

**CULTIVO DE UNA CEPA CAROTENOGÉNICA DE
CHLOROCOCCUM SP. (CHLOROPHYTA: CHLOROCOCCALES)
AISLADA DE RIZOSFERA DE *VICIA FABA* (HABA)**

Culture of a carotenogenic strain of the *Chlorococcum* sp. (Chlorophyta: Chlorococcales) isolated from rhizosphere *Vicia faba* (bean)

**Ana CARVAJAL¹, Mabel CADENA¹, Denisse MOLINA¹,
Pedro ROMERO¹, Franklin GAVILANEZ² y Ever MORALES³**

¹Escuela Politécnica del Ejército, Departamento de Ciencias
de la Vida, Ingeniería en Biotecnología, Sangolquí, Ecuador

²Centro de Biología, Universidad Central del Ecuador

³Proyecto Prometeo-SENESCYT
evermster@gmail.com

RESUMEN

Chlorococcum sp. fue aislada de rizosfera de haba (*Vicia faba*) en un campo agrícola de Latacunga, Cotopaxi, Ecuador, con el objeto de evaluar el efecto de factores inductores de carotenogénesis. El crecimiento de la microalga con medio BBM fue monitoreado en cultivo discontinuo. En fase exponencial se obtuvo la mayor densidad celular de $13,2 \times 10^6$ cel.ml⁻¹ y contenido de clorofila *a*, con 13,65 µg.ml⁻¹. En cambio, en la fase de decrecimiento se produjo el máximo contenido de carotenoides con 8,58 µg.ml⁻¹. La mayor población de células carotenogénicas fue inducida en el tratamiento con NaCl (0,5%) + iluminación ($115,2 \mu\text{mol.m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y temperatura ($30 \pm 2^\circ\text{C}$), con $3,4 \times 10^6$ cel. ml⁻¹. Esta cepa de *Chlorococcum* sp. es capaz de acumular carotenoides con la edad del cultivo, y con el efecto combinado de la salinidad, temperatura e iluminación.

Palabras clave: Carotenogénesis, *Chlorococcum*, cultivo discontinuo, microalga, salinidad

ABSTRACT

Chlorococcum sp. was isolated from rhizosphere of bean (*Vicia faba*) in a farm field in Latacunga, Cotopaxi, Ecuador, in order to evaluate the effect of inducing factors of carotenogenesis. The microalgae growth was monitored in batch culture with medium BBM. Exponentially, the higher cell density of $13,2 \times 10^6$ cel.ml⁻¹ and chlorophyll *a* content, 3,65 µg.ml⁻¹ was obtained. Instead under decrease cell, the maximum content of carotenoids was of 8,58 µg.ml⁻¹. The highest population of carotenogenic cells was induced with NaCl (0.5%) + light ($115,2 \mu\text{mol.m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and temperature ($30 \pm 2^\circ\text{C}$) with $3,4 \times 10^6$ cel. ml⁻¹. This strain of *Chlorococcum* sp. in batch cultures is able to accumulate carotenoids with age of the culture, and the combined effect of salinity, temperature and irradiance.

Key words: Batch culture, carotenogenic, *Chlorococcum*, microalgae, salinity

INTRODUCCION

Las comunidades edáficas de microalgas y cianobacterias asociadas a rizos-

fera de plantas y suelos, conjuntamente con hongos, levaduras y bacterias participan en los procesos de interacción microbiota-planta, así como en la generación de nutrientes disponibles y en el acondicionamiento de suelos (Ferrera & Alarcón 2001). Así mismo, la diversidad de estas comunidades fotosintéticas puede variar según el tipo de manejo que se pueden aplicar a los suelos cuando son utilizados para la agricultura. En este sentido, se ha descrito que en suelos cultivados con *Solanum tuberosum*, *Zea mays*, *Heliantus annus*, *Glycine max*, *Hordeum vulgare*, *Triticum* sp., *Beta vulgaris* y *Medicago sativa* sugieren la influencia de estas plantas y de los fertilizantes sobre la dominancia, diversidad, morfotipos y presencia de microorganismos fotosintéticos e incluso su relación con niveles de fertilidad natural o inducida de los suelos (Salaru *et al.* 2008).

En este grupo se encuentran las microalgas clorófitas las cuales crecen en ambientes terrestres, aéreos y acuáticos, tanto de agua dulce como marinos e hipersalinos. En el orden Chlorococcales (Marchand 1895) se distinguen los géneros: *Botryococcus*, *Characium*, *Chlorella*, *Chlorococcum*, *Desmodesmus*, *Dictyosphaerium*, *Golenkinia*, *Palmella*, *Scenedesmus*, *Sphaerocystis*. Entre las características de estos géneros se indican su capacidad por ser colonizadores efectivos de suelos, de cuerpos de agua recién formados y de todas aquellas superficies que mantienen la humedad. Pueden ser unicelulares o coloniales no flagelados y con reproducción asexual por medio de esporas móviles o inmóviles (Klochkova *et al.* 2006).

Chlorococcum (Meneghini 1842) pertenece a la familia Chlorococcaceae, orden Chlamydomonadales, clase Chlorophyceae, phylum Chlorophyta (Guiry & Guiry 2007); su morfología puede ser ovoide, elipsoidal o esférica, con un cloroplasto parietal urceolado y uno o varios pirenoides. Generalmente su reproducción es asexual por zoósporas y aplanósporas formadas por sucesivas divisiones celulares. En ocasiones puede exhibir reproducción sexual por fusión de isogametos indistinguibles de las zoósporas (Noguerol *et al.* 1979; Backwell *et al.* 1991; Satpati *et al.* 2011).

