

EFFECTO DEL GLICINATO DE SELENIO COMERCIAL EN EL CRECIMIENTO Y BIOACUMULACIÓN DE SELENIO EN *Chlorella sorokiniana* UTEX 1230 y *Scenedesmus obliquus* ATCC 11457

Galvis Sánchez, Juan Camilo^a

^aUniversidad EAFIT / Departamento de Ciencias, Biología

RESUMEN

Este trabajo tiene como objetivo evaluar el impacto del PROKEL® (glicinato de Se) sobre las microalgas *C. sorokiniana* UTEX 1230 y *S. obliquus* ATCC 11457, con respecto a su absorción, bioacumulación y toxicidad. Se encontró en las concentraciones más bajas (5, 10, 20 ppm Se) los cambios visibles *a priori* como el cambio de color y la aparición de pequeños sólidos que no correspondían a la biomasa fue mucho menor respecto al control que en las más altas (30, 40, 50 ppm Se), además en esta última luego del día 4, en el que se presentó mayor crecimiento de la biomasa comienza a descender de manera significativa. También se encontró que el Se absorbido por la biomasa final es mucho mayor a las cantidades reportadas por investigaciones en las que se trabaja con una fuente inorgánica de Se, por lo que se es posible sugerir que esta forma de Se orgánico facilita la captación de dicho elemento con las microalgas evaluadas, además, se reporta una relación directamente proporcional entre los niveles de Se en el medio evaluado y los niveles intracelulares en la biomasa final.

ABSTRACT

This work aims to evaluate the impact of PROKEL® (glycinate of Se) on the microalgae *C. sorokiniana* UTEX 1230 and *S. obliquus* ATCC 11457, with respect to their absorption, bioaccumulation, and toxicity. It was found in the lowest concentrations (5, 10, 20 ppm Se) the visible changes *a priori* such as the color change and the appearance of small solids that did not correspond to the biomass was much less compared to the control than in the highest (30, 40, 50 ppm Se), also in the latter after day 4, in which there was greater growth of the biomass, it begins to decrease significantly. It was also found that the Se absorbed by the final biomass is much higher than the amounts reported by research in which an inorganic source of Se is used, so it is possible to suggest that this form of organic Se facilitates the uptake of said element with the evaluated microalgae, in addition, a directly proportional relationship between the levels of Se in the evaluated medium and the intracellular level in the final biomass is reported.

PALABRAS CLAVE / KEY WORDS: Selenio, microalgas, *Chlorella*, bioacumulación, *Scenedesmus* / Selenium, microalgae, *Chlorella*, bioaccumulation, *Scenedesmus*.

Introducción

El selenio (Se) es un oligoelemento requerido en concentraciones bajas para el correcto funcionamiento de los distintos organismos bióticos incluyendo humanos, mamíferos, bacterias y arqueas; aunque también puede ser un elemento tóxico. Dependiendo de factores como vía de entrada (principalmente oral o por inhalación) puede causar problemas gastrointestinales, daño neurológico, mareos, entre otras. El déficit de Se en el cuerpo puede causar enfermedades como cardiomiopatías y músculo blando, tanto en animales como en humanos [1]. En animales de cría con bajos niveles de, se han registrado menores ganancias de peso, menor producción de leche y lana, baja eficiencia reproductiva con reducción en la fertilidad, en la prolificidad y la calidad seminal, incluso mortalidad asociada a los problemas de miocardio, siendo los pequeños rumiantes, ovinos y caprinos las especies más afectadas por ello [1] [2]. Adicionalmente, Se ha reportado que a bajas concentraciones, (debajo de los 50 μg), el Se ha mostrado efectos anticancerígenos, debido a la función antioxidante de las Selenio-proteínas que previenen el daño al DNA por parte de ROS (especies reactivas de oxígeno) [3] [4] [5]. Sin embargo, a altas concentraciones pueden causar la generación de ROS, que inducen a la oxidación del DNA, rompientes en la doble cadena y la muerte celular [4] y convertirse en un componente tóxico [6].

En ecosistemas acuáticos las microalgas son las encargadas de ingresar el Se a la cadena trófica, lo filtran de las columnas de agua y lo convierten en selenio orgánico, al ser ingeridas por organismos superiores, [7]. Este oligoelemento es considerado necesario para el crecimiento y funciones metabólicas de diferentes microalgas [8]. Estudios de la toxicidad y la bioacumulación de Se en estos organismos ha sido documentado ampliamente en cuanto a fuentes de Se inorgánicas [9] [10] [11], estos enfocados principalmente a la producción de biomasa enriquecida para ser utilizada como suplemento alimenticio saludable o alimento para animales mediante la biotransformación a formas orgánicas de este oligoelemento [12], también se ha encontrado que la acumulación de Se en estas puede resultar en una disminución de la tasa de crecimiento, inhibición de la fotosíntesis y daño a la ultraestructura celular [13]. Por todo lo anterior, en el presente trabajo se evaluará el efecto de la concentración de glicinato de selenio (PROKEL®) en el crecimiento y bioacumulación de selenio en *S. obliquus* ATCC 11457 y *C. sorokiniana* UTEX 1230.

Materiales y Métodos

Recurso Biológico

Las cepas *Chlorella sorokiniana* UTEX 1230 y *Scenedesmus obliquus* ATCC 11457 fueron obtenidas del cepario del laboratorio de biotecnología del Centro de Argos para la Innovación (CApI) ubicado en la Universidad EAFIT sede Medellín.

Montaje y seguimiento de ensayos

El desarrollo experimental fue llevado a cabo en Erlenmeyers de 2 L en BBM, a $24 \pm 5^\circ \text{C}$, con fotoperiodos de 12:12, intensidad de $55 \pm 4 \mu\text{mol} / \text{m}^2\text{s}$ y con aire enriquecido con CO_2 . Los cultivos se iniciaron con una concentración celular de $0,2 \text{ g L}^{-1}$, tanto para *C. sorokiniana* como *S. obliquus*. Entre las actividades de seguimiento se estableció la determinación de concentración celular en el tiempo, cuantificación de clorofila y determinación de selenio en la biomasa final.

La fuente de Se orgánico fue suministrado por la empresa Premex en forma de Glicinato de Se (PROKEL®) con un contenido de Se de 3,39%. Todos los ensayos se hicieron por triplicado para un total de 21 unidades experimentales. Los cultivos sin adición de PROKEL® sirvieron como controles.

Cinética de crecimiento celular y determinación de la concentración celular final

La concentración celular se cuantificó por el método de peso seco empleando filtros estériles de éster de celulosa (Advantec MFS, Inc) con poro de 0,45 µm, diámetro de 47 mm y balanzas de humedad Sartorius Mark-3. Los valores permitieron la construcción de la cinética de crecimiento para cada uno de los tratamientos. La concentración celular se obtuvo como se muestra en la ecuación 1. Las muestras se tomaron cada 24 horas aproximadamente.

$$X(g/L) = \frac{P_f(g) - P_i(g)}{V(L)} \quad (1)$$

Ecuación 1. X=concentración biomasa, P_i= peso inicial, P_f= peso final, V = volumen tomado de muestra.

