros de crecimiento de las cepas de *Dunaliella salina* sometidas a una intensidad luminosa de 10000 lux y cultivadas en el laboratorio. D.C., densidad celular máxima; K, tasa de crecimiento; T.D., tiempo de duplicación; r, tasa instantánea de crecimiento.

Parámetros de crecimiento	Boca Chica	Coche
D. C. (x10 cel/ml)	8.14 x 10 ⁶	9.76 x 10 ⁵
K (div/día)	0.33 ± 0.04	0.23 ± 0.05
T. D. (día)	3.03	4.34
r	0.32	0.29
Duración fase latencia (días)	0	0
Duración fase exponencial (días)	5	5
Duración fase lineal (días)	20	20
Duración fase estacionaria (días)	5	5

Se determinaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre las constantes de crecimiento (K y TD) de las dos cepas cultivadas en condiciones de laboratorio a una misma intensidad de luz, con valores de 0,33 div/día para 10000 lux y de 0,28 div/día para 20000 lux (Fig. 2).

En el Cuadro 1 se indican los resultados obtenidos en los parámetros de crecimiento asociados al modelo logístico en cada cultivo para las dos cepas a una intensidad luminosa de 10000 lux, donde se observa que la mayor tasa de crecimiento K y el mayor tiempo de duplicación (TD) lo presentó la cepa Boca Chica con valores de 0,33 div/día y 3,03 día respectivamente, mientras que la cepa Coche mostró un valor más bajo en la tasa de crecimiento (0,28 div/día), lo que indica que necesita más tiempo para duplicar su población. Las mismas consideraciones se observan en ambas cepas sometidas a una intensidad de 20000 lux, en el cual la cepa Boca Chica, presentó índices de crecimiento más altos y menor tiempo de duplicación (Cuadro 2).

Cuadro 2. Parámetros de crecimientos de las cepas de *Dunaliella salina* sometidas a una intensidad luminosa de 20000 lux y cultivadas en el laboratorio. D.C., densidad celular máxima; K, tasa de crecimiento; T.D., tiempo de duplicación; r, tasa instantánea de crecimiento.

Parámetros de crecimiento	Boca Chica	Coche
D. C. (x10 cel/ml)	2.53x10 ⁶	3.10x10 ⁵
K (div/día)	0.28	0.18
T. D. (día)	3.57	5.55
r	0.29	0.25
Duración fase latencia (días)	0	0
Duración fase exponencial (días)	5	10
Duración fase lineal (días)	25	15
Duración fase estacionaria (días)	5	5

El ajuste de los datos de crecimiento de cada cultivo a modelos de regresión mostró que la mayor correlación se obtuvo con un modelo logístico polinomial del tipo $Y = ax^2 + bx + c$, en los cuales se obtuvieron coeficientes de determinación superiores a 0,97 (Cuadro3).

Cuadro 3. Ecuaciones logísticas polinomiales de mejor ajuste obtenidas para los cultivos de dos cepas de *Dunaliella salina* sometidas a dos intensidades luminosas. NC, número de las células/ml; t, tiempo en días.

CEPAS		
Intensidad	COCHE	Correlación
10000 lux	NC= 1019,8t ² + 4769t – 10889	r ² = 0,973
20000 lux	NC= 269,05t ² + 2650t – 6095,2	r ² = 0,973
BOCA CHICA		
10000 lux	NC= 8658,7t ² + 23710t – 9539,9	r ² = 0,973
20000 lux	NC= 3507t ² + 24862t – 51566	r ² = 0,994

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en los bioensayos de cepas de *D. salina* cultivadas a diferentes intensidades de luz indican claramente el efecto de este parámetro sobre el crecimiento de la microalga. El mayor incremento poblacional observado en la cepa de Boca Chica a ambas intensidades de luz indicaría que la cepa de Coche es más susceptible al estrés producido por la intensidad luminosa a la alta salinidad del medio (270 ‰) o también que la cepa Boca Chica responde con mayor facilidad a las condiciones adversas del medio. En microalgas se ha demostrado que el incremento de la densidad celular está en función de la intensidad luminosa hasta un nivel determinado (Kaplan *et al.*, 1986; Richmond, 1986).

