

Caracterización biológica de una cepa chilena de *Dunaliella salina* potencialmente comerciable

Biological characterization of a chilean strain of *Dunaliella salina*
of commercial potential

OSCAR O. PARRA, MARIELA GONZALEZ, VICTOR DELLAROSSA
ANA S. CIFUENTES y MARIANELA CONEJEROS.

Departamento de Botánica, Facultad de Ciencias Biológicas y de Recursos Naturales,
Universidad de Concepción, Casilla 2407, Concepción, Chile

A morphological and a physiological characterization of a strain of *Dunaliella* from a salt pond in the North of Chile was performed. Morphological and ultrastructural observations of the cells under the light and transmission electron microscopes, show that the strain belongs to *D. salina* (Dunal) Teodoresco.

Unialgal cultures of this strain in different media, and under variable conditions of irradiance, aeration, salinity and nutrients (NO_3 and PO_4) reveal that *D. salina* strain CONC-001, reach an optimum growth in ES and/or J/1 media, at 200-300 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{sec}$ of continuous light, in aeration, with a salt (NaCl) concentration of 12.5%, nitrates of 25 mM and phosphates 0.4 mM.

Dunaliella salina strain CONC-001 has a very peculiar biochemical property which is, its high content of alpha-carotene.

INTRODUCCION

Las algas del género *Dunaliella* (Chlorophyta, Chlorophyceae), que crecen en ambientes acuáticos hipersalinos, especialmente *D. salina* y *D. bardawil*, están entre aquellas microalgas más estudiadas para cultivo masivo (Borowitzka y Borowitzka, 1988). *Dunaliella salina* fue primero propuesta como fuente comercial de betacaroteno y posteriormente como fuente de glicerol.

El betacaroteno producido en forma natural o sintética tiene uso comercial importante como agente colorante en alimentos. El alto contenido de betacaroteno en *D. salina* (Ben-Amotz, Katz y Avron 1982; Borowitzka *et al.*, 1984), junto a la tendencia creciente de utilización de colorantes naturales en reemplazo de los sintéticos, ha despertado el interés por la explotación de dicha microalga para la producción comercial de betacaroteno.

Esta microalga está siendo actualmente cultivada en forma masiva y con fines comerciales para la obtención de betacaroteno en Australia, Israel, Norteamérica

(Borowitzka y Borowitzka 1988) y China (Cheng, comun. pers.).

En el norte de Chile, entre las latitudes 18-26°S, existen numerosas lagunas hipersalinas y salares, con intensidades de radiación solar entre las más altas del planeta y cielos despejados todo el año. Estas características hacen de esta área un lugar apropiado y óptimo para el cultivo masivo de *Dunaliella salina*.

La cantidad de información ficológica y limnológica que existe sobre los ambientes acuáticos salinos continentales en el mundo es considerablemente menor a la que existe sobre otros cuerpos de agua continentales. Williams (1981) en un completo trabajo sobre los lagos salinos interiores athalasicos considera aspectos como: 1. Valor económico. 2. Unidades biológicas. 3. Interés científico. 4. Distribución geográfica; y 5. Componentes de la biota. Analiza más de 2.000 referencias (sin considerar las de carácter geoquímico y geológico), llegando a la conclusión de que se está lejos de tener una completa descripción y comprensión de la dinámica

de estos ambientes. La principal razón de esta situación, según el autor, sería la lejanía de estos sistemas acuáticos de los centros de estudios, situación que se presenta también en Chile.

La reciente creación del Instituto del Desierto por la Universidad de Antofagasta posibilitará el creciente desarrollo de las investigaciones sobre estos ambientes. Varios autores han enfatizado la importancia de estos sistemas interiores como sustratos propicios para estudios de carácter ecológico, fisiológico, evolutivo, paleolimnológico y otros estudios biológicos.