El crecimiento celular se determinó mediante el método de peso seco.

Modelación de Cinética

Los parámetros cinéticos del crecimiento cada tratamiento se evaluó con el modelo logístico no lineal, utilizando la ecuación 2.

$$X = \frac{X_0 X_{max} e^{\mu_{max} t}}{X_{max} - X_0 + X_0 e^{\mu_{max} t}} \quad (2) [14]$$

Donde X₀ es la concentración de biomasa inicial, X_{max} es la concentración de biomasa máxima que alcanza la microalga según la predicción del modelo, μ_{max} la velocidad específica de crecimiento máxima y t el tiempo.

Separación de la biomasa obtenida

La biomasa final obtenida de cada uno de los tratamientos fue decantada durante 2 días. Luego, se sifonó la mayor cantidad posible del líquido contenido, de modo que se conservara la biomasa dentro del recipiente. Se hicieron 3 lavados con agua tipo HPLC para garantizar que el Se que podría estar extracelular fuese descartado y no estuviese pegado a la membrana extracelular de las microalgas, el pellet de biomasa resultante seco a 65 ° C.

Cuantificación de Se

Para la cuantificación de selenio en la biomasa final se pesaron aproximadamente 500 mg de la muestra. Luego se adicionó 1 mL de H₂O₂ al 30% y 9 mL de HNO₃ al 65%, posteriormente, se llevó a digestión. Por último, se trasvararon estas soluciones a los tubos del cetac y se introdujeron en el equipo Shimadzu ICPE-9000 para determinar la cantidad de selenio presente en la muestra [15].

Cuantificación de clorofila

Dentro de los pigmentos medidos en el experimento se tuvo en cuenta la clorofila y los carotenoides. Para ello, se tomó 40 mL de cada réplica y del control para centrifugar a 4000 RPM por 5 min, la biomasa obtenida se lavó con agua desionizada. finalizado la preparación de las muestras, se centrifugó a 4200 rpm y se midió absorbancia a 665, 646 y 470 nm Se usaron las ecuaciones (1-4) para calcular el contenido de pigmentos fotosintéticos en las muestras.

$$Chl_a = (13.36 * A_{665}) - (5.19 * A_{646}) \quad (3)$$

$$Chl_b = (27.43 * A_{646}) - (8.12 * A_{665}) \quad (4)$$

$$Chl_{total} = (5.24 * A_{665}) + (22.24 * A_{646}) \quad (5)$$

$$Car = \frac{(1000 * A_{470}) - (2.13 * Chl_a) - (97.64 * Chl_b)}{209} \quad (6)$$

Donde Chl_a es clorofila a, Chl_b es clorofila b, Chl_{total} es clorofila total, Car es carotenoides y A es absorbancia la longitud de onda en nm. Ecuaciones y metodología adaptada de [16].

Diseño experimental

El diseño experimental empleado fue unifactorial 1*6 para cada cepa, donde el factor 1 corresponde a las concentraciones en ppm de Se total en el medio y los niveles o tratamientos corresponden a los mostrados en la tabla 1. Cada tratamiento, incluido el blanco (control), conto con 3 réplicas, utilizando el medio Basal Bristol (BBM), para un total de 21 unidades por cepa.

Tabla 1. Niveles evaluados de selenio en el medio

Nivel	Concentración de Se (ppm)
1	50
2	40
3	30
4	20
5	10
6	5

Análisis de resultados

El análisis estadístico de los resultados se realizó por medio de un análisis de varianza (ANOVA) con el 95 % de confiabilidad. Las barras de error presentadas en las gráficas corresponden al error estadístico entre las réplicas de cada uno de los tratamientos. Para el desarrollo del análisis estadístico se utilizó el Software STATGRAPHICS Centurión versión XVI.

Resultados y Discusión

En la figura 1 se observan las fotografías tomadas al montaje de los cultivos de *C. sorokiniana*, en el cual se evidencia que al iniciar todos los tratamientos presentaron un color verde característico de los cultivos con esta cepa (Figura 1-a), *S. obliquus* se comportó de la misma manera. Al finalizar el montaje (Figura 1-b) se observa que los tratamientos que contenían glicinato de Selenio se tornaron de coloración rojo intenso a medida que aumenta la concentración de glicinato en el medio. Estos resultados son comparables con los reportados por Chen *et al.*, [17] el cual encontró que los cultivos de *Espirulina platensis* se tornaron de color rojos durante la fase estacionaria a una concentración de Se superior a 700 ppm, así mismo, estos autores reportan que el color rojo aumenta con la elevación de la concentración de Se, lo que fue atribuido a la aparición de Se elemental, como un mecanismo de adaptación al alto estrés de Se, mediante la biotransformación de Se a la forma elemental insoluble que no estaba disponible para las células de microalgas.

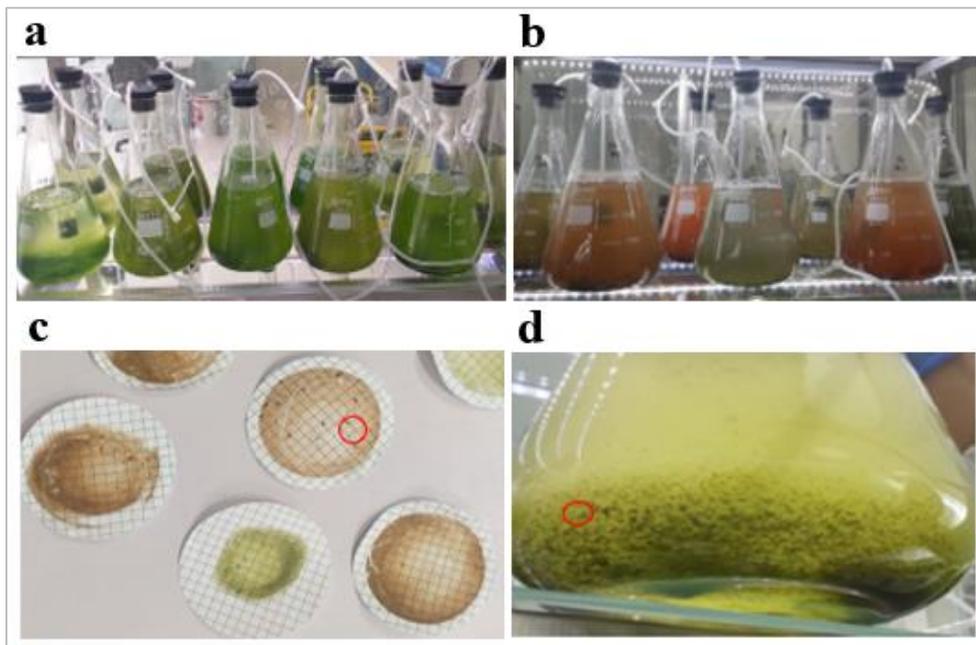


Figura 1. Fotografía realizada a el montaje de los cultivos de *C. sorokiniana*. (a) Día 0 de cultivo, (b) Día 7 de cultivo, (c) Papel filtro con biomasa, (d) Sólidos suspendidos en cultivos.

