

Efecto del campo magnético sobre el potencial bioenergético de *Chlorella vulgaris* y *Dunaliella viridis*

Effect of magnetic field on bioenergetic potential of *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella viridis*

Liliana Gomez-Luna^{1*}, <http://orcid.org/0000-0002-1282-3392>

Ramón Arias-Gilart¹, <http://orcid.org/0000-0003-2050-9712>

Yadenis Ortega-Díaz¹, <http://orcid.org/0000-0001-9674-9785>

Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba

*Autor para la correspondencia: lilianag@uo.edu.cu

Recibido: 11 de julio de 2023

Aprobado: 3 de noviembre de 2023

RESUMEN

Entre las microalgas de mayor importancia por su valor económico y nutricional, destaca *Chlorella vulgaris* Beijerinck, por su amplio espectro de aplicaciones, su calidad proteica y la versatilidad de sus cultivos. Sin embargo, la especie halófila *Dunaliella viridis*, presenta limitadas aplicaciones biotecnológicas, si bien ambas constituyen sistemas biológicos con una alta eficiencia fotosintética y fácil adaptación. En este trabajo se evalúa el efecto de un campo magnético estático no homogéneo de 30 mT aplicado en dosis a repetición, sobre el crecimiento, y potencial bioenergético de células en cultivos unialgales discontinuos asincrónicos de ambas especies en condiciones de fotoautotrofia, con un régimen de luz continua a una densidad de flujo fotónico de $75 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Se demuestra que el campo magnético estimula el crecimiento en *C. vulgaris*. En *D. viridis* induce un proceso de senescencia temprana, limita el crecimiento celular, estimula la síntesis lipídica y la producción celular de hidrógeno.

Palabras clave: *Chlorella vulgaris*; Chlorophyceae; campo magnético; *Dunaliella salina*; microalgas.

ABSTRACT

Among the most economic and nutritional valuable microalgae, *Chlorella vulgaris* Beijerinck stand out, due to its wide spectrum of applications, its protein quality and culture versatility. Nevertheless, the halophilic microalga *Dunaliella viridis*, has limited applications, even when both are biological systems with high photosynthetic efficiency and easy adaptation. This work evaluates the effect of a non-homogeneous static magnetic field (SMF) of 30 mT (applied in repeated doses) on the growth, and bioenergetic potential of cells of both species established in unialgal non synchronic batch cultures, in photoautotrophic conditions, with continuous light and a Photosynthetic photon flux of $75 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$. It was demonstrated that the static magnetic field stimulates the growth of *C. vulgaris*. In *D. viridis* it induces a senescent process, limiting the cell growth, and stimulating the lipid synthesis and cellular hydrogen production.

Keywords: *Chlorella vulgaris*; Chlorophyceae; *Dunaliella viridis*; magnetic field, microalgae.

Introducción

El fomento de nuevas aplicaciones y el uso convencional de aplicaciones existentes confiere una gran importancia al cultivo de microalgas. Sin embargo, para su cultivo a escala comercial aún se requiere un consumo elevado de energía, CO_2 y nutrientes inorgánicos, dependiendo de los metabolitos a producir. En general estos son microorganismos muy versátiles, y de gran utilidad para la producción de varios compuestos de interés comercial, ya que no tienen que competir con tierras de cultivo y pueden hacer uso de residuos orgánicos e inorgánicos como fuente de nutrientes; además de sus aplicaciones en la remoción de contaminantes.^(1,2)

En las últimas décadas ha aumentado el interés del cultivo de microalgas destinado a la producción de biocombustibles y sustancias de origen lipídico como el omega 3, así como algunos pigmentos y vitaminas.^(1,2,3,4) La variación de las condiciones de cultivo, tales como pH, intensidad luminosa, el tipo y concentración de nutrientes, temperatura, fotoperíodo, régimen de cosecha de cultivos discontinuos, continuos o semicontinuos, entre otros, ha contribuido a establecer sistemas dirigidos hacia la obtención de biomasa microalgal como fuente para la obtención de valiosos productos para diferentes industrias.^(1,2,3,4, 5)

Actualmente se dedican esfuerzos para a abaratar la productividad de los cultivos, desde el establecimiento de inóculos, de cuya calidad depende la del cultivo final, hasta la obtención de metabolitos de interés, existiendo especificidades en el manejo de los cultivos y algunas tecnologías alternativas, como el uso del campo magnético. Son numerosas las experiencias con campos magnéticos y electromagnéticos en microalgas, con el propósito de lograr algún efecto

biológico que pueda traducirse en mejoras del manejo de cultivo a escala comercial (tabla 1), convirtiéndose en tema tendencia de las investigaciones en la actualidad.⁽¹⁾

Los efectos del campo magnético sobre sistemas biológicos pueden clasificarse en no observables, inhibitorios o estimulantes, dependiendo de variables como: la densidad del campo magnético (B), la frecuencia de la corriente eléctrica que lo indujo, en caso de campos electromagnéticos; el tipo de onda, el tiempo y el momento de exposición. En general, varios trabajos explican los beneficios del campo magnético estático (CME) sobre la productividad de metabolitos secundarios, crecimiento y estado de los cultivos de especies de varias especies de microalgas entre las que destacan las de los géneros *Chlorella* y *Dunaliella*.⁽¹⁾ Sin embargo, de todas las especies ha sido *Chlorella vulgaris* el modelo biológico más estudiado, reportándose en ella efectos positivos sobre parámetros de crecimiento, la actividad de ciertas enzimas, aumento de la peroxidación lipídica, de la concentración pigmentaria, entre otras.^(1,2,3,4,5,6) *D. viridis* ha destacado en los últimos años por su potencial bioenergético, si bien sus aplicaciones han sido más limitadas.⁽⁴⁾

Tabla 1. Resumen del efecto biológico asociado a la exposición de cultivos de *C. vulgaris* y *D. viridis* al campo magnético (CM): condiciones experimentales, intensidad de CM y resultados experimentales claves.