Lagos salinos o áreas con sistemas acuáticos salinos se presentan en todos los continentes y en términos de volúmenes absolutos y porcentual del agua total de la biosfera, son sólo un poco menos importantes que las aguas dulces, $125 \times 10^3 \text{ km}^3$ (0,009%) y 104 km^3 (0,008%) aguas dulces y salinas interiores, respectivamente (Vallentyne, 1972). Williams (1981) señala que en Sudamérica existe una gran cantidad de cuerpos de agua salados, definidos como aquellos que presentan una concentración de sólidos disueltos totales mayor a un 3%.

La alta concentración de sal, unida a otros factores ambientales como una alta intensidad lumínica, escasas precipitaciones y alta temperatura debido a la posición geográfica que estos sistemas ocupan, permite el crecimiento de especies especialmente adaptadas a estas condiciones.

Toda vez que se combina altas concentraciones de sal con altas temperaturas, la solubilidad de los gases disminuye significativamente, por lo que el principal factor limitante para la fijación de carbono fotosintético puede ser la disponibilidad de CO_2 disuelto en el medio.

De un cuerpo acuático con estas características se aisló una población del género *Dunaliella* (cepa CONC-001), sustrato de esta investigación. La caracterización biológica lograda hasta el momento debe ser considerada como preliminar.

La presente contribución se ha realizado dentro del marco de los objetivos planteados en los proyectos PNUD CHI/87/009 "Obtención de betacaroteno de la microalga *Dunaliella*" y el proyecto FONDECYT 0823/89 "Búsqueda de nuevas fuentes

fotosintéticas de ambientes acuáticos hipersalinos del Norte de Chile", que son los siguientes:

1. Estudiar la microflora de los ambientes acuáticos salinos de la región desértica del Norte de Chile.
2. Búsqueda de otras especies de microalgas potencialmente útiles como nuevas fuentes alimenticias o generadoras de productos industriales.
3. Caracterización limnológica de los ambientes acuáticos salinos.
4. Iniciar el desarrollo de la Ficología y Limnología de ambientes acuáticos continentales salinos.
5. Reforzar el proyecto PNUD con nueva información científica básica.
6. Incrementar el conocimiento ficológico del país.
7. Desarrollo a nivel de laboratorio de la tecnología para la extracción de β -caroteno de *Dunaliella*, producida en planta piloto.

MATERIALES Y METODOS

Origen de las muestras

Muestras de agua conteniendo poblaciones de especies de *Dunaliella* fueron colectadas en una laguna natural hipersalina, ubicada aproximadamente 30 km al norte de Antofagasta ($23^\circ 30'S$, $70^\circ 35'W$) en el sector "La Rinconada" y transportadas hasta el Laboratorio de Cultivos de la Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

Aislamiento y purificación del material algológico

En una primera etapa se hizo cultivos de enriquecimiento de las muestras de terreno tomando alícuotas de ellas, las que fueron colocadas en tubos con agua de mar enriquecida con NO_3 y PO_4 (medio Erdschreiber, McLachlan 1973) y adicionando cantidades crecientes de NaCl (0-30%).

Transcurrido el tiempo necesario para un crecimiento evidente, se procedió al aislamiento de las cepas de *Dunaliella*, mediante la técnica de lavados sucesivos con micropipetas (según Hoshaw y Rosowski, 1973) tanto sobre una superficie de agar isotónica como en portaobjetos bajo microscopio. De esta manera se obtuvo cultivos unialgales de dos especies de *Dunaliella*, CONC-001 y CONC-002, las que son mantenidas en el laboratorio. Además, se mantienen en cultivo 8 taxa de *Dunaliella* obtenidos de la colección UTEX (USA).

El traspaso de estas cepas a medio fresco, en el tiempo, se hace mediante dilución seriada en tubos de ensayo.

Condiciones de mantención

Las cepas aisladas son mantenidas en una sala de cultivos bajo las siguientes condiciones ambientales:

Temperatura:

25 ± 3°C.

Iluminación:

30-200 μE/m²seg (variable según los requerimientos u objetivos de la investigación).