Cinética de crecimiento

En las figura 2, 3 y 4 se observa la cinética de crecimiento y la modelación determinada mediante el Modelo Logístico respectivamente para *C. sorokiniana* y *S. obliquus*. Los resultados indican una tendencia de decreciente luego del cuarto día de cultivo para las concentraciones que van desde 30 ppm de Se en adelante mientras que las que se encuentra por debajo, se podría hablar de una fase estacionaria. Se puede observar que los tratamientos presentaron poca variación entre los días 0 y 2 de cultivo, por lo que se puede decir que este fue el periodo de adaptación. Entre el día 2 y 4 los tratamientos presentaron fase exponencial siendo el día 4 el que presentó el mayor crecimiento celular para todos los tratamientos excepto los tratamientos con 5 ppm de glicinato de selenio.

Luego de realizar una prueba ANOVA con un nivel de confianza de 95% se obtiene que para los diferentes tratamientos no se da una diferencia estadística ($P > 0,05$) significativa por lo que se puede sugerir que el uso de las concentraciones trabajadas no presenta un efecto en el crecimiento celular final para ambas cepas.

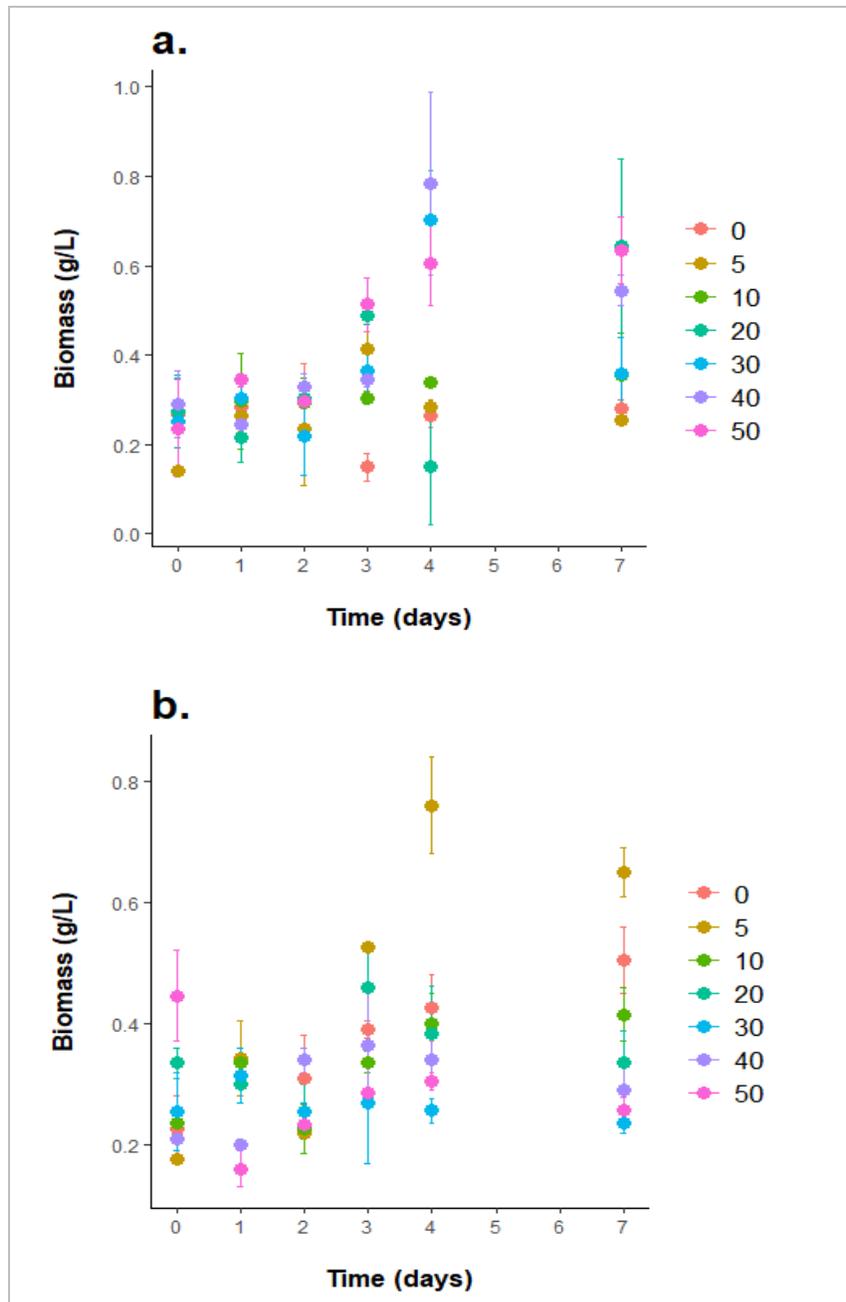


Figura 2. Cinetica de crecimiento de las 2 cepas de microalgas. (a) Ensayo con concentraciones de 0 a 50 ppm para *C. sorokiniana*. (b) Ensayo con concentraciones de 0 a 50 ppm para *S. obliquus*.

