Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada

CARACTERIZACION FENOTIPICA DE CEPAS DE *Dunaliella salina* PRODUCTORAS DE β-CAROTENO DE LA PENINSULA DE BAJA CALIFORNIA, MEXICO.

TESIS
MAESTRIA EN CIENCIAS

EDNA SANCHEZ CASTREJON

Ensenada, Baja California, Mexico. Enero de 1998

TESIS DEFENDIDA POR

EDNA SÁNCHEZ CASTREJÓN

Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITE

Dr. Jesús Paniagua Michell

Director del Comité

Dra. Diana Tentori Santacruz

Miembro del Comité

Dra. Beatriz Cordero Esquivel

Miembro del Comité

Dr. Roberto Iglesias Prieto

Miembro del Comité

Dr. Jaime Färber Lorda

Jefe del Departamento de Ecología

Dr. Federico Graef Ziehl

Director de Estudios de Posgrado

30 de enero de 1998

CENTRO DE INVESTIGACION CIENTIFICA Y DE EDUCACION SUPERIOR DE ENSENADA.

DIVISION DE OCEANOLOGIA.
DEPARTAMENTO DE ECOLOGIA

CARACTERIZACION FENOTIPICA DE CEPAS DE *Dunaliella salina* PRODUCTORAS DE β-CAROTENO DE LA PENINSULA DE BAJA CALIFORNIA, MEXICO.

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS presenta:

EDNA SANCHEZ CASTREJON

Ensenada, Baja California, México, Enero de 1998.

RESUMEN de la Tesis de EDNA SÁNCHEZ CASTREJÓN, *presentada como* requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS en ECOLOGÍA MARINA. Ensenada, Baja California, México. Enero de 1998.

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE CEPAS DE *Dunaliella salina* PRODUCTORAS DE ß-CAROTENO DE LA PENÍNSULA DE BAJA CALIFORNIA, MÉXICO.

Resumen aprobado por:

Dr. Jesús Paniagua Michell
Director de tesis

El principal objetivo de este trabajo fue aislar y determinar el potencial carotenogénico de cepas de *Dunaliella salina* productoras de ß-caroteno, una microlaga ubicua de ambientes hipersalinos de la Península de Baja California, México. La caracterización fenotípica se hizo con base a la tasa de crecimiento y a la composición de pigmentos de cultivos monoclonales.

La selección e identificación de las cepas se realizó con base al potencial carotenogénico de cepas aisladas de varios ambientes hipersalinos de la Península de Baja California, México, para lo cual se determinó la proporción de ß-caroteno y clorofila ***a***. Posteriormente se hicieron cultivos monoclonales de la cepa *Dunaliella salina* (BC02), aislada previamente de La Salina, Baja California y comparados con los monoclonales de *Dunaliella bardawil* (UTEX).

Los resultados obtenidos permitieron establecer diferencias entre las cepas, no así entre los clones. Sin, embargo, con base a las características de crecimiento y producción de carotenoides la cepa BC02 obtuvo los valores más altos.

Palabras clave: *Dunaliella salina*, ß-caroteno, caracterización fenotípica.

ABSTRACT of the Thesis of EDNA SÁNCHEZ CASTREJÓN, presented as partial requirement to obtain the MASTER IN SCIENCES degree in MARINE ECOLOGY. Ensenada, Baja California, México. January 1998.

PHENOTYPIC CHARACTERIZATION OF ß-CAROTENE PRODUCING STRAINS OF *Dunaliella salina* FROM THE PENINSULE OF BAJA CALIFORNIA, MEXICO.

The primary goal of the work presented in this study was to assess the potential for selection of *Dunaliella salina* strains producers of ß-carotene, an ubiquitous microalgae from hypersaline environments. Phenotypic characterization was undertaken based on the growth characteristics and pigment composition of clonal cultures.

Selection and identification of strains was performed on initial carotenogenic characterization based in the ratio carotenoids to chlorophyll ***a*** of isolates from several hipersaline environments of the Peninsule of Baja California, Mexico. Thereafter, clonal cultures were selected from *Dunaliella salina* strain (BC02), previously isolated from La Salina, Baja California and compared to isolates from *Dunaliella bardawil* (UTEX).

The obtained results assessed differences between strains but no among clones. However, based on growth characteristics and production of carotenoids, the strain BC02 obtained the high values.

Keywords: *Dunaliella salina*, ß-carotene, phenotypic characterization.

A mis padres y hermanos

AGRADECIMIENTOS

Sin duda una de las partes más difíciles es esta, ya que aún cuando uno quiere mencionar a todas las personas que de alguna forma hicieron posible este trabajo y manifestarles la magnitud de ese agradecimiento, uno siempre se queda "corto". A todas las personas e instituciones abajo mencionadas y a las que por un error de memoria no estén incluidas, mil gracias.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

A mi director de tesis Dr. Jesús Paniagua Michell por aceptarme en su proyecto y por su apoyo incondicional, pero sobre todo por su infinita paciencia y colaboración durante todo el desarrollo de la tesis.

A los miembros del comité de tesis, Dra. Beatriz Cordero E., Dra. Diana Tentori S. y al Dr. Roberto Iglesias P., por sus valiosos comentarios y correcciones al escrito así como al Dr. Jorge de la Rosa V. por su colaboración al inicio de este trabajo.

Al Dr. Vinicio Macías y al M.C Julio Villaescusa por su disposición y asesoría para realizar el análisis de las muestras en el HPLC en el Laboratorio de Química Analítica del Instituto de Investigaciones Oceanológicas, en especial al Oc. Víctor Macías por la ayuda y el tiempo que me dedicó en el laboratorio.

Al M.C Ricardo Searcy y al M.C. Antonio Trujillo por su asesoría en las cuestiones estadísticas.

A Sila Nájera y Carmen Bazán, responsables del Laboratorio de Lagunas Costeras del CICESE, por las facilidades prestadas durante el análisis de algunas muestras en dicho laboratorio.

A todas las personas del Departamento de Acuicultura, quienes pusieron a mi disposición todos los elementos necesarios para culminar este trabajo.

A *mis padres, hermanos* y *abuela* por su apoyo incondicional, pero sobre todo por creer en mi. A ellos, mi eterno agradecimiento.

A Luis, por compartir el presente.

A *mis amigos "paceños" en* Ensenada, Guillermo, Felipe, Armando, Edwyna, Andrés, Fernando, Roberto, Andrea y Gustavo por su amistad, tiempo y sueños compartidos. Todos ellos hicieron de mi estancia en esta ciudad, bastante llevadera.

A *mis compañeros de laboratorio*, Alejandro, Mauricio, Rosalía y Salomé por hacer las horas de laboratorio más cortas y amenas. Un especial agradecimiento a Lya por sus comentarios y consejos para este trabajo.

A mis compañeras de generación, Luz María, Paty Rojo y Paty Vilchis por su amistad.

A mis amigos en La Paz, en especial a Ernesto, Gina, Miguel y Rafael, quienes a pesar de estar allá se han mantenido siempre cerca.

A TV Azteca por *Mirada de Mujer*.

CONTENIDO

		Página
I.	INTRODUCCIÓN	1
	I.1. Objetivos	9
II.	MATERIALES Y MÉTODOS	10
	II.1. Localización de las áreas de colecta	10
	II.2. Muestreo	10
	II.3. Aislamiento e identificación de *Dunaliella salina*	10
	II.3.1. Aislamiento	13
	II.3.2. Identificación de la especie	15
	II.3.2.1. Condiciones de cultivo	15
	II.3.2.2. Densidad celular, peso seco y peso orgánico.	17
	II.3.2.3. Análisis de pigmentos	20
	II.3.2.4. Tamaño celular	21
	II.4. Elección de las líneas monoclonales	21
	II.4.1. Aislamiento de monoclonales de *Dunaliella salina*	21
	II.4.2. Condiciones experimentales	23
	II.4.3. Crecimiento	24
	II.4.4. Análisis de pigmentos	25
	II.4.5. Análisis de proteínas	26
	II.5. Análisis estadístico	28

CONTENIDO (Continuación)

	Página
III. RESULTADOS	29
III.1. Aislamiento e identificación de cepas de *Dunaliella salina*	29
III.1.1. Aislamiento de cepas	29
III.1.2. Identificación de la especie	30
III.1.3. Tamaño celular	36
III.2. Elección de líneas monoclonales	36
III.2.1. *Crecimiento*	40
III.2.2. Pigmentos	45
III.2.3. Proteínas totales	58
III.2.4. Análisis de agrupamiento	60
IV. DISCUSIÓN	62
V.1. Identificación de la especie	62
IV.2. Caracterización fenotípica	65
IV.2.1. Análisis entre cepas	66
IV.1.2. Análisis entre clones	68
IV.3. Relaciones fenotípicas	73
IV.4. Selección de cepas productoras de ß-caroteno	73
V. CONCLUSIONES	75
LITERATURA CITADA	76

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Localización de lo sitios de muestreo. Los sitios de muestreo se indican con las flechas.	11
2	Curva de calibración para la estimación de la densidad celular de las diferentes cepas de *Dunaliella salina*. a) Cepa Db, b) Cepa BC02 y c) Cepa BC06.	19
3	Curva de calibración para proteínas totales utilizando como estándar albúmina de suero de bovino (ABS). $Y = 0.0028$ x, $r^2 = 0.99$.	27
4	Espectro de absorción de los extractos metanólicos de la cepa Db. a) Condición control y b) condición inductora.	33
5	Espectro de absorción de los extractos metanólicos de la cepa BC02. a) Al inicio, b) condición control y c) condición inductora.	34
6	Espectro de absorción de los extractos metanólicos de la cepa BC06. a) Condición control y b) condición inductora.	35
7	Análisis de pigmentos mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de un extracto de *Dunaliella bardawil* cultivada en condición control (a) e inductiva (b). Identificación de picos 1. Clorofila ***a***, 2. α-caroteno, 3. All-trans-ß-caroteno y 4. cis-ß-caroteno	37
8	Perfil cromatográfico (HPLC) de los pigmentos extraídos de *Dunaliella salina*, cepa BC02, cultivada en condición control (b) e inductiva (a). Identificación de picos como en la figura 7.	38
9	Separación cromatográfica (HPLC) de pigmentos de *Dunaliella salina*, cepa BC06, cultivada en condición control (a) e inductiva (b). Para la identificación de picos ver figura 7.	39
10	Concentración celular de los monoclonales aislados de las cepas Db y BC02 en condición control (Con) e inductiva (Ind) durante el tiempo de experimentación.	41

LISTA DE FIGURAS (Continuación)

Figura		Página
11	Concentración de clorofila ***a*** y ***b***, y carotenoides totales de los tres monoclonales de la cepa Db en condición control (Con) e inductiva (Ind) durante el período de experimentación. a) Db-A, b) Db-B y c) Db-C.	46
12	Concentración de clorofila ***a*** y ***b***, y carotenoides totales de los tres monoclonales de la cepa BC02 en condición control (Con) e inductiva (Ind) durante el período de experimentación. a) BC02-A, b) BC02-B y c) BC02-C.	47
13	Concentración de pigmentos de los monoclonales de la cepa Db en condición control (Con) e inductiva (Ind). a) Clorofila ***a***, b) clorofila ***b*** y c) carotenoides totales.	49
14	Concentración de pigmentos de los monoclonales de la cepa BC02 en condición control (Con) e inductiva (Ind). a) Clorofila ***a***, b) clorofila ***b*** y c) carotenoides totales.	50
15	Regresión lineal de la acumulación de carotenoides totales durante el tiempo de experimentación de los monoclonales aislados de la cepa DB. a) Db-A, $Y = 0.661 + 0.073x$, $r^2 = 0.91$; b) Db-B, $Y = 0.937 + 0.068x$, $r^2 = 0.96$; y c) Db-C $Y = 0.435 + 0.088x$, $r^2 = 0.89$.	54
16	Regresión lineal de la acumulación de carotenoides totales durante el tiempo de experimentación de los monoclonales aislados de la cepa BC02. a) BC02-A, $Y = -0.018 + 0.169x$, $r^2 = 0.96$; b) BC02-B, $Y = -0.199 + 0.242x$, $r^2 = 0.98$; y c) BC02-C $Y = -0.250 + 0.254x$, $r^2 = 0.99$.	55
17	Concentración de proteínas totales de los seis monoclonales en condición control (Con) e inductiva (Ind) para el día 10 y 20 de cultivo. a) Cepa Db y b) Cepa BC02.	59
18	Análisis de agrupamiento (UPGMA) para los monoclonales de ambas cepas. a) Clorofila ***a*** y ***b***, carotenoides totales, proteínas totales, número de células final y la tasa intrínseca de crecimiento por día, b) Clorofila ***a*** y ***b***, y carotenoides totales. En ambos casos se incluyen los datos de la condición control (Con) e inductora (Ind).	61

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Medio de cultivo utilizando de acuerdo a Ben-Amotz (1975) y Ben-Amotz y Avron (1983b) y modificado por Gutiérrez-Millán (1996).	13
II	Concentración promedio de nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-), fosfatos ($PO_4^{=}$) y silicatos (SiO_3^-) del agua de mar empleada para la elaboración de los medios de cultivo. Cada valor corresponde al promedio de cuatro muestras ± la desviación estándar.	17
III	Concentración inicial y final de clorofila ***a***, ß-caroteno y su respectiva relación. El valor de la concentración final corresponde al promedio y desviación estándar (n=3) de cada cepa analizada.	31
IV	Medias del tamaño celular promedio de las cepas Db, BC02 y BC06 (n = 30).	36
V	Densidad celular de los monoclonales al inicio y final del experimento.	42
VI	Valor máximo y mínimo de la tasa de crecimiento específica (μ) por día de los seis monoclonales analizados correspondientes a las cepas Db y BC02.	43
VII	Tasa de crecimiento específica (μ) de los seis monoclonales analizados correspondientes a las cepas Db y BC02, calculada a partir del inicio y final del experimento.	44
VIII	Análisis de varianza de dos factores (tratamiento x monoclonales) con repetición de la tasa de crecimiento específica (μ), $\alpha = 0.05$.	45
IX	Análisis de varianza anidado de dos niveles (cepas y clones) de la tasa de crecimiento específica (μ), $\alpha = 0.05$.	45
X	Concentración final ($pg \cdot cel^{-1}$) de clorofila ***a***, clorofila ***b*** y carotenoides totales de los seis monoclonales analizados de las cepas Db y BC02.	54

LISTA DE TABLAS (Continuación)

Tabla		Página
XI	Análisis de varianza de dos factores (*tratamientos* x *monoclonales*) *con repetición* del contenido final de carotenoides totales, $\alpha = 0.05$.	57
XII	Análisis de varianza anidado de dos niveles (cepas x clones) del contenido final de carotenoides totales, $\alpha = 0.05$.	57
XIII	Análisis de varianza anidado de tres niveles (cepas, clones y réplicas) del contenido final de carotenoides totales, $\alpha = 0.05$.	58

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE CEPAS DE *Dunaliella salina* PRODUCTORAS DE ß-CAROTENO DE LA PENÍNSULA DE BAJA CALIFORNIA, MÉXICO

I. INTRODUCCIÓN

La búsqueda de nuevas fuentes de alimento y energía así como la aplicación de técnicas avanzadas en biología molecular, bioquímica e ingeniería genética principalmente, dieron la pauta para el desarrollo dentro del campo de la ficología de la biotecnología microalgal. En un sentido más estricto, la biotecnología microalgal es la ciencia que aplica los conocimientos de la biología molecular, bioquímica e ingeniería genética a la maquinaria fotosintética y organolelos microalgales para la producción de alimentos, productos químicos y energía. Con el desarrollo de esta nueva disciplina se brindan perspectivas más amplias sobre la utilización y potencialidad de las microalgas, no sólo como alimento vivo para organismos de importancia en la acuacultura, sino también, como una fuente de biomoléculas de interés económico (Paniagua Michel, 1993).

A pesar de su potencial biotecnológico las microalgas han sido pobremente explotadas para fines económicos. Las microalgas poseen atributos únicos que las hacen candidatos idóneos para su explotación como son: 1) Adaptación fisiológica y plasticidad bioquímica, que les permite la bioconversión directa de la energía solar en compuestos químicos, 2) por ser organismos unicelulares, su biomasa entera posee el producto de interés lo que facilita su extracción, y 3)

ciclos de vida cortos lo cual facilita la selección y mejoramiento genético de las especies (Paniagua Michel, 1993).

Si bien la producción de microalgas como fuente de alimento para organismos de importancia en la acuacultura es insustituible, el principal interés de la biotecnología microaigal hoy en día es la producción de metabolitos y productos químicos de alto valor agregado como son: carotenoides, ficobilinas, ácidos grasos polinsaturados, polisacáridos y productos farmacéuticos, entre otros. Por otro lado, el desarrollo de esta ciencia se ve favorecido por los bajos costos que implica la producción de biomasa microalgal con fines biotecnológicos en comparación con los que implica su producción para la acuacultura (Borowitzka, 1988).

Una de las especies de microalgas de gran interés biotecnológico y que ha sido objeto de numerosos estudios en los últimos años es *Dunaliella salina* (Dunal) Teodoresco (Chlorophyta, Dunaliellales). El género *Dunaliella* incluye organismos de color verde, estrictamente aeróbicos y con fotosíntesis oxigénica. En cuanto a sus características morfológicas los organismos de este grupo presentan células vegetativas de forma elipsoide, esférica, ovoides, cilíndrica o de cuña así como dos undulipodios de igual tamaño en posición apical El tamaño de las células es de 4-10 µm de ancho y 6-15 µm de largo (Javor, 1989). A diferencia del resto de las clorofitas, este grupo carece de una pared celular rígida de polisacáridos (Borowitzka y Borowitzka, 1988). La reproducción asexual es por división binaria o por esporas, mientras que la sexual es de tipo isogamética (Bold

y Wynne, 1985). Su distribución dentro del ambiente marino incluye aguas oceánicas, salobres e hipersalinas (Borowitzka y Borowitzka, 1988; Javor, 1989).

Una característica notable de *D. salina* es su tolerancia a un amplio intervalo de salinidad que pueden fluctuar entre 4% y 35% (Borowitzka y Borowitzka, 1988; Javor, 1989). Su éxito en ambientes de salinidad extrema se debe a su capacidad para mantener un equilibrio osmótico con el medio exterior mediante la producción de glicerol vía fotosíntesis. Dado que el glicerol funciona como un soluto osmoregulador, su concentración intracelular está en función de las concentraciones de cloruro de sodio del medio (Ben-Amotz y Avron, 1981,1983a; Borowitzka y Borowitzka, 1988).

Otra aspecto particular de *D. salina* es su capacidad de producir y acumular carotenoides, especialmente ß-caroteno, lo que ocasiona que la coloración verde característica de las algas clorofitas, se torne anaranjada o rojiza. La acumulación de ß-caroteno se encuentra estrechamente relacionada a factores que limitan el crecimiento de esta especie, como pueden ser temperaturas altas, concentraciones bajas de nutrientes (principalmente NO_3, SO_4 y PO_4), salinidades altas, pH bajo, así como su exposición a altas intensidades lumínicas por ciclo celular (Loeblich, 1982; Ben-Amotz, 1987; Ben-Amotz y Avron, 1983a y b; Borowitzka y Borowitzka, 1988, Borowitzka *et al.*, 1984; 1989; Cifuentes *et al.*, 1992). En condiciones que promueven la carotenogénesis de *D. salina* también llamada *D. bardawil* (Borowitzka y Borowitzka, 1989) se ha encontrado que cerca del 14% de su peso seco es ß-caroteno (Ben-Amotz y Avron, 1983a; Borowitzka

et al, 1984), lo cual representa el 95% de los carotenoides presentes en esta microalga.

El ß-caroteno se acumula en forma de gotas pequeñas o glóbulos lipoideos en los espacios intertilacoidales del cloroplasto (Ben-Amotz *et al.*, 1982), lo que sugiere que más que un pigmento accesorio actúa como un filtro que protege a las moléculas de clorofila y del ADN de las altas intensidades lumínicas a las que está expuesta esta especie en el medio natural (Loeblich, 1982; Ben-Amotz y Avron, 1983a). El mecanismo de fotoprotección lo realiza este pigmento reduciendo la cantidad de luz que incide sobre los tilacoides al absorber la irradiación excesiva, principalmente en la región azul del espectro (Ben-Amotz *et al.*, 1989).

En condiciones de altas intensidades lumínicas y alto contenido de NaCl la composición isomérica del ß-caroteno acumulado por *D. salina* es de aproximadamente 50% all-*trans*-ß-caroteno y 40% 9-*cis*-ß-caroteno (Ben-Amotz *et al.*, 1982, 1988). Ben-Amotz y Avron (1989) proponen que la acumulación de ß-caroteno así como la proporción de los isómeros all-*trans*-ß-caroteno y 9-*cis*-ß-caroteno están relacionados estrechamente a la intensidad lumínica a la que están cultivadas las microalgas y es independiente del tipo de luz al que están expuestas, esto solo, dentro de la región fotosintéticamente activa del espectro (PAR).

Los tres principales productos de *D. salina* considerados para su comercialización son: ß-caroteno, glicerol y proteína. Sin embargo, hoy en día, el de mayor valor económico e industrial es el ß-caroteno. La utilización del ß-

caroteno es amplia y variada: colorante de productos alimenticios, fuente de provitamina A, aditivo en cosméticos, complejos vitamínicos y como tratamiento en algunas enfermedades hereditarias asociadas al hígado en humanos. Si bien el valor en el mercado de ß-caroteno obtenido de fuentes naturales es superior que el sintético, su importancia como suplemento nutricional justifica su alto costo. Recientemente el interés se ha centrado en la medicina preventiva, ya que se han encontrado que una dieta rica en ß-caroteno proveniente de fuentes naturales reduce la incidencia de algunos tipos de cánceres (Ben-Amotz y Avron, 1990). Por otro lado, experimentos realizados con ganado muestran un aumento en la fertilidad, atribuible a suplementos de ß-caroteno (Borowitzka y Borowitzka, 1989).