La microalga *Chlorococcum* también se caracteriza por ser frecuentemente aislada de la superficie del suelo y presentar gran resistencia a sequías, estrés salino y amplio rango de pH, entre 2 y 10 (Lee 1999; Klochkova *et al.* 2006). Estas propiedades ya habían sido descritas por Liu & Lee (2000), quienes reportaron la capacidad que tiene *Chlorococcum* sp. de acumular carotenoides bajo condiciones estresantes de nutrientes, pH, salinidad e iluminación. Además, esta especie puede ser cultivada en fotobiorreactores usando la luz solar, por lo que constituye una fuente prometedora para la producción de carotenoides a nivel industrial (Abd El-Baky & El-Baroty 2013).

Entre las microalgas productoras de carotenoides (β -caroteno, luteína, cantaxantina, zeaxantina, astaxantina) se encuentran *Haematococcus pluvialis*, *Chlorella zofingiensis* y varias especies de *Chlorococcum* (Vila 2009; Bhagavathy & Sumathi 2010), tales como *Chlorococcum zofingiensis*, *C. infosiinium*, *C. multinucleatum*, *C. olefaciens* y *C. wimmerii*, productoras de carotenoides secundarios bajo condiciones extremas (Goodwin 1980).

La búsqueda de cepas de microalgas carotenogénicas reviste sumo interés en estudios de bioprospección debido a la necesidad de crear bancos de germoplasmas con estos microorganismos, a fin de preservar sus características genéticas y de ser utilizados en bioprocesos que conlleven a la producción de pigmentos con propiedades antioxidantes y provitamínicas; además de proveer beneficios terapéuticos tales como el fortalecimiento del sistema inmunológico y disminución del riesgo de enfermedades degenerativas.

El presente trabajo tuvo como objetivo el aislamiento de la microalga *Chlorococcum* en rizosfera de *Vicia faba* L. cultivadas en un campo de Latacunga, Cotopaxi, Ecuador, así como también la evaluación de su crecimiento en cultivos discontinuos y la determinación del efecto de la salinidad, temperatura e intensidad luminosa como posibles factores carotenogénicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento

El aislamiento de la cepa de *Chlorococcum* sp. asociada a rizosfera de plantas de haba (*Vicia faba*) en suelos cultivados en la parroquia Poaló, Latacunga, Cotopaxi, Ecuador, se realizó siguiendo la metodología de Acosta *et al.* (1996). Para ello se procedió a recolectar plantas adultas de esta leguminosa, las cuales fueron trasladadas al laboratorio en bolsas plásticas con las condiciones de humedad necesaria. Luego, con tijeras estériles y en condiciones de asepsia total, se realizaron cortes de las raíces de la planta que fueron colocadas en cápsulas de Petri, las que contenían 20 ml de medio de cultivo sólido con el fertilizante NITROFOSKA (1,0 ml.l⁻¹). Posteriormente, las muestras en cápsulas de Petri fueron expuestas a luz continua bajo lámparas fluorescentes, a una intensidad luminosa de 2 klx, equivalente a 38,4 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$, durante dos semanas y a fin de inducir el crecimiento de microorganismos fotosintéticos con luz continua.

Las áreas de crecimiento de microorganismos fotosintéticos observadas en la periferia de las raíces (Fig. 1) fueron seleccionadas para ser muestreadas con un asa bacteriológica, y colocadas en tubos de ensayo con 5 ml de medio de cultivo líquido ALGAL (Fábregas *et al.* 1984). Estas muestras se mantuvieron en condiciones controladas de iluminación a 38,4 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ con luz continua y $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por una semana.

A partir de estos cultivos se procedió a inocular muestras en cápsulas de Petri con medio BBM (Bold Basal Medium) (Bischoff & Bold 1963) en agar al 1,5%, para ser expuestas a condiciones controladas de luz y temperatura. Las colonias de *Chlorococcum* fueron identificadas con empleo de literatura especializada (Nogerol *et al.* 1979; Guiry & Guiry 2007), así como por la coloración anaranjada en las cápsulas de Petri mantenidas por más de tres semanas. Posteriormente, fueron observadas al microscopio para su evaluación morfológica y se seleccionaron las colonias para ser trasladadas a medio BBM líquido.



Fig. 1. Crecimiento de microorganismos fotosintéticos obtenidos a partir de una muestra de raíces de haba (*Vicia faba*).

Cultivo y mantenimiento de la cepa de *Chlorococcum* sp.

Las colonias seleccionadas fueron transferidas a tubos de ensayo de 10 ml con 1,0 ml de medio de cultivo BBM + 5 mM de NaHCO_3 (Shilpark *et al.* 2010). Éstos fueron mantenidos a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, intensidad luminosa de $38,4 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, con un fotoperiodo de 12:12 h. Paulatinamente, a medida que incrementó la biomasa, se aumentó el volumen de los cultivos desde 10 hasta 50 ml, mantenidos en agitación continua a 170 RPM, $25 \pm 2^\circ\text{C}$, a $38,4 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, y a un fotoperiodo 12:12 h (Martínez 2010; Ramasamy *et al.* 2012).

Cultivo discontinuo de la microalga *Chlorococcum* sp.

Los cultivos discontinuos de *Chlorococcum* sp. fueron iniciados con un inóculo de $0,5 \times 10^6$ cel. $\cdot\text{ml}^{-1}$ en 250 ml de medio BBM, enriquecido con una solución 5 mM de NaHCO_3 + 3 ml extracto de suelo, previamente esterilizado y a pH 8, en envases de vidrio con una capacidad de 500 ml. Estos cultivos por triplicado se mantuvieron bajo una intensidad luminosa de $115,2 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, con un fotoperiodo 12:12 h, $21 \pm 2^\circ\text{C}$ y aireación continua durante 25 días.