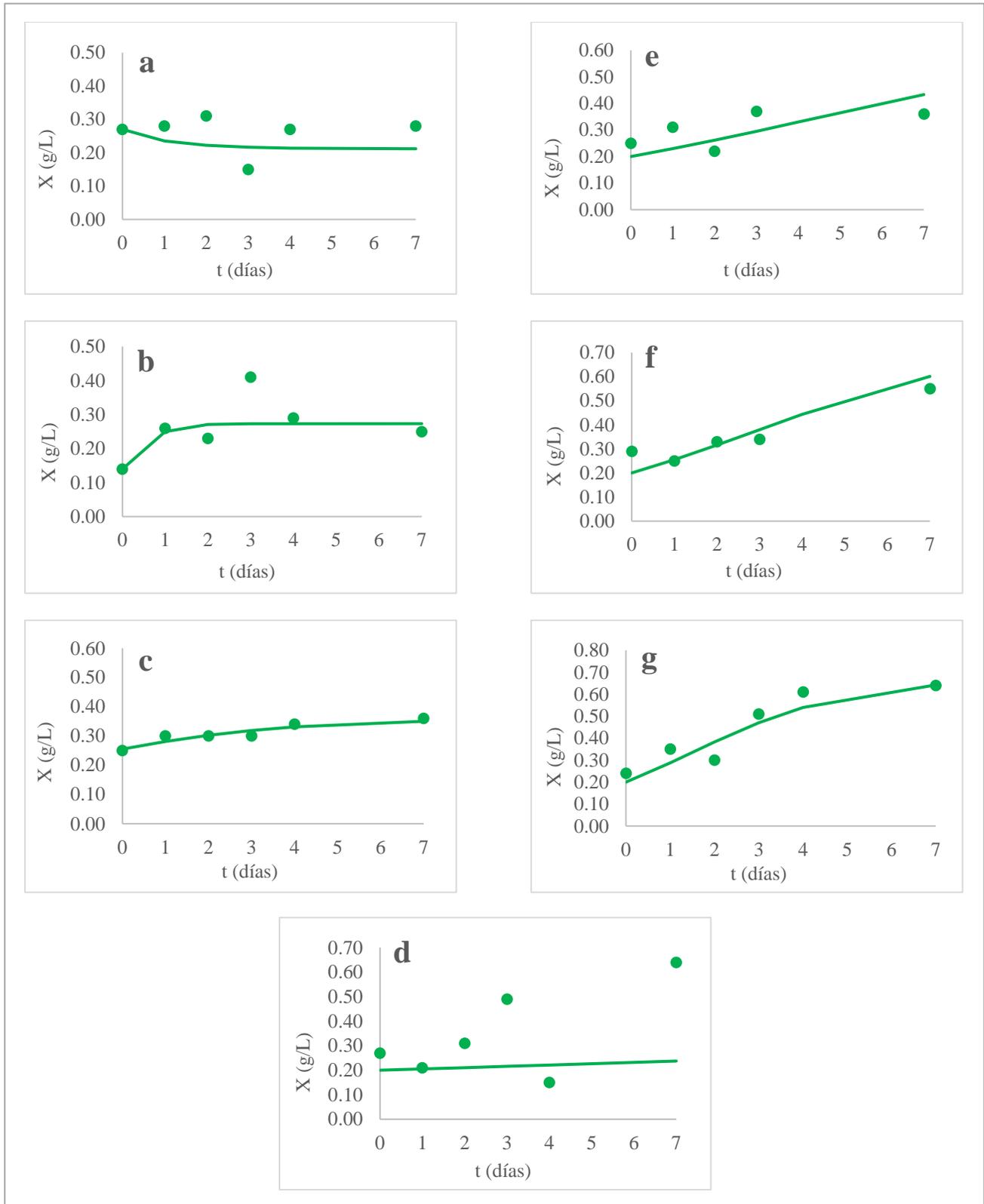


Figura 3. Cinética de crecimiento para *C. sorokiniana*. los diferentes tratamientos con Se (a) Control, (b) 5 ppm, (c) 20 ppm, (d) 30 ppm, (f) 40 ppm y (g) 50 ppm.

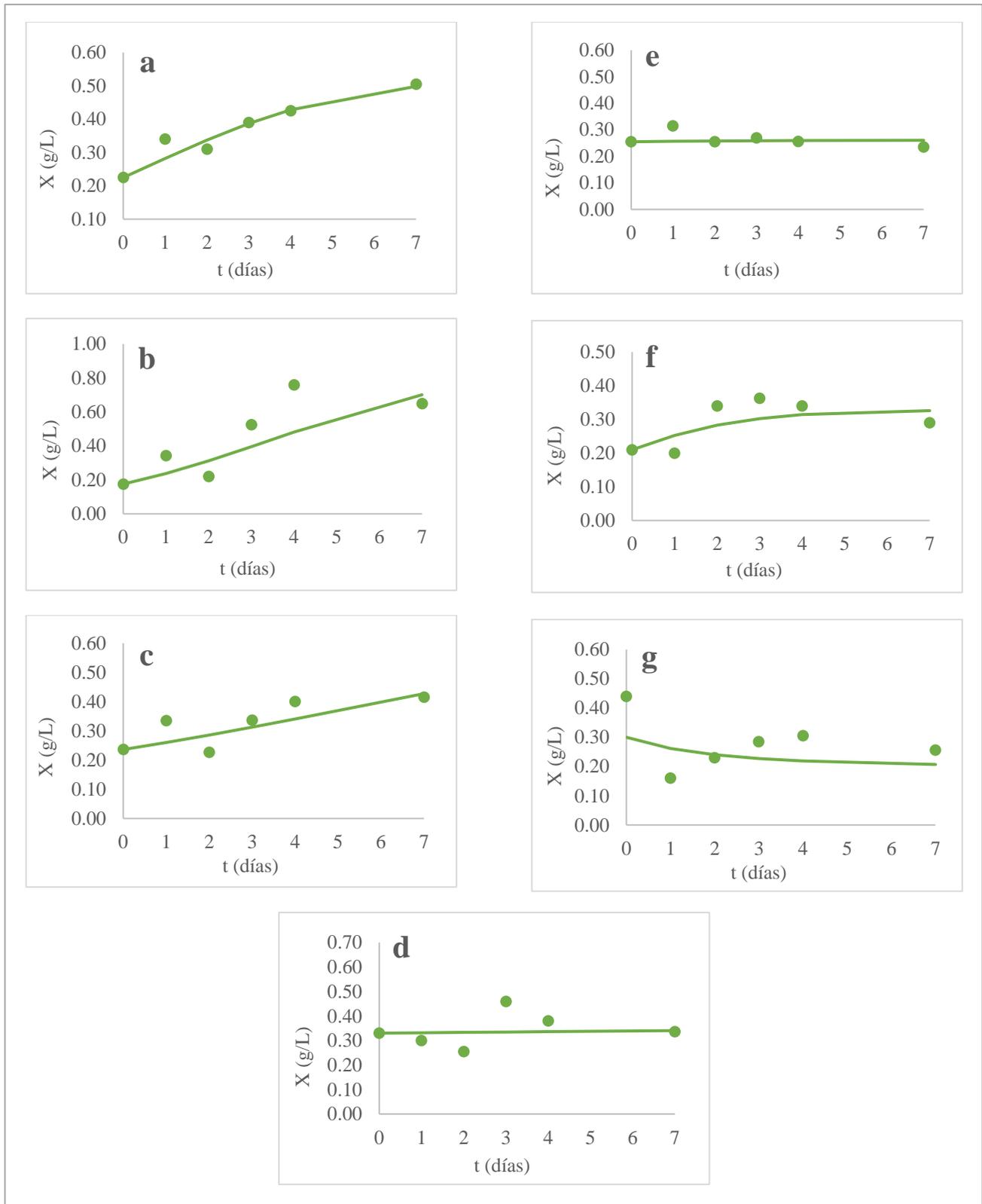


Figura 4. Cinética de crecimiento *S. obliquus* para los diferentes tratamientos con Se (a) Control, (b) 5 ppm, (c) 20 ppm, (d) 30 ppm, (f) 40 ppm y (g) 50 ppm.