Tomando en cuenta que *D. salina* acumula la mayor cantidad de ß-caroteno que ninguna otra fuente vegetal (Aasen *et al.*, 1969: Ben-Amotz y Avron, 1980) y que las condiciones extremas de temperatura y salinidad que favorecen la acumulación de este metabolito facilitan el desarrollo de cultivos monoespecíficos, esta microalga constituye un organismo idóneo para su explotación biotecnológica (Borowitzka *et al.*, 1984; Moulton *et al.*, 1984).

En países como Australia, Israel y Estados Unidos existen compañías que producen a escala comercial ß-caroteno a partir de *D. salina*, mientras que en China y Chile se ha desarrollado proyectos piloto para su explotación, sin embargo hasta 1987-1988 la demanda de este pigmento excedió a su producción (Borowitzka y Borowitzka, 1989).

Dado el carácter ubicuo de *D. salina* en ambientes con salinidad extrema (Javor, 1989), es de esperarse que esta alga se distribuya a lo largo de las costas de la Península de Baja California, donde las condiciones climáticas permiten la ocurrencia de cuerpos de agua hipersalinos. Aún cuando existen por lo menos 14 hábitats hipersalinos con un área mayor a 30 hectáreas en ambas costas de la península (Del Castillo, 1988), los estudios orientados hacia la utilización con fines biotecnológicos de organismos de estos ambientes son escasos. En el caso particular de *D. salina*, los trabajos sobre esta zona geográfica sólo son puntuales y aislados

Del Castillo (1988) estudió la hidrología de un cuerpo de agua hipersalino en la costa occidental de la península conocido como la Salina, localizado a 35 km al Norte de la ciudad de Ensenada, B.C. En su estudio taxonómico encontró formas semejantes a *Dunaliella* mismas que formaba una fracción importante del plancton. Su identificación mediante criterios morfológicos fue difícil e incierta dada las características de la metodología empleada. Posteriormente, Gutiérrez-Millán y Paniagua-Michel (1994, 1995) aislaron y caracterizaron bioquímicamente cepas de microalgas con potencial carotenogénico de la misma zona de estudio, confirmando la presencia de *D. salina* en este cuerpo de agua.

Loeblich en 1982 aisló esta especie de la salina Punta Colorada B.C.S. demostrando, de manera conjunta, la relación directa entre salinidad, intensidad lumínica y la concentración de ß-caroteno en esta cepa. Actualmente esta cepa se

encuentra en la colección de la Universidad de Texas, E.U.A. con la clasificación UTEX 1644 (Starr y Zeikus, 1987).

Observaciones preliminares sugieren la presencia de *D. salina* en otros cuerpos de agua hipersalinos de la península tanto en la costa del Pacífico como en la región del Golfo de California (Paniagua Michel, com. pers.). Sin embargo, un estudio más detallado y profundo confirmaría la presencia de esta microalga en estos ambientes, para analizar su potencialidad como fuente natural de ß-caroteno.

Uno de los principales aspectos a considerar para la selección de una cepa de microalgas de importancia biotecnológica es la gran variabilidad intraespecífica que presentan sus poblaciones (Gallagher, 1986). Los organismos de una especie, aislados de una misma área geográfica pueden presentar diferencias fisiológicas notables que se reflejan directamente en tasas diferenciales de crecimiento e incorporación de nutrientes, producción de clorofila, pigmentos y ácidos grasos, entre otras moléculas (Gallagher, 1982; Romeo y Fisher, 1982; Gallagher *et al.*, 1984; Wood *et al.*, 1987; Shaw *et al.*, 1989. López-Alonso *et al.*, 1994). Esta variabilidad es el reflejo de la acción conjunta de factores ambientales a los que se encuentran sometidos los organismos y a la variabilidad intrínseca de sus genotipos.

Con el propósito de elucidar la variabilidad encontrada entre poblaciones de la misma especie, el primer aspecto que se debe considerar es determinar que porción de esa variabilidad es debida a presiones ambientales y cuál a sus

atributos genéticos. Brand (1981) establece que el efecto de la variabilidad fenotípica se reduce los organismos crecen bajo las mismas condiciones ambientales. Para lo cual el autor menciona los siguientes requisitos: 1) Los organismos deben estar completamente aclimatados a las condiciones del experimento, 2) Una vez aclimatado a las condiciones constantes de laboratorio, el genotipo debe mantenerse estable. 3) Contar con las réplicas necesarias que aseguren la utilización de un estadístico apropiado, y 4) Considerar la posibilidad de procesos estocásticos. De esta manera el autor asume que las diferencia encontradas entre los organismos sólo tienen un origen genético.

Es evidente la importancia que tiene la variabilidad intraespecífica en la selección de una cepa de interés biotecnológico, sin embargo, otro aspecto a considerar son las diferencias que existen entre cepas de distinto origen geográfico. En este sentido, si se quiere desarrollar un cultivo de *D. salina* en nuestro país se deben evaluar aquellas cepas autóctonas superproductoras de ß-caroteno que ya estén adaptas a las condiciones ambientales de la región.

De acuerdo a todo lo anteriormente expuesto, uno de los proyectos que actualmente se lleva a cabo por el grupo de Biotecnología Marina del CICESE, y dentro del cual se encuentra este trabajo de tesis, es la de buscar cepas autóctonas de *D. salina* con potencial biotecnológico para posteriores estudios de manipulación molecular y optimización del proceso carotenogénico.

I.1. OBJETIVOS

Objetivo general

Aislar y caracterizar el potencial carotenogénico de cepas regionales de *Dunaliella salina*, así como evaluar su variabilidad en función de su tasa de crecimiento, contenido de carotenoides totales y proteína total.

Objetivos específicos

a) Aislar cepas de *D. salina* de ambientes hipersalinos de la región.

b) Mediante un análisis de cromatografía liquida de alta resolución evaluar el perfil y la concentración de clorofila ***a***, α-caroteno, ß-caroteno y posibles formas isoméricas de las cepas aisladas en comparación con la cepa superproductora de ß-caroteno

c) Caracterizar el potencial de las cepas aisladas a nivel monoclonal en función de su tasa de crecimiento específica por día, concentración de carotenoides totales y proteínas totales.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1. Localización de las áreas de colecta

Dado que *D. salina* se distribuye principalmente en ambientes hipersalinos, los sitios de colecta se eligieron tomando en cuenta su régimen de desecación ya que esto propiciaría un incremento gradual de la salinidad en los cuerpos de agua, e incluso la creación de formas minerales de sal (halita).

Los sitios elegidos con estas características fueron: La Ventana y San Felipe en el estado de Baja California, y Laguna San Ignacio y Punta Colorada en Baja California Sur (Figura 1).

II.2. Muestreo

En cada zona se colectaron muestras de agua y sedimento, la cuales fueron almacenadas en tubos de plástico para su traslado al laboratorio de Biotecnología del C.I.C.E.S.E. Se hicieron mediciones de temperatura con un termómetro de mercurio (±1°C) y de salinidad con un refractómetro Reicher-Jung 10419 con escala de 0-100 ‰ (±0.5).

II.3. Aislamiento e identificación de *Dunaliella salina*

Una vez en el laboratorio, se hizo un revisión preliminar al microscopio compuesto de cada una de las muestras para evidenciar la presencia o ausencia de organismos del género *Dunaliella*. Las características que se consideraron para la identificación preliminar de organismos de este género fueron: la presencia

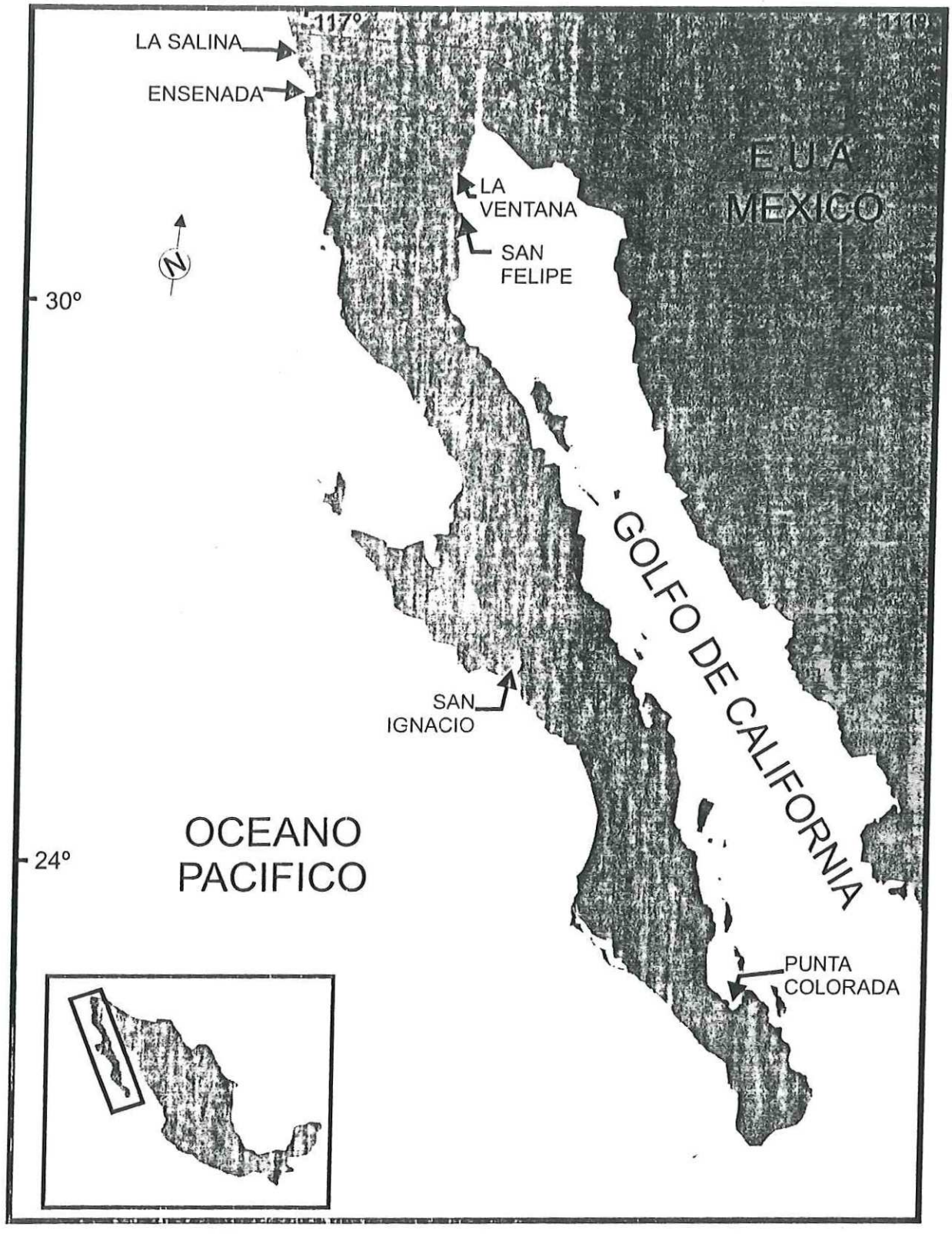

Figura 1. Localización de los sitios de muestreo. Los sitios de muestreo se indican con las flechas.

de dos undulipodios apicales de igual tamaño, forma y tamaño del cloroplasto así como la ausencia de pared celular. De las muestras que presentaron organismos con estas características se tomaron alícuotas de aproximadamente 1 ml para sembrarlas en tubos de ensayo los cuales contenían 5 ml de medio de cultivo enriquecido.

El medio de cultivo empleado fue el desarrollado por Gutiérrez-Millán (1996) a partir de la composición original propuesta por Ben-Amotz (1975) y Ben-Amotz y Avron (1983b) para este género utilizando agua destilada (Tabla I). La concentración de NaCl se determinó en función de la salinidad encontrada al momento de la colecta. El pH del medio se ajustó a 7.5 previamente a su esterilización en el autoclave. El tiempo de esterilización fue de 20 minutos a una temperatura de 121° C y a una presión de 1.05 $kg \cdot cm^{-2}$.

Los tubos con las muestras se colocaron en gradillas en un anaquel adaptado con un sistema de iluminación compuesto por seis lámparas fluorescentes, tres en la parte de enfrente y tres en la de arriba. Las lámparas de 8 pies de largo fueron de luz fría (cool light) de 40 watts. Las mediciones de la irradiancia se realizaron con un irradiómetro marca Li-Cor modelo Li-188b encontrándose un valor promedio de 130 $\mu E\ m^{-2}s^{-1}$. El fotoperíodo se fijó en 12 horas luz / 12 horas oscuridad con el fin de inducir a la sincronía celular.

Una vez que se observó crecimiento en cada uno de los tubos se procedió con el aislamiento e identificación de la especie.

Tabla I. Medio de cultivo utilizado de acuerdo a Ben-Amotz (1975) y Ben-Amotz y Avron (1983b) y modificado por Gutiérrez-Millán (1996).

	Agua destilada	Agua de mar
Reactivo	Concentración	
KNO_3	5 mM	5.009 mM *
NaCl	10%	10% *
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5 mM	5 mM
KH_2PO_4	0.2 mM	0.201 mM
$FeCl_3$	1.5 µM	1.5 µM
FeNa-EDTA	30 µM	30 µM
H_3BO_3	7 µM	7 µM
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.8 µM	0.8 µM
$ZnCl_2$	0.8 µM	0.8 µM
$CoCl_2$	0.02µM	0.02µM
$CuCl_2$	0.2 µM	0.2 µM
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.3 µM	0.3 µM

* Concentración empleada en los medios control. La concentración de los medios inductores se indica en materiales y métodos.

II.3.1. Aislamiento

Las muestras obtenidas en el paso anterior se sometieron a un aumento gradual de salinidad. Tomando en cuenta lo recomendado por Borowitzka y Borowitzka (1988) sobre los intervalos de tolerancia a la salinidad de cuatro especies de *Dunaliella*. *D. salina* es la única especie que puede soportar una

concentración de 35% de NaCl (p/v) la cual corresponde a su punto de saturación. De acuerdo a lo anterior las muestras fueron transferidas a matraces Erlenmeyer de 50 ml y sometidas a un aumento gradual de salinidad mediante la adición de NaCl a intervalos regulares de tiempo, deteniendo el proceso al momento de observar la precipitación de la sal en el medio de cultivo. El análisis de las muestras al microscopio de contraste de fases evidenció la presencia de bacterias y la ausencia de protozoarios.

Las muestras obtenidas en el paso anterior fueron sometidas a un gradiente de salinidad inverso (disminución de la concentración de NaCl) hasta alcanzar una salinidad del 10%, con el propósito de incrementar su biomasa y continuar con su análisis.

Las bacterias presentes en la muestra fueron eliminadas mediante un tratamiento con los antibióticos penicilina y estreptomicina siguiendo la metodología propuesta por Guillard (1973b) para estos fines.

Finalmente, una parte de las microalgas aisladas fueron sembradas en medio sólido con agar enriquecido al 1.5% e incubadas en una cámara ambiental con luz continua a una temperatura de 21° C. La otra porción de la muestra fue escalada en medio líquido para su posterior análisis bioquímico.

Las cepas aisladas de cada sitio de colecta fueron identificadas de acuerdo a un acrónimo.

II.3.2. Identificación de la especie

Uno de los principales criterios bioquímicos empleados para la identificación de *D. salina* es la proporción de ß-caroteno y clorofila ***a***, considerándose que una proporción igual o mayor a 6:1 (ß-caroteno:Clorofila ***a***) definen a esta especie (Loeblich, 1982).

Para fines de comparación del análisis se utilizó a la cepa superproductora *Dunaliella bardawil* (Db) del banco internacional UTEX (University of Texas Culture Collection) así como la BC02 aislada por Gutiérrez-Millán (1995). La cepa Db es conocida por su alta capacidad carotenogénica (Ben Amotz *et al.*, 1982), sin embargo, de acuerdo a lo encontrado por Gutiérrez-Millán (1995) la cepa BC02 es capaz de acumular una concentración mayor de ß-caroteno que la Db.

II.3.2.1. Condiciones de cultivo

Para identificar y caracterizar la cepas aisladas en base a su proporción de β-caroteno:Cl ***a***, se diseñó un experimento que promoviera la síntesis y acumulación de los carotenoides. El experimento consistió de dos tratamientos (control e inductor) con tres réplicas cada uno para cada cepa aislada. El tratamiento control consistió en mantener a la cepa en un medio de cultivo enriquecido con una concentración 5.009 mM de nitratos y 10% de NaCl. Tomando en cuenta que tanto la deficiencia de nitratos como una concentración alta de NaCl son algunos de los factores que inducen la carotenogénesis, el tratamiento inductor consistió en un medio de cultivo con deficiencia de nitratos

(0.3092 mM) y una concentración alta de NaCl (30%). Las unidades experimentales fueron matraces de 250 ml, con un volumen funcional de 50 ml. La iluminación fue constante durante las 24 horas. La medición de la irradiancia se realizó con un irradiómetro marca Biospherical Instruments Inc modelo QLS-100 con un valor promedio de 382 $\mu Es^{-1}m^{-2}$. La temperatura promedio durante el experimento fue de 32 ± 0.5°C.

Los medios de cultivo preparados a partir de este experimento se hicieron empleando agua de mar proporcionada por el laboratorio de microalgas del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (U.A.B.C.). El tratamiento aplicado al agua en este laboratorio fue: 1) filtración, para lo cual emplearon filtros de arena y cartuchos de polivinilo con un tamaño de retención de partículas de 1 µm y 2) esterilización con luz ultravioleta. Adicionalmente a este tratamiento, el agua fue esterilizada nuevamente con una autoclave durante 15 minutos a una temperatura de 121° C y a una presión de 1.05 kg cm^{-2}.

Considerando que la concentración de nitrato es uno de los factores que se emplearon para inducir la carotenogenesis en *D. salina* y que el agua de mar contiene disuelto este nutriente, la concentración final de nitratos en los medios de cultivo fue diferente a la empleada en el proceso de aislamiento (Tabla I). Para conocer la concentración final de nitratos en los medios de cultivo, se determinó la concentración de este nutriente en el agua de mar utilizada, así como la de nitritos, fosfatos y silicatos (Tabla II). El análisis de estas muestras se realizó en el laboratorio de Lagunas Costeras del C.I.C.E.S.E. mediante un autoanalizador de

flujo continuo Technicon, empleando la metodología propuesta por Friedrich y Whitledge (1972).

Tabla II. Concentración promedio de nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-), fosfatos ($PO_4^{\equiv}$) y silicatos (SiO_3^-) del agua de mar empleada para la elaboración de los medios de cultivos. Cada valor corresponde al promedio de cuatro muestras ± la desviación estándar.

Nutriente	Concentración (µM)
Nitratos	9.272 ± 1.731
Nitritos	0.257 ± .041
Fosfatos	43.54 ± 0.176
Silicatos	43.54 ± 5.547

El tiempo de experimentación fue de 20 días, período determinado en función de la coloración que presentaron los matraces mediante un reconocimiento visual y al análisis espectofotométrico respectivo. De manera paralela se hizo un registro fotográfico (en un microscopio óptico) de las células cultivadas en las dos condiciones (control e inductor).

II.3.2.2. Densidad celular, peso seco total y peso seco orgánico.

La densidad celular del cultivo al inicio y final del experimento, se estimó por medio del método de densidad óptica (Paniagua-Michell *et al.*, 1989). Este método establece una relación lineal entre el número de células y su densidad

óptica, mediante una curva de calibración. Para cada cepa se construyó una curva de calibración la cual incluyó cinco puntos o diluciones (Figura 2 a, b y c). La densidad celular para cada punto de la curva de calibración se determinó por conteos directos con un hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad de acuerdo a lo propuesto por Paniagua-Michell *et al.* (1989). La longitud de onda empleada para su lectura en el espectofotómetro fue 678 nm, la cual corresponde al pico máximo de absorción de la clorofila a *in vivo* (Sorokin, 1973).