El crecimiento poblacional fue expresado en densidad celular ($1,0 \times 10^6$ cel.

ml⁻¹), determinado mediante conteo celular en cámara de Neubauer (Shoen 1988). Por su parte, para el análisis de clorofila a y carotenoides fue utilizado el dimetilsulfóxido para su extracción. Luego, se hicieron mediciones de densidad óptica por espectrofotometría a $\lambda = 480$ y 665 nm para carotenoides y clorofila a, respectivamente, respecto a un blanco de dimetilsulfóxido. La concentración de ambos pigmentos fue determinada a partir de las ecuaciones propuestas por Wellburn (1994).

En este experimento el diámetro de las células fue medido en cada una de las fases de crecimiento. Es decir, en fase inicial (2d), fase exponencial (7d) y saturación (17d), con empleo del programa Axio Vision LE-ZEISS, una cámara AxioCam MRC- ZEISS y un microscopio compuesto, marca ZEISS.

Efecto de factores inductores de carotenogénesis

Los factores de temperatura (°C), salinidad (%) e intensidad luminosa ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) fueron evaluados a fin de ser considerados como posibles variables inductoras de la carotenogénesis en *Chlorococcum*. Para ello, se seleccionó un cultivo en medio BBM con un tiempo de incubación de aproximadamente 30 días, y una densidad celular estimada en $7,8 \times 10^6$ cel.ml⁻¹. Este cultivo fue decantado para eliminar el sobrenadante y se lavó tres veces con agua destilada con la finalidad de eliminar todos los nutrientes, hasta que finalmente se repuso un volumen de 1,3 l de agua destilada estéril. Para dicho ensayo (con dos réplicas para cada tratamiento), se probó la combinación de los tres factores en un medio de cultivo sin nutrientes que consistió en el siguiente diseño:

Salinidad (0,5, 1,5 y 3,0%) + luz ($115,2 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) = NaCl + L

Salinidad (0,5, 1,5 y 3,0%) + luz ($115,2 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) + temperatura ($30 \pm 2^\circ\text{C}$) = NaCl + L + t

Temperatura ($30 \pm 2^\circ\text{C}$) + luz ($115,2 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) = L + t

Estos experimentos se realizaron a volúmenes de 300, 100 y 50 ml para las pruebas combinadas del efecto de salinidad + luz, salinidad + luz + temperatura, y de la temperatura + luz, respectivamente. Se realizaron conteos de las poblaciones de células verdes, intermedias y naranjas, mediante el uso de la cámara de Neubauer a los 30 d de iniciado el experimento (Fig. 2).

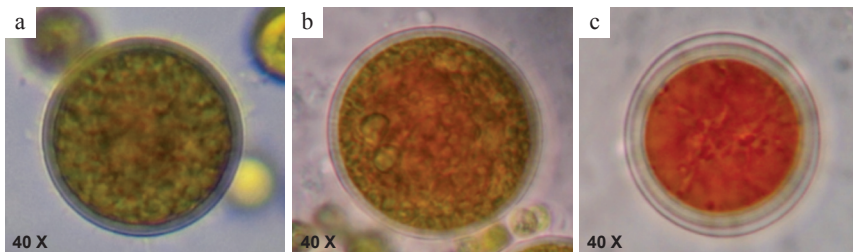


Fig. 2. Células de *Chlorococcum* sp. en diferentes estadios de acuerdo a su pigmentación.
a. Célula verde. b. Célula intermedia. c. Célula naranja.

RESULTADOS

Aislamiento de la cepa de *Chlorococcum* sp.

En el presente estudio fue observado en cultivos sólidos inoculado con cortes de raíces de haba (*Vicia faba*) y con más de 40 días de incubación, un crecimiento abundante de colonias naranjas, las cuales fueron resemebradas en medios de cultivos con el fertilizante NITROFOSKA y BBM, de tal manera que resultaron ser colonias del género *Chlorococcum*. No obstante, también se identificaron otras microalgas y cianobacterias asociadas a muestras de rizosfera tales como *Chlamydomonas*, diatomeas pennadas, *Leptolyngbya*, *Anabaena*, *Calothrix* y *Pseudanabaena*.

A las dos semanas aproximadamente, en medio sólido BBM se obtuvieron colonias de color verde oliva, lisas y semiesféricas (Fig. 3), a partir de las cuales se observaron al microscopio diversos estadios, típicos de *Chlorococcum*: 1) células elipsoidales, 2) células esféricas, 3) células con el cloroplasto parietal urceolado, 4) células con más de un pirenoide y, 5) células en reproducción (Fig. 4).

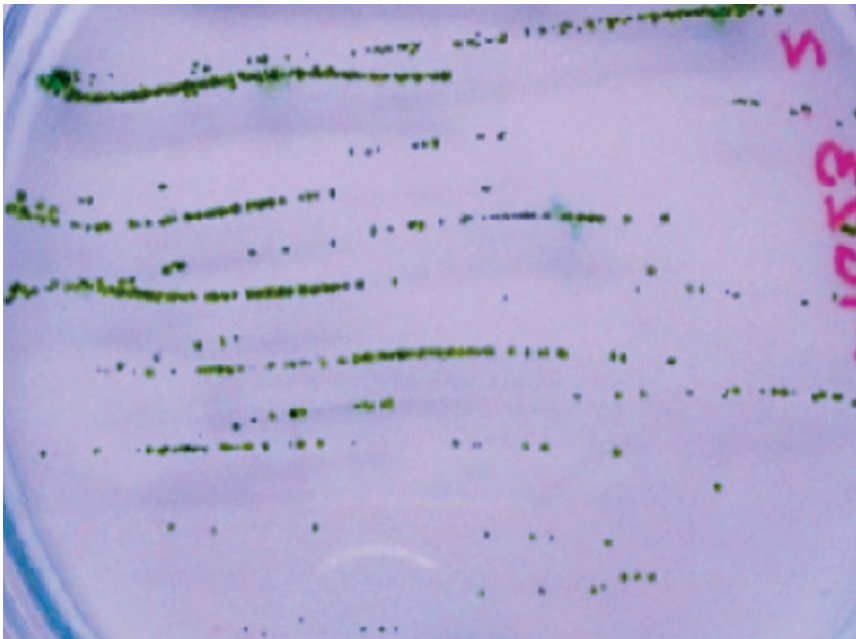


Fig. 3. Colonias de *Chlorococcum* sp. obtenidas en medio sólido BBM.