MICROALGA	ESQUEMA DE APLICACIÓN Y CONDICIONES EXPERIMENTALES	INTENSIDAD DEL CM	EFEECTO BIOLÓGICO
<i>Chlorella vulgaris</i> ⁽⁷⁾	CME 10–50 mT, 12 h. 10–35 mT, 12 h	10-35 mT	<ul style="list-style-type: none"> – Estimula el crecimiento y la defensa antioxidante. – Aumentan las tasas de crecimiento y velocidad de crecimiento específica (10-35 mT) – Eleva actividad superóxido dismutasa y peroxidasa (10-35 mT), catalasa (45-50 mT) – Aumento de la peroxidación lipídica.
<i>C. vulgaris</i> ⁽⁸⁾	CME Ci= 3 x 10 ⁵ cél.mL ⁻¹ Ciclo nictimeral 120 μmol photons m ⁻² s ⁻¹ Medio: BG-11 2 h diarias por 16 días. Temperatura: 28 ± 1 °C.	800 G	<ul style="list-style-type: none"> – Aumento de la velocidad de crecimiento, la actividad enzimática; estimula la proliferación celular y la formación de biomasa – Afecta el crecimiento y la respuesta antioxidante
<i>C. vulgaris</i> ⁽⁹⁾	1h y permanente al 7 ^{mo} día Ci= 850 x 10 ⁴ cél.mL ⁻¹ luz continua (110,35 μEm ⁻² s ⁻²) Medio: Controles con Bristol y con residual de soja	30 mT	<ul style="list-style-type: none"> – Incremento de la densidad celular. – Aumento de la concentración de pigmentos.
<i>C. vulgaris</i> ⁽¹⁰⁾	Gradiente de CM (0,12T, 0,18T, 0,24T, 0,30T, 0,36T,	240-300 mT	<ul style="list-style-type: none"> – A 0,24T hay producción de proteínas y oxígeno

	0,42T and 0,48T 15, 30, 45 y 60 min.		– Tendencia al incremento de la concentración de proteínas de 0 a 0,18T. Máxima concentración proteica de 0,24 a 0,30T.
<i>C. vulgaris</i> ⁽¹¹⁾	A. 1 hora, dosis a repetición cada 24h durante 3 días consecutivos, a partir del 2do día de cultivo. B. 1 hora de exposición con dosis a repetición cada 24h durante 3 días consecutivos, a partir del 7mo día. 3000 lx, 22 ±2,3 °C, luz continua Daylight pH 7, aireación 0,45 L.min ⁻¹ .	47,23 mT	– Incremento de concentración celular en protocolo B, de las concentraciones de clorofila y carotenos. Estimula la síntesis de clorofila.
<i>D. viridis</i> ⁽¹²⁾	Campo magnético 24, 72 h; 7 a 8 días	60 mT	– Disminución de la infestación del título infeccioso del virus de las algas en el Mar Negro en 1 a 2 órdenes (10 a 100 veces) después de una carga magnética.

Se ha trabajado fundamentalmente en el rango entre los 10 y 300 mT, aplicando el CME desde 1 min hasta 11 h, o de forma permanente, con efectos positivos sobre el crecimiento celular y la biosíntesis de biomoléculas; razón por la que ha aumentado el interés por la estimulación bioelectromagnética de cultivos para aplicaciones biotecnológicas y bioenergéticas.⁽¹³⁾ Se han usado no solo campos estáticos, sino campos electromagnéticos de baja frecuencia, con respuestas típicas para cada especie, en dependencia del esquema de aplicación utilizado. Esta investigación se enfocó en la evaluación del efecto de un CME no homogéneo de 30 mT sobre el crecimiento, la concentración de clorofila y el potencial energético de dos cepas de microalgas clorofíceas: *Dunaliella viridis* y *Chlorella vulgaris*.

Materiales y métodos

Microalgas

Se utilizan las microalgas clorofíceas *Chlorella vulgaris* (código F010102-A) y *Dunaliella viridis* (código M020412-A) (Figura 1), ambas aisladas del medio natural, mantenidas en el cepario del Laboratorio de Ecotoxicología del Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado (CNEA), conservándose en condiciones adecuadas, cultivadas en medio Bristol (*C. vulgaris*), y en el medio sugerido por Ben-Amotz y Avron, modificado ⁽⁵⁾ con 8,7 % de salinidad para *D. viridis*. *C. vulgaris* fue aislada a partir de muestras de agua colectadas en un estanque destinado al cultivo de ciprínidos en la estación de alevinaje de Maffo, Contramaestre, Santiago de Cuba y *D. viridis* fue obtenida a partir de muestras de aguas hipersalinas de la costa sudeste de la isla de Cuba, específicamente en la salina de Joa, provincia de Guantánamo.

Chlorella vulgaris es un alga verde unicelular de agua dulce; las células se presentan aisladas, aunque eventualmente pueden formar agregados; tiene forma esférica y un tamaño que oscila entre 2 y 6 μm . La especie local en cuestión mide 2,5 μm . Cada célula posee un pirenoide y un cloroplasto parietal único en forma de copa con abertura irregular, que ocupa gran parte del volumen celular. Se reproduce solamente por autósporas. Presentan una pared celular celulósica rígida que dificulta su digestibilidad por animales monogástricos; esta es fina, lisa y está compuesta fundamentalmente por esporopolenina, politerpeno resistente a la degradación. ⁽⁵⁾

D. viridis es un alga verde unicelular, biflagelada, isokonta. Las células, siempre verdes, tienen en condiciones normales forma ovoide, más anchas en la región media (5-7,5 μm), aunque pueden variar con las condiciones de cultivo presentándose más cilíndricas y/o alargadas. El tamaño promedio de las células es 13,5 x 5 μm , siendo visible el pirenoide.

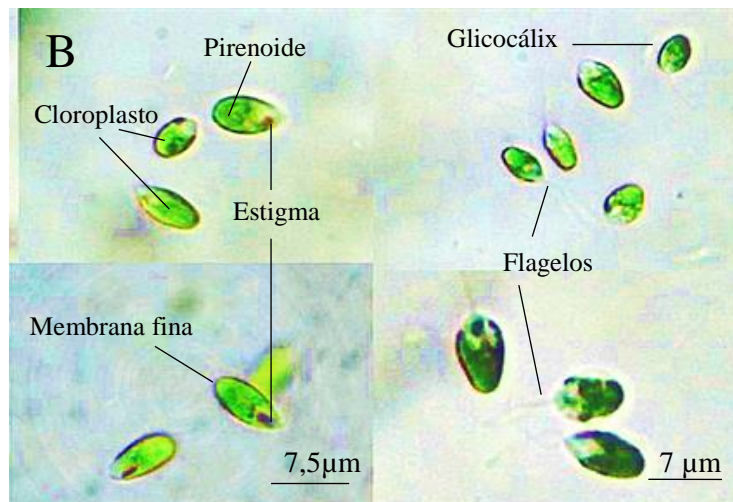
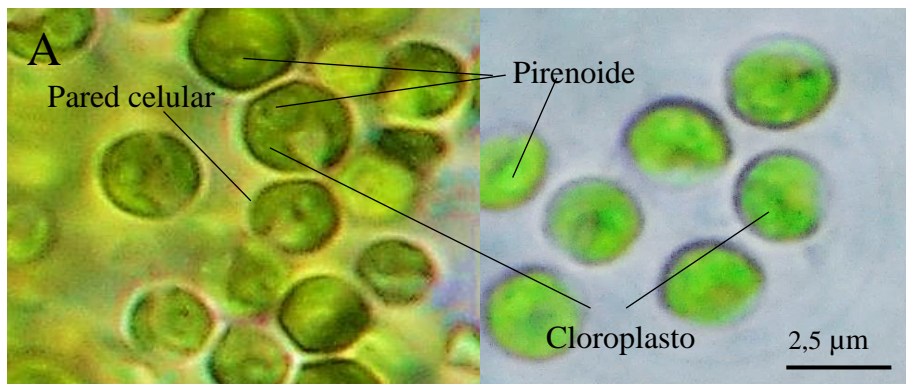


