

## Efecto de la concentración y fuentes de nitrógeno en la producción de proteínas de cultivos masivos de la microalga *Chaetoceros muelleri*

Effect of nitrogen source and concentration to produce proteins in mass cultures of the microalgae *Chaetoceros muelleri*

López-Elías JA, R González-Vega, E Márquez-Ríos, W Torres-Arreola

**Resumen.** Las proteínas son uno de los principales metabolitos que componen la biomasa de las microalgas que constituyen la dieta de los organismos marinos cultivados en acuicultura, ya que son imprescindibles para su crecimiento. La cantidad producida de este componente es influenciada por los nutrimentos, temperatura e intensidad luminosa, entre otros factores. En la presente investigación se evaluó el crecimiento, producción de biomasa, proteínas y patrón electroforético de las proteínas de *Chaetoceros muelleri*, cultivadas con dos fuentes de nitrógeno (nitratos y urea) a tres concentraciones, utilizando el medio f/2 (0,88 moles/L) (nitratos) como control. Los tratamientos fueron los medios 2f (3,53 moles/L) y 4f (7,05 moles/L) con  $\text{NO}_3^-$ , y los medios f/2 (0,88 moles/L), 2f (3,53 moles/L) y 4f (7,05 moles/L) con urea. En general, se encontró que al emplear urea en los medios de cultivos, los parámetros productivos fueron mayores que con los medios a base de nitratos. Las concentraciones celulares ( $2,83 \times 10^6$  cel/mL) y tasas de crecimiento promedio y acumulada (1,50 div/día y 6,01 divisiones), y el peso seco (0,0044 g/L) y la proporción de proteínas (23,74%) fueron más altas cuando se utilizó urea respecto a nitrato; sin embargo, la mayoría de las bandas del perfil electroforético se presentaron en los medios con  $\text{NO}_3^-$  (~6,5 a 90 kDa).

**Palabras clave:** *Chaetoceros muelleri*; Biomasa; Proteínas; Urea; Nitratos.

**Abstract.** Proteins are one of the major metabolites in biomass from microalgae that constitute the diet of marine organisms grown in aquaculture, and are essential for their growth. The quantity of this component is influenced by nutrients, temperature and light intensity, among others. We examined the growth, biomass production and protein of *Chaetoceros muelleri* with two sources of nitrogen (nitrate and urea) at three concentrations, using the medium f/2 (0.88 mol/L) (nitrates) as control. The treatments were the medium 2f (3.53 mol/L) and 4f (7.05 mol/L) with  $\text{NO}_3^-$ , and the medium f/2 (0.88 mol/L), 2f (3.53 mol/L) and 4f (7.05 mol/L) with urea. In general, the productive parameters were greater using urea than nitrate in the media. Higher cell concentrations ( $2.83 \times 10^6$  cell/mL), average and cumulative growth rates (1.50 div/day and 6.01 divisions), dry weight (0.0044 g/L), and proportion of proteins (23.74%) were found when urea was used as the N source. However, most of the bands on the electrophoretic profile were present in the mediums with  $\text{NO}_3^-$  (~6.5 to 90 kDa).

**Keywords:** *Chaetoceros muelleri*; Biomass, Proteins; Urea; Nitrates.

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el uso de las microalgas como organismos capaces de producir biomoléculas ha despertado gran interés, ya que poseen una gran plasticidad metabólica y una elevada velocidad de replicación (Spolaore et al., 2006). Estos organismos fotosintéticos son productores de una amplia variedad de metabolitos secundarios biológicamente activos, tales como proteínas y péptidos, lípidos y carotenoides. Entre ellos el  $\beta$ -caroteno, que tiene una gran importancia por su actividad antioxidante, vitaminas y pigmentos (Reboloso et al., 2000, 2001; Pulz y Gross, 2004; Rao et al., 2006).