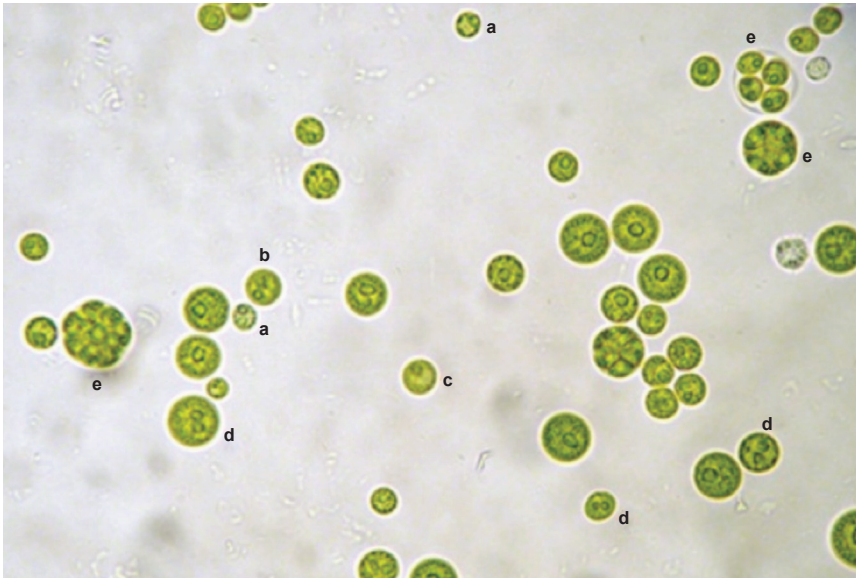


Fig. 4. Diferentes estadios de *Chlorococcum* sp. **a.** Células elipsoidales. **b.** Células esféricas. **c.** Células con el cloroplasto parietal urceolado. **d.** Células con más de un pirenoide. **e.** Células en reproducción.

A las cuatro semanas, en los cultivos en medio sólido las colonias cambiaron de color de verde a naranja rojizo (Fig. 5).

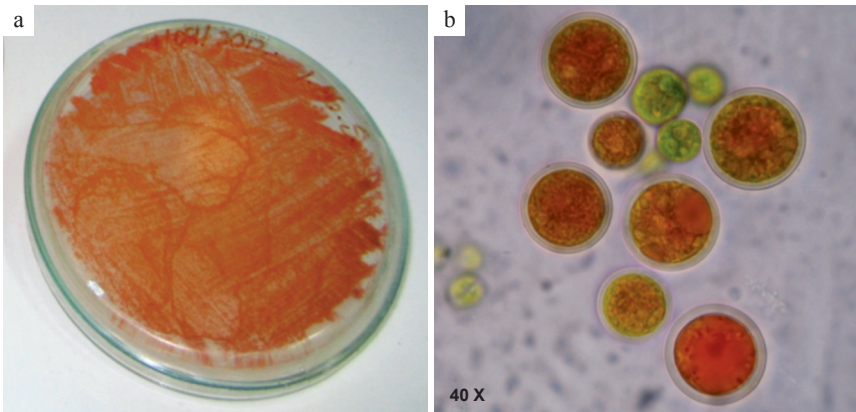


Fig. 5. **a.** Cultivos de *Chlorococcum* sp. en medio sólido BBM a cuatro semanas de incubación. **b.** Células carotenogénicas en cultivos sólidos envejecidos.

Cultivo discontinuo de la microalga *Chlorococcum* sp.

El crecimiento de la microalga describió una curva típica de un cultivo discontinuo, reflejando una fase exponencial hasta los 17 días (Fig. 6), en donde alcanzó la mayor densidad celular, con $13,2 \times 10^6$ cel.ml⁻¹, mientras que los máximos valores de clorofila *a* se produjeron entre los 14 y 21 d, con valores entre 13,06 y 13,65 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, respectivamente. En cambio, los carotenoides comenzaron a incrementarse a partir del décimo día, con el valor máximo de 8,58 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, el cual coincidió con la fase de decrecimiento celular. Así mismo, a partir del día 21 se observó un descenso de la densidad celular y del contenido volumétrico de clorofila *a*, mientras que para los carotenoides se produjo un incremento hasta su valor máximo (Tabla 1).