Fig.1- Vistas al microscopio óptico de *C. vulgaris* (A) y *D. viridis* (B). Cepario del Laboratorio de Ecotoxicología del Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado (CNEA). Microscopio óptico MOTIC: 10x40

Condiciones de cultivo

Los experimentos fueron desarrollados en una cámara de cultivo con valores estables de temperatura ($20 \pm 2,3$ °C) y humedad relativa ($62,5 \pm 3,1$ %) en biorreactor de borosilicato con tapa de rosca, adaptado para establecer cultivos aireados. La temperatura fue medida con un termómetro electrónico profesional Quartz de Oregon Scientific. Para mantener iluminados los cultivos en régimen de luz continua, se utilizaron cuatro lámparas fluorescentes Daylight TL-D 36W/ 54-765 de la marca comercial PHILIPS a $75 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Todos los cultivos se realizaron por triplicado, considerando 3 réplicas para cada experimento. En la tabla 2 se presentan características experimentales específicas para cada cepa. La interferencia electromagnética de campos de baja frecuencia (hasta 300 Hz) fue determinada previo establecimiento de los cultivos, ubicando estos donde la exposición fue menor que $0,25 \mu\text{T}^{(14)}$, para eliminar interferencias en la instalación experimental al aplicar el campo magnético. Se establecen cultivos unialgales discontinuos asincrónicos (discontinuo) de ambas cepas en condiciones de fotoautotrofia con aireación, sin suministro extra de CO_2 y con un régimen de luz continua a una densidad de flujo fotónico (DFF) de $75 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Tabla 2. Condiciones experimentales específicas para cada microalga.

Microalgas	Flujo de aireación $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$	pH	Medio	Ci $\times 10^4 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$
<i>C. vulgaris</i>	0,45	7	Bristol	100
<i>D. viridis</i>	0,25	8	BAM	65

Ci: Concentración inicial de células

Esta intensidad fue ajustada diariamente en todos los experimentos, utilizando una estación meteorológica de bolsillo TP LM 8000 4 en 1, con sensor instalado permanentemente con un fotodiodo integrado exclusivo y sensor de luz con filtro para la corrección del color en el rango de la radiación fotosintéticamente activa (PAR), fotónico (0-20 000 lx, E: ± 8).

Los cultivos se mantuvieron aireados con un flujo de aireación constante, mediante burbujeo de aire filtrado con pre-filtros de jeringa de microfibra de vidrio MIDISART 2000 de $0,20 \mu\text{m}$. Estas condiciones permitieron un crecimiento uniforme, ya que los cultivos reciben una cantidad

mínima de CO₂, que es la que está presente en el aire (0,03 %), que contribuye con el tamponamiento de estos. ⁽⁵⁾

Protocolo de aplicación del CME

Se desarrollan experimentos en biorreactores de borosilicato con un volumen de 1L. Se valida una estrategia combinada de cultivo en la cual se mantienen condiciones de aireación hasta el 5^{to} día, momento a partir del cual se desarrollan cultivos estáticos y se aplica el CME a repetición durante 3 días consecutivos (dosis a repetición los días 5, 6 y 7 durante 1h). Se incluye un cultivo control, y uno con CME y cisteína (1gL⁻¹), utilizada para validar el efecto del CME y explicar posibles mecanismos de acción de este agente físico. La hipótesis que se presenta es que el CME no homogéneo mantiene su efecto sobre las células en cultivo o es anulado por la cisteína, la que funciona como agente reductor, secuestrando el O₂ que se produce durante la fotosíntesis. Una vez que se añade la cisteína, se sella el biorreactor con y tapa de rosca y para film hasta el final del experimento.

Los cultivos se exponen a un CME no homogéneo (1,8-68,2 mT) a partir de un arreglo de imanes de ferrita, con un valor medio de intensidad de campo en la zona de trabajo de 30 mT. El dispositivo magnético fue caracterizado utilizando un Gaussímetro LakeShore 410-HCAT (42302), provisto del Sensor MST-410 (HA2580), calibrado contra la referencia del Patrón Nacional de Inducción Magnética del Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado (CNEA), Santiago de Cuba. La intensidad del campo y la selección de los protocolos se basaron en recomendaciones realizadas en trabajos previos (tabla 1). Los nuevos esquemas permitirán perfilar la tecnología para aplicación del CME.

Determinación de parámetros de crecimiento

Se realizó un recuento directo de una alícuota del cultivo, utilizando para ello una cámara de recuento hematológico Neubauer mejorada, realizando para cada cultivo tres recuentos. ^(1,2,3,4) Para ello se utilizó un microscopio óptico MOTIC Professional (Series B, China), expresándose los resultados en cél.mL⁻¹. Para la realización de los recuentos se realizaron diluciones en agua destilada, de forma tal que el número de células por campo de recuento en 1 mm² estuviera entre 10 y 100. Se utiliza una magnificación de 10x40.

