

RESUMEN de la Tesis de Luis Enrique Gutiérrez-Millán presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS en ECOLOGÍA MARINA. Ensenada, Baja California, México. Enero de 1996.

ÁCIDO DESOXIRIBONUCLEICO, PROTEÍNA Y PIGMENTOS DURANTE LA CAROTENOGÉNESIS INDUCIDA EN UNA NUEVA CEPA DE *Dunaliella salina* (CHLOROPHYTA), AISLADA DE UNA LAGUNA HIPERSALINA DE BAJA CALIFORNIA.

Resumen aprobado por:

Dunaliella salina es una microalga de interés biotecnológico que, bajo condiciones de estrés salino y/o limitación de nutrientes, acumula en su cloroplasto gran concentración del pigmento β -caroteno, metabolito secundario de alto valor comercial. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de salinidad (NaCl) y concentración de nitrato sobre la carotenogénesis y su relación con proteínas y ácido desoxiribonucleico en una nueva cepa de *D. salina*, aislada de la laguna hipersalina "La Salina" de Ensenada, Baja California, México.

La identificación de la especie se realizó de acuerdo a las propiedades halofílicas y a la razón de carotenoides/clorofila *a*. Para inducir la carotenogénesis, se diseñó un experimento factorial con dos salinidades (15 y 25 % NaCl) y tres concentraciones de nitrato (5, 2.75 y 0.5 mM), con tres réplicas.

La identificación de *D. salina* representa un registro nuevo de esta especie en Baja California. Este estudio mostró que la inducción de la carotenogénesis reduce el crecimiento poblacional del alga. La concentración obtenida de carotenoides fue directamente proporcional a las molaridades de cloruro de sodio ensayadas e inversamente proporcional al ión nitrato, como se observó al concluir el experimento. En condiciones carotenogénicas se encontró un contenido mayor de ADN y proteína celular en comparación con lo encontrado en el alga cultivada en medio control. Esta situación inductiva produce una disminución en el nivel de clorofila *a* y *b* por número celular. Los resultados indican la necesidad de una elevación en el nivel de ADN y proteínas para realizar síntesis *de novo* de carotenoides, lo cual refleja el control genético del proceso carotenogénico.

**DEOXIRIBONUCLEIC ACID, PROTEIN AND PIGMENTS DURING INDUCED
CAROTENOGENESIS IN A NEW STRAIN OF *Dunaliella salina*
(CHLOROPHYTA) ISOLATED FROM HYPERSALINE LAGOON IN BAJA
CALIFORNIA.**

ABSTRACT

Dunaliella salina is a microalga of biotechnological importance that under stress of sodium chloride and nutrient deficiency accumulates into its chloroplast a high concentration of the β -carotene pigment, secondary metabolite of high commercial value. The aim of this research was to evaluate the effect of salinity (NaCl) and nitrate concentration on carotenogenesis correlated to proteins and deoxyribonucleic acid (DNA) into a new strain of *D. salina* isolated from the hypersaline lagoon La Salina in Baja California, Mexico.

Species identification was performed according to the halophilic properties and the carotenoid/chlorophyll *a* ratio of the strain. A three-replicate factorial experiment with two salinities (15 and 25 % NaCl) and three nitrate concentration (5, 2.75 y 0.5 mM) was undertaken to induce carotenogenesis.

The isolated of *D. salina* represents a new record in Baja California. This work demonstrated that induced carotenogenesis diminished algal population growth. The cell accumulation of carotenoids was directly proportional to NaCl and inversely to nitrate molarities, as observed at the end of the experimented period. Under carotenogenic conditions a higher DNA and cell protein content was found when compared to the alga cultivated in the control media. This inductive state decreased the cell biosynthesis of chlorophylls (*a* and *b*). The obtained results suggest the need of maintaining a level DNA and protein to realize *de novo* carotenoids synthesis, which reflects the genetic control of carotenogenic process.

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE
EDUCACIÓN SUPERIOR DE ENSENADA.

DIVISIÓN DE OCEANOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE ECOLOGÍA

**ÁCIDO DESOXIRIBONUCLEICO, PROTEÍNA Y PIGMENTOS DURANTE LA
CAROTENOGÉNESIS INDUCIDA EN UNA NUEVA CEPA DE *Dunaliella salina*
(CHLOROPHYTA), AISLADA DE UNA LAGUNA HIPERSALINA DE BAJA
CALIFORNIA.**

TESIS

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

presenta

LUIS ENRIQUE GUTIÉRREZ-MILLÁN

Ensenada, Baja California, México. Enero de 1996.

DEDICATORIA

A ti, mi tierna esposa, por tu maravilloso amor.

A mis tres adorables angelitos: Jéssica, Luis Enrique y Orlando, razones de mi existir.

A mi Padre, por su ejemplo de superación.

A ti, mamá, que vives eternamente en mi corazón.

A mis hermanos Felipe, Alma y Alberto, por su afán incansable de cada día ser mejores.

A mi cuñada Tuly, con cariño.

Con especial afecto y admiración, al Dr. Carlos Vásquez Peláez.

AGRADECIMIENTOS

- Al Dr. Jesús Paniagua Michel, por su dirección en esta investigación y por las facilidades prestadas en su laboratorio de Biotecnología Marina, CICESE.
- Al Dr. Jorge De La Rosa, por su participación como miembro del comité de tesis y por las facilidades prestadas en su laboratorio de Genética, U.A.B.C.
- A la M. en C. Elena Solana, investigadora de CICESE, por su participación como miembro del comité de tesis y por su asesoría estadística.
- Al Dr. Jaime Färber, por su participación como miembro del comité de tesis y por las facilidades prestadas en su laboratorio de Bioquímica Marina, CICESE.
- Al M. en C. Francisco Suárez, director administrativo de CICESE, por su participación como miembro del comité de tesis.
- Al Dr. Fernando Bückle, por las facilidades prestadas en sus instalaciones del Departamento de Acuicultura, CICESE.
- Al Dr. Leonardo Lizárraga, por las facilidades prestadas en su laboratorio de Biotecnología Marina, CICESE.
- Al M. en C. Vicente Ferreira, por las facilidades prestadas en su laboratorio de Paleoceanografía, CICESE.
- Al Dr. Helmut Maske, por las facilidades prestadas en su laboratorio de Ecofisiología del Fitoplancton Marino, CICESE.
- A la cand. Ph. D. Ma. Del Refugio González, por su valiosa asesoría en indentificación de fitoplancton.
- Al diligente personal de la Biblioteca de CICESE.
- A las entusiastas Sila, Carmen y Lupita, por su ayuda incondicional.
- A mis eficaces colaboradoras de laboratorio: Berenice y Erika.
- A mis amigos Mónica, Elisa, Alfredo, Idalia, Siu, Eduardo, Iriana, Alf, Marisela, Avril, Manuel Mendoza, Reyna, Manuel Grijalva, Mayoy, Margarita, Pepe y Unai, por su amistad y constante apoyo.
- Al CESUES y al CONACYT, por la becas otorgadas para realizar esta investigación.

CONTENIDO

	<u>Página</u>
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	8
II. 1. Objetivo general.	8
II. 2. Objetivos específicos.	8
III. MATERIALES Y MÉTODOS	9
III. 1. Prospección.	9
III. 1. 1. Localización del área de estudio.	9
III. 1. 2. Muestreo.	11
III. 2. Aislamiento e identificación de <i>Dunaliella salina</i> .	11
III. 2. 1. Aislamiento.	11
III. 2. 2. Identificación de la especie.	15
III. 3. Condiciones experimentales.	16
III. 3. 1. Condiciones de cultivo.	16
III. 3. 2. Inducción a la carotenogénesis.	16
III. 4. Evaluación de crecimiento.	18
III. 5. Análisis bioquímicos.	20
III. 5. 1. Análisis de pigmentos.	20
III. 5. 2. Determinación de proteínas totales.	22
III. 5. 3. Cuantificación de ácidos nucleicos.	24
III. 6. Análisis estadísticos.	30
IV. RESULTADOS	31
IV. 1. Prospección y aislamiento.	31

CONTENIDO (Continuación)

	<u>Página</u>
IV. 2. Identificación de la especie.	33
IV. 2. 1. Crecimiento.	33
IV. 2. 2. Proporción carotenoides / clorofila <i>a</i> .	33
IV. 3. Inducción a la carotenogénesis.	37
IV. 3. 1. Crecimiento.	39
IV. 3. 2. Pigmentos.	39
IV. 3. 3. Proteínas y ácidos nucleicos.	56
IV. 3. 4. Relación entre variables.	65
V. DISCUSIÓN	66
V. 1. Prospección y aislamiento.	66
V. 2. Identificación de la especie.	67
V. 2. 1. Crecimiento.	67
V. 2. 2. Proporción carotenoides / clorofila <i>a</i> .	67
V. 3. Inducción a la carotenogénesis.	68
V. 3. 1. Crecimiento.	68
V. 3. 2. Pigmentos.	69
V. 3. 3. Proteínas y ácidos nucleicos.	70
V. 3. 4. Relación entre variables.	72
VI. CONCLUSIONES	73
LITERATURA CITADA	74

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura</u>		<u>Página</u>
1	Localización del sitio de muestreo, La Salina, Baja California.	10
2	Configuración de La Salina, B.C. y localización de las estaciones de muestreo (Tomado de Del Castillo, 1988).	12
3	Métodos de aislamiento e identificación de <i>Dunaliella salina</i> .	13
4	Relación de absorbencia y número celular de <i>Dunaliella salina</i> .	21
5	Registro continuo de un extracto acetónico al 90% (v/v en agua) de <i>Dunaliella salina</i> cultivada en el medio control.	23
6	Curva de calibración para proteína con base en albúmina de suero de bovino (ABS).	25
7	Curva de calibración para ácido desoxiribonucleico con base en el colorante hoechst 33258 (escala x2 a la ordenada).	27
8	Curva de calibración para ácido desoxiribonucleico con base en el colorante anaranjado de tiazol (escala x4 a la ordenada).	28
9	Curva de calibración para ácido ribonucleico con base en el colorante anaranjado de tiazol (escala x4 a la ordenada).	29
10	Crecimiento de <i>Dunaliella salina</i> en medio control (10% NaCl) y prueba (35% NaCl).	34
11	Registro continuo de dos extractos acetónicos al 90% (v/v en agua) de células en medio control (10% NaCl) y prueba (35% NaCl) de <i>Dunaliella salina</i> .	35

LISTA DE FIGURAS (Continuación)

<u>Figura</u>		<u>Página</u>
12	Proporción de carotenoides / clorofila a en células de <i>Dunaliella salina</i> en medio control (10% NaCl) y prueba (35% NaCl).	36
13	Células de <i>Dunaliella salina</i> cultivadas en medio control (10% NaCl).	38
14	Células de <i>Dunaliella salina</i> en carotenogénesis intermedia (6 pg carotenoides/célula) en medio al 35% NaCl.	38
15	Acumulación masiva de carotenoides (10 pg / célula) en <i>Dunaliella salina</i> en medio al 35% NaCl.	38
16	Crecimiento de <i>Dunaliella salina</i> en los seis diferentes tratamientos durante la fase experimental.	40
17	Efecto de la salinidad y concentración de nitrato sobre el crecimiento de <i>Dunaliella salina</i> después de 7 días de cultivo.	41
18	Efecto de la salinidad y concentración de nitrato sobre el crecimiento de <i>Dunaliella salina</i> después de 18 días de cultivo.	42
19	Concentración de clorofila a en <i>Dunaliella salina</i> durante la fase experimental.	43
20	Efecto de la salinidad y la concentración de nitrato sobre el contenido de clorofila a en <i>Dunaliella salina</i> después de 7 días de cultivo.	45

LISTA DE FIGURAS (Continuación)

<u>Figura</u>		<u>Página</u>
21	Efecto de la salinidad y concentración de nitrato sobre el contenido de clorofila <i>a</i> en <i>Dunaliella salina</i> después de 18 días de cultivo.	46
22	Concentración de clorofila <i>b</i> en <i>Dunaliella salina</i> durante la fase experimental.	48
23	Efecto de la salinidad y la concentración de nitrato sobre el contenido de clorofila <i>b</i> en <i>Dunaliella salina</i> después de 18 días de cultivo.	49
24	Concentración de carotenoides en <i>Dunaliella salina</i> durante la fase experimental.	50
25	Efecto de la salinidad y la concentración de nitrato sobre el contenido de carotenoides en <i>Dunaliella salina</i> después de 7 días de cultivo.	51
26	Efecto de la salinidad y la concentración de nitrato sobre el contenido de carotenoides en <i>Dunaliella salina</i> después de 18 días de cultivo.	52
27	Proporción de carotenoides / clorofila <i>a</i> en <i>Dunaliella salina</i> durante la fase experimental.	53
28	Efecto de la salinidad y la concentración de nitrato sobre la proporción de carotenoides / clorofila <i>a</i> en <i>Dunaliella salina</i> después de 7 días de cultivo.	54

LISTA DE FIGURAS (Continuación)

<u>Figura</u>		<u>Página</u>
29	Efecto de la salinidad y la concentración de nitrato sobre la proporción de carotenoides / clorofila <i>a</i> en <i>Dunaliella salina</i> después de 18 días de cultivo.	55
30	Concentración de proteína celular en <i>Dunaliella salina</i> durante la fase experimental.	57
31	Efecto de la salinidad y la concentración de nitrato sobre el contenido proteico en <i>Dunaliella salina</i> después de 7 días de cultivo.	59
32	Efecto de la salinidad y la concentración de nitrato sobre el contenido proteico en <i>Dunaliella salina</i> después de 18 días de cultivo.	60
33	Concentración de ácido desoxiribonucleico celular en <i>Dunaliella salina</i> durante la fase experimental.	61
34	Efecto de la salinidad y la concentración de nitrato sobre el contenido de ácido desoxiribonucleico en <i>Dunaliella salina</i> después de 7 días de cultivo.	62
35	Efecto de la salinidad y la concentración de nitrato sobre el contenido de ácido desoxiribonucleico en <i>Dunaliella salina</i> después de 18 días de cultivo.	63
36	Concentración de ácido ribonucleico celular (normalizada al valor máximo) en <i>Dunaliella salina</i> durante la fase experimental.	64

LISTA DE TABLAS

<u>Tabla</u>		<u>Página</u>
I	Medio de cultivo utilizado, modificado de Ben-Amotz (1975) y Ben-Amotz y Avron (1983a).	17
II	Tratamientos experimentales formados por la combinación de tres distintas concentraciones de nitrato y dos diferentes salinidades.	19
III	Parámetros físico-químicos de las cinco estaciones de muestreo de "La Salina", B. C.	32
IV	Resultados de los análisis de varianza (valores "F") practicados a los pigmentos de <i>Dunaliella salina</i> después de 7 y 18 días de experimentación.	44
V	Resultados de los análisis de varianza (valores "F") de las estimaciones de proteínas y ácidos nucleicos después de 7 y 18 días de cultivo.	58

ÁCIDO DESOXIRIBONUCLEICO, PROTEÍNA Y PIGMENTOS DURANTE LA CAROTENOGENÉISIS INDUCIDA EN UNA NUEVA CEPA DE *Dunaliella salina* (CHLOROPHYTA), AISLADA DE UNA LAGUNA HIPERSALINA DE BAJA CALIFORNIA.

I. INTRODUCCIÓN

La biotecnología es una ciencia interdisciplinaria que integra los conocimientos de bioquímica, biología molecular, genética e ingeniería, al estudio y aprovechamiento de los organismos o de sus componentes. Esta definición incluye a los productos y procesos resultantes de las técnicas de manipulación del ADN.

En tiempos recientes ha surgido una nueva área de la biotecnología orientada a la investigación y explotación de los organismos marinos: la biotecnología marina. Este campo es relativamente nuevo, comparado con la biotecnología "tradicional" (no-marina) (Attaway, 1989). En países en desarrollo, la biotecnología marina puede ayudar a resolver, de acuerdo a los propios recursos naturales y financieros, algunos de sus problemas más apremiantes, tales como el manejo de enfermedades, suministro de alimentos y control de la contaminación. De acuerdo a esto, es de esperarse que los países elijan distintas estrategias para el desarrollo de la biotecnología marina en base al análisis de sus propias necesidades, ventajas y oportunidades (Baker, 1989).

En este contexto surge la biotecnología microalgal, cuya aplicación en países como Australia, Israel y E.U.A., ha permitido obtener una amplia gama de productos químicos finos, pigmentos, proteína unicelular, aceites y polisacáridos

de importancia económica. Sin embargo, los rendimientos de los metabolitos no siempre han sido los deseados, ya que las condiciones que fomentan la síntesis de algunos productos, inhiben la acumulación de otros e incluso el crecimiento celular. La aplicación de las metodologías modernas de la biotecnología permitirá una mejor caracterización y optimización de los recursos.

Entre las microalgas con interés biotecnológico cabe destacar a *Dunaliella* (Chlorophyta, Volvocales), alga unicelular de forma ovoide, de 4-10 μm de ancho y de 6-15 μm de largo. La característica morfológica principal de este género es la ausencia de una pared celular polisacárida rígida. La célula es un protoplasto natural, envuelta tan sólo por una membrana delgada elástica conocida con el nombre de periplasto (Ben-Amotz y Avron, 1980). Esta estructura le permite al organismo cambios rápidos en la forma y volumen celulares en respuesta a diferencias osmóticas externas (Ben-Amotz y Avron, 1983a).

Recientemente, el interés por esta microalga se ha incrementado debido a que crece en ambientes extremos de temperatura y salinidad, lo cual facilita enormemente el desarrollo de cultivos monoespecíficos (Borowitzka, Moulton y Borowitzka, 1986), aparte de acumular productos de importancia química como el glicerol, servir como fuente considerable de proteína para otros organismos y producir metabolitos de alto valor agregado, como el β -caroteno.

Ben-Amotz y Avron (1980, 1983a) establecen que *Dunaliella* puede producir fotosintéticamente glicerol en concentraciones de hasta un 80% de su

peso seco para balancear la gran presión osmótica a que es sujeta la célula en ambientes hipersalinos.

En acuicultura, se ha hecho extensivo el uso de *Dunaliella* como alimento para peces, moluscos y crustáceos en cultivo, dada su excelente digeribilidad por carecer de una pared celular. Además, a los organismos cultivados les permite generar una coloración atractiva para el consumidor y, lo más importante, aporta un alto contenido proteico (50-60% y 30% del peso seco) en el caso de células cultivadas en condiciones normales y carotenogénicas, respectivamente (Ben-Amotz y Avron, 1980). De acuerdo con Ben-Amotz y Avron, 1982 y Thomas y Dumas, 1970 (citados por: Borowitzka y Borowitzka, 1988) el contenido de proteína de esta microalga es más alto en los primeros estadios de crecimiento y decae conforme el cultivo envejece.

Una de las especies más estudiadas del género *Dunaliella* es sin duda *D. salina*. Entre sus pigmentos acumulados, los de mayor importancia económica son los carotenoides, especialmente el β -caroteno, molécula compuesta de 40 átomos de carbono. Este pigmento es accesorio del aparato fotosintético de plantas verdes y algas, de color naranja (Borowitzka, Borowitzka y Moulton, 1984) que juega un papel importante en la protección de las clorofilas contra la fotooxidación producida por las altas irradiancias a las que el alga normalmente está expuesta en ambientes naturales (Ben-Amotz y Avron, 1983b). Entre las aplicaciones actuales del β -caroteno sobresale su uso como colorante alimenticio, además de ser importante en la industria farmacéutica y de salud por ser precursor de la

vitamina A, atributo utilizado también en determinados productos de la cosmetología moderna (Bauernfeind, 1981).

El β -caroteno puede presentarse en las formas estereo-isoméricas: 15-*cis* β -caroteno (10% del total de β -caroteno), 9-*cis* β -caroteno (41%) y All-*trans* β -caroteno (42%) (Ben-Amotz y Avron, 1982; Ben-Amotz y Shaish, 1992). Además de este terpeno, *Dunaliella* contiene las clorofilas *a* y *b*, y acumula en menor cantidad, de entre otros carotenoides, a la luteína, pigmento también de importancia comercial (Borowitzka y Borowitzka, 1988).

D. salina y *D. bardawil* se consideran las fuentes naturales más abundantes de β -caroteno (Aasen, Eimhjellen y Liaaen-Jensen, 1969; Ben-Amotz y Avron, 1980). No obstante, Borowitzka, Borowitzka y Moulton (1984) propusieron que la especie *D. bardawil* aislada en el Mar Muerto, en Israel, podría bien ajustarse a la descripción de *D. salina* Teodoresco. La propiedad carotenogénica de esta última especie ha sido estudiada por diversos autores (Loeblich, 1982; Ben-Amotz y Avron, 1983b; Shaish, Ben-Amotz y Avron, 1991; Cifuentes *et al.*, 1992). Massyuk y Radchenko (1970, citados por: Ben-Amotz y Avron, 1980), Loeblich (1982) y Borowitzka, Borowitzka y Moulton (1984) han determinado que cuando estas microalgas crecen en condiciones no-inductivas, los niveles normales de β -caroteno representan aproximadamente el 0.3% del peso seco algal; sin embargo, en situaciones que inducen la acumulación masiva de este pigmento, los valores pueden ser superiores al 6% de su peso seco. Algunas de estas condiciones carotenogénicas incluyen altas concentraciones de NaCl (mayores a 2.5 M),

deficiencias de nutrientes (NO_3^{-1} , SO_4^{-2} , PO_4^{-3}) e intensidades luminosas elevadas ($300 \mu\text{M quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

Cuando se provoca choque salino o limitación de nutrientes en este organismo sucede un aumento en la producción del β -caroteno, acompañado de una reducción del crecimiento a nivel celular. El cambio celular provocado por la carotenogénesis natural e inducida, mediante altas salinidades ($> 2.5 \text{ M}$) y deficiencia en nutrientes, podría ser el resultado de alteraciones a nivel de ácidos nucleicos y proteínas. El estudio del efecto del proceso carotenogénico sobre el contenido en ácidos nucleicos y proteínas algales es información básica importante para fines de manejo y optimización de la cepa. Los logros obtenidos en la presente investigación podrían marcar lineamientos para la caracterización de este proceso orientado hacia el aislamiento de genes responsables y así manipular la producción del metabolito. Sin embargo, la literatura sobre la biología molecular del proceso carotenogénico en *D. salina* es escasa. Algunos autores (Lers, Biener y Zamir, 1990; Zamir, 1992) han postulado la existencia de un gen (*cbr*: "relativo a la biosíntesis de carotenos") relacionado al proceso carotenogénico en mutantes de *D. bardawil*. Lers, Bien y Zamir (1990) afirman que la carotenogénesis inducida por altas irradiancias en esta especie, requiere la transcripción y traducción *de novo* y, por lo tanto, la activación de genes relacionados. Los cambios en el nivel de proteínas en *D. salina*, inducidos mediante altas salinidades ($> 3 \text{ M}$) (Sadka, Himmelhock y Zamir, 1991), se reflejan directamente en alteraciones a nivel del ácido ribonucleico y desoxiribonucleico (ARN y ADN). La adición de NaCl al medio de cultivo de dos especies de cianobacterias (algas azul-verdes) redujo la tasa de crecimiento e indujo cambios

en los contenidos de ácidos nucleicos: en una especie disminuyó el contenido de ARN y ADN, mientras que en la otra el ARN se incrementó y no hubo cambios en ADN (Hagemann y Wittenburg, 1989). Además de los efectos del NaCl sobre la concentración de proteínas y ácidos nucleicos en microalgas, existen también otros factores como luz y nutrientes que afectan a dichos componentes celulares.

A pesar de los avances logrados, son escasas las investigaciones sobre la determinación de ácidos nucleicos durante la carotenogénesis inducida mediante estrés salino y limitación de nitrato en *D. salina*. Esta información es fundamental como una primera aproximación a la biología molecular de esta microalga para posteriores estudios de manipulación genética y optimización del proceso carotenogénico, tanto en cepas ya conocidas, como en aquellas de reciente aislamiento, tal y como es el caso del presente estudio.

Es importante considerar también que si se quiere desarrollar a futuro una cepa de *D. salina* excepcionalmente carotenogénica en nuestro país, deben evaluarse preferencialmente las cepas autóctonas que están ya adaptadas a condiciones específicas de temperatura, salinidad e irradiancia.

Dunaliella salina se ha identificado en Yavaros, Sonora (Ortega-Salas y Martínez, 1987), en la "Laguna Figueroa", Baja California (Stolz, 1984) y en la salina "Punta Colorada", Baja California Sur (Loeblich, 1982). La cepa asilada de este último sitio se encuentra actualmente en la colección de algas de la Universidad de Texas en Austin, Texas, E. U. A., bajo la clasificación UTEX 1644 (Starr y Zeikus, 1987). Además, Del Castillo (1988) ha informado de una forma

celular semejante a *Dunaliella* en "La Salina", Baja California, 30 Km al norte de Ensenada, B.C.