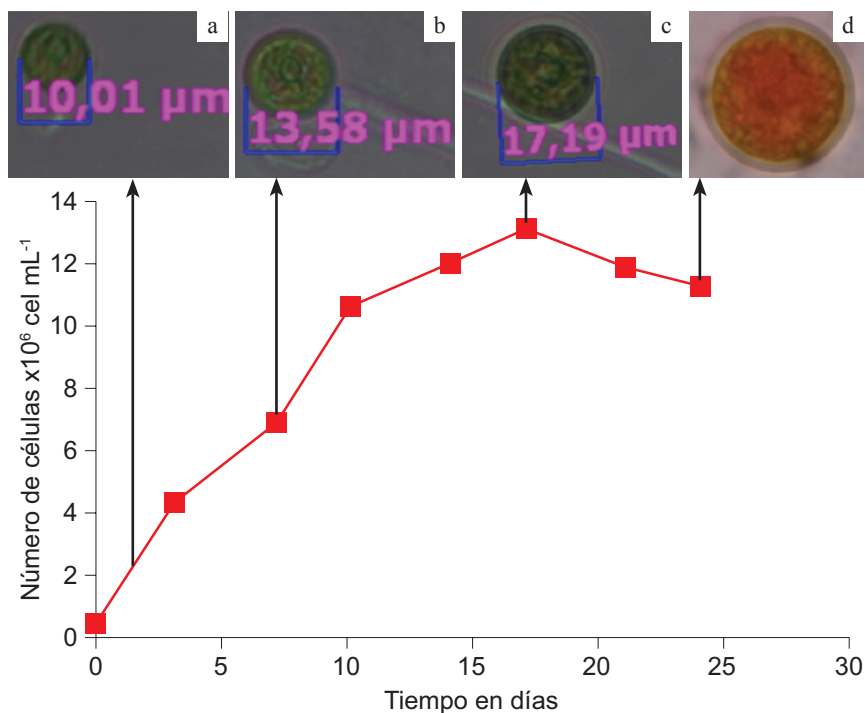


Fig. 6. Diámetro de las células de *Chlorococcum* sp. en función de la etapa de crecimiento. **a-b.** Fase exponencial entre 10,01 y 13,58 μm . **c.** Fase exponencial 17,19 μm . **d.** Células en fase de decrecimiento celular.

Tabla 1. Densidad celular, contenido de clorofila a y de carotenoides en cultivo discontinuo de la microalga *Chlorococcum* sp. según la edad del cultivo.

Edad cultivo (d)	Densidad celular (x 10 ⁶ cel.ml ⁻¹)	Clorofila a (µg.ml ⁻¹)	Carotenoides (µg.ml ⁻¹)
0	0,50	0	0
3	4,34	2,76	2,12
7	6,99	9,33	4,11
10	10,70	9,47	6,94
14	12,10	13,06	7,41
17	13,20	-	-
21	12,00	13,66	7,25
24	11,40	9,70	8,58

En cuanto al tamaño celular y de acuerdo a las fases de crecimiento en el cultivo discontinuo, se encontraron células entre 10,01 y 13,58 µm en fase exponencial, hasta alcanzar un tamaño promedio de 17,19 µm al final de la fase estacionaria. Se demuestra un crecimiento del tamaño celular conforme se desarrolla la curva de crecimiento, desde la fase exponencial hasta la fase de decrecimiento celular del cultivo discontinuo (Fig. 6). Además, se aprecia que al avanzar la fase estacionaria, *Chlorococcum* sp. comienza a cambiar su pigmentación a naranja, lo que también se evidencia en los cultivos envejecidos en medio sólido.

Efecto de factores inductores de carotenogénesis

Salinidad + luz

A los 30 días de ensayo se obtuvo mayor producción de células naranjas con la concentración de NaCl del 3%, seguido del 1,5% y por último la del 0,5%, con 2,5, 1,3 y 0,2 x 10⁶ cel.ml⁻¹, respectivamente. Es decir, la pigmentación naranja se incrementó con la concentración del NaCl adicionada a los cultivos. Con relación a la presencia de células con pigmentación verde-naranja o intermedia, se observó al 1,5% la mayor densidad poblacional con 3,9 x 10⁶ cel.ml⁻¹. En cambio, a 3 y 0,5% se cuantificaron densidades celulares similares con 1,95 y 1,9 x 10⁶ cel.ml⁻¹, respectivamente. En cuanto a las células verdes hubo una mayor representatividad en la concentración de 0,5%, siendo nula su población al 3% (Tabla 2), lo cual sugiere que la mayor concentración de NaCl al 3% induce el proceso de carotenogénesis en la mayor parte de las células, con lo cual disminuye la población celular enriquecida con clorofila.

Tabla 2. Producción de células ($\times 10^6$ cel.ml⁻¹) en función de la combinación de factores de salinidad, iluminación y de temperatura.

Factores	Concentración de salinidad	Células		
		Verdes	Intermedias	Naranja
NaCl + L	0,5%	3,5	1,9	0,2
	1,5%	0,22	3,9	1,3
	3,0%	0	1,95	2,5
NaCl + L + t	0,5%	0	2,1	3,4
	1,5%	0,1	4,4	1,1
	3,0%	0	2,2	2,9
L + t	-	0,9	1,51	2,77

L = iluminación; t = temperatura.

Salinidad + luz + temperatura

En este ensayo la concentración de 0,5% presentó la mayor cantidad de células naranjas, seguido de la del 3,0% y por último a la incubada al 1,5% con 3,4, 2,9 y 1,1 $\times 10^6$ cel.ml⁻¹, respectivamente. Se encontraron valores semejantes de células intermedias a la concentración salina del 0,5 y 3,0%, mientras que en la concentración de 1,5% la presencia de las mismas fue predominante con 2,1, 2,2 y 4,4 $\times 10^6$ cel.ml⁻¹, respectivamente. Tanto en la concentración de 0,5% como en la de 1,5%, la presencia de células verdes no fue detectada y en las células sometidas con NaCl al 1,5% no fue representativa ya que la población fue apenas de 0,1 $\times 10^6$ cel.ml⁻¹ (Tabla 2).

Temperatura + luz

La población de células naranjas fue predominante, seguida de las intermedias y en menor cantidad las células verdes con 2,77, 1,51 y 0,9 $\times 10^6$ cel.ml⁻¹, respectivamente (Tabla 2).

Este estudio comparativo entre los tres tratamientos, indicó que el más eficiente para la producción de células naranjas correspondió a la combinación: salinidad (0,5%), luz (115,2 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y temperatura ($30 \pm 2^\circ\text{C}$), seguido del tratamiento T + L, y por último, salinidad (3,0%) con 3,5, 2,77 y 2,5 $\times 10^6$ cel.ml⁻¹, respectivamente.

