

**Centro de Investigación Científica y de Educación  
Superior de Ensenada, Baja California**



---

**Maestría en Ciencias  
en Acuicultura**

---

**Crecimiento e inducción a la carotenogénesis de la microalga  
*Dunaliella* sp. en diferentes condiciones de cultivo**

Tesis  
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias

Presenta:

**Enrique Gilberto Zepeda Lupio**

Ensenada, Baja California, México  
2017

Tesis defendida por  
**Enrique Gilberto Zepeda Lupio**

y aprobada por el siguiente Comité

---

Dra. Beatriz Cordero Esquivel  
Codirectora de tesis

---

Dr. Benjamín Barón Sevilla  
Codirector de tesis

**Dra. Mónica Hernández Rodríguez**

**M. en C. Abelardo Campos Espinoza**

**Dra. Ma. Elena Solana Arellano**



---

**Dr. Benjamín Barón Sevilla**  
Coordinador del Posgrado en Ciencias en  
Acuicultura

---

**Dra. Rufina Hernández Martínez**  
Directora de Estudios de Posgrado

*Enrique Gilberto Zepeda Lupio© 2017*

*Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.*

Resumen de la tesis que presenta **Enrique Gilberto Zepeda Lupio** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura.

**Crecimiento e inducción a la carotenogénesis de la microalga *Dunaliella* sp. en diferentes condiciones de cultivo**

Resumen aprobado por:

---

Dra. Beatriz Cordero Esquivel  
Codirectora de tesis

---

Dr. Benjamín Barón Sevilla  
Codirector de tesis

La producción de microalgas es una fuente importante de compuestos con un alto valor comercial, como pigmentos carotenoides, antibióticos, vitaminas y ácidos grasos poliinsaturados, entre otros. La microalga flagelada *Dunaliella* es la principal fuente natural de  $\beta$ -caroteno. La microalga *Dunaliella* sp. utilizada en el presente estudio fue recolectada de una salina en el estado de Sinaloa, México. En un primer ensayo se evaluó su crecimiento utilizando dos medios nutritivos de cultivo: medio Guillard y medio Johnson, los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 20°C y en una intensidad de luz de 100  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  durante 14 días. En otro ensayo, se evaluó la producción de biomasa en ocho intensidades de luz (100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1300 and 1600  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) utilizando medio "f/2" a una temperatura de 25°C durante siete días. En un tercer ensayo se probó el efecto de la salinidad (35 y 100 ups) y el contenido de nitrógeno (217, 435 y 882  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{NaNO}_3$ , medio "f/2") sobre el crecimiento en un período de 12 días. Para este experimento, además, se evaluó el contenido de pigmentos a lo largo del tiempo de cultivo. El crecimiento celular resultó mejor utilizando el medio de Guillard ("f" y "f/2") que el medio Johnson (JSW y JDW), alcanzando densidades celulares de  $10.7 \times 10^6$  cél  $\text{mL}^{-1}$  y  $5.3 \times 10^6$  cél  $\text{mL}^{-1}$  en el día 14, respectivamente. La mayor producción de biomasa de *Dunaliella* sp. se obtuvo bajo dos condiciones: con una intensidad de luz de 100  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  en el día cuatro, alcanzando una concentración de  $5.6 \times 10^6$  cél  $\text{mL}^{-1}$ ; y con una salinidad de 35 ups y contenido de nitrógeno de 882  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (100% nitrógeno), alcanzando  $5.1 \times 10^6$  cél  $\text{mL}^{-1}$ . El medio de cultivo, intensidad de luz, salinidad y porcentaje de nitrógeno necesarios para optimizar el crecimiento de *Dunaliella* sp. fueron el medio "f/2" de Guillard, 100  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , 35 ups y 100% nitrógeno ("f/2"), respectivamente. Las mayores cantidades de clorofila *a* (2.701 pg cél<sup>-1</sup>),  $\beta$ -caroteno (0.535 pg cél<sup>-1</sup>) y cantaxantina (0.213 pg cél<sup>-1</sup>) se encontraron en el experimento de crecimiento a intensidad de luz de 100  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , 100 ups y 882  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (100% nitrógeno). Para evaluar la producción de pigmentos se realizaron dos ensayos de inducción adicionales, donde se probaron las ocho intensidades de luz utilizadas en el experimento de crecimiento en combinación con tres salinidades: 35, 100 y 200 ups. El primer ensayo de inducción se llevó a cabo privando a los cultivos de nutrientes en su totalidad, mientras que en el segundo ensayo solo se removió el nitrógeno (medio "f/2"). Las mayores concentraciones de luteína (1.025 pg cél<sup>-1</sup>) y astaxantina (0.144 pg cél<sup>-1</sup>) se encontraron en el experimento de inducción sin nitrógeno, a intensidades de luz entre 100 y 200  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , y salinidad de 35 (astaxantina) y 100 ups (luteína). La cepa de *Dunaliella* sp. cultivada e inducida con las diferentes combinaciones de intensidad de luz, salinidad y nitrógeno, no produjo cantidades importantes de los pigmentos astaxantina, cantaxantina y  $\beta$ -caroteno, en comparación con otras cepas consideradas como grandes productoras. Las concentraciones de luteína y clorofila *a* de *Dunaliella* sp. se encuentran en los intervalos observados en otras especies del mismo género.

**Palabras clave:** microalga, *Dunaliella*, carotenoides, condiciones de luz y salinidad, volumen celular.

Abstract of the thesis presented by **Enrique Gilberto Zepeda Lupio** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Aquaculture.

**Growth and carotenogenesis induction of microalgae *Dunaliella* sp. In different culture conditions**

Abstract approved by:

---

Dra. Beatriz Cordero Esquivel  
**Thesis Codirector**

---

Dr. Benjamín Barón Sevilla  
**Thesis Codirector**

Microalgae production represents an important source of valuable commercial compounds like carotenoid pigments, antibiotics, vitamins and poly-unsaturated fatty acids, among others. The flagellated microalgae *Dunaliella* is the major natural source of  $\beta$ -carotene. In this study, *Dunaliella* sp. strain was isolated from Sinaloa, México. As a first assay to test the growth, the culture media of Guillard and Johnson were evaluated at 20°C and a 100  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  light intensity over 14 days. In another assay, eight light intensities (100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1300 and 1600  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) were tested for biomass production with “f/2” medium at 25°C for seven days. In a third assay, the effect of salinity (35 and 100 ups) and nitrogen content (217, 435 y 882  $\mu\text{mol L}^{-1}$  of  $\text{NaNO}_3$ , “f/2” medium) were tested for biomass production for 12 days; also, the cells pigment content was evaluated over the growing time. *Dunaliella* growth was better with Guillard’s medium (“f” and “f/2”) than Johnson’s media (JSW and JDW), reaching cell densities of  $10.7 \times 10^6$  cell  $\text{mL}^{-1}$  and  $5.3 \times 10^6$  cell  $\text{mL}^{-1}$  at 14 days, respectively. Highest biomass production of *Dunaliella* was achieved with two conditions: in 100  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  light intensity at day four, reaching a concentration of  $5.6 \times 10^6$  cell  $\text{mL}^{-1}$ ; and with a salinity of 35 ups and a nitrogen content of 882  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (100% nitrogen), reaching  $5.1 \times 10^6$  cell  $\text{mL}^{-1}$ . The best combination of culture medium, light intensity, salinity and nitrogen content for *Dunaliella* growth was “f/2” Guillard, 100  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , 35 ups and 882  $\mu\text{mol L}^{-1}$  of  $\text{NaNO}_3$ , respectively. Highest amounts of chlorophyll *a* (2.701  $\text{pg cell}^{-1}$ ),  $\beta$ -carotene (0.535  $\text{pg cell}^{-1}$ ) and canthaxanthin (0.213  $\text{pg cel}^{-1}$ ) were found in the growth experiment at light intensity of 100  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , 100 ups and 882  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (100% nitrogen). Two additional induction assays were performed to evaluate pigment production, where the eight light intensities used in the growth experiment were tested in combination with three salinities: 35, 100 and 200 ups. The first induction assay was carried out without nutrients, while in the second assay only the nitrogen was removed (“f/2” medium). Highest concentrations of lutein (1.025  $\text{pg cell}^{-1}$ ) and astaxanthin (0.144  $\text{pg cell}^{-1}$ ) were found in the induction experiment without nitrogen, at light intensities between 100 and 200  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , and salinity of 35 (astaxanthin) and 100 ups (lutein). *Dunaliella* strain cultivated and induced with different combinations of light intensity, salinity and nitrogen, did not produce significant amounts of the pigments astaxanthin, canthaxanthin and  $\beta$ -carotene, compared to other strains considered as major producers. Concentrations of lutein and chlorophyll *a* of this *Dunaliella* strain are in the ranges observed in another species of the same genus.

**Keywords:** microalgae, *Dunaliella*, carotenoids, light conditions, cell volume, salinity.

## Dedicatoria

*A mi esposa Iveth; amiga, compañera y amor de mi vida, un gran impulso para seguir evolucionando como ser humano. Y a mis padres que, sin ellos, no estaría aquí, en este momento.*

## Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) por otorgarme un espacio en sus filas para poder desarrollar mi maestría y tesis.

Al CONACyT por respaldar mis gastos mediante el otorgamiento de una beca (no. becario: 340056) durante mi estancia en la institución y la escritura de la tesis.

A mis directores de tesis Dra. Beatriz Cordero, por su infinito apoyo desde que llegué a su laboratorio en 2012 y a lo largo de mi carrera profesional, por último, por su paciencia y participación en este trabajo de tesis. Y al Dr. Benjamín Barón por aportar su conocimiento, tiempo y apoyo a lo largo de mis estudios profesionales.

A mi comité de tesis, Dra. Mónica Hernández por complementar este trabajo y la disponibilidad de utilizar su laboratorio y equipo. Al M. en C. Abelardo Campos, por su intenso apoyo en la metodología y procesamiento de las muestras de pigmentos mediante HPLC, por estar conmigo en la caracterización de la microalga utilizada en este trabajo y por hacer más ameno el proceso de análisis de las muestras. Y a la Dra. Ma. Elena Solana por su ayuda en los aspectos estadísticos del trabajo.

A la M. en C. Patricia Prado por preceder este trabajo, por la información previa generada y por su interés en los resultados de esta tesis. Y a todos los estudiantes con los que he convivido (Vincent, Raquel) y apoyado en el laboratorio de microalgas (Marco, Araceli).

Al Dr. Jorge Olmos por facilitar su conocimiento, laboratorio y material necesario para la identificación molecular de la microalga utilizada en este trabajo, y a la M. en C. Rosalía Contreras, por su apoyo dentro del laboratorio de Microbiología molecular del departamento de Biotecnología Marina.

A los Dres. y Dras. del Departamento de Acuicultura, por el conocimiento en las clases que imparten y la disponibilidad de resolver dudas que se presentaron a lo largo del camino.

A personal técnico del Departamento de Acuicultura, Adrián Celaya Ortega, Luis Alberto Murillo Valenzuela y Jesús Mariscal Medina, por la disposición del agua de mar utilizada en los experimentos de este trabajo.

A mis compañeros de maestría, y a los amigos que hice a lo largo de este tiempo.

## Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas.....	xi
<b>Capítulo 1. Introducción</b>	
1.1 Crecimiento celular.....	1
1.2 El estrés ambiental en la producción de pigmentos carotenoides.....	5
1.3 <i>Dunaliella</i> spp. ....	7
1.4 Justificación.....	9
1.5 Hipótesis.....	9
1.6 Objetivos.....	10
1.6.1 Objetivo general .....	10
1.6.2 Objetivos específicos.....	10
<b>Capítulo 2. Metodología</b>	
2.1 Colecta y aislamiento de la cepa de <i>Dunaliella</i> sp. ....	11
2.2 Identificación genética de la especie de <i>Dunaliella</i> .....	11
2.3 Producción inicial de biomasa de <i>Dunaliella</i> sp. ....	11
2.4 Optimización del crecimiento de <i>Dunaliella</i> sp. ....	11
2.4.1 Evaluación de medios de cultivo.....	11
2.4.2 Evaluación de la intensidad de luz.....	13
2.4.3 Efecto interactivo de la limitación del nitrógeno y exposición a dos concentraciones de salinidad durante un periodo de 12 días.....	13
2.5 Inducción a la carotenogénesis de <i>Dunaliella</i> sp. ....	14
2.5.1 Estrés salino agudo y crónico.....	14
2.5.2 Efecto interactivo de la intensidad de luz y exposición aguda a la salinidad.....	14
2.5.3 Efecto interactivo de la intensidad de luz, ausencia de nutrientes y exposición crónica a la salinidad.....	15
2.5.4 Efecto interactivo de la intensidad de luz, ausencia de nitrógeno y exposición crónica a la salinidad.....	17

2.6	Análisis de pigmentos en <i>Dunaliella</i> sp. ....	18
2.7	Análisis estadístico.....	19
<b>Capítulo 3. Resultados</b>		
3.1	Identificación genética de la especie de <i>Dunaliella</i> .....	21
3.2	Evaluación de crecimiento de <i>Dunaliella</i> sp. ....	21
3.2.1	Evaluación de medios de cultivo para la producción de biomasa.....	21
3.2.2	Evaluación de ocho intensidades de luz para la producción de biomasa.....	23
3.2.3	Efecto interactivo de la limitación del nitrógeno y exposición a dos concentraciones de salinidad.....	24
3.2.3.1	Cuantificación de los pigmentos carotenoides y clorofila <i>a</i> .....	25
3.3	Inducción a la carotenogénesis de <i>Dunaliella</i> sp. Estrés salino agudo y crónico.....	31
3.3.1	Efecto interactivo de la intensidad de luz y exposición aguda a la salinidad.....	31
3.3.2	Efecto interactivo de la intensidad de luz, ausencia de nutrientes y exposición crónica a la salinidad.....	31
3.3.2.1	Cuantificación de pigmentos carotenoides y clorofila <i>a</i> en la inducción crónica a la salinidad y ausencia de nutrientes.....	34
3.3.3	Efecto interactivo de la intensidad de luz, ausencia de nitrógeno y exposición crónica a la salinidad.....	39
3.3.3.1	Cuantificación de pigmentos carotenoides y clorofila <i>a</i> en la inducción crónica a la salinidad y ausencia del nitrógeno.....	41
<b>Capítulo 4. Discusión.....</b>		<b>47</b>
<b>Capítulo 5. Conclusiones.....</b>		<b>55</b>
<b>Literatura citada.....</b>		<b>56</b>



## Lista de figuras

Figura		Página
1	Representación gráfica de la forma esferoide de una célula de <i>Dunaliella</i> sp. Se indican el diámetro (d) y altura (h). Tomado de Hillebrand <i>et al.</i> (1999).....	17
2	Crecimiento de <i>Dunaliella</i> sp. con el medio “F” y “f/2” de Guillard y con dos variantes del medio Johnson, uno preparado con agua de mar sintética (JMS) y otro con agua destilada (JD+NaCl). Las barras indican el error estándar.....	21
3	Crecimiento de <i>Dunaliella</i> sp. expuesta a ocho intensidades de luz (100 a 1600 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), a una temperatura de 25°C y salinidad de 35 ups. Las barras indican el error estándar.....	23
4	Crecimiento de <i>Dunaliella</i> sp. expuesta a dos concentraciones de salinidad (35 y 100 ups), un medio de cultivo (f/2) con tres niveles de nitrógeno (100, 50 y 25%), y a una temperatura de 25°C. Las barras indican el error estándar. Los porcentajes de 100, 50 y 25% de nitrógeno equivalen a una concentración de 217, 435 y 882 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de $\text{NaNO}_3$ , respectivamente.....	25
5	Concentración promedio y error estándar del pigmento astaxantina en los cultivos de <i>Dunaliella</i> sp. expuestos a dos concentraciones de salinidad (35 y 100 ups) y tres concentraciones de nitrógeno en el medio (100, 50 y 25%). Las letras denotan diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ).....	26
6	Concentración promedio y error estándar del pigmento luteína en los cultivos de <i>Dunaliella</i> sp. expuestos a dos concentraciones de salinidad (35 y 100 ups) y tres concentraciones de nitrógeno en el medio (100, 50 y 25%). Las letras denotan diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ). No se encontró pigmento en el día 0 de cultivo.....	28
7	Concentración promedio y error estándar del pigmento cantaxantina en los cultivos de <i>Dunaliella</i> sp. expuestos a dos concentraciones de salinidad (35 y 100 ups) y tres concentraciones de nitrógeno en el medio (100, 50 y 25%). Las letras denotan diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ).....	29
8	Concentración promedio y error estándar del pigmento clorofila <i>a</i> en los cultivos de <i>Dunaliella</i> sp. expuestos a dos concentraciones de salinidad (35 y 100 ups) y a tres concentraciones de nitrógeno en el medio (100, 50 y 25%). Las letras denotan diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ).....	30
9	Concentración promedio y error estándar del pigmento $\beta$ -caroteno en los cultivos de <i>Dunaliella</i> sp. expuestos a dos concentraciones de salinidad (35 y 100 ups) y a tres concentraciones de nitrógeno en el medio (100, 50 y 25%). Las letras denotan diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ).....	31
10	Volumen celular promedio ( $\mu\text{m}^3$ ) de <i>Dunaliella</i> sp. expuesta a diferentes combinaciones de intensidad de luz y salinidad, para la inducción crónica salina en ausencia de nutrientes.....	33

11	Correlación entre la concentración salina del medio sin nutrientes y el volumen celular de <i>Dunaliella</i> expuesta a una intensidad de luz de 400 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Los puntos representan el volumen celular promedio y las barras el error estándar.....	34
12	Concentración promedio y error estándar de los pigmentos astaxantina (ASXT), luteína (LUT), cantaxantina (CAN), clorofila <i>a</i> (CLOA) y $\beta$ -caroteno (BCAR) en los cultivos de <i>Dunaliella</i> sp. expuestas a ocho intensidades de luz (100 a 1600 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), una concentración salina de 35 ups y ausencia de nutrientes. Las letras denotan diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ).....	38
13	Concentración promedio y error estándar de los pigmentos astaxantina (ASXT), luteína (LUT), cantaxantina (CAN), clorofila <i>a</i> (CLOA) y $\beta$ -caroteno (BCAR) en los cultivos de <i>Dunaliella</i> sp. expuestas a ocho intensidades de luz (100 a 1600 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), una concentración salina de 100 ups y ausencia de nutrientes. Las letras denotan diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ). No se encontró cantaxantina en los tratamientos de 1000 a 1600 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .....	38
14	Concentración promedio y error estándar de los pigmentos astaxantina (ASXT), luteína (LUT), cantaxantina (CAN), clorofila <i>a</i> (CLOA) y $\beta$ -caroteno (BCAR) en los cultivos de <i>Dunaliella</i> sp. expuestas a cuatro intensidades de luz (100, 400, 800 y 1300 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), una concentración salina de 200 ups y ausencia de nutrientes. Las letras denotan diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ). No se encontró cantaxantina en los tratamientos de 800 y 1300 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Los tratamientos de 200, 600, 1000 y 1600 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ no fueron analizados en la salinidad de 200 ups.....	39
15	Volumen celular promedio ( $\mu\text{m}^3$ ) de <i>Dunaliella</i> sp. expuesta a diferentes combinaciones de intensidad de luz y salinidad, para la inducción crónica salina y ausencia de nitrógeno.....	40
16	Correlación entre la concentración salina del medio sin nitrógeno y el volumen celular de <i>Dunaliella</i> sp. expuesta a una intensidad de luz de 400 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Los puntos representan el volumen celular promedio y las barras el error estándar.....	41
17	Concentración promedio y error estándar de los pigmentos astaxantina (ASXT), luteína (LUT), cantaxantina (CAN), clorofila <i>a</i> (CLOA) y $\beta$ -caroteno (BCAR) en los cultivos de <i>Dunaliella</i> sp. expuestas a ocho intensidades de luz (100 a 1600 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), una concentración salina de 35 ups y ausencia de nitrógeno. Las letras denotan diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ).....	45
18	Concentración promedio y error estándar de los pigmentos astaxantina (ASXT), luteína (LUT), cantaxantina (CAN), clorofila <i>a</i> (CLOA) y $\beta$ -caroteno (BCAR) en los cultivos de <i>Dunaliella</i> sp. expuestas a ocho intensidades de luz (100 a 1600 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), una concentración salina de 100 ups y ausencia de nitrógeno. Las letras denotan diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ). No se encontró cantaxantina en el tratamiento de 1600 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .....	45
19	Concentración promedio y error estándar de los pigmentos astaxantina (ASXT), luteína (LUT), cantaxantina (CAN), clorofila <i>a</i> (CLOA) y $\beta$ -caroteno (BCAR) en los cultivos de <i>Dunaliella</i> sp. expuestas a ocho intensidades de luz (100, 400, 800 y 1600 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), una concentración salina de 200 ups y ausencia de nitrógeno. Las letras denotan diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ). No se encontró cantaxantina en los tratamientos de 800 y 1600 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Los tratamientos de	46

200, 600, 1000 y 1600  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  en combinación con la salinidad de 200 ups no fueron analizados.....

## Lista de tablas

Tabla	Página
1 Concentraciones de nitratos y fosfatos del medio f/2 y Johnson, expresados en molaridad (mM).....	12
2 Diseño experimental utilizado para evaluar el efecto combinado de tres concentraciones del nitrato de sodio y dos diferentes salinidades para la inducción de <i>Dunaliella</i> sp. a la carotenogénesis. 18 unidades experimentales en total.....	14
3 Diseño experimental utilizado para evaluar el efecto combinado de ocho intensidades de luz y cuatro salinidades para la inducción a la carotenogénesis de <i>Dunaliella</i> sp., cultivada en un medio sin nutrientes. En cada tratamiento se utilizaron tres repeticiones, con un total de 96 unidades experimentales.....	16
4 Diseño experimental utilizado para evaluar el efecto combinado de ocho intensidades de luz y tres salinidades, para la inducción a la carotenogénesis de <i>Dunaliella</i> sp. cultivada en un medio sin nitrógeno. Cada tratamiento fue probado con tres repeticiones, con un total de 72 unidades experimentales.....	18
5 Condiciones de operación del HPLC, método de Vidussi <i>et al.</i> (1996).....	19
6 Tasas de crecimiento ( $\mu$ ) de <i>Dunaliella</i> sp. cultivada con los medios de cultivo de Guillard ("f" y "f/2") y Johnson (con agua de mar sintética y con agua destilada). Los números en paréntesis muestran el error estándar.....	22
7 Tasas de crecimiento ( $\mu$ ) de <i>Dunaliella</i> sp. cultivada con diferentes intensidades de luz (100 a 1600 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). Los números en paréntesis muestran el error estándar...	24
8 Concentración de pigmentos carotenoides y clorofila <i>a</i> ( $\text{pg cél}^{-1}$ ) en los cultivos de <i>Dunaliella</i> sp. a los cuatro, ocho y 12 días de exposición a las diferentes combinaciones de concentración de nitrógeno en el medio (f/2) y salinidad. Las letras mayúsculas denotan diferencias significativas de la salinidad entre tratamientos ( $p < 0.05$ ) por pigmento para cada día; y las minúsculas diferencias significativas de la concentración de nitrógeno entre tratamientos ( $p < 0.05$ ) por pigmento para cada día. Los números en paréntesis muestran el error estándar. Los porcentajes de 100, 50 y 25% de nitrógeno equivalen a una concentración de 217, 435 y 882 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de $\text{NaNO}_3$ , respectivamente.....	27
9 Volumen celular ( $\mu\text{m}^3$ ) de <i>Dunaliella</i> sp. expuesta a diferentes combinaciones de intensidad de luz y salinidad, para la inducción crónica salina a la carotenogénesis en ausencia de nutrientes. Las letras mayúsculas denotan diferencias significativas de la salinidad entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ) y las letras minúsculas diferencias significativas de la intensidad de luz entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ). Los números en paréntesis muestran el error estándar.....	32
10 Concentración inicial ( $\text{pg cél}^{-1}$ ) de pigmentos carotenoides y clorofila <i>a</i> en la inducción crónica salina y ausencia de nutrientes.....	36

11	Concentración de pigmentos carotenoides y clorofila <i>a</i> (pg cél <sup>-1</sup> ) en los cultivos de <i>Dunaliella</i> sp. a los 11 días de exposición a diferentes combinaciones de intensidad de luz y salinidad en ausencia de nutrientes. Las letras mayúsculas denotan diferencias significativas en la salinidad entre tratamientos (p<0.05) y las minúsculas denotan diferencias significativas en la intensidad de luz para cada salinidad (p<0.05). Los números en paréntesis muestran el error estándar. El símbolo “-” representa ausencia de dato en esa intensidad de luz con la combinación de 200 ups de salinidad.....	37
12	Volumen celular (μm <sup>3</sup> ) de <i>Dunaliella</i> sp. expuesta a diferentes combinaciones de intensidad de luz y salinidad, para la inducción crónica salina de la carotenogénesis en ausencia de nitrógeno. Las letras mayúsculas denotan diferencias significativas de la salinidad entre tratamientos (p<0.05) y las letras minúsculas diferencias significativas de la intensidad de luz entre los tratamientos (p<0.05) en cada salinidad. Los números en paréntesis muestran el error estándar. Para este diseño se descartó la salinidad de 300 ups.....	40
13	Concentración inicial (pg cél <sup>-1</sup> ) de pigmentos carotenoides y clorofila <i>a</i> en la inducción crónica salina y ausencia del nitrógeno.....	42
14	Concentración de pigmentos carotenoides y clorofila <i>a</i> (pg cél <sup>-1</sup> ) en los cultivos de <i>Dunaliella</i> sp. a los 11 días de exposición a diferentes combinaciones de intensidad de luz y salinidad en ausencia de nitrógeno. Las letras mayúsculas denotan diferencias significativas en la salinidad entre tratamientos (p<0.05) y las minúsculas denotan diferencias significativas en la intensidad de luz para cada salinidad (p<0.05). Los números en paréntesis muestran el error estándar. El símbolo “-” representa ausencia de dato en esa intensidad de luz con la combinación de 200 ups de salinidad.....	44

## Capítulo 1. Introducción

---

Las microalgas son organismos eucariotas fotosintéticos que pueden tener una estructura unicelular, colonial o filamentosa; forman parte de la producción primaria de la mayoría de los sistemas acuáticos y ocupan hábitats muy diversos en prácticamente todo el planeta, su distribución geográfica está limitada por factores ambientales, que son específicos para el desarrollo de cada una de las especies. Los hábitats donde se distribuyen comprenden desde mares con abundancia de nutrientes hasta ambientes que presentan condiciones extremas, como cuerpos de agua hipersalinos (Andersen, 2013).

Algunas microalgas ofrecen la ventaja de poder desarrollarse en cultivos controlados o semicontrolados, ya sean abiertos, como estanques al aire libre o en sistemas cerrados, como biorreactores. Por esta razón, diversas especies se han estudiado para conocer su respuesta fisiológica, evaluada bajo condiciones que favorecen su crecimiento y la producción de metabolitos, lo cual ha llevado a la tecnificación y perfeccionamiento de sus cultivos. Esto las ha convertido en organismos muy utilizados para diversos fines, como la investigación, producción de alimento en la acuicultura, como modelos en estudios ecológicos o fisiológicos, y más recientemente para la producción de sustancias químicas con un valor económico a nivel mundial. Hoy en día se tiene una gran variedad de productos derivados del procesamiento e industrialización de estos microorganismos (Barsanti y Gualteri, 2014).