A partir de los datos diarios de densidad celular obtenidos se calcularon las tasas máximas de crecimiento (k ; doblajes celulares o divisiones por día) ($k_{máx}$), mediante la expresión de la ecuación 1:

$$k = \frac{\log_2 N_t - \log_2 N_o}{T_t - T_o} \quad (1)$$

donde:

N_t y N_o son las densidades celulares (cél.mL⁻¹) a los tiempos T_t y T_o .⁽¹⁾

Determinación de la concentración de lípidos

La extracción de lípidos se realizó a partir de una muestra integrada de los pellets previa obtención de clorofilas; se incluyen tres réplicas para cada cultivo. Para obtener los pellets se centrifugan 25 mL del cultivo y se sigue el protocolo de extracción de clorofilas. Al pellet, previamente pesado, se le agregan 4 mL de metanol (IMEFA®, calidad reactivo) y se homogeniza con un vortex durante 10 s. A esa suspensión se le añaden 2 mL de cloroformo (UNI CHEM®, calidad reactivo) y 0,4 mL de agua destilada Milli Q, mezclando nuevamente en vortex durante 30 s. Se sonica posteriormente dicha suspensión para lograr la ruptura celular completa durante 1 min (Sonicador SONICS Vibracell VCX 130, EUA) con una sonda de punta de 3 mm de diámetro, utilizando pulsos de 50 y 10 (amplitud 40 %). Se añaden posteriormente 2 mL de cloroformo y 1,6 mL de agua, volviendo a mezclar en el vortex durante 30 s.

La muestra se mantiene a temperatura ambiente durante 20 min, protegida de la luz. Transcurrido este tiempo se centrifuga a 2000 rpm (800 g) 4°C durante 15 min. Procedimiento que facilita retirar la capa acuosa (superior), lo que se realiza con ayuda de una pipeta Pasteur, manteniéndola en el borde superior de la misma, para evitar contaminarla con la fase apolar. La capa de disolvente apolar (inferior) se transfiere a un tubo transparente limpio, y el pellet restante se somete a una segunda extracción con 4 mL de la mezcla de solventes (metanol: cloroformo, 1: 1, v:v), durante 1 hora a temperatura ambiente, mezclando en vortex durante 30 s.^(1,2,3,4,5) Posteriormente se centrifuga a 2000 rpm (800 g) 4°C durante 10 min y la capa obtenida, una vez retirada la acuosa, se combina con la resultante de la extracción anterior.

La extracción realizada de forma sucesiva en fase apolar permite tener un volumen suficiente; este extracto se homogeniza en un vortex por 5 segundos y luego se centrifugan a 2000 rpm

(800 g) 4°C durante 5 min., añadiendo luego en la superficie 0,5 mL de acetona, para eliminar restos de agua. Posteriormente se evapora el solvente por rotaevaporación en un rotaevaporador HEIDOLPH (Alemania) con calentamiento Hel-VAP (EUA) a 40°C a vacío. A partir de este momento se realiza la determinación gravimétrica del contenido de lípidos. El porcentaje resultante de lípidos extraídos es la suma de las extracciones en serie realizadas.

Determinación de la concentración de biohidrógeno

La concentración de H₂ se determinó en todos los experimentos con un analizador de gases TESTO 350 (Alemania) con un 0,1 % de error. Los resultados se expresan en pg de H₂ por célula.

Análisis estadísticos

Se utilizó el estadígrafo *t* para comparar las curvas de crecimiento, teniendo en cuenta las diferentes fases o estadios del cultivo. Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple, de dos factores con una sola muestra por grupo, para una $p < 0,05$ con el objetivo de comparar diferentes medias. Se realizaron análisis de correlación (Kendall) para evaluar la relación de la viabilidad con la concentración celular ($p < 0,05$), utilizando las bondades del SPSS 12.0, el Basic Statistics, el Microsoft Office Excel 2008 y el Origin 8.0 Pro, tanto para los análisis estadísticos como para la elaboración de gráficos y los análisis de cómputo básicos.

Resultados y discusión

La cinética de los cultivos de ambas especies se presenta en la figura 2. Las ecuaciones que modelan el crecimiento (ecuaciones 2 a la 7) permiten visualizar las diferencias entre estas. En todos los casos se realizan ajustes a ecuaciones polinómicas.

$$y = -0,200x^3 + 5,944x^2 + 15,03x + 97,33; R^2 = 0,99; C. vulgaris, Control \quad (2)$$

$$y = 0,080x^3 - 4,480x^2 + 84,00x + 4,174; R^2 = 0,97; C. vulgaris, CME \quad (3)$$

$$y = 0,145x^3 - 6,438x^2 + 84,53x + 13,82; R^2 = 0,92; C. vulgaris, CME con cisteína \quad (4)$$

$$y = -0,0053x^5 + 0,3973x^4 - 10,555x^3 + 112,68x^2 - 320,84x + 298,25; R^2 = 0,99; D. viridis, Control \quad (5)$$

$$y = 0,0361x^4 - 2,2317x^3 + 38,943x^2 - 78,917x; R^2 = 0,983; D. viridis, CME \quad (6)$$

$$y=-1,9603x^2+71,262x; R^2 = 0,916; D. viridis, CME con cisteína$$

(7)

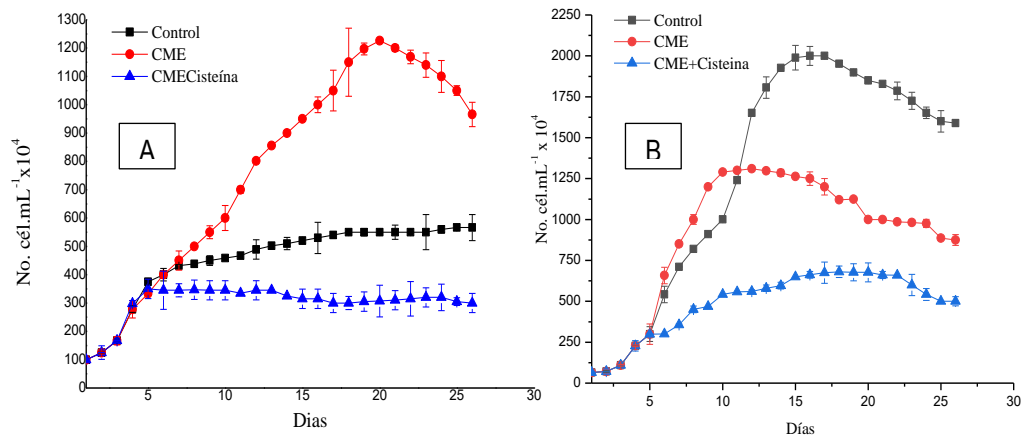


Fig. 2- Comparación de la cinética de los cultivos en *Chlorella vulgaris* (A) y *D. viridis* (B)

El efecto del protocolo aplicado con CME es diferente para cada especie. En los cultivos de *C. vulgaris* la concentración celular máxima de los controles se obtiene el día 25 ($567 \pm 10,00 \times 10^4 \text{ cél.mL}^{-1}$). La exposición al CME no homogéneo permite valores máximos significativamente superiores el día 20 de cultivo ($1226 \pm 0,00 \times 10^4 \text{ cél.mL}^{-1}$), confirmándose un efecto positivo significativo del CME ($p < 0,0,5$), con valores que duplican la concentración celular; resultados similares han sido referidos por otros autores. ^(7,8,9,10) Este efecto se anula en presencia de cisteína. Se explica que la exposición a CME de 10 a 35 mT promueve el crecimiento de *C. vulgaris* y regula su sistema de defensa antioxidante; sin embargo, estas investigaciones no exploran el efecto de dosis a repetición.