Fotoperíodo:

12/12 (luz: oscuridad) o iluminación continua.

Para experiencias específicas de crecimiento se cuenta con una pequeña cámara de cultivo controlada, en la que es posible mantener cultivos con iluminación permanente o fotoperíodo 12/12 y aireación continua e intermitente 12/12. En ella es posible obtener una iluminación de hasta 300 μE/m²/seg.

Medios de cultivos

Se experimentó con diferentes medios, tanto sólidos (S) como líquidos (L), y diferentes salinidades. En la actualidad se mantienen cultivos de las cepas aisladas, en los siguientes medios:

- Medio Erdschreiber (ES)- NaCl, L.
- Medio PES (agua de mar enriquecida de Provasoli) NaCl, L.
- Medio J/1 (Johnson modificado, Borowitzka y Borowitzka, 1988) + NaCl, L.
- Medio J/1-agar (0,5%)- NaCl, S.

En la Tabla I se presenta la lista de cepas de *Dunaliella* que actualmente se mantienen en la colección de cultivo de la Universidad de Concepción. En esta tabla se detallan las condiciones específicas en que es mantenida la cepa CONC-001.

Preparación de muestras para microscopía electrónica de transmisión

A partir de cultivos de diferente edad (20-40 días) se obtuvo material que fue fijado en una mezcla de glutaraldehído al 8% en 10% de NaCl, 16% de paraformaldehído acuoso y 4% de OsO₄ acuoso. De esta forma, la concentración final en la muestra fue de 2% de glutaraldehído, 0,8% de paraformaldehído y 0,2% de OsO₄ en 5% de NaCl. Las células fueron lavadas 4 veces con agua destilada, incluidas en agar y teñidas en 0,5% de acetato de uranilo acuoso; en seguida, deshidratadas en una serie ascendente de acetona y, finalmente, infiltradas en resina Spurr. Los cortes se efectuaron con un cuchillo de diamante y se tiñeron en KMnO₄ y citrato de plomo. Las observaciones se efectuaron con un microscopio electrónico Zeiss EM-10 CA operado a 60 u 80 KV.

TABLA I

Lista de cepas de *Dunaliella* mantenidas en la colección de cultivos de la Universidad de Concepción