DISCUSIÓN

La microalga *Chlorococcum* sp. utilizada en el presente estudio fue aislada de rizosfera de haba (*Vicia faba*) y se caracteriza por estar presente en suelos en diversos ambientes (El-Gamal *et al.* 2008; Rindi *et al.* 2009). No obstante, la presencia de microalgas y cianobacterias está relacionada con las condiciones de cultivo, la exposición a la luz y a los diferentes medios de cultivos suministrados, lo que significa que la diversidad de las mismas, incluso en muestras de suelos,

está influenciada por estos factores. En un estudio realizado para identificar las poblaciones de microorganismos fotosintéticos en rizosfera de *Vigna unguiculata*, se observó *Anabaena*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Spirulina*, *Nodularia* y diatomeas (Acosta *et al.* 1996). Es decir, la presencia de microalgas y de cianobacterias puede ser siempre detectada a menos que sea aplicada iluminación y medios de cultivos inorgánicos para estimular el crecimiento de los mismos, habida cuenta que se tiene descrito un valor estimado de estos consorcios en suelos a una profundidad entre 3-8 cm y a una proporción de 25 nmoles/g de suelo (Carrillo 2003). En cambio, la adición de nutrientes orgánicos a muestras de suelos no expuestas a iluminación, solo estimula más el crecimiento de los diferentes morfotipos de levaduras, bacterias y mohos (Benitez *et al.* 2007; Pedraza *et al.* 2010).

Entre otras evidencias que demuestran que la microalga corresponde a *Chlorococcum* sp. se encontraron las características morfológicas de las colonias en medio sólido. Así, se observaron colonias de color verde oliva semiesféricas, y en varios estadios, los cuales han sido reportados por Blackwell *et al.* (1991), Klochkova *et al.* (2006), Silva *et al.* (2008) y Bhagavathy & Sumathi (2010). Por otra parte, los cambios de pigmentación en las colonias en medios sólidos a partir de cuatro semanas desde color verde característico a rojizo, también confirman la producción de carotenoides (Goodwin 1980; Backwell *et al.* 1991; Zhang & Phang 1997). Igualmente, los rangos de diámetro de las células de *Chlorococcum* sp. entre 10,01-17,19 μm encontrados en este trabajo están incluidos entre los señalados por Klochkova *et al.* (2006) y por Silva *et al.* (2008), quienes reportaron medidas entre 4,5-17 μm y 7,8-15,2 μm , respectivamente, lo cual también confirma la identificación del género *Chlorococcum*.

Cuando *Chlorococcum* sp. se hizo crecer en cultivos discontinuos mostró la respuesta de todo microorganismo en presencia de nutrientes hasta fase estacionaria. Esto significa que el medio BBM utilizado favorece la producción celular, a pesar de ser considerado limitante en cuanto al contenido de nitrógeno (0,7 mM) y a la relación N:P de 0,61:1 (Kumar 2010). Sin embargo, contiene los requerimientos mínimos necesarios para el crecimiento de las microalgas tales como nitrógeno, fósforo, potasio, magnesio, calcio, azufre, hierro y manganeso, entre otros elementos (Sharma *et al.* 2011). Al respecto, en otra cepa de *Chlorococcum* sp. aislada a partir de una laguna de agua dulce, se encontró que tanto el medio BBM como el BG11 estimularon el crecimiento de esta microalga al comparar los medios de cultivos: BG11, BBM, CHU#10, HS-CHU#10 y ALLEN (Kirrolia *et al.* 2012).

Los valores de clorofila a obtenidos durante el crecimiento de la microalga son comparativos a los descritos por Kirrolia *et al.* (2012), quienes reportaron valores de 13,4 y 13,87 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, en presencia de BG11 y BBM, respectivamente. Esto permite sugerir que la cepa de *Chlorococcum* sp. expresa un contenido de clorofila similar a otras cepas evaluadas para esta clorófito con otros medios de cultivos.

En lo que respecta al contenido de carotenoides, se reflejó una acumulación a medida que las células dejaban de reproducirse por limitación de nutrientes, como es típico de la fase estacionaria y la de decrecimiento celular. Esto significa

que también esta cepa de *Chlorococcum* sp. es capaz de inducir carotenogénesis bajo una deficiencia en nutrientes, lo cual se hace más evidente en los cultivos con mucho tiempo de exposición o al final de un cultivo discontinuo. Esto coincide con lo reportado por varios autores (Ben-Amotz & Avron 1983; Ben-Amotz *et al.* 1989; Del Campo *et al.* 2000), quienes demostraron un efecto estimulante de la carencia de nitrógeno, fósforo y azufre sobre la acumulación de carotenoides en las microalgas *Dunaliella* sp. y *Haematococcus* sp.

La pigmentación color naranja de los cultivos al final de la fase estacionaria pudo evidenciar la acumulación de carotenoides y, en consecuencia, estos resultados permitieron evaluar el efecto de la salinidad, temperatura e intensidad luminosa como posibles factores carotenogénicos. Asimismo, en el tratamiento con diferentes concentraciones de cloruro de sodio (0,5, 1,5 y 3%) + luz ($115,2 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) se demostró un incremento de las células naranjas, como evidencia de la producción de carotenoides. Resultados análogos también son descritos por Cifuentes *et al.* (2003), quienes trabajaron con la optimización de biomasa y producción de carotenoides en *Haematococcus pluvialis*. Así mismo, Harker *et al.* (1996), en su trabajo sobre la eficiencia de la producción de carotenoides en *H. pluvialis*, obtuvo una inducción de la carotenogénesis con la adición de porcentajes bajos de NaCl (0,14-0,17%), pero con altas intensidades luminosas. Trabajos realizados con *Chlorococcum* sp. cultivada con deficiencia de nitrógeno, salinidad y elevada intensidad luminosa reportaron una reducción de su crecimiento y tasa fotosintética con la consiguiente acumulación de carotenoides (Masojídek *et al.* 2000).