Los resultados de esta investigación difieren ligeramente de los reportados por Suárez *et al.*, (2002) quienes utilizando un inóculo de 8000 cel/ml alcanzaron con 80000 lux una densidad máxima de $5,10 \times 10^5$ cel/ml a los 15 días, disminuyendo a $3,5 \times 10^5$ a los 20 días; y determinaron un crecimiento celular irregular mayor para la especie a intensidades de luz entre 80000 y 200000 lux; y señalan que variando el tamaño de inóculo de siembra, se establece una dependencia de la velocidad de crecimiento con el número inicial de células de cada experimento.

Estos últimos investigadores utilizaron inóculos que oscilaron entre 2×10^3 y $3,24 \times 10^5$ cel/ml, algunos con valores muy superiores a los utilizados en el presente trabajo (8000 cel/ml), además realizaron los experimentos en lagunas al aire libre. El tamaño del inóculo es un factor importante en el crecimiento celular de cultivos, ya que pequeños inóculos no permiten una mayor disposición de las células a las radiaciones solares, provocando la fotoinhibición celular, además de la fotodestrucción de la clorofila y los carotenoides (Ridley, 1982; Powles, 1984); por el contrario inóculos más grandes, permiten un mayor resguardo de las células a las altas irradiaciones y mayor tasa de supervivencia.

En el experimento realizado, la temperatura se mantuvo constante, por lo tanto la intensidad de luz fue para cada cultivo el parámetro más importante ya que influye sobre el esquema de síntesis macromolecular (Mortain-Bertrand *et al.*, 1987) y el metabolismo

celular, del cual depende la tasa de fijación de carbono. Cada especie o cepa tiene una tasa de fijación de carbono específica que varía según la disponibilidad de luz y los nutrientes, aunque la interacción de la luz y la temperatura tienen un papel importante en la capacidad fotosintética, densidad celular y síntesis macromolecular, porque las reacciones que ocurren en ellas están catalizadas por enzimas (Lips & Avisar, 1986)

En especies del género *Dunaliella* se ha investigado el efecto de la intensidad luminosa con rangos entre 1 y 22 Klux sobre el crecimiento en cultivos, determinándose que las bajas concentraciones de CO₂ puede ser el factor más limitante en el crecimiento celular a altas intensidades de luz. (Wegmann, 1971; Loeblich, 1982). Otro factor como el pH, aparentemente afecta menos al crecimiento, ya que las especies de *Dunaliella* toleran un amplio rango de pH.

Las bajas tasas de crecimiento observadas en la cepa Coche, puede también ser consecuencia del mayor volumen celular de esta cepa, en comparación con la de Boca Chica, ya que el volumen celular es inversamente proporcional al número de divisiones diarias y por lo tanto necesitarían mayor espacio y disponibilidad de nutrientes que las haría entrar en competencia entre ellas.

Los ajustes de los datos de los cultivos de ambas cepas a una curva de crecimiento mostraron que las mejores correlaciones se lograron con regresiones polinomiales en todos los casos. Estos modelos son de uso corriente en cultivos de microalgas cuando se relacionan algunos parámetros bioquímicos como el aumento del β -caroteno en relación al nivel de proteína (Suárez *et al.*, 2002), aunque se han propuesto diferentes modelos logísticos para ajustar las curvas de crecimiento, (Moulton, 1988)

CONCLUSIONES

Los resultados indican que la cepa de *Dunaliella salina* de Boca Chica sometida a ambas intensidades luminosas presentó mayor tasa de crecimiento que la cepa de Coche. En ambas cepas la mayor correlación entre el crecimiento celular en relación al tiempo se obtuvieron con un modelo logístico polinomial.

REFERENCIAS

Borowitzka, M. A. & L. J. Borowitzka. 1988. *Dunaliella*. En: Microalgal Biotechnology. Borowitzka, M. A. & L. J. Borowitzka (eds.), pp: 27-58. Cambridge University Press. Cambridge.

Fábregas, J., J. Abalde, C. Herrero, B. Cabezas & M. Veiga. 1984. Growth of the marine microalga *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations. *Aquaculture*, 42: 207-215.

Kaplan, D., Z. Cohen & A. Abeliovich, 1986. Optimal growth condition for *Isocrysis galbana*. *Biomass* 9: 37-48.

Leal, E. 1996. Efecto de algunos factores ambientales sobre la capacidad carotenogénica de una cepa de *Dunaliella salina* Teodoresco (Chlorophyceae, Dunaliellales). Trabajo de Grado. Departamento de Biología. UDO. Cumaná, Venezuela. 104 pp.