A pesar de la existencia de ambientes propicios para la presencia de esta especie en México, se carece de estudios orientados hacia el aprovechamiento biotecnológico de esta microalga.

II. OBJETIVOS

II. 1. Objetivo general.

Evaluar el efecto de la salinidad (NaCl) y concentración de nitrato sobre la carotenogénesis y su relación con proteínas y ácido desoxiribonucleico en una nueva cepa de *Dunaliella salina*, aislada de la laguna hipersalina "La Salina", Baja California.

II. 2. Objetivos específicos.

- Identificar y aislar una nueva cepa de *Dunaliella salina*.
- Inducir la carotenogénesis en *D. salina*, mediante limitación de nitrato y exceso de NaCl.
- Evaluar el crecimiento logístico de *D. salina* durante la carotenogénesis
- Cuantificar la concentración de clorofilas y carotenoides de *D. salina* en condiciones carotenogénicas.
- Determinar el contenido de proteína total de *D. salina* en medios carotenogénicos.
- Estimar los niveles de ácido desoxiribonucleico de *D. salina* en carotenogénesis.
- Formular un modelo que relacione las variables estudiadas para predecir el rendimiento celular de carotenoides en la cepa aislada de *D. salina*.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III. 1. Prospección.

III. 1. 1. Localización del área de estudio.

Este estudio se realizó en la laguna hipersalina denominada "La Salina", en el estado de Baja California, México, a los 35° 05' latitud norte y 118° 40' longitud oeste (figura1). El principal acceso a la zona es por la carretera escénica Ensenada-Tijuana. A la fecha de realización del presente trabajo, esta laguna estaba separada del océano adyacente mediante depósitos de arena y dividida en secciones este y oeste por la carretera antes citada. Ambas partes cubrían un área superficial de 33.2 ha y una capacidad máxima de 216,072 m³. Del Castillo (1988) menciona que la profundidad promedio de este cuerpo de agua era de 0.62 ± 0.24 m.

Actualmente, en la zona de estudio se realizan trabajos de construcción de una marina, por lo cual la descripción geográfica del área se restringe al período de esta investigación (1993-1994).

Esta laguna presentaba, hasta antes de su modificación actual, un régimen de desecación anual en época seca, lo cual propiciaba un incremento gradual en salinidades desde 150 ppm hasta saturación de sal (aprox. 350 ppm).



Figura 1. Localización del sitio de muestreo, La Salina Baja California.

III. 1. 2. Muestreo.

Se realizó un muestreo aleatorio estratificado, siguiendo la metodología propuesta por Sournia (1978) para obtener material biológico representativo de las diversas condiciones micro-ambientales del cuerpo de agua principal y sus pozas circundantes (figura 2). En cada zona de muestreo se colectó un litro de agua para su observación *in vivo* al microscopio y su posterior procesamiento para el aislamiento de la cepa. Las muestras obtenidas fueron analizadas por separado, de acuerdo a su origen y coloración. Las estimaciones de pH, salinidad, temperatura e irradiancia se realizaron por separado para cada sitio de muestreo.

III. 2. Aislamiento e identificación de *Dunaliella salina*.

III. 2. 1. Aislamiento.

El aislamiento de las cepas (figura 3) se logró siguiendo en forma secuencial los métodos: (1) gradiente de salinidad; (2) centrifugación diferencial; (3) pipeta capilar al microscopio; (4) cultivo en medio sólido.

(1) Gradiente de salinidad: Las muestras fueron sometidas a un constante aumento de salinidad, elevando la concentración en 5% cada tercer día, desde agua de mar (10% NaCl) hasta llegar al punto de saturación (35% NaCl). De esta manera se separaron especies en función de su tolerancia a la salinidad.

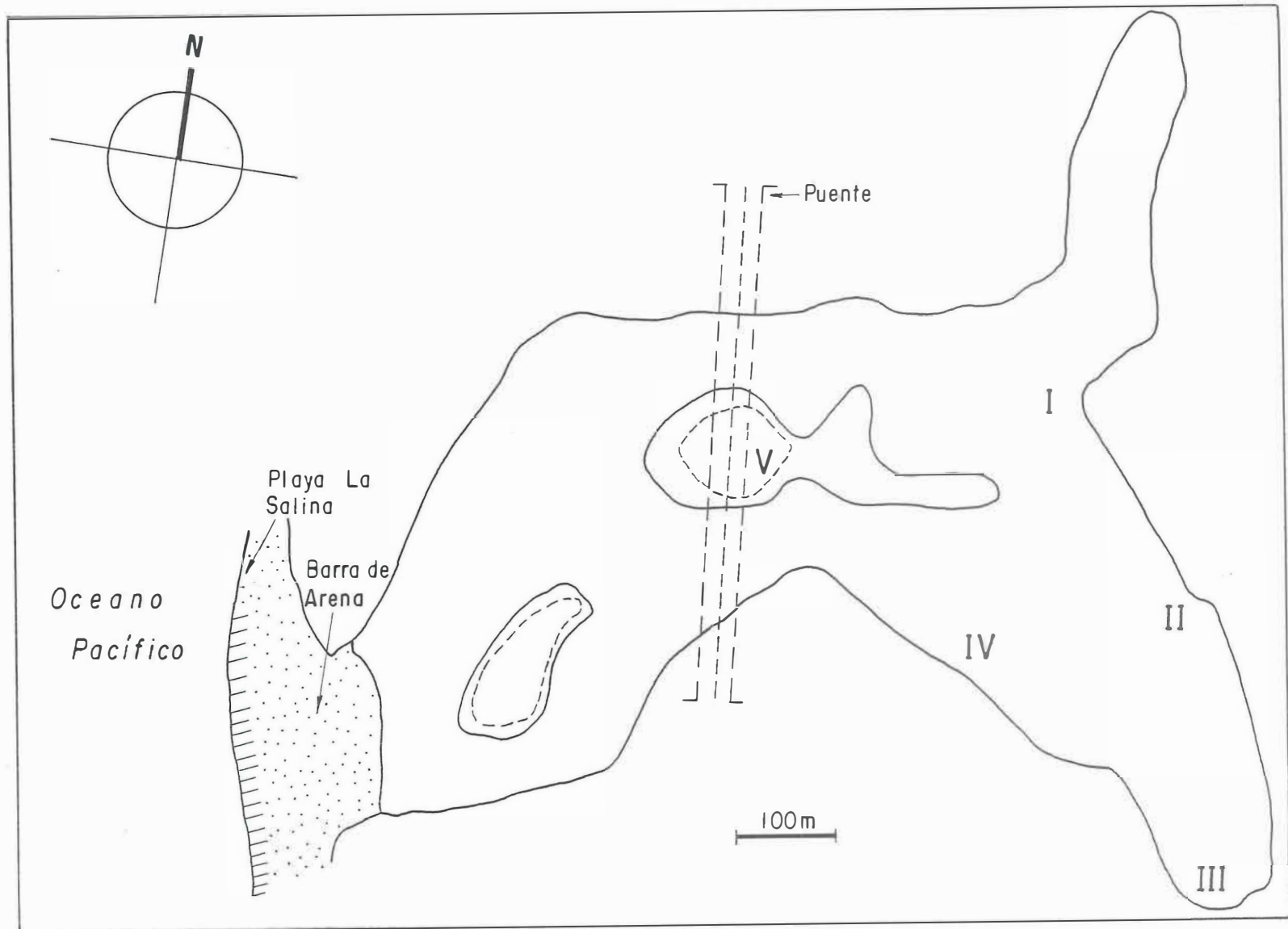


Figura 2- Configuración de La Salina , B.C. y localización de las estaciones de muestreo. (Tomado de Del Castillo, 1988)

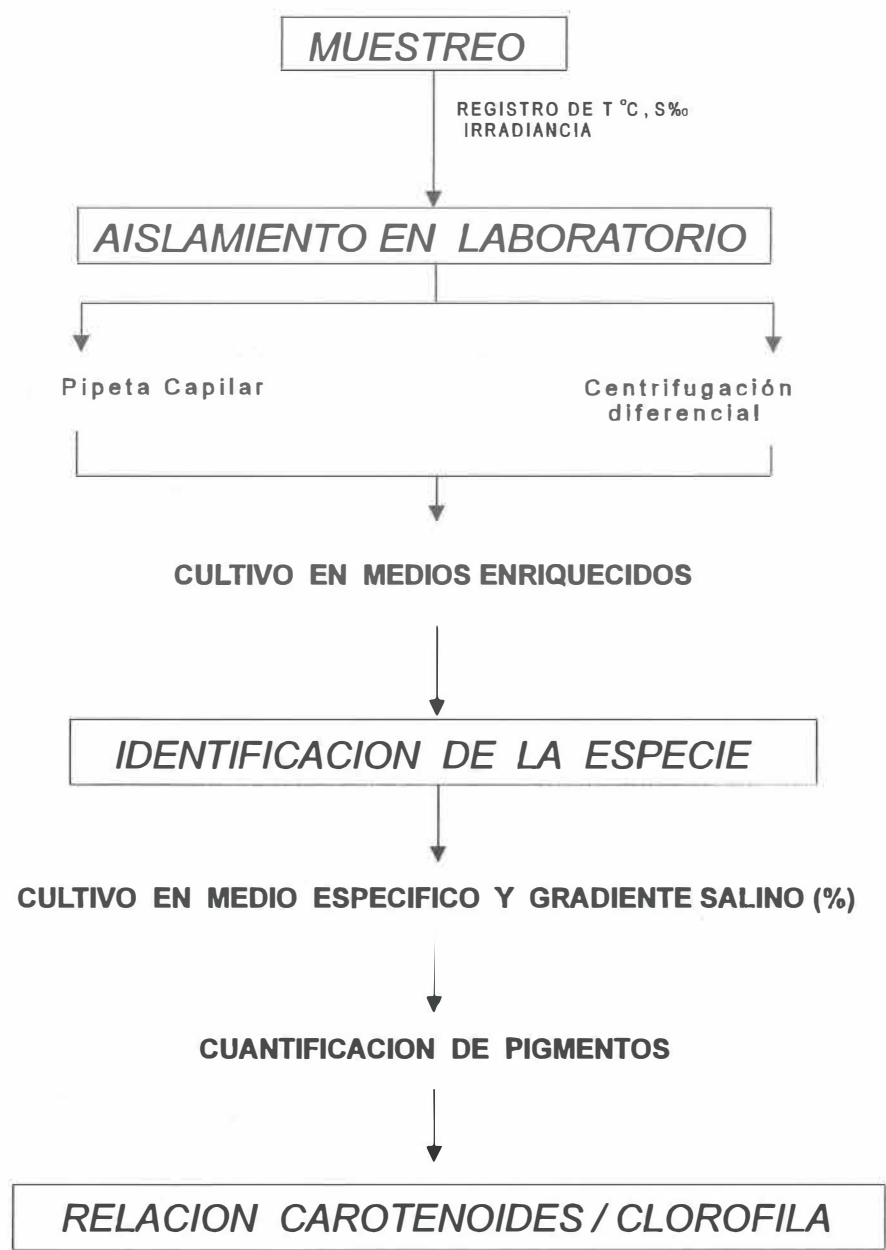


Figura 3.- Método de aislamiento e identificación de *Dunallella salina*.

(2) Centrifugación diferencial: Las muestras resultantes de la etapa anterior fueron llevadas a pasos secuenciales de centrifugación para separar, de acuerdo a su peso, halobacterias, microalgas y protozoarios. Inicialmente las muestras se centrifugaron a $80 \times g$, desechándose la fracción sobrenadante que contenía principalmente bacterias. El sólido precipitado que contenía las algas y protozoarios se resuspendió en medio líquido estéril y se procedió nuevamente a su centrifugación. Este procedimiento de lavado se repitió en tres ocasiones. Posteriormente, la fuerza centrífuga se incrementó a 150 y $300 \times g$ con el fin de separar la fracción algal de los protozoarios.

(3) Pipeta capilar al microscopio: La fracción de microalgas del paso anterior fue colocada en portaobjetos excavados para su observación y aislamiento al microscopio. Para lograr esto, se capilarizó a la flama una pipeta Pasteur para seleccionar al microscopio las células que presentaban más vigor, inferido en función de su movimiento.

(4) Cultivo en medio sólido: Las microalgas aisladas se sembraron en medio sólido con agar al 1.5%, siguiendo la formulación propuesta por Ben-Amotz (1975) y modificado por Ben-Amotz y Avron (1983a).

Los cultivos así obtenidos fueron escalados ulteriormente en medio líquido, para su posterior evaluación.

III. 2. 2. Identificación de la especie.

El material biológico obtenido se analizó en un microscopio compuesto. Se observaron dos tipos de células con las características morfológicas del género *Dunaliella*: dos flagelos apicales, un cloroplasto en forma de tasa ocupando casi 3/4 partes del organismo y ausencia de pared celular.

Para identificar a *Dunaliella salina* se diseñó un experimento (dos tratamientos, con tres réplicas) para producir cambios bioquímicos en las cepas aisladas y caracterizar la especie en cuestión sobre la base de esta información. El tratamiento control consistió en mantener la cepa a una salinidad de 10% de NaCl, mientras que la salinidad se elevó instantáneamente en el experimental hasta saturación (aprox. 35% NaCl). Las unidades experimentales fueron matraces de 250 ml, con volumen funcional de 50 ml. La irradiancia se mantuvo en $150 \mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$ las 24 horas del día. La temperatura fluctuó alrededor de $29 \pm 4^\circ \text{C}$. Se evaluó diariamente el crecimiento en número de células por mililitro mediante observación directa al microscopio, tal y como se describe en la sección III.4 "Evaluación de crecimiento". Al final de la fase de crecimiento exponencial (26 días) se estimó la proporción de carotenoides a clorofila *a*, debido a que esta relación define a la especie *D. salina* (Loeblich, 1982).

El registro óptico de las células de *D. salina* cultivadas en el medio control y en condiciones carotenogénicas se realizó, mediante impresión fotográfica paralelamente a los análisis bioquímicos y espectroscópicos de pigmentos.

III. 3. Condiciones experimentales.

III. 3. 1. Condiciones de cultivo.

Una vez identificada a la microalga como *Dunaliella salina*, ésta se cultivó en matraces Erlenmeyer de 500 ml, pero con volumen práctico de 250 ml. Se utilizó el sistema de cultivo estático (cerrado) y unialgal. La temperatura se mantuvo alrededor de $29 \pm 4^\circ \text{C}$ y un fotoperíodo de 12 horas luz / 12 horas oscuridad, para inducir la sincronía celular. La irradiancia de los cultivos se fijó en $150 \mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$.

Como fue citado con anterioridad, el medio de cultivo utilizado fue propuesto originalmente por Ben-Amotz en 1975, modificado por Ben-Amotz y Avron en 1983a y finalmente desarrollado en este trabajo de acuerdo a la formulación presentada en la tabla I.

El pH del medio se ajustó a 7.5, previo a su esterilización en autoclave, a una temperatura de 121°C y una presión de 1.05 kg/cm^2 , durante 20 minutos.

III. 3. 2. Inducción a la carotenogénesis.

El cultivo de la microalga se escaló hasta un volumen de 18 litros, el cual fue posteriormente centrifugado hasta lograr un inóculo altamente concentrado de células. Este concentrado celular se dividió en 18 partes iguales para inocular con él otras tantas unidades experimentales, distribuidas en 6 tratamientos, con tres

Tabla I. Medio de cultivo utilizado, modificado de Ben-Amotz (1975) y Ben-Amotz y Avron (1983a).

<u>REACTIVO</u>	<u>CONC. FINAL</u>
KNO ₃	5 mM *
NaCl	1.7 M *
MgSO ₄ ·7H ₂ O	5 mM
KH ₂ PO ₄	0.2 mM
FeCl ₃	1.5 μM
FeNa-EDTA	30 μM
H ₃ BO ₃	7 μM
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.8 μM
ZnCl ₂	0.8 μM
CoCl ₂	0.02 μM
CuCl ₂	0.2 μM
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.3 μM

* Esta molaridad fue para el mantenimiento de las cepas. Las concentraciones experimentales se describen en "Materiales y métodos".

réplicas cada uno, de acuerdo al arreglo matricial presentado en la tabla II: dos salinidades (15 y 25 % NaCl) x 3 concentraciones de nitrato (5.0, 2.75 y 0.5 mM).

En cada uno de los seis tratamientos se evaluó la carotenogénesis, además de los pigmentos clorofila *a* y clorofila *b*, crecimiento, proteína total, ácido desoxiribonucleico y ácido ribonucleico.

III. 4. Evaluación de crecimiento.

La estimación de densidad de los cultivos se realizó mediante conteo celular con un hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad, de acuerdo a lo descrito por Guillard (1973) y Paniagua-Michel *et al.* (1989). Para ello, las muestras tomadas diariamente fueron fijadas con Lugol, siguiendo la solución de Utermöhl (Guillard, 1973). El cálculo de biomasa se practicó de acuerdo a la ecuación de crecimiento logístico (curva sigmoideal) presentada por Schoen, 1988:

$$B_{t_1} = B_{t_0} e^{\mu t}$$

donde: B_{t_1} = Biomasa (No. de células) al tiempo t_1 ,

B_{t_0} = Biomasa medida al tiempo t_0 ,

e = Base de los logaritmos naturales

μ = Tasa de crecimiento

t = Intervalo de tiempo entre observaciones ($t_1 - t_0$)

Tabla II. Tratamientos experimentales formados por la combinación de tres distintas concentraciones de nitrato y dos diferentes salinidades. Cada tratamiento fue experimentado con tres réplicas.

SALINIDAD (%)		
NITRATO (mM)	15	25
5.0	A1	A2
2.75	B1	B2
0.5	C1	C2

La tasa de crecimiento μ (divisiones por día) se estimó durante la fase de crecimiento exponencial (Cifuentes *et al.*, 1992). El valor inverso de μ representa el tiempo de duplicación de la población o tiempo de generación en días (Guillard, 1973).

Para evaluar el crecimiento en el segundo experimento se estableció la relación lineal entre número de células y densidad óptica, mediante una curva de calibración, realizando lecturas en el espectrofotómetro a 678 nm (Sorokin, 1973). Esta longitud de onda fue corroborada como el pico máximo de absorción de la clorofila *a in vivo* mediante un barrido continuo (de 400 a 700 nm) en un espectrofotómetro marca Elyptica de 2 nm de ancho de banda. La curva así obtenida se muestra en la figura 4, cuya ecuación es: $Y = - 5.84571E-9 + 7.71378E-7 X$ ($r^2 = 0.9999$; $F = 7.518E013$, $p < 0.001$).

III. 5. Análisis bioquímicos.

III. 5. 1. Análisis de pigmentos.

Se obtuvieron 10 ml de cada cultivo experimental y el control durante 20 días, cada dos, para proceder a la determinación de los máximos de absorción pigmentaria. El volumen colectado se centrifugó a $1600 \times g$ para descartar el sobrenadante. El precipitado resultante se sometió a extracción acetónica (90% v/v en agua), utilizando $MgCO_3$ (Jensen, 1978) como amortiguador para retardar el rompimiento de la clorofila (Serman, 1988). Los máximos de absorción de las clorofilas *a* y *b* y carotenoides de los extractos de algas se determinaron mediante

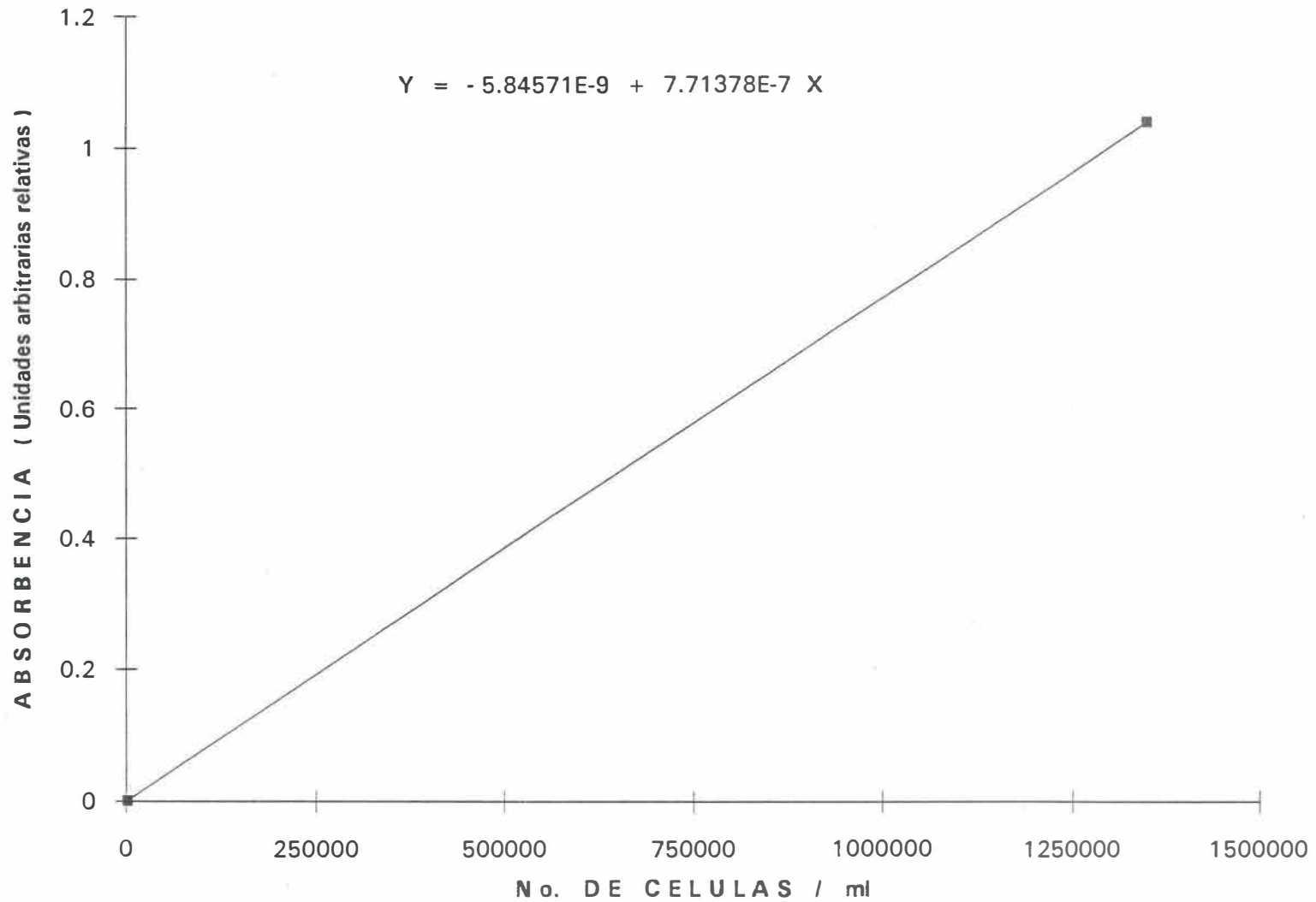


Figura 4. Relación de absorbencia y número celular de Dunaliella salina.

registro continuo de la absorción en la ventana óptica del visible, es decir, entre 400 y 700 nm (figura 5).

La cuantificación de las clorofilas (*a* y *b*) y carotenoides totales fue realizada utilizando los registros de absorbencia (*A*) obtenidos anteriormente y en concordancia con las metodologías propuestas por Strickland y Parsons (1972) y Sterman (1988), de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$\text{Clor. a} = 11.93 A_{664} - 1.93 A_{647}$$

$$\text{Clor. b} = 20.36 A_{647} - 5.50 A_{664}$$

$$\text{Carot.} = 4.0 A_{480}$$

Estos pigmentos se obtienen en $\mu\text{g/ml}$, cuando se usan celdas de 1 cm de recorrido de luz.