Se ha investigado el valor alimenticio de varias especies de microalgas. Una de las más utilizadas son las especies de la diatomea *Chaetoceros* sp. En esta microalga el valor alimenticio se mide en términos de crecimiento larvario de bivalvos y crustáceos. Esta microalga es uno de los mejores alimentos utilizados en acuicultura (Napolitano et al., 1990; Treece y Yates, 1993; Brown, 2002; Richmond, 2004; Mallo y Fenucci, 2004), se utiliza además para la producción de metabolitos (Spolaore et al., 2006). Actualmente, microalgas como ésta se han estado utilizando para la producción de proteínas (Iwamoto, 2003), ya que son uno de los componentes orgánicos principales de la biomasa obtenida durante su cosecha (Gatenby et al., 2003; López Elías et al., 2003, 2004). Las proteínas están constituidas por nitrógeno (N), el cual es vital para su síntesis de DNA y RNA (Richmond, 2004). El N es uno de los nutrientes principales en el crecimiento de las microalgas (Serpa y Calderón, 2006). Además, es uno de los elementos cuantitativamente más importantes que constituyen la estructura celular de las algas y microalgas. Por lo tanto, el medio de cultivo debe estar constituido por nitrógeno (Richmond, 2004).

El medio más utilizado para el cultivo de los organismos del fitoplancton es el medio f/2 de Guillard, que contiene  $\text{NaNO}_3$  como fuente de nitrógeno. Algunos investigadores lo consideran como la mejor fuente de nitrógeno; fuentes alternativas de N como las sales de amonio (nitrato de amonio, cloruro de amonio, sulfato de amonio y acetato de amonio) son menos efectivas. También se ha informado que las fuentes de nitrógeno orgánicas (ej., la urea) generalmente son menos eficientes que las inorgánicas (Ben-Amotz y Avronet, 1989). Sin embargo, en estudios recientes realizados por Serpa y Calderón (2006) la urea jugó un papel importante. Dicha fuente de N determinó la mayor concentración de carotenoides, por encima de los valores obtenidos en medios enriquecidos con  $\text{NaNO}_3$  en *Dunaliella salina*: la actividad ureasa produjo probablemente un gasto energético menor con respecto al gasto necesario para la producción de biomasa y carotenoides en los medios con nitratos. En investigaciones realizadas por Piña et al. (2007) se registraron mayores concentraciones de células en *Chaetoceros muelleri*, y una mayor concentración proteica en *Thalassiosira weissflogii* e *Isochrysis* sp. utilizando el medio f con urea, el cual se comparó con Nutrilake.

Es importante establecer las condiciones óptimas de producción de biomasa de las microalgas para una mayor producción de proteínas; el crecimiento y composición bioquímica de las microalgas puede estar influenciado por la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo (Xin et al., 2010). También es importante buscar fuentes alternativas de nitrógeno, tanto inorgánicas como orgánicas para la biosíntesis de dichas proteínas (Gallardo et al., 2010; Vargas et al., 2006). En el presente trabajo se evaluó el efecto de dos fuentes de nitrógeno ( $\text{NO}_3^-$  y urea) en el crecimiento, producción de biomasa, concentración de proteínas y patrón electroforético proteico de *Chaetoceros muelleri* en condiciones controladas de laboratorio, empleando medios de cultivos con concentraciones de nitrógeno elevadas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La microalga, diatomea *Chaetoceros muelleri* se utilizó en esta investigación. La misma se encuentra en el cepario de microalgas del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS). Esta microalga se aclimató a cada una de las fuentes de nitrógeno ( $\text{NO}_3^-$  y urea), a nivel de tubo de ensayo por 7 días. Posteriormente, los cultivos de *Ch. muelleri* se pasaron a matraces de 250 mL por una semana, y después a matraces de 1 L por una semana. Finalmente, el experimento se inició en garrafones con 15 L de cultivo por triplicado.