En la tabla 2 y 3 se pueden evidenciar los parámetros cinéticos evaluados para las dos cepas por el Modelo Logístico el cual considera que el sustrato no es una limitante para el crecimiento, mientras que X_{max} es la que describe la máxima concentración celular que se puede esperar para las condiciones trabajadas. Además, se observa que el comportamiento de los datos experimentales de la biomasa para las dos cepas que se observa en las figuras 3 y 4 la mayoría de los ensayos difieren (no se ajustan) del comportamiento determinado por el modelo; esto puede ser debido a errores experimentales causados por fallas en los equipos usados o en la toma de muestras, enfocados más en cuanto a la precisión y exactitud. También es posible atribuirlo a que después de la primera medición.

Tabla 2. Parámetros cinéticos obtenidos a partir del Modelo Logístico para *C. sorokiniana*.

Concentración Se (ppm)	X_{max} (g/L)	μ_{max} (día ⁻¹)	Coefficiente de determinación R^2	R^2 Corregido
0	0.21	0.76	-0.40	-1.34
5	0.27	2.32	0.45	0.08
10	0.36	0.39	0.96	0.93
20	0.64	0.04	-0.20	-1.00
30	0.70	0.20	0.28	-0.20
40	0.75	0.35	0.66	0.43
50	0.67	0.57	0.95	0.91

Tabla 3. Parámetros cinéticos obtenidos a partir del Modelo Logístico para *S. obliquus*.

Concentración Se (ppm)	X_{max} (g/L)	μ_{max} (día ⁻¹)	Coefficiente de determinación R^2	R^2 Corregido
0	0.53	0.43	0.91	0.85
5	0.88	0.40	0.64	0.39
10	0.86	0.14	0.68	0.46
20	1.51	0.01	0.11	-0.49
30	0.26	0.30	0.94	0.89
40	0.33	0.63	0.80	0.67
50	0.20	0.35	0.51	0.19

En la figura 5, se observa el selenio intracelular cuantificado en la biomasa final de cada tratamiento para las 2 cepas. Donde se evidencia que a media que aumenta el selenio disponible en el medio de cultivo aumenta la concentración de selenio intracelular. Es importante resaltar que la cepa *S. obliquus* presenta mayor bioamulación que *C. sorokiniana*, resultados comparables con los reportados por diferentes autores (tabla 2) en los cuales reportan que el factor determinante sería la cantidad de Se disponible en el medio para las condiciones empleadas en este estudio dado que

como describe Schiavon *et al.* [8]. Esto posiblemente se deba a que el selenio comparte una gran similitud química con el azufre (S) y ambos elementos compiten por los sitios de unión de las permeasas para ingresar dentro de las células de microalgas, como reportan Schiavon *et al* [8], uno de los factores involucrado en la captación y concentración de Se en el medio. Debido a esta similitud, una vez absorbido el Se puede ingresar a la vía de asimilación reductiva de S y pasar a la síntesis de los selenio-aminoácidos selenocisteína (SeCys) y selenometionina (SeMet). SeCys se incorpora en proteínas esenciales que juegan un papel clave en los sistemas de barrido y defensa de las Especies Reactivas de Oxígeno (ROS). Sin embargo, si la concentración intracelular de Se es alta, los aminoácidos de Se también pueden incorporarse a otras proteínas de forma no específica, produciendo estructuras malformadas que podrían conducir a la muerte celular y por ende la disminución en la producción de biomasa.

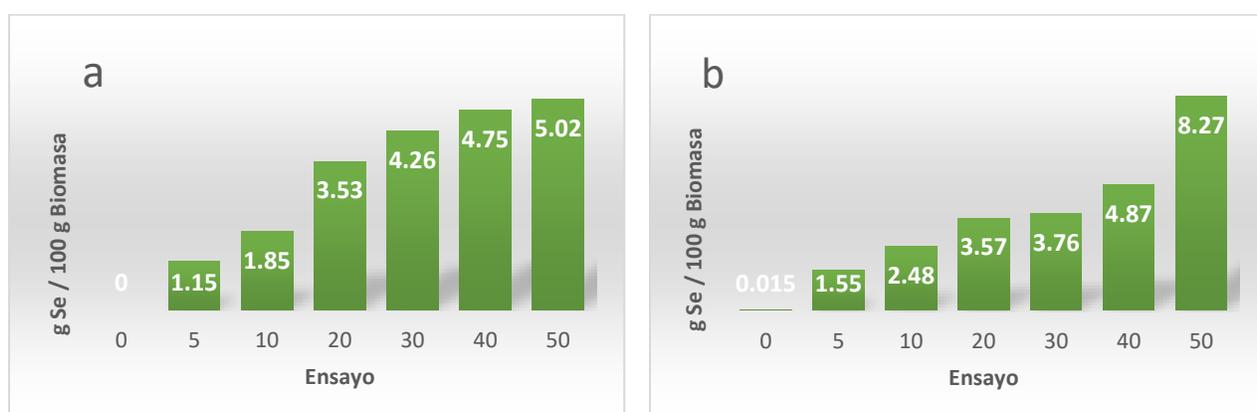


Figura 5. Contenido de Se en la biomasa final para (a) *C. sorokiniana* y (b) *S. obliquus*.

Tabla 4. Selenio intracelular reportado en otras investigaciones.

Especie	[Se] (mg / kg)	[Se] ₀	Referencia
<i>S. platensis</i>	30.00	10.00	[18]
<i>S. platensis</i>	35.00	5.00	[19]
<i>C. vulgaris</i>	450.00	100.00	[6]
<i>C. vulgaris</i>	350.00	50.00	[6]
<i>S. quadricuada</i>	1433.00	50.00	[20]
<i>S. quadricuada</i>	280.00	10.00	[21]
<i>S. obliquus</i>	1000.00	0.50	[22]
<i>S. obliquus</i>	100.00	0.05	[22]

Las microalgas empleadas logran asimilar el selenio orgánico, mostrando concentraciones altas de selenio intracelular en la biomasa final, en comparación a valores reportados para otras especies, por lo que se podría sugerir que esta forma orgánica facilita la captación de Se por parte de las microalgas trabajadas, también se puede observar que a medida que se aumentó la disponibilidad

de Se en el medio aumento la captación de este por parte del microalga, además, al no presentar una significancia estadística entre las concentraciones trabajadas para el crecimiento celular final se deben evaluar concentraciones por encima de 50 ppm y debajo de 5 ppm de Selenio para futuros trabajos.