De manera paralela a la estimación de densidad se determinó el peso seco total y orgánico de las muestras para el último día de cultivo de acuerdo a la metodología propuesta por Sorokin (1973). Se emplearon filtros de fibra de vidrio GF/C con un tamaño de poro de 1.2 µm, los cuales fueron lavados con agua destilada y prequemados a una temperatura de 490° C en una mufla Blue M modelo 51828 durante dos horas. De cada matraz experimental se filtraron 10 ml de cultivo por duplicado. Los filtros con las muestras fueron lavados con formiato de amonio para eliminar las sales disueltas en el medio de cultivo que pudieran dar como resultado una sobreestimación del peso seco. La presión de filtrado se mantuvo menor a 10 cm Hg, lo cual evita el rompimiento de las células y por lo tanto la pérdida de su contenido (Dortch *et al.*, 1984). Los filtros se mantuvieron en una estufa Blue-M modelo OV-560A-2 a una temperatura constante de 70°C (durante 10 horas), posterior a este tiempo se llevó un registro de su peso seco cada 2 horas hasta que el peso se mantuvo constante. Se empleó una balanza analítica Mettler modelo AE 240 con una precisión de 0.01 mg. Posteriormente

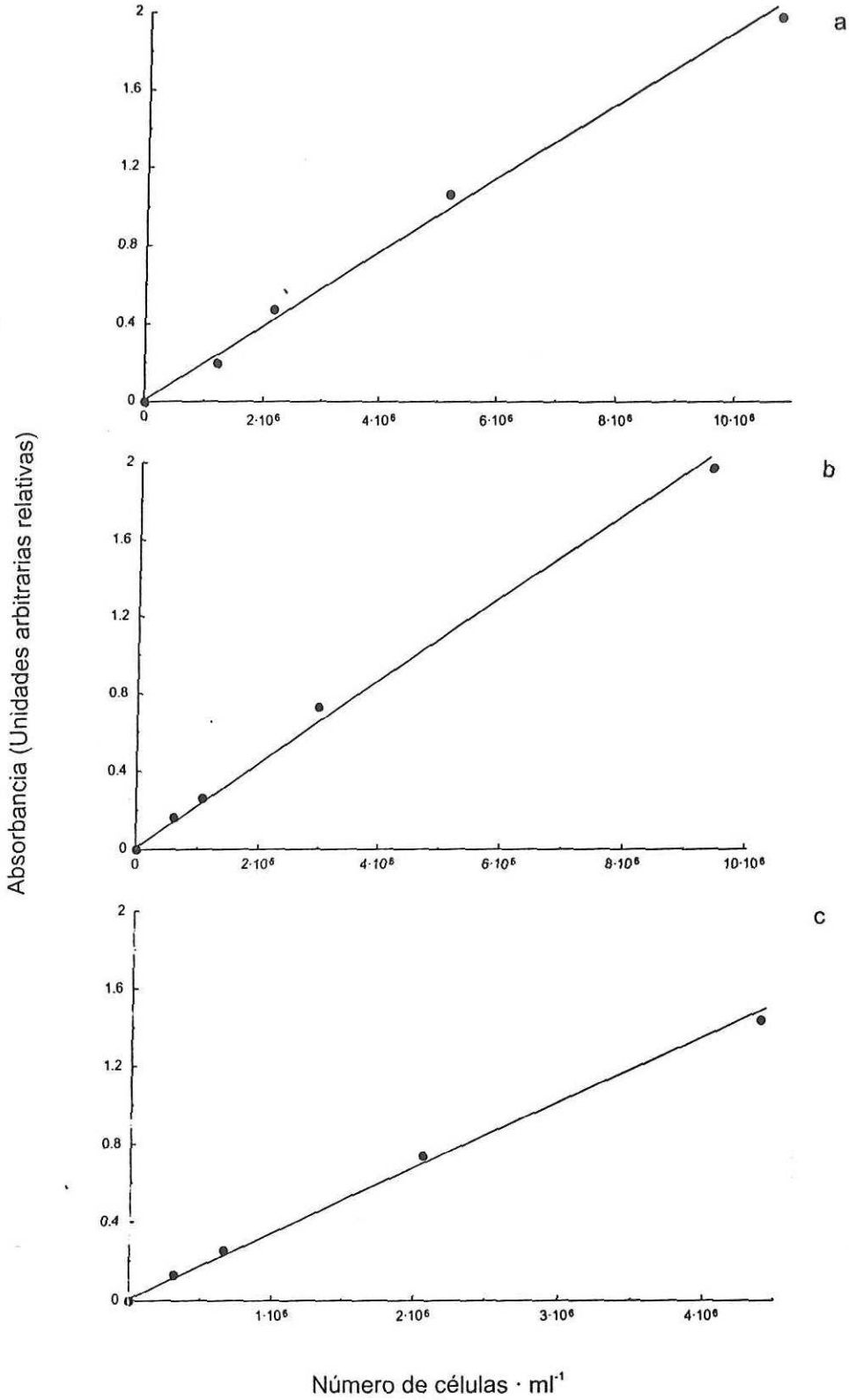

Figura 2. Curva de calibración para la estimación de la densidad celular de las diferentes cepas de *Dunaliella salina*. a) Cepa Db, b) cepa BC02 y c) cepa BC06.

los filtros se quemaron en la mufla a 490° C durante ocho horas y se determinó el peso de la cenizas. Por diferencia entre el peso seco total y las cenizas se calculó el peso seco orgánico.

II.3.2.3. Análisis de pigmentos

La concentración e identificación de los pigmentos (clorofila ***a***, α-caroteno y all-trans-β-caroteno) se determinó al inicio y final del experimento mediante una análisis de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), en el laboratorio de Química Analítica del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (UABC). De cada unidad experimental se filtraron 10 ml de cultivo en filtros de fibra de vidro GF/C con tamaño de poro de 1.2 µm. Los filtros se almacenaron a -20° C hasta el momento de su análisis. Las condiciones de filtración fueron las mencionadas anteriormente. La extracción de los pigmentos se realizaron con metanol al 100%.

El análisis de las muestra se realizó en un HPLC Hewlett Packard modelo 1090 equipado con un inyector automático termoregulado para las columnas, un sistema ternario para solventes y un detector de arreglo de diodos (DAD 190-600 nm). Se empleó una columna Phenomenex Hypersil-C-18 de fase inversa con un tamaño de partícula de 5 µm. La elución fue isocrática con metanol:acetonitrilo (9:1 v/v) y con una velocidad de flujo de 5 $\mu l \cdot min^{-1}$. Para la cuantificación de los pigmentos se emplearon estándares de referencia marca Sigma los cuales fueron disueltos en metanol al 100%.

De manera conjunta se realizó un registro continuo de la absorción (350-700 nm) de los extractos metanólicos de las muestras correspondientes al día último de experimentación tanto de la condición control como inductora.

II.3.2.4. Tamaño celular

Se estimó el tamaño promedio de las células de las cepas cultivadas en un medio rico en nutrientes y 10% NaCl y expuestas a luz continua (96 $\mu Es^{-1}m^{-2}$). Se midió el largo y ancho de 30 células con un micrómetro ocular calibrado al objetivo de 100x.

II.4. Elección de líneas monoclonales productoras de ß-caroteno

Tomando en cuenta el resultado obtenido del experimento anterior (concentración de ß-caroteno) sólo se eligieron dos cepas (Db y BCO2) para la elección de líneas monoclonales de acuerdo a su capacidad carotenogénica.

II.4.1. Aislamiento de monoclonales de *Dunaliella salina*

Para la elaboración de los cultivos monoclonales, es decir, cultivos generados a partir de una célula, se utilizaron tanto técnicas para medio líquido como sólido o placa en agar en condiciones estériles.

a) Medio líquido

Para llevar a cabo el aislamiento de una sola célula y que esta creciera en medio líquido se siguió la técnica del capilar y de la pipeta capilar modificada

(Hoshaw y Rosowski, 1973). Para lo cual las puntas de pipetas Pasteur fueron alargadas con calor hasta obtener un diámetro del filamento lo suficientemente angosto y similar al de un capilar, para fines de separación de células. Las células separadas se vaciaron en tubos de ensayo pequeños preparados a partir de pipetas Pasteur selladas por unos de sus extremos.

El primer paso del aislamiento consistió en tener un volumen de cultivo con una densidad celular lo suficientemente baja que facilitara su manejo, para lo cual se hicieron varias diluciones hasta obtener la densidad celular adecuada. El aislamiento de la célula consistió en tomar un pequeño volumen de cultivo con la pipeta revisándolo cuidadosamente al microscopio invertido. Una vez que se tuvo la seguridad de que en ese pequeño volumen sólo había una célula, se trozó la punta de la pipeta y se vació en el tubo de ensayo el cual contenía aproximadamente 0.5 ml de medio de cultivo. En el caso de que al revisar la pipeta al microscopio invertido se tuviera más de una célula o que la célula aislada no presentara movilidad, se desechaba el contenido de la pipeta y se iniciaba nuevamente el procedimiento.

Los tubos de ensayo se taparon con algodón, se colocaron en una gradilla y se mantuvieron a temperatura ambiente. El tiempo de exposición a la luz/oscuridad fue de 12 horas. El tiempo aproximado en que se observó un crecimiento evidente, es decir, en que los tubos mostraron una coloración verde fue de 30 días.

b) Medio sólido:

Para esta técnica se siguió el principio utilizado en bacteriología como el de las unidades formadoras de colonias. Para lograr lo anterior, se hicieron diluciones del medio de cultivo original hasta obtener una densidad celular aproximada de 30 células por cada 40 µl de cultivo. Una vez obtenida esa dilución, se extendió cuidadosamente con un triángulo de vidrio estéril 40 µl de cultivo en cada una de las cuatro secciones de la placa de agar. Las cajas de Petri se incubaron en una cámara ambiental bajo condiciones de luz continua y a una temperatura constante de 21° C. El tiempo aproximado en que se observó la aparición de pequeños puntos o colonias, originados a partir de una sola célula fue de 30 días.

La utilización de ambas técnicas dió resultados favorables, es decir hubo crecimiento evidente de los clones; sin embargo, para nuestro estudio nos inclinamos por la técnica del medio líquido, ya que además de ser práctica, tenemos la seguridad de que cada uno de los clones se originó a partir de una sola célula, dada la revisión exhaustiva que se realizó con el microscopio invertido.

De los cultivos monoclonales obtenidos de cada cepa, se eligieron tres de cada una (aleatoriamente) y fueron escalados en medio líquido en matraces Erlenmeyer de 50, 250, 500, así como en matraces Fernbach de 2.8 l para su posterior análisis.

II.4.2. Condiciones experimentales

El diseño experimental empleado para cada monoclonal consistió de dos tratamientos (control e inductor) con dos réplicas cada uno. El tratamiento control

consistió en un medio de cultivo enriquecido con una concentración 5.009 mM de nitratos y 10% de NaCl, mientras que en el inductor el medio presentó deficiencia de nitratos (0.3092 mM) y una concentración alta de NaCl (25%). Las unidades experimentales fueron matraces Fernbach de 2.8 l, con un volumen funcional de 980 ml.

El cultivo de cada monoclonal (aprox. 1 l) fue centrifugado a 1221 x g durante 20 minutos. El concentrado de células fue lavado con medio de cultivo estéril libre de nitratos. Se determinó la densidad celular del concentrado por medio del método de densidad óptica. Cada unidad experimental se inoculó con la misma densidad celular. La temperatura promedio durante el experimento fue de 29 ± 4°C. El fotoperíodo de 12 horas luz / 12 horas oscuridad con una irradiancia promedio de 130 $\mu Es^{-1}m^{-2}$. En cada unidad experimental se evaluó el crecimiento (tasa de crecimiento específica), pigmentos (clorofila ***a*** y ***b***, carotenoides totales) y proteínas totales.

II.4.3. Crecimiento

Se llevó a cabo un registro continuo de la densidad celular de los matraces experimentales a intervalos de dos días durante los primeros 20 días y posteriormente para el día 25 y 35 de cultivo. Se calculó la tasa de crecimiento específica (μ) mediante la ecuación propuesta por Guillard (1973 b).

$$\mu = \frac{\ln (N_1 / N_0)}{t_1 - t_0}$$

donde:

μ = Tasa de crecimiento específica por día

N_1 = Número de células al tiempo t_1

N_0 = Número de células al tiempo t_0

$t_1 - t_0$ = Intervalo de tiempo entre observaciones

II.4.4. Análisis de pigmentos

De cada matraz experimental se obtuvieron por duplicado 10 ml de cultivo a intervalos de 5 días durante los primeros 25 y al final del experimento (día 35). Las muestras se filtraron empleando filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C con un tamaño de poro de 1.2 µm. La presión de filtrado se mantuvo menor a 10 cm Hg (Dortch *et al.*, 1984). La extracción de los pigmentos de cada filtro se hizo empleando como solvente acetona al 90% (v/v) y agregando $MgCO_3$ para evitar la degradación de la clorofila. Para una extracción completa, las muestras se mantuvieron en refrigeración (4°C) y oscuridad durante 20-24 horas, de acuerdo a lo propuesto por Hansmann (1978)

Mediante el análisis espectrofotométrico de los extractos acetónicos se determinó la concentración de las clorofilas (***a*** y ***b***) y de los carotenoides totales. La concentración de las clorofilas ***a*** y ***b*** se determinó mediante el empleo de las ecuaciones propuestas por Sterman (1988) para algas Clorofitas, mientras que para el caso de los carotenoides totales se utilizó la ecuación de Strickland y Parson (1972). El registro de las absorbencias para cada una de las longitudes de

ondas requeridas se hicieron en un espectrofotómetro marca Bausch&Lomb Spectronic de 2 nm de ancho de banda con celdas de 1 cm de recorrido de luz. Los valores de absorbencia fueron corregidos por turbidez a 730 nm (Jensen, 1978)

$$Cl\ a = 11.93\ A_{664} - 1.93\ A_{647}$$

$$Cl\ b = 20.36\ A_{647} - 5.50\ A_{664}$$

$$Caro = 4.0\ A_{480}$$

II.4.5. Análisis de proteínas

Se determinó la concentración de proteína para los días 10 y 20 de cultivo. De cada matraz experimental se cosecharon 20 ml de cultivo, los cuales fueron inmediatamente congelados a -80°C. Previo análisis se filtraron por duplicado 5 ml de cultivo empleando filtro de fibra de vidro GF/C con un tamaño de poro de 1.2 µm. Las condiciones de filtrado fueron las mismas que en los casos anteriores. La extracción de las proteínas se hizo empleando NaOH 0.25 M de acuerdo a la metodología propuesta por Rausch (1981). El tiempo de extracción fue de 30 minutos a 100° C.

La cuantificación de proteínas se hizo mediante el método de Lowry *et al.* (1951). Los valores de proteína fueron estimados mediante una curva de calibración empleando como proteína estándar albúmina de suero de bovino (Figura 3).

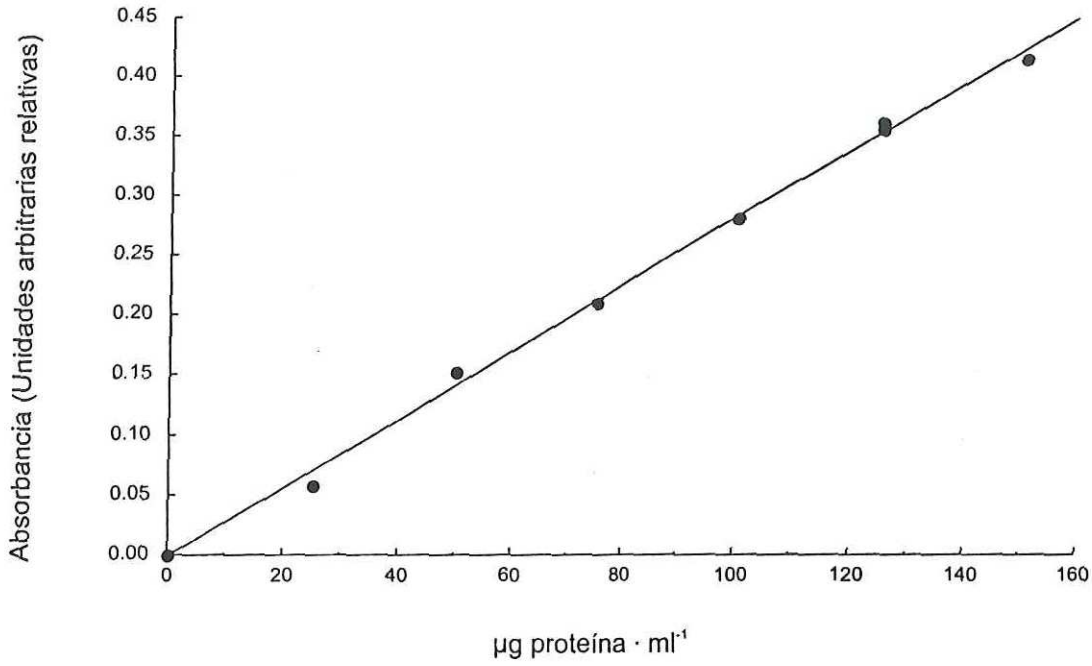

Figura 3. Curva de calibración para proteínas totales utilizando como estándar albúmina de suero de bovino. $Y = 0.0028x$, $r^2 = 0.99$.

II.5. Análisis estadístico

El análisis de los resultados del experimento para la elección de las líneas monoclonales se hizo mediante analisis de varianza (ANOVA) de dos factores (tratamientos x monoclonal) con repetición. De manera paralela se realizó un análisis de varianza anidado de dos y tres niveles (cepas, clones y réplicas, respectivamente) (Sokal y Rohlf, 1979).

Los datos de carotenoides totales se ajustaron a un modelo de regresión lineal. Posteriormente se realizó una comparación multiple de pendientes así como una prueba *a posteriori* de Tukey (Zar, 1984).

Con el objeto de explorar las posibles diferencias o similitudes entre los monoclonales aislados de cada cepa, se realizó un análisis de agrupamiento (UPGMA) (Sneath y Sokal, 1973) empleando distancias euclidianas. Este análisis incluyó los datos de clorofila ***a*** y ***b***, carotenoides totales, proteínas totales y número de células del último día de análisis así como la tasa intrínseca de crecimiento durante el período experimental.

III. RESULTADOS

III.1. Aislamiento e identificación de cepas de *Dunaliella salina*

III.1.1. Aislamiento de cepas

Se aislaron un total de cuatro cepas con características de *Dunaliella*. Los criterios utilizados para tal fin fueron principalmente morfológicos (presencia de dos undulipodios apicales, forma de las células y del cloroplasto), así como su tolerancia a salinidades extremas (35% NaCl). Las cepas fueron depositadas en el cepario de especies de interés biotecnológico del Laboratorio de Biotecnología Marina del C.I.C.E.S.E., bajo los siguientes acrónimos. La proveniente de La Ventana B.C., con la clave BC04; San Ignacio B.C.S., BC05; de San Felipe B.C., BC06 y de Punta Colorada B.C.S., BC07.

Durante el procedimiento de aislamiento, la cepa que presentó un mayor cambio en su coloración, de verde a amarillo, fue la BC06, el resto de las cepas mantuvieron su color verde. Esta característica inicial pudo ser un factor determinante en la elección de las cepas con potencial carotenogénico, sin embargo, debido a que no sólo la salinidad extrema es un factor que promueve la síntesis y acumulación de ß-caroteno, se decidió incluir todas las cepas aisladas en el experimento de inducción a la carotenogénesis. En este experimento se combinaron además de salinidades altas (30%), condiciones limitantes de nutrientes y altas irradiancias. Con base a los resultados de este experimento se corroboró la identificación de la cepas aisladas como *Dunaliella*. Con el fin de comparar los resultados de este experimento, se incluyó la cepa *Dunaliella*

bardawil (Db) proveniente de una colección internacional (UTEX, aislada del Mar Muerto, Israel) así como la BC02, aislada previamente de la Salina, B.C.

III.1.2. Identificación de la especie

Debido a que las cepas BC04, BC05 y BC07 mantuvieron su coloración verde posterior al experimento de inducción a la carotenogénesis, lo que evidenció su poca capacidad de acumular carotenos, éstas no fueron seleccionadas para el análisis de pigmentos mediante HPLC. Tomando en cuenta esta característica, además de su morfología y del hecho que pueden tolerar altas salinidades, estas cepas fueron ubicadas, tentativamente, como *Dunaliella viridis.*

Por lo arriba expuesto, se determinó la concentración inicial y final de pigmentos (Clorofila ***a*** y ß-caroteno, y su relación) de las cepas Db, BC02 y BC06 (Tabla III).

La proporción de ß-caroteno:clorofila ***a*** superior a seis, permitió ubicar y corroborar a las cepas BC02 y BC06, como *Dunaliella salina.* Esta proporción de pigmentos, mayor a seis, se presentó en las cepas Db y BC02, al inicio del experimento en el medio inductor, sin embargo en el caso de la BC06, fue necesario esperar hasta el final del experimento para alcanzar dicha razón. En el caso de los resultados del medio inductor, pareciera que no hubo presencia de clorofila ***a***, sin embargo eso se debió a que su concentración fue menor a la cantidad mínima detectable por el aparato.

Tabla III. Concentración inicial y final de clorofila *a* y ß-caroteno y su respectiva relación. El valor de la concentración final corresponde al promedio y la desviación estándar (n = 3) de cada cepa analizada.