| Cepa | Medio |
|---------------------------------|--|
| <i>D. salina</i> UTEX 200 | 2 SW |
| <i>D. salina</i> 200 | J/1 + 10% NaCl-Agar 0,5% |
| <i>D. salina</i> 200 | J/1 + 15% NaCl-Agar 0,5% |
| <i>D. salina</i> UTEX 1644 | 2 SW |
| <i>D. salina</i> 1644 | J/1 + 10% NaCl-Agar 0,5% |
| <i>D. salina</i> | ES + 10% NaCl |
| <i>D. salina</i> | ES + 30% NaCl |
| <i>D. salina</i> | PES + 12,5% NaCl |
| <i>D. salina</i> | ES + 12,5% NaCl |
| <i>D. salina</i> (CONC-001) | ES + 10% NaCl |
| <i>D. salina</i> (CONC-001) | ES + 12,5% NaCl |
| <i>D. salina</i> (CONC-001) | ES + 10% NaCl-25 mM NO ₃ ⁻ |
| <i>D. salina</i> (CONC-001) | ES + 20% NaCl-1,5 mM NO ₃ ⁻ |
| <i>D. salina</i> (CONC-001) | ES + 20% NaCl-6 mM NO ₃ ⁻ |
| <i>D. salina</i> (CONC-001) | ES + 25% NaCl-25 mM NO ₃ ⁻ |
| <i>D. salina</i> (CONC-001) | ES + 12,5% NaCl-Aire |
| <i>D. salina</i> (CONC-001) | ES + 12,5% NaCl-60 mM NO ₃ ⁻ |
| <i>D. salina</i> (CONC-001) | ES + 12,5% NaCl-50 mM NO ₃ ⁻ |
| <i>D. salina</i> (CONC-001) | PES + 12,5% NaCl |
| <i>D. salina</i> (CONC-001) | ES + 15% NaCl |
| <i>D. salina</i> (CONC-001) | J/1 + 10% NaCl-Agar 0,5% |
| <i>D. viridis</i> (CONC-002) | J/1 + 10% NaCl |
| <i>D. viridis</i> (CONC-002) | ES + 15% NaCl |
| <i>D. primiolecta</i> UTEX 1000 | ES |
| <i>D. primiolecta</i> | ES + 5% NaCl |
| <i>D. primiolecta</i> | J/1 + 5% NaCl-Agar 0,5% |
| <i>D. primiolecta</i> | J/1 + 10% NaCl-Agar 0,5% |
| <i>D. bioculata</i> UTEX 199 | 2 SW |
| <i>D. bioculata</i> | J/1 + 10% NaCl-Agar 0,5% |
| <i>D. bioculata</i> | J/1 + 5% NaCl-Agar 0,5% |
| <i>D. tertiolecta</i> UTEX 999 | Soil + Sea water |
| <i>D. tertiolecta</i> | 2 SW |
| <i>D. tertiolecta</i> | ES + 5% NaCl |
| <i>D. tertiolecta</i> | J/1 + 10% NaCl-Agar 0,5% |
| <i>D. tertiolecta</i> | J/1 + 4% NaCl-Agar 0,5% |
| <i>D. parva</i> UTEX 1983 | ES |
| <i>D. parva</i> | 2 SW |
| <i>D. parva</i> | ES + 5% NaCl |
| <i>D. parva</i> | J/1 + 10% NaCl-Agar 0,5% |
| <i>D. peircei</i> UTEX 2192 | 2 SW |
| <i>D. peircei</i> | J/1 + 10% NaCl-Agar 0,5% |
| <i>D. peircei</i> | J/1 + 5% NaCl-Agar 0,5% |
| <i>D. lateralis</i> | BBM-Suelo |
| <i>D. lateralis</i> | BBM-Suelo-Agar 1,5% |

SW = Sea water.

ES = Erdschreiber.

J/1 = Johnson modificado.

BBM = Medio Bristol.

Experiencias para determinar condiciones óptimas de crecimiento de la cepa *Dunaliella salina* CONC-001

Se han realizado experiencias para determinar el efecto de:

- Salinidad sobre el crecimiento.
- Salinidad sobre la producción de caroteno.
- Aireación sobre el crecimiento.
- Concentración óptima de los principales nutrientes (N y P).
- Iluminación sobre el crecimiento.
- Iluminación sobre la tasa fotosintética.

Todas estas experiencias se llevaron a cabo en la cámara de cultivo a una temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$, iluminación continua de $200 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{seg}$ y aireación permanente, a excepción de (e), que se realiza en la sala de cultivo sin aireación. Para el efecto de salinidad y nutrientes se hizo un acondicionamiento de las células a las concentraciones de experimentación con una semana de anticipación. Se trabajó con un rango de salinidad obtenido adicionando 50, 75, 100, 125, 175 y 200 g NaCl a 1 litro de medio de cultivo. Para nitratos (NaNO_3) se utilizaron concentraciones de 0, 0,5, 1,5, 5, 6, 12, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 mM. Para fosfato (Na_2HPO_4) las concentraciones fueron 0,0, 0,02, 0,04, 0,2, 0,4, 2,0, 4,0, 8,0 mM. Los medios de cultivos utilizados fueron ES (salinidad) y agua de mar enriquecida (nutrientes).

La cuantificación de crecimiento se hizo mediante:

- Estimaciones de la densidad de células (células/ml) tanto con hemocitómetro Thomas (0,1 mm prof. y $1/400 \text{ mm}^2$ de área mínima) como con cámara Utermohl de 1 ml.
- Medida de la densidad óptica a 750 nm, con espectrofotómetro Shimatzu.