Las microalgas son una fuente importante de productos con un alto valor comercial, como los pigmentos carotenoides, antibióticos, vitaminas y ácidos grasos poli-insaturados, entre otros (Sevilla *et al.*, 2004), los cuales pueden ser utilizados con diferentes propósitos, como suplementos para la alimentación humana y animal, para la elaboración de fertilizantes, productos farmacéuticos, biorremediadores y biocombustibles, además de su uso en la acuicultura, principalmente por su importancia en la nutrición de larvas de peces, a través de organismos intermediarios como rotíferos, nauplios de *Artemia* y copépodos y, de manera directa, en la alimentación de los moluscos y algunas especies de crustáceos (Muller-Feuga, 2000).

### 1.1 Crecimiento celular

El crecimiento de las microalgas se puede dividir en cinco fases o etapas de desarrollo: (1) fase de acondicionamiento, es la etapa de adaptación de las microalgas a las nuevas condiciones del medio; (2) fase exponencial, aquí las células se duplican sucesivamente en intervalos iguales de tiempo y la tasa de consumo de los nutrientes aumenta de manera sustancial; (3) fase de crecimiento lento, en esta etapa se incrementa el tiempo requerido para duplicar la población y la tasa de crecimiento se reduce; (4) fase

estacionaria, donde no hay un incremento neto de la población; (5) fase de muerte, aquí la tasa de mortalidad supera a la tasa de multiplicación celular (Wijffels *et al.*, 2009).

La optimización del crecimiento de las microalgas requiere la puesta a punto de un gran número de factores físicos y químicos, entre los cuales se encuentra la composición del medio nutritivo de cultivo, por lo que resulta importante conocer los requerimientos tanto de los nutrientes mayores como de los micronutrientes (metales traza y vitaminas), ya que éstos cumplen un papel vital en diversos procesos metabólicos y en el crecimiento celular de las microalgas, por lo que es necesario incluirlos en el medio de cultivo, ya sea que se elabore con agua marina o artificial (Mata *et al.*, 2010).

El crecimiento celular de las microalgas está determinado entre otros factores, por la calidad del medio utilizado para su cultivo. En el cultivo de cepas puras se requiere un riguroso control de los nutrientes en el medio utilizado; mientras que, para cultivos masivos, en ocasiones se suelen utilizar fertilizantes agrícolas, los cuales derivan de fuentes minerales (Alvarado *et al.*, 2008). Es conveniente formular los medios de cultivo con concentraciones definidas, las cuales varían dependiendo de los requerimientos nutricionales específicos de la microalga con la que se trabaje. La definición de estos medios nutritivos facilita la comparación entre diferentes investigaciones (Subba, 2009). Posiblemente el medio nutritivo “f/2” de Guillard (1975), es el más utilizado en agua de mar, tanto para cultivar especies planctónicas como bentónicas, su contenido de nutrientes mayores como el nitrógeno y el fósforo es la mitad del medio “f” y se acerca a la concentración de muchos otros medios de cultivo (Vonshak, 1986).

El nitrógeno es un nutriente muy importante en el crecimiento microalgal, regularmente constituye alrededor del 10% del peso seco total de la célula, dependiendo de las condiciones de cultivo y la disponibilidad del mismo. Es un constituyente fundamental en la estructura y función de las proteínas celulares, incluidas las enzimas, que son esenciales en la síntesis de lípidos y carbohidratos y en el metabolismo celular. El nitrógeno puede ser suministrado en el medio de cultivo principalmente en forma de nitrato, urea o amonio. La preferencia de cada microalga por una fuente de nitrógeno depende de las condiciones ambientales (*e.g.*, la luz), la disponibilidad de las diferentes especies de nitrógeno en el cultivo y del gasto energético que podría requerir la asimilación de una fuente en particular (Giordano y Bowes, 1997). Cuando el nitrógeno del medio es utilizado por la célula en su totalidad, el proceso de fotosíntesis continúa, pero a una tasa significativamente reducida, lo cual limita su crecimiento (Hu, 2013).

Durante las etapas de crecimiento exponencial, las microalgas consumen rápidamente los nutrientes, por lo que resulta muy importante su renovación continua. Por otro lado, los factores ambientales como la intensidad y calidad de la luz, no sólo afectan el proceso fotosintético y el incremento de la biomasa celular, sino también las vías y actividad del metabolismo celular, por lo tanto, modifican la composición de las

células. La luz es una de las variables físicas de mayor importancia en el cultivo de las microalgas, debido a que es la fuente de energía (captada principalmente por las moléculas de clorofila) para el proceso de la fotosíntesis, donde el CO<sub>2</sub> y el agua son metabolizados y convertidos a carbohidratos y oxígeno. Estos procesos se llevan a cabo en las membranas de los tilacoides en los cloroplastos, donde se encuentran los fotosistemas I y II, que son los complejos pigmento-proteína desde donde se provee a los centros de reacción de la célula el NADPH<sub>2</sub> (potencial reductor) y la energía química en forma de ATP, para la asimilación del carbón inorgánico y la síntesis de carbohidratos. Esta molécula de NADPH<sub>2</sub> es producida mediante la extracción de dos electrones de la molécula de agua, los cuales son transportados a través de una cadena de acarreadores de electrones, esto a consecuencia del proceso de captación de la luz (Masojídek *et al.*, 2004).

La intensidad y calidad (composición espectral) de la luz son determinantes en el desempeño de los cultivos microalgales, ya que al incrementar o reducir la intensidad de la luz, se pueden modificar las tasas de crecimiento (Sciandra *et al.*, 1997; Solovchenko *et al.*, 2008), lo cual tiene un efecto preponderante en la composición bioquímica de las células. La cantidad de luz que absorbe la célula depende de los arreglos en la composición y concentración de los pigmentos, lo que involucra cambios dinámicos en la estructura celular y en su fisiología, que le permiten ajustar su crecimiento (Dubinsky *et al.*, 1995; Sciandra *et al.*, 1997).

En condiciones de altas intensidades de luz, la tasa de fijación del CO<sub>2</sub> de la célula microalgal no permite el procesamiento de la energía excedente, por lo que el proceso de la fotosíntesis se satura y genera un daño foto-oxidativo que inhibe la actividad del fotosistema II. Cuando la magnitud de este daño rebasa la capacidad de fotoprotección y el proceso de reparación, los centros de reacción en los tilacoides pierden la capacidad de revertir el efecto ocasionado por el exceso de energía luminosa (Osmond y Forster, 2006). Así, las altas intensidades de luz pueden fotoinhibir a la célula y disminuir sus tasas de crecimiento, además es importante considerar que no todas las especies de microalgas crecen de manera óptima en condiciones de luz continua (Barsanti y Gualteri, 2014).

La salinidad es otro factor ambiental que afecta el crecimiento de las microalgas. Las variaciones en la salinidad del medio afectan a las células microalgales de tres formas, induciendo: a) estrés osmótico, que modifica la capacidad de regular su contenido de agua; b) estrés iónico, originado por la acumulación o pérdida de iones; el cual forma parte de la aclimatación de la célula; y c) un cambio en las tasas de intercambio iónico, debido a la permeabilidad selectiva de la membrana (Kirst, 1990).

Los cambios en la composición iónica del medio determinan en menor medida la productividad de las microalgas, ya que las condiciones ambientales extremas propician un cambio en la utilización de la



energía metabólica, disminuyendo aquella energía que se dedica al crecimiento, para utilizarla en procesos de protección, como la producción de compuestos bioquímicos de defensa, como el glicerol y los ácidos grasos poliinsaturados. Estos últimos permiten la adaptación de las membranas intracelulares para funcionar en un ambiente de concentraciones altas de glicerol, producido para balancear la presión osmótica externa (Renaud *et al.*, 1994).

Se conocen dos procesos fundamentales que permiten a las microalgas tolerar el estrés osmótico ocasionado por altas concentraciones de sal. En el primero, las células mantienen altas concentraciones intracelulares de iones inorgánicos, equivalentes a las concentraciones externas, de esta forma, todos los sistemas en el interior de la célula se adaptan a las altas salinidades. En el segundo mecanismo, las células mantienen concentraciones bajas de iones inorgánicos en el citoplasma, por lo tanto, la presión osmótica del medio se balancea mediante la acumulación intracelular de solutos orgánicos como el glicerol, el arabitol, azúcares y aminoácidos (Kirst, 1990).

Otro factor ambiental que influye de manera importante en la productividad de los cultivos de microalgas es la temperatura, que, en combinación con la luz, determinan su crecimiento. En consecuencia, resulta de gran importancia controlar la producción de calor generada por la fuente de luz en un cultivo. La definición de la temperatura óptima para el crecimiento de las cepas de microalgas es crucial, ya que las temperaturas inferiores y superiores pueden limitar el metabolismo del carbono, lo que se puede traducir en daño o pérdida de los centros de reacción del fotosistema II (Kurpan Nogueira *et al.*, 2015). Uno de los escenarios más comunes en los cultivos al exterior es la exposición de las células a altas intensidades de luz y bajas temperaturas (durante la noche y madrugada), estas condiciones térmicas disminuyen las tasas de fijación del CO<sub>2</sub>. Además, pueden inhibir la función antioxidante de los pigmentos accesorios, los cuales son capaces de captar las especies reactivas del oxígeno, protegiendo al fotosistema II de la fotooxidación (Vonshak *et al.*, 2001).

Se ha reportado que algunas especies de microalgas disminuyen su crecimiento cuando se exponen a temperaturas mayores que sus óptimos térmicos. Por lo regular la temperatura idónea para el crecimiento de una especie es aquella en la cual fue colectada, pero esto depende de otros factores ambientales. En un gran número de especies, se ha reportado que las temperaturas por debajo de los 16 °C disminuyen su crecimiento y por arriba de los 35°C resultan letales (Barsanti y Gualtieri, 2014).

## 1.2 El estrés ambiental en la producción de pigmentos carotenoides

El estrés fisiológico se define como un desbalance metabólico en el organismo, resultado de una condición ambiental específica (factores limitantes), que requiere ajustes bioquímicos y metabólicos para poder alcanzar un estado estable de crecimiento, por lo general diferente al que mostraba antes del evento ambiental. Estos factores limitantes determinan las tasas de crecimiento y metabólicas en los organismos y dependiendo de su magnitud, pueden inducir un ajuste fisiológico en la célula o, si se rebasa su capacidad de respuesta, pueden inducir su muerte (Vonshak y Torzillo, 2004).

La producción de metabolitos a partir de las microalgas, está íntimamente ligada a condiciones específicas de cultivo, como la disponibilidad de nutrientes, la intensidad de la luz, la temperatura y la salinidad, entre otros. Estos factores son utilizados en diferentes combinaciones con el fin de optimizar la productividad de cada metabolito (Hemaiswarya *et al.*, 2011).

La variación de la concentración en los nutrientes del medio, principalmente del nitrógeno y el fósforo; regulan la producción de productos de interés como lípidos, proteínas y pigmentos carotenoides, por lo tanto, resulta importante optimizar estas concentraciones para lograr el mejor rendimiento en especies de microalgas con interés biotecnológico (Mata *et al.*, 2010). Algunas especies de microalgas, tienden a acumular pigmentos carotenoides al exponerlas a ambientes limitados de nitrógeno, lo cual conlleva una disminución significativa del contenido de clorofila en la célula (Ben-Amotz *et al.*, 1982).

Los pigmentos carotenoides comprenden una diversa gama de compuestos orgánicos que pueden encontrarse en organismos unicelulares como las microalgas, bacterias, hongos y hasta organismos más complejos como peces y crustáceos. Los carotenoides pertenecen al grupo de los isoprenoides, se caracterizan por una estructura de 40 átomos de carbono y son producidos a partir de lípidos. Pueden acumularse y modificarse en los tejidos de peces o crustáceos, como resultado de la ingesta de los microorganismos que los producen (Sasso *et al.*, 2012; Schiedt, 1998). Las dobles ligaduras de su estructura química son responsables de la gran variedad de colores que se pueden encontrar y que determinan su capacidad de absorber la luz en una longitud de onda específica. Los pigmentos carotenoides que contienen en su estructura átomos de oxígeno se conocen como xantofilas, como la luteína o la zeaxantina. Aquellos que no contienen oxígeno son hidrocarburos puros y se les denomina carotenos (licopeno,  $\beta$ -caroteno) (Britton, 1998).

Los carotenoides que participan en el proceso de fotosíntesis se conocen como carotenoides primarios (como la luteína), todos los demás se clasifican como secundarios (astaxantina, violaxantina, cantaxantina) y son producidos por la célula cuando se encuentra en una condición de estrés. En el proceso de

fotosíntesis, los carotenoides primarios pueden tener varias funciones, una de ellas es la absorción de fotones en longitudes de onda diferentes a los que absorbe la clorofila, lo cual amplía el rango de captación de la luz, ya que la energía de estos fotones es transferida a las moléculas de clorofila, y consecuentemente a los centros de reacción de los fotosistemas (Goodwin, 1980).

Cuando las células microalgales se exponen a intensidades de luz altas o a radiación UV, el exceso de energía captado, genera una serie de reacciones que promueven la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), las cuales tienen la capacidad de oxidar los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos de la célula. En consecuencia, estos cambios celulares pueden alterar negativamente las actividades y estructuras de las células (Asada, 2006). Los carotenoides secundarios como la astaxantina, tienen la capacidad de funcionar como filtros fotoprotectores y como antioxidantes, lo cual previene la sobreacumulación de los radicales de oxígeno. Actualmente, la función de estos carotenoides no ha sido explicada del todo (Boussiba, 2000; Fromme *et al.*, 2006).

Las microalgas responden de manera específica a la intensidad de luz a la que son expuestas, por ejemplo, cuando la intensidad de la luz es alta, la concentración de los pigmentos involucrados en la fotosíntesis (como la clorofila *a* y carotenoides primarios) disminuye y los pigmentos accesorios o carotenoides secundarios como el  $\beta$ -caroteno y la astaxantina, que funcionan como agentes fotoprotectores, tienden a incrementar sus concentraciones en la célula (Hu, 2013). Los carotenoides secundarios regularmente se almacenan en estructuras especializadas, como cuerpos lipídicos en el citoplasma, e impiden que llegue una gran cantidad de energía lumínica a la maquinaria encargada de la fotosíntesis (Vetchel *et al.*, 1992).

La salinidad del medio es otro factor estresor que afecta la fisiología de las microalgas. El estrés osmótico puede inhibir los procesos de fotosíntesis en la célula, requeridos para la producción de energía, lo cual reduce su capacidad de crecimiento. Sin embargo, se ha observado que, en algunas cepas de microalgas, al incrementar la salinidad del medio se producen incrementos significativos en las concentraciones de carotenoides (Borowitzka y Borowitzka, 1988). En contraste, otros estudios han encontrado que las variaciones en la salinidad tienen un efecto muy limitado en los procesos de carotenogénesis (Cifuentes *et al.*, 2001). Es importante mencionar que, la conjunción de múltiples factores químicos y físicos puede generar efectos sinérgicos que se traducen en una mayor producción de pigmentos carotenoides, contrario al efecto que se tiene al poner a prueba solo un factor estresor en los procesos de inducción a la carotenogénesis en algunas especies de microalgas como *Dunaliella* sp. y *Haematococcus* sp. (Steinbrenner y Linden, 2001).

La temperatura es otro factor que modula y tiende a modificar la producción de algunos pigmentos fotosintéticos. En tres especies de microalgas (*Thalassiosira pseudonana*, *Phaeodactylum tricornutum*,

*Pavlova lutheri*), se ha observado que un incremento en la temperatura, por encima de los niveles óptimos de crecimiento, produce un aumento en el contenido de clorofila *a* (Thompson *et al.*, 1992); además, las temperaturas elevadas pueden inducir la formación de radicales activos de oxígeno en las células, lo que se traduce en un aumento en la producción de carotenoides, optimizando así las reacciones enzimáticas que promueven la carotenogénesis (Liu y Lee, 2000).

### **1.3 *Dunaliella* spp.**

El género *Dunaliella* fue definido en 1905, desde entonces se han descrito 28 especies en numerosos ambientes, desde marinos hasta aquellos en condiciones de hipersalinidad (Borowitzka y Siva, 2007). Entre estas especies destaca *Dunaliella salina*, por su capacidad de adaptación a condiciones extremas de temperatura y salinidad y por qué es una de las especies con mayor importancia a nivel comercial por su alto contenido de  $\beta$ -caroteno, que puede alcanzar hasta el 16% del peso seco celular (García-González *et al.*, 2003). Además, acumula en menores cantidades otro carotenoide de importancia comercial, la luteína (Borowitzka y Borowitzka, 1988). Debido a sus altos requerimientos de salinidad, es considerada una candidata idónea para su producción a escala comercial, ya que en estas condiciones de cultivo se reduce el número de competidores.

Las células de *Dunaliella* tienen una morfología que varía de ovoide a casi esférica, piriforme, elipsoide y cilíndrica; usualmente su forma es radialmente simétrica, pero bajo condiciones adversas puede presentar asimetría. Estas diferencias en la simetría de la célula están relacionadas con la concentración de sales en el medio y los procesos de osmorregulación, por los cuales la célula regula su concentración interna de solutos mediante la producción del glicerol (Ben-Amotz y Avron, 1983).

La célula tiene una longitud de 5 a 18  $\mu\text{m}$  y no tiene pared celular, sin embargo, en su fase estacionaria puede desarrollar una capa externa a la membrana plasmática, la cual es rica en polisacáridos. Posee un solo cloroplasto, donde también se almacenan los carotenoides, en forma de glóbulos lipídicos, lo que le confiere a la célula una coloración rojiza o anaranjada (Ben-Amotz *et al.*, 1982).

En las especies del género *Dunaliella* se han descrito dos tipos de reproducción: una asexual, la cual se lleva a cabo mediante división longitudinal de la célula motil y una sexual, en la cual, dos células motiles se fusionan para formar un cigoto. La reproducción sexual se ha observado cuando las concentraciones salinas son de 30 a 100 ups (Oren, 2005).

La producción a gran escala de *Dunaliella* se desarrolló en Ucrania en 1966, pero no fue hasta la década de los años 80 cuando inició la operación de las primeras plantas comerciales en Australia, Israel y Estados Unidos. A la fecha, su producción se lleva a cabo principalmente bajo dos esquemas, el sistema extensivo,

que consiste en la utilización de grandes estanques al aire libre (hectáreas); y el sistema intensivo, donde el cultivo se hace en tanques tipo “raceways” (Borowitzka y Hallegraeff, 2007).

Algunas especies de *Dunaliella* son una fuente natural importante de  $\beta$ -caroteno, por lo que son valoradas por la industria alimentaria, acuícola, cosméticas y farmacéutica, ya que es utilizado como colorante, antioxidante y, en otras aplicaciones, como en la prevención de enfermedades como el cáncer (Albanes *et al.*, 1996; Prieto *et al.*, 2011). Recientemente, también se cultiva por su capacidad de producir ácidos grasos y por su potencial para la producción de biocombustibles (Tang *et al.*, 2011).

El  $\beta$ -caroteno es uno de los carotenoides más comunes, es precursor de la vitamina A, está presente en numerosos organismos como plantas de hojas verdes, frutas, vegetales y algunas especies de microalgas. Este pigmento tiene un precio en el mercado de entre 300 a 3000 dólares estadounidenses por kg, dependiendo de la demanda, su fuente y disponibilidad. En 2010, el valor económico de la producción mundial de  $\beta$ -caroteno, tanto natural como sintético, ascendió a los 260 millones de dólares (BCC Research, 2010).

Las condiciones apropiadas para el crecimiento óptimo de *Dunaliella* contrastan con las necesarias para la producción y acumulación del  $\beta$ -caroteno. Se sabe que, bajo condiciones estresantes, la microalga puede acumular hasta el 16% de este compuesto con respecto a su peso seco orgánico total (García-González *et al.*, 2003), esta acumulación ocasiona que la célula adquiera una coloración entre rojiza y anaranjada (Oren, 2005).

La deficiencia de nutrientes mayores, como el nitrógeno y el fósforo, tienen un efecto secundario sobre la producción de pigmentos carotenoides (Ben-Amotz y Avron, 1983). Cuando *Dunaliella* se cultiva en condiciones de limitación de nitrógeno, la producción de  $\beta$ -caroteno se incrementa (Ben-Amotz *et al.*, 1982).

La radiación fotosintéticamente activa (PAR, por sus siglas en inglés) constante, suplementada con radiación ultra violeta, produce incrementos en el contenido de carotenoides en la microalga *Dunaliella bardawil*. Este aumento se atribuye a la alta intensidad de luz y a cambios en las reacciones bioquímicas del Fotosistema II (Jahnke, 1999). La calidad espectral de la luz también influye en la producción y acumulación de carotenoides; Sánchez-Saavedra *et al.* (1996), mencionan que, con el uso de lámparas fluorescentes de luz roja en cultivos de *D. bardawil*, la densidad celular y el contenido de carotenoides aumentó hasta un 10% con respecto a los cultivos irradiados con luz blanca; esto indica que la luz roja estimula el crecimiento, el volumen celular y el contenido de carotenoides totales.

Algunas cepas de *Dunaliella* tienen la capacidad de incrementar en forma significativa la concentración de carotenoides cuando se incrementa la salinidad (Borowitzka *et al.*, 1984; Cifuentes *et al.*, 2001). Las microalgas *Dunaliella salina* y *Dunaliella bardawil* produjeron la mayor cantidad de carotenoides a una salinidad 2 M (116 ups) (Gómez-Pinchetti *et al.*, 1992); igualmente Marín *et al.* (1998) encontró que a una salinidad 3.6 M (208 ups), se incrementó la producción de pigmentos carotenoides en *D. salina*, pero no hubo un incremento de clorofila *a*.

En algunas especies de *Dunaliella*, la disminución de la temperatura del cultivo de 34 a 17 °C, produjo un incremento de 7.5 veces los niveles de  $\beta$ -caroteno (Orset y Young, 1999). En contraste, Tjahjono *et al.* (1994), encontró que temperaturas altas pueden inducir la formación de radicales activos de oxígeno en las células y conducir a procesos de estrés oxidativo, lo que estimula la carotenogénesis.

## 1.4 Justificación

Las especies del género *Dunaliella* son una de las principales fuentes naturales de  $\beta$ -caroteno, ya que cuentan con una capacidad significativa para la producción y acumulación de este compuesto, lo que representa una ventaja con respecto a las fuentes vegetales. Además, su producción no compite por áreas que pueden ser utilizadas para la agricultura y tiene un corto período de crecimiento y cultivo. Resulta imprescindible la identificación y caracterización de la microalga utilizada en este estudio, con el objetivo de poder evaluar y comparar su productividad con respecto a otras especies y cepas de *Dunaliella* que son utilizadas actualmente para la producción comercial de carotenoides y otros compuestos. Los resultados preliminares de crecimiento celular obtenidos con *Dunaliella* sp. objeto de este estudio, son superiores a los descritos para algunas cepas de *Dunaliella salina*, por lo que resulta importante evaluar su capacidad de producción de biomasa y de pigmentos carotenoides.

## 1.5 Hipótesis

- La exposición de *Dunaliella* sp. a condiciones de luz de 100 a 200  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  aumentará la concentración celular en los cultivos comparado con intensidades de luz altas (1300 a 1600  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ).
- La utilización del medio Johnson para el cultivo de *Dunaliella* sp. aumentará la concentración celular en los cultivos comparado con el medio "f" de Guillard.

- La exposición de *Dunaliella* sp. a condiciones ambientales extremas (intensidad de luz de 1300 a 1600  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , salinidad de 200 a 300 ups y limitación de nitrógeno) incrementará la producción de pigmentos carotenoides.

## 1.6 Objetivos

### 1.6.1 Objetivo general

Evaluar diferentes condiciones de intensidad de luz, salinidad y nutrientes para inducir el mayor crecimiento y la mayor producción de carotenoides en la microalga *Dunaliella* sp.

### 1.6.2 Objetivos específicos

- Evaluar diferentes condiciones de luz y nutrientes en el cultivo de *Dunaliella* sp. para optimizar su crecimiento.
  - Evaluar el efecto de la exposición de *Dunaliella* sp. a altas intensidades de luz, salinidad y limitación del nitrógeno para la producción de pigmentos carotenoides.
  - Evaluar la producción de biomasa en los cultivos de *Dunaliella* sp. con base en el número de células y concentración de pigmentos carotenoides.
-

## Capítulo 2. Metodología

---

### 2.1 Colecta y aislamiento de la cepa de *Dunaliella* sp.

La microalga utilizada para este trabajo se colectó en Playa Las Glorias en el municipio de Guasave, Sinaloa, México, en las coordenadas 25° 17' 42" N y -108° 30' 54" W. Los granos de sal se trasladaron al Laboratorio de Microalgas en el Departamento de Acuicultura de CICESE, donde se aisló y se determinó la viabilidad de las células al colocarlas en un medio nutritivo; el cultivo se aclimató a una salinidad de 35 ups con base en el procedimiento de Prado-Brambila (2015).

### 2.2 Identificación genética de la cepa de *Dunaliella*

La identificación de la microalga se llevó a cabo en el laboratorio de Microbiología Molecular del Departamento de Biotecnología Marina en las instalaciones de CICESE, se utilizó la técnica de extracción de ADN por fenol-cloroformo (Ausubel *et al.*, 1992). Se utilizaron oligonucleótidos diseñados en ese laboratorio (Olmos *et al.*, 2000) para la amplificación por PCR de la secuencia 18S ribosomal.

### 2.3 Producción inicial de biomasa de *Dunaliella* sp.

Se realizaron cultivos en matraces Erlenmeyer de 500 mL con un volumen efectivo de 400 mL por duplicado, se utilizaron lámparas fluorescentes (6500 kelvin, 65 watts) con luz continua a  $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , salinidad de 35 ups y una temperatura de 19 °C. Se utilizó medio de cultivo f/2 (Guillard, 1975) preparado con agua de mar sintética Coralife Scientific Grade, libre de nitratos y fosfatos; antes de agregar los nutrientes, el agua fue esterilizada en autoclave. Los cultivos se llevaron a la fase final del crecimiento exponencial hasta obtener la biomasa necesaria, que sirvió como inóculo para los experimentos que se desarrollaron en este trabajo. El nivel de iluminación (iluminancia) se midió con un luxómetro Fisher Scientific, para calcular la intensidad de luz (irradiancia) se utilizó un factor de conversión donde 1 lux corresponde a  $0.014 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (Langhans y Tibbitts, 1997).