**Diseño del experimento.** El diseño experimental consistió de un arreglo factorial de  $2 \times 3$ , con las variables fuente de nitrógeno (nitratos y urea) y concentración de nutrientes (f/2, 2f y 4f). El medio control en el estudio fue el f/2 de Guillard y Ryther (1962). Estos cultivos se realizaron en garrafones de 20 L por triplicado bajo condiciones controladas de laboratorio. Los mismos se efectuaron con aireación constante, temperatura controlada de 24 °C e iluminación constante de 110  $\mu\text{moles/m}^2/\text{s}$ . La fuente de nitrógeno ( $\text{NO}_3^-$ ) del medio f/2 fue 75 g/L, 2f con 300 g/L y 4f con 600 g/L. El medio preparado con urea fue el f/2 con 36,16 g/L, el medio 2f con 144,6 g/L y el medio 4f con 298,3 g/L. El resto de los nutrientes (fósforo, silicio, minerales y vitaminas) se mantuvo en las mismas proporciones.

**Determinación de la concentración celular.** La cosecha de la microalga *Chaetoceros muelleri* se realizó al final de la fase exponencial de crecimiento (Richmond, 2004). El conteo celular se llevó a cabo en un hematocitómetro de 0,1 mm de profundidad, utilizando un microscopio óptico, y aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{No. Células/mL} = (\text{No. total de células} / \text{No. de cuadros contados}) * 10000.$$

Además, se estimaron las tasas de replicación celular:  $\mu$  máxima,  $\mu$  acumulada, y  $\mu$  promedio, en base a las siguientes

tes fórmulas: tasa de crecimiento máxima ( $\mu_{\max} = \text{Log}_2 B_n - \text{Log}_2 B_{n-1} / (t_n - t_{n-1})$ ); acumulada  $\Sigma \mu$ , y promedio  $\mu_{\text{prom}} = \text{Log}_2 B_n - \text{Log}_2 B_0 / (t_n - t_0)$  (Andersen, 2005).

**Determinación de biomasa.** Se filtraron 100 mL de cultivo de cada tratamiento en filtros de fibra de vidrio (whatman GFC) de 47 mm. Los filtrados se secaron en estufa a 65 °C por 8 horas para obtener el peso seco de la biomasa gravimétricamente (Sorokin, 1973). Las muestras fueron luego colocadas en una mufla a 480 °C por 12 h, para estimar la cantidad de cenizas. La materia orgánica libre de cenizas se calculó mediante la diferencia del peso seco y las cenizas, utilizando una balanza analítica (METTLER Modelo AJ100) (López Elías et al., 1995).

**Extracción y determinación de proteína.** Se filtraron 10 mL de cultivo por tratamiento en filtros whatman GFC de 24mm. Posteriormente se determinó el contenido de proteínas por el método colorimétrico de Lowry modificado (López Elías et al., 1995).

**Patrón electroforético.** El patrón electroforético se determinó empleando el sistema discontinuo descrito por Laemmli (1970) en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Las proteínas obtenidas de la biomasa se mezclaron en relación 1:1 (v/v) con buffer muestra (0,125 M Tris-HCl, 4% SDS, 20% v/v glicerol, 0,02% azul de bromofenol, pH=6,8). Posteriormente se calentó en agua a ebullición durante 5 minutos y se enfrió en un baño de hielo, para el subsiguiente análisis electroforético.

Se aplicaron 20  $\mu\text{L}$  de proteína a un gel de poliacrilamida al 12%, empleando una unidad para electroforesis Mini PROTEAN<sup>®</sup>3 Cell Multi-casting (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Se utilizó una mezcla de proteínas estándar de amplio rango (Bio-Rad), compuesta por las siguientes proteínas: cadena pesada de miosina (200 kDa),  $\beta$ -Galactosidasa (116 kDa), fosforilasa b (97 kDa), albúmina de suero bovino (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa) y anhidrasa carbónica (31 kDa). La corrida de electroforesis se llevó a cabo a temperatura ambiente (condiciones de temperatura controlada en el laboratorio), a un voltaje de 180 volts. Finalmente se realizó una tinción con plata, para obtener el número de bandas promedio y la proporción de éstas en cada extracto (Yan, 2000). Los gels se analizaron en un densitómetro de imágenes modelo GS-700 (Bio-Rad Laboratories., Hercules, CA). Posteriormente se llevó a cabo un análisis de imagen con el programa Quantity One (Bio-Rad Laboratories/1998).