Lemus, N. 2000. Efecto de diferentes salinidades sobre el crecimiento de dos cepas de *Dunaliella salina* aisladas de dos salinas en Venezuela. Trabajo de Grado. Departamento de Biología, UDO Núcleo de Sucre. 38 pp.

Lips, S. & Y. Avisar. 1986. Photosynthesis and ultra structure in microalgae. En: Handbook of Microalgal Mass Culture. Richmond, A. (ed.), pp 43-67. CRC Press Inc. Boca Ratón, Florida.

Loeblich, L. A. 1982. Photosynthesis and pigments influenced by light intensity and salinity in the halophile *Dunaliella salina*. (Chlorophyta).

Marín, N., F. Morales, C. Lodéiros & F. Tamigneaux. 1998. Effect of nitrite concentration on growth and pigment synthesis of *Dunaliella salina* cultivated under low illumination and preadapted to different salinities, *J. Appl. Phycol.*, 10: 405-411.

Morales, F. 1995. Efectos de algunos parámetros ambientales sobre las especies talofíticas de microalgas del género *Dunaliella* (Dunal) Teodoresco, 1905 (Chlorophyta, Volvocales) presentes en las salinas

de Araya, Estado Sucre, Venezuela. Trabajo de Grado. Departamento de Biología. UDO. Cumaná, Venezuela. 66 pp.

Mortain-Bertrand, A., C. Descolas-Gross & H. Jupin. 1987. Stimulating effect of light to dark transitions carbon assimilation by a marine diatom. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 112: 11-26.

Moulton, T. P. 1998. Statistical techniques for the analysis of growth experiments: case study, *Dunaliella spp.* (Volvocales, Chlorophyta). ANAIS IV. Congreso Latino Americano, II Reunión Ibero Americana y VII Reunión Brasileira de Fisiología. Soc. de Ficol. de Amer. Lat. y el Caribe. Sociedad Brasileira de Fisiología. 461-474.

Powles, S. 1984. Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35: 15-44.

Richmond, A. 1986. Outdoor mass cultures of microalgae. En: *Handbook of Microalgal Mass Culture*. Richmond, A. (ed.) pp: CRC Press Inc. Boca Raton, Florida.

Ridley, S. 1982. Carotenoids and herbicide action. In G. Britton, TW. Goodwin, eds, *Carotenoides Chemistry and Biochemistry*. Pergamon Press, Oxford, pp 353-369.

Shelef, S, & J. Soeder, 1980. *Algae Biomass. Production and Use*. Elsevier- North Holland Biomedical Press, Amsterdam. 852 pp.

Sokal, J.D. & F. J. Rohlf. 1979. *Biometría. Principios y Métodos Estadísticos en la investigación Biológica*. Edit. Blume, Madrid. 832 pp.

Suárez, G., T. Romero & D. Hernández. 2002. Tamaño de inóculo y crecimiento en *Dunaliella salina* cultivada al aire libre. CIVA 2002 (<http://www.civa2002.org>): 492-501.

Thomas, W. H., D. Siebert, M. Alden, A. Neori & P. Eldridge. 1984. Yields, photosynthetic efficiencies and approximate composition of dense marine microalgal cultures. *Biomass*, 5:181-209.

Wegmann, K. 1971. Osmotic regulation and photosynthetic glycerol production in *Dunaliella*: Biochim. Biophys. Acta 234: 317-323.

Yepez, M. 1992. Estudio sobre el crecimiento de la microalga *Dunaliella sp.* (Chlorophyta, Volvocales) a altas concentraciones de cloruro de sodio. Tesis de Maestría. Departamento de Biología. Universidad del Zulia. Maracaibo. 124 pp.

Yepez, M. & E. Morales. 1998. Efecto de la concentración de nitrato y cloruro de sodio sobre la densidad celular y contenido de pigmentos de *Dunaliella viridis*. Bol. Centro Invest. Biol. 32(1): 1-12.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan agradecimiento al profesor: Miguel Guevara, jefe del Laboratorio de Acuicultura del Departamento de Biología Pesquera del Instituto Oceanográfico de Venezuela, por la colaboración prestada. Al Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente, por la subvención a través del proyecto CI-2-010101-1368/07. A la Universidad de Panamá por permitir el espacio, a la Revista Tecnociencia por la publicación y finalmente a los revisores cuyas acertadas recomendaciones mejoraron la versión inicial.

Recibido diciembre de 2006, aceptado diciembre de 2007.