Db	Inicio		Final	
	Control	Inductor	Control	Inductor
Clorofila *a* (pg·cel^{-1})	1.69	1.45	0.61 ± 0.13	-
ß-caroteno (pg·cel^{-1})	5.36	17.34	7.22 ± 1.03	46.43 ± 1.06
Clorofila *a* (mg·g peso seco^{-1})	38.17	15.44	7.44 ± 2.48	-
ß-caroteno(mg·g peso seco^{-1})	120.87	184.29	85.33 ± 3.44	174.88 ± 64.69
Clorofila *a* (mg·g peso seco orgánico^{-1})	45.80	19.64	8.76 ± 2.21	-
ß-caroteno (mg·g peso seco orgánico^{-1})	145.04	234.38	102.33 ± 10.70	345.22 ± 12.22
ß-caroteno : Clorofila *a*	3	12	12	-

BC02	Inicio		Final	
	Control	Inductor	Control	Inductor
Clorofila *a* (pg·cel^{-1})	1.11	1.03	0.76 ± 0.04	-
ß-caroteno (pg·cel^{-1})	5.66	7.41	7.26 ± 0.63	44.59 ± 1.56
Clorofila *a* (mg·g peso seco^{-1})	18.44	10.98	8.38 ± 0.57	-
ß-caroteno(mg·g peso seco^{-1})	93.94	79.34	79.87 ± 8.12	115.07 ± 60.95
Clorofila *a* (mg·g peso seco orgánico^{-1})	19.72	11.48	8.72 ± 0.42	-
ß-caroteno (mg·g peso seco orgánico^{-1})	100.46	82.96	83.10 ± 7.02	180.25 ± 13.53
ß-caroteno : Clorofila *a*	5	7	10	-

BC06	Inicio		Final	
	Control	Inductor	Control	Inductor
Clorofila *a* (pg·cel^{-1})	3.27	3.48	1.34 ± 0.08	-
ß-caroteno (pg·cel^{-1})	5.83	11.13	13.15 ± 5.06	71.10 ± 5.06
Clorofila *a* (mg·g peso seco^{-1})	38.73	53.18	7.52 ± 0.85	-
ß-caroteno(mg·g peso seco^{-1})	69.03	169.95	73.86 ± 9.37	169.53 ± 55.76
Clorofila *a* (mg·g peso seco orgánico^{-1})	41.90	59.43	8.71 ± 0.85	-
ß-caroteno (mg·g peso seco orgánico^{-1})	74.69	189.95	85.29 ± 6.83	268.77 ± 10.08
ß-caroteno : Clorofila *a*	2	3	10	-

El espectro de absorción de los extractos metanólicos de cada una de la cepas, en condiciones control e inductor, se muestra en las figuras, 4, 5 y 6. En ellas se observa que los picos máximos de absorción se presentaron entre los 448 y 470 nm, los cuales corresponden al ß-caroteno. La absorbancia en la región de los 600-700 nm, indicó la presencia de la clorofila ***a*** y ***b***. En todos los espectros de absorción que correspondieron a las muestras del medio control, la señal de las clorofilas fue mayor que en el inductor. El análisis cromatográfico no detectó la presencia de clorofilas en las muestras del tratamiento inductor, sin embargo, el espectro de absorción permitió detectar estos pigmentos.

La cepa que presentó la mayor concentración de ß-caroteno ($pg \cdot célula^{-1}$), al final del experimento, tanto en el medio control como inductor, fue la cepa BC06. Esta concentración fue superior en casi un 20% (inductor), a la de la cepa Db, considerada como superproductora de ß-caroteno. Por otro lado, la cepa BC02, presentó una concentración muy similar a la Db. La concentración de este pigmento, por unidad de peso seco total y peso seco orgánico no presentó la misma tendencia. Para ambos casos, la cepa que mayor contenido de pigmento presentó fue la Db.

Debido a que la metodología utilizada no permitió una eficiente separación de los estándares puros utilizados tanto del α-caroteno como del isómero 9-cis-ß-caroteno, se procedió a su identificación mediante los cromatogramas reportados en la literatura. Al comparar el análisis cromatográfico realizado en las muestras se detectó la presencia de los isómeros 9-cis y all-trans del ß-caroteno

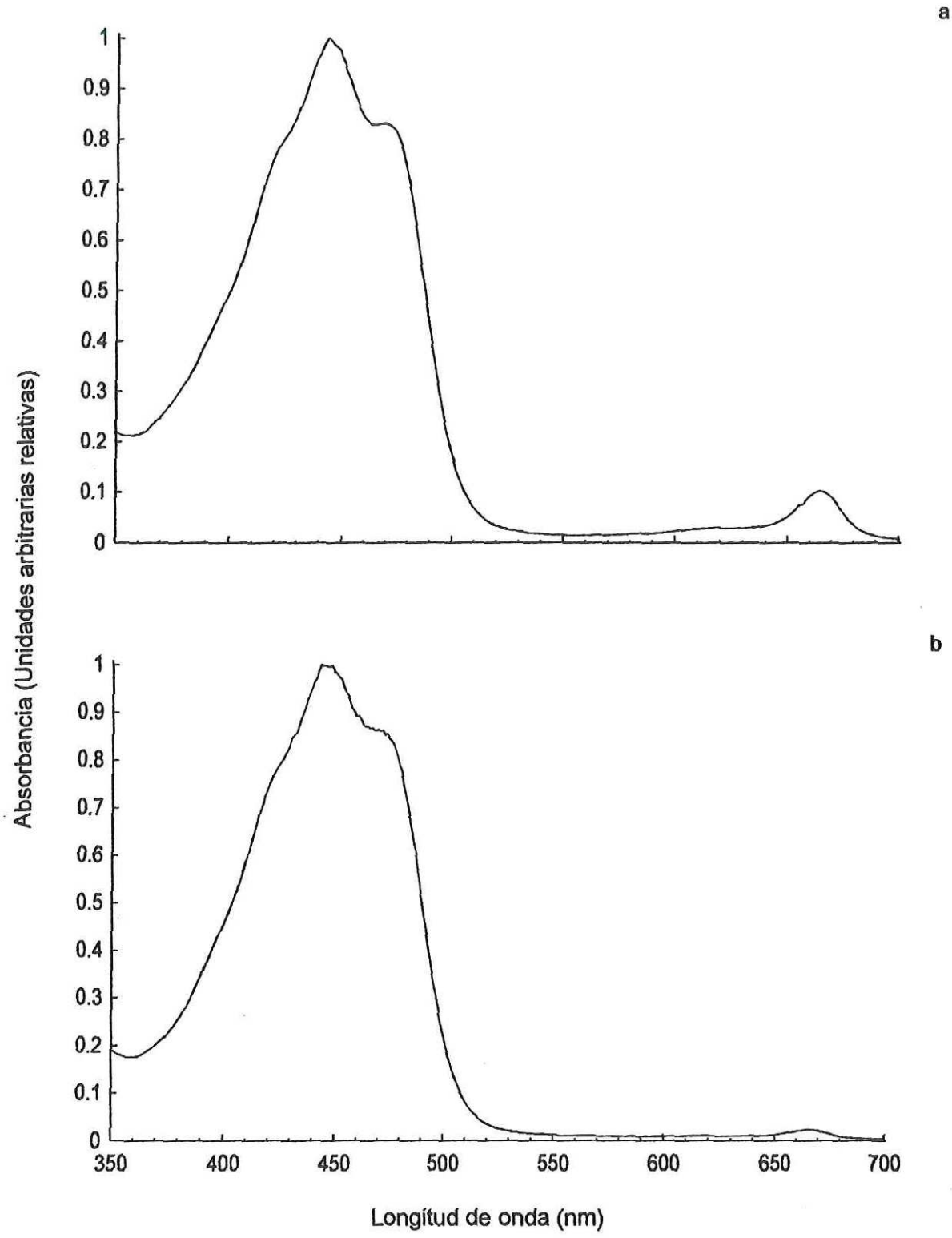

Figura 4. Espectro de absorción de los extractos metanólicos de la cepa Db. a)Condición control y b) condición inductora.

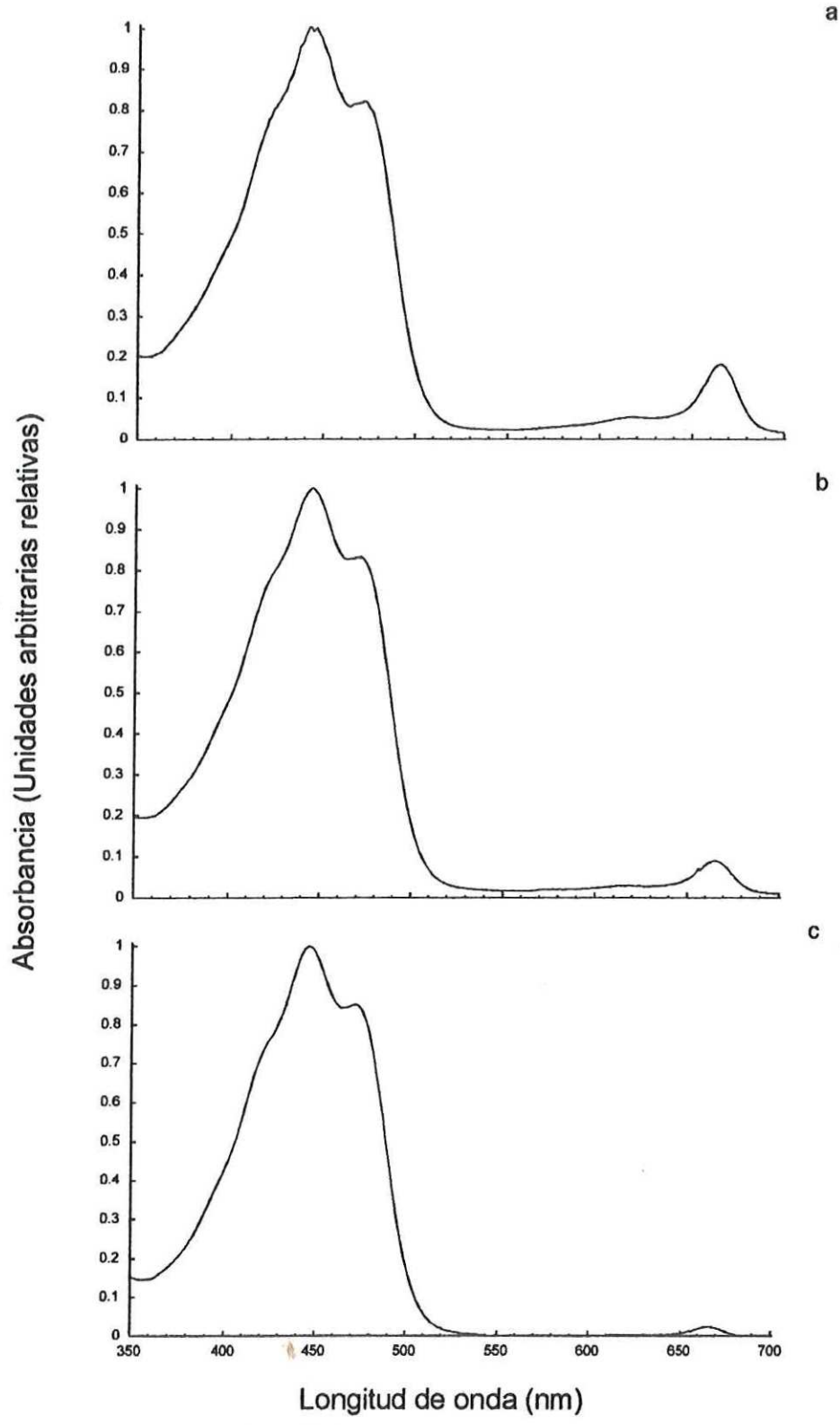

Figura 5. Espectro de absorción de los extractos metanólicos de la cepa BC02. a) Al inicio del experimento, b) condición control y c) condición inductora.

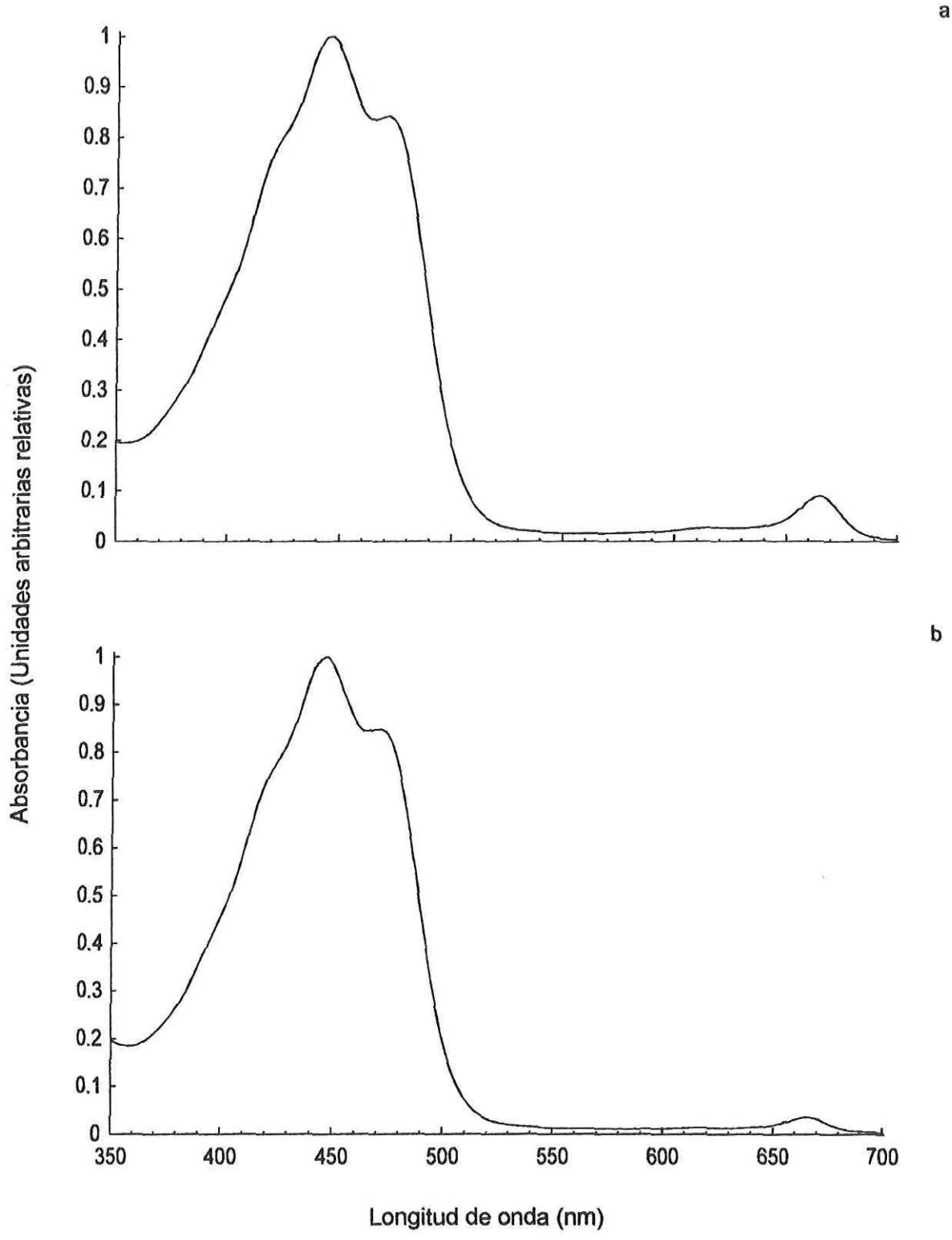

Figura 6. Espectro de absorción de los extractos metanólicos de la cepa BC06. a)Condición control y b) condición inductora.

principalmente en condiciones inductivas (Figuras 7, 8 y 9). Si bien, en ellos también se observó la presencia de otros pigmentos, su correcta identificación no fue posible debido a la falta de estándares puros de los respectivos pigmentos que lo pudieran corroborar.

III.1.3.Tamaño celular

El tamaño de la células fue similar en todas las cepas. Aún cuando las células de la cepa BC06 presentaron el mayor tamaño, no se detectaron diferencias significativas entre ellas.

Tabla IV. Medias del tamaño celular promedio de las cepas Db, BC02 y BC06 (n=30).

Cepa	Largo (µm) x ± D. E.	Ancho (µm) x ± D. E.
DB	10.872 ± 1.097	7.957 ± 0.977
BC02	10.853 ± 0.841	7.737 ± 0.890
BC06	11.733 ± 1.447	8.140 ± 1.005

III.2. Elección de líneas monoclonales

Las cepas de *Dunaliella* seleccionadas para el aislamiento y caracterización de líneas monoclonales fueron Db (*D. bardawil*) y BC02 (*D. salina*). Esto se hizo básicamente de acuerdo a los resultados obtenidos en el experimento anterior, en el que se determinó que estas cepas fueron unas de las que mayor cantidad de ß-caroteno acumularon.

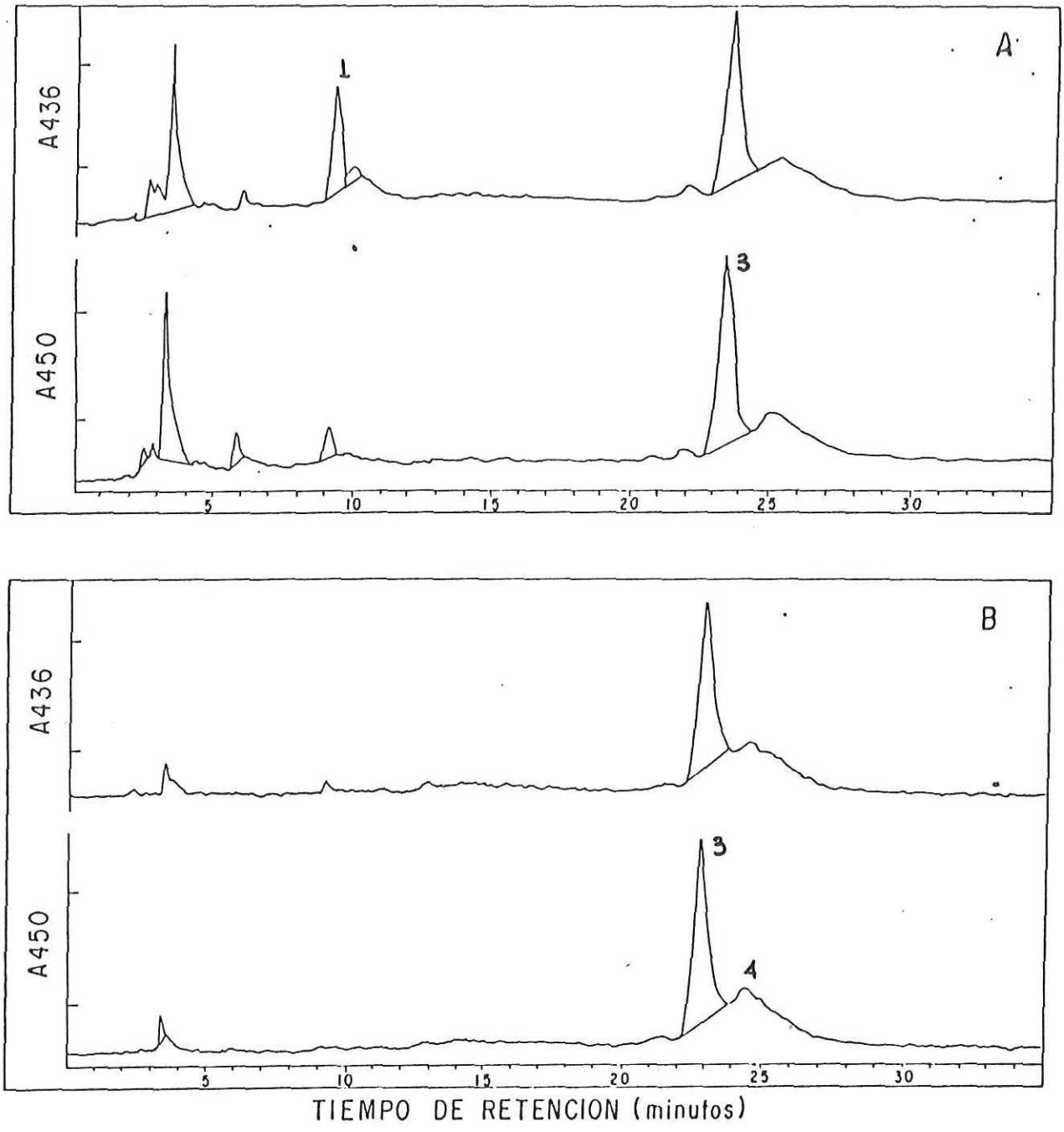

Figura 8. Perfil cromatográfico (HPLC) de los pigmentos extraidos de *Dunaliella salina*, cepa BC02, cultivada en condición control (a) e inductiva (b). Identificación de picos como en la figura 7.

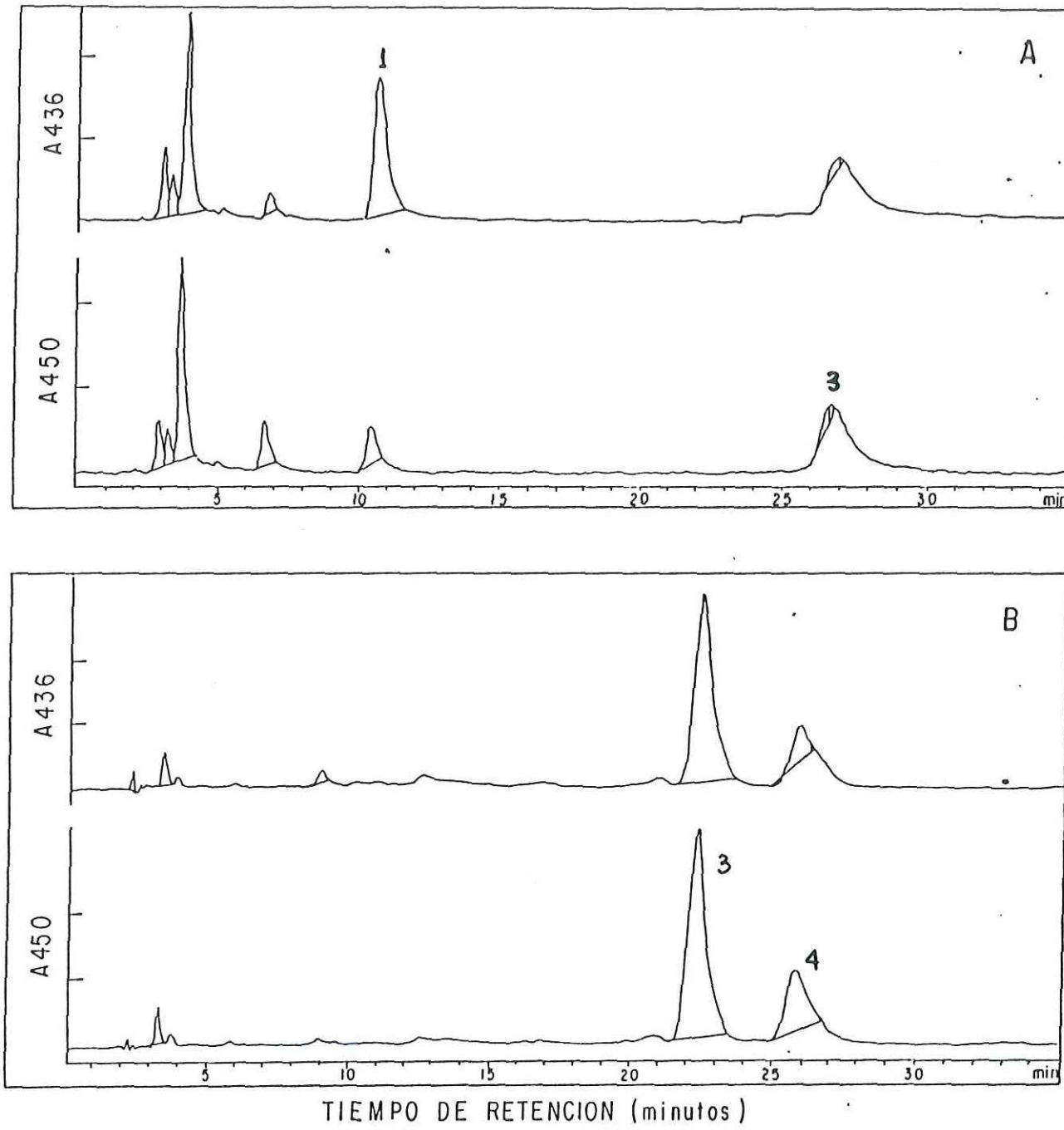

Figura 9. Separación cromatográfica (HPLC) de pigmentos de *Dunaliella salina*, cepa BC06, cultivada en condición control (a) e inductiva (b). Para la identificación de picos ver figura 7.