III. 5. 2. Determinación de proteínas totales.

Para la cuantificación de proteína celular se colectaron 5 ml de cultivo, cada 2 días, durante el período de crecimiento ensayado. Estas muestras fueron inmediatamente congeladas a -80°C para evitar interferencias debidas a proteolisis y otros procesos bioquímicos. Después de recuperar las células de *Dunaliella* de cada tratamiento experimental, se sometieron al procedimiento de extracción acetónica al 90% (v/v en agua) para evitar interferencias por

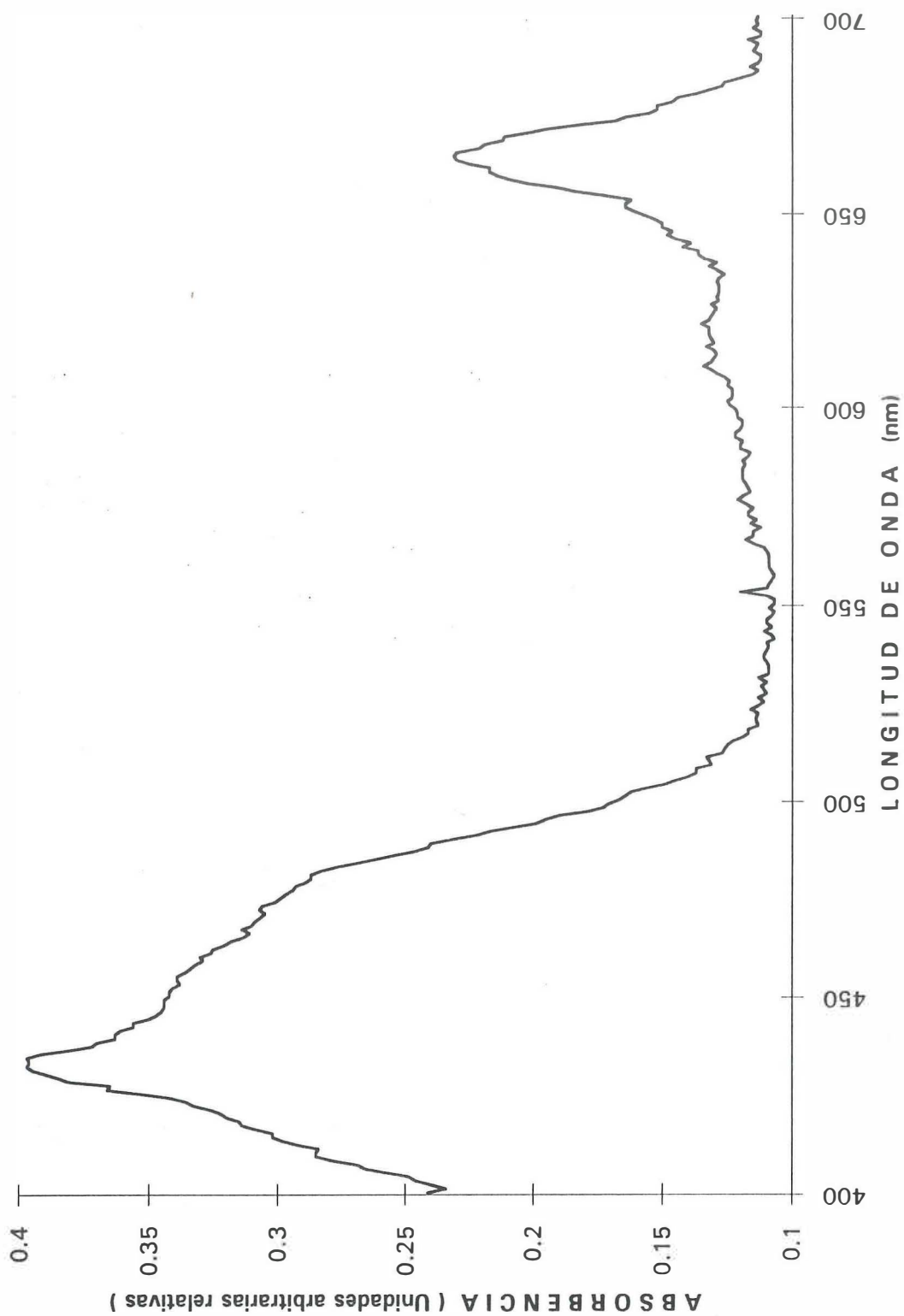


Figura 5. Registro continuo de un extracto acetónico al 90% (v/v en agua) de *Dunaliella salina* cultivada en el medio control.

pigmentos. La extracción proteica se realizó con ácido tricloroacético (TCA) 0.37M y desoxicolato de sodio (DOC) 3.6 mM, de acuerdo a lo propuesto por Clayton *et al.* (1988).

Para la estimación proteica se aplicó la metodología de tinción de proteínas con el colorante azul brillante de Coomassie propuesta por Bradford (1976), ya que es mucho más sensible para la detección de concentraciones bajas de proteína (Kochert, 1978) con respecto al método tradicional de Lowry *et al.* (1951), además de ser más rápida y de que no se afecta por compuestos no-proteicos del fitoplancton marino (Berges, Fisher y Harrison, 1993). De acuerdo a lo propuesto por estos autores, como proteína estándar se empleó albúmina de suero de bovino (ABS), debido a que es la más apropiada para la determinación de proteína algal por el método Bradford. Las estimaciones de proteína se realizaron mediante lecturas de absorbencia (595 nm) de los extractos de cada muestra previamente tratada. Los valores de proteína fueron estimados en base a la curva de calibración presentada en la figura 6, cuya ecuación de predicción es: $Y = 0.362077 + 0.0405491 X$ ($r^2 = 0.9974$; $F = 3842.434$, $p < 0.001$).

III. 5. 3. Cuantificación de ácidos nucleicos.

Se congelaron 5 ml de muestra de cada tratamiento a -80°C durante todo el período experimental, con el fin de detener toda actividad bioquímica que pudiese afectar el análisis posterior de ácidos nucleicos.

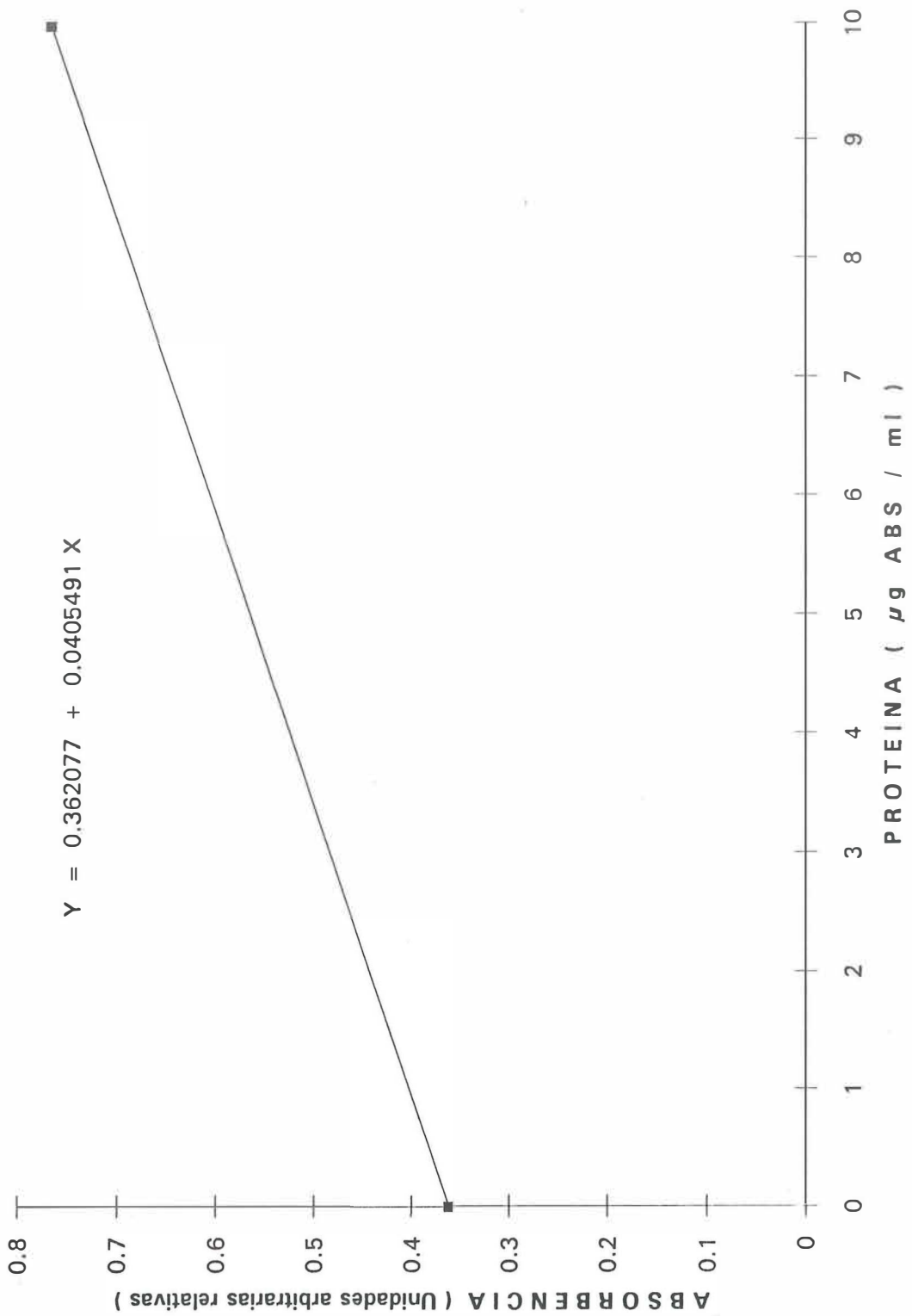


Figura 6. Curva de calibración para proteína con base en albúmina de suero de bovino (ABS).

La extracción de ADN y ARN se hizo homogenizando las muestras en una solución amortiguadora de pH en base a Tris-Ca²⁺, pH 7.5 y 0-4 °C, debido a que estas condiciones son las más propicias para precipitar los ácidos nucleicos; después, se procedieron a centrifugar los homogenizados a 2000 x g, durante 5 minutos. El mismo amortiguador es usado también posteriormente para el análisis fluorométrico de doble tinción propuesto por Berdalet y Dortch (1991) por ser esta una técnica más simple y sensible que el método basado en el bromuro de etidio (Thoresen *et al.*, 1983). Los fluorocromos utilizados fueron: Hoechst 33258[®], que reacciona específicamente con ADN, y anaranjado de tiazol[®], que permite la estimación de ácidos nucleicos totales. Esta técnica exige tres curvas de calibración: (a) ácido desoxiribonucleico, con base en el colorante Hoechst 33258 y tomando como estándar al ADN tipo I (D-5101) de timo de becerro, suministrado por la empresa de productos químicos SIGMA (St. Louis, MO. USA), cuya ecuación resultante fue: $Y = 10.05 + 7.8861 X$ ($r^2 = 0.9925$; $F = 132.36$, $p < 0.05$), con escala del espectrofluorofotómetro (Shimadzu RF-540) x2 a la ordenada (figura 7); (b) ácido desoxiribonucleico, con base en el colorante anaranjado de tiazol y el mismo estándar de ADN antes citado (figura 8), cuya ecuación de predicción resultó: $Y = 1.4 + 0.675676 X$ ($r^2 = 0.9523$; $F = 59.8534$, $p < 0.005$), con escala del espectrofluorofotómetro x4 a la ordenada; y (c) ácido ribonucleico, con base en el colorante anaranjado de tiazol y tomando como estándar al ARN tipo III (R-7125) de levadura de pan suministrado también por SIGMA (figura 9), con ecuación: $Y = 0.64 + 0.385321 X$ ($r^2 = 0.9498$; $F = 56.73242$, $p < 0.005$)

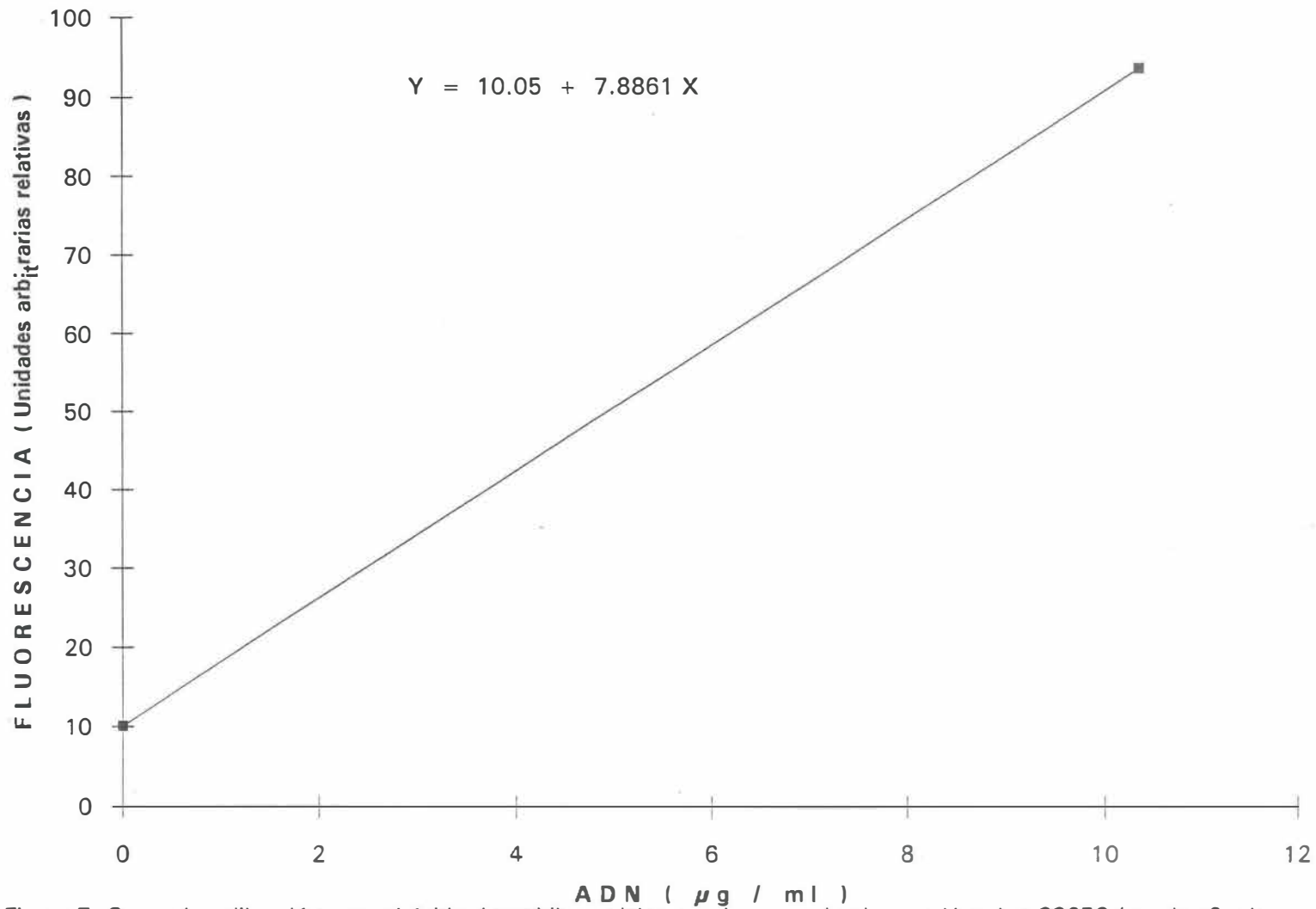


Figura 7. Curva de calibración para el ácido desoxiribonucleico con base en el colorante Hoechst 33258 (escala x2 a la ordenada).

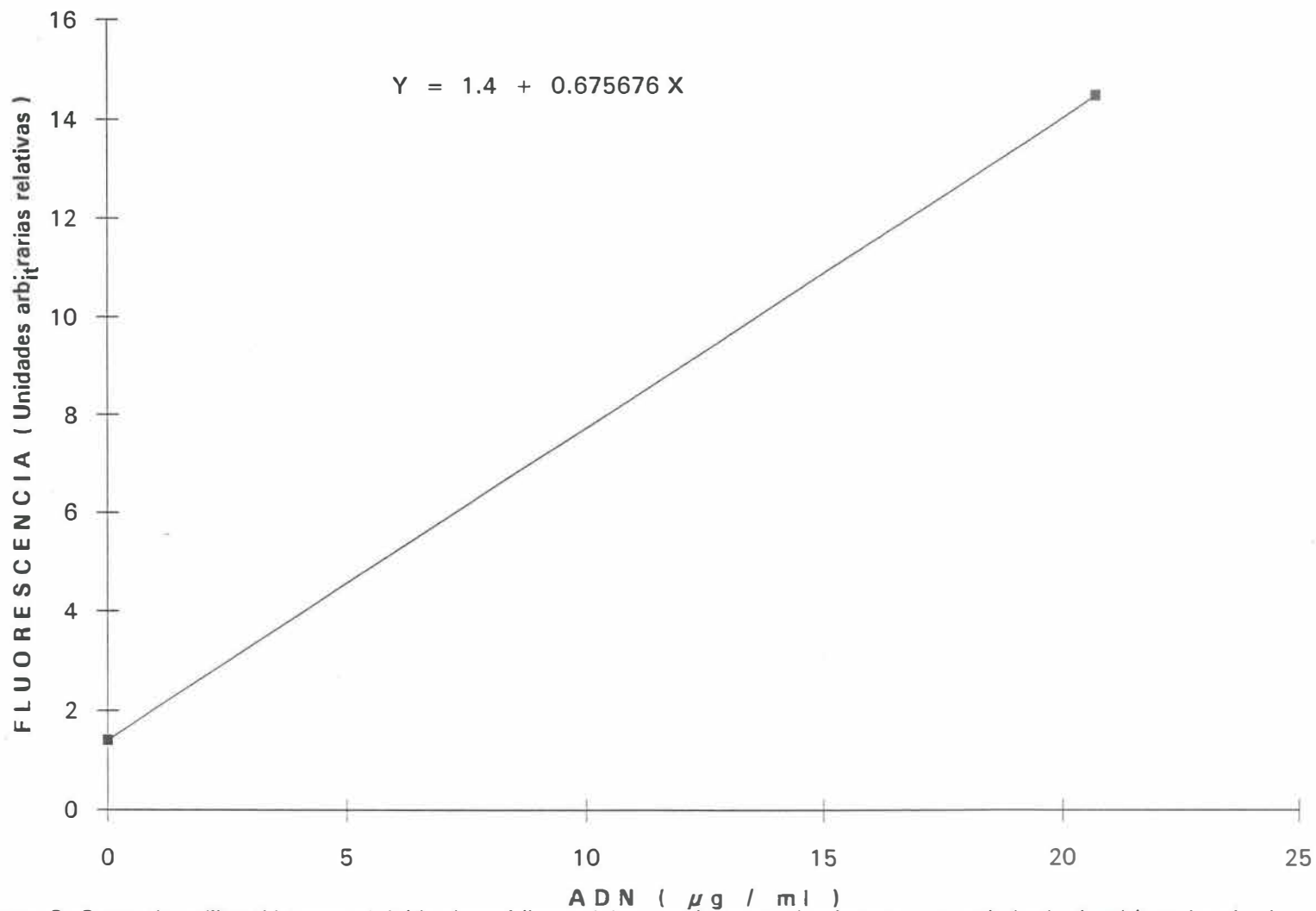


Figura 8. Curva de calibración para el ácido desoxiribonucleico con base en el colorante anaranjado de tiazol (escala x4 a la ordenada).

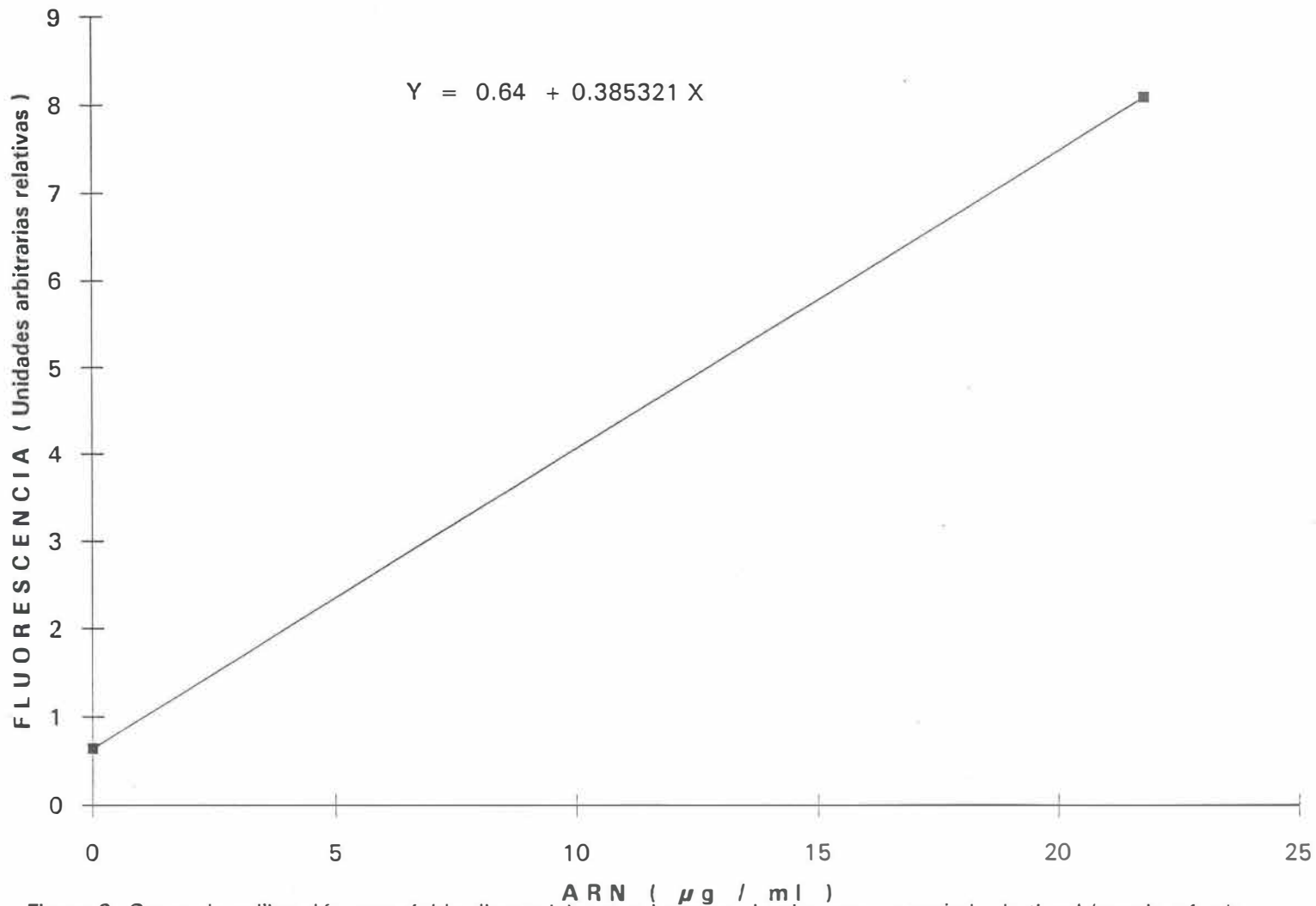


Figura 9. Curva de calibración para ácido ribonucleico con base en el colorante anaranjado de tiazol (escala x4 a la ordenada).

III. 6. Análisis estadísticos.

Las pruebas de normalidad (Kolmogorov-Smirnov) y homocedasticidad (Levene) fueron aplicadas mediante el programa estadístico computacional "Sigma-Stat".

A los datos de crecimiento del primer experimento (para la identificación de la especie) se les aplicó una prueba no-paramétrica de Mann-Whitney, mientras que a los valores de carotenoides se les aplicó una "t de student". Ambas pruebas fueron realizadas de acuerdo a Sokal y Rohlf (1988).

Los resultados del segundo experimento fueron analizados de acuerdo a Zar (1984) mediante análisis de varianza de 2 vías de clasificación, modelo puro-fijo, con el paquete estadístico "Statgraphics", versión 4.0.

Para evaluar la relación entre las variables, especialmente para encontrar un modelo predictivo para carotenoides totales, se ejecutó una prueba de regresión lineal múltiple hacia adelante ("forward") en la utilidad estadística "Statgraphics".

IV. RESULTADOS

IV. 1. Prospección y aislamiento.

La tabla III muestra los principales parámetros físico-químicos estimados en el muestreo realizado en las cinco estaciones de muestreo.

De la muestra proveniente de la estación 2 se aisló una cepa con características morfológicas de *Dunaliella*, con fototaxis negativa, pero que no sobrevive en medio salino saturado (aproximadamente 5 M NaCl), y que mantuvo siempre su coloración verde. Debido a estas propiedades, esta cepa podría corresponder a *Dunaliella viridis*, por lo cual se procedió al análisis pigmentario para corroborar esta hipótesis.

De la estación 5 se aisló otra cepa de *Dunaliella*, pero que sí sobrevive en medio salino superior a 5 M NaCl, con fototaxis positiva y con una respuesta notoria de cambio de color (de verde a amarillo y rojo) ante los incrementos de salinidad a que fue sujeta. Por estas características, esta cepa podría corresponder a *Dunaliella salina*. Para corroborar la identificación de la especie se analizó la relación carotenoides/clorofila *a*, en forma complementaria a las observaciones morfológicas y de crecimiento.

Ambas cepas fueron depositadas en el cepario de especies de interés biotecnológico del Laboratorio de Biotecnología Marina, bajo las claves BC01 y BC02, respectivamente.

Tabla III. Parámetros físico-químicos de las cinco estaciones de muestreo de "La Salina", B.C. (los valores entre paréntesis representan la desviación estándar de la estimación).