### 2.4 Optimización del crecimiento de *Dunaliella* sp.

#### 2.4.1 Evaluación de medios de cultivo.

Para la evaluación del crecimiento, se utilizaron dos medios de cultivo, medio "f" de Guillard y medio Johnson. Para el medio "f" se probaron dos concentraciones: "f" y el mismo medio a la mitad de su concentración ("f/2"). El medio Johnson se preparó utilizando agua de mar sintética para un tratamiento



y agua destilada para el otro, a esta última, se le añadió cloruro de sodio hasta alcanzar 35 ups de salinidad. Las concentraciones de nitratos y fosfatos de cada medio se presentan en la Tabla 1. Los cultivos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 200 mL por triplicado con un volumen efectivo de 150 mL, iniciando con un inóculo de  $2.5 \times 10^5$  cél mL<sup>-1</sup>, se mantuvieron a una temperatura de  $20.5 \pm 0.5$  °C dentro del Laboratorio Húmedo del Departamento de Acuicultura en CICESE; el pH osciló entre 9.2 y 9.8 a lo largo del experimento. Los cultivos estuvieron expuestos a una intensidad de luz de  $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

**Tabla 1.** Concentraciones de nitratos y fosfatos del medio f/2 y Johnson, expresados en molaridad (mM).

Compuesto	f/2	Johnson
NO <sub>3</sub>	1.2	16.12
PO <sub>4</sub>	0.05	0.36

Se evaluó la densidad del cultivo mediante recuentos celulares, recolectando una muestra cada 24 horas y analizándola en un hematocitómetro (cámara de Neubauer), utilizando un microscopio compuesto Primo Star, Carl Zeiss. Para evaluar la densidad celular se utilizó la siguiente fórmula:

$$C = N * 10^4 * \text{dil} \quad (1)$$

En donde:

C = densidad celular (cél mL<sup>-1</sup>)

N = promedio de células en cuatro cuadrantes

Dil = factor de dilución

$10^4$  = factor de conversión de 0.1  $\mu\text{L}$  a 1 mL

A partir de los conteos celulares, se calculó la tasa de crecimiento específica para cada tratamiento utilizando la siguiente fórmula:

$$\mu = \log_2(x_2) - \log(x_1) / (t_2 - t_1) \quad (2)$$

donde:

$\mu$  = tasa de crecimiento

$x_2, x_1$  = biomasa en tiempo 2 y tiempo 1

$t_1, t_2$  = tiempo 1 y tiempo 2

#### **2.4.2 Evaluación de la intensidad de la luz.**

Para evaluar el efecto de la luz sobre el crecimiento de la microalga se realizaron cultivos en placas de 24 pocillos con 2.5 mL de cultivo. Se utilizaron ocho intensidades de luz: 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1300 y 1600  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Se utilizaron lámparas fluorescentes Sanlight® de 6500 kelvin, 65 watts y un flujo luminoso de 3900 lumens. Las lámparas se colocaron dentro de una campana metálica con la finalidad de concentrar y focalizar la luz en cada tratamiento. Para alcanzar cada una de las intensidades de luz, las lámparas fueron colocadas a distancias diferentes del punto focal. La biomasa utilizada en este experimento se centrifugó en un equipo Thermo Fisher Scientific modelo Heraeus Megafuge 16R a 2000 rpm y se resuspendió en un volumen conocido de agua de mar sintética enriquecida con medio de cultivo f/2 de Guillard y a una concentración salina de 35 ups. La concentración celular inicial fue de  $1 \times 10^6$  cél  $\text{mL}^{-1}$ . La temperatura se midió diariamente con termómetros Sper Scientific y se mantuvo controlada a  $24.6 \pm 1.1$  °C, por medio de ventiladores eléctricos colocados en los extremos del sistema de cultivo. El pH se midió los días 3, 6 y 8 de cultivo y osciló entre 8 y 9. El volumen evaporado de los cultivos se completó añadiendo agua destilada para no alterar la concentración celular en los conteos. Se realizaron conteos celulares diarios y se calcularon las tasas de crecimiento específico para cada tratamiento siguiendo los procedimientos descritos anteriormente.

#### **2.4.3 Efecto interactivo de la limitación del nitrógeno y exposición a dos concentraciones de salinidad durante un periodo de 12 días.**

Para evaluar el efecto interactivo de la concentración de nitrógeno y la salinidad sobre el crecimiento y la producción de pigmentos carotenoides de *Dunaliella* sp., se evaluaron tres porcentajes de nitrógeno, tomando como base el medio "f/2": 25, 50 y 100%; lo que corresponde a 217, 435 y 882  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{NaNO}_3$ . Las dos salinidades fueron 35 y 100 ups (Tabla 2) y se combinaron con tres niveles del nitrógeno. Las microalgas se inocularon en la fase de máximo crecimiento exponencial (previamente aclimatadas a la salinidad) a una concentración de  $3 \times 10^5$  cél  $\text{mL}^{-1}$ , en matraces Erlenmeyer de 125 mL con un volumen efectivo de cultivo de 100 mL y se mantuvieron a una temperatura de 25 °C dentro de una cámara climática Shel Lab. Se utilizaron tres réplicas por cada tratamiento experimental. Los cultivos se expusieron a una irradiancia de  $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  con lámparas fluorescentes y un fotoperiodo 12:12 por un lapso de 12 días. Se realizaron recuentos celulares los días 0, 4, 8 y 12 del experimento. Para evaluar la producción de

carotenoides a lo largo del tiempo se tomó una alícuota de 1.9 mL de cultivo los días 0, 4, 8 y 12. Estas muestras fueron centrifugadas a 10,000 rpm durante 15 minutos, se desechó el sobrenadante y el paquete celular se almacenó a -80 °C para su posterior análisis en HPLC.

**Tabla 2.** Diseño experimental utilizado para evaluar el efecto combinado de tres concentraciones del nitrato de sodio y dos diferentes salinidades para la inducción de *Dunaliella* sp. a la carotenogénesis. 18 unidades experimentales en total.

		Salinidad (ups)	
		35	100
	NaNO <sub>3</sub> (μmol L <sup>-1</sup> )	A	B
1	217	1A	1B
2	435	2A	2B
3	882	3A	3B

## 2.5 Inducción a la carotenogénesis de *Dunaliella* sp.

### 2.5.1 Estrés salino agudo y crónico

Para la inducción a la carotenogénesis se expuso a la microalga a dos condiciones de estrés salino: agudo y crónico. Para el estrés agudo, una muestra de microalgas, que se encontraban en 35 ups, se traspasaron a las respectivas salinidades de 100, 200 y 300 ups sin pasar por un proceso de aclimatación previo. Para el estrés crónico, las microalgas fueron aclimatadas en forma gradual a tres salinidades experimentales: 100, 200 y 300 ups. Para la aclimatación se utilizó la biomasa producida de acuerdo a las condiciones descritas en el apartado 2.3, esta biomasa se centrifugó y resuspendió en agua de mar sintética a 35 ups en matraces de 125 mL. Para alcanzar las salinidades de 100, 200 y 300 ups, se añadió agua de mar sintética con una concentración salina de 300 ups (solución concentrada), en un volumen necesario para aumentar la salinidad en 25 ups cada dos horas, hasta alcanzar las salinidades requeridas. Las concentraciones de salinidad fueron verificadas utilizando un osmómetro de la marca Wescor, modelo Vapro.

### 2.5.2 Efecto interactivo de la intensidad de luz y exposición aguda a la salinidad.

Con la finalidad de observar la respuesta de las células a un cambio repentino de salinidad, se inocularon tres matraces con la biomasa producida de *Dunaliella* sp., con una concentración inicial de  $4.5 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup>, y a las concentraciones salinas de 100, 200 y 300 ups, en agua de mar sintética libre de nutrientes.

No se realizaron análisis exploratorios de este experimento de inducción, debido a la lisis celular observada en los primeros 30 minutos posteriores a la inoculación.

### **2.5.3 Efecto interactivo de la intensidad de luz, ausencia de nutrientes y exposición crónica a la salinidad.**

Para este experimento se aclimataron paulatinamente las células de *Dunaliella* sp. a cada una de las salinidades experimentales; los cultivos para este experimento partieron de un cultivo con una concentración de  $4.5 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup>, se inició con una concentración salina de 35 ups y se aumentó paulatinamente (25 ups cada 2 horas), añadiendo un volumen de agua de mar sintética, concentrada a 300 ups y libre en su totalidad de nutrientes (Sadka *et al.*, 1989), hasta llegar a las concentraciones finales de 100, 200 y 300 ups.

Una vez que las células se encontraron en las concentraciones previstas, se colocaron alícuotas en placas de 24 pocillos con un volumen de 2.5 mL, por triplicado por tratamiento. Cabe destacar que, debido al período de aclimatación, se originó pérdida de la biomasa en algunas salinidades; por lo que los cultivos no iniciaron con la misma concentración celular. Las concentraciones celulares iniciales fueron de  $5.2 \times 10^6$ ,  $4.7 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$  y  $2.5 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup> para las salinidades de 35, 100, 200 y 300 ups, respectivamente.

En combinación con la salinidad, se evaluaron ocho intensidades de luz: 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1300 y 1600  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , en el arreglo que se presenta en la Tabla 3. Este experimento tuvo una duración de 11 días y se cuantificó la densidad celular mediante el conteo celular de cada una de las unidades experimentales. La temperatura se monitoreo diariamente y se mantuvo en  $25.9 \pm 0.6$  °C. El pH estuvo entre 8 y 9 a lo largo del experimento y se midió con tiras indicadoras Fermont.

Al concluir el experimento (día 11), se tomaron alícuotas de cada tratamiento (en las tres réplicas) y fueron almacenadas en tubos Eppendorf de 1.5 mL (para su posterior análisis en HPLC); en un ultracongelador marca Thermo Scientific, modelo Revco ExF a -80 °C en el laboratorio de Ecofisiología del Departamento de Acuicultura.

**Tabla 3.** Diseño experimental utilizado para evaluar el efecto combinado de ocho intensidades de luz y cuatro salinidades para la inducción a la carotenogénesis de *Dunaliella* sp., cultivada en un medio sin nutrientes. En cada tratamiento se utilizaron tres repeticiones, con un total de 96 unidades experimentales.

		Salinidad (ups)			
		35	100	200	300
	Intensidad de luz ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	A	B	C	D
1	100	1A	1B	1C	1D
2	200	2A	2B	2C	2D
3	400	3A	3B	3C	3D
4	600	4A	4B	4C	4D
5	800	5A	5B	5C	5D
6	1000	6A	6B	6C	6D
7	1300	7A	7B	7C	7D
8	1600	8A	8B	8C	8D

Para cuantificar el efecto de los tratamientos sobre la morfología celular, se tomaron fotografías de 30 células previamente fijadas en lugol para cada uno de los tratamientos y las imágenes obtenidas fueron analizadas en un microscopio Leica con una ampliación de 100x; se utilizó el paquete Leica Application Suite v.4.3.0 para medir el diámetro y la altura de las células. Con los datos obtenidos, se calculó el volumen celular, considerando la forma de la célula como un esferoide (Figura 1) y utilizando la ecuación de Hillebrand *et al.* (1999):

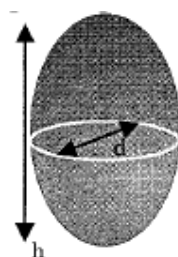
$$V = \frac{\pi}{6} \times d^2 \times h \quad (3)$$

donde:

V = volumen celular en  $\mu\text{m}^3$

d = diámetro de la célula en  $\mu\text{m}$

h = altura de la célula medida en  $\mu\text{m}$



**Figura 1.** Representación gráfica de la forma esferoide de una célula de *Dunaliella* sp. Se indican el diámetro (d) y altura (h). Tomado de Hillebrand *et al.* (1999).

#### **2.5.4 Efecto interactivo de la intensidad de luz, ausencia de nitrógeno y exposición crónica a la salinidad.**

En este experimento se emularon las condiciones de aclimatación del experimento anterior, las microalgas fueron centrifugadas y resuspendidas en medio “f/2”, pero sin la adición de nitrógeno. A partir de la gran mortalidad celular observada de los experimentos anteriores, se decidió eliminar del diseño experimental el nivel de 300 ups (Tabla 4).

Como se mencionó anteriormente en otro experimento, una vez que las células se encontraron en las concentraciones previstas, se colocaron alícuotas en placas de 24 pocillos con un volumen de 2.5 mL, por cuadruplicado, por tratamiento, sin embargo, debido al período de aclimatación, hubo pérdida de la biomasa en algunas salinidades, por lo que los cultivos no iniciaron con la misma concentración celular. Las concentraciones celulares iniciales fueron de  $4.5 \times 10^6$ ,  $4 \times 10^6$  y  $2.8 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup> para las salinidades de 35, 100 y 200 ups, respectivamente.

Al igual que en el bioensayo anterior, se calculó el volumen de 30 células de cada tratamiento. La temperatura se monitoreó a lo largo del experimento y se mantuvo en  $24.5 \pm 1.3$  °C, el pH osciló entre 7 y 8. Este experimento tuvo una duración de 11 días. Se recolectaron alícuotas de cada tratamiento (con tres réplicas cada uno) al final del experimento, se transfirieron a tubos eppendorff y fueron almacenadas a -80 °C para su posterior análisis.

**Tabla 4.** Diseño experimental utilizado para evaluar el efecto combinado de ocho intensidades de luz y tres salinidades, para la inducción a la carotenogénesis de *Dunaliella* sp. cultivada en un medio sin nitrógeno. Cada tratamiento fue probado con tres repeticiones, con un total de 72 unidades experimentales.

		Salinidad (ups)		
		35	100	200
	Intensidad de luz ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	A	B	C
1	100	1A	1B	1C
2	200	2A	2B	2C
3	400	3A	3B	3C
4	600	4A	4B	4C
5	800	5A	5B	5C
6	1000	6A	6B	6C
7	1300	7A	7B	7C
8	1600	8A	8B	8C

## 2.6 Análisis de pigmentos en *Dunaliella* sp.

Para la extracción de pigmentos, las muestras de microalgas de los diferentes cultivos experimentales se centrifugaron a 10,000 rpm por 15 minutos, en una centrífuga refrigerada (marca Thermo Scientific Heraeus, Megafuge 16R), se decantó el sobrenadante y se agregó metanol al 100%, inmediatamente se aplicó agitación con vortex y la mezcla se almacenó en oscuridad por 1 hora a 4 °C. A continuación, las muestras fueron sonicadas por 5 minutos y después se centrifugaron, se recuperó el sobrenadante en un tubo de 15 mL y a éste se le agregó acetato de amonio 1M (Vidussi *et al.*, 1996) en una proporción 1:2 (acetato de amonio:muestra en metanol) para ser analizado en HPLC.

Para la identificación y cuantificación de los pigmentos por HPLC, se utilizó el método de gradiente de Vidussi *et al.* (1996) (Tabla 5). Se inyectaron 20  $\mu\text{L}$  de cada muestra en el cromatógrafo Agilent Technologies®, modelo 1260 INFINITY, equipado con una columna Zorbax C8 de 4.36 x 150 mm y tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$ . Para la detección de los pigmentos se utilizaron dos longitudes de onda: 436 para cuantificar la clorofila *a* y 450 para los pigmentos carotenoides. El tiempo de elución fue de 20 minutos con un flujo de 1  $\text{mL min}^{-1}$  de eluyente. Se utilizaron los siguientes eluyentes: (A) 100% metanol grado HPLC y (B) 100% metanol-acetato de amonio 0.5M (70/30 v/v).

**Tabla 5.** Condiciones de operación del HPLC, método de Vidussi *et al.* (1996)

<b>Gradiente</b>	<b>Solución A</b>	<b>Solución B</b>
<i>Minuto 0</i>	75%	25%
<i>Minuto 1</i>	50%	50%
<i>Minuto 15</i>	0%	100%
<i>Minuto 18.5</i>	0%	100%
<i>Minuto 19</i>	75%	25%

Para la cuantificación de los pigmentos se utilizaron curvas de calibración de los estándares comerciales de astaxantina, luteína, cantaxantina, clorofila *a* y  $\beta$ -caroteno (DHI-Dinamarca). Para calcular la concentración del pigmento en  $\text{pg c\acute{e}l}^{-1}$  se utilizó la fórmula de Hooker y Heukelem (2011):

$$C_p = \frac{v_x}{N_c} \times \frac{C_i}{v_c}$$

donde:

$C_p$  = concentración del pigmento ( $\text{pg c\acute{e}l}^{-1}$ )

$v_x$  = volumen de metanol para extracción ( $\mu\text{L}$ )

$N_c$  = número de células en la muestra

$C_i$  = cantidad de pigmento inyectado (ng)

$v_c$  = volumen inyectado en HPLC ( $\mu\text{L}$ )

## 2.7 Análisis estadístico

En todos los experimentos de este trabajo se utilizó un diseño completamente aleatorizado. Se aplicó la prueba de normalidad Shapiro-Wilks y para la homogeneidad de varianzas, la prueba de Levene.

Para la comparación del crecimiento de *Dunaliella sp.*, en el experimento con diferentes medios nutritivos de cultivo y para el experimento con ocho intensidades de luz, se utilizó un ANOVA de una vía con un nivel de significancia de 0.05. En este último experimento se utilizó un análisis de correlación de Pearson para demostrar la relación que existe entre la intensidad de luz y la concentración celular. Para el bioensayo de



limitación de nitrógeno con dos concentraciones de salinidad se utilizó un ANOVA de dos vías. En los casos donde se encontraron diferencias significativas se aplicó una prueba *a posteriori* de Fisher LSD.

En los resultados del volumen celular y de inducción a la carotenogénesis se utilizaron pruebas ANOVA de dos vías con un nivel de significancia de 0.05. En los casos donde se encontraron diferencias significativas se realizó una prueba *a posteriori* de Fisher LSD. En donde no se encontró normalidad u homogeneidad de varianzas, los datos fueron transformados con la función  $\log_{10}$ . Si los datos transformados no presentaban normalidad, se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Para evaluar la relación de la salinidad y el volumen celular de *Dunaliella* sp. se utilizaron análisis de correlación de Pearson con un nivel de significancia de 0.05.

Todos los análisis estadísticos se realizaron con los programas STATISTICA 10 y SigmaPlot 12.

## Capítulo 3. Resultados

### 3.1 Identificación genética de la especie de *Dunaliella*

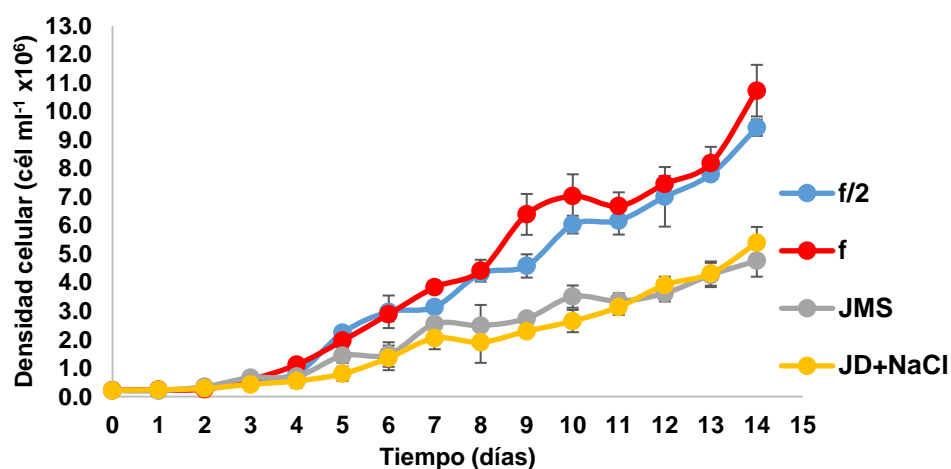
De acuerdo al análisis genético, se llegó a la conclusión de que la microalga pertenece al género *Dunaliella*, sin embargo, los oligonucleótidos no amplificaron para las especies *D. parva*, *D. salina* ni *D. bardawil*, por lo que no fue posible identificar a la especie del presente trabajo, por lo anterior se seguirá reportando como *Dunaliella* sp.

### 3.2 Evaluación de crecimiento de *Dunaliella* sp.

#### 3.2.1 Evaluación de medios de cultivo para la producción de biomasa.

Los resultados del crecimiento de *Dunaliella* sp. en los medios de cultivo "f" de Guillard y Johnson, a  $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y  $20^\circ\text{C}$ , se muestran en la Figura 2 y en la Tabla 6. El crecimiento fue lento en todos los cultivos hasta el día tres, a partir de este día comienza la fase de crecimiento exponencial y para el día cinco, se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el crecimiento con los dos medios (Figura 2). La densidad celular fue superior con los medios "f" y "f/2" ( $1.95 \times 10^6$  cél  $\text{mL}^{-1}$ ), en contraste, con el medio Johnson preparado a partir de agua sintética donde la densidad celular fue de  $1.43 \times 10^6$  cél  $\text{mL}^{-1}$ .

Para el día 14, las microalgas cultivadas con el medio "f" y "f/2", alcanzaron sus concentraciones máximas, de  $10.7 \times 10^6$  y  $9.4 \times 10^6$  cél  $\text{mL}^{-1}$ , respectivamente, las cuales fueron mayores ( $p < 0.05$ ) a las obtenidas con las microalgas cultivadas con el medio Johnson, las cuales fueron de  $4.7 \times 10^6$  cél  $\text{mL}^{-1}$  para el medio formulado con sales sintéticas y  $5.3 \times 10^6$  cél  $\text{mL}^{-1}$  para la formulación con NaCl.



**Figura 2.** Crecimiento de *Dunaliella* sp. con el medio "f" y "f/2" de Guillard y con dos variantes del medio Johnson, uno preparado con agua de mar sintética (JMS) y otro con agua destilada (JD+NaCl). Las barras indican el error estándar.

La máxima tasa de crecimiento ( $\mu$ ) con el medio "f/2" se presentó el día 5 con una  $\mu$  de 1.47 div día<sup>-1</sup> (Tabla 6). Con el medio f, la máxima tasa de crecimiento se presentó el día 3, con un valor de 1.05 div día<sup>-1</sup> y en los días siguientes hubo una disminución en la tasa de crecimiento. Para el medio Johnson, la máxima tasa de crecimiento se presentó el día 5 (1.21 div día<sup>-1</sup>) con el medio preparado con sales sintéticas y el día 6 (0.83 div día<sup>-1</sup>) para el preparado con agua destilada y NaCl. Cabe destacar, que aparentemente ninguno de los tratamientos de este experimento alcanzó la fase estacionaria en las curvas de crecimiento.

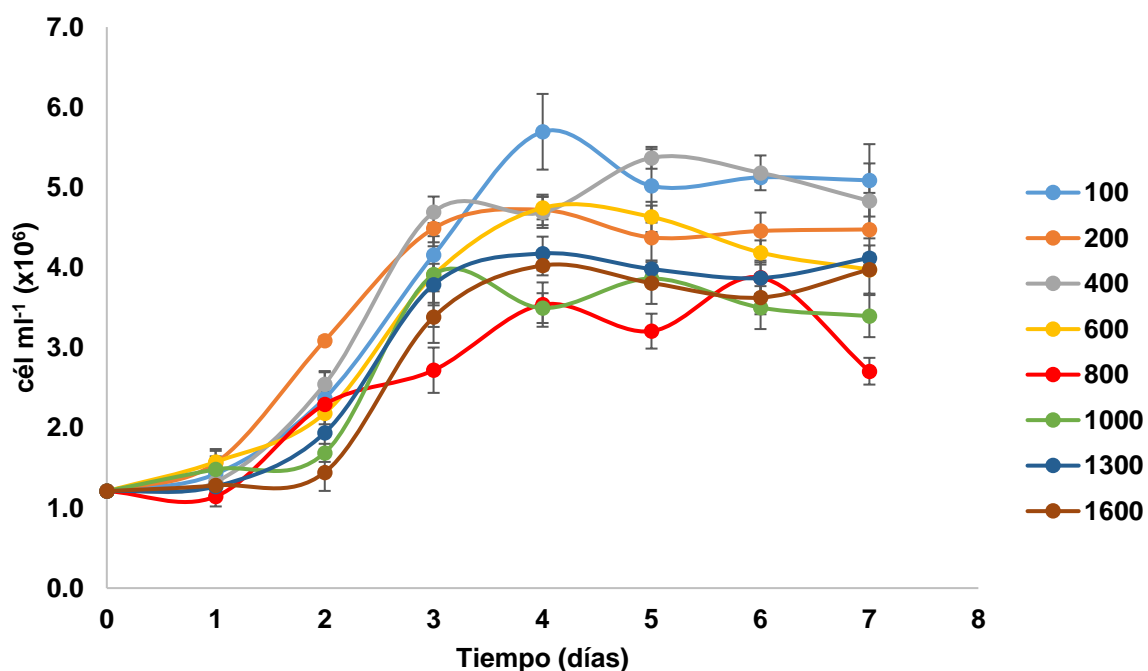
**Tabla 6.** Tasas de crecimiento ( $\mu$ ) de *Dunaliella* sp. cultivada con los medios de cultivo de Guillard ("f" y "f/2") y Johnson (con agua de mar sintética (JMS) y con agua destilada (JD+NaCl). Los números en paréntesis muestran el error estándar.

Día	$\mu$ (div día <sup>-1</sup> )			
	f/2	f	JMS	JD+NaCl
1	-0.06	0.11	-0.01	0.14
	(0.07)	(0.04)	(0.29)	(0.05)
2	0.50	0.65	0.69	0.26
	(0.17)	(0.05)	(0.31)	(0.18)
3	1.06	1.05	0.93	0.59
	(0.16)	(0.12)	(0.21)	(0.10)
4	0.41	0.86	-0.11	0.36
	(0.06)	(0.20)	(0.53)	(0.19)
5	1.47	0.69	1.21	0.47
	(0.09)	(0.30)	(0.52)	(0.24)
6	0.36	0.49	-0.03	0.83
	(0.25)	(0.20)	(0.15)	(0.50)
7	0.13	0.31	0.87	0.59
	(0.32)	(0.19)	(0.25)	(0.25)
8	0.46	0.36	-0.13	-0.10
	(0.04)	(0.05)	(0.32)	(0.29)
9	0.08	0.33	0.26	0.25
	(0.10)	(0.06)	(0.36)	(0.20)
10	0.40	0.04	0.34	0.17
	(0.19)	(0.32)	(0.12)	(0.21)
11	0.03	0.05	-0.06	0.23
	(0.11)	(0.10)	(0.28)	(0.07)
12	0.16	0.15	0.12	0.38
	(0.12)	(0.14)	(0.10)	(0.29)
13	0.18	0.26	0.23	0.14
	(0.20)	(0.08)	(0.26)	(0.19)
14	0.27	0.39	0.15	0.34
	(0.06)	(0.10)	(0.07)	(0.08)

### 3.2.2 Evaluación de ocho intensidades de luz para la producción de biomasa.

La máxima concentración celular se obtuvo al día cuatro con el tratamiento de  $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , con una densidad de  $5.6 \times 10^6 \text{ cél mL}^{-1}$  (Figura 3), en contraste, con los tratamientos de  $800$  y  $1000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  se obtuvieron las menores densidades ( $p < 0.05$ ), con  $3.5$  y  $3.4 \times 10^6 \text{ cél mL}^{-1}$ , respectivamente. Para el día tres, la mayoría de los tratamientos alcanzaron su máximo crecimiento exponencial, excepto el tratamiento de  $400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , que lo alcanzó el día cinco de cultivo con  $5.3 \times 10^6 \text{ cél mL}^{-1}$ . Para el día uno de cultivo no se encontraron diferencias significativas entre las densidades de los distintos tratamientos ( $p > 0.05$ ).

A los dos y tres días de cultivo se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ), y se observó una segmentación en dos grupos, entre los tratamientos de  $100$  a  $600 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y los de  $800$  a  $1600 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Al aplicar un análisis de correlación entre la intensidad de luz y la densidad celular se observó que existe una correlación negativa ( $p = -0.40$ ) entre las dos variables, por lo tanto, intensidades de luz altas dan como resultado concentraciones celulares menores. Como se aprecia en la Figura 3, la mayoría de los cultivos llegaron a su fase estacionaria el día cuatro de cultivo. No obstante, solo el tratamiento de  $800 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  alcanzó la fase de muerte celular en el tiempo que duró el experimento (7 días).



**Figura 3.** Crecimiento de *Dunaliella* sp. expuesta a ocho intensidades de luz ( $100$  a  $1600 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), a una temperatura de  $25^\circ\text{C}$  y salinidad de  $35$  ups. Las barras indican el error estándar.

La máxima tasa de crecimiento, para las intensidades de luz de  $100$  a  $800 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  se observó entre los días dos y tres de cultivo (entre  $0.85$  y  $1.03 \text{ div día}^{-1}$ ). En las intensidades de luz altas, la máxima tasa se

observó al día tres de crecimiento, siendo en la intensidad de  $1600 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  donde se observó el valor mayor,  $1.26 \text{ div día}^{-1}$ . En algunos tratamientos experimentales (100, 600, 1300 y  $1600 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) se observó un aumento gradual de la tasa de crecimiento a medida que transcurrió el cultivo (Tabla 7) y a partir del día 4 en todos los tratamientos se observó una disminución en la tasa de crecimiento.