Del total de monoclonales aislados de cada cepa se eligieron tres de ellos al azar. Para diferenciar los clones se les denominó con una de las tres primeras letras del abecedario posterior al acrónimo de la cepa de la cual provienen. De esta manera los clones de cada cepa fueron: Db-A, Db-B, Db-C, BC02-A, BC02-B y BC02-C.

III.2.1. Crecimiento

La figura 10 muestra las curvas de crecimiento de los diferentes clones analizados para los dos tratamientos durante el tiempo de experimentación. Las mayores densidades celulares se obtuvieron en el medio control donde se observa una tendencia al aumento de la densidad celular a través del tiempo. En el caso de la condición inductiva la tendencia fue diferente, aún cuando existió un ligero aumento en la densidad celular, ésta se mantuvo casi constante durante todo el tiempo de investigación. Al analizar por separado ambos tratamientos, se observó que en el caso del tratamiento control hasta el día dieciséis las densidades fueron similares entre los clones, mientras que a partir del día dieciocho las diferencias entre ellos se acentuaron, siendo máximas en el último día de experimentación. Si bien la mayor densidad celular al final del experimento control la presentó el clon BC02-C (5.88×10^6 células·ml^{-1}) y la menor Db-A (2.25×10^6 células·ml^{-1}), no existió un patrón que indicara que los clones originados a partir de alguna cepa en particular presentaran las mayores densidades (Tabla V),

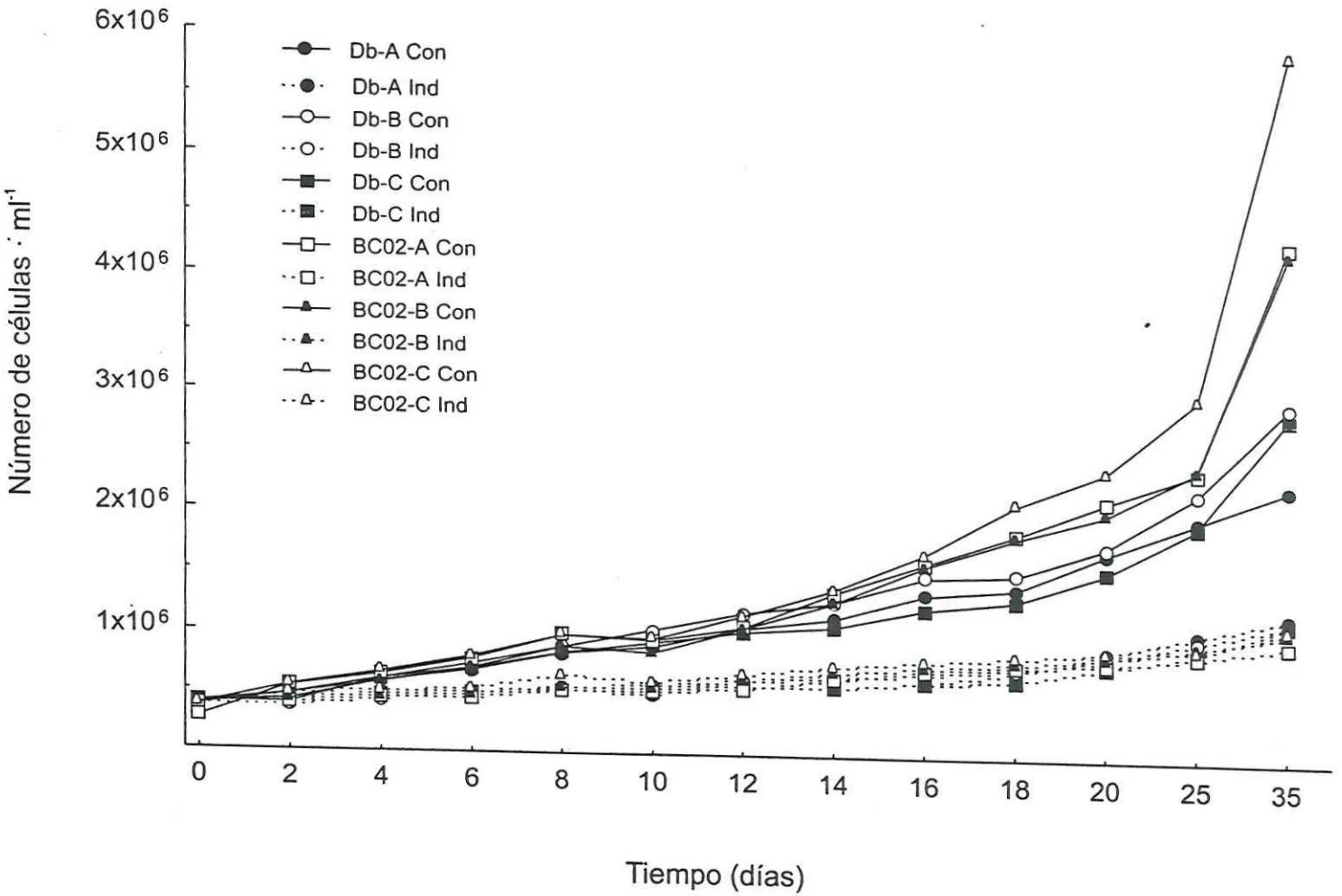

Figura 10. Concentración celular de los monoclonales aislados de las cepas Db y BC02 en condición control (Con) e inductiva (Ind) durante el tiempo de experimentación.

lo mismo se observó en el caso del tratamiento inductor, donde la densidad celular fluctuó entre 0.99 (BC02-A) a 1.20 x 10^6 células·ml^{-1} (Db-A).

Tabla V. Densidad celular de los monoclonales al inicio y final del experimento.

Monoclonal	Densidad celular (cel·ml^{-1}·10^6)	
	Control x ± D. E.	Inductor x ± D. E.
Db-A	2.25 ± 0.05	1.20 ± 0.14
Db-B	2.95 ± 0.14	1.14 ± 0.09
Db-C	2.85 ± 0.08	1.14 ± 0.12
BC02-A	4.29 ± 0.85	0.99 ± 0.05
BC02-B	4.22 ± 0.24	1.08 ± 0.00
BC02-C	5.88 ± 0.80	1.10 ± 0.00

De acuerdo a lo propuesto por Guillard (1973 b), los parámetros de crecimiento deben ser evaluados durante la fase exponencial de la curva de crecimiento. Sin embargo, a pesar de que en ninguno de los tratamientos se observa claramente esta fase, se decidió calcular la tasa de crecimiento (μ) para cada intervalo del cual se tenía un registro de la densidad celular. Esto con el propósito de tener una aproximación de los valores de este parámetro. La tabla VI presenta los valores máximos y mínimos de la tasa de crecimiento (μ) para ambos tratamientos de los seis monoclonales durante el tiempo de experimentación.

Tabla VI. Valor máximo y mínimo de la tasa de crecimiento específica por día (μ) de los seis monoclonales analizados correspondientes a las cepas Db y BC02.

	Tratamiento	
Monoclonal	Control	Inductor
Db-A	0.01 - 0.16	0 - 0.12
Db-B	0 - 0.21	0 - 0.07
Db-C	0.02 - 0.13	0.01 - 0.09
BC02-A	0 - 0.34	0 - 0.08
BC02-B	0 - 0.12	0 - 0.05
BC02-C	0 - 0.19	0 - 0.11

Con base a los resultados de la Tabla VI se observa que los valores más altos se presentaron en el tratamiento control. Los valores de μ fluctuaron entre 0-0.34, siendo el clon BC02-A el que presentó el valor más alto (μ = 0.34). En la condición inductiva los valores de μ variaron entre 0-0.12, en este caso fue el clon Db-A el que presentó el mayor valor (μ = 0.12).

Para el análisis de varianza (ANOVA) de dos factores (tratamientos x monoclonales) con repetición (Sokal y Rohlf, 1979) se empleó la tasa de crecimiento (μ) calculada a partir del inicio y final del experimento (Tabla VII).

Tabla VII. Tasa de crecimiento específica por día de los seis monoclonales analizados correspondientes a las cepas Db y BC02 calculada a partir del inicio y final del experimento.

Monoclonal	Tasa de crecimiento (μ)	
	Control x ± D. E.	Inductor x ± D. E.
Db-A	0.050 ± 0.001	0.031 ± 0.003
Db-B	0.057 ± 0.001	0.030 ± 0.002
Db-C	0.056 ± 0.001	0.030 ± 0.003
BC02-A	0.079 ± 0.006	0.028 ± 0.001
BC02-B	0.069 ± 0.002	0.030 ± 0.000
BC02-C	0.079 ± 0.004	0.031 ± 0.000

Los resultados del análisis de varianza indicaron que entre tratamientos y en la interacción de ambos factores hubo diferencias altamente significativas, p=0.001 y p=0.000, es decir, el crecimiento de los monoclonales en condiciones controladas e inductoras fue diferente (Tabla VIII). De esta manera podemos afirmar que los clones que crecieron en el medio control presentaron tasas de crecimiento mayores que los cultivados en el inductor. Por otro lado, no existieron diferencias significativas entre clones (p=0.999), es decir que aún cuando hubo clones que presentaron tasas de crecimiento mayores, éstas no fueron significativamente diferentes, lo cual no nos permite afirmar que algún clon en particular presentó las mayores tasas de crecimiento.

Tabla VIII. Análisis de varianza de dos factores (tratamientos x monoclonales) con repetición de la tasa de crecimiento específica (μ), $\alpha = 0.05$.

Fuente de variación	SC	g.l.	CM	F	*p*
Entre clones	$6.8 \cdot 10^{-4}$	5	$1.4 \cdot 10^{-4}$	0.09	0.999
Entre tratamientos	$7.3 \cdot 10^{-3}$	1	$7.3 \cdot 10^{-3}$	42.64	0.001
Interacción	$8.6 \cdot 10^{-4}$	5	$1.7 \cdot 10^{-4}$	25.06	0
Error	$8.2 \cdot 10^{-5}$	12	$6.8 \cdot 10^{-6}$		
Total	$8.9 \cdot 10^{-3}$	23			

Al realizar un análisis de varianza anidado de 2 niveles (cepas y clones) (Sokal y Rohlf, 1979) se encontró que existen diferencias significativas entre cepas (p=0.004) pero no así entre clones dentro de cepas (p= 0.996) (Tabla IX).

Tabla IX. Análisis de varianza anidado de dos niveles (cepas y clones) de la tasa de crecimiento específica (μ), $\alpha = 0.05$.

Fuente de variación	SC	g.l.	CM	F	*p*
Entre cepas	$6.0 \cdot 10^{-4}$	1	$6.0 \cdot 10^{-4}$	32.36	0.004
Entre clones dentro de cepas	$7.5 \cdot 10^{-5}$	4	$1.9 \cdot 10^{-5}$	0.04	0.996
Entre lecturas de cada clon	$8.2 \cdot 10^{-3}$	18	$4.6 \cdot 10^{-4}$		
Total	$8.9 \cdot 10^{-3}$	23			

III.2.2. Pigmentos

Los resultados del seguimiento de las clorofilas ***a*** y ***b***, asi como las de los carotenoides, tanto en condiciones controladas como inductoras se muestran en las figuras 11 y 12. La primera figura incluye a los monoclonales aislados de la cepa Db y la segunda a los de la cepa BC02.

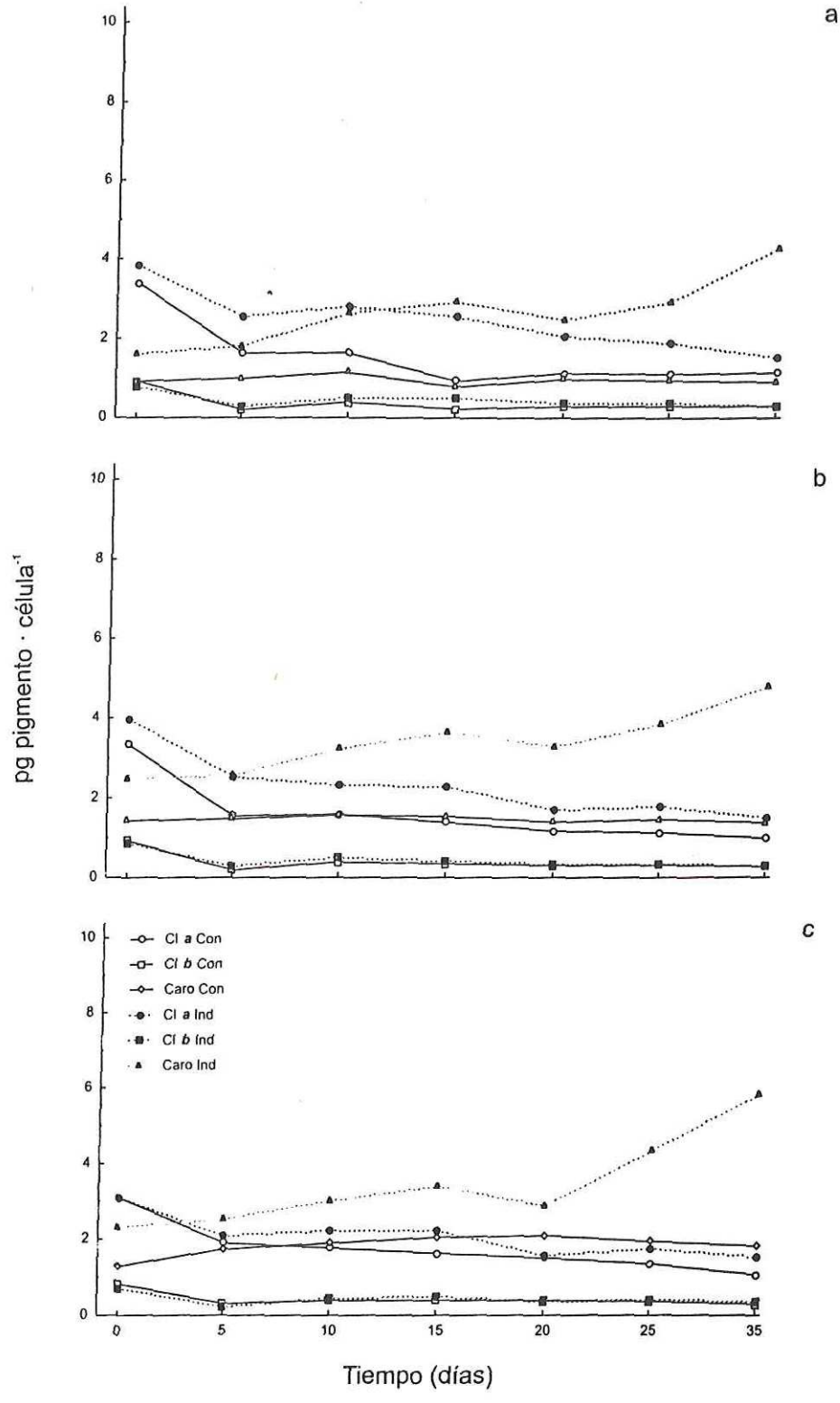

Figura 11. *Concentración de clorofila **a** y **b**, y carotenoides totales de los tres monoclonales de la cepa* Db en condición control (Con) e inductiva (Ind) durante el período de experimentación. a) Db-A, b) Db-B y c) Db-C.

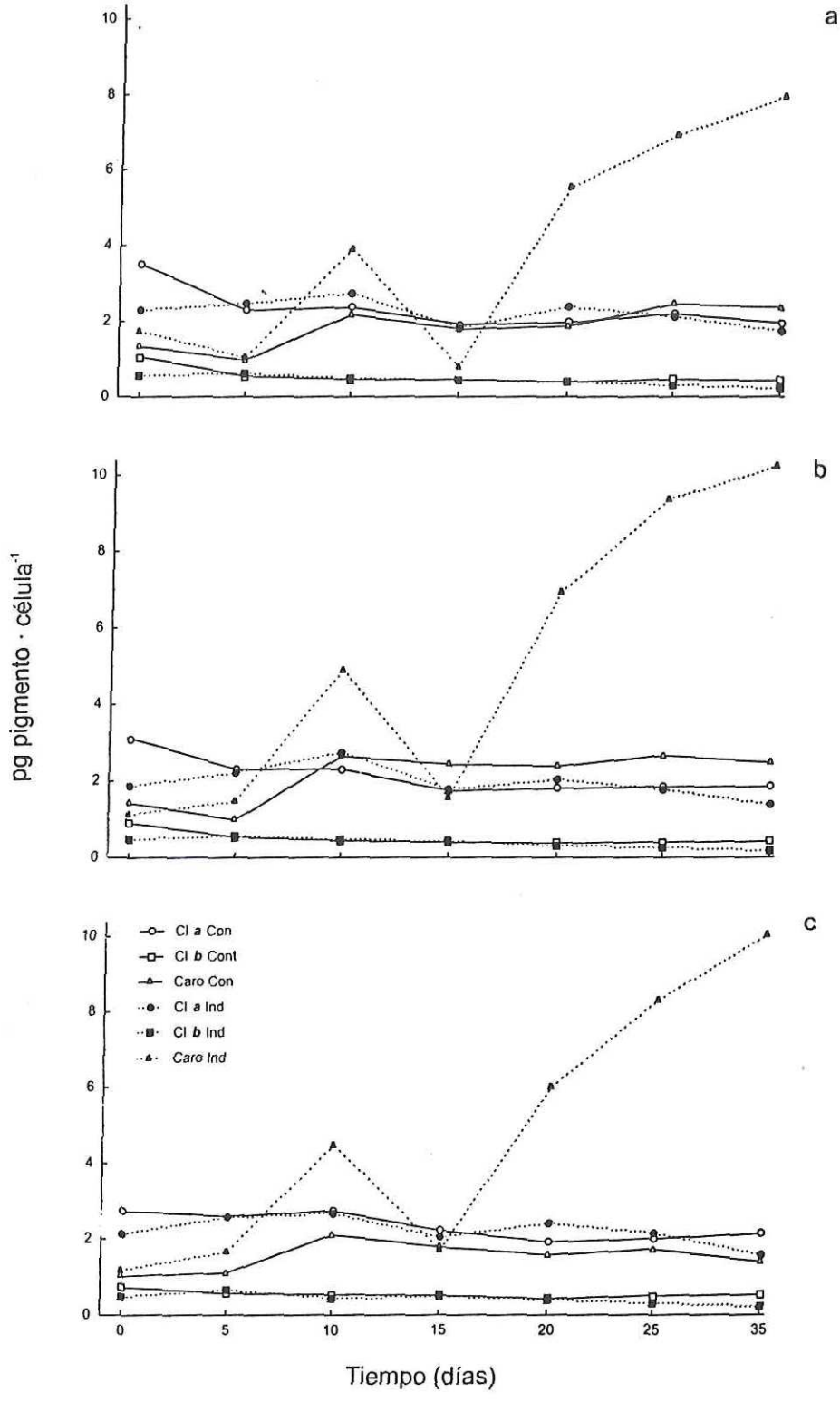

Figura 12. Concentración de clorofila ***a*** y ***b***, y carotenoides totales de los tres monoclonales de la cepa BC02 en condición control (Con) e inductiva (Ind) durante el período de experimentación. a) BC02-A, b) BC02-B y c) BC02-C.

En lo que respecta a la clorofila *a*, la tendencia general de los monoclonales de ambas cepas fue a la disminución de este pigmento tanto en el tratamiento inductor como en el control (Figuras 13a y 14a) . Sin embargo, se observó que los monoclonales de la cepa BC02 del tratamiento inductor se apartaron ligeramente de este patrón al inicio del experimento, ya que, a diferencia del tratamiento control, la tendencia fue a incrementar la concentración de clorofila *a* al menos hasta el día 10 de experimentación para posteriormente disminuir. Al analizar por separado las cepas se observaron diferencias entre ellas, en el caso de la cepa Db, los monoclonales del tratamiento inductor presentaron una mayor concentración de clorofila *a* que el control durante todo el período de experimentación (Figura 13a). En los monoclonales de la cepa BC02 no se apreciaron diferencias en los valores de clorofila *a* entre los dos tratamientos ya que los valores se translaparon excepto por el día último, donde la concentración de clorofila *a* fue ligeramente mayor en el tratamiento control que en el inductor (Figura 14a).