	EST. 1	EST. 2	EST. 3	EST. 4	EST. 5
	MEDIA	MEDIA	MEDIA	MEDIA	MEDIA
	(DESV. EST.)	(DESV. EST.)	(DESV. EST.)	(DESV. EST.)	(DESV. EST.)
SALINIDAD	160	165	162	172	196
(‰)	(1.41)	(0.71)	(1.77)	(1.41)	(4.95)
TEMPERAT.	22.5	22	22.5	22	23
(°C)	(0.35)	(0.35)	(0.35)	(0.71)	(1.06)
pH	8.01	8.04	8.44	8.75	8.02
	(0.08)	(0.11)	(0.24)	(0.18)	(0.01)
IRRADIANCIA	1730	1715	1730	1715	1730
($\mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$)	(10.61)	(3.54)	(7.07)	(7.07)	(3.54)

Debido al objetivo del presente estudio, se eligió la cepa que presentó cambio en su coloración y crecimiento en concentraciones salinas cercanas al punto de saturación, ya que estas características son indicativas de la especie carotenogénica de *Dunaliella*, tal y como se comprueba a continuación.

IV. 2. Identificación de la especie.

IV. 2. 1. Crecimiento.

La figura 10 muestra las diferencias altamente significativas ($T=380$, $p < 0.001$) encontradas al comparar el crecimiento entre ambos tratamientos (control 10% NaCl: $\mu = 0.173$, $t = 5.78$ y prueba 35% NaCl: $\mu = 0.056$, $t = 17.915$), aplicados en *Dunaliella* cepa BC02. Se observó un crecimiento mayor en células no sometidas a estrés salino.

IV. 2. 2. Proporción carotenoides / clorofila a.

Al realizarse barridos continuos en la ventana óptica del visible (400-700 nm) para ambos tratamientos (figura11) se detectaron diferencias entre las regiones de carotenoides (480 nm) y clorofila a (664 nm), con una "aparente" mayor proporción de carotenoides en el grupo control. Sin embargo, al normalizar los datos con respecto al número de células por muestra (figura 12) se aprecia exactamente lo contrario, es decir, la proporción de carotenoides a clorofila a por célula, es mucho mayor ($t = - 50.49$, $p < 0.001$) en el grupo de prueba (14.92), con

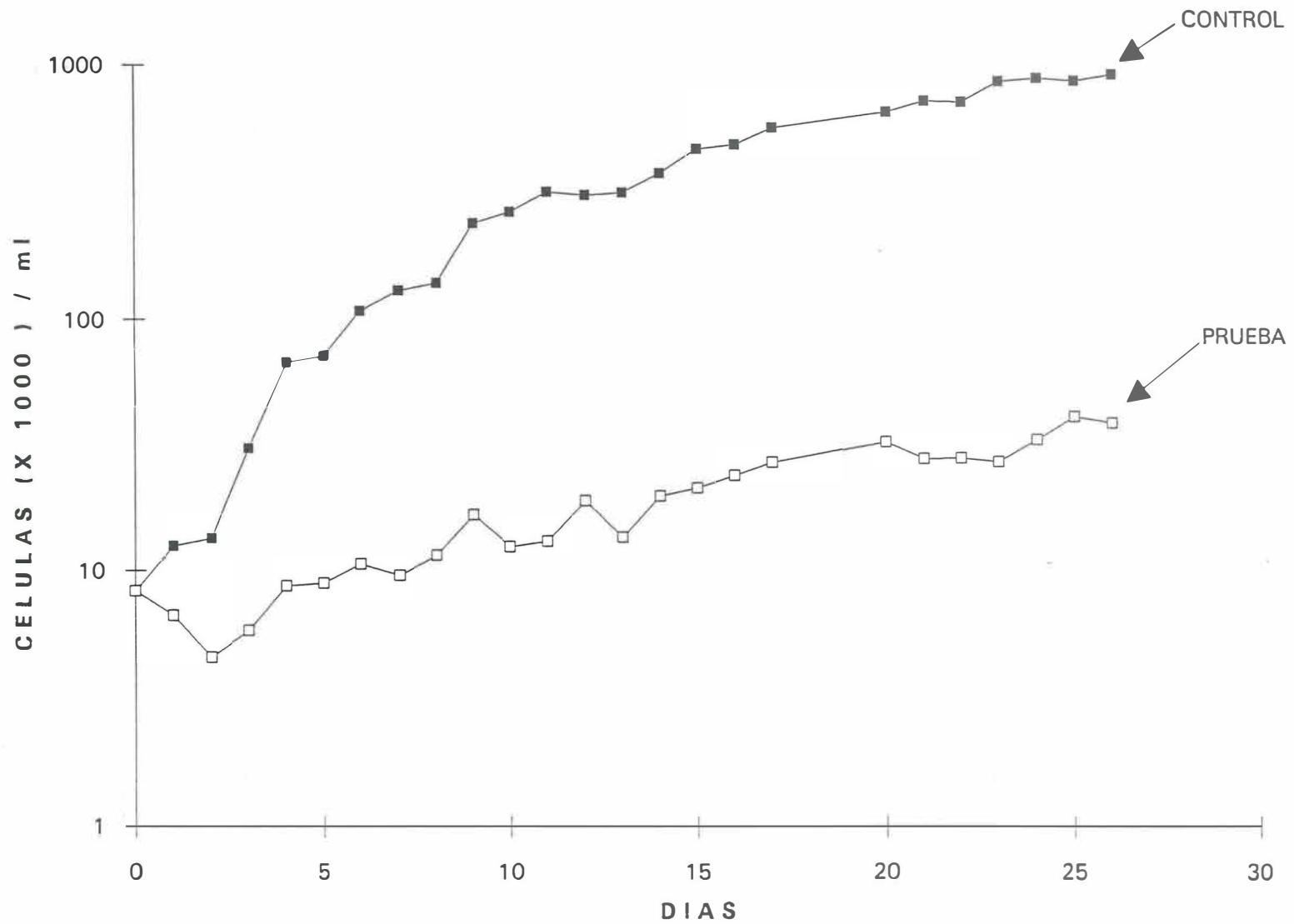


Figura 10. Crecimiento de *Dunaliella salina* en medio control (10% NaCl) y prueba (35% NaCl).

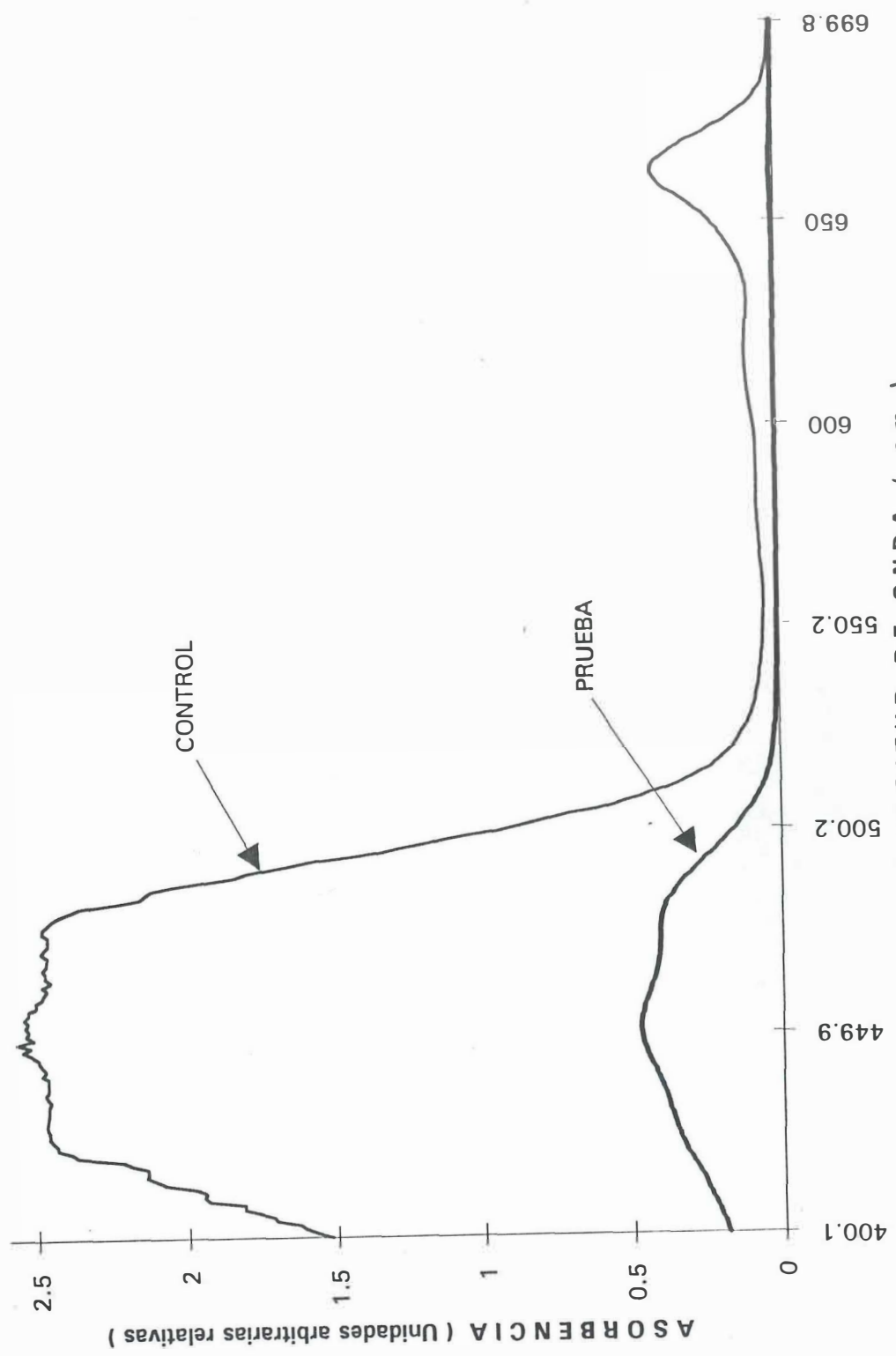


Figura 11. Registro continuo de dos extractos acetónicos al 90% (v/v en agua) de células en medio control (10% NaCl) y prueba (35% NaCl) de Dunaliella salina.

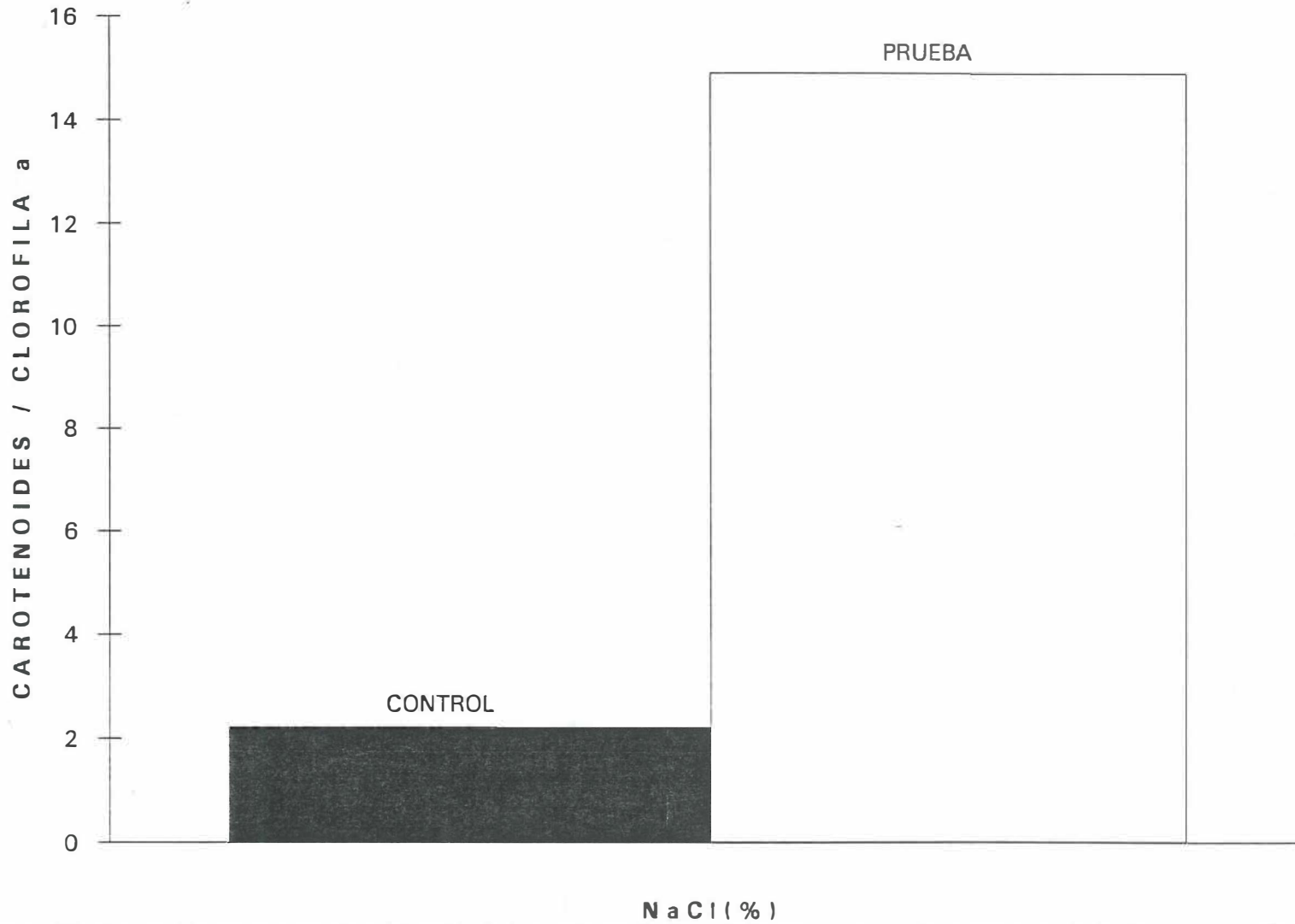


Figura 12. Proporción de carotenoides/clorofila "a" en células de Dunaliella salina en medio control (10% NaCl) y prueba (35% NaCl).

respecto a la analizada en el control (2.22). Esta razón carotenoides/clorofila *a* superior a 6 define al aislado *Dunaliella* BC02 como la especie *Dunaliella salina*. Todos los resultados descritos a continuación corresponden a los análisis realizados en esta especie.

La figura 13 muestra al alga cultivada en el medio control. La forma y coloración verde observada es característica de la concentración elevada en clorofilas, como resultado del crecimiento celular en un medio rico en nutrientes. La evolución de la inducción carotenogénica registrada en la figura 14 revela la acumulación progresiva de carotenoides en el cloroplasto debido a las altas concentraciones en cloruro de sodio. El efecto se manifiesta como tonalidades amarillo-naranja, cubriendo parcialmente el cloroplasto. El tamaño celular se incrementó como consecuencia de la acumulación de sustancias de reserva, principalmente almidón, conforme progresó el tiempo de exposición del alga a las condiciones de salinidad elevada del medio de cultivo. Esta influencia se observó en la síntesis de carotenoides, que se identificó en la impresión fotográfica como una coloración rojo-naranja más intensa (figura 15).

IV. 3. Inducción a la carotenogénesis.

Para todos los resultados que a continuación se presentan debe considerarse que los grados de libertad para los factores salinidad, nitrato y su interacción, fueron 1, 2 y 2, respectivamente.



Figura 13. Células de *Dunaliella salina* cultivadas en medio control (10% NaCl).

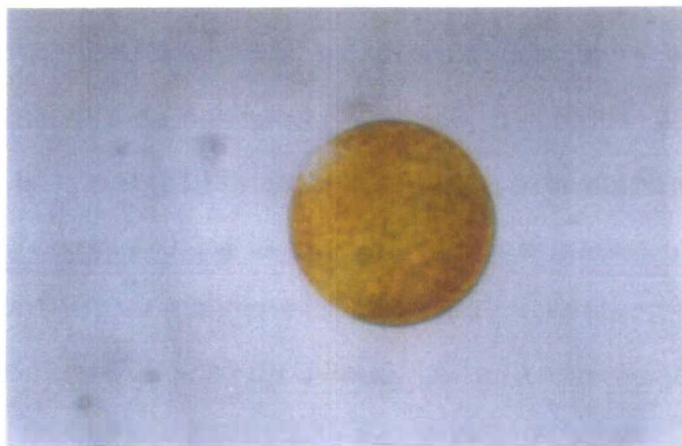


Figura 14. Células de *Dunaliella salina* en carotenogénesis intermedia (6 pg carotenoides /célula) en medio al 35% NaCl.



Figura 15. Acumulación masiva de carotenoides (10 pg/célula) en *Dunaliella salina* en medio al 35% NaCl.

IV. 3. 1. Crecimiento.

En la figura 16 se muestran las curvas de crecimiento total para los seis tratamientos experimentales. De su análisis estadístico se deduce que hubo un efecto altamente significativo de salinidad ($F = 48.856$, $p < 0.001$), pero no se encontró influencia de nitrato ($F = 0.984$, $p = 0.3773$), ni de interacción salinidad X nitrato ($F = 1.193$, $p = 0.3073$). Cuando se desglosa el análisis por días, se encuentra que al séptimo día (figura 17) los resultados de salinidad y nitrato parecen ser semejantes al análisis global de crecimiento, es decir, un efecto altamente predominante de salinidad ($F = 1543$, $p < 0.001$) y ninguna influencia de nitrato ($F = 1.913$, $p = 0.190$). Sin embargo, en esta etapa empieza a hacerse evidente ($F = 5.756$, $p < 0.05$) la interacción entre ambos. Así, al término del experimento (figura 18), se mantiene la respuesta preponderante de salinidad ($F = 373.2$, $p < 0.001$), el efecto de nitrato se muestra también notablemente significativo ($F = 51.44$, $p < 0.001$) y la interacción se vuelve más evidente ($F = 45.725$, $p < 0.001$).

IV. 3. 2. Pigmentos.

En la figura 19 se muestra la evolución de la clorofila *a* durante toda la etapa experimental. No obstante, para una mejor apreciación de los resultados, el análisis de los datos se dividió en dos etapas: al día 7 y al final del experimento (día 18). En la tabla IV puede apreciarse que la acción de la salinidad, el nitrato y su interacción sobre la clorofila *a* se manifestó tanto al día 7 (figura 20), como en la última etapa del cultivo (figura 21).

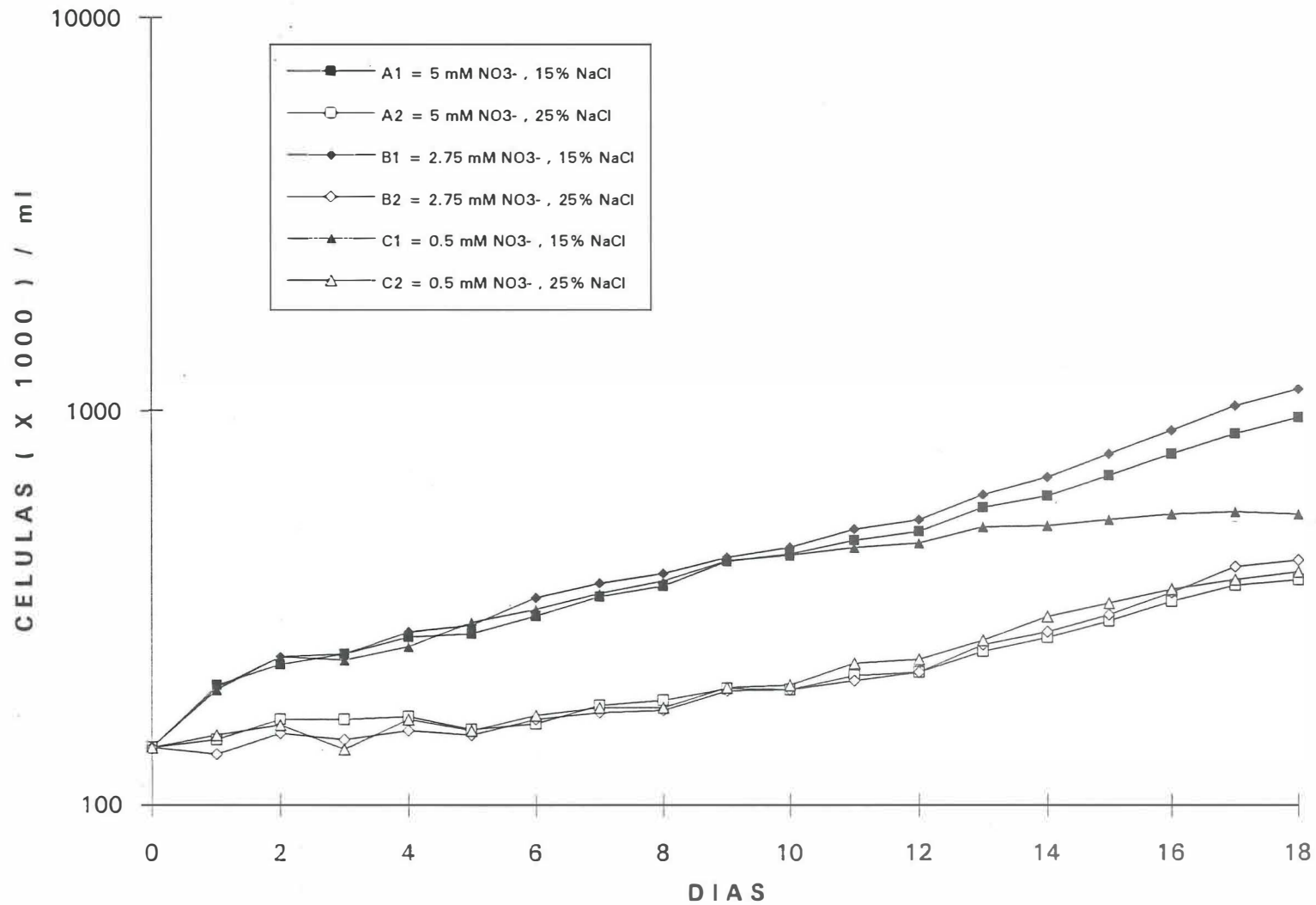


Figura 16. Crecimiento de Dunaliella salina en los seis tratamientos diferentes durante la fase experimental.

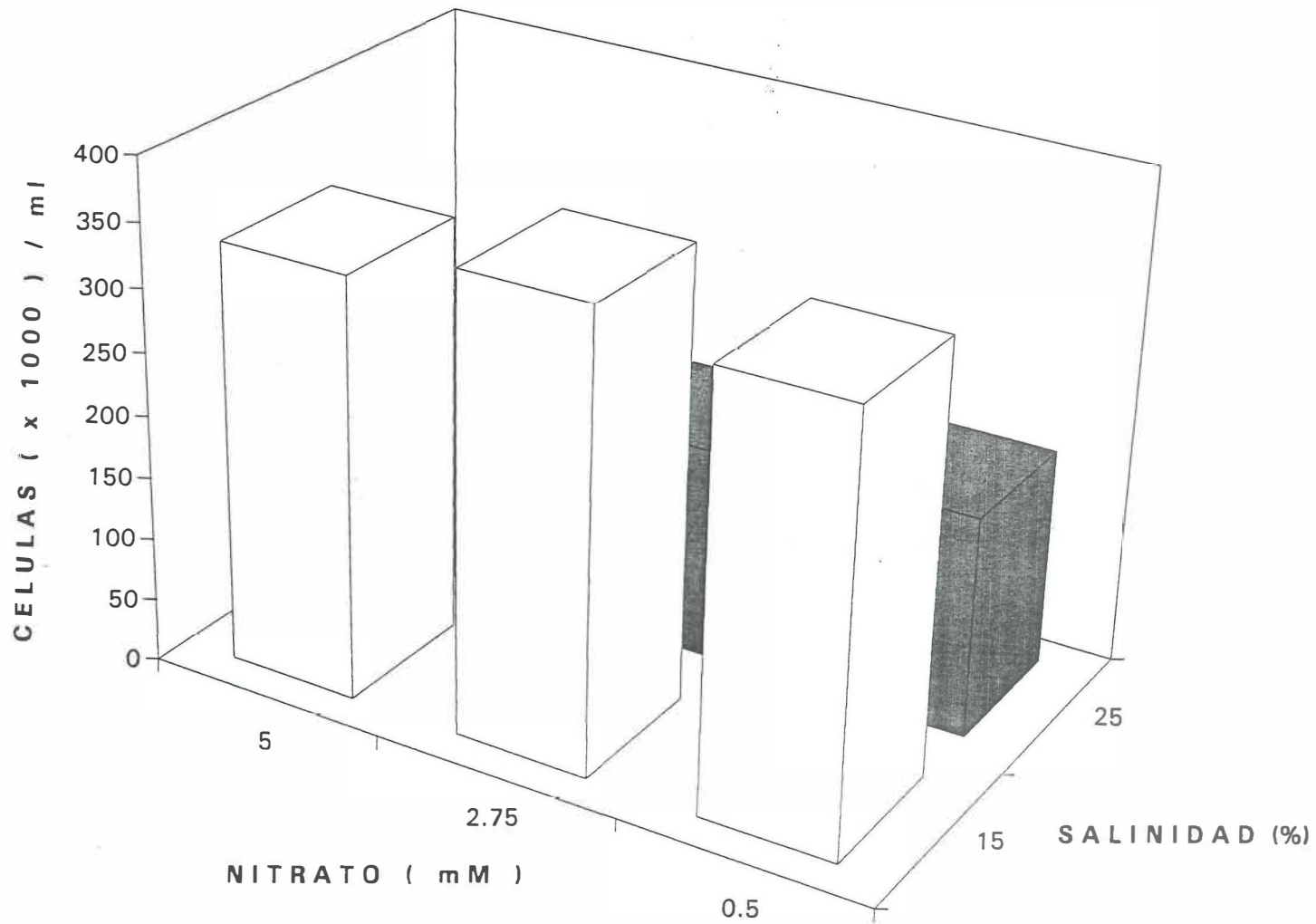


Figura 17. Efecto de la salinidad y la concentración de nitrato sobre el crecimiento de *Dunaliella salina* después de 7 días de cultivo.