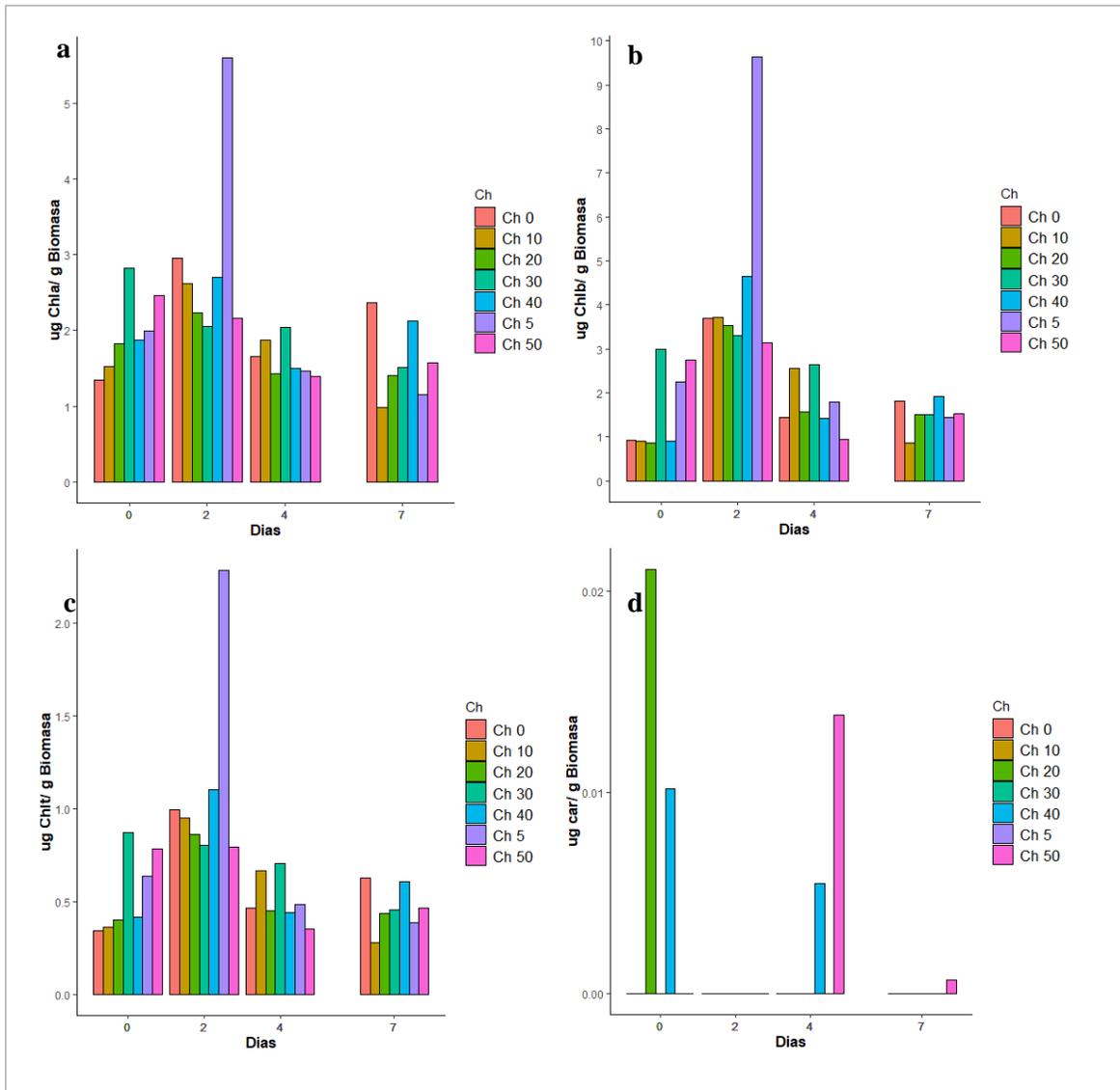


Figura 6. Pigmentos fotosintéticos para *C. sorokiniana* (a) clorofila a, (b) clorofila b, (c) clorofila total y (d) carotenoides.

En la figura 6, se puede apreciar la variación en la concentración de los pigmentos fotosintéticos a diferentes concentraciones de Se para *C. sorokiniana*. En la figura 6a, b y c, se ve que entre los días 0 y 2 de cultivo, hubo un incremento generalizado en la producción de clorofila a, b y total, respectivamente. Los cultivos con 5ppm de Se mostraron el mayor incremento comparado con las demás concentraciones de Se. Además, para 5 ppm de Se en la figura 6a por ejemplo, se muestra como para el día 2 la clorofila a alcanzó a ser más del doble de la cantidad inicial, mientras que en la clorofila b, la producción casi que se cuatriplicó (ver figura 6b).

Por el contrario, la concentración de 50ppm de Se presentó una de las menores disminuciones en la producción de clorofila. En la figura 6a y 6b, se muestra que, para esta misma concentración, en la clorofila *a* se vio una disminución de casi el doble, mientras que para la clorofila *b*, la disminución fue casi del triple, ambas entre el día 0 y 4. Sin embargo, esta fue una de las pocas concentraciones de Se, en las que se pudo cuantificar carotenoides. Al compararse estos datos con el crecimiento se puede observar como a pesar de que, a concentraciones de 30, 40 y 50 ppm de Se la clorofila *a*, *b* y total disminuyen en el tiempo, el crecimiento en el día 4 fue de los más altos.

Es decir, que concentraciones bajas de Se como 5 ppm estimularon la producción de clorofila *a*, *b* y total. Mientras que a concentraciones altas como 50 ppm de Se sí vio una disminución de estos mismos pigmentos, aunque sí se observó la generación de carotenoides.