Al comparar la concentración final de clorofila *a* entre los monoclonales de ambas cepas se observó que en el tratamiento control los valores de clorofila de la cepa BC02 (1.85-2.11 $pg \cdot cel^{-1}$) fueron aproximadamente el doble que los presentados por los monoclonales de la cepa Db (0.99-1.15 $pg \cdot cel^{-1}$), mientras que para el tratamiento inductor los valores de clorofila *a* fueron similares para ambas cepas (Tabla X).

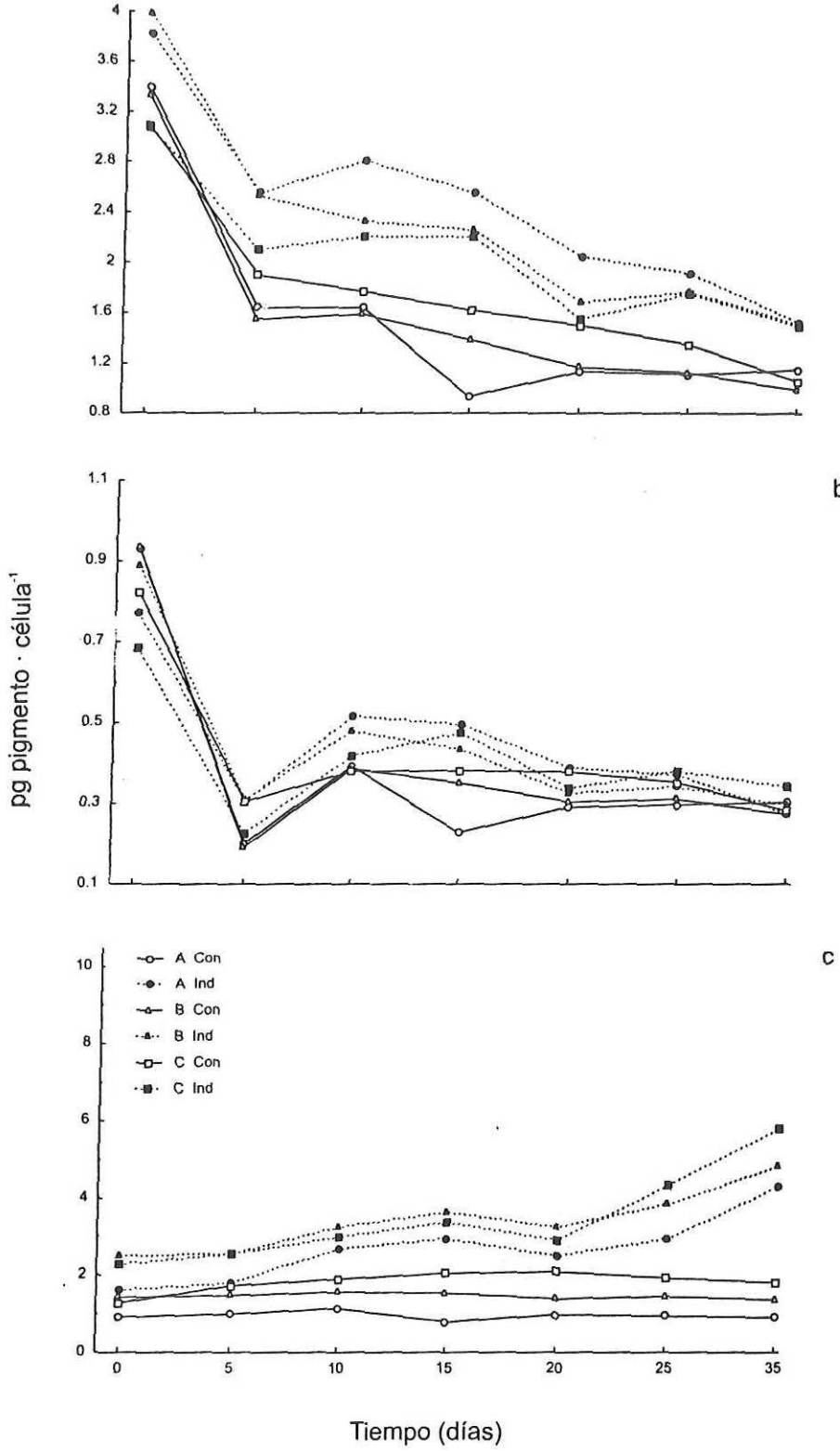

Figura 13. Concentración de pigmentos de los *monoclonales* de la cepa Db en condición control (Con) e inductiva (Ind). a) Clorofila ***a***, b) clorofila ***b*** y c) carotenoides totales.

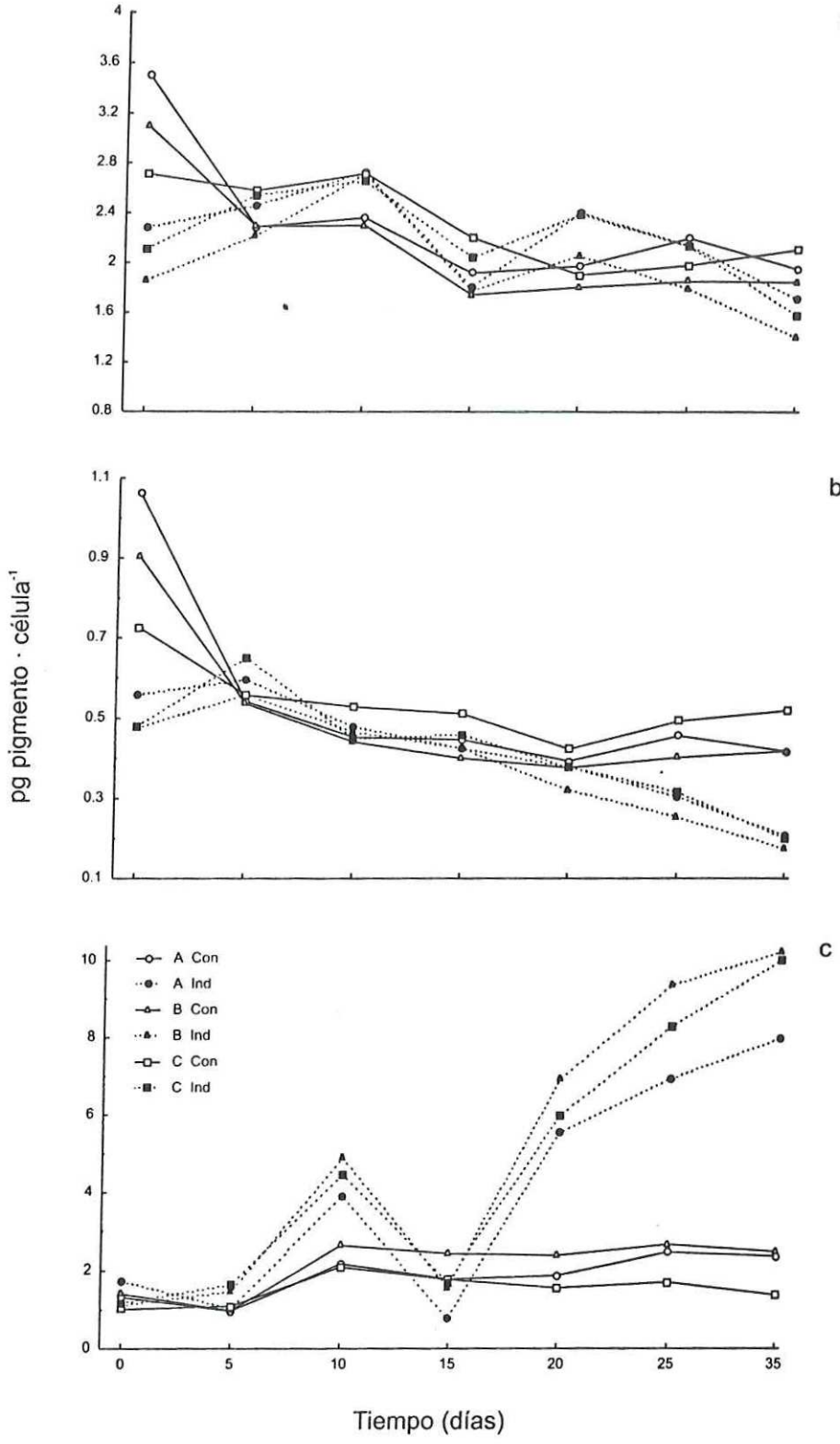

Figura 14. Concentración de pigmentos de los monoclonales de la cepa BC02 en condición control (Con) e inductiva (Ind). a) Clorofila ***a***, b) clorofila ***b*** y c) carotenoides totales.

Tabla X. Concentración final (pg·cel^{-1}) de clorofila ***a***, clorofila ***b*** y carotenoides totales de los seis monoclonales analizados de las cepas Db y BC02.

Clon	Clorofila ***a*** (pg·cel^{-1})		Clorofila ***b*** (pg·cel^{-1})		Carotenoides totales (pg·cel^{-1})	
	Control	Inductor	Control	Inductor	Control	Inductor
Db-A	1.15 ± 0.16	1.52 ± 0.22	0.30 ± 0.05	0.27 ± 0.06	0.91 ± 0.00	4.30 ± 0.36
Db-B	0.99 ± 0.15	1.51 ± 0.16	0.27 ± 0.06	0.29 ± 0.04	1.37 ± 0.19	4.80 ± 0.26
Db-C	1.06 ± 0.03	1.50 ± 0.38	0.28 ± 0.01	0.34 ± 0.08	1.81 ± 0.10	5.79 ± 1.23
BC02-A	1.95 ± 0.04	1.72 ± 0.14	0.42 ± 0.02	0.21 ± 0.00	2.36 ± 0.02	7.98 ± 0.76
BC02-B	1.85 ± 0.03	1.40 ± 0.04	0.42 ± 0.01	0.18 ± 0.01	2.47± 0.09	10.24 ± 0.17
BC02-C	2.11 ± 0.30	1.58 ± 0.05	0.52 ± 0.05	0.20 ± 0.01	1.39 ± 0.10	10.01 ± 0.47

En relación a la clorofila ***b***, la tendencia fue a la disminución de su concentración a través del tiempo, sin embargo se observaron ligeras diferencias entre cepas (Figuras 13b y 14b). Posterior a la inoculación de los monoclonales de ambos tratamientos de la cepa Db, se observó una disminución drástica de la concentración de clorofila ***b***, para luego incrementarse ligeramente (día 10) y nuevamente a partir del día 15 continuar la tendencia a la disminución, la cual se mantuvo hasta el final de experimento. La concentración final de clorofila ***b*** en ambos tratamientos fue similar (Tabla X). En el caso de la cepa BC02 los tratamientos presentaron patrones diferentes. En el caso del control, la tendencia a la disminución de la concentración de clorofila ***b*** se mantuvo hasta el día 20, posterior a este día el contenido se incrementó ligeramente. En lo que respecta al inductor, al inicio del experimento se observó un aumentó en la cantidad de

clorofila ***b***, sin embargo a partir del día 10 la tendencia fue a la disminución paulatina de su concentración. La concentración final de clorofila ***b*** fue mayor en los monoclonales del tratamiento control que en los del inductor (Tabla X).

La tendencia que presentaron los carotenoides totales fue diferente a lo encontrado en las clorofila ***a*** y ***b*** (Figura 13c y 14c). En el tratamiento control de ambas cepas, los carotenoides totales se mantuvieron más o menos constantes durante el tiempo de experimentación, en el medio inductor incrementaron su concentración, encontrándose los valores mayores al final del experimento. La cantidad de carotenoides acumulados por los monoclonales de la cepa BC02 en condiciones inductoras fueron superiores a los de la cepa Db, mientras los valores de los monoclonales de la cepa Db fluctuaron entre 4.30 y 5.79 $pg \cdot cel^{-1}$, los de la BC02 fueron de 7.98 a 10.24 $pg \cdot cel^{-1}$. El decremento en la concentración de carotenoides para el día 20 y 15 de la cepas Db y BC02, respectivamente, se debieron a un error metodológico ya que en ambos casos el procesamiento de las muestras fue realizado varios días después de su cosecha, lo cual subestimó la cantidad de pigmentos cuantificados para ese día en ambas cepas.

Tomando en cuenta que nuestro interés se centra en la diferenciación de las líneas monoclonales en función de su capacidad de acumular carotenoides totales, los resultados que a continuación se presentan sólo incluyen este pigmento.

Dado que la acumulación de carotenoides totales presentó una tendencia lineal, los datos se ajustaron a un modelo de regresión lineal con el objeto de

comparar las pendientes y determinar si existían diferencias significativas entre ellas. Los datos utilizados para este ajuste son los valores obtenidos de la diferencia entre el tratamiento inductor y el control para cada día analizado. La figura 15 presenta las gráficas de la líneas de regresión, así como la ecuación y su coeficiente de determinación para cada monoclonal de la cepa Db, de igual manera la figura 16 muestra los correspondientes a los monoclonales de la cepa BC02. En la mayoría de los casos el modelo explicó más del 95% de la relación entre las variables siendo la excepción los monoclonales Db-A y Db-C, en los cuales los coeficientes de determinación fueron 0.91 y 0.89, respectivamente. En todos los casos, el análisis de varianza de la regresión mostró diferencias significativas ($p < 0.000$) a un nivel de confianza del 95%. Con base a lo anterior podemos considerar que la relación entre las variables tiempo y concentración de carotenoides mostrada por los monoclonales se ajustó adecuadamente a un modelo de regresión lineal.

El análisis para comparar más de dos pendientes (Zar, 1984) indicó que existen diferencias significativas entre ellas a un nivel de confianza de 95%. Dado que al menos una de las pendientes de la regresión de los monoclonales fue diferente, se procedió con una comparación múltiple *a posteriori* para determinar cuales eran diferentes. Los resultados obtenidos en esta prueba mostraron que todas las pendientes de los monoclonales de la cepa Db no fueron significativamente diferentes a un nivel de $\alpha = 0.95$, de igual forma ocurrió con las

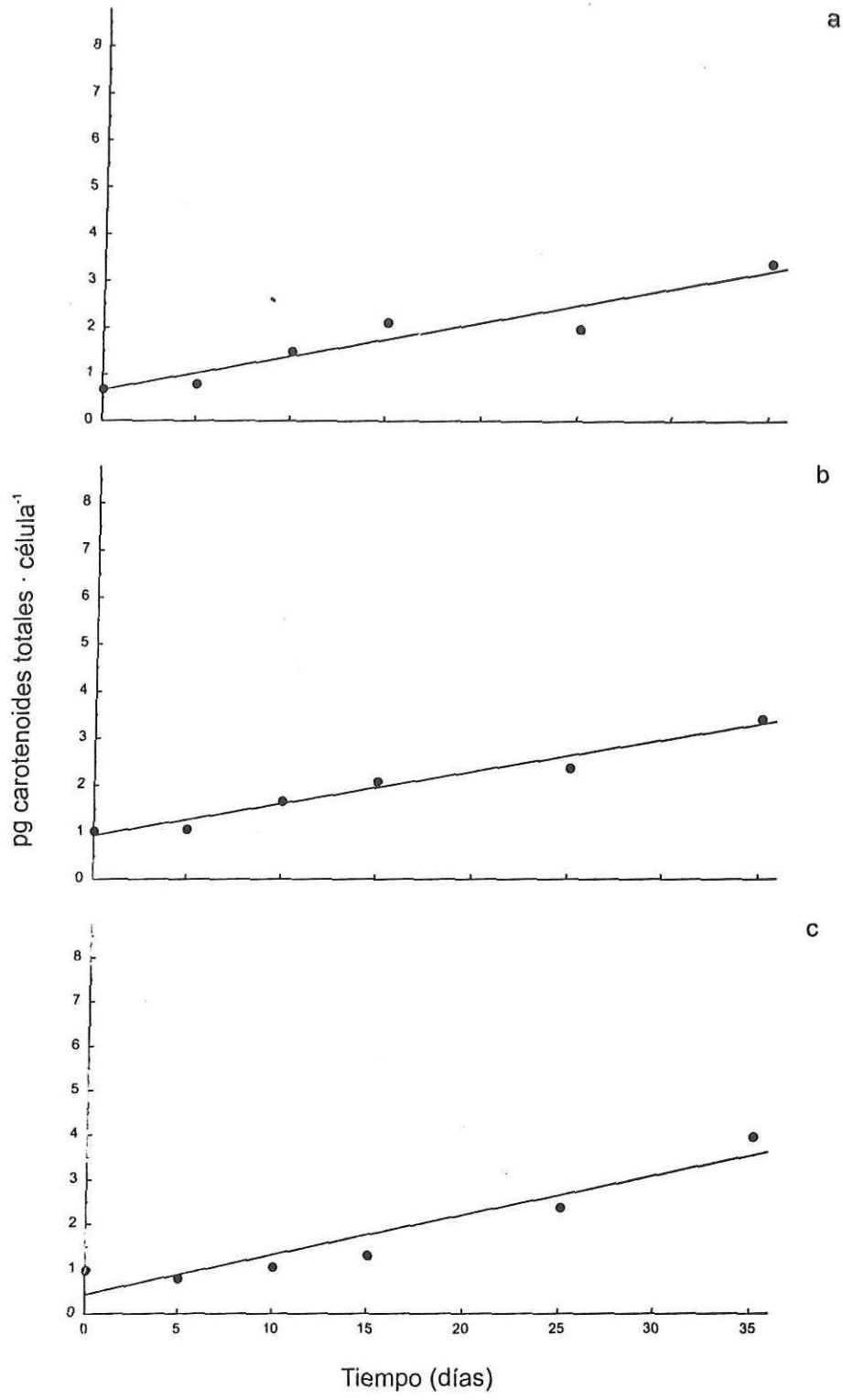

Figura 15. Regresión lineal de la acumulación de carotenoides totales durante el tiempo de experimentación de los monoclonales aislados de la cepa Db. a) Db-A, $Y = 0.661 + 0.073x$, $r^2 = 0.91$; b) Db-B, $Y = 0.937 + 0.068$, $r^2 = 0.96$; y c) Db-C, $Y = 0.435 + 0.088$, $r^2 = 0.89$.

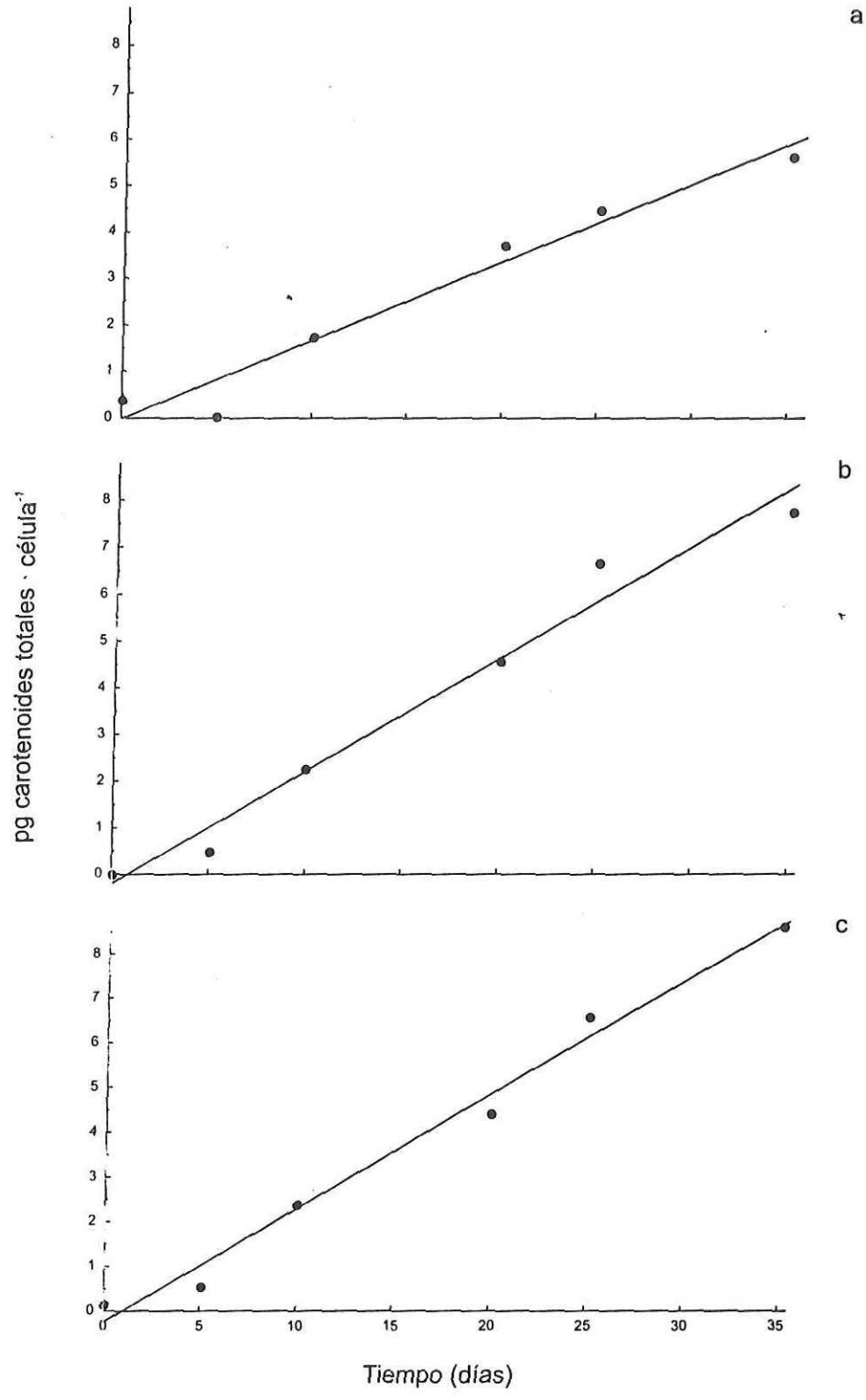

Figura 16. Regresión lineal de la acumulación de carotenoides totales durante el tiempo de experimentación de los monoclonales aislados de la cepa BC02. a) BC02-A, Y = -0.018 + 0.169x, r^2 = 0.96; b) BC02-B, Y = -0.199 + 0.242x, r^2 = 0.98 y c) BC02-C, Y = -0.250 + 0.254x, r^2=0.99.

pendientes de los monoclonales BC02-B y BC02-C. El resto de las comparaciones indicaron que las pendientes fueron significativamente diferentes ($\alpha = 0.95$).