**Tratamiento estadístico.** La gráfica de los crecimientos en los diferentes tratamientos con medios de cultivos ricos en nitrógeno fueron generados con datos promedios y desviación estándar de los cultivos crecidos en el laboratorio. El análisis estadístico fue aplicado a las siguientes variables de respuestas: concentración celular, tasas de crecimiento, biomasa y canti-

dad de proteínas. Se utilizó un análisis de varianza de dos vías (2 medios de cultivos x 3 concentraciones/medio de cultivo). Los promedios se compararon mediante rangos múltiples de Tuckey-Kramer a un nivel de significancia de 0,05 (Box et al., 2005).

## RESULTADOS

**Crecimiento de *Chaetoceros muelleri*.** El crecimiento de *C. muelleri* se vió influenciado por la fuente de nitrógeno y la concentración de la misma ( $p < 0,05$ ) (Fig. 1). Los tratamientos que presentaron mayor crecimiento de *C. muelleri* fueron 4f urea, seguido de 4f  $\text{NO}_3^-$ , con recuentos celulares de  $2,83 \times 10^6$  y  $2,81 \times 10^6$  cel/mL, respectivamente. Por otra parte, a concentraciones menores (2f y f/2), se observó que el crecimiento celular fue mayor con urea como fuente de nitrógeno. Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas ( $p \geq 0,05$ ) entre las concentraciones 2f y f/2, al comparar sus medias dentro de la misma fuente de nitrógeno; sin embargo, hubo diferencias entre una fuente y otra ( $p < 0,05$ ). Esto indica que el efecto de la concentración de nitrógeno sólo fue significativo a altas concentraciones (4f). La concentración celular final, tasa de crecimiento acumulada y  $\mu$  promedio de los cultivos fueron mayores ( $p < 0,05$ ) al utilizar urea cuando se estudiaron los efectos de la concentración y fuente de nitrógeno sobre dichos parámetros (Tabla 1).

**Evaluación de biomasa.** Al comparar la producción de biomasa seca, por efecto de la fuente y concentración de nitrógeno, se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ )

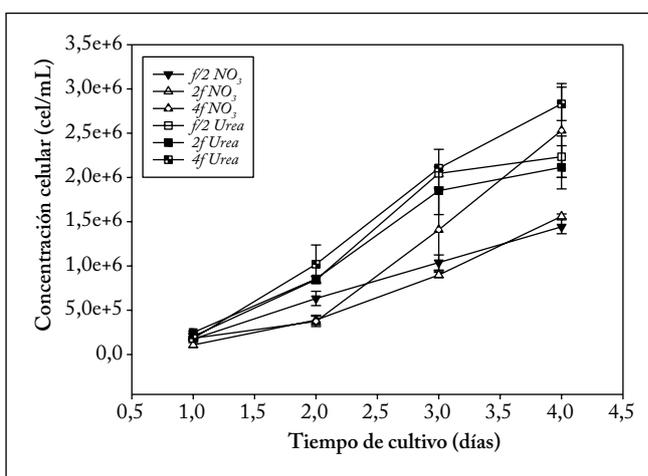


Fig. 1. Curvas de crecimiento de los cultivos masivos de *Chaetoceros muelleri* con  $\text{NO}_3^-$  y urea como fuente de nitrógeno a las tres concentraciones (f/2, 2f y 4f).

Fig. 1. Growth curves of the mass culture of *Chaetoceros muelleri* with  $\text{NO}_3^-$  and urea as a nitrogen source in cel/mL at the three concentrations (f/2, 2f and 4f).

**Tabla 1.** Concentración celular final, y tasas de crecimiento máxima, acumulada y promedio de los cultivos de *Chaetoceros muelleri* con las dos fuentes de nitrógeno (nitratos y urea) a las tres concentraciones (f/2, 2f y 4f). Los valores son promedio de n=6; el dato entre paréntesis corresponde a la desviación estándar.