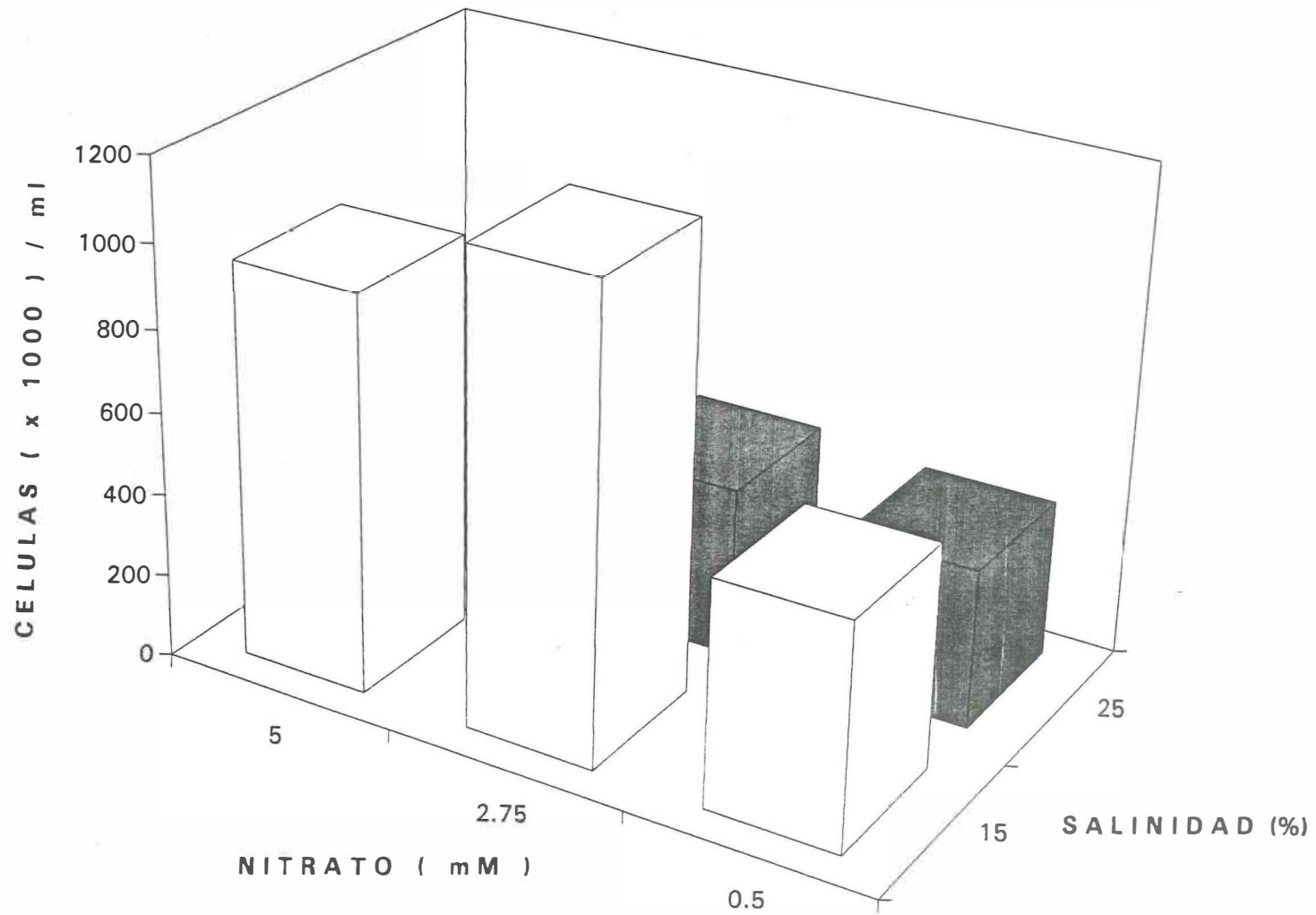


Figura 18. Efecto de la salinidad y la concentración de nitrato sobre el crecimiento de Dunaliella salina después de 18 días de cultivo.

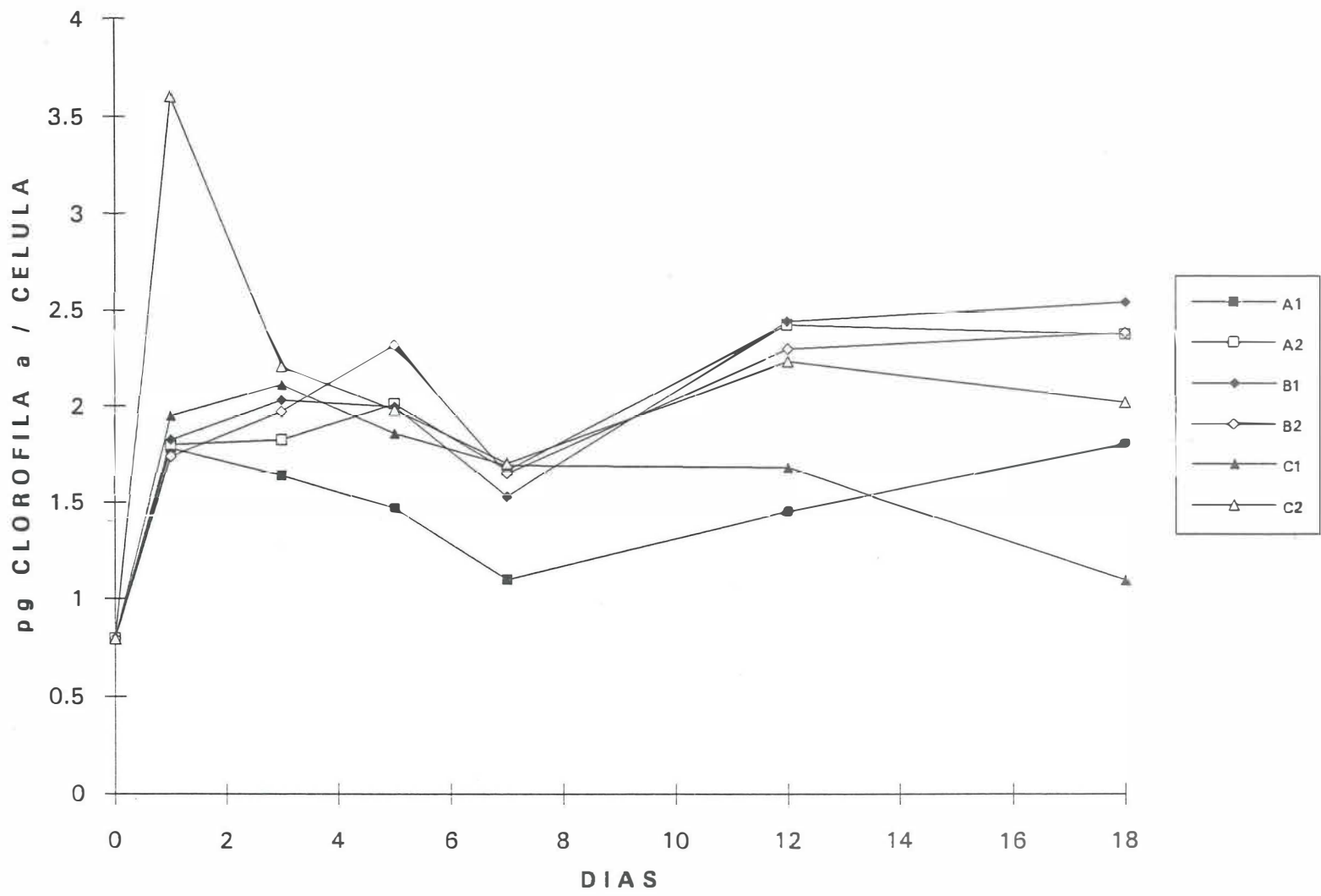


Figura 19. Concentración de clorofila "a" en *Dunaliella salina* durante la fase experimental.

Tabla IV. Resultados de los análisis de varianza (valores "F") practicados a los pigmentos de *Dunaliella salina* después de 7 y 18 días de experimentación.

	SALINIDAD (S)	NITRATO (N)	S x N
CLOROFILA a			
DIA 7	15.854 **	10.066 **	8.577 **
DIA 18	18.937 ***	25.935 ***	9.647 **
CLOROFILA b			
DIA 7	0.825 n.s.	1.170 n.s.	1.075 n.s.
DIA 18	13.091 **	28.605 ***	14.978 ***
CAROTENOID.			
DIA 7	129.6 ***	3.160 n.s.	0.467 n.s.
DIA 18	84.844 ***	24.384 ***	4.470 *
CAROT./CLOR. a			
DIA 7	74.113 ***	2.145 n.s.	14.178 ***
DIA 18	2.047 n.s.	154.8 ***	52.489 ***

n.s. = no significativo

* p < 0.05

** p < 0.01

*** p < 0.001

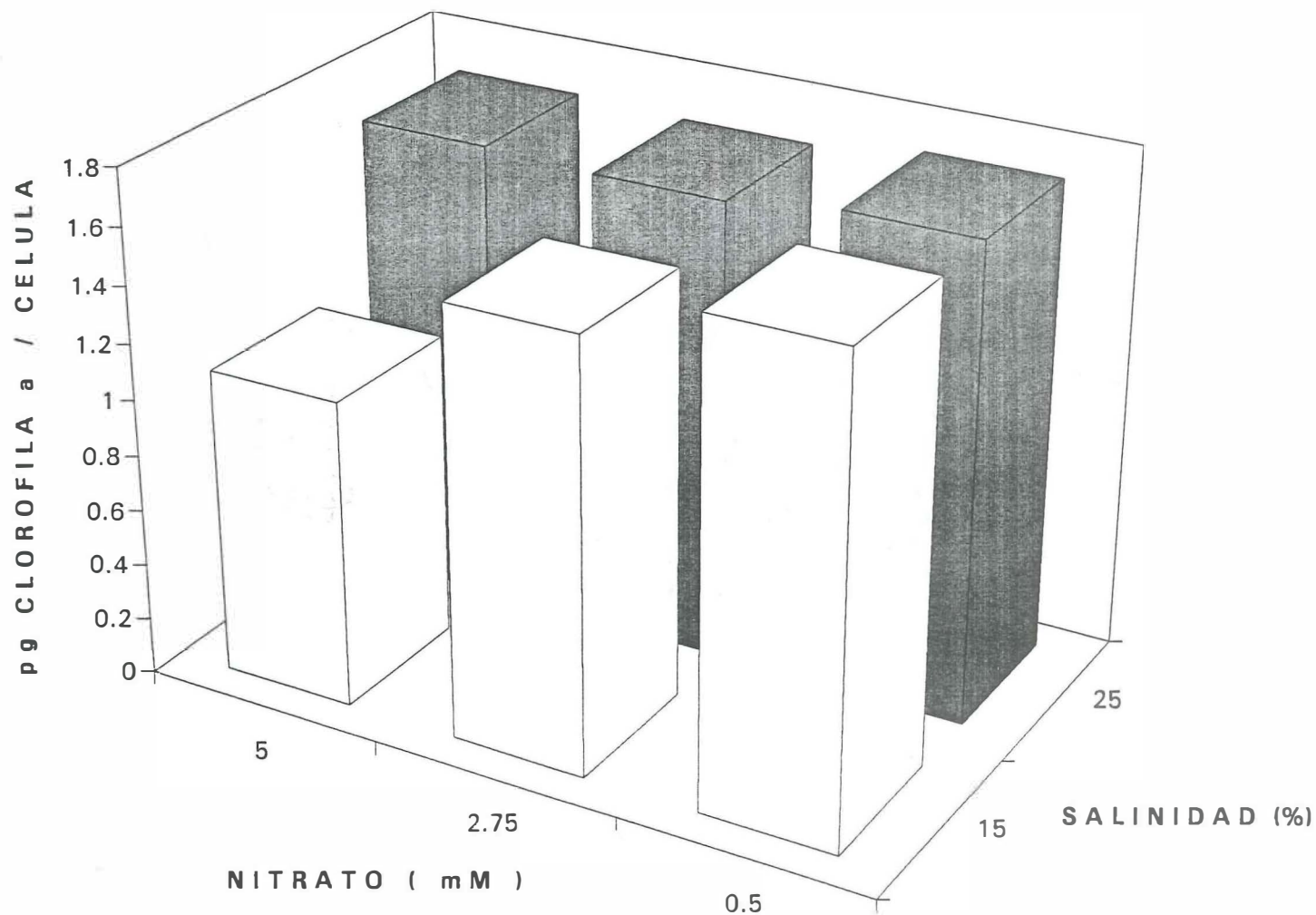


Figura 20. Efecto de la salinidad y la concentración de nitrato sobre el contenido de clorofila "a" en Dunaliella salina después de 7 días de cultivo.

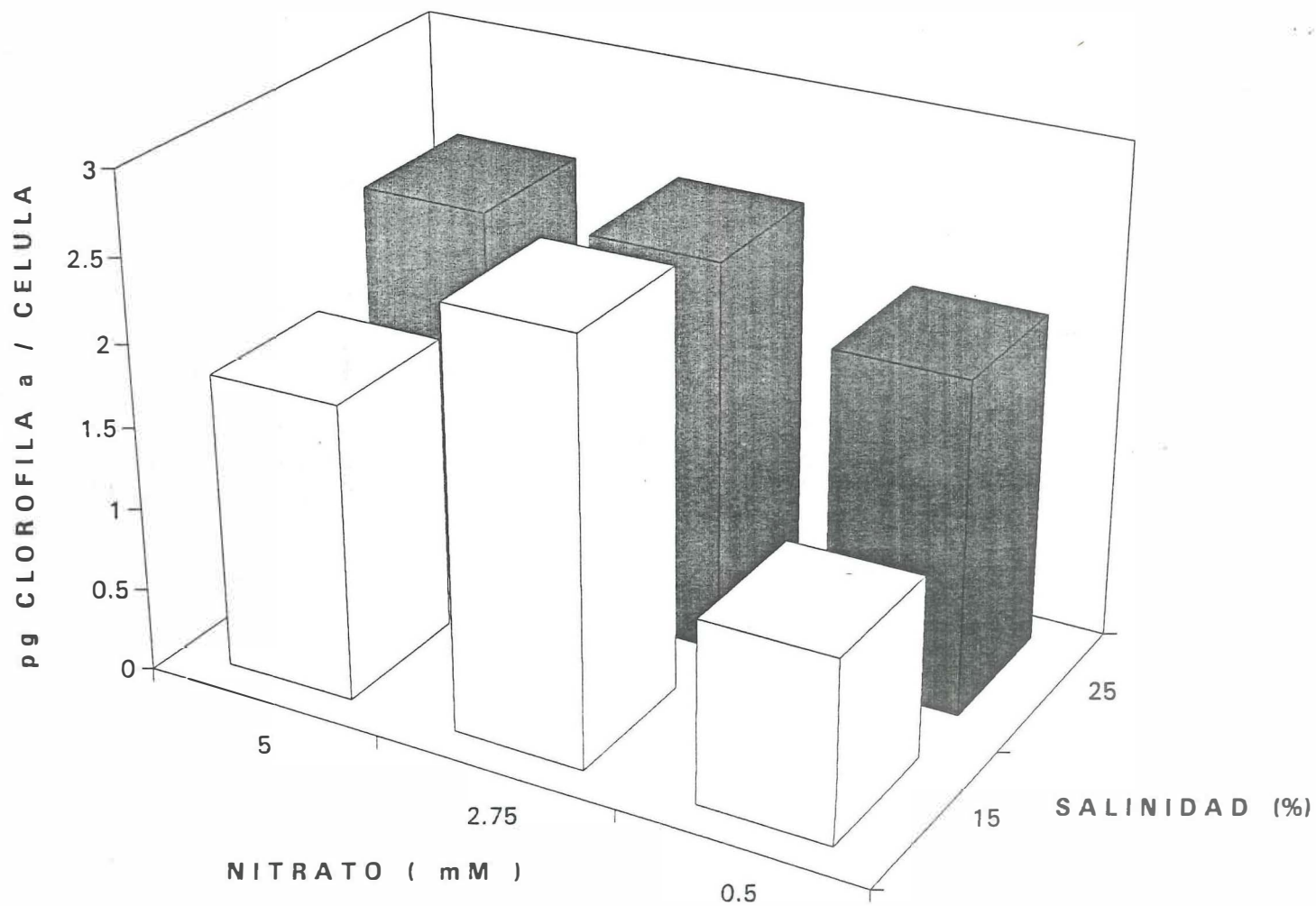


Figura 21. Efecto de la salinidad y la concentración de nitrato sobre el contenido de clorofila "a" en Dunaliella salina después de 18 días de cultivo.

La evolución del contenido en clorofila *b* durante la investigación se muestra en la figura 22. Su análisis por días aparece en la tabla IV. Aquí se observa que ningún efecto se presentó sobre la clorofila *b* al día 7. Las influencias de nitrato, salinidad y su interacción se manifestaron al concluir la experimentación (figura 23). La proporción clorofila *a* / clorofila *b* no se consideró por separado (como índice fisiológico), dado que su comportamiento fue similar al descrito para la clorofila *b*.

La estimación de la concentración celular de carotenoides totales durante toda la fase experimental se muestran en la figura 24. Su análisis parcial por días (tabla IV) indica que solamente la influencia de la salinidad sobre los carotenoides totales se observó en el día 7 (figura 25). La acción combinada de salinidad y nitrato se presentó al final de la investigación (figura 26).

La información más relevante de estos resultados es la progresión de la proporción de carotenoides a clorofila *a* (peso/peso), tal y como aparece en la figura 27. En el análisis diario de estos pigmentos (tabla IV) resalta que al día 7 (figura 28) sólo se mostraron los efectos de salinidad y la interacción salinidad x nitrato sobre la proporción de carotenoides a clorofila *a*, mientras que al día 18 (figura 29) la influencia de salinidad desapareció, pero se hizo evidente la acción de nitrato. La interacción sobre dicha proporción prevaleció hasta el final del experimento.

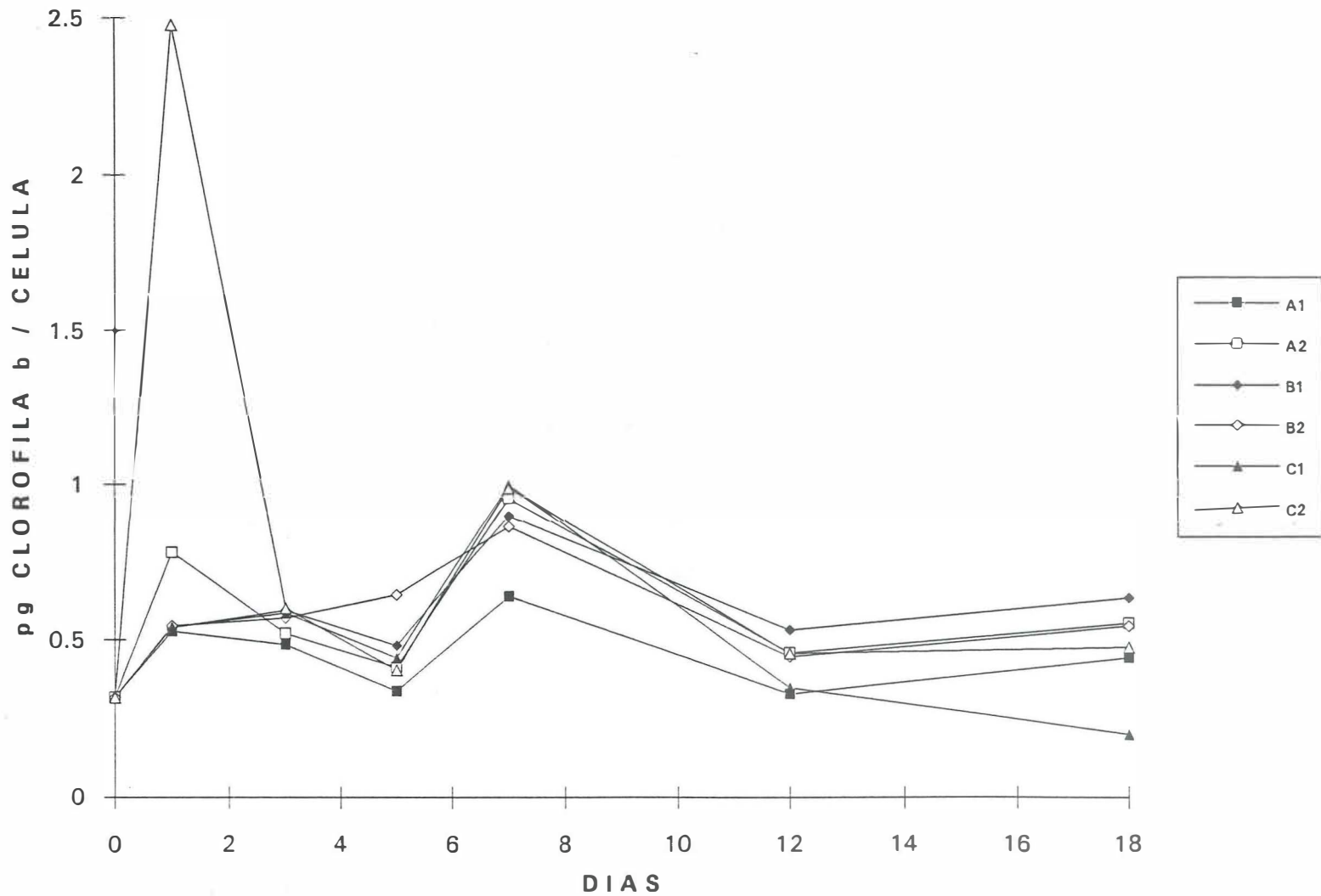


Figura 22. Concentración de clorofila "b" en Dunaliella salina durante la fase experimental.