Para *D. viridis* se obtiene una cinética que advierte sobre una respuesta más compleja. La concentración celular máxima en los controles se obtiene a los 16 días de cultivo ($2\ 000 \pm 58,00 \times 10^4 \text{ cél.mL}^{-1}$), mientras que con el CME el día 12 ($132 \pm 15,00 \times 10^4 \text{ cél.mL}^{-1}$), valor significativamente menor que el obtenido en los controles ($p < 0, 0,5$).

El campo magnético estático no homogéneo (CME) es aplicado los días 5, 6 y 7 excepto en los cultivos control (n=6).

Las células en cultivo presentan una respuesta compleja que apunta a una perturbación del equilibrio metabólico, en la que pudieran estar involucradas varias macromoléculas, y procesos de transporte a través de las membranas, resultando en una sensibilidad al CME que limita su crecimiento a partir del día 12.

Un análisis más detallado permite observar que hay un crecimiento acelerado hasta el 8^{vo} día, es decir, 72h después de la última exposición al CME. Hasta este momento el crecimiento se ve favorecido, aspecto descrito en la literatura para otros protocolos de aplicación en clorofíceas⁽¹⁴⁾. Este aumento de la concentración celular podría estar vinculado con un aumento de la velocidad de consumo de nutrientes, como respuesta primaria a la perturbación producida por el CME. Luego la velocidad de crecimiento decae, lo que caracteriza a una respuesta al estrés. En presencia de cisteína el crecimiento se ve aún más afectado, sugiriendo la presencia de una doble perturbación, o efecto sinérgico negativo. El análisis de las tasas de crecimiento máximas (tabla 3) permite corroborar que el CME favorece en crecimiento de *C. vulgaris*, pero limita el de *D. viridis*.

Tabla 3. Variación de las tasas de crecimiento máximo en los diferentes experimentos para *C. vulgaris* y *D. viridis*.

Especies	Tasa de crecimiento máxima		
	Control	CME	CME-Cisteína
<i>Chlorella vulgaris</i>	4,07± 0,88 ^a	6,65±0,00 ^b	3,37±1,02 ^c
<i>Dunaliella viridis</i>	4,99±0,22 ^a	2,79±0,19 ^b	2,26±0,17 ^b

Letras diferentes indican diferencias significativas (p<0,05).

En los cultivos con CME y cisteína se obtuvieron valores significativamente más bajos que en los cultivos respectivos con CME y los controles para *C. vulgaris*, lo que indica que se anula el efecto del CME por una afectación del mecanismo involucrado en esta estimulación, lo que se justifica por el efecto de la cisteína, previamente descrito. En el caso de *D. viridis* la exposición al CME afecta significativamente el crecimiento, corroborándose que no existen diferencias significativas respecto a los cultivos con CME y Cisteína, evidencia de que la diana del CME podría ser la membrana celular.

D. viridis es una especie mótil, muy sensible a los cambios de su entorno, lo que pudiera condicionar el efecto negativo del CME no homogéneo de 30 mT respecto al crecimiento.

Estudios previos han demostrado su sensibilidad y los cambios que se producen al variar la salinidad, el pH, el CO₂ y la iluminación, todo lo que afecta su motilidad y, por tanto, su crecimiento ⁽¹¹⁾. Además de la fragilidad de la membrana celular hay que considerar la estructura del glicocálix ambas dianas del CME. ^(12,13,14,15,16,17,18) Por otra parte, no menos importante es su condición de microorganismo halófilo. Ya que las células, para enfrentar el estrés osmótico, deben mantener altas concentraciones intracelulares de sal y sintetizar solutos compatibles osmorreguladores que le permitan balancear su presión osmótica ^(17,18,19); en el momento que el CME provoca un desbalance de este equilibrio, se afectaría notablemente el crecimiento.

En *D. viridis* el CME induce un proceso de senescencia temprana, respuesta que ha sido explicada para otros microorganismos. ⁽²⁰⁾ Se verifica, además, una disminución progresiva de la motilidad de las células en cultivo, hasta llegar a un 75 % en estado de palmella el día 20 de cultivo. La etapa de palmella es crítica para la sobrevivencia de algunas algas unicelulares en ambientes extremos. En esta los flagelos y la mancha ocular dejan de ser visibles, en respuesta a las perturbaciones del medio, aspecto que se ha descrito fundamentalmente como respuesta al estrés salino ⁽²¹⁾. En general, los mecanismos de osmorregulación podrían verse afectados por el CME, generándose cambios del gradiente de salinidad en el microentorno celular que faciliten la transición al estado de palmella.

Es importante explicar, además, que *C. vulgaris* y *D. salina* tienen diferencias morfológicas y ultraestructurales que inciden en su sensibilidad al CME, presentando una respuesta totalmente diferente al ser expuestas. *D. viridis* es una especie mótil, halófila, muy sensible a los cambios de su entorno; presenta una fina membrana rodeada de un mucus o glicocálix, al igual que otras especies del género. ⁽²⁰⁾ En cambio, *C. vulgaris* presenta menor tamaño (2,5 μm) y una pared celular celulósica rígida trilaminar, que le confiere resistencia.

En los cultivos con cisteína el crecimiento estuvo muy limitado en ambas especies, destacando en el caso de *C. vulgaris* para la que se anula el efecto positivo del CME sobre el crecimiento. La cisteína tiene propiedades reductoras, los grupos tiol reaccionan formándose enlaces disulfuro, entre moléculas contiguas, liberándose 2 H₂ que reaccionan con el oxígeno presente en el medio para formar agua, lo hace que disminuya la concentración de oxígeno. El grupo tiol ayuda a la célula a combatir el estrés oxidativo mediante la captura de las especies reactivas de O₂, tales como O₂, O₂⁻ y H₂O₂. El ambiente anóxico limita la fotosíntesis oxigénica lo que puede afectar

severamente el crecimiento y productividad. Estos resultados sugieren un efecto del CME sobre la fotosíntesis, relacionado con la generación de O₂ que se anularía por la presencia de cisteína. En el caso de *D. viridis*, a la sensibilidad del CME se suma el efecto negativo de la cisteína, por lo que el cultivo decae. Los resultados de la variación de la concentración de lípidos se presentan en la figura 3.