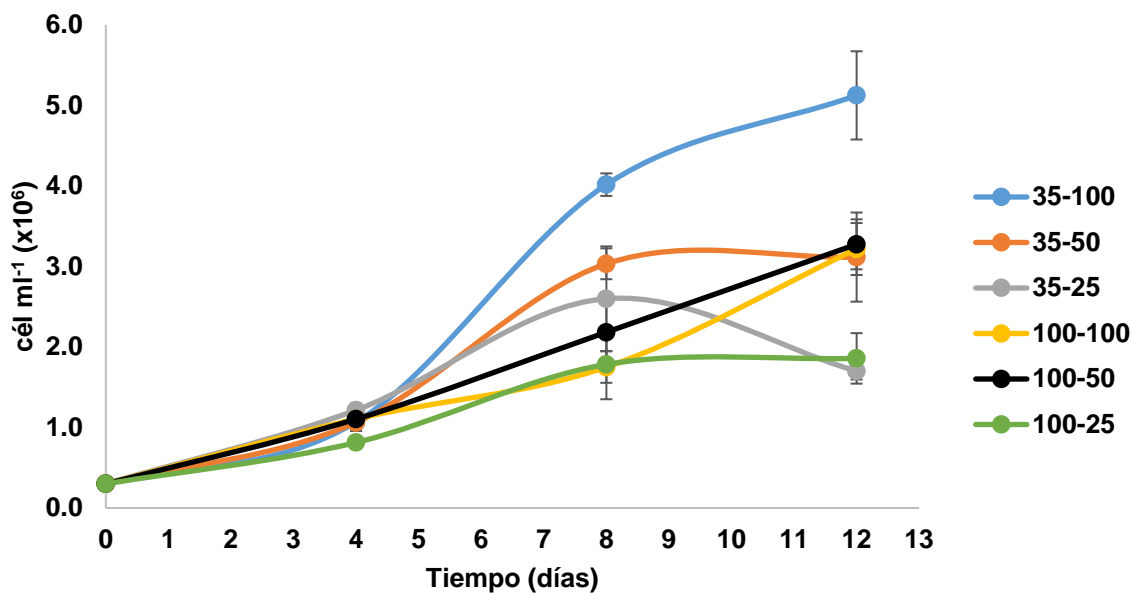
**Tabla 7.** Tasas de crecimiento ( $\mu$ ) de *Dunaliella* sp. cultivada con diferentes intensidades de luz (100 a  $1600 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). Los números en paréntesis muestran el error estándar.

Día $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	$\mu$ (div día <sup>-1</sup> )							
	100	200	400	600	800	1000	1300	1600
1	0.18 (0.24)	0.34 (0.17)	0.12 (0.08)	0.36 (0.13)	-0.11 (0.18)	0.28 (0.11)	0.06 (0.08)	0.08 (0.08)
2	0.75 (0.05)	1.01 (0.17)	0.94 (0.14)	0.45 (0.22)	1.03 (0.11)	0.19 (0.1)	0.59 (0.21)	0.13 (0.26)
3	0.85 (0.22)	0.54 (0.08)	0.89 (0.08)	0.80 (0.39)	0.23 (0.11)	1.21 (0.08)	0.98 (0.16)	1.26 (0.13)

### 3.2.3 Efecto interactivo de la limitación de nitrógeno y exposición a dos concentraciones de salinidad.

La inducción a la carotenogénesis de *Dunaliella* sp. con tres diferentes porcentajes del contenido de la fuente de nitrógeno en el medio "f/2", en combinación con dos concentraciones de salinidad y una irradiancia de  $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , indicó una máxima concentración celular de  $5.1 \times 10^6 \text{ cél mL}^{-1}$  al día 12 con el tratamiento de 35 ups y 100% de la fuente de nitrógeno (Figura 4); los tratamientos con 25% nitrógeno y 35 y 100 ups, produjeron las menores densidades, con  $1.7$  y  $1.9 \times 10^6 \text{ cél mL}^{-1}$ , respectivamente. El día 12 de cultivo (último día), la mayoría de los tratamientos alcanzaron su máxima concentración celular, excepto el tratamiento de 35 ups y 25% de nitrógeno, que lo alcanzó el día ocho de cultivo con  $2.6 \times 10^6 \text{ cél mL}^{-1}$ . No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ) el día cuatro de cultivo entre los tratamientos, lo que indica que no hubo un efecto de la salinidad ni de la concentración de nitrógeno en el crecimiento para este día. El día ocho se observó un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) de la salinidad en el crecimiento de *Dunaliella* sp. Las microalgas cultivadas a 35 ups crecieron más que las cultivadas a 100 ups, no obstante, en este primer grupo (35 ups), el crecimiento también fue afectado por la disponibilidad de nitrógeno en una relación directa. Para el día uno se observa un marcado efecto de la disponibilidad de nitrógeno ( $p < 0.001$ ) y de su interacción con la salinidad ( $p < 0.05$ ), solamente en el tratamiento de 35 ups y

25% nitrógeno se observó la fase de muerte celular en el tiempo que duró el experimento, al día 12 su concentración resultó similar a la del tratamiento de 100 ups y 25% de nitrógeno.



**Figura 4.** Crecimiento de *Dunaliella* sp. expuesta a dos concentraciones de salinidad (35 y 100 ups), un medio de cultivo (f/2) con tres niveles de nitrógeno (100, 50 y 25%), y a una temperatura de 25°C. Las barras indican el error estándar. Los porcentajes de 100, 50 y 25% de nitrógeno equivalen a una concentración de 217, 435 y 882  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{NaNO}_3$ , respectivamente.

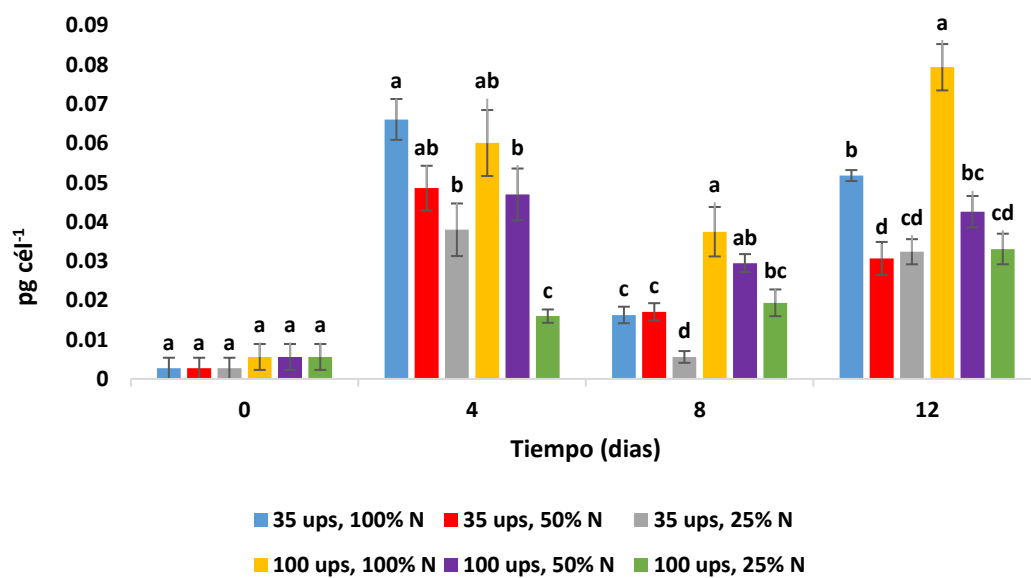
### 3.2.3.1. Cuantificación de los pigmentos carotenoides y clorofila a.

Los resultados de la concentración de los pigmentos en los cultivos de *Dunaliella* sp. los días cuatro, ocho y doce se muestran en la Tabla 8. Los datos se presentan para cada pigmento y se denotan las diferencias significativas entre tratamientos (salinidad y concentración de nitrógeno) para cada pigmento en cada día.

La concentración inicial de astaxantina de 0.003 y 0.006  $\text{pg cél}^{-1}$  fue similar para 35 y 100 ups, respectivamente ( $p=0.54$ ). De acuerdo al análisis estadístico, hubo un efecto altamente significativo ( $p<0.001$ ) en la concentración del pigmento por efecto de la concentración del nitrógeno durante los tres días analizados; en el día doce se cuantificó la mayor cantidad del pigmento, con una media de  $0.079 \pm 0.006$   $\text{pg cél}^{-1}$  en el tratamiento de 100 ups y 100% nitrógeno (Figura 5). Se encontró un efecto significativo ( $p<0.001$ ) de la salinidad a los ocho y doce días del bioensayo y no se encontraron diferencias significativas ( $p>0.05$ ) de la interacción entre la concentración de nitrógeno y la salinidad.

La menor cantidad del pigmento astaxantina ( $0.006 \pm 0.002$   $\text{pg cél}^{-1}$ ) se presentó en el día ocho de cultivo con el tratamiento de 35 ups y 25% de nitrógeno. Se encontraron diferencias significativas ( $p<0.05$ ) en los

resultados del día doce con respecto al día ocho para el tratamiento de 100 ups y 100% nitrógeno, sin embargo no presentó diferencias significativas ( $p=0.098$ ) con el día cuatro, donde se obtuvo una concentración del pigmento de  $0.060 \pm 0.008$  pg cél<sup>-1</sup>.



**Figura 5.** Concentración promedio y error estándar del pigmento astaxantina en los cultivos de *Dunaliella* sp. expuestos a dos concentraciones de salinidad (35 y 100 ups) y tres concentraciones de nitrógeno en el medio (100, 50 y 25%). Las letras denotan diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ).

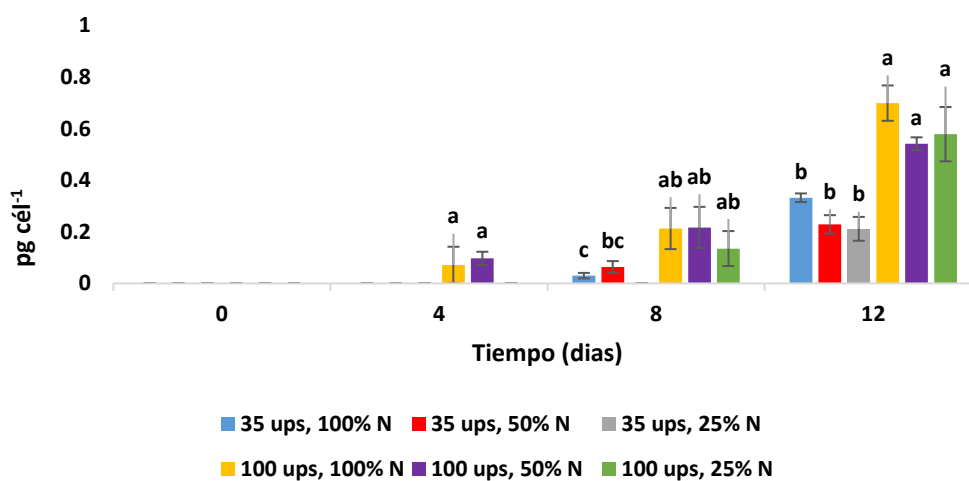
**Tabla 8.** Concentración de pigmentos carotenoides y clorofila *a* ( $\mu\text{g c\acute{e}l}^{-1}$ ) en los cultivos de *Dunaliella* sp. a los cuatro, ocho y 12 días de exposición a las diferentes combinaciones de concentración de nitrógeno en el medio (f/2) y salinidad. Las letras mayúsculas denotan diferencias significativas de la salinidad entre tratamientos ( $p < 0.05$ ,  $A > B$ ) por pigmento para cada día; y las minúsculas indican diferencias significativas de la concentración de nitrógeno entre tratamientos ( $p < 0.05$ ) por pigmento para cada día. Los números en paréntesis muestran el error estándar. Los porcentajes de 100, 50 y 25% de nitrógeno equivalen a una concentración de 217, 435 y 882  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{NaNO}_3$ , respectivamente.

Pigmento ( $\mu\text{g c\acute{e}l}^{-1}$ )	Tiempo (días) 0		4			8			12					
	% Nitrógeno	-	100	50	25	100	50	25	100	50	25			
Astaxantina	35 ups <sup>A</sup>	0.003	35 ups <sup>A</sup>	0.066 <sup>ab</sup> (0.005)	0.049 <sup>bc</sup> (0.006)	0.038 <sup>c</sup> (0.007)	35 ups <sup>B</sup>	0.016 <sup>a</sup> (0.002)	0.017 <sup>a</sup> (0.002)	0.006 <sup>b</sup> (0.002)	35 ups <sup>B</sup>	0.052 <sup>a</sup> (0.001)	0.031 <sup>b</sup> (0.004)	0.032 <sup>b</sup> (0.003)
	100 ups <sup>A</sup>	0.006	100 ups <sup>A</sup>	0.060 <sup>ab</sup> (0.008)	0.047 <sup>b</sup> (0.007)	0.016 <sup>c</sup> (0.002)	100 ups <sup>A</sup>	0.038 <sup>a</sup> (0.006)	0.030 <sup>ab</sup> (0.002)	0.019 <sup>b</sup> (0.003)	100 ups <sup>A</sup>	0.079 <sup>a</sup> (0.006)	0.043 <sup>bc</sup> (0.004)	0.033 <sup>b</sup> (0.004)
Luteína	35 ups	0	35 ups <sup>B</sup>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	35 ups <sup>B</sup>	0.030 <sup>b</sup> (0.011)	0.064 <sup>ab</sup> (0.023)	0 <sup>c</sup> (0)	35 ups <sup>B</sup>	0.332 <sup>a</sup> (0.017)	0.229 <sup>a</sup> (0.036)	0.212 <sup>a</sup> (0.046)
	100 ups	0	100 ups <sup>A</sup>	0.071 <sup>ab</sup> (0.071)	0.097 <sup>a</sup> (0.026)	0 <sup>b</sup> (0)	100 ups <sup>A</sup>	0.213 <sup>a</sup> (0.078)	0.217 <sup>a</sup> (0.080)	0.135 <sup>a</sup> (0.068)	100 ups <sup>A</sup>	0.699 <sup>a</sup> (0.069)	0.542 <sup>a</sup> (0.025)	0.579 <sup>a</sup> (0.105)
Cantaxantina	35 ups <sup>B</sup>	0.001	35 ups <sup>B</sup>	0.087 <sup>ab</sup> (0.014)	0.047 <sup>b</sup> (0.010)	0.044 <sup>b</sup> (0.008)	35 ups <sup>B</sup>	0.042 <sup>b</sup> (0.007)	0.057 <sup>ab</sup> (0.005)	0.009 <sup>c</sup> (0.004)	35 ups <sup>B</sup>	0.115 <sup>a</sup> (0.007)	0.066 <sup>b</sup> (0.007)	0.072 <sup>b</sup> (0.008)
	100 ups <sup>A</sup>	0.130	100 ups <sup>A</sup>	0.174 <sup>a</sup> (0.030)	0.153 <sup>a</sup> (0.027)	0.055 <sup>b</sup> (0.019)	100 ups <sup>A</sup>	0.153 <sup>a</sup> (0.017)	0.132 <sup>a</sup> (0.019)	0.099 <sup>a</sup> (0.026)	100 ups <sup>A</sup>	0.213 <sup>a</sup> (0.017)	0.140 <sup>b</sup> (0.013)	0.135 <sup>b</sup> (0.020)
Clorofila <i>a</i>	35 ups <sup>B</sup>	0.049	35 ups <sup>B</sup>	1.697 <sup>a</sup> (0.143)	1.273 <sup>a</sup> (0.113)	1.147 <sup>a</sup> (0.099)	35 ups <sup>B</sup>	0.673 <sup>b</sup> (0.068)	0.858 <sup>ab</sup> (0.052)	0.385 <sup>c</sup> (0.047)	35 ups <sup>B</sup>	1.197 <sup>a</sup> (0.055)	0.859 <sup>a</sup> (0.078)	1.023 <sup>a</sup> (0.091)
	100 ups <sup>A</sup>	1.896	100 ups <sup>A</sup>	2.701 <sup>a</sup> (0.291)	2.552 <sup>a</sup> (0.226)	1.796 <sup>b</sup> (0.261)	100 ups <sup>A</sup>	2.175 <sup>a</sup> (0.195)	1.799 <sup>ab</sup> (0.196)	1.526 <sup>b</sup> (0.273)	100 ups <sup>A</sup>	2.312 <sup>a</sup> (0.186)	1.565 <sup>b</sup> (0.120)	1.713 <sup>b</sup> (0.250)
$\beta$ -caroteno	35 ups <sup>B</sup>	0.260	35 ups <sup>B</sup>	0.425 <sup>a</sup> (0.007)	0.407 <sup>a</sup> (0.006)	0.358 <sup>b</sup> (0.004)	35 ups <sup>B</sup>	0.130 <sup>b</sup> (0.004)	0.172 <sup>a</sup> (0.003)	0.171 <sup>a</sup> (0.003)	35 ups <sup>B</sup>	0.106 <sup>c</sup> (0.003)	0.129 <sup>b</sup> (0.007)	0.203 <sup>a</sup> (0.006)
	100 ups <sup>A</sup>	0.320	100 ups <sup>A</sup>	0.446 <sup>b</sup> (0.011)	0.442 <sup>b</sup> (0.007)	0.535 <sup>a</sup> (0.013)	100 ups <sup>A</sup>	0.306 <sup>a</sup> (0.008)	0.250 <sup>b</sup> (0.009)	0.280 <sup>ab</sup> (0.019)	100 ups <sup>A</sup>	0.176 <sup>b</sup> (0.006)	0.146 <sup>c</sup> (0.005)	0.207 <sup>a</sup> (0.018)



En relación al pigmento luteína, no se encontró en los cultivos al inicio del bioensayo (día cero), ni en el día cuatro en el tratamiento con 35 ups en las diferentes concentraciones de nitrógeno, ni en el día ocho, con el tratamiento de 35 ups y 25% de nitrógeno; sin embargo, al día doce de cultivo se observó la mayor concentración, en la salinidad de 100 ups, sin diferencias significativas ( $p>0.05$ ) entre las tres concentraciones de nitrógeno, con valores de  $0.542 \pm 0.025$  a  $0.699 \pm 0.069$  pg cél<sup>-1</sup>.

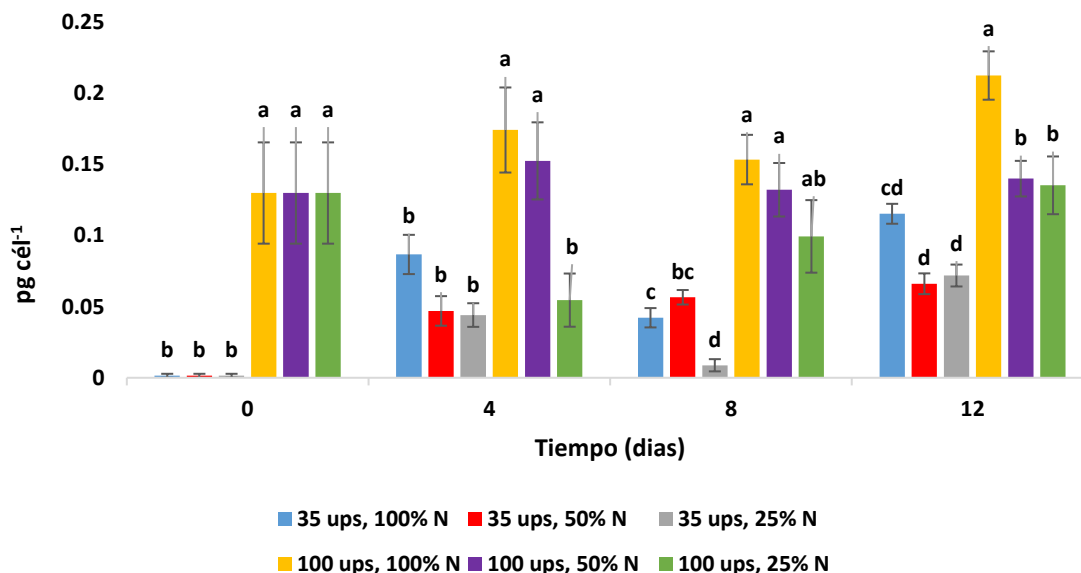
En el día ocho se observaron diferencias significativas ( $p<0.001$ ) en los resultados obtenidos a 35 ups en las diferentes concentraciones de nitrógeno, y un efecto significativo ( $p<0.05$ ) en la interacción del nitrógeno y la salinidad sobre la concentración de luteína. Se observó un aumento de la concentración de luteína a lo largo del tiempo (Figura 6).



**Figura 6.** Concentración promedio y error estándar del pigmento luteína en los cultivos de *Dunaliella* sp. expuestos a dos concentraciones de salinidad (35 y 100 ups) y tres concentraciones de nitrógeno en el medio (100, 50 y 25%). Las letras denotan diferencias significativas entre los tratamientos ( $p<0.05$ ). No se encontró pigmento en el día 0 de cultivo.

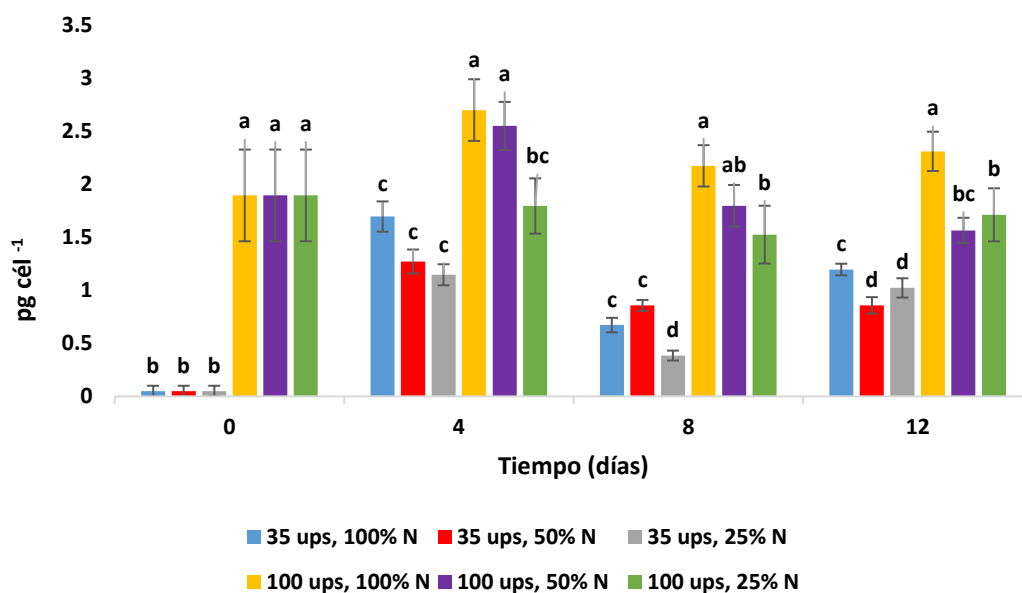
La concentración de cantaxantina en el día 0 de cultivo fue de  $0.001$  y  $0.130$  pg cél<sup>-1</sup> para 35 y 100 ups, respectivamente y se encontró un efecto significativo ( $p<0.05$ ) de la salinidad en la concentración de cantaxantina (Tabla 8 y Figura 7). De acuerdo al análisis estadístico, hubo un efecto altamente significativo ( $p<0.001$ ) en la producción de este carotenoide con relación a la concentración del nitrógeno y la salinidad (evaluados individualmente) durante los tres días analizados (4, 8 y 12), el día doce se cuantificó la mayor cantidad, con una media de  $0.213 \pm 0.017$  pg cél<sup>-1</sup> en el tratamiento de 100 ups y 100% nitrógeno, sin diferencias significativas ( $p>0.05$ ) entre las otras dos concentraciones de nitrógeno (50 y 25%) en la misma salinidad. No se encontró un efecto significativo ( $p>0.05$ ) en la interacción entre el nitrógeno y salinidad

sobre la concentración de cantaxantina en los cultivos. La menor cantidad del pigmento ( $0.009 \pm 0.004$  pg  $\text{cél}^{-1}$ ) se presentó en el tratamiento de 35 ups y 25% de nitrógeno en el día ocho de cultivo.



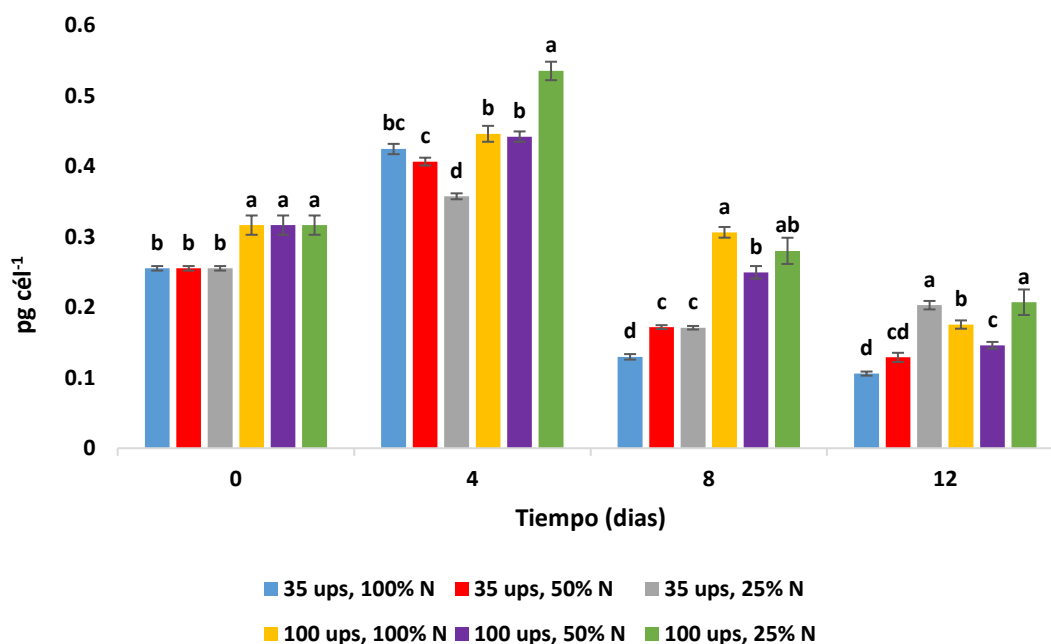
**Figura 7.** Concentración promedio y error estándar del pigmento cantaxantina en los cultivos de *Dunaliella* sp. expuestos a dos concentraciones de salinidad (35 y 100 ups) y tres concentraciones de nitrógeno en el medio (100, 50 y 25%). Las letras denotan diferencias significativas entre los tratamientos analizados ( $p < 0.05$ ).

La concentración inicial de clorofila *a* en *Dunaliella* sp. fue de  $0.049$  y  $1.896$  pg  $\text{cél}^{-1}$  para 35 y 100 ups, respectivamente, observándose un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) de la salinidad en la concentración de clorofila *a* en el día cero. Se encontró un efecto altamente significativo ( $p < 0.001$ ) de la concentración del nitrógeno y la salinidad durante los tres días analizados (4, 8 y 12) en la cuantificación de clorofila *a*; siendo el día cuatro donde se presentó la mayor cantidad del pigmento con una media de  $2.701 \pm 0.291$  pg  $\text{cél}^{-1}$  en el tratamiento de 100 ups y 100% nitrógeno y no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) con el tratamiento de 50% nitrógeno en la misma salinidad. La interacción del nitrógeno y la salinidad sobre la concentración de clorofila *a* en los cultivos no tuvo un efecto significativo ( $p > 0.05$ ). En todos los días de bioensayo hubo diferencias altamente significativas entre la salinidad de 35 y 100 ups en todas las concentraciones de nitrógeno (Tabla 8). La menor cantidad del pigmento se presentó en el día ocho de cultivo en el tratamiento de 35 ups y 25% de nitrógeno ( $0.385 \pm 0.047$  pg  $\text{cél}^{-1}$ ). Al igual que en la presencia de cantaxantina no se observó un cambio en la cantidad de clorofila *a* a lo largo del periodo de experimentación (Figura 8), el tratamiento con mayor cantidad del pigmento (100 ups con 100% nitrógeno) mantuvo, en general, concentraciones similares a lo largo de los cuatro días evaluados en el experimento.