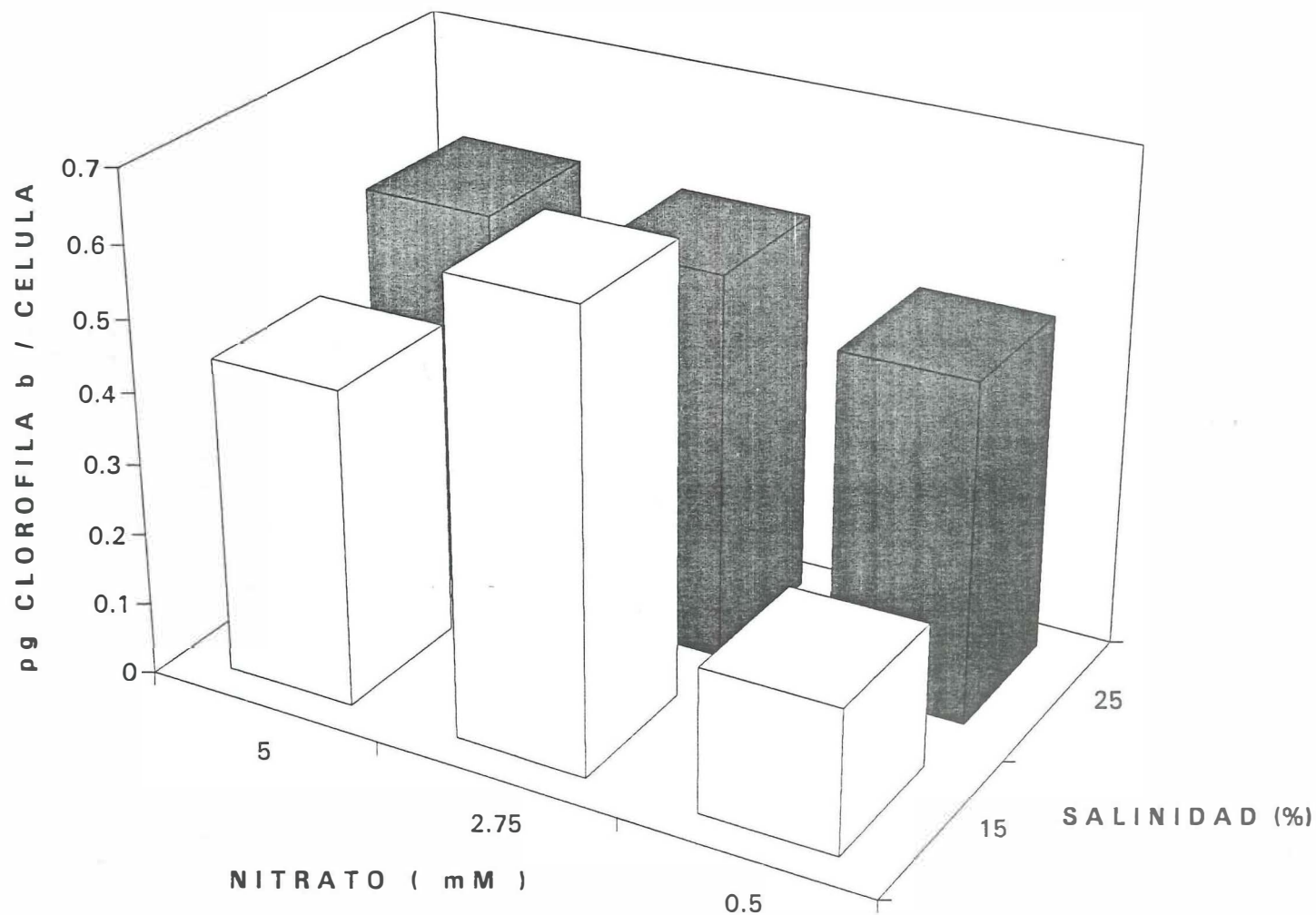


Figura 23. Efecto de la salinidad y la concentración de nitrato sobre el contenido de clorofila "b" en Dunaliella salina después de 18 días de cultivo.

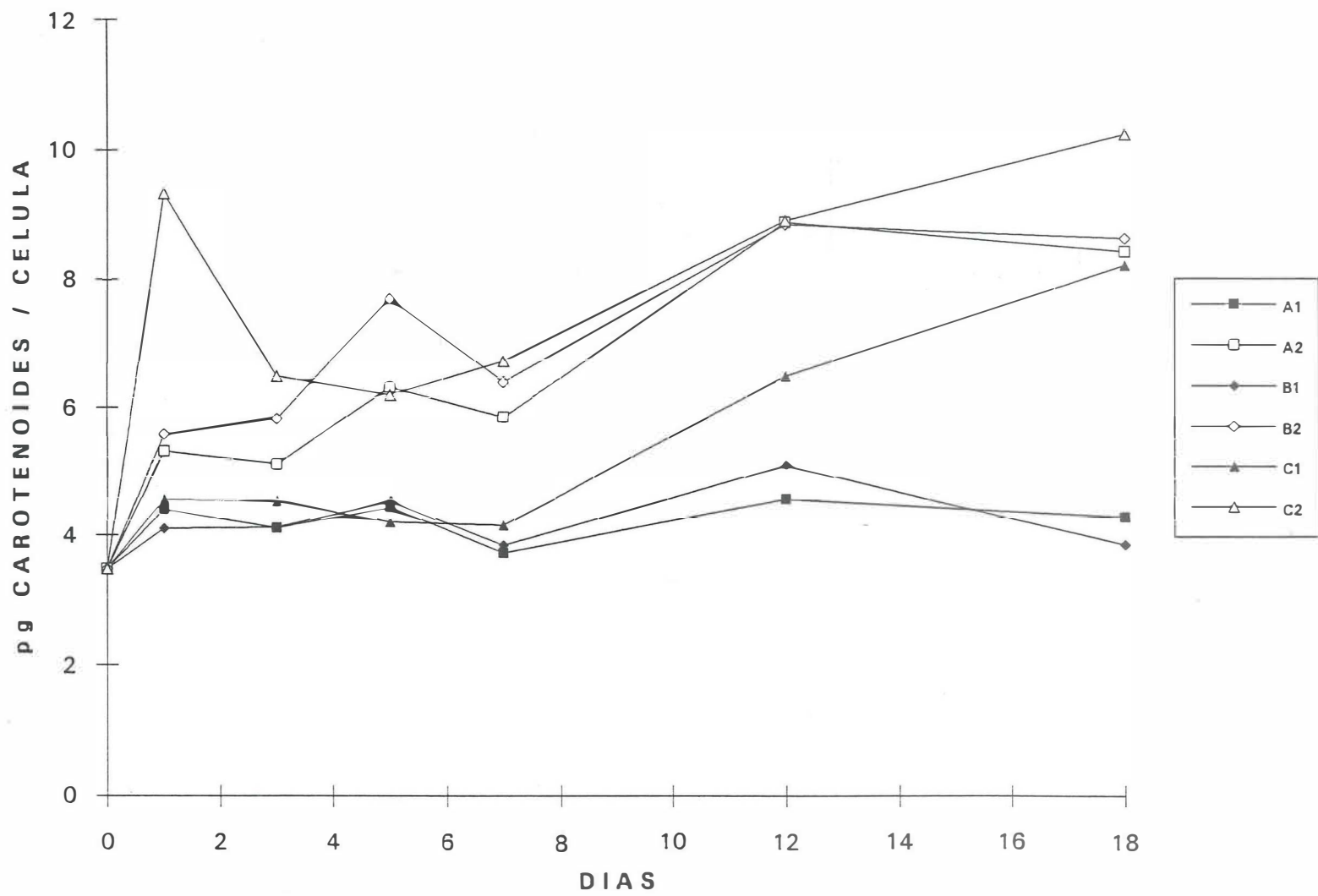


Figura 24. Concentración de carotenoides en Dunaliella salina durante la fase experimental.

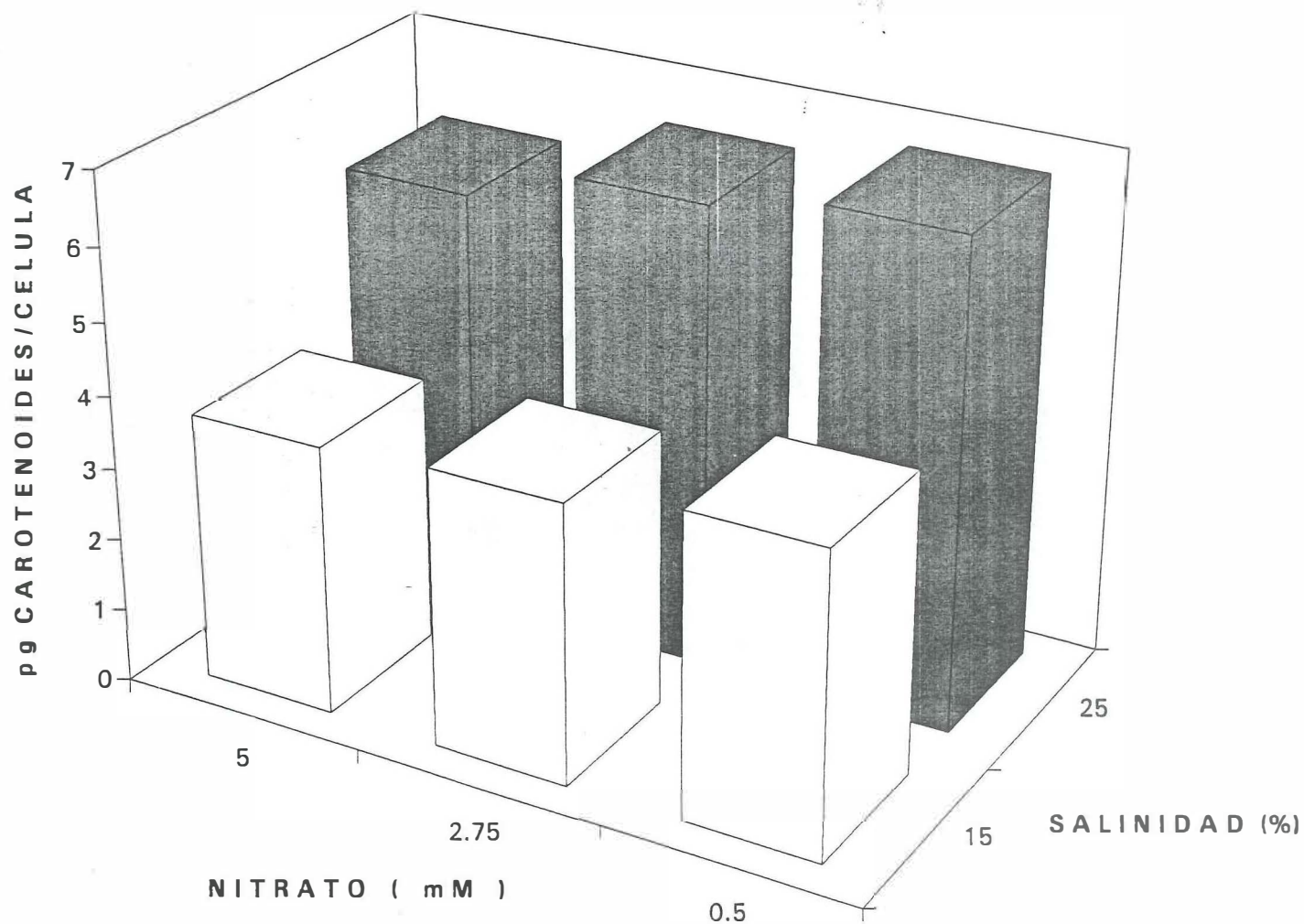


Figura 25. Efecto de la salinidad y la concentración de nitrato sobre el contenido de carotenoides en Dunaliella salina después de 7 días de cultivo.

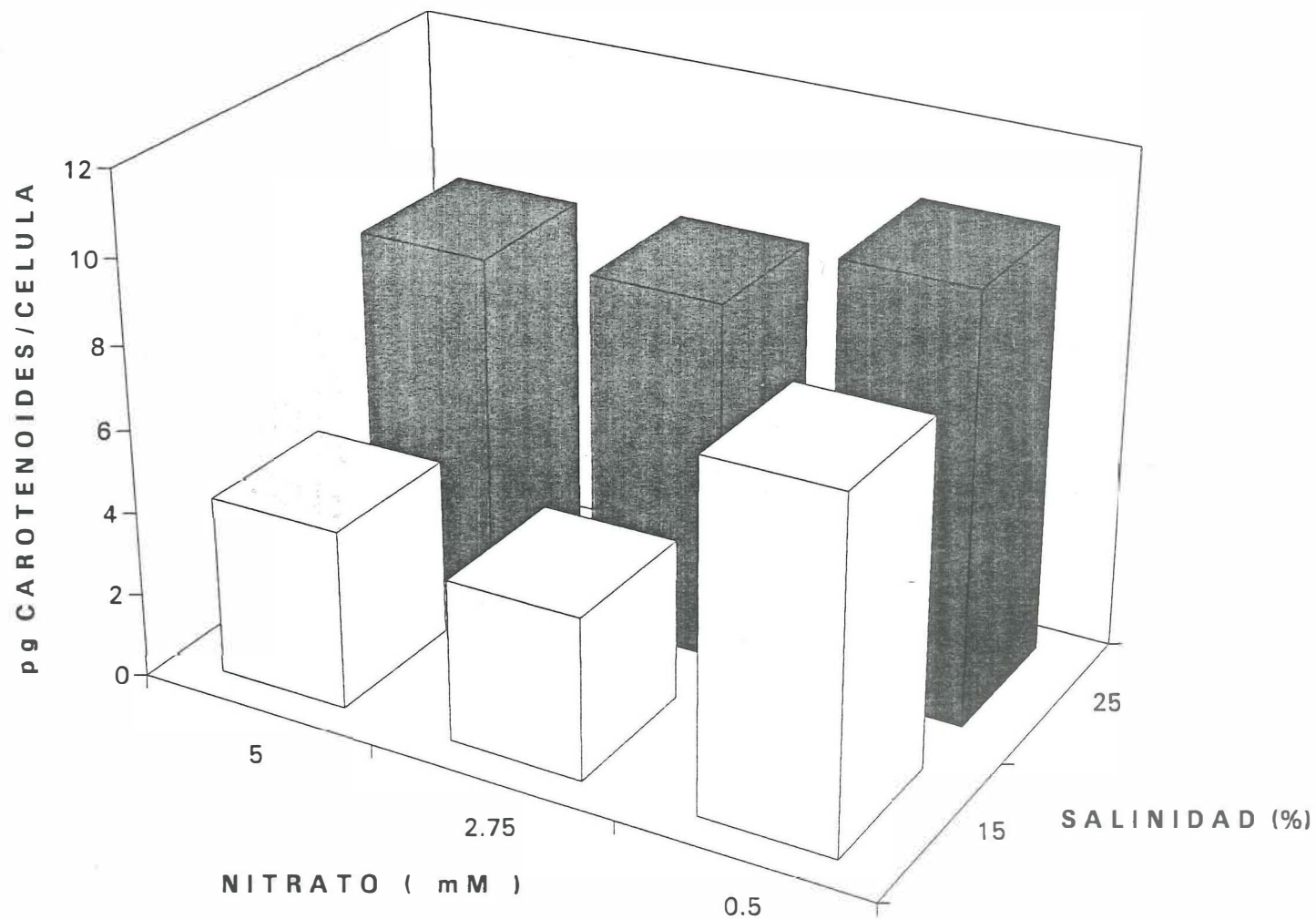


Figura 26. Efecto de la salinidad y la concentración de nitrato sobre el contenido de carotenoides en Dunaliella salina después de 18 días de cultivo.

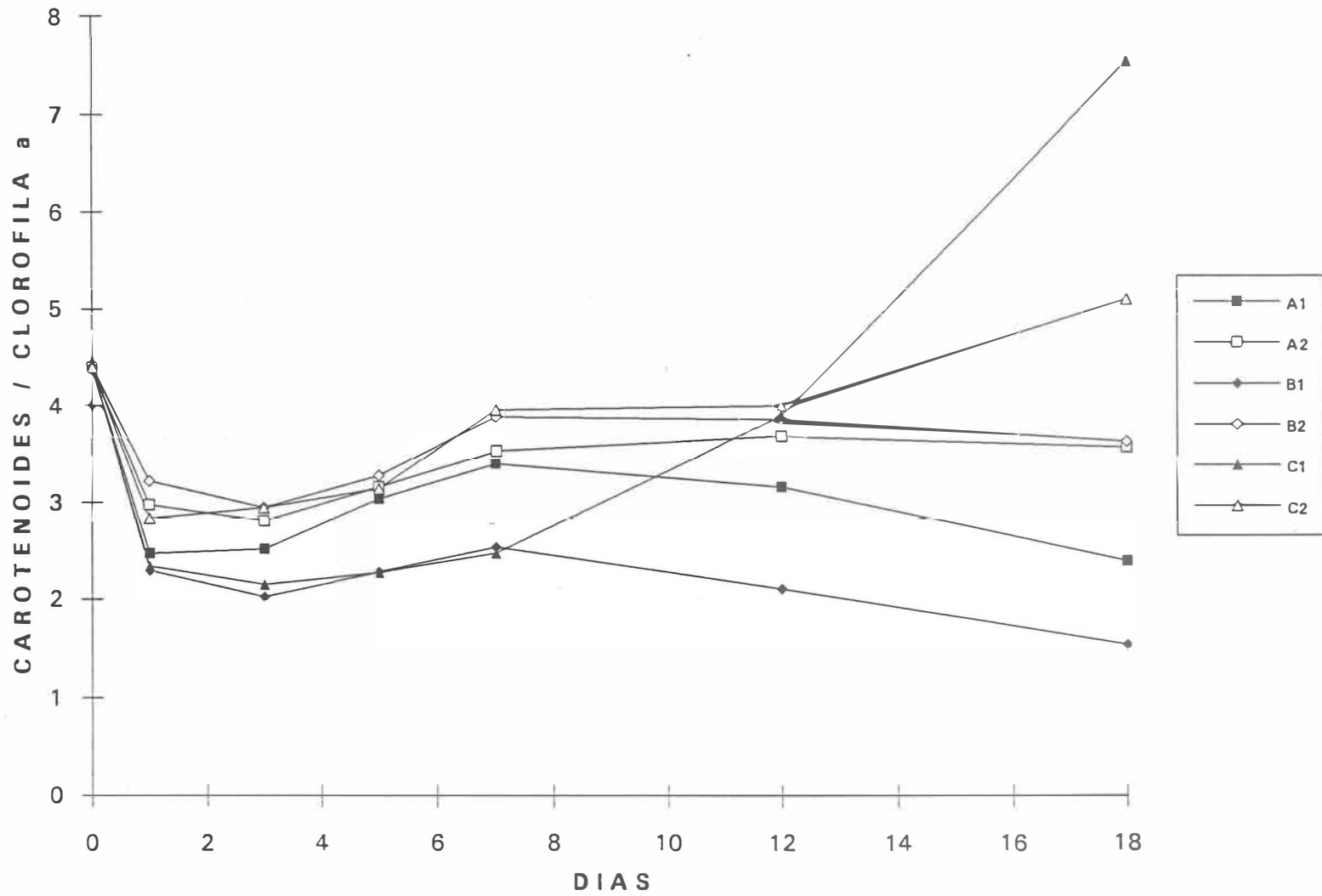


Figura 27. Proporción de carotenoides / clorofila "a" en Dunaliella salina durante la fase experimental.

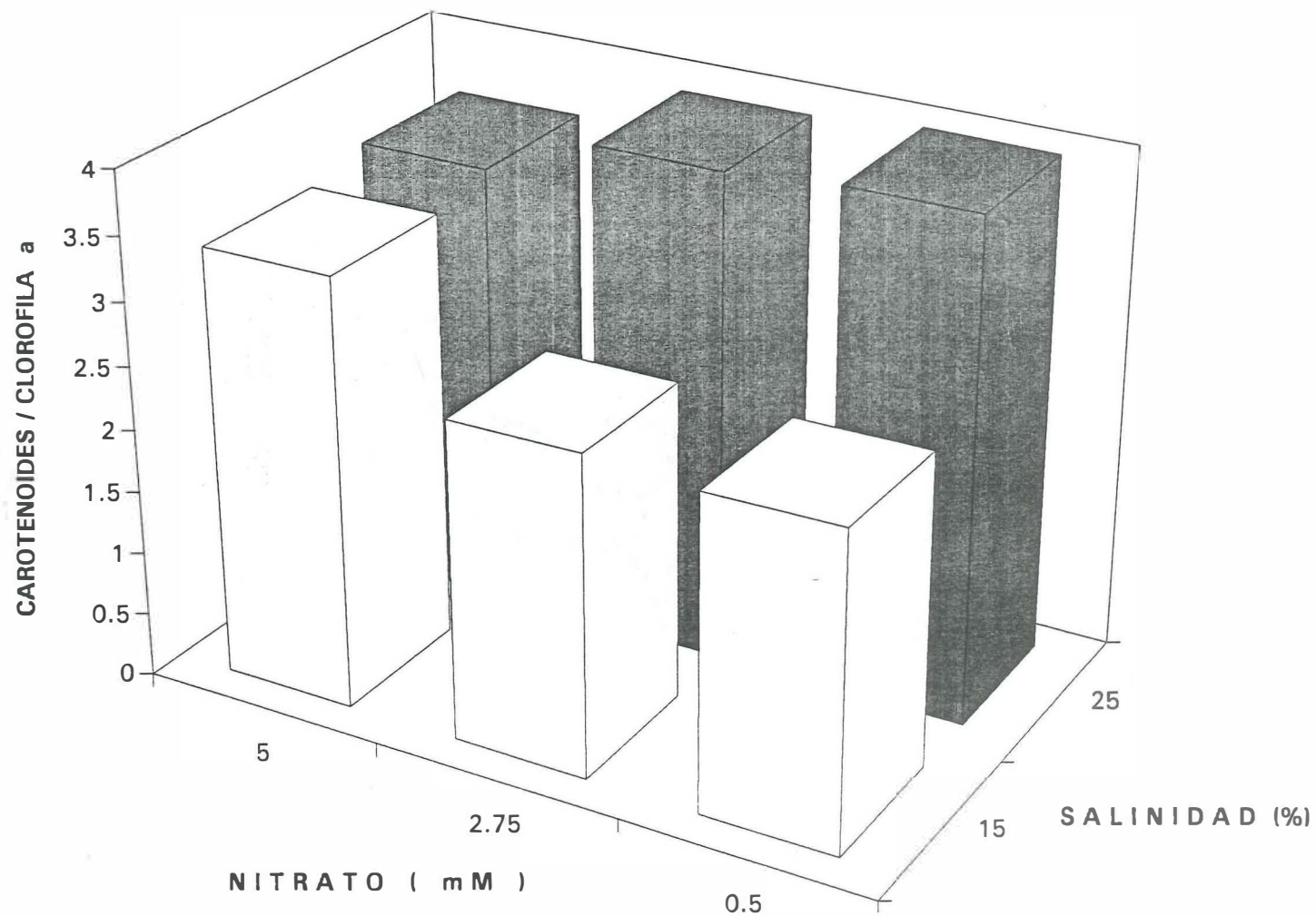


Figura 28. Efecto de la salinidad y la concentración de nitrato sobre la proporción carotenoides / clorofila "a" en Dunaliella salina después de 7 días de cultivo.

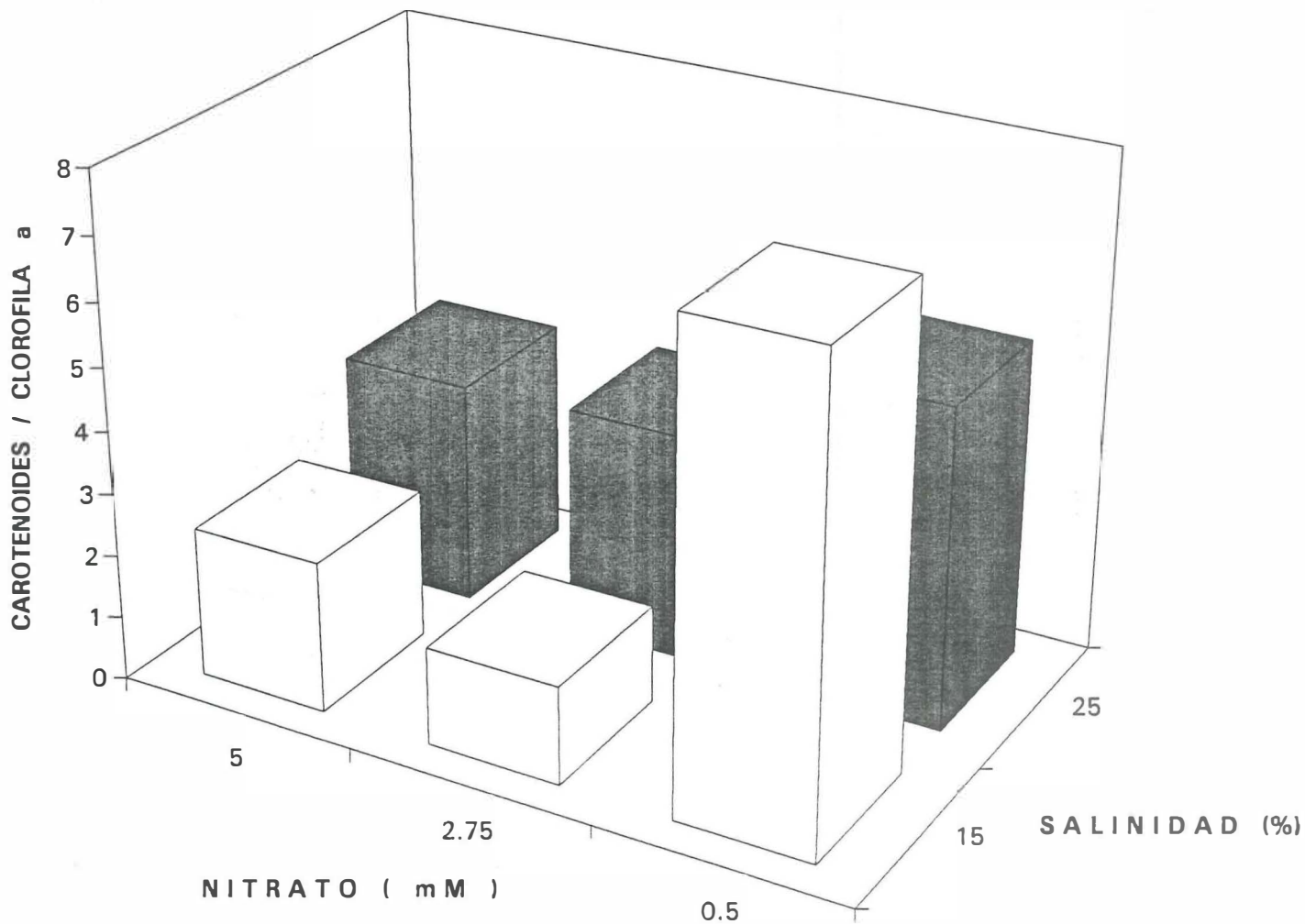


Figura 29. Efecto de la salinidad y la concentración de nitrato sobre la proporción de carotenoides / clorofila "a" en Dunaliella salina después de 18 días de cultivo.