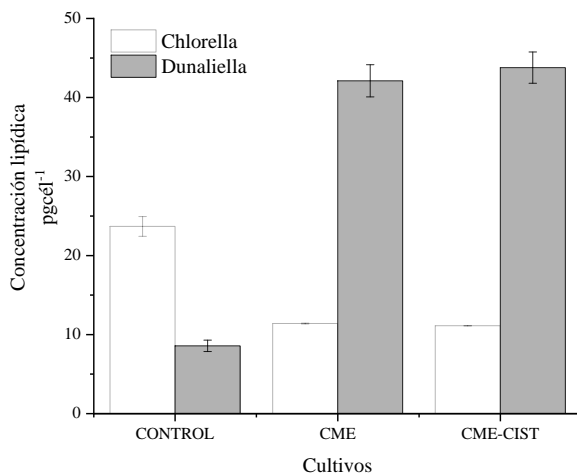


Fig. 3- Variación de la concentración lipídica a los 18 días de cultivo en células de *C. vulgaris* y *D. viridis*, para cultivos controles (n=6), con el protocolo de aplicación del CME no homogéneo de 30 mT (n=6) en dosis a repetición, y con CME y cisteína (n=6)

En los cultivos controles se observa una mayor concentración celular de lípidos en *C. vulgaris*, respecto a *D. viridis* ($23,68 \pm 1,25$ vs $8,57 \pm 0,72$ pgcel⁻¹); sin embargo, con la aplicación del campo magnético hay una clara estimulación de la síntesis lipídica en *D. viridis*, donde se alcanzan valores cinco veces mayores ($42,11 \pm 2,03$ pgcel.), patrón que no varía al incorporar la cisteína.

En *C. vulgaris* se observa un efecto contrario, con una disminución de la concentración lipídica hasta $11,39 \pm 0,05$ pgcel., patrón que se mantiene en los cultivos con CME y cisteína. El crecimiento de microalgas y la acumulación de lípidos no ocurren en forma paralela en los cultivos, por lo que el hecho de que el CME estimule el crecimiento en *C. vulgaris*, pero inhiba la síntesis de lípidos no implica que la tecnología no pueda ser usada para mejorar índices productivos, en determinada fase del cultivo.

Respecto a la concentración de biohidrógeno obtenida a los 18, 26 días y total (tabla 4), el CME con y sin cisteína estimula discretamente la producción de hidrógeno en *D. viridis*; mientras que en el caso de *C. vulgaris*, no se estimula con el CME, sino con la combinación de CME y cisteína. Para ambas especies hay una producción en los controles de más de 0,20 fgcél⁻¹ sin que existan diferencias significativas. Al aplicar el CME disminuye la concentración de hidrógeno en *C. vulgaris* y aumenta para *D. viridis*; sin embargo, la presencia de cisteína no afecta significativamente la producción de hidrógeno en *D. viridis* y aumenta significativamente para *C. vulgaris*.

Tabla 4. Variación de la producción de H₂ expresada en fgcél⁻¹ en los diferentes experimentos realizados con *C. vulgaris* y *D. viridis*, en cultivos de 1L.

Días	Concentración de H ₂ (fgcél ⁻¹)		
	Control	CME	CME+Cisteína
<i>C. vulgaris</i>			
18	0,138 1±0,001 6	0,0583±0,002 5	0,4370±0,0010
26	0,158 2±0,002 2	0,0822±0,002 8	0,1952±0,0011
Total	0,296 3±0,002 2a	0,1405±0,002 9b	0,6322±0,0010c
<i>D. viridis</i>			
18	0,1103±0,001 2	0,1032±0,002 1	0,1181±0,003 5
26	0,0942±0,002 0	0,1885±0,001 0	0,1811±0,001 1
Total	0,204 5±0,0019^a	0,291 7±0,0021^b	0,2992±0,0038^b

Letras diferentes representan diferencias significativas (p<0,05).

Se valida el protocolo de aplicación de un campo magnético estático de 30 mT, en dosis a repetición, para dos especies de microalgas clorofíceas (*C. vulgaris* y *D. viridis*). Para *C. vulgaris* se obtienen concentraciones de hidrógeno 2 veces superior al control y 4 veces mayor que un cultivo establecido con CME, lo que sugiere un mecanismo de acción que involucra en CME con la producción fotosintética de O₂. Se confirma además, que la fotosíntesis oxigénica y la producción anaerobia de H₂ pueden conciliarse hasta 18 días (432 h) mediante la captura del O₂ con cisteína, lo que supera experiencias anteriores.⁽²²⁾

Respecto a la producción de H₂ en presencia de cisteína se han obtenido concentraciones hasta 4 veces mayor que bajo el protocolo de privación azufre, demostrándose que la fotosíntesis oxigénica y la producción anaerobia de H₂ pueden ser conciliadas por más de 40 h mediante la captura del O₂ con cisteína, constituyendo esta una nueva alternativa en la producción de H₂ con microalgas mediante el uso de secuestradores de O₂ químicos y/o biológicos.⁽²²⁾

En 2016 Márquez demostró que, en medios autótrofos y heterótrofos con privación de azufre, 5 especies de microalgas pueden producir H₂ (3 especies de *Chlamydomonas*; *Scenedesmus obliquus* y *C. vulgaris*); sin embargo, en *C. vulgaris* en medio heterótrofo la producción de H₂ se vio limitada. Utilizando varios agentes reductores, se demostró que la cisteína fue el único compuesto que no inhibió el crecimiento de las clorofíceas, e incluso lo estimuló, y fue posible mantener niveles menores a 125 pmol y 3,73 pmol de O₂ fotosintético durante 192 h para microalgas clorofíceas, respectivamente. Sin embargo, en la presente investigación se aplica de conjunto con el CME.⁽²²⁾

Las algas clorofíceas unicelulares son productoras de hidrógeno, lo que fue descubierto por Gaffron en 1939, presentando como ventaja sobre otros sistemas biológicos que las hidrogenasas presentes son mayormente Fe-hidrogenasas⁽²³⁾; sin embargo, cada especie tiene un potencial de fotoproducción de hidrógeno determinado. Las algas verdes en condiciones anaeróbicas pueden usar el H₂ como donador de electrones en el proceso de fijación de CO₂, tanto en condiciones de luz, como de oscuridad; observaciones que han sido corroboradas para *Chlorella fusca*.⁽²⁴⁾

En esta investigación el potencial de producción de hidrógeno es similar, pero añadir la cisteína en combinación con el CME marca la diferencia, duplicándose para *C. vulgaris*, mientras que para *D. viridis* no hay efectos significativos. En la biofotólisis directa, la producción de hidrógeno depende de la tolerancia de la hidrogenasa al oxígeno, ya que se generan los dos gases de forma simultánea. Este proceso no es sostenible en el tiempo, ya que el oxígeno inactivaría a la hidrogenasa, lo que constituye el fundamento de los mejores resultados en cuanto a evolución de H₂ encontrado en los cultivos con cisteína, la que al secuestrar el O₂ impide la inactivación de dichas enzimas, por lo que los resultados se deben en todo caso a la cisteína y no al CME.