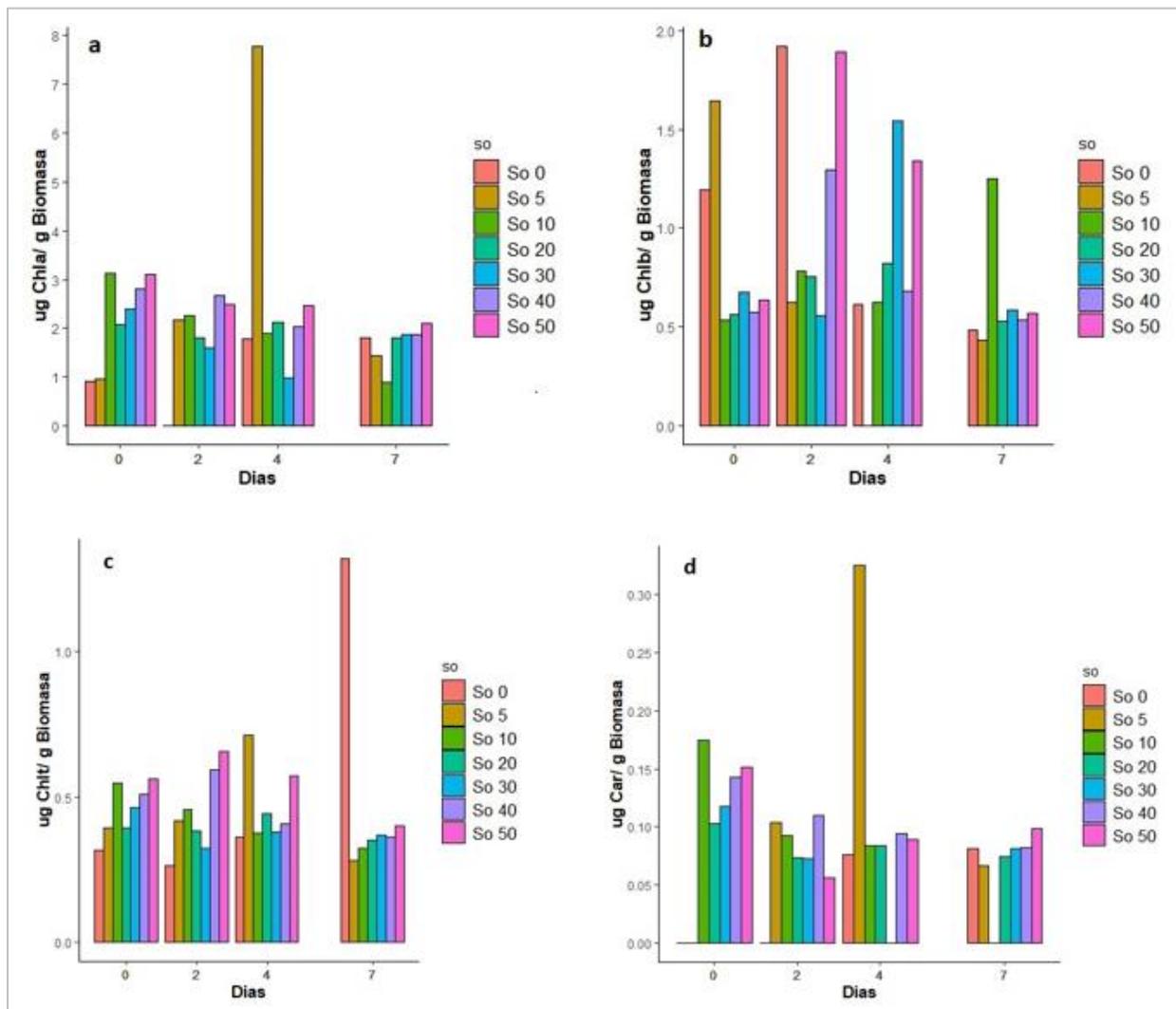


Figura 7. Pigmentos fotosintéticos para *S. obliquus* (a) clorofila *a*, (b) clorofila *b*, (c) clorofila total y (d) carotenoides.

Adicionalmente, en la figura 7, se puede apreciar que la variación en la concentración de pigmentos fotosintéticos para diferentes concentraciones de Se en *S. obliquus*, tuvo un comportamiento diferente al de *C. sorokiniana*. Por ejemplo, en la figura 7a, se muestra que la producción de clorofila *a*, tuvo una mayor tendencia a ser estable en el tiempo. Aunque de una forma similar a *C. sorokiniana*, una concentración de 5ppm de Se presenta un incremento en la producción de clorofila *a* de casi siete veces mayor a la inicial, solo que esto se da es en el día 4. Mientras que en la figura 7b se muestra como a concentraciones de Se altas como 40 y 50 ppm, se da un incremento de clorofila *b* de casi el doble y el triple, respectivamente. Ambas logrando su valor máximo en el día 2 para luego disminuir paulatinamente. A concentraciones como 10 ppm de Se el pico máximo se vio en el día 4 y a 30 ppm de Se el día 3. En esta misma figura 7b, se observa que el control tuvo valores altos de clorofila *b* desde el inicio de los ensayos, por lo que podría tratarse de un error durante la experimentación y no a valores máximos.

Otra diferencia entre la producción de pigmentos entre *S. obliquus* y *C. sorokiniana* se da al comparar la producción de carotenoides. Tal como se ve en la figura 7c, *S. obliquus* presenta la aparición de carotenoides en las diferentes concentraciones de selenio. Estos carotenoides tuvieron tendencia a disminuir en el tiempo, sin embargo, en el día 4 se obtuvo el mayor valor máximo entre todas las muestras para una concentración de 5 ppm de Se. También, para esta misma concentración de Se en este mismo día, se logró obtener el crecimiento máximo de biomasa en *S. obliquus*.

Concentraciones de Se como 30, 40 y 50 ppm permitieron obtener un crecimiento mayor con *C. sorokiniana* alcanzando en las tres un crecimiento máximo alrededor del día 4. De todas formas, la producción de pigmentos fotosintéticos se vio afectada, pues solo las muestras enriquecidas con 5 ppm de Se inicial presentaron un pico máximo de producción tanto en clorofila *a*, *b* y total y las demás tendieron a disminuir la producción de pigmentos o aumentarlos de manera muy leve. Además, la producción de carotenoides fue muy baja comparado con *S. obliquus*, incluso siendo solo cuantificable durante algunos días con 0, 4 y 7 y en muestras como 10, 30 y 50 ppm de Se.

En otros estudios, donde se experimentó sobre la bioacumulación de Se inorgánico en *Chlorella pyrenoidosa*, se encontró que la mayor producción de pigmentos como clorofila *a*, *b* y carotenoides se dio para una concentración de Se de 40 ppm. Lo cual difiere con lo encontrado en este estudio, pues para *C. sorokiniana* la concentración máxima de clorofila *a* y *b* que se logró fue con concentraciones de Se de 5ppm. Mientras, que para *S. obliquus* la concentración máxima de clorofila *a* y carotenoides se logró con concentraciones de Se de 5ppm, y para *b*, con concentraciones de Se de 30 y 50 ppm.

El aumento de pigmentos en muestras tratadas con bajo Se, como por ejemplo 5ppm, puede deberse a que el Se puede promover la actividad de enzimas como el glutatión peroxidasa (GPX). Estas enzimas son capaces de contrarrestar la producción de especies de oxígeno reactivas (ROS) que se generan en un estado de estrés bioquímico alto. A su vez, disminuyendo la utilización de los pigmentos fotosintéticos que pueden tener un papel antioxidante, como ayuda a la disminución en la concentración de ROS [6]

Es decir, que los pigmentos fotosintéticos al ser indicadores indirectos de la toxicidad del Se al interior de las células, podrían estar señalando que, aunque el Se tuvo un efecto citotóxico para ambas cepas que aumentaba al aumentar la concentración de Se, para *C. sorokiniana* fue más tóxico

que para *S. obliquus*, ya que la producción de pigmentos en *C. sorokiniana* se vio que en general tuvo tendencia a ser menor que para *S. obliquus*. A pesar, que para concentraciones entre 5 y 40 ppm la bioacumulación de Se fue similar entre *C. sorokiniana* y *S. obliquus*.

Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos es posible afirmar que las concentraciones evaluadas no presentaron un impacto significativo en cuanto al crecimiento celular final, pero en cuanto a la bioacumulación se observó que a mayores concentraciones de Se en el medio mayor sería la concentración intracelular por lo que este factor ([Se]) es relevante en la biomasa resultante por ello para la obtención Se-*C. sorokiniana* (*C. sorokiniana* enriquecida con Se) y Se-*S. obliquus* (*S. obliquus* enriquecida con Se) el PROKEL® tendrá un impacto positivo en los niveles de Se intracelular.