Finalmente, es importante resaltar que la acción del nitrato no se detectó en la mayoría de las variables analizadas (clorofila *b*, carotenoides y proporción carotenoides/clorofila *a*) en las primeras etapas estudiadas, sino sólo hasta el final.

IV. 3. 3. Proteínas y ácidos nucleicos.

La progresión del contenido en proteínas microalgales durante toda la fase investigada se presenta en la figura 30. El análisis diario la concentración proteica celular (tabla V) muestra que hubo diferencias muy significativas de la influencia de las salinidades ensayadas en estos constituyentes algales después de 7 (figura 31) y 18 días (figura 32). El efecto de nitrato sólo se evidenció al día 18. En ningún día se pudo encontrar evidencia significativa de la interacción entre salinidad y nitrato.

La figura 33 presenta la evaluación de ácido desoxiribonucleico durante todo el experimento. Si se analiza esta variables por días (tabla V) se puede también apreciar que los valores de ADN mostraron diferencias significativas por efecto de salinidad, tanto al día 7 (figura 34), como al día 18 (figura 35). No se pudo demostrar influencia de nitrato, ni de interacción salinidad con nitrato sobre esta variable.

El análisis general realizado sobre el contenido de ácido ribonucleico en *Dunaliella salina* se presenta en la figura 36. Sin embargo, el registro diario de

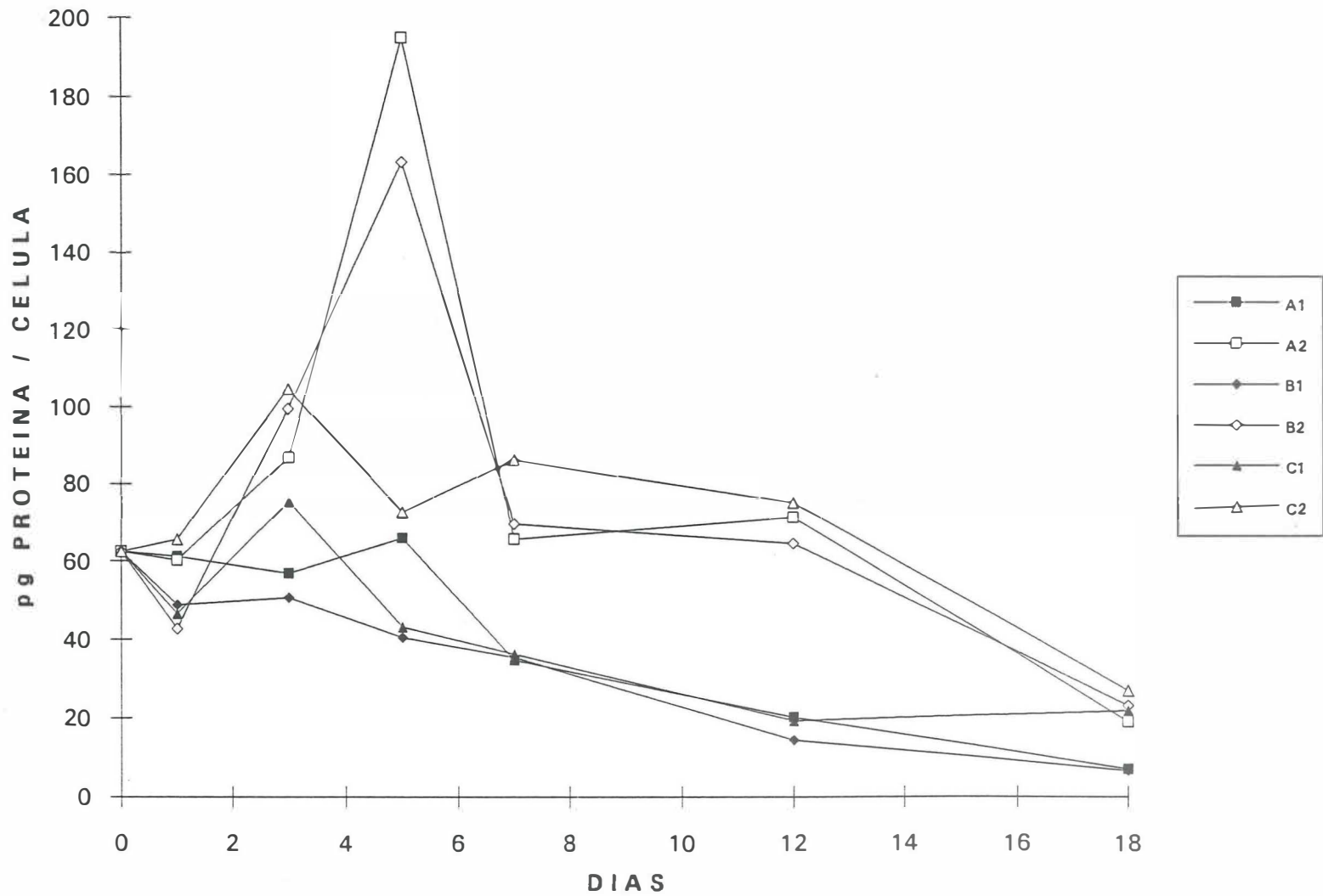


Figura 30. Concentración de proteína celular en *Dunaliella salina* durante la fase experimental.

Tabla V. Resultados de los análisis de varianza (valores "F") de las estimaciones de proteínas y ácidos nucleicos después de 7 y 18 días de cultivo.

	SALINIDAD (S)	NITRATO (N)	S x N
PROTEINA			
DIA 7	12.393 **	0.392 n.s.	0.296 n.s.
DIA 18	12.703 **	5.037 *	1.138 n.s.
ADN			
DIA 7	23.435 ***	2.414 n.s.	0.445 n.s.
DIA 18	8.881 *	1.540 n.s.	1.189 n.s.
ARN			
DIA 7	3.729 n.s.	0.654 n.s.	0.041 n.s.
DIA 18	0.228 n.s.	1.190 n.s.	0.514 n.s.

n.s. = no significativo

* $p < 0.05$

** $p < 0.01$

*** $p < 0.001$

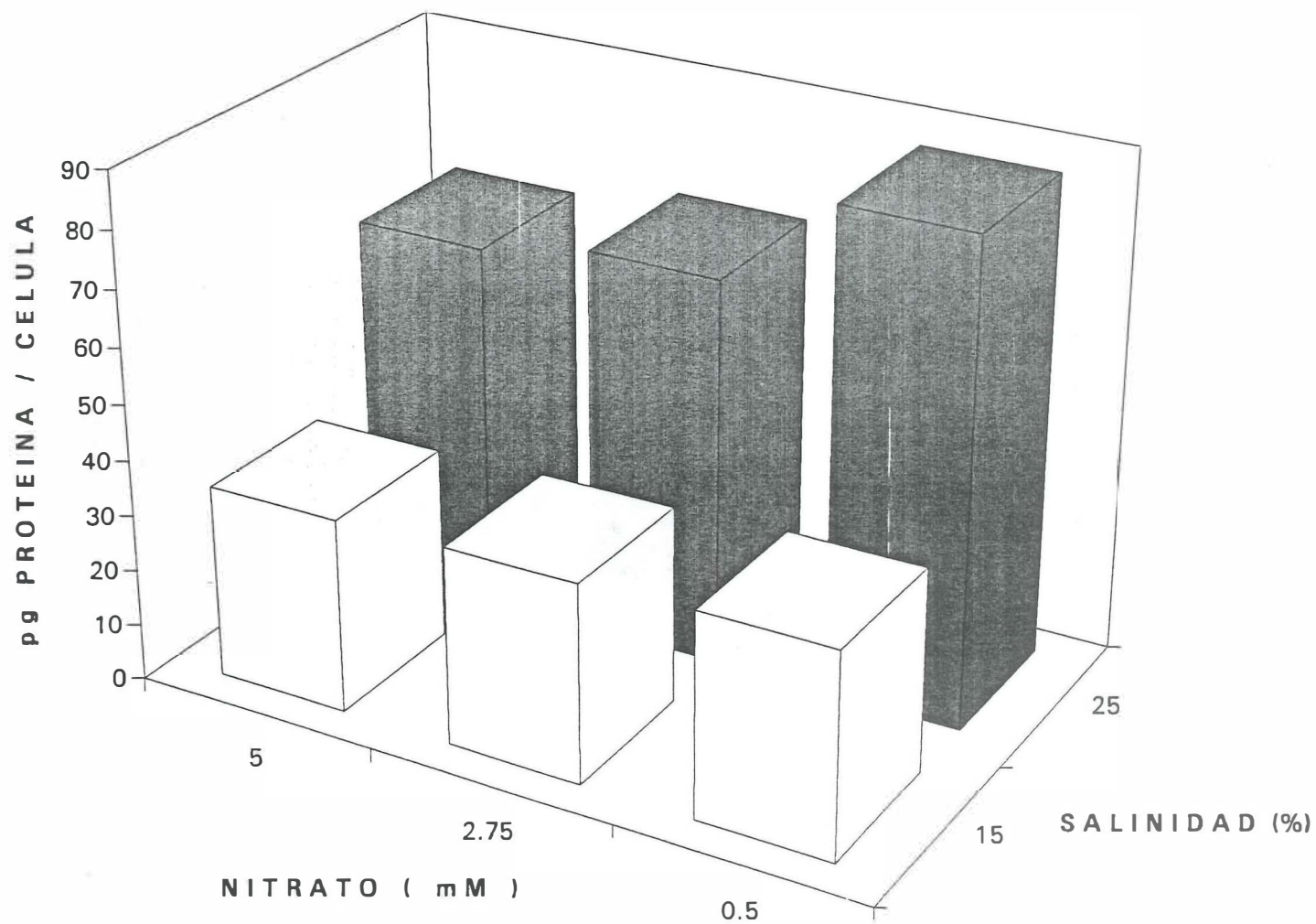


Figura 31. Efecto de la salinidad y la concentración de nitrato sobre el contenido proteico en *Dunaliella salina* después de 7 días de cultivo.

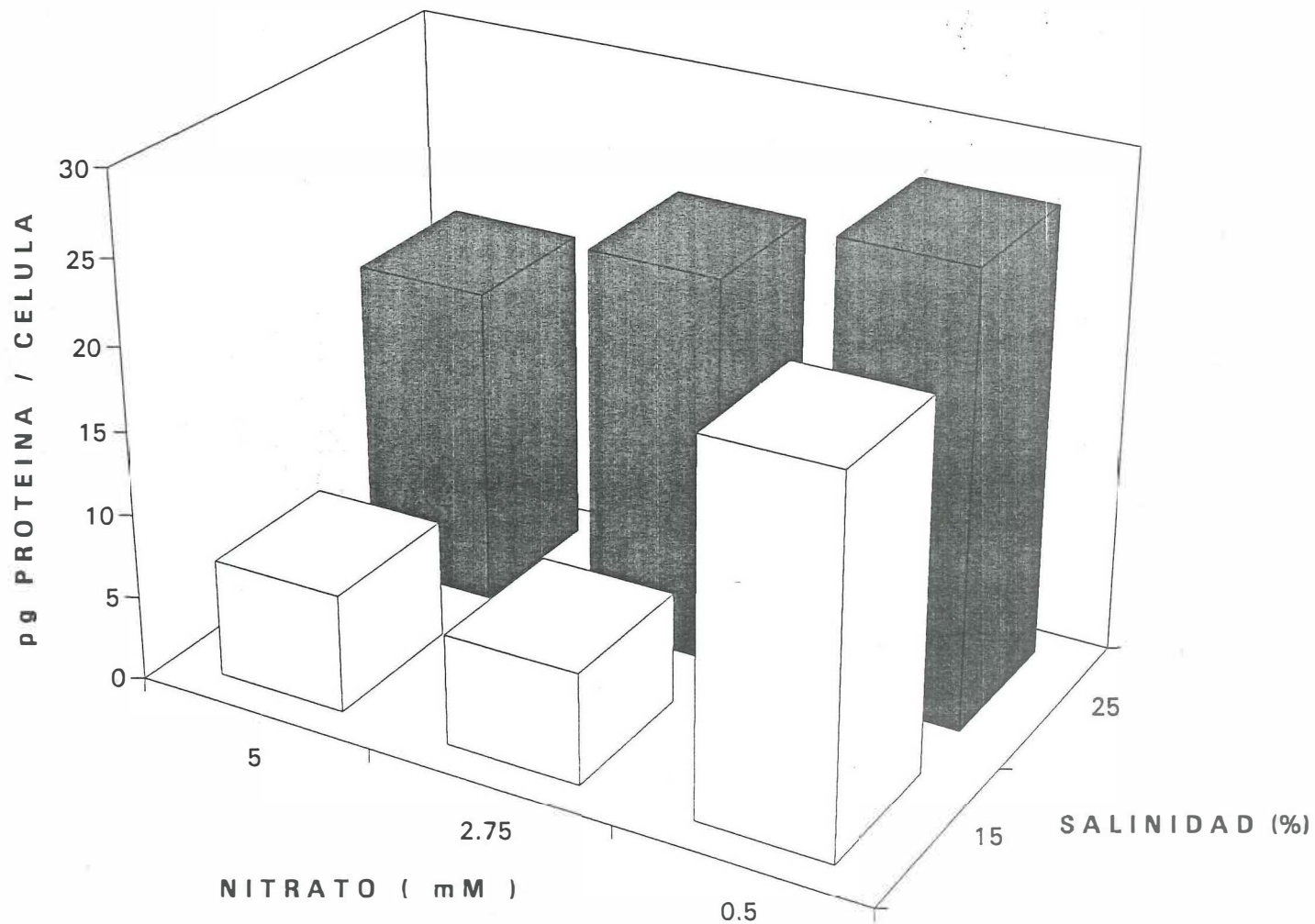


Figura 32. Efecto de la salinidad y la concentración de nitrato sobre el contenido proteico en Dunaliella salina después de 18 días de cultivo.

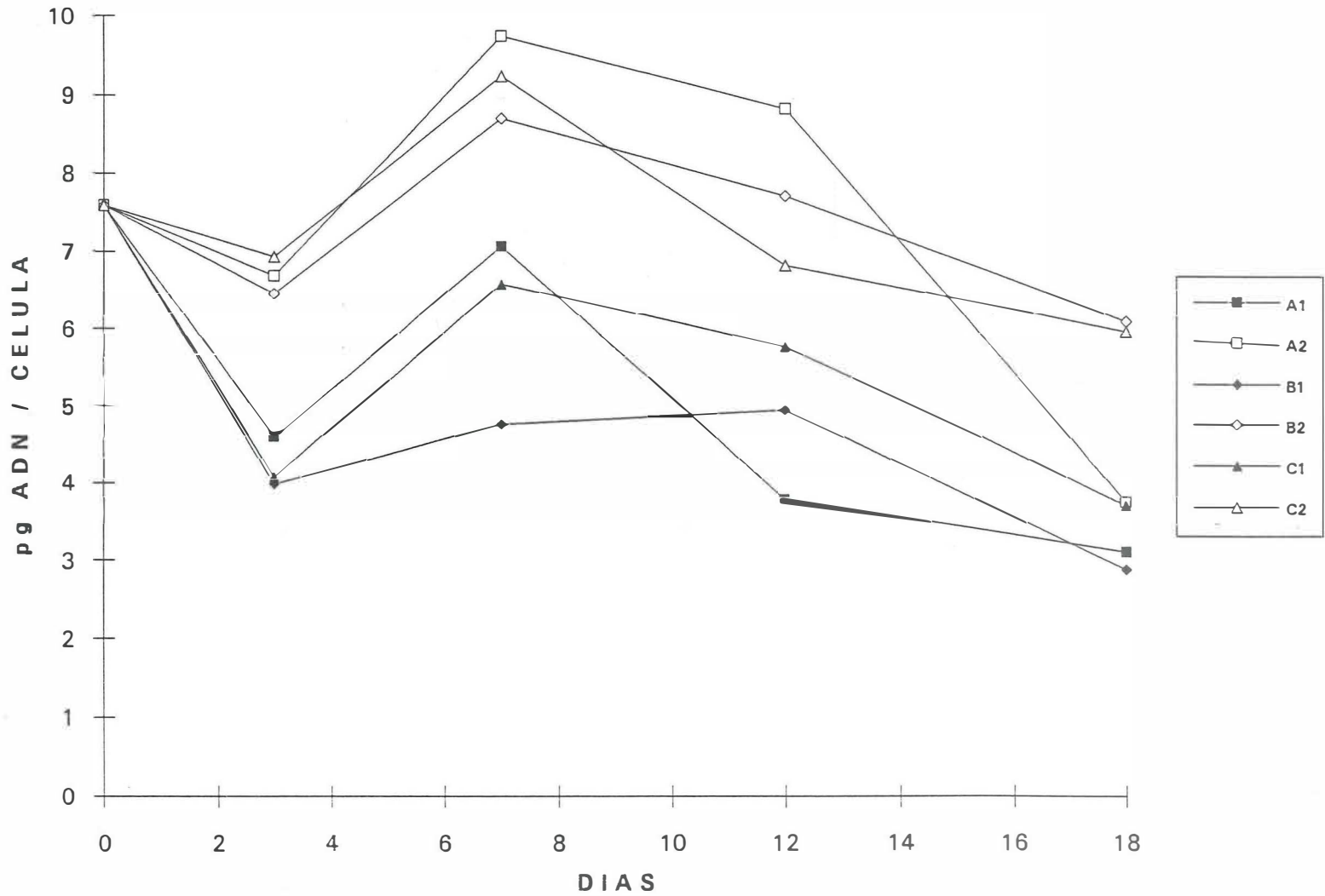


Figura 33. Concentración de ácido desoxiribonucleico celular en *Dunaliella salina* durante la fase experimental.

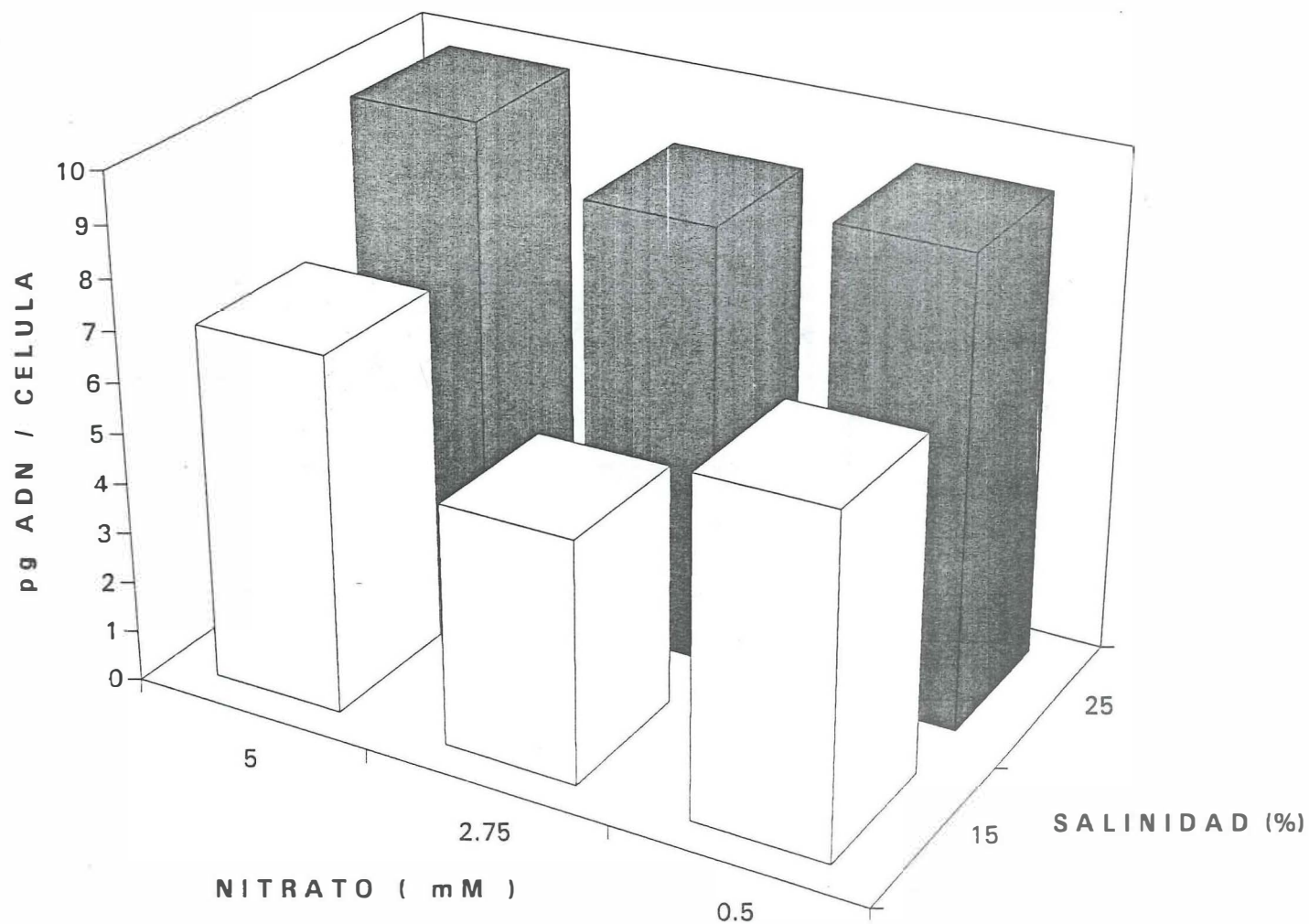


Figura 34. Efecto de la salinidad y concentración de nitrato sobre el contenido de ácido desoxiribonucleico en Dunaliella salina después de 7 días de cultivo.

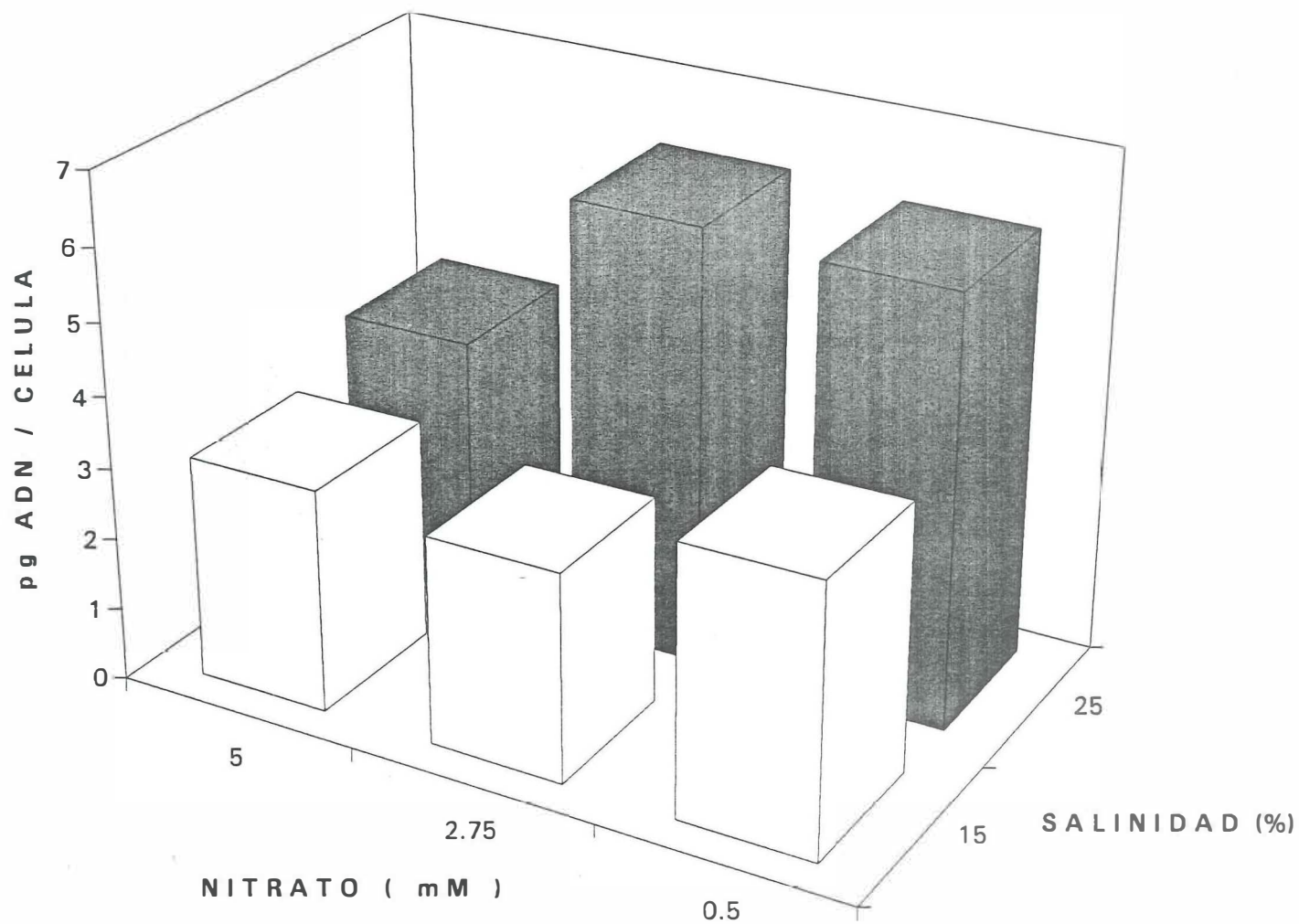


Figura 35. Efecto de la salinidad y la concentración de nitrato sobre el contenido de ácido desoxiribonucleico en Dunaliella salina después de 18 días de cultivo.