Si bien los resultados no muestran altos valores de concentración H₂, esta investigación constituye una aproximación en la búsqueda de especies promisorias y condiciones favorables para dicho fin. El CME de 30 mT aplicado en dosis a repetición favorece el crecimiento, lo que hace a esta tecnología relevante para la producción a gran escala y para el diseño de nuevas estrategias de cultivo, considerando que la producción de lípidos o hidrógeno y el crecimiento, son procesos que se manejan en los cultivos a gran escala en momentos diferentes. Haber encontrado una forma de conciliar ambos procesos por largo periodo hace a esta estrategia de gran interés para la ciencia y las aplicaciones biotecnológicas del CME y de *C. vulgaris*.

Considérese solamente, que dado el potencial reconocido de *C. vulgaris* para la biorremediación, pudiera conciliarse un proceso de depuración de residuales con la producción de hidrógeno; por muy bajo que sea su nivel, constituiría un beneficio agregado a un proceso de gran impacto ambiental.

La influencia de los campos magnéticos estáticos (CME) en los sistemas biológicos ha sido un tema de considerable interés científico. Estos campos, a diferencia de los campos variables en el tiempo (electromagnéticos), no están asociados con la corriente eléctrica inducida, excepto durante la activación y desactivación, o cuando hay movimiento dentro del campo. Para explicar los mecanismos que sustentan el efecto biológico de estos campos, es útil clasificarlos en: débiles (<1 mT), moderados (1 mT a 1 T), fuertes (1 T a 5 T), y ultra fuertes (> 5 T).^(24,25)

En las clorofíceas hay evidencias del efecto del CME. En *Dunaliella* existen reportes del efecto del CME a intensidades moderadas⁽¹²⁾, sobre la estimulación del crecimiento, el aumento de la eficiencia fotosintética y de la síntesis proteica a escala de laboratorio en volúmenes ≤ 500 mL, con protocolos de aplicación diferentes; sin embargo, existe poca información sobre *D. viridis*. En el caso de *C. vulgaris* se ha trabajado mucho más, explicándose el efecto positivo de CME moderados (10-300 mT) sobre el crecimiento y la síntesis de clorofila (tabla 1). En esta investigación se trabaja con dos cepas locales, aisladas del medio natural y conservado por más de dos años en una colección biológica. Se establecen volúmenes de cultivo de 1L y un protocolo de aplicación del CME que implica dosis a repetición, por lo que hay elementos distintivos que deben ser considerados al realizar cualquier comparación con resultados previos.

Conclusiones

Las dos especies de clorofíceas incluidas en este ensayo: *C. vulgaris* y *D. viridis*, presentan respuestas diferentes al exponerse a un CME no homogéneo a 30 mT en dosis a repetición durante la fase exponencial temprana (FET). El CME estimula el crecimiento en *C. vulgaris*; sin embargo, en *D. viridis* induce un proceso de senescencia temprana, limita el crecimiento y estimula la síntesis lipídica y la producción celular de hidrógeno. La mayor sensibilidad de *D. viridis* está condicionada por sus características morfológicas y ultraestructurales. Estos hallazgos abren un nuevo campo de aplicaciones biotecnológicas para *D. viridis*, considerando su potencial bioenergético, la que además ofrece como ventaja su presencia, disponibilidad y tolerancia a los ambientes salinos. Se demuestra, además, que el CME constituye una tecnología

efectiva en diferentes procesos y etapas de cultivo, con beneficios específicos para cada especie de microalga. Los experimentos realizados con cisteína sugieren que el mecanismo de acción del CME podría estar relacionado con la fotoevolución de oxígeno, proceso clave para el crecimiento de los microorganismos fotosintetizadores. En estas condiciones, conciliar por más de 90 h la fotosíntesis con la producción de H₂, constituye un aspecto relevante, considerando su importancia para la valorización de estas especies de microalgas clorofíceas.

Referencias bibliográficas

- 1 GOMEZ-LUNA, L., L. TORMOS-CEDENO AND Y. ORTEGA-DIAZ. Cultivo y aplicaciones de *Chlorella vulgaris*: principales tendencias y potencialidades en la agricultura. *Revista Tecnología Química*, 2022, 42(1), 70-93. <http://scielo.sld.cu/pdf/rtq/v42n1/2224-6185-rtq-42-01-70.pdf>
- 2 AHMAD, M. T., M. SHARIFF, F. MD. YUSOFF, Y. M. GOH, et al. Applications of microalga *Chlorella vulgaris* in aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 2020, 12(1), 328-346. <https://doi.org/10.1111/raq.12320>
- 3 LUNA, J. J. R. Producción de biodiesel en México: Materias primas promisorias y sus rendimientos. *Naturaleza y Tecnología*, 2022, 9(5), 22-42. <http://www.naturalezaytecnologia.ugto.mx/index.php/nyt/article/view/465>
- 4 KANG, N. K., K. BAEK, H. G. KOH, C. A. ATKINSON, et al. Microalgal metabolic engineering strategies for the production of fuels and chemicals. *Bioresource Technology*, 2022, 345, 126529. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126529>
- 5 GOMEZ, L. Cultivo y aplicación de las microalgas *Dunaliella salina* y *Chlorella vulgaris* en Cuba. Tesis de Doctorado Universidad de La Coruña, 1997. https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/5592/GomezLuna_LilianaMaria_TD_1997.pdf
- 6 WANG, H.-Y., X.-B. ZENG AND S.-Y. GUO. Effects of magnetic treatment on ultrastructure of *Chlorella vulgaris*. *Acta Laser Biology Sinica*, 2007, (4), 24-33 pag. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/bem.20360>
- 7 WANG, H. Y., X. B. ZENG, S. &. GUO AND Z. T. LI. Effects of magnetic field on the antioxidant defense system of recirculation-cultured *Chlorella vulgaris*. *Bioelectromagnetics*, 2008, 29, 39-46. doi:10.1002/bem.20360
- 8 LUO, X., ZHANG, H., LI, Q., & ZHANG, J. (2020). Effects of static magnetic field on *Chlorella vulgaris*: Growth and extracellular polysaccharide (EPS) production. *Journal of Applied Phycology*, 32, 2819-2828. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02164-7>
- 9 GOMEZ LUNA, L., R. D. RIVERO Y Á. INAUDIS. Cultivo de *Chlorella vulgaris* sobre residual de soja con la aplicación de un campo magnético. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 2011, XIII(2), 27-38. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77621587003>.
- 10 YANG, G., ET AL. Effect of magnetic field on protein and oxygen-production of *Chlorella vulgaris*. *Mathematical and Physical Fisheries Science*, 2011, 9, 116-126. http://jsmpfs.org/9_2011/Yang_2011.pdf