La cuantificación de caroteno, según la metodología descrita por Strickland y Parsons (1972).

RESULTADOS Y DISCUSION

a) Caracterización morfológica y ultraestructural de *Dunaliella salina* (Dunal) Teodoresco, cepa Antofagasta, CONC-001

Se identificaron dos poblaciones del género *Dunaliella*, proveniente de material colectado en la laguna hipersalina, en el sector de la Rinconada de Antofagasta. Estas correspondieron a las especies *D. salina* (Dunal) Teodoresco y *D. viridis* Teodoresco, las que fueron aisladas y purificadas, siendo, además, catalogadas como cepas CONC-001 y CONC-002, respectivamente.

La investigación taxonómica se inició con observaciones al microscopio óptico de las cepas aisladas mantenidas en cultivo y con la revisión de literatura ad-hoc.

La cepa *D. salina* CONC-001 fue estudiada detalladamente bajo microscopía fotónica y electrónica de barrido y transmisión por Parra *et al.* (en prensa), cuya información resumimos en forma muy breve.

D. salina (Dunal) Teodoresco, presenta células de forma elipsoidal a cilíndrica,

siendo su forma muy variable bajo condiciones de cultivo. Posee dos flagelos isomorfos de igual tamaño y de una longitud similar al cuerpo celular. La parte posterior de la célula está ocupada por un enorme cloroplasto en forma de copa, el que contiene un gran pirenoide de posición central. El núcleo se ubica entre los lóbulos del cloroplasto y también tiene posición central. El tamaño celular varía entre 10-29 μm de longitud y de 8-21 μm de ancho. La cepa muestra una variación de su color desde el amarillo-verdoso al rojo intenso, tanto en condiciones de laboratorio como en el ambiente natural.

De las características ultraestructurales más relevantes de la cepa destacan las siguientes: 1. Carencia de pared celular; sólo posee una cubierta constituida por un material difuso que se distribuye por toda la superficie celular en forma irregular. 2. Un cloroplasto bien definido, con un pirenoide central notorio, el cual está penetrado por múltiples pares de tilacoides. 3. Células en fase estacionaria con numerosos gránulos de almidón rodeando al pirenoide y gran cantidad de glóbulos conteniendo caroteno. 4. El núcleo contiene un voluminoso nucléolo. 5. El aparato Golgi consiste de 2 a 3 dictiosomas que se ubican entre el extremo anterior del núcleo y los cuerpos basales. 6. El retículo endoplásmico está ubicado muy próximo a la membrana plasmática y alrededor de toda la célula. 7. Las mitocondrias se encuentran generalmente muy cercanas a los cuerpos basales. 8. El sistema flagelar muestra el típico patrón de transición flagelar descrito para las Chlorophyceae (Melkonian y Preisig, 1984; Watanabe y Floyd, 1989), teniendo un sistema de raíces flageladas del tipo 4-2-4-2 y la disposición de los cuerpos basales en el sentido de las agujas del reloj y sin sobrelapes (Parra *et al.*, en prensa).

Las Figs. 1 y 2 ilustran la célula de *D. salina* vista al microscopio óptico y electrónico de transmisión.

b) Caracterización fisiológica de *D. salina*, cepa CONC-001

Como se expresó en la introducción de este trabajo, la caracterización de algunas propiedades fisiológicas de la cepa estudiada

debe considerarse como preliminar. Esta se ha enfocado principalmente con vías a obtener información sobre las condiciones óptimas de crecimiento en cultivo, que sean de utilidad para el posterior cultivo masivo de la cepa.