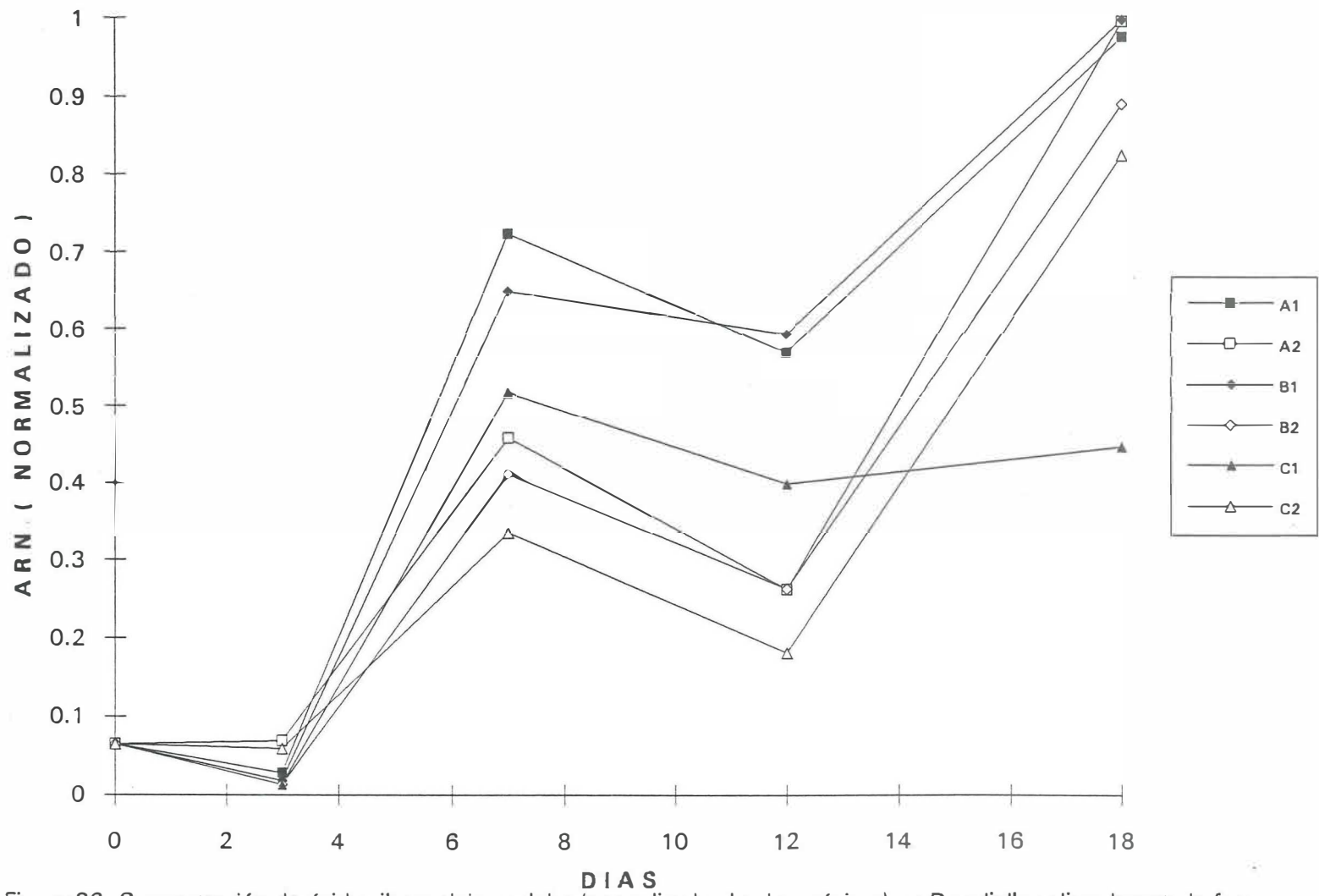


Figura 36. Concentración de ácido ribonucleico celular (normalizada al valor máximo) en *Dunaliella salina* durante la fase experimental.

este ácido nucleico no evidenció la acción de las condiciones experimentales sobre este componente celular (tabla V).

IV. 3. 4. Relación entre variables.

Se encontró una alta multicolinealidad entre las variables crecimiento, proteína y ácido ribonucleico. Para predecir los carotenoides (CAROT.), se consideraron en el modelo la variables: crecimiento (CREC.), clorofila *a* (CLOR. *a*), clorofila *b* (CLOR. *b*) y ácido desoxiribonucleico (ADN) ($r^2 = 0.637$; $p < 0.001$). La relación obtenida se presenta a continuación:

$$\text{CAROT.} = 3.98 - 7.39\text{E-}6(\text{CREC.}) + 2.70(\text{CLOR. } a) - 4.30(\text{CLOR. } b) + 4.64(\text{ADN})$$

V. DISCUSIÓN

V. 1. Prospección y aislamiento.

Dunaliella salina se aisló del agua colectada en la estación de muestreo V, la cual mostró la salinidad más alta (figura 2). Un año posterior al estudio se encontró en este mismo sitio la presencia de halita (forma mineralizada de cloruro de sodio), como una prueba más de la alta salinidad de este lugar. Otra evidencia más que corrobora la idoneidad del sitio de muestro, como fuente de *Dunaliella salina*, es la coloración roja del agua observada en un cuerpo de agua contiguo a esta estación (parte Oeste de la salina), lo cual representa una respuesta natural carotenogénica de *Dunaliella salina* y halobacterias ante condiciones extremas de salinidad y deficiencia en nutrientes (Massyuk, 1961; Borowitzka y Brown, 1974 y Ben-Amotz y Avron, 1983b).

En este estudio se confirmó la suposición hecha por Del Castillo (1988) sobre la presencia de "formas semejantes a *Dunaliella*".

La identificación de *D. salina* representa un registro nuevo de esta especie en Baja California. Similar confirmación para *D. viridis* se encuentra en proceso.

V. 2. Identificación de la especie.

V. 2. 1. Crecimiento.

Los resultados encontrados en este estudio confirman las investigaciones de otros autores (Ben-Amotz y Avron, 1983b; Borowitzka, Borowitzka y Moulton, 1984), ya que conforme aumenta la concentración de sal en el medio, el crecimiento celular decrece. Tal pareciera que la célula utiliza su energía para el mantenimiento de sus mecanismos bioquímicos para sobrevivir fisiológicamente a las condiciones adversas del medio, cesando o disminuyendo la división celular, como resultado de la canalización de su energía hacia las funciones de metabolismo basal.

V. 2. 2. Proporción carotenoides / clorofila a.

En este estudio pudo comprobarse que existe una relación inversa entre biomasa celular y producción de carotenoides, lo cual constituye el principal dilema para la producción comercial de β -caroteno (Borowitzka, Borowitzka y Kessly, 1990).

La cepa registrada en nuestro laboratorio como BC02 cumple los requisitos establecidos por Loeblich (1982) para ser considerada como *Dunaliella salina*, ya que cambia su coloración de verde a roja bajo condiciones de alta salinidad (> 25 % NaCl) y presenta una tasa de carotenoides/clorofila a de 15:1, que es mucho

mayor de 6:1, la cual es la proporción mínima establecida por esta autora para definir a *Dunaliella salina*.

V. 3. Inducción a la carotenogénesis.

V. 3. 1. Crecimiento.

Los resultados de este segundo experimento son congruentes con los datos de crecimiento del primer estudio de identificación de la especie, es decir, a mayor salinidad, menor densidad poblacional. El efecto de las concentraciones limitantes de nitrato ensayadas se manifestaron al final del experimento. En acuerdo con Semenenko y Abdullaev (1980), Ben-Amotz y Avron (1983b) y Borowitzka y Borowitzka (1988), el estrés por la carencia de nitrato produce una respuesta semejante a la de la salinidad sobre el crecimiento microalgal. Se esperaba que bajas concentraciones de nitrato produjeran menor crecimiento, inclusive antes de entrar las células a la fase de cultivo exponencial, lo cual no se observó. La razón de esto se explica debido a que el diseño original de la investigación contemplaba la limitación de nitrato con base en un medio de cultivo artificial preparado con agua destilada. No obstante, durante el desarrollo del estudio se cambió la formulación original empleando agua de mar natural, por considerarse que así las condiciones experimentales serían más semejantes a lo que sucede en la naturaleza y que, de igual forma, trata de simularse en las plantas productoras de β -caroteno. De esta manera, debe considerarse que el agua de mar empleada traía consigo una reserva natural de nitrato, el cual se

agotó hasta la etapa final del experimento, cuando empezó a evidenciarse el efecto de nitrato en el metabolismo y fisiología de *D. salina*.

V. 3. 2. Pigmentos.

Los resultados de la tabla IV muestran una tendencia similar al crecimiento para la composición de las microalgas en clorofila *b*, carotenoides y la proporción carotenoides/clorofila *a*. El efecto de salinidad se hizo patente durante todo el experimento, pero la influencia de nitrato y su interacción con salinidad sólo se observó al final de la etapa experimental. La proporción de carotenoides/clorofila *a* fue baja en comparación con los datos de otras investigaciones (Loeblich, 1982; Ben-Amotz y Avron, 1983b; Borowitzka, Borowitzka y Kessly, 1990). La causa de esto pudo ser la poca influencia limitante del nitrato, debido a la composición natural de este ión en el agua utilizada. Esto se corrobora del primer experimento, en el cual se obtuvieron relaciones carotenoides/clorofila *a* superiores a las mencionadas.

La clorofila *a*, si se le compara con carotenoides y clorofila *b*, se mostró más sensible al efecto de nitrato quizás por la gran influencia del nitrógeno en el grupo de porfirina, en comparación con carotenoides, y tal vez también por la mayor proporción de clorofila *a*, con respecto de la *b*. La clorofila *a* es uno de los pigmentos más afectados por cambios ambientales, específicamente nutrientes, por ser parte estructural del fotosistema II del aparato fotosintético de *Dunaliella*.

Si se analiza conjuntamente la evolución del crecimiento y la tasa de carotenoides/clorofila *a*, puede postularse que después de 5-7 días del choque salino es el mejor período para obtener una relación adecuada entre crecimiento celular y producción de carotenoides. Estos resultados son importantes para fines de manejo de la especie orientada hacia la producción comercial de β -caroteno.

V. 3. 3. Proteínas y ácidos nucleicos.

La carotenogénesis, representada por las células de *Dunaliella salina* en estrés salino, estuvo caracterizada por una proporción mayor de la fracción proteica. Para evitar una posible sobreestimación de los valores de proteínas, debido a la presencia de carotenoproteínas, se hizo una extracción pigmentaria previa. Aún así, las células en medios hipersalinos mostraron siempre una mayor concentración de proteína. La razón de esto pudo deberse al gran número de proteínas sintetizadas *de novo* exprofeso para hacer frente al estrés salino. Sin embargo, no fue posible discernir el efecto de cada ión carotenogénico investigado por dos razones: (1) la propia técnica de evaluación, ya que el colorante azul brillante de Coomassie sólo se adhiere a residuos de aminoácidos principalmente básicos y aromáticos, lo que supondría quizás un incremento de este tipo de residuos y no necesariamente de la proteína total; y/o (2) la estimación de proteína se hizo en unidades absolutas de peso, es decir, no se consideró el porcentaje proteico sobre la base del peso seco, lo cual podría indicar que la aparente mayor proporción de proteína por célula carotenogénica tal vez sea sólo el reflejo de un mayor volumen celular de este tipo de células.

Si se supone que los altos valores de proteína en células rojas realmente reflejan los cambios bioquímicos que se desarrollan durante la carotenogénesis plastidial, entonces debería esperarse un reflejo de esto a nivel de ácidos nucleicos. Este efecto se observó como un incremento significativamente mayor de ácido desoxiribonucleico en células carotenogénicas, pero no se evidenció en cambio alguno en el contenido en ARN. Sin embargo, la diferencia detectada gráficamente en esta última variable podría sugerir un decremento considerable en células carotenogénicas. El no haber podido demostrar estadísticamente el efecto sobre el ARN no significa que no exista. Esto pudo deberse a condiciones de manipulación experimental en la evaluación de este componente nucleico. La investigación se realizó con un producto comercial de anaranjado de tiazol, destinada para la detección de ácidos nucleicos en reticulocitos y cuya concentración no se especifica en su presentación. Actualmente, la venta del anaranjado de tiazol en forma pura está protegida por derecho de patente y la exclusividad está concedida a una compañía de sondas moleculares de los Estados Unidos de Norteamérica. Así, la técnica se adaptó a la respuesta fluorométrica obtenida. Además, debe considerarse que la escala del espectrofluorofotómetro se cambió para poder evaluar la respuesta a la fluorescencia del ARN, con respecto a la escala utilizada para el ADN. Lo anterior impidió el cálculo adecuado de ARN, por lo que los resultados hubieron de presentarse sólo en forma relativa como datos normalizados con respecto al valor máximo obtenido.

V. 3. 4. RELACIÓN ENTRE VARIABLES.

Los resultados obtenidos presentan una relación lineal entre crecimiento, proteínas y ácido ribonucleico, en concordancia con el dogma central de la genética, aunque es sorprendente que el ADN no esté siendo incluido en esta multicolinealidad.

El modelo resultante para predecir los carotenoides es susceptible de ser mejorado, siempre y cuando se disponga de mayor información (tamaño de muestra más grande), ya que intervienen en él muchas variables y el porcentaje de variación explicado por el mismo es relativamente bajo ($r^2 = 0.63$), tal y como lo mostró el análisis residual. Se sugiere un estudio más exhaustivo orientado exclusivamente a encontrar un mejor modelo predictivo basado en la utilización de un menor número de variables y de una más fácil y rápida estimación en laboratorio.

VI. CONCLUSIONES

- Se presentan en este estudio dos registros nuevos de *Dunaliella* para la zona de Baja California: una cepa carotenogénica identificada como *D. salina* y una no carotenogénica, que por sus características pudiera ser *D. viridis*.

- La cepa aislada de *D. salina* presenta un gran potencial carotenogénico, con proporciones de carotenoides/clorofila a 15:1, muy por encima del promedio presentado en la literatura, tal y como se demostró con el experimento de identificación de la especie

- La biomasa está en proporción inversa a la producción de carotenoides en células estresadas en medio hipersalino.

- Se propone el período 5-7 días posterior al estrés salino como el óptimo para la cosecha de células con fines comerciales. Es en esta etapa en la cual se da la mejor relación entre biomasa y producción de carotenoides.

- El proceso carotenogénico está regulado genéticamente, lo cual pudo evidenciarse a través de cambios a nivel ADN y proteínas totales.

LITERATURA CITADA

- AASEN, A.J., K. E. EIMHJELLEN y S. LIAAEN-JENSEN, 1969. An extreme source of β -carotene. *Acta Chimica Scandinavica*. **23**: 2544-2545.
- ATTAWAY, D. H., 1989. Marine biotechnology in the National Sea Grant College Program: status and oportunities. En *Current Topics in Marine Biotechnology*, S. Miyachi, I. Karube e Y. Ishida (eds.), pp. 37-40. Tokyo: Japanese Society for Marine Biotechnology c/o System Research Center.
- BAKER, J. T., 1989. Contributions of "strategies in marine biotechnology". En *Current Topics in Marine Biotechnology*, S. Miyachi, I. Karube e Y. Ishida (eds.), pp. 41-42. Tokyo: Japanese Society for Marine Biotechnology c/o System Research Center.
- BAUERNFEIND, J. C. (ed.), 1981. Carotenoids as colorants and vitamin A precursors: technological and nutritional applications. Academic Press, London, 938 pp.
- BEN-AMOTZ, A., 1975. Adaptation of the unicellular alga *Dunaliella parva* to a saline environment. *J. Phycol.* **11**: 50-54.
- BEN-AMOTZ, A. y M. AVRON, 1980. Glycerol, β -carotene and dry algal meal production by commercial cultivation of *Dunaliella*. En *Algae Biomass*, G.

Shelef y C. J. Soeder (eds.), pp. 603-610. Amsterdam: Elsevier/North Holland Biomedical Press.

BEN-AMOTZ, A. y M. AVRON, 1982. The potential use of *Dunaliella* for the production of glycerol, β -carotene and high-protein feed. En *Biosaline Research: A Look to the Future*, A. San Pietro (ed.), pp. 207-214. New York: Plenum Publishing Corporation.

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 β -carotene accumulation in the halotolerant alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiol.* **72**: 593-597.

BEN-AMOTZ, A. y A. SHAISH, 1992. β -carotene biosynthesis. En *Dunaliella: Physiology, Biochemistry, and Biotechnology*, M. Avron y A. Ben-Amotz (eds.), pp. 205-216. Boca Raton: CRC Press.

BERDALET, E. y Q. DORTCH, 1991. New double-staining technique for RNA and DNA measurement in marine phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **73**: 295-305.

BERGES, J. A., A. E. FISHER y P. J. HARRISON, 1993. A comparison of Lowry, Bradford and Smith protein assays using different protein standards and

protein isolated from the marine diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Mar. Biol.* **115**: 187-193.

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

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**: 115-134.

BOROWITZKA, M. A., L. J. BOROWITZKA y D. KESSLY, 1990. Effects of salinity increase on carotenoid accumulation in the green alga *Dunaliella salina*. *J. Appl. Phycol.* **2**: 111-119.

BOROWITZKA, L. J. y A. D. BROWN, 1974. The salt relations of marine and halophilic species of the unicellular green alga, *Dunaliella*: The role of glycerol as a compatible solute. *Arch. Microbiol.* **96**: 37-52.

BOROWITZKA, L.J., T. P. MOULTON y M. A. BOROWITZKA, 1986. Salinity and the commercial production of beta-carotene from *Dunaliella salina*. En *Algal Biomass Technologies: an Interdisciplinary Perspective*, W. R. Barclay y R. P. McIntosh (eds.), pp. 224-229. Verduz: J. Cramer Verlag.

- BRADFORD, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* **72**: 248-254.
- CIFUENTES, A. S., M. GONZALEZ, M. CONEJEROS, V. DELLAROSSA y O. PARRA, 1992. Growth and carotenogenesis in eight strains of *Dunaliella salina* Teodoresco from Chile. *J. Appl. Phycol.* **4**: 111-118.
- CLAYTON, J. R., Q. DORTCH, S. S. THORESEN y S. I. AHMED, 1988. Evaluation of methods for the separation and analysis of proteins and free amino acids in phytoplankton samples. *J. Plankton Res.* **10**(3): 341-358.
- DEL CASTILLO, E., 1988. Hidrobiología de La Salina, B. C., México. Tesis de Maestría en Ciencias (Ecología Marina); CICESE, 122 pp.
- GUILLARD, R. R. L., 1973. Division rates. En *Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements*, J. R. Stein (ed.), pp. 289-311. Cambridge: Cambridge University Press.
- HAGEMANN, M. y E. WITTENBURG, 1989. Salt-induced changes in the RNA and DNA content of the cyanobacteria (blue-green algae) *Synechocystis aquatilis* and *Microcystis firma* in batch and turbidostat cultures. *Arch. Hidrobiol. Suppl.* **82**(3): 381-391.

- JENSEN, A., 1978. Chlorophylls and carotenoids. En *Handbook of Phycological Methods: Physiological and Biochemical Methods*, J. A. Hellebust y J. S. Craigie (eds.), pp. 59-70. Cambridge: Cambridge University Press.
- KOCHERT, G., 1978. Protein determination by dye binding. En *Handbook of Phycological Methods: Physiological and Biochemical Methods*, J. A. Hellebust y J. S. Craigie (eds.), pp. 91-93. Cambridge: Cambridge University Press.
- LEERS, A., Y. BIENER y A. ZAMIR, 1990. Photoinduction of massive β -carotene accumulation by the alga *Dunaliella bardawil*: kinetics and dependence on gene activation. *Plant Physiol.* **93**: 389-395.
- LOEBLICH, L. L., 1982. Photosynthesis and pigments influenced by light intensity and salinity in the halophile *Dunaliella salina* (Chlorophyta). *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* **62**: 493-508.
- LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR y R. J. RANDALL, 1951. Protein measurement with Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- MASSYUK, N. P., 1961. Carotene containing alga *Dunaliella salina* Teod. in saline basins of Crimea. *Ukranskyia Botanichnya Zhournal*, **18**: 100-109.
- ORTEGA-SALAS, A. A. y G. A. MARTINEZ, 1987. Hydrological and population studies on *Artemia franciscana* in Yavaros, Sonora, Mexico. *Rev. Biol. Trop.* **35** (2): 233-239.

- 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.
- SADKA, A., S. HIMMELHOCK y A. ZAMIR, 1991. A 150 kilodalton cell surface protein is induced by salt in the halotolerant green alga *Dunaliella salina*. *Plant Physiol.* **95**: 822.
- SCHOEN, S., 1988. Cell Counting. En *Experimental Phycology: A Laboratory Manual*, C. S. Loban, D. J. Chapman y B. P. Kremer (eds.), pp. 16-22. Cambridge: Cambridge University Press.
- SEMENENKO, V. E. y A. A. ABDULLAEV, 1980. Parametric control of β -carotene biosynthesis in *Dunaliella salina* cells under conditions of intensive cultivation. *Soviet Plant Physiol.*, **27**(1): 22-30.
- SHAISH, A., A. BEN-AMOTZ y M. AVRON, 1991. Production and selection of high β -carotene mutants of *Dunaliella bardawil* (Chlorophyta). *J. Phycol.* **27**: 652-656.
- SOKAL R. R. y F. J. ROHLF, 1988. Introducción a la Bioestadística. E. Reverté, Barcelona, 362 pp.

- SOROKIN, 1973. Dry weight, packed cell volume and optical density. En *Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements*, J. R. Stein (ed.), pp. 321-343. Cambridge: Cambridge University Press.
- SOURNIA, A., 1978. Phytoplankton manual. UNESCO, Monograph on oceanographic methods No. 6, París, 337 pp.
- STARR, R.C. y J. A. ZEIKUS, 1987. UTEX-The culture collection of algae at the University of Texas at Austin. *J. Phycol.* **23**:1-47, Suplemento a Septiembre.
- STERMAN, N. T., 1988. Spectrophotometric and fluorometric chlorophyll analysis. En *Experimental Phycology: A Laboratory Manual*, C. S. Loban, D. J. Chapman y B. P. Kremer (eds.), pp. 35-46. Cambridge: Cambridge University Press.
- STOLZ, J. F., 1984. Fine structure of the stratified microbial community at Laguna Figueroa, Baja California, Mexico: 2. Transmission electron microscopy as a diagnostic tool in studying microbial communities *in situ*. *Microbial Mats: Stromatolites*. MBL Lect. Biol. **3**: 23-38.
- STRICKLAND, J. D. H. y T. R. PARSONS, 1972. A manual of seawater analysis. *Bull. Fish. Res. Bd. Canada* 125, 310 pp.
- THORESEN, S. S., J. R. CLAYTON, Jr., Q. F. DORTCH y S. I. AHMED, 1983. A rapid technique for the determination of RNA and DNA in marine phytoplankton. *J. Plankton Res.* **5**(2): 253-261.

ZAMIR, A., 1992. Molecular biology of *Dunaliella*. En *Dunaliella: Physiology, Biochemistry, and Biotechnology*, M. Avron y A. Ben-Amotz (eds.), pp. 195-203. Boca Raton: CRC Press.

ZAR, J. H., 1984. *Biostatistical Analysis*. 2a. ed., Prentice Hall, Nueva York, 718 pp.