También es posible concluir que concentraciones superiores a 5 ppm de Se en el medio presentan un mayor estrés en cuanto a la producción de pigmentos fotosintéticos, mientras que a una concentración de 5 ppm dicha producción se ve potenciada respecto al blanco por lo que se puede sugerir que esta concentración no presenta un estrés en los cloroplastos de las microalgas trabajadas.

Referencias

- [1] A. E. Molina Maisincho, «SELENIO: UN ELEMENTO TÓXICO Y ESENCIAL,» Fbrero 2019. [En línea]. Available: <https://cutt.ly/IzLhvvp..> [Último acceso: 2021].
- [2] A. E. Hefnawy y J. T. Pérez, «Selenio y salud animal"Importancia, deficiencia, suplementacion y toxicidad,» *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*, vol. 11, n° 2, pp. 153-165, 2008.
- [3] R. Ebert, M. Ulmer, S. Zeck, J. Meissner-Weigl, D. Schneider y et al, «Selenium supplementation restores the antioxidative capacity and prevents cell damage in bone marrow stromal cells in vitro,» *Stem Cells*, vol. 24, p. 1226–1235, 2006.
- [4] L. Letavayova, V. Vlckova y . J. Brozmanova, «Selenium: From cancer prevention to DNA damage,» *Toxicol*, vol. 227, pp. 1-14, 2006.
- [5] L. Schomburg, U. Schweizer y J. Kohrle, «Selenium and selenoproteins in mammals: extraordinary, essential, enigmatic,» *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 61, p. 1988–1995, 2004.
- [6] S. Xian, Z. Yu, H. Zhi y Y. Yufeng, «Selenium Accumulation in Unicellular Green Alga *Chlorella vulgaris* and Its Effects on Antioxidant Enzymes and Content of Photosynthetic Pigments,» *PLOS ONE*, vol. 9, n° 11, 2014.

- [7] J. Abalde, A. Cid, P. Fidalgo Paredes, E. Torres y C. Herrero, *Microalgas: cultivo y aplicaciones*, A Coruña: Universidade, Servizo de Publicacións, 1995.
- [8] M. Schiavon, S. Parrasia, A. Ertani y F. D. Vecchi, «Selenium accumulation and metabolism in algae,» *Aquat Toxicol*, vol. 189, pp. 1-8, 2017.
- [9] D. V. M. D. I. e. a. Umysová, «Bioaccumulation and toxicity of selenium compounds in the green alga *Scenedesmus quadricauda*,» *BMC Plant Biology*, vol. 9, nº 58, 2009.
- [10] V. Gómez-Jacinto, T. García-Barrera, I. Garbayo, C. Vílchez y J. L. Gómez-Ariza, «Metalloomic study of selenium biomolecules metabolized by the microalgae *Chlorella sorkiniana* in the biotechnological production of functional foods enriched in selenium,» *Pure and Applied Chemistry*, vol. 84, nº 2, pp. 269-280, 2012.
- [11] Z. Yu y J. J. Cheng, «Effects of Selenite on Unicellular Green Microalga *Chlorella pyrenoidosa*: Bioaccumulation of Selenium, Enhancement of Photosynthetic Pigments, and Amino Acid Production,» *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 65, nº 50, pp. 10875-10883, 2017.
- [12] N. A. Pronina, Y. I. Kovshova, V. V. Popova y S. G. Alekseeva, «The Effect of Selenite Ions on Growth and Selenium Accumulation in *Spirulina platensis*,» *Russian Journal of Plant Physiology*, vol. 49, pp. 235-241, 2002.
- [13] Ž. Gojkovic, . I. Garbayo, J. L. Gómez Ariza, I. Márová y C. Vílchez, «Selenium bioaccumulation and toxicity in cultures of green microalgae,» *Algal Research*, vol. 7, pp. 106-116, 2015.
- [14] J. P. Posada Valencia, *Procesos de biotransformación - Cinética*.
- [15] P. S.A., *Cuantificación de selenio*, Medellín, 2019.
- [16] S. C. Siebeneichler, J. Silva Barbosa, A. M. Milhomem Cruz, M. A. Dias Ramos, H. E. Fernandes y V. L. Nascimento, «PIGMENT EXTRACTION METHODS IN ACACIA MANGIUM,» *Communications in Plant Sciences*, vol. 9, pp. 1-5, 2019.
- [17] T. Chen, . W. Zheng, F. Yang, Y. Bai y Y. Wong, «"Mixotrophic culture of high selenium-enriched *Spirulina platensis* on acetate and the enhanced production of photosynthetic pigments,» *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 39, nº 1, pp. 103-107, 2006.
- [18] Z. Huang, W. J. Zheng, . F. Yang y B. J. Guo, «"CHEMICAL COMPOSITION AND SELENIUM DISTRIBUTION IN SELENIUM ENRICHED *Spirulina platensis* BIOMASS,» *Chemistry of Natural Compounds*, vol. 42, nº 6, pp. 636-640, 2006.
- [19] A. I. Belokobylsky, E. I. Ginturi, N. E. Kuchava y et. al, «Accumulation of selenium and chromium in the growth dynamics of *Spirulina platensis*,» *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, vol. 259, nº 1, pp. 65-68, 2004.

- [20] M. Vitova, K. Bisova, M. Hlavova y et. al, «Glutathione peroxidase activity in the selenium-treated alga *Scenedesmus quadricauda*,» , *Aquatic Toxicology*, vol. 102, pp. 87-94, 2011.
- [21] D. Umysová, M. Vítová, I. Doušková y et. al, «Bioaccumulation and toxicity of selenium compounds in the green alga *Scenedesmus quadricauda*,» *BioMed Central*, vol. 9, pp. 1-16, 2009.
- [22] E. Polettini, S. Fortaner, M. Farina y et. al, «Uptake from Water, Internal Distribution and Bioaccumulation of Selenium in *Scenedesmus obliquus*, *Unio mancus* and *Rattus norvegicus*: Part A,» *Bull Environ Contam Toxicol*, vol. 94, p. 84–89, 2015.
- [23] A. MATAMOROS VELOZA, «DISTRIBUCION ESPACIAL DE SELENIO EN SUELOS Y SU COMPORTAMIENTO GEOQUIMICO LOCAL AL ORIENTE DE LOS MUNICIPIOS DE UTICA Y VILLETA,» Bogota D. C., 2001.
- [24] J. E. Conde y M. Sanz Alaejos, «Selenium Concentrations in Natural and Environmental Waters,» *Chemical Reviews*, vol. 97, nº 6, pp. 1979-2004, 1997.
- [25] R. ANDERSEN, *Algal culturing techniques*, Amsterdam: Elsevier, 2005.
- [26] F. Samkhaniyani, G. Najafpour y F. Ardestani, «Evaluation of effective nutritional parameters for *Scenedesmus* sp. microalgae culturing in a photobioreactor for biodiesel production,» *International Journal of Environmental Science and Technology*, vol. 14, nº 5, pp. 1037-1046, 2017.