En el presente trabajo, al igual que lo encontrado por estos autores, la producción de células naranjas con NaCl (0,5%) mejoró con la combinación de factores como la luz y la temperatura, así como la deficiencia de nutrientes. Sin embargo, para este caso más que la luz, lo que principalmente influyó fue la temperatura ($30 \pm 2^\circ\text{C}$), puesto que los dos ensayos se encontraban a la misma intensidad luminosa de $115,2 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Zhang & Phang (1997) también investigaron sobre la composición y acumulación de carotenoides secundarios en *Chlorococcum* sp. a temperaturas de 30 y 35°C , lo que les permitió demostrar una mayor acumulación de astaxantina de 1,10 y de $1,24 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, respectivamente, con relación a los cultivos expuestos a 25°C con una producción de $0,64 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$. Cuando se realizó una comparación entre los tres tratamientos, se determinó que la producción de células naranjas estuvo en el siguiente orden: (NaCl + L + T) > (L + T) > (NaCl + L), con $3,4$, $2,77$ y $2,55 \times 10^6 \text{ cel}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectivamente, lo que sugiere una vez más que la temperatura puede marcar la diferencia en la producción de carotenoides.

Otro aspecto muy importante es el reportado por Sarada *et al.* (2002), quienes encontraron que la edad del cultivo es crucial para la producción de astaxantina inducido por estrés salino en *Haematococcus pluvialis*, puesto que cultivos jóvenes de 4 a 8 días fueron muy sensibles a la adición de NaCl, mientras que cultivos envejecidos entre 12 y 16 días fueron más resistentes y acumularon mayor cantidad de astaxantina con la adición de cloruro de sodio y acetato de sodio en el transcurso de 20 días. En esta investigación, se utilizó un cultivo de 30 días y

luego se esperó un tiempo de 30 días para que los resultados se hicieran visibles, lo que puede ser justificado con lo antes mencionado.

Estos resultados evidencian que la microalga *Chlorococcum* sp. aislada a partir de rizosfera de haba (*Vicia faba*) muestra un crecimiento significativo en presencia del medio BBM en cultivos discontinuos, y es capaz de acumular carotenoides conforme alcanzan la fase estacionaria y en cultivos envejecidos. Además, se logra un incremento de células carotenogénicas con el efecto combinado de la salinidad, temperatura e iluminación.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo científico ha sido financiado por el Proyecto Prometeo de la Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (Ecuador) y ha contado con la infraestructura de la Unidad de Biología del Centro de Ciencias de la Universidad Central del Ecuador.

BIBLIOGRAFÍA

- Abd El-Baky, A. & G. El-Baroty. 2013. Healthy benefit of microalgal bioactive substances. *J. Aquatic Sci.* 1(1): 11-23.
- Acosta, K., S. Silva, D. Esparza & R. Santo. 1996. Evaluación cualitativa y cuantitativa de microalgas en la rizosfera del cultivo de frijol. *Revista Fac. Agron. Univ. Zulia.* 13: 13-24.
- Ben-Amotz, A. & M. Avron. 1983. On those factors which determine the massive β -carotene accumulation in the halotolerant alga *Dunaliella bardawill*. *Pl. Physiol.* 72: 593-597.
- Ben-Amotz, A., A. Shaish & M. Avron. 1989. Mode of action of the massively accumulated β -carotene of *Dunaliella bardawill* in protecting the alga against damage by excess irradiation. *Pl. Physiol.* 91: 1040-1043.
- Benítez, S., J. Bentley, P. Bustamante, L. Sánchez & L. Corrales. 2007. Aislamiento de los microorganismos cultivables de la rizosfera de *Ornithogalum umbellatum* y evaluación del posible efecto biocontrolador en dos patógenos del suelo. *Nova* 5(8): 101-212.
- Bhagavathy, S. & P. Sumathi. 2010. Protective role of β -carotene from *Chlorococcum humicola* against reactive oxygen species and lipid peroxidation in B(A)P induced toxicity. *J. Pharmacology Research* 1: 21-35.
- Bischoff, H. & H. Bold. 1963. Phycological studies. IV. Some soil algae from enchanted rock and related algal species. *Univ. Texas Publ.* 6318: 1-95.
- Blackweell, J., E. Cox & J. Gilmour. 1991. The morphology and taxonomy of *Chlorococcum submarinum* (Chlorococcales) isolated from a tidal rockpool. *Brit. Phycol. J.* 26(2): 133-139.
- Borowitzka, M.A. 2005. Culturing microalgae in outdoor ponds. In: Andersen, R.A. (ed.). *Algal culturing techniques*, pp. 205-218. Elsevier, Burlington.