**Figura 8.** Concentración promedio y error estándar del pigmento clorofila *a* en los cultivos de *Dunaliella* sp. expuestos a dos concentraciones de salinidad (35 y 100 ups) y a tres concentraciones de nitrógeno en el medio (100, 50 y 25%). Las letras denotan diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ).

En el pigmento  $\beta$ -caroteno se encontró un efecto altamente significativo ( $p < 0.001$ ) de la salinidad y de la interacción entre la concentración de nitrógeno y la salinidad, durante los tres días analizados (4, 8 y 12). En el día ocho se detectó un efecto altamente significativo ( $p < 0.001$ ) de la concentración de nitrógeno sobre la producción de  $\beta$ -caroteno. Las concentraciones iniciales de  $\beta$ -caroteno fueron de 0.260 y 0.320  $\text{pg c\acute{e}l}^{-1}$  para 35 y 100 ups, respectivamente. La salinidad tuvo un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) en la concentración de  $\beta$ -caroteno en el día cero. En el tratamiento de 100 ups y 25% nitrógeno, al día cuatro se detectó la mayor cantidad del pigmento con una media de  $0.535 \pm 0.013 \text{ pg c\acute{e}l}^{-1}$  (Figura 9). La menor cantidad del pigmento se presentó el día doce de cultivo ( $0.106 \pm 0.003 \text{ pg c\acute{e}l}^{-1}$ ) en el tratamiento de 35 ups y 100% de nitrógeno. Se observa una clara disminución de este pigmento carotenoides en los tratamientos de cultivo entre los días cuatro y ocho (Figura 9). Se encontraron diferencias altamente significativas ( $p < 0.001$ ) en las concentraciones de  $\beta$ -caroteno para el tratamiento con mayor cantidad del pigmento (100 ups con 25% nitrógeno) en el día cuatro con respecto a los días posteriores y al día inicial del bioensayo.



**Figura 9.** Concentración promedio y error estándar del pigmento  $\beta$ -caroteno en los cultivos de *Dunaliella* sp. expuestos a dos concentraciones de salinidad (35 y 100 ups) y a tres concentraciones de nitrógeno en el medio (100, 50 y 25%). Las letras denotan diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ).

### 3.3 Inducción a la carotenogénesis de *Dunaliella* sp. Estrés salino agudo y crónico

#### 3.3.1 Efecto interactivo de la intensidad de luz y exposición aguda a la salinidad.

La exposición súbita (estrés salino agudo) de las células de *Dunaliella* sp. a las salinidades de 100, 200 y 300 ups (inmediato), produjo el rompimiento celular después de un periodo de 30 minutos. Este tratamiento es letal para la microalga y por lo tanto no es útil para inducir la carotenogénesis. Sin embargo, cuando la exposición a estas salinidades se hizo en forma gradual (estrés salino crónico), la microalga se aclimató satisfactoriamente, por lo tanto, el ensayo y análisis de inducción de la carotenogénesis se realizó con el esquema de estrés salino crónico.

#### 3.3.2 Efecto interactivo de la intensidad de luz, ausencia de nutrientes y exposición crónica a la salinidad.

Los resultados del volumen celular para el día 11 (final) del cultivo, correspondientes a cada tratamiento para la inducción salina crónica, se presentan en la Tabla 9, las letras mayúsculas en la tabla denotan diferencias significativas para la salinidad y las minúsculas para la intensidad de luz entre los tratamientos. Los resultados del tratamiento con la intensidad de luz de  $1300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y salinidad de 35 ups no se reportan debido a la pérdida de la muestra (no se detectaron células) y los datos de volumen celular para

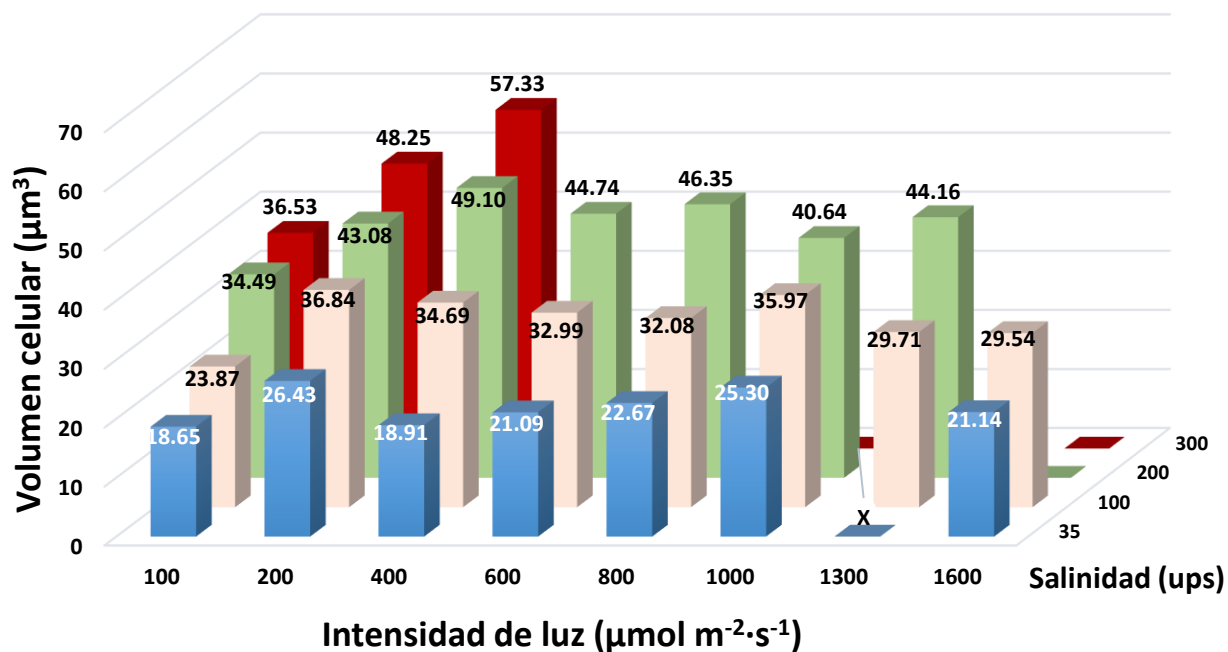
las intensidades de 600 a 1600  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y 300 ups no se midieron debido a rompimiento celular durante el bioensayo, por lo tanto, el análisis estadístico para la salinidad de 300 ups se hizo separado de las salinidades de 35 a 200 ups. Los datos de las intensidades de luz de 1300 y 1600  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  no se incluyeron en el análisis por la falta de datos en algunas salinidades, pero si se analizaron en el siguiente experimento de inducción (medio “f/2” sin nitrógeno). Debido a esto, los tratamientos mencionados anteriormente no fueron contemplados para el análisis estadístico.

Los promedios del volumen celular fueron: en 35 ups, de 18.65 a 26.43  $\mu\text{m}^3$ , en 100 ups, de 23.87 a 36.84  $\mu\text{m}^3$ , en 200 ups, de 34.49 a 49.10  $\mu\text{m}^3$  y en 300 ups oscilaron entre los 36.53 a 57.33  $\mu\text{m}^3$ . De acuerdo al análisis estadístico, se observa que hubo un efecto altamente significativo de la luz ( $p < 0.001$ ), la salinidad ( $p < 0.001$ ) y de la interacción entre la intensidad de luz y la salinidad ( $p < 0.001$ ) en los resultados de volumen celular.

**Tabla 9.** Volumen celular ( $\mu\text{m}^3$ ) de *Dunaliella* sp. expuesta a diferentes combinaciones de intensidad de luz y salinidad, para la inducción crónica salina a la carotenogénesis en ausencia de nutrientes. Las letras mayúsculas denotan diferencias significativas de la salinidad entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ) y las letras minúsculas diferencias significativas de la intensidad de luz entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ). Los números en paréntesis muestran el error estándar.

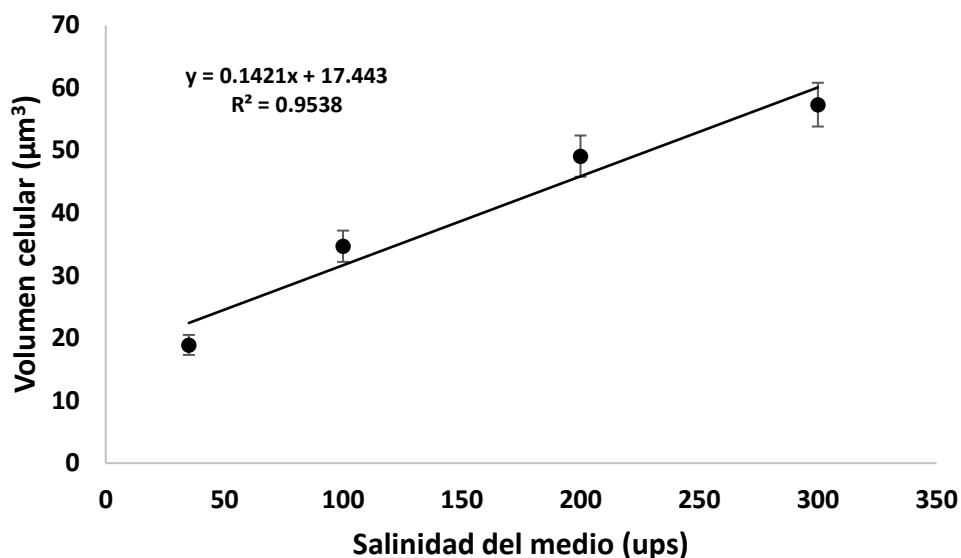
		Intensidad de luz ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )							
		100	200	400	600	800	1000	1300	1600
Salinidad (ups)	35 <sup>C</sup>	18.65 <sup>b</sup> (1.3)	26.43 <sup>a</sup> (1.5)	18.91 <sup>b</sup> (1.6)	21.09 <sup>bc</sup> (1.2)	22.67 <sup>ac</sup> (1.1)	25.30 <sup>a</sup> (1.1)	- -	21.14 (1.2)
	100 <sup>B</sup>	23.87 <sup>b</sup> (1.2)	36.84 <sup>a</sup> (2.7)	34.69 <sup>a</sup> (2.5)	32.99 <sup>a</sup> (2.1)	32.08 <sup>a</sup> (1.9)	35.97 <sup>a</sup> (2.0)	29.71 (2.0)	29.54 (1.7)
	200 <sup>A</sup>	34.49 <sup>c</sup> (2.6)	43.08 <sup>ab</sup> (3.2)	49.10 <sup>a</sup> (3.3)	44.74 <sup>a</sup> (1.7)	46.35 <sup>a</sup> (2.9)	40.64 <sup>bc</sup> (4.4)	44.16 (2.9)	- -
	300	36.53 <sup>b</sup> (2.6)	48.25 <sup>a</sup> (3.2)	57.33 <sup>a</sup> (3.5)	- -	- -	- -	- -	- -

Los mayores valores del volumen celular fueron en los cultivos mantenidos en los tratamientos a 400  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y 300 ups de salinidad, en el de 200  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y 300 ups y en el tratamiento de 400  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y 200 ups, sin diferencias significativas entre ellos. Para cada intensidad de luz, se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.001$ ) entre las concentraciones de salinidad de 35, 100 y 200 ups. Las células con el menor volumen se observaron en el tratamiento de 100  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y 35 ups, con una media de  $18.65 \pm 1.3 \mu\text{m}^3$  (Figura 10).



**Figura 10.** Volumen celular promedio ( $\mu\text{m}^3$ ) de *Dunaliella* sp. expuesta a diferentes combinaciones de intensidad de luz y salinidad, para la inducción crónica salina en ausencia de nutrientes.

Al aplicar un análisis de correlación (Figura 11) entre el volumen celular medido y las cuatro salinidades en el tratamiento de  $400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , se observó una relación significativa ( $p < 0.001$ ) con un coeficiente de determinación de 0.95. El análisis se hizo con los datos obtenidos a  $400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , debido a que este fue uno de los tratamientos en donde se alcanzaron los mayores volúmenes celulares. Se observó que el aumento de intensidad de  $100$  a  $400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  acentuaba el efecto de la salinidad sobre el volumen de la célula, el coeficiente de determinación para  $100$  y  $200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  fue de 0.885 y 0.933, respectivamente. A partir de  $400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  se observó un efecto menor de la intensidad de luz sobre el volumen, como en el caso del tratamiento de  $1000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , donde se obtuvo un coeficiente de determinación de 0.886.



**Figura 11.** Correlación entre la concentración salina del medio sin nutrientes y el volumen celular de *Dunaliella* expuesta a una intensidad de luz de  $400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Los puntos representan el volumen celular promedio y las barras el error estándar.

### 3.3.2.1 Cuantificación de pigmentos carotenoides y clorofila $\alpha$ en la inducción crónica a la salinidad y ausencia de nutrientes.

Para el análisis estadístico de la concentración de los pigmentos carotenoides y de la clorofila  $\alpha$ , se consideraron las ocho intensidades de luz ( $100$  a  $1600 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) y su interacción solo con dos concentraciones de salinidad ( $35$  y  $100$  ups) en un medio de cultivo sin nutrientes. En la salinidad de  $200$  ups solo se analizaron los pigmentos en los tratamientos desfasados de  $100$ ,  $400$ ,  $800$  y  $1300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , debido a que las lecturas espectrofotométricas de los cultivos; previas al análisis de pigmentos en HPLC; mostraron absorbancias muy bajas. Por lo anterior, se optó por hacer un análisis exploratorio de la producción de pigmentos en los cultivos, con la finalidad de entender el comportamiento de la célula a esta salinidad. Cabe destacar que el análisis para todos los pigmentos en la salinidad de  $200$  ups, se realizó independientemente de las salinidades de  $35$  y  $100$  ups, debido a la falta de datos en ciertas intensidades de luz. Los cultivos de  $300$  ups no se analizaron debido a que la muerte celular a lo largo del bioensayo redujo de manera sustancial la biomasa algal. Los resultados de este experimento corresponden al último día de cultivo (día 11).

Para contrastar los efectos de la intensidad de la luz y la salinidad sobre la inducción a la carotenogénesis, se tomó una muestra inicial de las microalgas que se habían aclimatado en forma paulatina a cada una de las salinidades experimentales. Las concentraciones iniciales de los pigmentos analizados se muestran en la Tabla 10.

Para la astaxantina, las concentraciones iniciales fueron en promedio  $0.009 \text{ pg c\acute{e}l}^{-1}$  en las tres salinidades (35, 100 y 200) (Tabla 10). De acuerdo al análisis estadístico de las muestras analizadas al finalizar el experimento (día 11), se observó un efecto altamente significativo de la luz ( $p < 0.001$ ), de la salinidad ( $p < 0.05$ ) y de la interacción entre éstas variables ( $p < 0.05$ ) en la concentración del pigmento astaxantina. La mayor cantidad de astaxantina se encontró en los tratamientos de 35 ups, en las intensidades de luz de 600 y  $800 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (Tabla 11), sin diferencias significativas entre ambos tratamientos ( $p = 0.329$ ) y con un promedio de  $0.115 \text{ pg c\acute{e}l}^{-1}$  (Figura 12). Las menores concentraciones del pigmento se presentaron en el tratamiento de 100 ups y  $1000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (con  $0.029 \pm 0.003 \text{ pg c\acute{e}l}^{-1}$ ) (Figura 13), así como en los tratamientos de 200 ups con 800 y  $1300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , sin diferencias estadísticas entre éstos dos últimos valores, con un promedio de  $0.021 \text{ pg c\acute{e}l}^{-1}$  (Figura 14). Las diferencias altamente significativas ( $p < 0.001$ ) se encontraron entre los tratamientos de 35 y 100 ups con 600 y  $800 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

La concentración inicial de luteína fue de 0.096, 0.065 y  $0 \text{ pg c\acute{e}l}^{-1}$  para la concentración salina de 35, 100 y 200 ups, respectivamente. En el análisis estadístico para este pigmento, se observó un efecto altamente significativo de la luz y de la salinidad ( $p < 0.001$ ). Las mayores cantidades del pigmento se encontraron en los tratamientos de 100 ups y 100 a  $800 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (Figura 13), con un promedio entre éstas intensidades de  $0.410 \text{ pg c\acute{e}l}^{-1}$ . Las menores concentraciones se observaron en los tratamientos con las intensidades más altas (1000 a  $1600 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), en las tres salinidades (Figuras 12, 13 y 14). En cuanto a la salinidad de 200 ups, el tratamiento de  $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  resultó con la mayor cantidad de luteína (Fig. 14), con un valor de  $0.491 \pm 0.041 \text{ pg c\acute{e}l}^{-1}$ .

En relación al carotenoide cantaxantina las concentraciones fueron las siguientes: 0.131, 0.122 y  $0.160 \text{ pg c\acute{e}l}^{-1}$  para las salinidades de 35, 100 y 200 ups, respectivamente. Se encontró un efecto significativo de la luz ( $p < 0.05$ ) en este pigmento en el último día del bioensayo, mientras que en la variable salinidad y la interacción luz x salinidad se encontró un efecto altamente significativo ( $p < 0.001$ ). No se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre las salinidades de 35 y 100 ups, en los tratamientos de 100 y  $400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . La mayor cantidad de este carotenoide se encontró en el tratamiento con una salinidad de 35 ups, en las intensidades de luz de 100, 200 y  $800 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , con un promedio de  $0.053 \text{ pg c\acute{e}l}^{-1}$  (Figura 12), sin diferencias significativas entre éstos tratamientos ( $p > 0.05$ ). Se observó una tendencia similar en la salinidad de 100 ups para las intensidades de luz de 100 y  $200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (Figura 13). Las menores concentraciones, en ambas salinidades, fueron en los tratamientos con una intensidad de 1000 a  $1600 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . En la salinidad de 200 ups y  $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , solo se observaron pequeñas concentraciones de este carotenoide ( $0.041 \text{ pg c\acute{e}l}^{-1}$ ), en las otras intensidades de luz las concentraciones fueron casi indetectables.



**Tabla 10.** Concentración inicial ( $\text{pg c\acute{e}l}^{-1}$ ) de pigmentos carotenoides y clorofila  $a$  en la inducción crónica salina y ausencia de nutrientes.

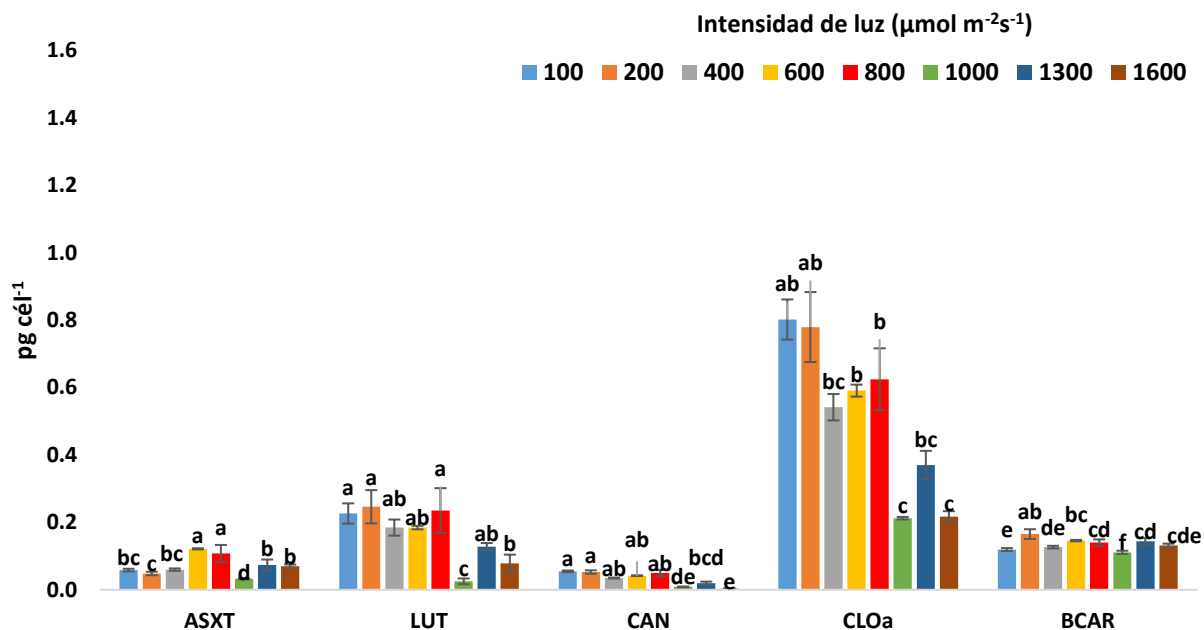
Salinidad (ups)	Pigmentos ( $\text{pg c\acute{e}l}^{-1}$ )				
	Astaxantina	Luteína	Cantaxantina	Clorofila $a$	$\beta$ -caroteno
35	0.010	0.096	0.131	1.385	0.090
100	0.009	0.065	0.122	1.284	0.100
200	0.008	0	0.160	1.573	0.141

Las concentraciones iniciales de clorofila  $a$  en las tres salinidades fueron en promedio  $1.41 \text{ pg c\acute{e}l}^{-1}$ . La luz tuvo un efecto altamente significativo sobre la concentración de clorofila  $a$  ( $p < 0.001$ ) mientras que la salinidad solo tuvo un efecto significativo en las dos últimas intensidades de luz ( $1300$  y  $1600 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). La mayor cantidad de clorofila se encontró en el tratamiento con  $100$  ups y en las tres primeras intensidades de luz ( $100$ ,  $200$  y  $400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) (Figura 13), sin diferencias significativas entre éstas ( $p = 0.584$ ). La menor concentración de clorofila  $a$  se observó en el tratamiento a  $200$  ups e intensidad de luz de  $1300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  ( $0.053 \pm 0.010 \text{ pg c\acute{e}l}^{-1}$ ).

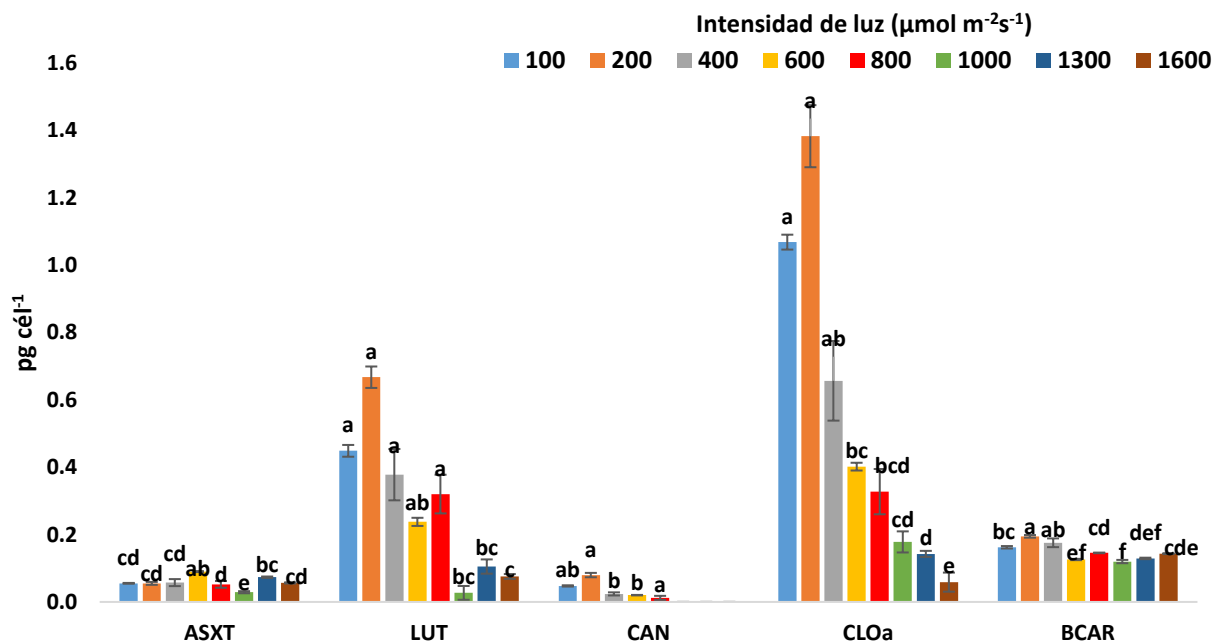
En relación al  $\beta$ -caroteno las concentraciones iniciales, en las tres salinidades, fueron en promedio  $0.11 \text{ pg c\acute{e}l}^{-1}$ . Al finalizar el bioensayo, se encontró un efecto altamente significativo ( $p < 0.001$ ) de la intensidad de la luz, la salinidad y de la interacción entre las dos variables, sobre la concentración del  $\beta$ -caroteno. La mayor concentración ( $0.230 \pm 0.003 \text{ pg c\acute{e}l}^{-1}$ ) de este pigmento se observó en la concentración salina de  $200$  ups a una intensidad de luz de  $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y la menor en  $35$  ups y  $1000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  ( $0.111 \pm 0.005 \text{ pg c\acute{e}l}^{-1}$ ). No se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en las concentraciones de  $\beta$ -caroteno obtenidas en las salinidades de  $35$  y  $100$  a las intensidades de luz de  $800$  a  $1600 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (Figuras 12 y 13), sin embargo, si fueron diferentes a la salinidad de  $200$  ups en  $800$  y  $1300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (Figura 14).

**Tabla 11.** Concentración de pigmentos carotenoides y clorofila  $a$  ( $\mu\text{g c\acute{e}l}^{-1}$ ) en los cultivos de *Dunaliella* sp. a los 11 días de exposición a diferentes combinaciones de intensidad de luz y salinidad en ausencia de nutrientes. Las letras mayúsculas denotan diferencias significativas en la salinidad entre tratamientos ( $p < 0.05$ ) y las minúsculas denotan diferencias significativas en la intensidad de luz para cada salinidad ( $p < 0.05$ ). Los números en paréntesis muestran el error estándar. El símbolo – representa ausencia de dato en esa intensidad de luz con la combinación de 200 ups de salinidad.