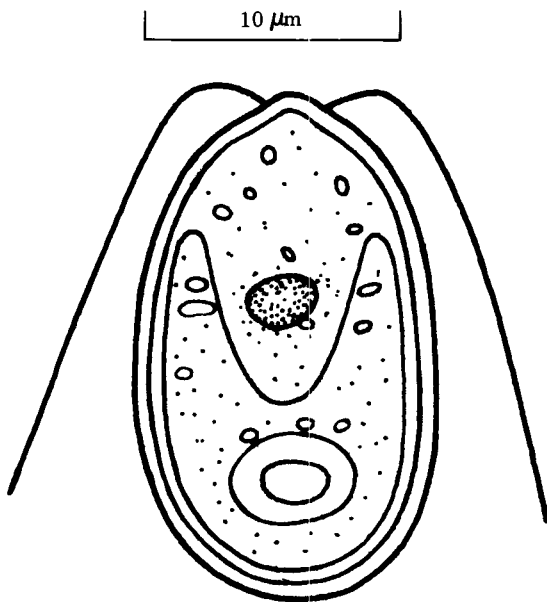


Fig. 1: Célula observada al microscopio óptico.

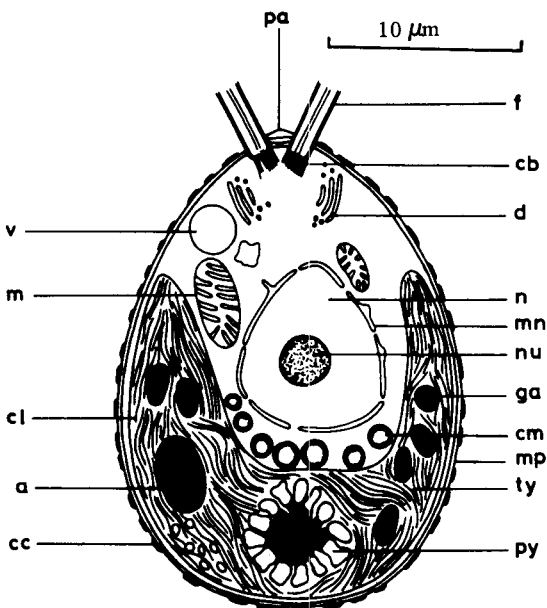


Fig. 2: Ilustración de una célula observada al microscopio electrónico de transmisión (a: almidón; cb: cuerpo basal; cc: cubierta celular; cl: cloroplasto; cm: cuerpo multivesicular; f: flagelo; ga: gránulo de almidón; m: mitocondria; mn: membrana nuclear; mp: membrana plasmática; n: núcleo; nu: nucléolo; py: pyrenoide; ty: tylacoide).

Medio de cultivo: Los medios ES y J/1 en fase líquida han resultado ser los más adecuados para la obtención de un crecimiento óptimo de esta cepa.

Salinidad: De las experiencias de crecimiento realizadas en el rango de 0-20% de NaCl se obtuvo un óptimo a 12,5% de NaCl. En células cultivadas a 20% de NaCl se obtuvo el mayor contenido de carotenos.

Iluminación: El óptimo para la actividad fotosintética de la cepa se presenta entre 200 y 300 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{seg}$.

Aireación: A las mismas condiciones anteriormente establecidas, los cultivos con aireación presentaron un mejor crecimiento (mayor número de células y mayor velocidad de crecimiento).

Temperatura: Los cultivos se mantienen viables dentro del rango 5-30°C. Observaciones cualitativas permiten inferir que la temperatura óptima para el crecimiento sería de ca. 28°C.

pH: No se ha determinado la influencia del pH en el crecimiento de *D. salina* (cepa CONC-001), pero se obtuvo un rango de variación de éste en el medio óptimo (ES + 12,5% NaCl) durante la curva de crecimiento. El pH varió entre 7,6 y 9,0.

Nitratos: *Dunaliella* cepa CONC-001 presentó cultivos anaranjados, con un aumento en la cantidad de carotenos a concentraciones menores que 1,5 mM de NaNO_3 . Entre 1,5-25,0 mM hubo un aumento en la tasa de división celular que se estabiliza entre 25 y 60 mM de NaNO_3 . A concentraciones mayores de 40 mM, parece haber inhibición del crecimiento.