- Carrillo, L. 2003. *Microbiología Agrícola*. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Salta. Argentina.
- Cifuentes, A., M. González, S. Vargas, M. Hoeneisen & N. González. 2003. Optimization of biomass, total carotenoids and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* Flotow strain Steptoe (Nevada, USA) under laboratory conditions. *Biol. Res.* 36: 343-357.
- Del Campo, J., J. Moreno, H. Rodríguez, M. Vargas, J. Rivas & M. Guerrero. 2000. Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis* sp. (Chlorophyta). *J. Biotechnol.* 76(1): 51-9.
- El-Gamal, A.D., N.A. Ghanem, E.Y. El-Ayouty & E.F. Shehata. 2008. Studies on soil algal flora in Kafr El-Sheikh Governorate, Egypt. *Egyptian J. Phycol.* 9: 1-23.
- Fábregas, J., J. Abalde, C. Herrero, B. Cabezas & M. Veiga. 1984. Growth of marine microalgae *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentration. *Aquaculture* 42: 207-215.
- Ferrera R. & A. Alarcón. 2001. La microbiología del suelo en la agricultura sostenible. *Ciencia Ergo Sum.* 8(2): 175-183.
- Goodwin, T. 1980. *The Biochemistry of the Carotenoids*. Chapman and Hall, London.
- Guiry, M. & G. Guiry. 2007. "Genus: *Chlorococcum* taxonomy browser" Algae Base version 4.2 World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway.
- Harker, M., A. Tsavalos & A. Young. 1996. Factors responsible for astaxanthin formation in the chlorophyte *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technol.* 55: 207-214.
- Kirrolia, A., N. Bishnoi & R. Singh. 2012. Effect of shaking, incubation temperature, salinity and media composition on growth traits of green microalgae *Chlorococcum* sp. *J. Algal Biomass Utiln.* 3(3): 46-53.
- Klochkova, T., H. Kang, G. Cho, C. Poeschel, J. West & H. Kim. 2006. Biology of a terrestrial green alga *Chlorococcum* sp. (Chlorococcales, Chlorophyta), collected from the Miruksazi stupa in Korea. *Phycology* 45(3): 349-358.
- Kumar, N. 2010. Nutrient removal, growth response and lipid enrichment by a phytoplankton community. *Biomass Algal.* 1(3): 1-28.
- Lee, R. 1999. *Phycology*. Third edition. Cambridge University Press. Cambridge.
- Liu, B. & K. Lee. 2000. Secondary carotenoids formation by green *Chlorococcum* sp. *J. Appl. Phycol.* 12: 301-307.
- Marchand, L. 1895. Synopsis et tableau synoptique des familles qui composent la clases des phycophytes (algues, diatomées et baktérieus). In: *Sous-regne des Cryptogames*, pp. 20. 2e Embranchements, Paris Soc. d'état Sci.
- Martínez, A. 2010. Evaluación del crecimiento celular y de los pigmentos obtenidos de la microalga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyta: Volvocales) cultivada en diferentes medios. Trabajo Especial de Grado. Insti-

- tuto Politécnico Nacional. Distrito Federal, México.
- Masojídek, J., J. Torzillo, M. Kopecky & L. Nidiaci. 2000. Changes in chlorophyll fluorescence quenching and pigment composition in the green alga *Chlorococcum* sp. grown under nitrogen deficiency and salinity stress. *J. Appl. Phycol.* 12: 417-426.
- Meneghini, G. 1842. Monographia Nostochinearum italicarum addito specimen de Rivulariis. *Mem. Reale Accad. Sci. Torino*, ser. 25(Cl. Sc. Fis. e Mat): 1-143, pls I-XVII.
- Noguerol, A., C. Hernández & J. Seoane. 1979. Problemas taxonómicos en las algas de suelo. *Acta Bot. Malac.* 5: 21-28.
- Pedraza, R., K. Teixeira, A. Fernández, I. García, B. Baca, R. Azcón, V. Baldani & R. Bonilla. 2010. Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. *Revista Corpoica* 11(2): 155-164.
- Ramasamy, S., E. Sanniyasi & S. Sundaram. 2012. Fatty acids methyl ester analysis of potent micro algae *Scenedesmus dimorphus* (Turpin) Kützing and *Chlorococcum infusarium* (Schrank) Meneghini isolated from effluents of Neyveli thermal power station expansion. *J. Algal Biomass Utln.* 3(3): 12-20.
- Rindi, F., H. Allali, D. Lam & J. López. 2009. An overview of the biodiversity and biogeography of terrestrial green algae. In: Rescigno, V. (ed.). *Biodiversity Hotspots*, pp. 1-25. Nova Science Publishers, Inc. New York.
- Salaru, V., A. Trofim, C. Melniciuc & N. Dontu. 2008. Taxonomic and ecologic structure of communities of edaphic algae from the agrophytocenoses of the northern districts of Moldova. *J. Pl. Develop.* 15: 3-6.
- Sarada, R., U. Tripathi & G. Ravishankar. 2002. Influence of stress on astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* grown under different culture conditions. *Process Biochem.* 37: 623-627.
- Satpati, G., N. Barman, T. Chakraborty & R. Pal. 2011. Unusual habitat of algae. *J. Algal Biomass Utln.* 2(4): 50-52.
- Sharma, R., P. Gajendra & V. Sharma. 2011. Comparison of different media formulations on growth, morphology and chlorophyll content of green alga, *Chlorella vulgaris*. *Int. J. Pharm. Bio. Sci.* 2(2): 509-516.
- Shilpark, S., D. Harish & S. Sundaramoorthy. 2010. Growth pattern of some desert algal isolates and selection of media. *J. Adv. Dev. Res.* 1(1): 29-31.
- Shoen, S. 1988. Cell counting. In: Lobban, C., D. Chapman & B. Kremer (eds.). *Experimental Phycology: A Laboratory Manual*, pp. 16-22. Cambridge University Press. Cambridge.
- Silva, A., C. Sili & G. Torzillo. 2008. Cyanoprocaryota y microalgas (Chlorophyceae y Bacillariophyceae) bentónicas dominantes en ríos de Costa Rica. *Revista Biol. Trop.* 56(4): 221-235.
- Vila, M. 2009. Inhibición de la enzima fitoeno desaturasa y acumulación de fitoeno en microalgas: el iRNA como mecanismo de silenciamiento génico. Trabajo Especial de Grado. Universidad de Huelva. España.

- Wellburn, A. 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Pl. Physiol.* 144(3): 307-313.
- Zhang, D. & S. Phang. 1997. Composition and accumulation of secondary carotenoids in *Chlorococcum* sp. *J. Appl. Phycol.* 9: 147-155.