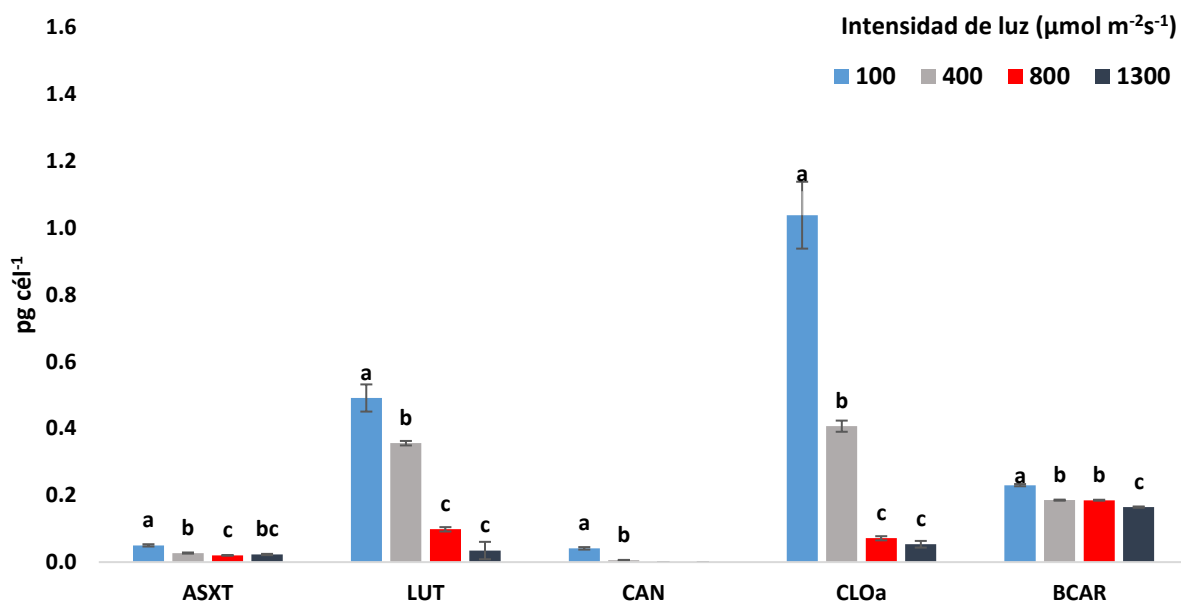
Pigmento ( $\mu\text{g c\acute{e}l}^{-1}$ )	Salinidad	Intensidad de luz ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )							
		100	200	400	600	800	1000	1300	1600
Astaxantina	35	0.058 <sup>bc</sup> (0.004)	0.048 <sup>c</sup> (0.005)	0.060 <sup>bc</sup> (0.004)	0.121 <sup>Aa</sup> (0.002)	0.108 <sup>Aa</sup> (0.025)	0.033 <sup>d</sup> (0.001)	0.074 <sup>b</sup> (0.016)	0.070 <sup>Ab</sup> (0.005)
	100	0.055 <sup>cd</sup> (0.001)	0.055 <sup>cd</sup> (0.004)	0.057 <sup>cd</sup> (0.010)	0.090 <sup>Bab</sup> (0.002)	0.052 <sup>Bd</sup> (0.010)	0.029 <sup>e</sup> (0.003)	0.073 <sup>bc</sup> (0.002)	0.056 <sup>Bcd</sup> (0.002)
	200	0.050 <sup>a</sup> (0.003)	- -	0.027 <sup>b</sup> (0.002)	- -	0.020 <sup>c</sup> (0.001)	- -	0.022 <sup>bc</sup> (0.002)	- -
Luteína	35	0.226 <sup>Ba</sup> (0.030)	0.246 <sup>Ba</sup> (0.049)	0.185 <sup>Bab</sup> (0.024)	0.185 <sup>Bab</sup> (0.005)	0.235 <sup>a</sup> (0.067)	0.025 <sup>c</sup> (0.009)	0.128 <sup>ab</sup> (0.011)	0.078 <sup>b</sup> (0.026)
	100	0.448 <sup>Aa</sup> (0.018)	0.667 <sup>Aa</sup> (0.032)	0.378 <sup>Aa</sup> (0.076)	0.238 <sup>Aab</sup> (0.012)	0.320 <sup>a</sup> (0.057)	0.027 <sup>bc</sup> (0.021)	0.105 <sup>bc</sup> (0.021)	0.076 <sup>c</sup> (0.007)
	200	0.491 <sup>a</sup> (0.041)	- -	0.356 <sup>b</sup> (0.007)	- -	0.098 <sup>c</sup> (0.007)	- -	0.035 <sup>c</sup> (0.026)	- -
Cantaxantina	35	0.055 <sup>ab</sup> (0.002)	0.053 <sup>Ba</sup> (0.005)	0.035 <sup>b</sup> (0.002)	0.042 <sup>Ab</sup> (0.001)	0.050 <sup>Aab</sup> (0.010)	0.009 <sup>Ade</sup> (0.001)	0.019 <sup>Abcd</sup> (0.005)	0.004 <sup>Ae</sup> (0.001)
	100	0.048 <sup>ab</sup> (0.002)	0.080 <sup>Aa</sup> (0.007)	0.024 <sup>b</sup> (0.005)	0.020 <sup>Bb</sup> (0.001)	0.012 <sup>Ba</sup> (0.006)	0 <sup>Bc</sup> (0)	0 <sup>Bc</sup> (0)	0 <sup>Bc</sup> (0)
	200	0.041 (0.004)	- -	0.005 (0.001)	- -	0 (0)	- -	0 (0)	- -
Clorofila $a$	35	0.802 <sup>ab</sup> (0.060)	0.780 <sup>ab</sup> (0.104)	0.542 <sup>bc</sup> (0.039)	0.591 <sup>b</sup> (0.018)	0.625 <sup>b</sup> (0.092)	0.212 <sup>c</sup> (0.004)	0.370 <sup>Abc</sup> (0.042)	0.217 <sup>Ac</sup> (0.016)
	100	1.068 <sup>a</sup> (0.022)	1.382 <sup>a</sup> (0.092)	0.656 <sup>ab</sup> (0.118)	0.402 <sup>bc</sup> (0.012)	0.327 <sup>bcd</sup> (0.067)	0.178 <sup>cd</sup> (0.031)	0.143 <sup>Bd</sup> (0.009)	0.059 <sup>Be</sup> (0.028)
	200	1.039 <sup>a</sup> (0.100)	- -	0.407 <sup>b</sup> (0.017)	- -	0.071 <sup>c</sup> (0.006)	- -	0.053 <sup>c</sup> (0.010)	- -
$\beta$ -caroteno	35	0.119 <sup>Be</sup> (0.004)	0.165 <sup>Bab</sup> (0.014)	0.127 <sup>Bde</sup> (0.004)	0.146 <sup>Abc</sup> (0.002)	0.140 <sup>cd</sup> (0.010)	0.111 <sup>f</sup> (0.005)	0.144 <sup>cd</sup> (0.010)	0.132 <sup>cde</sup> (0.005)
	100	0.162 <sup>Abc</sup> (0.004)	0.195 <sup>Aa</sup> (0.004)	0.176 <sup>Aab</sup> (0.013)	0.126 <sup>Bef</sup> (0.002)	0.146 <sup>cd</sup> (0.001)	0.120 <sup>f</sup> (0.005)	0.129 <sup>def</sup> (0.002)	0.143 <sup>cde</sup> (0.001)
	200	0.230 <sup>a</sup> (0.003)	- -	0.186 <sup>b</sup> (0.002)	- -	0.185 <sup>b</sup> (0.001)	- -	0.165 <sup>c</sup> (0.002)	- -



**Figura 12.** Concentración promedio y error estándar de los pigmentos astaxantina (ASXT), luteína (LUT), cantaxantina (CAN), clorofila *a* (CLOa) y  $\beta$ -caroteno (BCAR) en los cultivos de *Dunaliella sp.* expuestas a ocho intensidades de luz (100 a 1600  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), una concentración salina de 35 ups y ausencia de nutrientes. Las letras denotan diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ).



**Figura 13.** Concentración promedio y error estándar de los pigmentos astaxantina (ASXT), luteína (LUT), cantaxantina (CAN), clorofila *a* (CLOa) y  $\beta$ -caroteno (BCAR) en los cultivos de *Dunaliella sp.* expuestas a ocho intensidades de luz (100 a 1600  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), una concentración salina de 100 ups y ausencia de nutrientes. Las letras denotan diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ). No se encontró cantaxantina en los tratamientos de 1000 a 1600  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .



**Figura 14.** Concentración promedio y error estándar de los pigmentos astaxantina (ASXT), luteína (LUT), cantaxantina (CAN), clorofila *a* (CLOa) y  $\beta$ -caroteno (BCAR) en los cultivos de *Dunaliella* sp. expuestas a cuatro intensidades de luz (100, 400, 800 y 1300  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), una concentración salina de 200 ups y ausencia de nutrientes. Las letras denotan diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ). No se encontró cantaxantina en los tratamientos de 800 y 1300  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Los tratamientos de 200, 600, 1000 y 1600  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  no fueron analizados en la salinidad de 200 ups.

### 3.3.3 Efecto interactivo de la intensidad de luz, ausencia de nitrógeno y exposición crónica a la salinidad

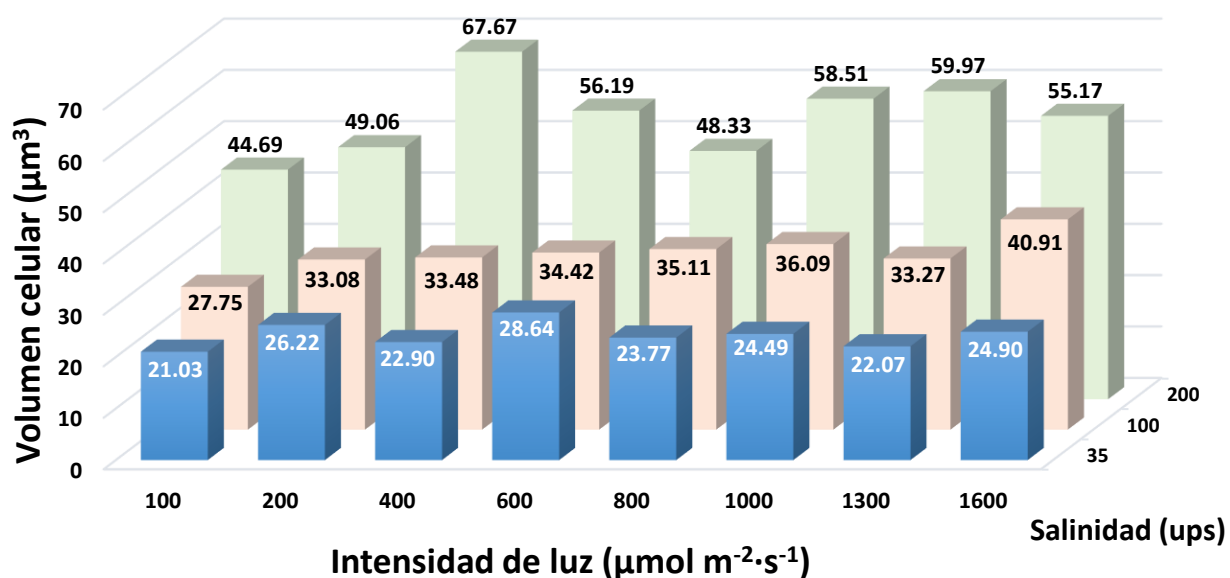
Los resultados de volumen celular de *Dunaliella* sp. expuesta a los tratamientos de inducción salina crónica, ausencia de nitrógeno y ocho intensidades de luz se presentan en la Tabla 12, las letras mayúsculas en la tabla denotan diferencias significativas para la salinidad y las minúsculas para la intensidad de luz entre los tratamientos. Los resultados corresponden al día 11 (final) de cultivo.

De acuerdo al análisis estadístico, se deduce que hubo un efecto altamente significativo de la intensidad de luz ( $p < 0.001$ ), la salinidad ( $p < 0.001$ ) y de la interacción entre estas variables ( $p < 0.001$ ) en el volumen celular de *Dunaliella* sp. Los valores promedio del volumen celular en las concentraciones salinas de 35, 100, 200 ups oscilaron entre los 21.03 a 28.64  $\mu\text{m}^3$ , 27.75 a 40.91  $\mu\text{m}^3$  y 44.69 a 67.67  $\mu\text{m}^3$ , respectivamente (Tabla 12).

**Tabla 12.** Volumen celular ( $\mu\text{m}^3$ ) de *Dunaliella* sp. expuesta a diferentes combinaciones de intensidad de luz y salinidad, para la inducción crónica salina de la carotenogénesis en ausencia de nitrógeno. Las letras mayúsculas denotan diferencias significativas de la salinidad entre tratamientos ( $p < 0.05$ ) y las letras minúsculas diferencias significativas de la intensidad de luz entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ) en cada salinidad. Los números en paréntesis muestran el error estándar. Para este diseño se descartó la salinidad de 300 ups.

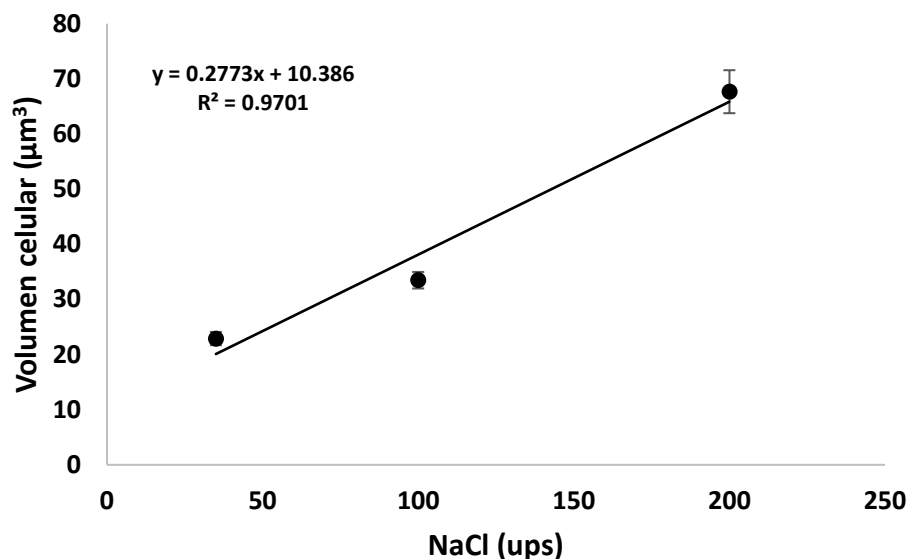
		Intensidad de luz ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )							
		100	200	400	600	800	1000	1300	1600
Salinidad	35 <sup>C</sup>	21.03 <sup>c</sup> (1.0)	26.22 <sup>ab</sup> (1.1)	22.90 <sup>c</sup> (1.2)	28.64 <sup>a</sup> (1.7)	23.77 <sup>bc</sup> (1.3)	24.49 <sup>bc</sup> (1.3)	22.07 <sup>c</sup> (1.0)	24.90 <sup>abc</sup> (1.2)
	100 <sup>B</sup>	27.75 <sup>d</sup> (1.5)	33.08 <sup>c</sup> (2.0)	33.48 <sup>c</sup> (1.5)	34.42 <sup>bc</sup> (1.7)	35.11 <sup>abc</sup> (1.5)	36.09 <sup>abc</sup> (2.0)	33.27 <sup>c</sup> (1.5)	40.91 <sup>a</sup> (2.4)
	200 <sup>A</sup>	44.69 <sup>d</sup> (1.7)	49.06 <sup>cd</sup> (2.2)	67.67 <sup>a</sup> (3.9)	56.19 <sup>bc</sup> (3.1)	48.33 <sup>d</sup> (2.6)	58.51 <sup>ab</sup> (2.9)	59.97 <sup>ab</sup> (3.3)	55.17 <sup>bc</sup> (2.3)

Se observaron diferencias en el volumen celular entre las tres concentraciones salinas (35, 100 y 200 ups) para cada una de las intensidades de luz ( $p < 0.001$ ), con los mayores volúmenes en la concentración más alta (200 ups) y los valores más bajos se encontraron en el tratamiento de  $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y 35 ups, con una media de  $21.03 \pm 1.0 \mu\text{m}^3$  (Figura 15).



**Figura 15.** Volumen celular promedio ( $\mu\text{m}^3$ ) de *Dunaliella* sp. expuesta a diferentes combinaciones de intensidad de luz y salinidad, para la inducción crónica salina y ausencia de nitrógeno.

El análisis de correlación entre la salinidad en el medio de cultivo y el volumen celular de *Dunaliella* sp., cultivada con una intensidad de luz de  $400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  indicó una relación altamente significativa ( $p < 0.001$ ), con un coeficiente de determinación de 0.97 (Figura 16). El análisis se hizo con el tratamiento de  $400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  debido a que en este se alcanzaron los mayores volúmenes celulares. Al igual que en el análisis de correlación del experimento anterior, se observó que con el aumento de 100 a  $400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  se acentuaba el efecto de la salinidad sobre el volumen de la célula y a partir de  $400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  se observó un efecto menor de la intensidad de luz sobre el volumen.



**Figura 16.** Correlación entre la concentración salina del medio sin nitrógeno y el volumen celular de *Dunaliella* sp. expuesta a una intensidad de luz de  $400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Los puntos representan el volumen celular promedio y las barras el error estándar.

### 3.3.3.1. Cuantificación de pigmentos carotenoides y clorofila $\alpha$ en la inducción crónica a la salinidad y ausencia del nitrógeno.

Para el análisis estadístico de los resultados de la concentración de pigmentos (día 11 de cultivo), se consideraron las ocho intensidades de luz ( $100$  a  $1600 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) y su interacción solo con dos concentraciones de salinidad ( $35$  y  $100$  ups) y de manera independiente, la salinidad de  $200$  ups y su interacción con las intensidades de luz de  $100$ ,  $400$ ,  $800$  y  $1300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , por las mismas razones expuestas en el apartado del experimento anterior (disminución de la absorbancia al alcanzar intensidades de luz por arriba de los  $800 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ).

Las concentraciones iniciales de astaxantina fueron de  $0.012$ ,  $0.014$  y  $0.006 \text{ pg cél}^{-1}$  para los tratamientos con una salinidad de  $35$ ,  $100$  y  $200$  ups (Tabla 13). De acuerdo al análisis estadístico, hubo un efecto

altamente significativo de la luz, la salinidad y de la interacción entre la intensidad de luz y la salinidad ( $p < 0.001$ ) en la concentración de astaxantina en la microalga *Dunaliella* sp. La mayor cantidad de astaxantina se encontró en los tratamientos de 100 y 600  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y 35 ups ( $p = 0.354$ ) (Figura 17). Las menores concentraciones del pigmento se presentaron en el tratamiento de 200 ups, sin diferencias significativas entre las intensidades de luz (Figura 19). Se encontraron diferencias altamente significativas ( $p < 0.001$ ) en la concentración del pigmento entre las salinidades de 35 y 100 ups en todas las intensidades de luz (Figura 17 y 18).

Para la luteína se encontraron concentraciones iniciales de 0.033 a 0.188  $\text{pg c\acute{e}l}^{-1}$  en las salinidades de 35, 100 y 200 ups (Tabla 13). El análisis estadístico reveló un efecto altamente significativo ( $p < 0.001$ ) de la intensidad de la luz, la salinidad y la interacción entre las dos variables sobre la concentración de este pigmento. La mayor cantidad del pigmento se encontró en el tratamiento de 100 ups y 200  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (Tabla 14), con un valor de  $1.025 \pm 0.015$   $\text{pg c\acute{e}l}^{-1}$  y las menores concentraciones se observaron en los tratamientos de 100 ups y 1600  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (0.200  $\text{pg c\acute{e}l}^{-1}$ ) y en 200 ups en todas las intensidades de luz (Fig. 19). En la salinidad de 100 ups, a partir de 1000  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  se observó un decremento en la concentración de luteína, conforme se incrementó la intensidad de luz.

Con relación al pigmento cantaxantina, al iniciar el experimento, las concentraciones fueron de 0.163, 0.140 y 0.084  $\text{pg c\acute{e}l}^{-1}$  para las salinidades de 35, 100 y 200 ups, respectivamente. Se encontró un efecto altamente significativo ( $p < 0.001$ ) de la intensidad de la luz, la salinidad y la interacción de las dos variables en la concentración de este pigmento. La mayor concentración de este carotenoide ( $0.196 \pm 0.008$ ) se encontró en el tratamiento con una salinidad 35 ups y 100  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (Figura 17). Las menores concentraciones se observaron a 100 ups, en las intensidades de 400 a 1600  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , así como en todas las intensidades de 200 ups. Al igual que con la luteína, se observó una disminución considerable del pigmento a medida que se incrementaron la intensidad de luz y la salinidad (Tabla 14).

**Tabla 13.** Concentración inicial ( $\text{pg c\acute{e}l}^{-1}$ ) de pigmentos carotenoides y clorofila  $\alpha$  en la inducción crónica salina y ausencia del nitrógeno.

Salinidad (ups)	Pigmentos ( $\text{pg c\acute{e}l}^{-1}$ )				
	Astaxantina	Luteína	Cantaxantina	Clorofila $\alpha$	$\beta$ -caroteno
35	0.012	0.111	0.163	1.775	0.123
100	0.014	0.118	0.140	1.830	0.146
200	0.006	0.033	0.084	1.59	0.182

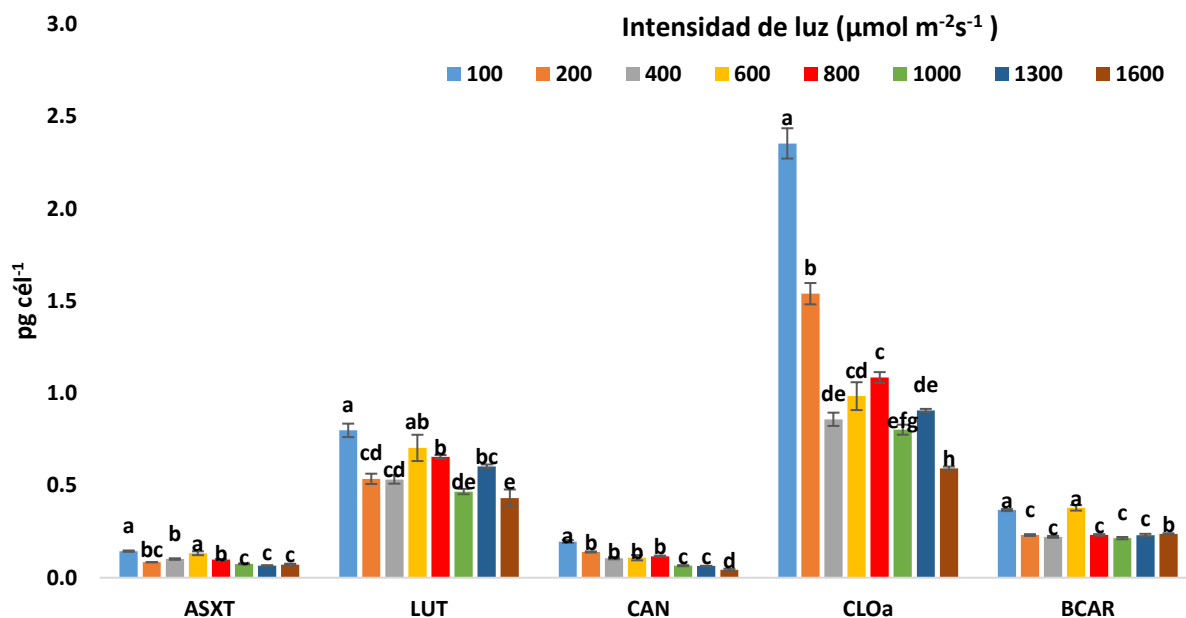
La concentración de clorofila  $\alpha$  se encontró en concentraciones iniciales de 1.590 a 1.830  $\text{pg c\acute{e}l}^{-1}$  en las tres concentraciones de salinidad (35, 100 y 200 ups). Los resultados mostraron un efecto altamente significativo ( $p < 0.001$ ) de la intensidad de la luz, la salinidad y la interacción entre ambas variables en la concentración de este pigmento en la microalga. La mayor cantidad de clorofila  $\alpha$  se encontró en el tratamiento de 35 ups con  $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (Tabla 14), con  $2.355 \pm 0.082 \text{ pg c\acute{e}l}^{-1}$  y la menor cantidad ( $0.251 \pm 0.019 \text{ pg c\acute{e}l}^{-1}$ ) en el tratamiento de 100 ups e intensidad de luz de  $1600 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Se encontraron diferencias altamente significativas ( $p < 0.001$ ) en la concentración del pigmento entre las salinidades de 35 y 100 ups en todas las intensidades de luz y se observó una disminución del pigmento al aumentar la salinidad y la intensidad de luz, a partir de  $800 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

Las concentraciones iniciales del pigmento  $\beta$ -caroteno fueron de 0.123, 0.146 y 0.182  $\text{pg c\acute{e}l}^{-1}$  para las salinidades de 35, 100 y 200, respectivamente (Tabla 13). Se encontró un efecto altamente significativo de la intensidad de la luz y de la interacción entre la intensidad de la luz y salinidad ( $p < 0.001$ ), en la concentración del  $\beta$ -caroteno en las células de *Dunaliella* sp. Las mayores concentraciones de este pigmento fueron alrededor de 0.377  $\text{pg c\acute{e}l}^{-1}$  (en las concentraciones de 35 ups con  $100$  y  $600 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , y en 100 ups con  $200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) (Tabla 14).

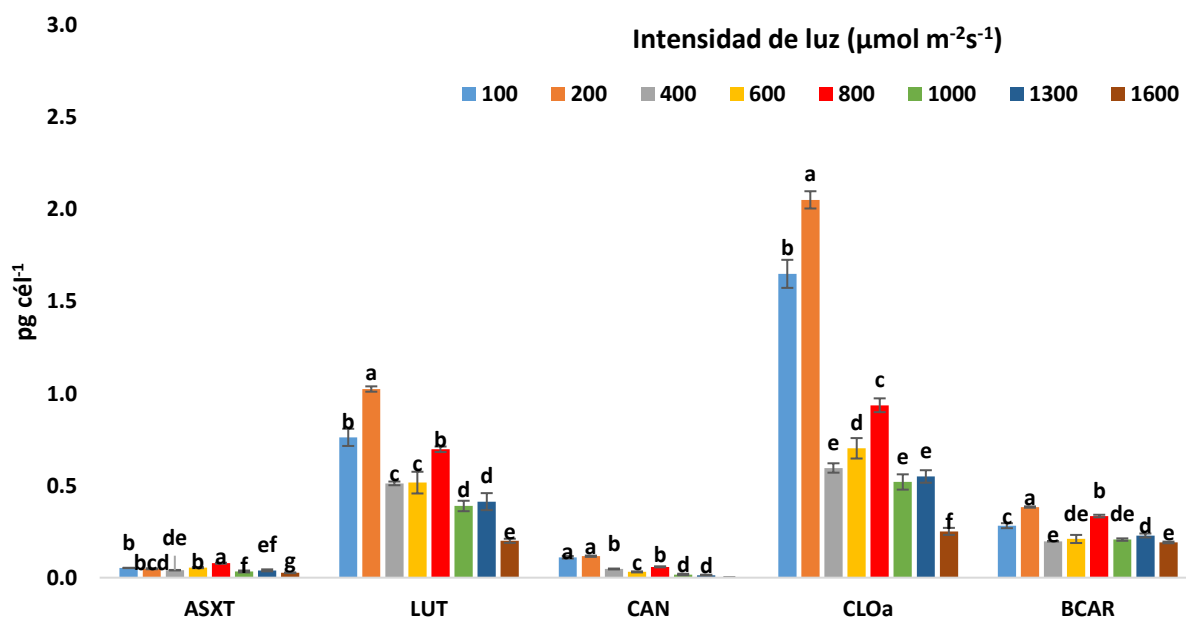


**Tabla 14.** Concentración de pigmentos carotenoides y clorofila *a* ( $\mu\text{g c\acute{e}l}^{-1}$ ) en los cultivos de *Dunaliella* sp. a los 11 días de exposición a diferentes combinaciones de intensidad de luz y salinidad en ausencia de nitrógeno. Las letras mayúsculas denotan diferencias significativas en la salinidad entre tratamientos ( $p < 0.05$ ) y las minúsculas denotan diferencias significativas en la intensidad de luz para cada salinidad ( $p < 0.05$ ). Los números en paréntesis muestran el error estándar. El símbolo – representa ausencia de dato en esa intensidad de luz con la combinación de 200 ups de salinidad.