- 11 SILVEIRA-FONT, Y., L. GÓMEZ-LUNA, M. D. KUFUNDALA-WEMBA, D. SALAZAR-HERNÁNDEZ, et al. Variación de la composición de pigmentos de *Chlorella vulgaris* Beijerinck, con la aplicación del campo magnético estático. *Revista Cubana de Química*, 2018, 30(1), 54-67. <http://scielo.sld.cu/pdf/ind/v30n1/ind05118.pdf>
- 12 STEPANOVA, O. A., P. V. GAISKY & S. A. SHOLAR Influence of a Constant Magnetic Field on the Infectious Titer of Black Sea Algal Viruses. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA*, 2022/04/01 2022, 67(2), 183-187. <https://link.springer.com/article/10.1134/S000635092202021X>
- 13 HUNT, R. W., A. ZAVALIN, A. BHATNAGAR, S. CHINNASAMY, et al. Electromagnetic biostimulation of living cultures for Biotechnology, Biofuel and Bioenergy applications. *International Journal of Molecular Science*, 2009, 10(11), 4719-4722. doi:10.3390/ijms10104515
- 14 GÓMEZ, L., J. MENÉNDEZ, I. ÁLVAREZ Y I. FLORES Efecto de diferentes protocolos de aplicación de un campo magnético (0.03T) sobre el crecimiento, viabilidad y composición pigmentaria de *Haematococcus pluvialis* Flotow en suficiencia y ausencia de nitrógeno. *Biotecnología Vegetal*, 2009, 9(2), 105-117. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/viewFile/313/287>.
- 15 RYCKEBOSCH, E., K. MUYLAERT & I. FOUBERT. Optimization of an analytical procedure for extraction of lipids from microalgae. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2012, 89(2), 189-198. DOI 10.1007/s11746-011-1903-z
- 16 DEAMICI, K. M., ET AL. Static magnetic fields in culture of *Chlorella fusca*: Bioeffects on growth and biomass composition. *Process Biochemistry*, 2016, 51(7), 912-916. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.04.005>
- 17 JIMÉNEZ, C., J. M. CAPASSO, C. L. EDELSTEIN, C. J. RIVARD, et al. Different ways to die: cell death modes of the unicellular chlorophyte *Dunaliella viridis* exposed to various environmental stresses are mediated by the caspase-like activity DEVDase. *Journal of Experimental Botany*, 2009, 60(3), 815-828. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern330>
- 18 GOMEZ LUNA, L. M., N. STEFFANIE, T. ARTOI, A. BENITEZ AMARO, et al. Cambios fisiológicos, bioquímicos y ultraestructurales inducidos por el campo magnético en *Synechocystis aquatilis*. *Cumbres*, 2016, 2(2), 39-48. <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/6550721.pdf>
- 19 WANG, D., W. WANG, N. XU & X. SUN. Changes in growth, carbon and nitrogen enzyme activity and mRNA accumulation in the halophilic microalga *Dunaliella viridis* in response to NaCl stress. *Journal of Ocean University of China*, 2016, 15(6), 1094-1100. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11802-016-2848-5>
- 20 ELAHEE, K. B. & D. POINAPEN. Effects of static magnetic fields on growth of *Paramecium caudatum*. *Bioelectromagnetics*, 2006, 27, 26-34. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/bem.20172>
- 21 SIJIA WEI, Y. B., QI ZHAO, SIXUE CHEN, JIAWEI MAO, CHUNXIA SONG, AND Z. X. KAI CHENG, CHUANFANG ZHANG, WEIMIN MA, HANFA ZOU, MINGLIANG YE, & SHAOJUN DAI. Salinity-Induced Palmella Formation Mechanism in Halotolerant Algae *Dunaliella salina* Revealed by Quantitative Proteomics and Phosphoproteomics. *Front. Plant Sci., Sec. Plant Proteomics and Protein Structural Biology*, 2017, 8:810. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2017.00810/full>
- 22 MÁRQUEZ, L. A. Efecto de las condiciones ambientales y adición de consumidores de oxígeno sobre el crecimiento y la producción de hidrógeno en cultivos de clorófitas. Tesis de Doctorado. Universidad de Baja California, Colección Ciencias de la Vida, 2016. 131 pp.

https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/94/1/TESIS%20LUIS%20MARQUEZ%2001_nov_2016.pdf

23 WINKLER, M., A. HEMSCHEMEIER, C. GOTOR, A. MELIS, et al. [Fe]-hydrogenases in green algae: photo-fermentation and hydrogen evolution under sulfur deprivation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2002, 27(11-12), 1431-1439. [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(02\)00095-2](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(02)00095-2)

24 KESSLER, E. Hydrogenase, photoreduction and anaerobic growth of algae. In W.D.P. STEWART ed. *Algal Physiology and Biochemistry* New Jersey, EUA: Blackwel Publishing, 1974, p. 456-473. ISBN: 0-520-02410-9

25 ROSEN, A. D. Mechanism of action of moderate-intensity static magnetic fields on biological systems. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 2003, 39(2), 163-173. <https://link.springer.com/article/10.1385/CBB:39:2:163>.

Conflictos de interés

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses.

Contribución de los autores

Liliana M. Gómez Luna: Conceptualización, Curación de datos, Investigación, Metodología, Operación de Software, Supervisión y Validación.

Yadenis Ortega, Ramón Arias Gilart: Investigación.

Ramón Arias Gilart: Metodología.

Yadenis Ortega, Ramón Arias Gilart: Supervisión.