Considerando lo anteriormente expuesto podemos decir que los monoclonales que mayor cantidad de carotenoides totales acumularon, en condiciones inductoras, fueron BC02-B y BC02-C, además, estos mismos clones fueron los que presentaron las pendientes con mayor valor, lo cual nos sugiere una mayor capacidad de incrementar estos pigmentos a través del tiempo, esto en relación al resto de los clones analizados.

De manera paralela al análisis de pendientes se hicieron los de varianza de dos bloques (tratamientos x monoclonales) con repetición y el anidado de dos niveles (cepas y clones). Los resultados del primer análisis mostraron que entre tratamientos y su interacción existen diferencias significativas, $p = 0.002$ y $p = 0.000$; es decir, la acumulación de carotenoides totales en condiciones controladas e inductoras fue diferente, esto permitió confirmar que la acumulación de carotenoides totales fue mayor en el tratamiento inductor. Sin embargo aún cuando se observó que algunos clones presentaron concentraciones mayores de carotenoides, este análisis no mostró diferencias significativas entre ellos (Tabla XI).

Tabla XI. Análisis de varianza de dos factores (tratamientos x monoclonales) con repetición del contenido final de carotenoides totales, $\alpha = 0.05$.

Fuente de variación	SC	g.l.	CM	F	*p*
Entre clones	91.23	5	18.25	0.05	0.993
Entre tratamientos	358.85	1	358.85	34.52	0.002
Interacción	51.97	5	10.39	70.57	0.000
Error	5.30	36	0.15		
Total	507.35	47			

El análisis de varianza anidado mostró que las diferencias significativas son entre cepas (p=0.006), mientras que entre clones dentro de cepas no existieron diferencias significativas (p=0.883) (Tabla XII) . Esto sugiere que mientras la cepa BC02 acumuló una mayor cantidad de carotenoides que la cepa Db, ninguno de los clones lo hizo de manera significativa.

Tabla XII. Análisis de varianza anidado de dos niveles (cepas y clones) del contenido final de carotenoides totales, $\alpha = 0.05$.

Fuente de variación	SC	g.l.	CM	F	*p*
Entre cepas	79.79	1	79.79	27.91	0.006
Entre clones dentro de cepas	11.44	4	2.86	0.29	0.883
Entre lecturas de cada clon	416.12	42	9.91		
Total	507.35	47			

Debido a que los análisis de varianza (ANOVA) realizados anteriormente incluyeron las dos condiciones experimentales, se decidió aplicar un ANOVA anidado de tres niveles en los que sólo se incluyeran los datos de carotenoides

totales obtenidos del tratamiento inductor. Los niveles incluidos por orden jerárquico fueron: cepas, clones y réplicas. El resultado de este análisis indicó que existen diferencias significativas entre cepas (p = 0.006) pero no así entre clones dentro de las cepas (p = 0.040) (Tabla XIII).

Tabla XIII. Análisis de varianza anidado de tres niveles (cepas, clones y réplicas) del contenido final de carotenoides totales, α = 0.05.

Fuente de variación	SC	g.l.	CM	F	p
Entre cepas	118.727	1	118.727	27.96	0.006
Entre clones dentro de cepas	16.987	4	4.247	5.02	0.403
Réplicas dentro de clones	5.072	6	0.845	110.14	0.000
Entre lecturas de cada réplica	0.092	12	0.008		
Total	140.878	23			

III.2.3. Proteínas totales

De acuerdo a la tendencia que presentaron las proteínas se observó que su concentración fue mayor en condiciones inductoras, este patrón se observó claramente en la cepa BC02, sin embargo en la Db el monoclonal Db-A fue la excepción, ya que el contenido de proteínas se mantuvo muy similar en ambas condiciones (Figura 17). También se apreció que el contenido de proteínas, independientemente del tratamiento, fue mayor en el día 10 que en el 20. La excepción nuevamente fue el monoclonal Db-A en condiciones inductoras, ya que la mayor concentración la presentó en el día 20 de cultivo (Figura 17).

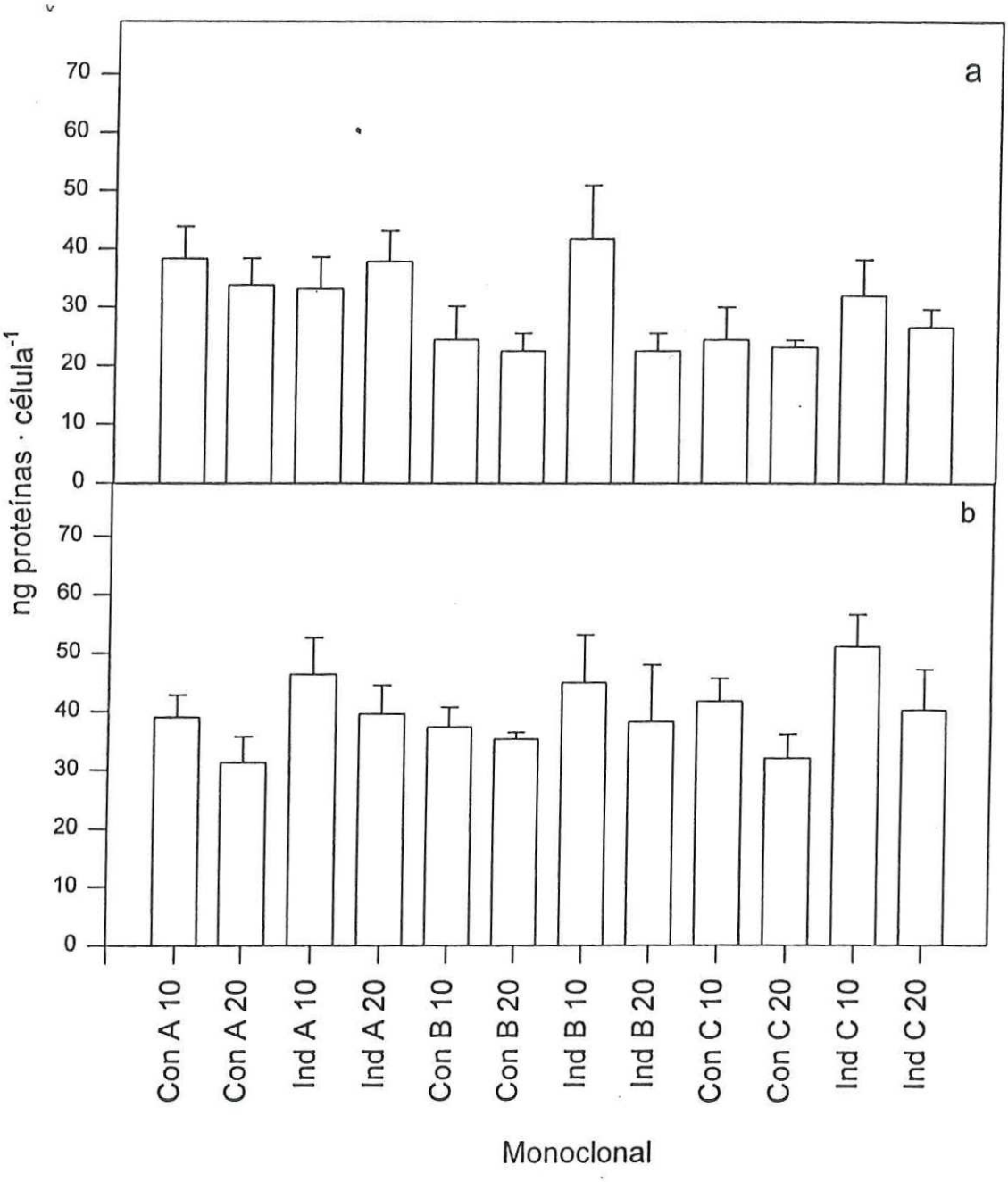

Figura 17. Concentración de proteínas totales de los seis monoclonales en condición control (Con) e inductivo (Ind) para el día 10 y 20 de cultivo. a) Cepa Db y b) cepa BC02.

III.2.4. Análisis de agrupamiento

El análisis de agrupamiento en el que se incluyeron las variables clorofila ***a*** y ***b***, carotenoides totales, proteínas totales, concentración final de células y tasa de crecimiento específica por día, se muestra en la figura 18a. En esta figura se observaron tres grupos definidos, el primero incluyó a los monoclonales de la cepa BC02 en condiciones controladas, el segundo grupo los monoclonales de ambas cepas del tratamiento inductor y el tercer grupo los monoclonales de la cepa Db en condición control. Aún cuando se encuentran definidos estos tres grupos era de esperarse que dentro del grupo inductor se encontraran agrupados los clones de cada cepa, sin embargo no se observa tal agrupamiento. Cuando sólo se incluyeron las variables clorofila ***a*** y ***b***, y carotenos, el agrupamiento permitió separar a los monoclonales del tratamiento inductor según su origen (Figura 18b). Si bien se observó que existe una tendencia a agrupamiento de cada uno de los clones, las diferencias entre ellos en porcentaje fueron menores del 5%.

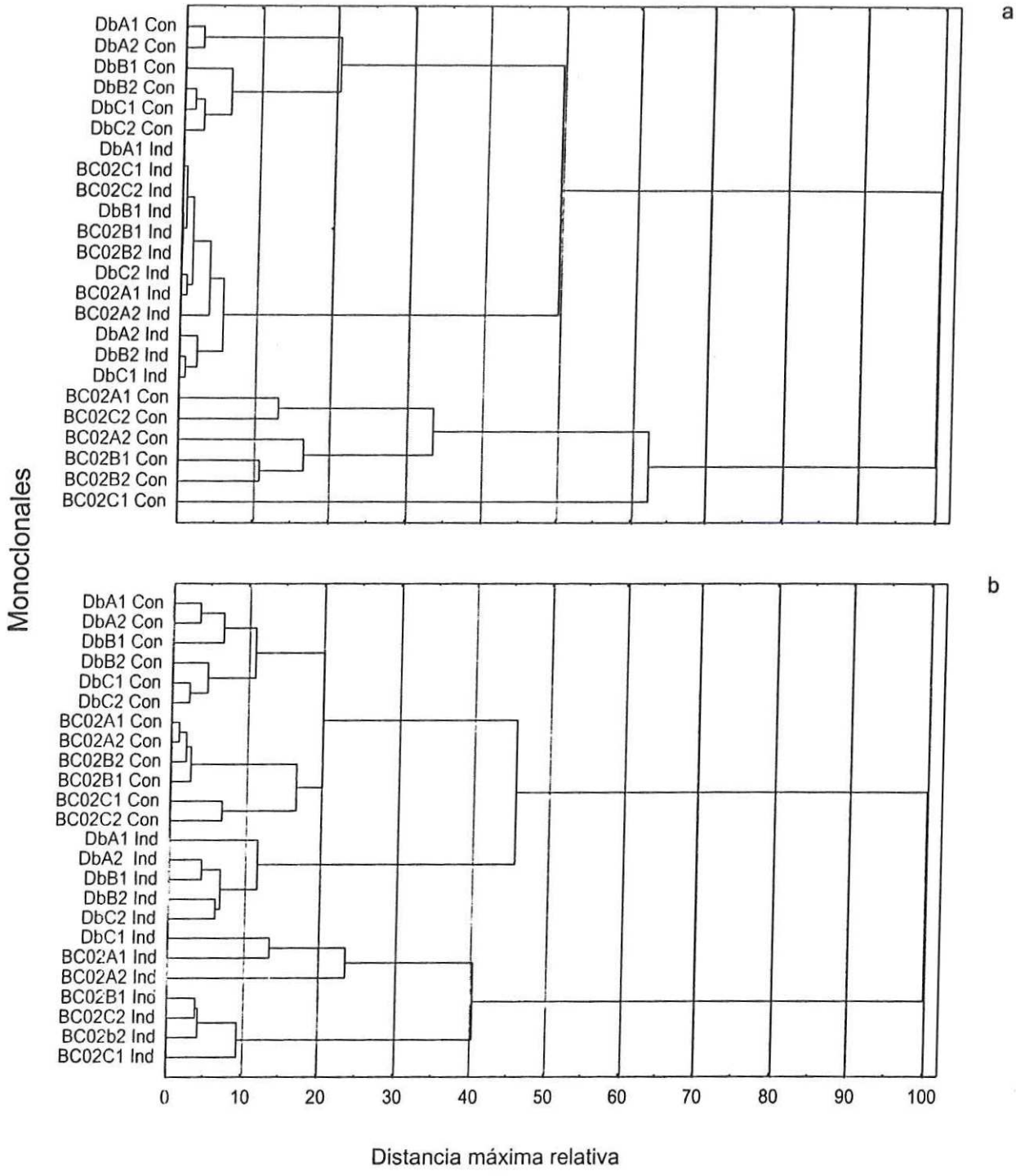

Figura 18. Análisis de agrupamiento (UPGMA) para los monoclonales de ambas cepas. a) Clorofila ***a*** y ***b***, carotenoides totales, proteínas totales, número de células final y tasa intrínseca de crecimiento, b) Clorofila ***a*** y ***b***, y carotenoides totales. En ambos casos se incluyen los datos de la condición control (Con) e inductora (Ind).

IV. DISCUSIÓN

IV.1. Identificación de la especie

De las cuatro cepas aisladas (BC04, BC05, BC06 y BC07) solo la cepa BC06 fue identificada como *D. salina*, con base al criterio propuesto por Loeblich (1982) que indica que una razón mínima de carotenos:clorofila *a* de 6:1, define a esta especie. Si bien para las cepas BC04, BC05 y BC07 no se realizó el análisis de sus pigmentos mediante el método de cromatografía líquida, la coloración verde que presentaron los cultivos, posterior al experimento de inducción a la carotenogénesis evidenció su pobre capacidad de acumular carotenos. Loeblich (1982) menciona, como primera instancia, que uno de los atributos que deben caracterizar a la especie *D. salina* es su capacidad de tornarse de color anaranjado cuando crece en condiciones de salinidad mayores al 15% y con altas intensidades lumínicas. Este no fue el caso de las cepas BC04, BC05 y BC07, ya que sus cultivos presentaron una coloración verde durante todo el período de experimentación, aun cuando además de la condiciones que menciona el autor (altas salinidades altas e irradiancia), el medio inductor presentó un pobre contenido de nitratos. La deficiencia de nitratos, al igual que salinidades extrema y altas irradiancias, son algunos de los factores que promueven la acumulación de ß-caroteno (Loeblich, 1982; Ben-Amotz, 1987; Ben-Amotz y Avron, 1983a y b; Borowitzka y Borowitzka, 1988, Borowitzka *et al.*, 1984; 1989; Cifuentes *et al.*, 1992).

Las cepas BC04, BC05 y BC07 podrían corresponder a la especie *D. viridis*, considerando como criterios principales, además de su morfología, su tolerancia a las altas salinidades y a su poca capacidad de acumular ß-caroteno lo que la hace presentar esa coloración verde. Las cepas arriba mencionadas fueron sometidas a un gradiente de salinidad extremo, el cual alcanzó el punto de saturación (35%), aún cuando se reconoce que la única especie eucariota que crece en tales concentraciones es *D. salina*, (Borowitzka y Borowitzka, 1988), *D. viridis* puede tolerar estas condiciones (Borowitzka, 1981).

Era de esperarse que de acuerdo a las características de los ambientes que se muestrearon (ambientes hipersalinos), existiera una mayor incidencia de *D. salina* en estos cuerpos de agua, ya que éstos presentan las características idóneas para la presencia de esta especie. Sin embargo, es posible que en el proceso de aislamiento, las células de esta especie se hayan eliminado, ya que el análisis al microscopio de las muestras colectadas (previo tratamiento), mostró cierto número de células de color anaranjado, presumiblemente *D. salina*. No se descarta la presencia de esta especie en los cuerpos de agua muestreados, sin embargo, mayores cuidados en el proceso de aislamiento deben considerarse.

Si bien existen trabajos previos que indican la alta capacidad carotenogénica de las cepas Db y BC02, se decidió incluirlas en este trabajo con fines comparativos. A partir de este estudio, donde las condiciones de estrés fueron las mismas para todas las cepas, la cepa BC06 fue la que presentó un mayor contenido de ß-caroteno ($pg \cdot célula^{-1}$), aproximadamente un 50% más que

la cepa Db, considerada como superproductora. La concentraciones de este pigmento por unidad de peso seco total, deben tomarse con reserva, ya que en la mayoría de los casos, el contenido de cenizas fue muy superior al 10%, lo que nos lleva a una sobrestimación del valor real y por ende a comparaciones erróneas con trabajos previos. En general, en microalgas que carecen de pared celular de sílice, el porcentaje de cenizas es menor al 10%. Sin duda, el elevado porcentaje de cenizas encontrado en este trabajo se debió a una deficiente eliminación de las sales, que incrementaron de manera considerable el contenido de cenizas, sobre todo, tomando en cuenta que los muestras presentaban un alto contenido de sales (10% y 30%). Sin embargo, el contenido de pigmentos por unidad de peso seco orgánico, nos proporciona resultados más congruentes ya que solo toma en cuenta la fracción orgánica. A partir de ésta se observó que el mayor contenido de pigmentos lo presentó la cepa Db, lo cual nos indica que esta cepa fue la que registró un mayor rendimiento en función de su biomasa. En el caso del cepa BC06, el contenido de pigmentos por célula fue mayor, aunque su biomasa fue menor que la Db. Es importante reconocer que la cepa Db al inicio del experimento, tanto en la condición control como inductiva, acumuló concentraciones de ß-caroteno superiores al resto de las cepas. Estas son algunas de las características que deben considerase al momento de seleccionar una cepa para la producción a nivel comercial de este pigmento, ya que no sólo se debe elegir aquella que acumule mayor cantidad de pigmento, sino también considerar el tiempo que tarda en acumularlo, así como la biomasa producida.

IV.2. Caracterización fenotípica

El interés de esta investigación fue inicialmente determinar posibles diferencias a nivel de cepas y las respectivas variaciones intraespecíficas debido al hecho de que aunque cepas con morfología idéntica se consideran miembros de una sola especie, esto no asegura el potencial de rendimiento para fines de su utilización biotecnológica, principalmente para la producción de biomasa y metabolitos (carotenoides).

Esta evidencia se basa en el hecho de que las variaciones entre cepas para los parámetros fisiológicos (tasa de crecimiento y producción de pigmentos, entre otros) poseen una base genética debido al hecho de que el efecto de las diferencias ambientales en la expresión del gene se minimizan (Brand *et al.*, 1981a; Simon y Latorella, 1984).

Debido a la influencia de la estación del año en la expresión de las características fenotípicas de los organismos como es el caso de *D. salina*, se decidió colectar la misma durante el período de verano para tales fines. En estas fechas podría encontrarse una alta probabilidad de la ocurrencia de formas carotenogénicas naturales así como las características genotípicas asociadas.

Las comparaciones estadísticas de las frecuencias alélicas entre muestras tomadas en escalas de diferencias de distancias de metros han indicado frecuentemente heterogeneidad microespacial dentro de las similiaridades de las frecuencias alélicas a gran escala (Gallager, 1980, Hedgecock, 1984).

Debido a la ubicuidad ecotípica de *D. salina* en ambientes hipersalinos y a su habilidad para acumular carotenoides de importancia industrial así como a la necesidad de explorar nuevos ambientes y cepas para fines de selección, se eligieron parámetros que evaluaran estas propiedades y que al mismo tiempo sirvieran para su caracterización fenotípica, como a continuación se describen.

IV.2.1. Análisis entre cepas

El estudio de las cepas de diferentes localidades registró una respuesta diferente en relación a las condiciones de inducción mediante la limitación de nitrato, manifestándose en la reducción de las máximas densidades celulares obtenidas y en la tasa de crecimiento específica, así como el incremento en las concentraciones de carotenoides por célula en comparación con el medio no inductor (control).

El análisis de varianza anidado mostró diferencias significativas entre cepas, determinadas principalmente por el efecto en las tasas de crecimiento específica en el tratamiento control, en el cual se obtuvieron los valores mayores de densidad celular y tasa de crecimiento.

En relación al tratamiento inductor, diseñado para observar diferencias entre cepas, los mayores valores de crecimiento y contenido de carotenoides totales los presentó la cepa BC02. Un aspecto que podría influir en los resultados obtenidos, es el hecho de que esta cepa fue aislada más recientemente que la Db, esta última, obtenida de un banco de cepas, cuyo origen es el Mar Muerto en

Israel. Debido a que las condiciones de cultivo se mantuvieron constantes, podría esperarse que de alguna manera el genoma de las cepas nativas, que poseen menos ciclos generacionales, estuviera mayormente conservado reflejándose en características de crecimiento y contenido de pigmentos.