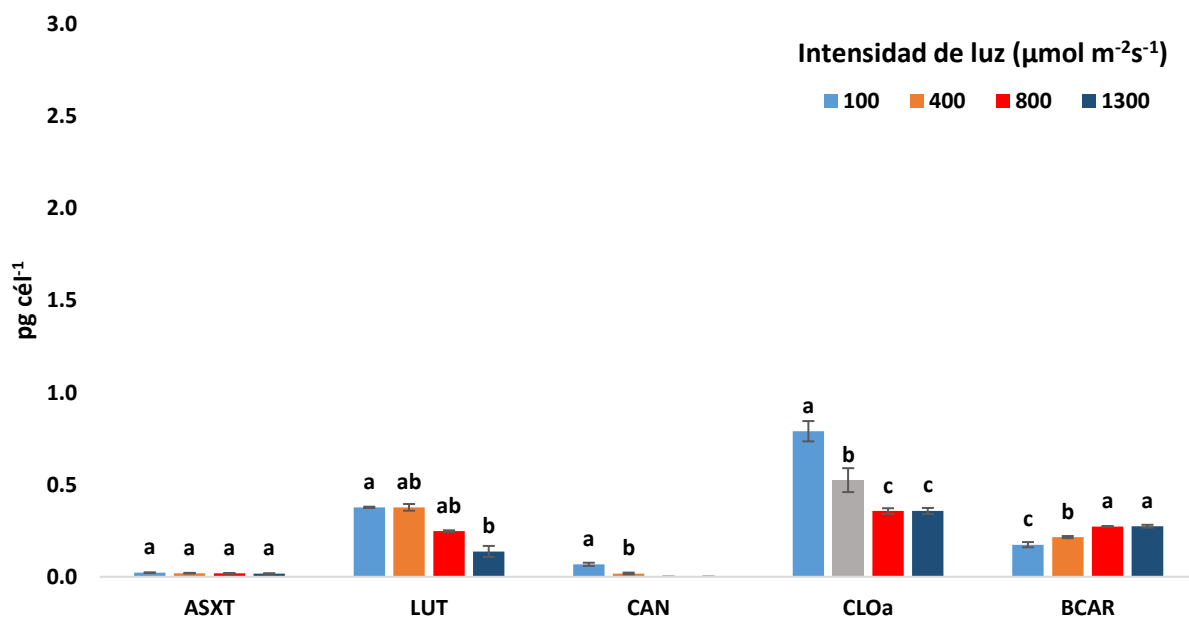
Pigmento ( $\mu\text{g c\acute{e}l}^{-1}$ )	Salinidad	Intensidad de luz ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )							
		100	200	400	600	800	1000	1300	1600
Astaxantina	35 <sup>A</sup>	0.144 <sup>a</sup> (0.004)	0.084 <sup>bc</sup> (0.001)	0.101 <sup>b</sup> (0.004)	0.133 <sup>a</sup> (0.010)	0.098 <sup>b</sup> (0.003)	0.075 <sup>c</sup> (0.003)	0.066 <sup>c</sup> (0.001)	0.071 <sup>c</sup> (0.005)
	100 <sup>B</sup>	0.053 <sup>b</sup> (0.001)	0.048 <sup>bcd</sup> (0.003)	0.041 <sup>de</sup> (0.001)	0.054 <sup>b</sup> (0.003)	0.078 <sup>a</sup> (0.003)	0.034 <sup>f</sup> (0.005)	0.040 <sup>ef</sup> (0.005)	0.026 <sup>g</sup> (0.002)
	200	0.022 <sup>a</sup> (0.002)	- -	0.020 <sup>a</sup> (0.002)	- -	0.019 <sup>a</sup> (0.001)	- -	0.016 <sup>a</sup> (0.003)	- -
Luteína	35	0.799 <sup>a</sup> (0.037)	0.536 <sup>Bcd</sup> (0.028)	0.533 <sup>cd</sup> (0.023)	0.704 <sup>Aab</sup> (0.071)	0.655 <sup>b</sup> (0.010)	0.467 <sup>de</sup> (0.014)	0.604 <sup>Abc</sup> (0.010)	0.432 <sup>Ae</sup> (0.046)
	100	0.762 <sup>b</sup> (0.047)	1.025 <sup>Aa</sup> (0.015)	0.512 <sup>c</sup> (0.010)	0.516 <sup>Bc</sup> (0.059)	0.697 <sup>b</sup> (0.015)	0.389 <sup>d</sup> (0.028)	0.413 <sup>Bd</sup> (0.046)	0.200 <sup>Be</sup> (0.011)
	200	0.377 <sup>a</sup> (0.004)	- -	0.377 <sup>ab</sup> (0.018)	- -	0.248 <sup>ab</sup> (0.004)	- -	0.138 <sup>b</sup> (0.030)	- -
Cantaxantina	35 <sup>A</sup>	0.196 <sup>a</sup> (0.008)	0.140 <sup>b</sup> (0.003)	0.105 <sup>b</sup> (0.005)	0.109 <sup>b</sup> (0.014)	0.117 <sup>b</sup> (0.003)	0.065 <sup>c</sup> (0.003)	0.063 <sup>c</sup> (0.001)	0.043 <sup>d</sup> (0.006)
	100 <sup>B</sup>	0.111 <sup>a</sup> (0.007)	0.117 <sup>a</sup> (0.004)	0.047 <sup>b</sup> (0.002)	0.031 <sup>c</sup> (0.003)	0.059 <sup>b</sup> (0.003)	0.017 <sup>d</sup> (0.004)	0.014 <sup>d</sup> (0.003)	0.000 <sup>e</sup> (0)
	200	0.068 (0.009)	- -	0.018 (0.005)	- -	0.000 (0)	- -	0.000 (0)	- -
Clorofila <i>a</i>	35 <sup>A</sup>	2.355 <sup>a</sup> (0.082)	1.540 <sup>b</sup> (0.058)	0.859 <sup>de</sup> (0.036)	0.985 <sup>cd</sup> (0.075)	1.086 <sup>c</sup> (0.029)	0.803 <sup>efg</sup> (0.027)	0.906 <sup>de</sup> (0.009)	0.594 <sup>h</sup> (0.009)
	100 <sup>B</sup>	1.650 <sup>b</sup> (0.076)	2.052 <sup>a</sup> (0.047)	0.596 <sup>e</sup> (0.026)	0.703 <sup>d</sup> (0.056)	0.937 <sup>c</sup> (0.037)	0.520 <sup>e</sup> (0.042)	0.550 <sup>e</sup> (0.034)	0.251 <sup>f</sup> (0.019)
	200	0.791 <sup>a</sup> (0.055)	- -	0.525 <sup>b</sup> (0.065)	- -	0.357 <sup>c</sup> (0.015)	- -	0.357 <sup>c</sup> (0.016)	- -
$\beta$ -caroteno	35	0.367 <sup>Aa</sup> (0.006)	0.231 <sup>Bc</sup> (0.005)	0.222 <sup>c</sup> (0.005)	0.379 <sup>Aa</sup> (0.015)	0.232 <sup>Bc</sup> (0.004)	0.215 <sup>c</sup> (0.006)	0.231 <sup>c</sup> (0.007)	0.236 <sup>Ab</sup> (0.004)
	100	0.282 <sup>Bc</sup> (0.014)	0.384 <sup>Aa</sup> (0.004)	0.198 <sup>e</sup> (0.001)	0.210 <sup>Bde</sup> (0.022)	0.335 <sup>Ab</sup> (0.007)	0.207 <sup>de</sup> (0.007)	0.229 <sup>d</sup> (0.011)	0.191 <sup>Be</sup> (0.005)
	200	0.174 <sup>c</sup> (0.014)	- -	0.216 <sup>b</sup> (0.006)	- -	0.273 <sup>a</sup> (0.002)	- -	0.275 <sup>a</sup> (0.008)	- -



**Figura 17.** Concentración promedio y error estándar de los pigmentos astaxantina (ASXT), luteína (LUT), cantaxantina (CAN), clorofila *a* (CLOa) y  $\beta$ -caroteno (BCAR) en los cultivos de *Dunaliella sp.* expuestas a ocho intensidades de luz (100 a 1600  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), una concentración salina de 35 ups y ausencia de nitrógeno. Las letras denotan diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ).



**Figura 18.** Concentración promedio y error estándar de los pigmentos astaxantina (ASXT), luteína (LUT), cantaxantina (CAN), clorofila *a* (CLOa) y  $\beta$ -caroteno (BCAR) en los cultivos de *Dunaliella sp.* expuestas a ocho intensidades de luz (100 a 1600  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), una concentración salina de 100 ups y ausencia de nitrógeno. Las letras denotan diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ). No se encontró cantaxantina en el tratamiento de 1600  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .



**Figura 19.** Concentración promedio y error estándar de los pigmentos astaxantina (ASXT), luteína (LUT), cantaxantina (CAN), clorofila *a* (CLOa) y  $\beta$ -caroteno (BCAR) en los cultivos de *Dunaliella* sp. expuestas a cuatro intensidades de luz ( $100, 400, 800$  y  $1300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), una concentración salina de  $200$  ups y ausencia de nitrógeno. Las letras denotan diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ). No se encontró cantaxantina en los tratamientos de  $800$  y  $1600 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Los tratamientos de  $200, 600, 1000$  y  $1600 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  en combinación con la salinidad de  $200$  ups no fueron analizados.

## Capítulo 4. Discusión

---

Las microalgas del género *Dunaliella* han sido abordadas en numerosos estudios, los cuales han permitido delimitar las condiciones específicas de su crecimiento para alcanzar mayores biomásas en cultivo (Herrero *et al.*, 1991; Hosseini y Shariati, 2008; Santos y Maciel, 2010; Hossein y Ghasemi, 2016), esto con fines de alimentación en acuicultura (Fabregas *et al.*, 1986; Borowitzka, 1997; Supamattaya *et al.*, 2005; Hemaiswarya *et al.*, 2011) o para generar metabolitos de interés tales como pigmentos carotenoides, lípidos y glicerol (Jin y Melis, 2003; Lamers *et al.*, 2012; Seok-Young *et al.*, 2014). Este género se ha encontrado en diferentes ambientes, en condiciones muy variadas y, a la fecha, se han reportado una gran diversidad de especies, por lo que es de suma importante la caracterización biológica de cada una de las cepas aisladas en las diferentes localidades.

La cepa de *Dunaliella* utilizada en este trabajo se ha expuesto a una serie de pruebas experimentales para evaluar su crecimiento, composición lipídica y contenido proteico. Los resultados indican que es una candidata idónea para la producción de estos compuestos. En cuanto a su crecimiento, se han evaluado intensidades de luz bajas ( $100$  a  $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) y medios nutritivos preparados a partir de fertilizantes agrícolas, los cuales tienen una fuente de nitrógeno a base de amonio y urea (Prado-Brambila, 2015). Estos medios se compararon con el medio "f/2", el cual es utilizado de manera común en una gran diversidad de especies de microalgas y ha resultado favorable para el crecimiento de *Dunaliella primolecta*, *D. tertiolecta*, *D. bardawil* y *D. parva* (Uriarte *et al.*, 1993, Sánchez-Saavedra *et al.*, 1996 y Cifuentes *et al.*, 2001), además, debido a que el medio Johnson es uno de los medios de cultivo más utilizados para el cultivo de *Dunaliella* spp., se consideró adecuado evaluarlo con la cepa utilizada en este trabajo.

La evaluación de los medios de cultivo utilizados para el crecimiento de *Dunaliella* sp., arrojó los mejores resultados de crecimiento con el medio "f" de Guillard y con una intensidad de luz de  $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , con concentraciones celulares de hasta  $10.7 \times 10^6$  cél  $\text{mL}^{-1}$ , lo cual concuerda con lo encontrado por Prado-Brambila (2015), quien alcanzó las mayores concentraciones celulares con  $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , sin embargo, este autor encontró mejores resultados utilizando el fertilizante agrícola Triple 17, con concentraciones celulares de  $9.24 \times 10^6$  cél  $\text{mL}^{-1}$ . Las concentraciones celulares obtenidas en esta tesis, coinciden con las reportadas por diversos autores (Subba Rao, 1981; Herrero *et al.*, 1991; Cifuentes *et al.*, 2001) para la especie *D. tertiolecta*, donde se utilizaron condiciones similares a las de este trabajo, como concentraciones celulares iniciales, medios de cultivo ("f") y temperaturas ( $18$ - $25$  °C).

La salinidad tiene un efecto importante en el crecimiento de *Dunaliella*, en este trabajo se observó que la microalga tiene un mejor desempeño en una concentración salina de 35 ups, lo cual concuerda con las condiciones de salinidad descritas para *D. tertiolecta* que tiene su crecimiento óptimo en salinidades de 20 a 40 ups, sin embargo, su crecimiento disminuye con salinidades de 100 a 200 ups (Jahnke y White, 2003). En contraste, *D. pseudosalina*, *D. parva* y *D. salina*, tienen un mayor potencial de crecimiento en un medio de mayor salinidad y alcanzan sus mayores concentraciones celulares con una salinidad de 114 ups (Shariati, 2003). Otras especies del género *Dunaliella*, como *D. viridis* tienen la capacidad de tolerar un amplio intervalo de salinidades e inclusive, pueden crecer en salinidades superiores a 100 ups, alcanzado su límite salino máximo a 228 ups; no obstante, la mayoría tendrá su óptimo crecimiento a salinidades más bajas (20-50 ups) (Johnson *et al.*, 1968).

La disponibilidad del nitrógeno en el medio de cultivo regula el crecimiento en las microalgas; en *D. salina*, un incremento en la concentración de la fuente de nitrógeno, mejora el crecimiento celular, en contraste, si la disponibilidad de nitrógeno es limitada, disminuye su crecimiento, pero se potencia la producción de pigmentos carotenoides (Pisal y Lele, 2005; Sánchez-Estudillo *et al.*, 2006). Los resultados de este trabajo mostraron un mayor crecimiento de la microalga cuando las células se mantuvieron con una concentración de nitrógeno equivalente al 100% de la concentración de este compuesto en el medio "f/2" ( $\text{NaNO}_3$ ), y se presentó una disminución considerable de la densidad celular cuando se combinaron altas salinidades (100 ups) con una privación casi total de nitrógeno. Esta respuesta de las células, varía dependiendo de la especie de *Dunaliella* y de la fuente de nitrógeno (Giordano y Bowes, 1997), los resultados de estudios previos con la cepa de *Dunaliella* utilizada en este trabajo, sugieren que prefiere el nitrógeno de una fuente como la urea, como el que estuvo disponible en el fertilizante Triple 17 (Prado-Brambila, 2015), es posible que la preferencia por esta forma de nitrógeno se deba a que la asimilación de la urea es energéticamente menos costosa que la del nitrato de sodio (Ibañez *et al.*, 2006).

La mayor tasa de crecimiento ( $\mu$ ) para *Dunaliella*, observada en este trabajo, fue de  $1.47 \text{ div} \cdot \text{día}^{-1}$  con el medio "f/2" y coincide con las observadas por Humphrey (1979) y Cifuentes *et al.* (2001), quienes utilizaron condiciones de temperaturas e intensidades de luz similares a las de este trabajo, y obtuvieron una tasa de crecimiento de  $1.4 \text{ div} \cdot \text{día}^{-1}$  para *D. parva* y  $1.7 \text{ div} \cdot \text{día}^{-1}$  para *D. tertiolecta*, en medios de cultivo Johnson y "f", respectivamente. Es importante mencionar que las divisiones celulares varían dependiendo de la especie, del medio nutritivo utilizado, así como de la intensidad de luz y la temperatura (Borowitzka y Borowitzka, 1988).

En este trabajo fue evidente una relación directa entre el volumen celular y la concentración salina, ya que a medida que las salinidades fueron más altas se observó un mayor volumen y un cambio en la morfología de la célula, pasando de una forma ovoide a una esférica. Estos cambios en el volumen de *Dunaliella* se han reportado en otros trabajos (Jiménez y Niell, 1991; Avron y Ben-Amotz, 1992), lo que se atribuye al proceso de osmorregulación de la célula, que sintetiza y acumula glicerol, para contrarrestar el efecto osmótico del incremento de solutos (sal) en el medio. Jiménez y Niell (1991), mencionan que, al aumentar la salinidad, además de este osmolito, *D. viridis* acumula nitratos, proteínas estructurales y aminoácidos libres.

Los mayores volúmenes celulares, de 57.33 a 67.67  $\mu\text{m}^3$ , se alcanzaron con salinidades de 200 y 300 ups y con una intensidad de luz de 400  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . De manera similar, Jiménez y Niell (1991) observaron volúmenes celulares de 115  $\mu\text{m}^3$  en *D. viridis* cultivada en un medio de 200 ups. En contraste, cuando *D. salina*, se cultiva en un medio con una salinidad de 300 ups, puede incrementar su volumen celular hasta 2000  $\mu\text{m}^3$  (García *et al.*, 2007).

En condiciones de estrés salino, *Dunaliella* produce glicerol para proteger los sistemas encargados de la fotosíntesis en la célula, este proceso biosintético involucra la utilización del bióxido de carbono y de los recursos energéticos para la producción de este osmolito. Cuando *D. parva* se cultiva en un medio con una salinidad superior a 290 ups y se le suministra almidón como principal fuente de carbono, la energía que las células obtienen es utilizada exclusivamente para la producción de glicerol (Ben-Amotz y Avron, 1973). Además del glicerol, se ha reportado que cuando *Dunaliella* se cultiva en un medio con deficiencia de nitrógeno, también mejora la asimilación fotosintética de  $\text{CO}_2$ , para producir sustancias de reserva (Liska *et al.*, 2004). Aunque en este trabajo no se analizó la producción de glicerol por parte de *Dunaliella*, el volumen celular podría ser un indicativo de que se haya producido en las células con mayor volumen, sin embargo, queda pendiente este estudio, para considerarlo en futuros trabajos con esta especie.

En cuanto a la intensidad de luz, se utilizó una intensidad superior a los 300  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , ya que el estudio realizado por Hejazi *et al.* (2004), demostró que cuando *Dunaliella salina* se cultiva con una intensidad de 800 a 1500  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , se pueden alcanzar las máximas concentraciones celulares, sin embargo, en este trabajo se encontró que las intensidades de luz por arriba de los 400  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  combinadas con salinidades de 300 ups ocasionaban la muerte de las células, por lo que es posible que, en esta condición, la célula aún tenga la capacidad de fotosintetizar, más no de producir pigmentos accesorios de protección contra los efectos adversos de la luz, como los pigmentos carotenoides. Además, en este trabajo, el análisis

de pigmentos reveló que con las mayores salinidades y con las mayores intensidades de luz, la producción de pigmentos carotenoides como la luteína, fue menor.

Es importante mencionar que la gran mayoría de los trabajos con *Dunaliella* se enfocan principalmente en la producción de  $\beta$ -caroteno y, de manera regular, se analiza este pigmento, o el contenido total de carotenoides y la clorofila  $a$ . En este sentido, este trabajo contribuye a la caracterización fisiológica de esta microalga y, el análisis de su composición de pigmentos, ofrece un panorama más completo sobre su posible utilización para la producción de otros pigmentos de interés.

La evaluación de la composición de pigmentos de *Dunaliella*, indicó que cuando se cultiva con una combinación de diferentes concentraciones de nitrógeno y salinidad, ésta última promueve cambios en la concentración de clorofila  $a$  durante las fases de crecimiento. En este estudio, la mayor cantidad de clorofila  $a$  se produjo con una salinidad de 100 ups. Marín *et al.* (1998) encontraron que un incremento en la salinidad del medio también produce un aumento en la cantidad de clorofila  $a$ , pero hasta una salinidad máxima de 208 ups, ya que más allá de este límite, la concentración de este pigmento disminuye en forma considerable. Este mismo efecto se observó en los experimentos de inducción en el presente trabajo, donde se probaron salinidades de hasta 300 ups.

En relación con el efecto de la disponibilidad de nitrógeno sobre la concentración de clorofila  $a$ , las mayores cantidades de este pigmento se encontraron en las microalgas cultivadas con concentraciones de nitrógeno de 50 y 100%, en salinidad de 100 ups. En *D. tertiolecta*, Young y Beardall (2003) y López-Elías *et al.* (2013) observaron que, al limitar a la célula de nitrógeno, los niveles de clorofila  $a$  disminuían, pero al incrementar la concentración de nitrógeno en el medio, la producción del pigmento se restablecía en 24 horas. De manera similar, otros estudios han demostrado que, en *D. salina*, la concentración de clorofila  $a$  por célula no difiere bajo condiciones de limitación de nitrógeno, lo contrario sucede con el  $\beta$ -caroteno. Esta característica de *D. salina* se ha utilizado para la optimización de la producción de este pigmento (Sánchez-Estudillo *et al.*, 2006).

La mayor concentración de clorofila  $a$  ( $2.7 \text{ pg cél}^{-1}$ ) se encontró en el día cuatro de cultivo con una concentración de 100% nitrógeno y 100 ups de salinidad, cabe destacar que la intensidad de luz en este experimento fue de  $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ; la concentración máxima del pigmento corresponde al 12% del peso seco de la célula. En el experimento sin nitrógeno y una salinidad de 100 ups, pero con una intensidad de luz de  $200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , se observaron los valores mayores ( $1.38 \text{ pg cél}^{-1}$ ). En un estudio previo con *D. salina*

(Gutiérrez-Millán, 1996), cuantificaron concentraciones de clorofila *a* de 2.9 pg cél<sup>-1</sup> a los 18 días de cultivo con un medio rico en nitrato, salinidad de 150 ups, temperatura de 29 °C e intensidad de luz de 150 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>. Otros estudios en *D. salina* han encontrado cantidades de clorofila *a* en un intervalo de 4.29 a 10 pg cél<sup>-1</sup> (Orset *et al.*, 1999; Cifuentes *et al.*, 2001; García *et al.*, 2007).

En relación con la luteína, se observó una relación inversamente proporcional entre su concentración y la del β-caroteno durante el período de crecimiento. La concentración de luteína se incrementó desde el inicio del cultivo hasta el día 12 en la salinidad de 100 ups, mientras que la concentración de β-caroteno disminuyó en todos los tratamientos a partir del día ocho e inclusive siguió disminuyendo para el día 12 de cultivo. La producción de luteína está ligada al precursor β, ε-caroteno, en una ruta metabólica diferente a la que se producen la cantaxantina y la astaxantina, que tienen como precursor al isómero β, β-caroteno. Este aumento en la concentración de luteína y por consecuencia, la disminución del β-caroteno, podría explicarse por el efecto de la intensidad de luz, ya que cuando la concentración celular en los cultivos es muy reducida, la penetración de la luz es mayor y puede provocar que la ruta bioquímica se perfile hacia la producción de luteína. Según Douce y Joyard (1996), en las cepas con una capacidad limitada para producir β-caroteno, la luteína es el principal pigmento fotoprotector de la célula, lo cual podría además explicar las cantidades tan bajas de cantaxantina y astaxantina cuantificadas en el presente estudio.

Las mayores concentraciones de luteína (1.03 pg cél<sup>-1</sup>, correspondientes al 4.6% del peso seco de la célula), se obtuvieron con un medio de cultivo sin nitrógeno, a 200 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> y 100 ups de salinidad. En el experimento con limitación total de nutrientes también se alcanzó la mayor producción del pigmento en estas mismas condiciones ambientales. Las concentraciones obtenidas de luteína con base en peso seco fueron de 46.2 mg g<sup>-1</sup> en el medio de cultivo sin nitrógeno, a 200 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> y 100 ups de salinidad, éstos valores fueron superiores a las obtenidas por López-Elías *et al.* (2013), quienes reportaron concentraciones máximas de 10 pg cél<sup>-1</sup> en *D. tertiolecta* cultivada con concentraciones limitadas de nitrógeno (medio "f/6"), intensidad de luz y salinidad menores (139 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> y 38 ups) y temperatura de 26 °C. El-Baky *et al.* (2004), también obtuvieron valores más bajos en *D. salina*, (7.14 mg g<sup>-1</sup> de peso seco), en condiciones de cultivo de 80 ups de salinidad y en un medio nutritivo rico en nitrógeno.

En el experimento de crecimiento, la producción de β-caroteno alcanzó una concentración máxima de 0.54 pg cél<sup>-1</sup> (2.4% del peso seco de la célula), al día cuatro, con el tratamiento de 100% nitrógeno, 100 ups e intensidades de luz entre 100 y 200 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>. En los experimentos de inducción se observaron



resultados similares, la mayor concentración de  $\beta$ -caroteno ( $0.38 \text{ pg c\acute{e}l}^{-1}$ ) se encontró con la salinidad de 100 ups, pero con limitación total de nitrógeno. Ocampo-Álvarez (2005) encontró concentraciones de hasta  $10 \text{ pg c\acute{e}l}^{-1}$  en tres cepas de *D. salina*, cultivadas por un mayor tiempo (30 días) con una intensidad de luz de  $200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y salinidades entre 87 y 116 ups. Una gran cantidad de estudios han evaluado la concentración de  $\beta$ -caroteno en diversas especies de *Dunaliella*, principalmente en *D. salina* y *D. bardawil*, que se destacan por su capacidad de producir grandes cantidades de este pigmento, con concentraciones entre 4 y  $9 \text{ pg c\acute{e}l}^{-1}$  (Kleinegris *et al.*, 2001; Hejazi *et al.*, 2004; Pisal y Lele, 2005). Las cantidades producidas de  $\beta$ -caroteno, mencionadas anteriormente, y las obtenidas en otros trabajos, superan las cantidades del pigmento encontradas en este estudio, lo que podría sugerir que esta cepa no sea una productora potencial del pigmento, sin embargo, es pertinente aclarar que al momento de ser recolectada esta microalga se encontraba totalmente roja en su ambiente natural, lo que fue confirmado en el laboratorio por observaciones al microscopio, lo que indica que se requiere seguir evaluando otras condiciones de cultivo que permitan descartar ésta suposición.

La evaluación del contenido del carotenoide astaxantina en muestras tomadas durante el proceso de crecimiento de *Dunaliella*, mostró una disminución de su concentración al día ocho de cultivo, mientras que para el día 12 la concentración se incrementó nuevamente hasta alcanzar los valores observados el día cuatro. La concentración de nitrógeno tuvo un efecto en la producción de astaxantina a lo largo del experimento, por lo que una menor cantidad de nitrógeno en el medio de cultivo se relacionó con una menor producción del pigmento y las diferencias entre las concentraciones para los diferentes niveles del nitrógeno fueron significativas. Resultados similares fueron observados en *D. tertiolecta* por López-Elías *et al.* (2013).

La mayor cantidad de astaxantina ( $0.14 \text{ pg c\acute{e}l}^{-1}$ ) se obtuvo con una combinación de  $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , una salinidad de 35 ups y con un medio de cultivo sin nitrógeno, esta concentración corresponde al 0.24% del peso seco de la célula, una concentración muy similar a la obtenida en las microalgas cultivadas con un medio sin nutrientes y con salinidades de 35 ups. El-Baky *et al.* (2004) reportaron una producción de astaxantina de hasta  $21.31 \text{ mg g}^{-1}$  en *D. salina*, cultivada con una salinidad de 160 ups y limitación de nitrógeno, mientras que en este experimento solo se alcanzaron  $4 \text{ mg g}^{-1}$  con una salinidad de 100 ups. De acuerdo con los resultados de Scibilia *et al.* (2015) para *Haematococcus pluvialis*, la interacción entre la limitación de nitrógeno ( $17.65 \text{ mM}$  de nitrato de sodio) y las altas intensidades de luz ( $400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) potencian la producción de astaxantina, de tal forma que se alcanzan concentraciones de hasta  $2000 \text{ pg c\acute{e}l}^{-1}$ . Los resultados de la producción de astaxantina con la cepa utilizada en este estudio indican que no

es una candidata viable para la producción de este pigmento, comparada con especies del género *Haematococcus*, que son grandes productoras de astaxantina.