Fosfato: En el rango de fosfato utilizado esta cepa tuvo un óptimo en el crecimiento a 0,4 mM. Bajo 0,04 mM, se obtuvo cultivos anaranjados (alta concentración de carotenos en las células) con una baja densidad de células.

Las condiciones de crecimiento en laboratorio obtenidas en este estudio, indican que los requerimientos fisiológicos de la cepa *D. salina* CONC-001 son muy similares a los obtenidos por otros autores para otras

cepas de *D. salina* (Ginzburg, 1987; Borowitzka y Borowitzka, 1988). Sin embargo, la cepa CONC-001 presenta una notable propiedad bioquímica, cual es la producción de alfacaroteno en alta concentración en relación a betacaroteno (Markowitz y Erazo, comunicación personal), propiedad que no había sido encontrada en ninguna cepa de *D. salina*.

Siendo el pigmento betacaroteno el producto económicamente importante, la presencia de alfacaroteno en esta cepa pone una interrogante sobre su potencial utilización como fuente de betacaroteno. No existe, por el momento, una explicación a esta situación, aspecto que está siendo investigado, ya que la cepa presenta todas las otras propiedades que la hacen cultivable masivamente para la obtención de biomasa vegetal.

REFERENCIAS

- BEN-AMOTZ, A.; KATZ, A.; AVRON, M. (1982) Accumulation of Beta-carotene in halotolerant algae: Purification and characterization of Beta-carotene-rich globules from *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae), *J. Phycol.* 18: 529-537.
- BOROWITZKA, M.A.; BOROWITZKA, L.J. (1988) *Dunaliella*. In: Borowitzka and Borowitzka (eds.), *Microalgal Biotechnology*, Cambridge, pp. 27-58.
- BOROWITZKA, L.J.; BOROWITZKA, M.A.; MOULTON, T.P. (1984) The mass culture of *Dunaliella salina* for fine chemicals: from laboratory to pilot plant. *Hydrobiologia* 116/117: 115-134.
- GINZBURG, M. (1987) *Dunaliella*: a Green Alga adapted to salt. *Advances in Botanical Research* 14: 93-198.
- HOSHAW, R.W.; ROSOWSKI, J.R. (1973) Methods for microscopic algae. In: Stein, J. (ed.), *Culture Methods & Growth Measurements. Handbook of Phycological Methods*, pp. 54-68.
- McLACHLAN, J. (1973) Growth Media-marine. In: Stein, J. (ed.), *Culture Methods & Growth Measurements. Handbook of Phycological Methods*, pp. 26-47.
- MELKONIAN, M.; PREISING, H.R. (1984) An ultrastructural comparison between *Spermatopsis* and *Dunaliella* (Chlorophyceae). *Pl. Syst. Evol.* 146: 31-46.
- PARRA, O.O.; FLOYD, G.L.; WILCOX, L.W. (1990) Taxonomic identification and ultrastructural characterization of a Chilean strain of *Dunaliella* (en prensa).
- STARR, R.C.; ZEIKUS, J.A. (1987) UTEX- The Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin. *J. Phycol.* 23 (Suppl. Sept.), p. 38.
- STRICKLAND, J.D.; PARSONS, T.R. (1972) A manual of sea water analysis. *Bull. Fish. Res. Bd. Canada* 125: 310 pp.
- VALLENTYNE, J.R. (1972) Freshwater supplies and pollution: effects of the demophoril explosion on water and man. In: N. Polunim (ed.), *The Environmental future*. Mac Millan Press: 181-211.
- WATANABE, S.; FLOYD, G.L. (1989) Variation in the ultrastructure of a biflagellate motile cells of the unicellular genera of the *Chlamydomonadales*, with emphasis on the flagellar apparatus. *Amer. J. Bot.* 76 (2): 307-317.
- WILLIAMS, W.D. (1981) Inland salt lakes: An introduction. *Hydrobiologia* 81: 1-14.