Por ejemplo, Ben-Amotz (1987) menciona que las condiciones inductivas mediante la deficiencia de nitratos provoca la activación del proceso carotenogénico y por ende acentúa la acumulación del ß-caroteno, para realizar funciones de fotoprotección del aparato fotosintético del alga (Loeblich, 1982; Ben-Amotz *et al.*, 1989), debido a que esta condición afectan la síntesis de clorofila, lo que puede ocasionar su pérdida parcial.

Estas características pueden considerarse como variaciones genéticas que afectan la adecuación en poblaciones silvestres adaptadas a ambientes diferentes durante el proceso de especiación. Estudios recientes han revelado que un gran número de genes se segregan dentro y entre poblaciones naturales (Mitchell-Olds, 1995). Estos genes que causan variaciones cuantitativas de las características genotípicas y fenotípicas se han encontrado en poblaciones de algas, plantas y animales. Los genes de efectos grandes no se han considerado importantes para la adaptación en poblaciones naturales debido a que la mayoría de las mutaciones mayores tienen efectos pleiotrópicos deletéreos en adecuación. Sin embargo, pueden ocurrir mutaciones mayores sin efectos deletéreos mismas que pueden jugar un papel importante en la evolución de poblaciones naturales. Alternativamente, fuerte selección de la interacción genotipo-medio ambiente

Al comparar estos resultados con las concentraciones de nitratos y salinidad adecuadas para un mejor crecimiento, no se observó una fase de crecimiento exponencial definida al inicio del experimento, observándose un mayor crecimiento en los monoclonales reflejado por las altas densidades celulares alcanzadas al final del experimento. Aunque en medios de cultivo control se registraron las mayores tasas de crecimiento, estas fueron menores que las determinadas por otros autores en condiciones similares de experimentación (Ginzburg y Ginzburg 1981; Ben-Amotz *et al.*, 1982; Loeblich, 1982) donde los valores fluctuaron entre 0.7 y 1.0 divisiones por día. Ginzburg y Ginzburg (1981) mencionan que la compleja interacción de variaciones en las condiciones ambientales y experimentales se reflejan directamente en el crecimiento de *Dunaliella*. Además la plasticidad bioquímica y adaptación fisiológica de la especie hace que los resultados varíen considerablemente. Las tasas de crecimiento calculadas para cada intervalo del cual se tenía registro de la densidad (Tabla VI) fueron más acordes a las publicadas por Cifuentes *et al.*, (1992) las cuales variaron entre 0.14 y 0.32 divisiones por día. Las diferencias podrían atribuirse a la fase de crecimiento elegida para el cálculo, ya que estos autores se basaron en al fase exponencial. En lo que respecta al crecimiento de cada uno de los clones, los análisis de varianza no permitieron establecer diferencias significativas entre ellos, lo cual sugiere que las tasas de crecimiento fueron similares entre ellos.

En relación a la concentración de pigmentos se encontró una tendencia general a la disminución en la concentración de clorofila ***a*** y ***b*** así como un incremento en el contenido de carotenoides totales.

El efecto de la deficiencia de nutrientes y altas salinidades del medio inductor se hizo evidente en todos lo monoclonales sometidos a esta condición, manifestándose una tendencia hacia la disminución de clorofila ***a*** y ***b*** y un aumento en la concentración de carotenoides. Estos resultados son acordes a los presentados por otros autores quienes consideran que aquellos factores que limitan el crecimiento de *D. salina* como son la deficiencia de nutrientes, temperaturas y salinidades extremas así como altas irradiancias, promueven la síntesis de carotenoides (Loeblich, 1972; Borowitka y Borowitzka, 1988; Borowitzka *et al.*, 1984). Con base a los resultados obtenidos, los principales factores que promovieron la síntesis de carotenoides fueron la deficiencia de nutrientes y la salinidad extrema (25%) ya que la intensidad lumínica fue la misma que en la condición control. Borowitzka y Borowitzka (1988) indican que en *D. salina* la interacción entre salinidad (20% y 24% NaCl) y deficiencia de nitratos inducen un incremento acelerado de carotenoides, provocando que las células de color verde se tornen anaranjadas debido a la acumulación de este pigmento.

Una explicación mas específica sobre el efecto de la deficiencia de nutrientes es la dada por Ben-Amotz y Avron (1983b). Los autores mencionan que en condiciones limitantes de nutrientes se inhiben la síntesis de clorofila e incluso las células pueden perder parcialmente este pigmento lo cual provoca que se

inicie la producción y acumulación de ß-caroteno para proteger a las células de la luz. En el caso de la cepa Db el efecto de la deficiencia de nitratos se manifestó en la disminución del contenido de clorofila ***a*** y ***b*** a partir del día 5, sin embargo el aumento evidente en la concentración de carotenoides se observó hasta el día 25. El comportamiento de la cepa BC02 fue un poco diferente, ya que mientras la clorofila ***a*** y ***b*** disminuyeron desde los primeros días, los carotenoides aumentaron desde el día 10. Posiblemente el contenido de carotenoides no se incrementó de manera considerable debido a que la intensidad lumínica (120 µE m^{-2} s^{-1}) y el tiempo de exposición (12:12) no fueron los adecuados para promover su síntesis. Lo anteriormente expuesto se evidencía con las bajas concentraciones de carotenoides obtenidas al final del experimento, las cuales fueron inferiores a las obtenidas por otros autores en condiciones similares de salinidad y nitratos pero no en cuanto a la cantidad y tiempo de exposición a la luz. Ben-Amotz (1987) menciona que el principal factor que promueve la síntesis de carotenoides es la luz. Cifuentes *et al.* (1992) registraron concentraciones de carotenoides de 13.7 a 35.6 pg·célula^{-1}, (superiores a las encontradas en este trabajo) en células que crecieron en medios sin deficiencia de nutrientes y en salinidades de 25% pero bajo luz continua a 150 µmol m^{-2} s^{-1} (150 µE m^{-2} s^{-1}). Esta intensidad lumínica fue similar a la manejada en este trabajo, sin embargo el tiempo de exposición fue de 12 horas, lo cual puedo haber influido directamente en la cantidad inferior de carotenoides acumulada al final del experimento (Tabla X).

Los análisis de varianza mostraron que no existían diferencias significativas en la concentración de carotenoides entre clones, por lo cual no hay evidencias suficientes que indiquen que algún clon en particular acumuló una mayor cantidad de carotenoides. Por otro lado las diferencias se acentúan entre cepas, ya que la cantidad de carotenoides acumulada al final de experimento por los monoclonales de la cepa BC02 fue muy superior a los de la cepa Db. De igual forma que en el caso de los pigmentos, el crecimiento no fue suficiente para evidenciar la variación intraespecífica de los clones.

Ben-Amotz (1987) menciona que mientras el contenido de lípidos se mantiene a un mismo nivel en condiciones limitantes de nitratos, las proteínas y los carbohidratos disminuyen. Sin embargo los resultados no se ajustan a este patrón, ya que los mayores contenidos proteicos los presentaron los monoclonales sometidos a la condición inductora, donde existieron deficiencias de nitratos y alto contenido de sal, nuevamente la interacción de estos factores debió de haber influido en la respuesta. Posiblemente la mayor concentración de proteínas encontrada en el medio inductor se deba que la célula las sintetiza para hacer frente a las condiciones de estres de este medio y que la cantidad de nitratos de este medio no fue un factor limitante para su síntesis. Por otro lado la mayor cantidad de proteínas encontrada en el día diez pareciera indicar que la síntesis se lleva a cabo en la primera etapa, sin embargo para confirmar tal conjetura seria necesario contar con los valores de proteínas al inicio del experimento.

IV.3. Relaciones fenotípicas

Las evaluaciones para fines de comparación de las diferencias cuantitativas de la diversidad genética se basan en analizar las diferencias medioambientales de las genéticas tanto entre como dentro de clones de las respectivas cepas de interés. El criterio seguido para estos fines fue la elección de cepas de procedencia geográfica de distancias superiores a 200 km. El raciocinio se basa en el hecho de que muchas especies que viven en distintas masas de agua desarrollan diferentes genotipos y por ende fenotipos. Así cepas aisladas de cada localidad morfológicamente idénticas podrían tener potencial de producción diferente de pigmentos.

El análisis de agrupamiento entre variables de las cepas y clones estudiados mostraron que solo los pigmentos permiten diferencias las características de los monoclonales de sus respectivas cepas y condiciones de cultivo.

Los resultados de este estudio pudieran estar influenciados por el número de muestras y de poblaciones y por el hecho de que solo un número reducido de los aislados intentados fueron viables, exponiendo así a las especies a una presión selectiva durante el proceso de aislamiento.

IV.4. Selección de cepas productoras de ß-caroteno

Uno de los primeros aspectos que se deben considerar al momento de elegir una cepa con fines biotecnológicos es evaluar el potencial de las cepas

regionales del lugar donde se pretenda llevar a cabo dicho cultivo. Otro punto importante es tomar en cuenta que organismos de una especie, aislados de una misma área geográfica pueden presentar diferencias fisiológicas notables que se reflejan directamente en tasas diferenciales de crecimiento, producción de pigmentos y ácidos grasos, entre otras moléculas (Gallagher, 1982; Romeo y Fisher, 1982; Gallagher *et al.*, 1984; Wood *et al.*, 1987; Shaw *et al.*, 1989. López-Alonso *et al.*, 1994). Del total de cepas aisladas en este trabajo, solo la BC06 cumple con este requisito ya que su contenido de ß-caroteno por célula (pg · célula) fue superior al de la cepa Db, considerada como superproductora de este pigmento. Por otro lado se corroboró el potencial de la cepa BC02, aislada en un trabajo previo, el cual fue ligeramente superior al de la Db. Es importante señalar que los valores presentados se obtuvieron de un ensayo a nivel de matraz, por cual es necesario realizar los escalamiento pertinentes y evaluar su rendimiento. Sin embargo como primer paso en la exploración de cepas regionales productoras de ß-caroteno, tanto la cepa BC02 como la BC06, cumplen con este requisito.

El análisis a nivel de monoclonales de las cepas Db y BC02 no registró diferencias importantes en relación al contenido de carotenoides totales y crecimiento, lo cual no permite elegir alguna clon en particular con base a estas características. Sin embargo a nivel de cepa, la BC02 fue la que presentó los valores más altos de los parámetros antes mencionados.

V. CONCLUSIONES

• Se aislaron cuatro cepas de *Dunaliella* de diferentes ambientes hipersalino de la Península de Baja California. De las cuales sólo la BC06, aislada de la localidad de San Felipe, fue identificada como *Dunaliella salina.* El resto de las cepas, BC04, BC05 y BC07 se consideran, tentativamente, como *Dunaliella viridis.*

• Tanto la cepa BC06 como BC02 poseen potencial carotenogénico comparable al de la cepa Db, considerada como superproductora de ß-caroteno.

• Se corroboró que el contenido de carotenoides totales, de la cepa BC02 aislada en un trabajo previó, está compuesto en su mayoría por ß-caroteno.

• El análisis a nivel de monoclonales de las cepas Db y BC02 no mostró diferencias en relación al contenido de carotenoide totales y crecimiento, sin embargo a nivel de cepa, la BC02 fue la que presentó los valores más altos.

LITERATURA CITADA

Aasen, A. J., K. E. Eimhjellen y S. Liaaen-Jensen. 1969. An extreme source of ß-carotene. Acta Chimica Scandinavica. 23:2544-2545.

Ben-Amotz, A. 1975. Adaptation of the unicellular alga *Dunaliella parva* to a saline environment. J Phycol. 11:50-54.

Ben-Amotz, A. 1987. Effect of irradiance and nutrient deficiency on the chemical composition of *Dunaliella bardawil* Ben-Amotz y Avron (Volvocales, Chlorophyta). J. Plant Physiol. 131:479-487.

Ben-Amotz, A. y M. Avron. 1980. Glycerol, ß-carotene and dry algal meal production by commercial cultivation of *Dunaliella*. p. 603-610. En: Algae biomass. G. Shelef y C.J. Soeder (eds.). Elsevier / North-Holland Biomedical Press., Amsterdam.

Ben-Amotz, A. y M. Avron. 1981. Glycerol and ß-carotene metabolism in the halotolerant alga *Dunaliella*: a model system for biosolar energy conversion. Trends in Biochemical Sciencs:297-299

Ben-Amotz, A. y M. Avron. 1983a. Accumulation of metabolites by halotolerant algae and its industrial potential. Ann. Rev. Microbiol. 37:95-119.

Ben-Amotz, A. y M. Avron. 1983b. On the factors which determine massive ß-carotene accumulation in the halotolerant alga *Dunaliella bardawil*. Plant Physiol. 72:593-597.

Ben-Amotz, A. y M. Avron. 1989. The wavelength dependence of massive carotene synthesis in *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae). J. Phycol. 25:175-178.

Ben-Amotz, A. y M. Avron. 1990. The biotechnology of cultivating the halotolerant alga *Dunaliella*. TIBTECH 8:121-126.

Ben-Amotz, A., A. Katzs y M. Avron. 1982. Accumulation of ß-carotene in halotolerant algae: purification and characterization of ß-carotene-rich globules from *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae). J. Phycol. 18:529-537.

Ben-Amotz, A., A. Lers y M. Avron. 1988. Stereoisomers of ß-carotene and phytoene in *Dunaliella bardawil*. Plant Physiol. 86:1286-1291.

Ben-Amotz, A., A. Shaish y M. Avron. 1989. Mode of action of the massively accumulated ß-carotene of *Dunaliella bardawil* in protecting the alga against damage by excess irradiation. Plant Physiol. 91:1040-1043.

Brand, L. E. 1981. Genetic variability in reproduction rates in marine phytoplankton populations. Evolution. 35(6):1117-1127.

Bold, H.C. y M. J. Wynne.1985. Introduction to the algae. Prentice-Hall, 2a. ed. New Jersey. 720 pp.

Borowitzka, L. J., M.A. Borowitzka. 1989. ß-carotene (Provitamin A) production with algae. 15-26 En: Biotechnology of vitamins, pigments and growth factors. E. J. Vandamme (ed.). Elsevier Science Publisers, LTD., New York. pp.

Borowitzka, L. J., M.A. Borowitzka y T. P. Moulton. 1984. The mass culture of *Dunaliella salina* for fine chemicals: From laboratory to pilot plant. Hidrobiologia, 116/117:115-125.

Borowitzka, M. A. 1988. Vitamins and fine chemicals from micro-algae. p. 153-194. En: Microalgal Biotechnology. M.A. Borowitzka y L. J. Borowitzka (eds.). Cambridge University Press, Cambridge. 448 pp.

Borowitzka, M. A. y L. J. Borowitzka. 1988. Dunaliella. p. 27-58. En: Microalgal Biotechnology. M.A. Borowitzka y L. J. Borowitzka (eds.). Cambridge University Press, Cambridge. 448 pp.

Borowitzka, M. A., L. J. Borowitzka y D. Kessly. 1990. Effects of salinity increase on carotenoid accumulation in the green alga *Dunaliella salina*. J. of Applied Phycology. 2:111-119.

Cifuentes, A. S., M. González, M. Conejeros, V. Dellarossa y O. Parra. 1992. Growth and carotenogenesis in eight strains of *Dunaliella salina* Teodoresco from Chile. J. of Applied Phycology, 4:111-118.

Del Castillo, E. 1988. Hidrología de la Salina, B.C., México. C.I.C.E.S.E., Ensenada, México. Tesis de Maestría. 122pp.

Dortch, Q., J. R. Clayton Jr., S. S. Thoresen y S. I. Ahmed. 1984. Species differences in accumulation of nitrogen pools in phytoplankton. Mar. Biol., 81:237-250.

Friedrich, G.C. y T. E. Whitledge. 1972. Autoanalyzer procedures for nutrients. p. 38-55. En: Phytoplankton growth dynamics, Vol. I. S. P. Plavlov (ed.). University of Washington Special Report, Seattle. pp.

Gallagher, J. C. 1982. Physiological variation and electrophoretic banding patterns of genetically different seasonal populations of *Skeletonema costatum* (*Bacillariophyceae*). J. Phycol. 18:148-162.

Gallagher, J. C. 1986. Population genetics of microalgae. Nova Hedwigia. 83:6-14.

Gallagher, J. C., A. M Wood,. y R. S. Alberte. 1984. Ecotypic differentiation in the marine diatom *Skeletonema costatum:* influence of light intensity on the photosynthetic apparatus. Marine Biology 82:121-134.

Guillard, R. R. L. 1973a. Division rates. p. 289-312. En: Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurements. J. R. Stein. (ed.). Cambridge University Press, Cambridge. 448 pp.

Guillard, R. R. L. 1973b. Methods for microflagellates and nannoplankton. p. 69-85. En: Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurements. J. R. Stein. (ed.). Cambridge University Press, Cambridge. 448 pp.

Guiéterrez-Millán, L.E. 1996. Ácido desoxirribonucleíco, proteína y pigmentos durante la carotenogénesis inducida en una nueva cepa de *Dunaliella salina* (Chlorophyta), aislada de una laguna hipersalina de Baja California. C.I.C.E.S.E., Ensenada, México. Tesis de Maestría. 82 pp.

Gutiérrez Millán, L. E. y Paniagua Michel, J. 1994. Isolated microalgae as source of anoxyc and oxygenated carotenoids. *Simposio Marine Biotechnology*: emerging economic opportunities. 7-9 Octubre. San Diego, CA.

Gutiérrez Millán, L. E. y Paniagua Michel, J. 1995. On the potential of screened microalga as food supplement for aquaculture. Aquaculture. 1-4 Febrero. San Diego, CA.

Hansmann, E. 1978. Pigment analysis. p: 359-368. En: Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurements. J. R. Stein. (ed.). Cambridge University Press, Cambridge. 448 pp.

Hoshaw, R. W. y J. R. Rosowski. 1973. Methods for microscopic algae. p. 53-68. En: Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurements. J. R. Stein. (ed.). Cambridge University Press, Cambridge. 448 pp.

Javor, B. 1989. Hypersalines environments microbiology and biogeochemistry. Springer-Verlog. Berlin. 328 pp.

Jensen, A. 1978. Chlorophylls and carotenoids. p. 59-70. En: Handbook of Phycological Methods. Physiological and Biochemical Methods. J. A. Hellebust y J. S. Craige. (eds.). Cambridge University Press, Cambridge. 512 pp.

Loeblich, L. A. 1982. Photosynthesis and pigments influenced by light intensity and salinity in the halophile *Dunaliellla salina* (Chlorophyta). J. mar. Biol. Ass. U.K. 62:493-508.

López Alonso, D., C. Segura del Castillo, J. L. García Sánchez, J. A. Sánchez Pérez y F. García Camacho. 1994. Quantitative genetics of fatty acid variation in *Isochrysis galbana* (Primnesiophyceae) and *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae). J. Phycol. 30:553-558.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr y R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193:265-275 pp.

Mitchell Olds, T. 1995. The molecular basis of quantitative genetics variation in natural populations. TREE, 10:324-327.

Moulton T. O., L. J. Borowitzka y D. J. Vincent. 1987. Culture of *Dunaliella salina* for β-carotene: from pilot plant to production plant. Hydrobiologia 151/152:99-105.

Paniagua Michel, J. 1993. Biotecnología microalgal y obtención de productos químicos y alimenticios. Rev. Inv. Cient. 4(1):107-117.

Paniagua Michel, J., L. F. Bückle, C. Granados Y D.H. Loya. 1989. Manual de metodologías y alternativas para el cultivo de microalgas. 2a. ed. CICESE, Informe Especial OC-89-01, Ensenada, B.C. 61 pp.

Rausch, T. 1981. The estimation of micro-algal protein content and its meaning to the evaluation of algal biomass I. Comparison of methods for extracting protein. Hydrobiologia, 78:237-251 pp.

Romeo, A. J. y N. D. Fisher. 1982. Intraspecific comparisons of nitrate uptake in three marine diatoms. J. Phycol. 18:220-225.

Schoen, S. 1988. Cell counting. p. 16-22. En: Experimental Phycology: A Laboratory Manual. C.S. Lobban, D.J. Chapman y B.P. Kremer (eds.). Cambridge University Press, New York. 295 pp.

Shaw, P. M., G. J. Jones, J. D. Smith y R. B. Johns. 1989. Intraespecific variations in the fatty acids of the diatom *Skeletonema costatum*. Phytochemistry, 28(3):811-815.

Sokal, R. R. y F. J. Rohlf. 1981. Biometry. W.H. Freeman and Company. 2a. ed. San Francisco, 859 pp.

Sorokin, C. 1973. Dry weight, packed cell volume and optical density. p. 321-343. En: Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurements. J. R. Stein (ed.). Cambridge University Press, Cambridge. 448 pp.

Starr, R. C. y J. A. Zeiukus. 1987. UTEX-The culture collection of algae at the University of Texas at Austin. J. Phycol. 23:1-47.

Sterman, N. T. 1988. Spectrophotometric and fluorometric chlorophyll analysis. p. 35-46. En: Experimental Phycology: A Laboratory Manual. C.S. Lobban, D.J. Chapman y B.P. Kremer (eds.). Cambridge University Press, New York. 295 pp.

Strickland, J. D. H. y T. R. Parsons. 1972. A practical handbook of seawater analysis. 2nd ed. Bull. Fish. Res. Bd. Canada, 167 pp.

Wood, A. M., R. Lande y G. A. Fryxell. 1987. Quantitative genetic analysis of morphological variation in an antartic diatom grown at two light intensities. J. Phycol. 23:42-54.

Zar, J. H. 1984. Biostatistical analysis. Prentice-Hall. Inc., New Jersey. 2a. de. 718 pp.