La cantaxantina alcanzó valores máximos de  $0.21 \text{ pg cél}^{-1}$  (0.95% del peso seco de la célula) en la fase de crecimiento (día 12), con una disponibilidad del 100% de nitrógeno, 100 ups de salinidad y  $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , lo cual concuerda con el experimento de inducción con la misma salinidad, pero sin nutrientes. No se encontraron trabajos que documentaran la presencia de este pigmento para *Dunaliella*, pero Grama *et al.* (2014) encontraron una producción de  $6 \text{ mg L}^{-1}$  de cantaxantina, como carotenoide primario, en la microalga *Dactylococcus dissociatus*, cultivada en un medio no limitado de nitrógeno y con intensidades de luz de  $600 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . En este trabajo, cuando la microalga se cultivó sin limitación del nitrógeno, la mayor producción de este pigmento fue de  $0.74 \text{ mg L}^{-1}$ .

Al evaluar el efecto de la intensidad de luz y la salinidad en la inducción a la carotenogénesis de *Dunaliella* sp. en los cultivos con altas concentraciones celulares ( $> 4.5 \times 10^6 \text{ cel}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), se observó un efecto significativo de estas variables en la concentración de los pigmentos astaxantina, cantaxantina y  $\beta$ -caroteno en los dos experimentos, sin nutrientes y sin nitrógeno. Sin embargo, en el experimento sin nutrientes, la luteína y la clorofila *a*, no fueron afectados por la salinidad, ni por su interacción con la intensidad de luz.

Las mayores concentraciones de pigmentos se cuantificaron con intensidades de luz entre 100 y  $600 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , con intensidades de luz mayores, se observó una disminución considerable de los pigmentos, excepto para el  $\beta$ -caroteno, que tiene una concentración similar sin importar la intensidad de la luz. Ben-Amotz y Avron (1990) y Orset y Young, (1999), explican que las intensidades altas de luz ( $600\text{-}800 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) en combinación con otros estresores, como altas salinidades ( $>100 \text{ ups}$ ) y bajas temperaturas ( $17^\circ\text{C}$ ) modulan el contenido de  $\beta$ -caroteno; sin embargo, Ben-Amotz (1996) explica que la deficiencia de nitrógeno (como en los dos experimentos de inducción del presente trabajo) pueden promover la producción de este pigmento con cualquier intensidad de luz.

Los pigmentos luteína y  $\beta$ -caroteno mostraron un aumento en su concentración en relación directa con el incremento en la salinidad, pero solo con intensidades de luz entre 100 y  $400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , es posible que este efecto esté relacionado con la capacidad de la célula para utilizar la energía en la producción de glicerol (que funciona como un osmolito) y que limita o impide la síntesis de pigmentos carotenoides (Ben-Amotz y Avron, 1973).

En relación con la identificación de la cepa de *Dunaliella* utilizada en este estudio, los resultados de los análisis genéticos no permitieron conocer su identificación a nivel de especie, no obstante, se pudo descartar que se tratara de *D. parva*, *D. salina* o *D. bardawil*.

La cepa de *Dunaliella* estudiada en este trabajo, en las condiciones de cultivo ensayadas, no mostró una capacidad destacada para la producción de pigmentos carotenoides de importancia comercial como el  $\beta$ -caroteno o la astaxantina, sin embargo, al igual que la mayoría de las clorofitas, tiene la capacidad de sintetizar cantidades considerables de clorofila *a* y luteína. En este sentido y tomando en consideración los conocimientos acumulados hasta ahora para esta microalga, resulta una candidata importante para la producción de ácidos grasos y biomasa, que puede ser utilizada tanto para la alimentación de otros organismos de importancia en la acuicultura, como para la producción de biocombustibles o para la biorremediación de efluentes. Cabe destacar que es posible cultivar esta microalga con fertilizantes agrícolas, por su capacidad de asimilar de manera indistinta el amonio, la urea y el nitrato como fuente de nitrógeno. Por último, dada la capacidad de adaptación de esta microalga a las altas salinidades del medio de cultivo, con el consecuente aumento de su volumen, resulta conveniente evaluar y medir su capacidad de producción de glicerol, que es otro compuesto químico de gran importancia económica.

## Capítulo 5. Conclusiones

---

1. Los mejores crecimientos de *Dunaliella* sp. en este estudio se obtuvieron con el medio "f", sin embargo, los estudios previos de esta microalga sugieren que se puede cultivar con el fertilizante agrícola Triple 17, con resultados similares y posiblemente con un menor costo.
2. La intensidad de luz en la que se encontraron los mejores crecimientos de *Dunaliella* sp. fue de  $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , lo que confirma las observaciones de Prado-Brambila (2015) para la misma cepa.
3. La cepa de *Dunaliella* sp. estudiada en este trabajo tiene una amplia tolerancia a la salinidad (halotolerante), pero su crecimiento óptimo se encontró a 35 ups de salinidad y en un medio sin limitación de nitrógeno.
4. El incremento en la salinidad del medio de cultivo produce un cambio en el volumen celular de *Dunaliella*, los mayores volúmenes celulares se observaron cuando la microalga se cultivó en un medio con una salinidad de 200 ups, una intensidad de luz de  $400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y en ausencia de nitrógeno.
5. La intensidad de luz, la salinidad del medio, la disponibilidad del nitrógeno y sus interacciones juegan un papel importante en la producción de pigmentos en *Dunaliella* sp., sin embargo, la concentración de estos fue muy limitada bajo las condiciones de estudio.
6. Las mayores cantidades de clorofila *a*,  $\beta$ -caroteno y cantaxantina se encontraron en el experimento de crecimiento a intensidad de luz de  $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , 100 ups y  $882 \mu\text{mol L}^{-1}$  (100% nitrógeno). Las mayores concentraciones de luteína y astaxantina se encontraron en el experimento de inducción sin nitrógeno, a intensidades de luz entre 100 y  $200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , y salinidad de 35 (astaxantina) y 100 ups (luteína).
7. Las concentraciones de luteína y clorofila *a* de *Dunaliella* sp. se encuentran en los intervalos observados en otras especies del mismo género.

## Literatura citada

---

- Albanes, D., Heinonen, O., Taylor, P., Virtamo, J., Edwards, B., Rautalahti, M., Hartman, A., Palmgren, J., Freedman, L., Haapakoski, J., Barrett, M., Pietinen, P., Malila, N., Tala, E., Liippo, K., Salomaa, E., Tangrea, J., Teppo, L., Askin, F., Taskinen, E., Erozan, Y., Greenwald, P. y Huttunen, J. (1996).  $\alpha$ -Tocopherol and  $\beta$ -Carotene Supplements and Lung Cancer Incidence in the Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study: Effects of Base-line Characteristics and Study Compliance. *J Natl Cancer Inst*, 88 (21), 1560-1570.
- Alvarado, D., Buitrago, E., Solé, M. y Frontado, K. (2008). Experimental evaluation of a composted seaweed extract as microalgal culture media. *Aquaculture International*, 16(1), 85–90.
- Andersen, R. A. (2013). The Microalgal Cell. En A. Richmond & Q. Hu (Eds.), *Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology* (Segunda, p. 719). Nueva Delhi: Wiley Blackwell.
- Asada, K. (2006). Production and scavenging of reactive oxygen especies in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology*, 141, 391-396.
- Ausubel, F., Brent, R. y Kingston, R. (1992). Short protocols in molecular Biology. Segunda edición. Greene Publishing Associates and John Wiley and Sons, Inc. USA, 16-89.
- Avron, M. y Ben-Amotz, A. (1992). En *Dunaliella Physiology Biochemistry and Biotechnology*. CRC Press, p.240.
- Barsanti, L. y Gualtieri, P. (2014). Algal Culturing. En *Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology* (Segunda, p.326). CRC Press, Taylor & Francis group.
- Ben-Amotz, A. (1996). Effect of low temperature on the stereoisomer composition of  $\beta$ -carotene in the halotolerant alga *Dunaliella bardawil* (Chlorophyta). *Journal of Phycology*, 32, 272-275.
- Ben-Amotz, A. y Avron, M. (1973). The role of glycerol in the osmotic regulation of the halophilic alga *Dunaliella parva*. *Plant Physiology*, 51, 875-878.
- Ben-Amotz, A. y Avron, M. (1983). On the Factors Which Determine Massive  $\beta$ -Carotene Accumulation in the Halotolerant Alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiology*, 72(3), 593–597.
- Ben-Amotz, A. y Avron, M. (1990). The Biotechnology of cultivating the halotolerant alga *Dunaliella*, *Trends Biotechnology*, 8, 121-126.
- Ben-Amotz, A., Katz, A. y Avron, M. (1982). Accumulation of  $\beta$ -carotene in halotolerant algae: purification and characterization of  $\beta$ -carotene-rich globules from *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae). *J. Phycol.*, 18, 529–537.
- Borowitzka, M. A. (1997). Microalgae for aquaculture: opportunities and constraints. *Journal of Applied Phycology*, 9, 393.
- Borowitzka, L. J. y Borowitzka, M. A. (1988). *Dunaliella*. En: *Microalgal Biotechnology* (eds M.A. Borowitzka y L.J. Borowitzka), pp. 27-58. Cambridge University Press.
- Borowitzka, L. J., Borowitzka, M. A. y Moulton, T. P. (1984). Production and utilization of microalgae The mass culture of *Dunaliella salina* for fine chemicals : From laboratory to pilot plant. *Hydrobiologia*, 116/117, 115–134.
- Borowitzka, M. A. y Hallegraeff, G. (2007). Economic importance of algae. In *Algae of Australia* (pp. 594–622). Canberra: ABRS.
- Borowitzka, M. A. y Siva, C. J. (2007). The taxonomy of the genus *Dunaliella* (Chlorophyta, Dunaliellales) with emphasis on the marine and halophilic species. *Journal of Applied Phycology*, 19(5), 567–590.

- Boussiba, S. (2000). Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: Cellular physiology and stress response. *Plant Physiology*, 108, 111-117.
- Britton, G. (1998). Overview of Carotenoid Biosynthesis. En: *Carotenoids, vol. 3, Biosynthesis and Metabolism*, ed. G. Britton, S. Liaaen-Jensen y H. Pfander, 13-147.
- Cifuentes, A. S., González, M. A., Inostroza, I. y Aguilera, A. (2001). Reappraisal of physiological attributes of nine strains of *Dunaliella* (Chlorophyceae): growth and pigment content across a salinity gradient. *Journal of Phycology*, 37(2), 334-344.
- Douce, R. y Joyard, J. (1996). Biosynthesis of thylakoid membrane lipids. En: *Oxygenic photosynthesis: the light reactions*, pp. 69-101. *Academic Publishers*, The Netherlands.
- Dubinsky, Z., Matsukawa, R. y Karube, I. (1995). Photobiological aspects of algal mass culture. *J. Mar. Biotechnol*, 2, 61-65.
- El-Baky, H., El-Baz, F. y El-Baroty, G. (2004). Production of antioxidant by the Green alga *Dunaliella salina*. *International journal of agriculture and biology*, 6, 49-57.
- Fabregas, J., Herrero, C., Abalde, J., Liaño, R. y Cabezas, B. (1986). Biomass production and biochemical variability of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) with high nutrient concentrations. *Aquaculture*, 53(3-4), 187-99 .
- Fromme, P., Yu, H., DeRuyter, Y.S., Jolley, C., Chauhanm, D.K., Melkozernov y Grotjohann. (2006). Structure of photosystems I and II. *C.R. Chimie* 9 (2). 188-200.
- García, F., Freile-Pelegrín, Y. y Robledo, D. (2007). Physiological characterization of *Dunaliella* sp. (Chlorophyta, Volvocales) from Yucatan, Mexico. *Bioresource Technology*., 98, 1359-1365.
- García-González, M., Moreno, J., Cañavate, J. P., Anguis, V., Prieto, a., Manzano, C. y Guerrero, M. G. (2003). Conditions for open-air outdoor culture of *Dunaliella salina* in southern Spain. *Journal of Applied Phycology*, 15(2-3), 177-184.
- Giordano, M. y Bowes, G. (1997). Gas exchange and C allocation in *Dunaliella salina* cells in response to the N source and CO<sub>2</sub> concentration used for growth. *Plant Physiology*, 115, 1049-1056.
- Gómez-Pinchetti, J. L., Ramazanov, Z., Fontes, A. y García-Reina, G. (1992). Photosynthetic characteristics of *Dunaliella salina* (Chlorophyceae, Dunaliellales) in relation to  $\beta$ -carotene content. *Journal of Applied Phycology*, 4(1), 11-15.
- Goodwin, T.W. (1980). The Biochemistry of the carotenoids. En: *Plants*. Vol. 1. (p. 377). Chapman and Hall.
- Grama, B., Chader, S., Khelifi, D., Agathos, Spiros y Jeffryes, C. (2014). Induction of canthaxanthin production in a *Dactylococcus* microalga isolated from the Algerian Sahara. *Bioresource Technology*, 151, 297-305.
- Guillard, R. R. L. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. pp 26-60. En: Smith W.L. y Chanley M.H. (Eds.) *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Plenum Press, New York, USA.
- Gutiérrez-Millán, L. E. (1996). Acido desoxiribonucleico, proteína y pigmentos durante la carotenogénesis inducida en una nueva cepa de *Dunaliella salina* (Chlorophyta), aislada de una laguna hipersalina de Baja California. CICESE.
- Hejazi, M., Holwerda, E., Wijffels, R. (2004). Milking microalga *Dunaliella salina* for beta-carotene production in two-phase bioreactors. *Biotechnology Bioengineering*, 85, 475-481.
- Hemaiswarya, S., Raja, R., Kumar, R. R., Ganesan, V. y Anbazhagan, C. (2011). Microalgae: A sustainable feed source for aquaculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(8), 1737-1746.

- Herrero, C., Fábregas, J. y Abalde, J. (1991). Yields in biomass and chemical constituents of four commercially important marine microalgae with different culture media. *Aquaculture Engineering*, 10, 99-110.
- Hillebrand, H., Durselen, C., Kirschtel, D., Pollinger, U. y Zohary, T. (1999). Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of Phycology*, 35, 403-424.
- Hooker, S. y Heukelem, L. (2011). A symbology and vocabulary for an HPLC lexicon. En: *Phytoplankton Pigments. Characterization, Chemotaxonomy and applications in Oceanography*. Cambridge University Press, United Kingdom, pp.243-256.
- Hosseini, M. y Ghasemi, Y. (2016). Culture medium optimization for enhanced  $\beta$ -carotene and biomass production by *Dunaliella salina* in mixotrophic culture. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, Vol. 7, 217-223.
- Hosseini, A. y Shariati, M. (2008). *Dunaliella* biotechnology: methods and applications. *Journal of Applied Microbiology*, 107, 14-35.
- Hu, Q. (2013). Environmental Effects on Cell Composition. En *Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology* (p. 719).
- Humphrey, G. F. (1979). Photosynthetic characteristics of algae grow under constant illumination and light-dark regimes. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 40, 63-70.
- Ibañez, R. y Calderón-Rodríguez, A. (2006). Effect of different nitrogen sources on the carotenoid and chlorophyll content of four peruvian strains of *Dunaliella salina* Teod. *Ecología aplicada*, 5.
- Jahnke, L. S. (1999). Massive carotenoid accumulation in *Dunaliella bardawil* induced by ultraviolet-A radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 48(1), 68-74.
- Jahnke, L. S. y White, A. L. (2003). Long-term hyposaline and hypersaline stresses produce distinct antioxidant responses in the marine alga *Dunaliella tertiolecta*. *Journal of Plant Physiology*, 160, 1193-1202.
- Jiménez, C. y Niell, F. X. (1991). Growth of *Dunaliella viridis* Teodoresco: effect of salinity, temperature and nitrogen concentration. *Journal of Applied Phycology*, 3, 319-327.
- Jin, E. y Melis, A. (2003). Microalgal biotechnology: carotenoid production by the green alga *Dunaliella salina*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 8, 331.
- Johnson, M. K., Johnson, E. J., Mac Elroy, R. D., Speer, H. L. y Bruff, B. S. (1968). Effects of salts on the halophilic alga *Dunaliella viridis*. *Journal of Bacteriology*, 95, 1461-1468.
- Kirst, G. O. (1990). Salinity Tolerance of Eukaryotic Marine Algae. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 41(1), 21-53.
- Kleinegris, D., Janssen, M., Brandenburg, W. y Wijffels, R. (2001). Continuous production of carotenoids from *Dunaliella salina*. *Enzyme and Microbial Technology*, 48, 253-259.
- Kurpan Nogueira, D. P., Silva, A. F., Araújo, O. Q. F. y Chaloub, R. M. (2015). Impact of temperature and light intensity on triacylglycerol accumulation in marine microalgae. *Biomass and Bioenergy*, 72, 280-287.
- Lamers, P., Janssen, M., De Vos, R., Bino, R. y Wijffels, R. (2012). Carotenoid and fatty acid metabolism in nitrogen-starved *Dunaliella salina*, a unicellular green microalga. *J. Biotechnol.*, 162 (1), 21-27.
- Langhans, R. y Tibbitts, T. (1997). Plant Growth Chamber Handbook. *North central regional research publication*, Iowa, p. 240.

- Liska, A., Shevchenko, Pick, U. y Katz, A. (2004). Enhanced photosynthesis and redox energy production contribute to salinity tolerance in *Dunaliella* as revealed by homology-based proteomics. *Plant Physiology*, 136, 2806-2817.
- Liu, B. y Lee, Y. (2000). Secondary carotenoids formation by the green alga *Chlorococcum* sp. *Journal of Applied Phycology*, 12, 301–307.
- López-Elías, J. A., Fimbres-Olivarría, D., Medina-Juárez, L. A., Miranda-Baeza, A., Martínez-Córdova, L. R. Y Molina-Quijada, D. M. (2013) Production of biomass and carotenoids of *Dunaliella tertiolecta* in nitrogen-limited cultures. *International Journal of Experimental Botany*, 82, 23-30.
- Marín, N., Morales, F., Lodeiros, C. y Tamigneaux, E. (1998). Effect of nitrate concentration on growth and pigment synthesis of *Dunaliella salina* cultivated under low illumination and preadapted to different salinities. *Journal of Applied Phycology*, 10(4), 405–411.
- Masojídek, J., Koblížek, M. y Torzillo, G. (2004). Photosynthesis in microalgae. En: *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, pp. 20-39, editado por Richmond, Blackwell Science, United Kingdom.
- Mata, T. M., Martins, A. A. y Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(1), 217–232.
- Muller-Feuga, A. (2000). The role of microalgae in aquaculture: situation and trends. *Journal of Applied Phycology*, 12(1998), 527–534.
- Ocampo-Alvarez, H. (2005). *Concentración de  $\beta$ -caroteno en cepas de Dunaliella salina de la región de Baja California en condiciones no estresantes de cultivo y caracterización de su comunidad bacteriana asociada*. CICESE.
- Olmos, J., Paniagua, J. y Contreras, R. (2000). Molecular identification of *Dunaliella* sp. utilizing the 18S Rdna gene. *Letter in Applied Microbiology*, 30, 80-84.
- Oren, A. (2005). A hundred years of *Dunaliella* research: 1905-2005. *Saline Systems*, 1, 2.
- Orset, S. y Young, A. J. (1999). Low-temperature-induced synthesis of  $\alpha$ -carotene in the microalga *Dunaliella salina* (Chlorophyta). *Journal of Phycology*, 35, 520–527.
- Osmond, B. y Forster, B. (2006). Photoinhibition: then and now, pp. 11-22. En: *Photoprotection, photoinhibition, gene regulation and environment. Advances in Photosynthesis and Respiration Series, Volumen 21*. Springer, The Netherlands.
- Pisal, D. S. y Lele, S. S. (2005) Carotenoid production from microalga, *Dunaliella salina*. *Indian Journal of Biotechnology*, 4, 476-483.
- Porra, R., Pfundel, E. Y Engel, N. (1997). Metabolism and function of photosynthetic pigments, pp. 85-120. En: *Phytoplankton pigments in Oceanography*. Ediciones Jeffrey y Wright. UNESCO Publishing, Francia.
- Prado-Brambila, M. P. (2015). *Crecimiento y composición bioquímica de la microalga Dunaliella sp., en diferentes condiciones de cultivo*. CICESE.
- Prieto, A., Pedro Cañavate, J. y García-González, M. (2011). Assessment of carotenoid production by *Dunaliella salina* in different culture systems and operation regimes. *Journal of Biotechnology*, 151(2), 180–185.
- Renaud, S. M., Parry, D. L. y Thinh, L.-V. (1994). Microalgae for use in tropical aquaculture I: Gross chemical and fatty acid composition of twelve species of microalgae from the Northern Territory, Australia. *Journal of Applied Phycology*, 3(6), 337–345.



- Research, B. (2010). *The Global Market for Carotenoids*. Retrieved from <http://www.bccresearch.com/market-research/food-and-beverage/carotenoids-market-fod025c.html>
- Sadka, A., Lers, A., Zamir, A. y Avron, M. (1989). A critical examination of the role of de novo protein synthesis in the osmotic adaptation of the halotolerant alga *Dunaliella*. *FEBS Lett* 244: 93-98.
- Sánchez-Estudillo, L., Freile-Pelegri, Y., Rivera-Madrid, R., Robledo, D. y Nárvaez-Zapata, J. A. (2006). Regulation of two photosynthetic pigment-related genes during stress-induced pigment formation in the green alga, *Dunaliella salina*. *Biotechnology Letters*, 28, 787-791.
- Sánchez-Saavedra, M. P., Jiménez, C. y Figueroa, F. L. (1996). Variable fluorescence of chlorophyll a in *Dunaliella bardawil* with different  $\beta$ -carotene content. *Scientia Marina*, 60(1), 227–231.
- Santos, S. y Maciel, R. (2010). Modeling growth of microalgae *Dunaliella salina* under different nutritional conditions. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 6 (4), 279-283.
- Sasso, S., Pohnert, G., Lohr, M., Mittag, M. y Hertweck, C. (2012). Microalgae in the postgenomic era: A blooming reservoir for new natural products. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(4), 761–785.
- Schiedt, K. (1998). Absorption and metabolism of carotenoids in birds, fish and crustaceans, pp. 285-358. En: *Carotenoids, vol.3: Biosynthesis and metabolism*. G. Britton, Switzerland.
- Sciandra, A., Gostan, J., Collos, Y., Descolas-Gros, C., Leboulanger, C., Martin-Jézéquel, V., Denis, M., Lefèvre, D., Copin-Montégut, C. y Avril, B. (1997). Growth-compensating phenomenon in continuous cultures of *Dunaliella tertiolecta* limited simultaneously by light and nitrate. *Limnol. Oceanogr.*, 42, 1325-1339.
- Scibilia, L., Girolomoni, L., Berteotti, S., Alboresi, A., Ballottari, M. (2015). Photosynthetic response to nitrogen starvation and high light in *Haematococcus pluvialis*. *Algal Research*, 12, 170-181.
- Seok-Young, L., So-Hyun, Kim, Sun-Hee, H., Hyo-Won S., Seong-Joo, H., Byung-Kwan, C., Choul-Gyun, L., Hookeun, L. y Hyung-Kyoon, C. (2014). Fatty acids and global metabolites profiling of *Dunaliella tertiolecta* by shifting culture conditions to nitrate deficiency and high light at different growth phases. *Process Biochemistry*, 49 (6), 996-1004.
- Sevilla, J. M. F., García, M. C. C. y Mirón, A. S. (2004). Pilot-plant-scale outdoor mixotrophic cultures of *Phaeodactylum tricornutum* using glycerol in vertical bubble column and airlift photobioreactors: studies in fed-batch mode. *Biotechnology Progress*, 20, 728–736.
- Shariati, M. (2003). Characterization of three species of *Dunaliella salina*, *Dunaliella parva* and *Dunaliella pseudosalina* isolated from salt marsh of Gave khoni of Isfahan-Iran. *Iranian Journal of Science and Technology*, 27, 185-190.
- Solovchenko, A. E., Khozin-Goldberg, I., Didi-Cohen, S., Cohen, Z. y Merzlyak, M. N. (2008). Effects of light intensity and nitrogen starvation on growth, total fatty acids and arachidonic acid in the green microalga *Parietochloris incisa*. *Journal of Applied Phycology*, 20(3), 245–251.
- Subba Rao, D.V. (2009). Cultivation, growth media, division rates and applications of *Dunaliella* species. En *The Alga Dunaliella: Biodiversity, Physiology, Genomics and Biotechnology* (p.555). Science Publishers.
- Subba Rao, D.V. (1981). Growth response of marine phytoplankters to selected concentrations of trace metals. *Botanica marina*, 92, 369-379.
- Supamattaya, S., Kiriratnikom, S., Boonyaratpalin, M. y Borowitzka, L. (2005). Effect of *Dunaliella* extract on growth performance, health condition, immune response and disease resistance in black tiger shrimp (*Peneaus monodon*). *Aquaculture*, 248, 207-216.

- Steinbrenner, J. y Linden, H. (2001). Regulation of two carotenoid biosynthesis genes coding for phytoene synthase and carotenoid hydroxylase during stress-induced astaxanthin formation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant Physiol*, 125, 810-817
- Tang, H., Abunasser, N., Garcia, M. E. D., Chen, M., Simon Ng, K. Y. y Salley, S. O. (2011). Potential of microalgae oil from *Dunaliella tertiolecta* as a feedstock for biodiesel. *Applied Energy*, 88(10), 3324–3330.
- Thompson, P. a, Guo, M., Harrison, P. J. y Jnc, W. (1992). Effects of Variation in Temperature. I. On the Biochemical composition of Eight Species of Marine Phytoplankton. *Journal of Phycology*, 28(August 2015), 481–488.
- Tjahjono, A. E., Hayama, Y., Kakizono, T., Terada, Y., Nishio, N. y Nagai, S. (1994). Hyper-accumulation of astaxanthin in a green alga *Haematococcus pluvialis* at elevated temperatures. *Biotechnology Letters*, 16(2), 133–138.
- Uriarte, I., Farias, A., Hawkings, A.J.S., y Bayne, B.L. (1993). Cell characteristics and biochemical composition of *Dunaliella primolecta* Butcher conditioned at different concentrations of dissolved nitrogen. *Journal of Applied Phycology*, 5: 447-453.
- Vetchel, B., Eichenberger, W. y Ruppel, H.G. (1992). Lipid bodies in *Eremosphaera viridis* De Bary (Chlorophyceae). *Plant Cell Physiol.*, 33, 41-48.
- Vidussi, F., Claustre, H., Bustillos-Guzman, J., Cailliau, C. y Marty J. (1996). Determination of chlorophylls and carotenoids of marine phytoplankton: separation of chlorophyll *a* from divinyl-chlorophyll *a* and zeaxanthin from lutein. *Journal of Plankton Research*, 18(12), 2377-2382.
- Vonshak, A. (1986). Laboratory techniques for the cultivation of microalgae. En *Handbook of Microalgal Mass Culture* (pp. 117–145). CRC Press.
- Vonshak, A. y Torzillo G. (2004). Environmental Stress Physiology. En *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology* (p. 566). Blackwell Publishing.
- Vonshak, A., Torzillo, G., Masojidek, J. y Boussiba, S. (2001). Sub-optimal morning temperature induces photoinhibition in dense outdoor cultures of the alga *Monodus subterraneus* (Eustigmatophyta). *Plant Cell Environment*, 24, 1113-1118.
- Wijffels, R., Barbosa, M. y Janssen M. (2009). Cultivation of *Dunaliella* for High-Value Compounds. En: *The Alga Dunaliella: Biodiversity, Physiology, Genomics and Biotechnology*. Science Publishers, 91-110.
- Young, E. B. y Beardall, J. (2003). Photosynthetic function in *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyta) during a nitrogen starvation and recovery cycle. *Journal of phycology*, 39, 897-905.
- Zhi-Wei, Y., Jian-Guo, J. Y Guang-Hong, W. (2008). Biosynthesis and regulation of carotenoids in *Dunaliella*: Progresses and prospects. *Biotechnology Advances*, 26, 352-360.