**Table 1.** Final cell concentration, and maximum, cumulative and average growth rates of the cultures of *Chaetoceros muelleri* with two sources of nitrogen (nitrate and urea) at the three concentrations (f/2, 2f and 4f). Values are the average of n=6; data in brackets correspond to the standard deviation.

Fuente de nitrógeno	Medio	N° de células x 10 <sup>6</sup> cel/mL	μ Max. div/día	μ Acum. Divisiones	μ Prom. div/día
Nitratos	f/2	1,44 a (0,45)	1,89 a (0,15)	4,61 a (0,08)	1,15 a (0,02)
	2f	1,63 a (0,14)	1,87 a (0,14)	4,96 ab (0,02)	1,24 ab (0,01)
	4f	2,81 ab (0,65)	1,12 a (0,82)	5,94 b (0,61)	1,49 b (0,15)
Urea	f/2	2,23 ab (0,28)	2,04 a (1,07)	5,87 ab (0,63)	1,47 b (0,16)
	2f	2,12 b (0,31)	1,84 a (0,46)	5,69 b (0,27)	1,42 ab (0,07)
	4f	2,83 b (0,49)	2,48 a (1,09)	6,01 b (0,62)	1,50 b (0,15)

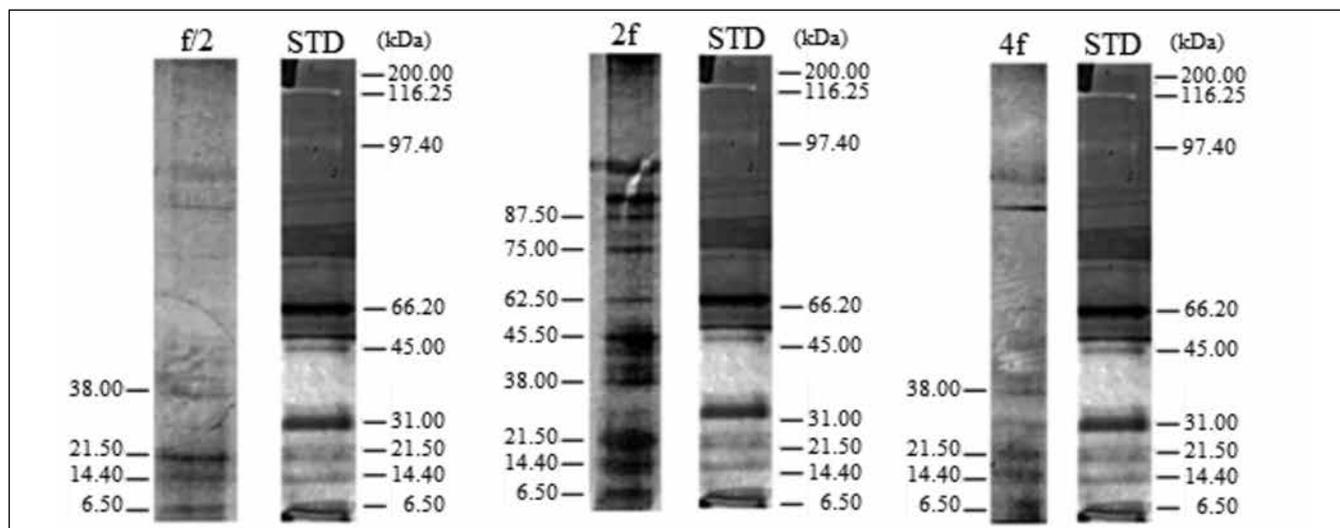
Letras diferentes indican diferencias significativas a  $p < 0,05$ .

**Tabla 2.** Peso seco, Materia Orgánica, Cenizas (g/L) y porcentaje de proteínas en dos fuentes de nitrógeno (nitratos y urea) a tres concentraciones (f/2, 2f y 4f). Los valores son promedio de n=6; el dato entre paréntesis corresponde a la desviación estándar.

**Table 2.** Dry weight, organic matter, ash (g/L) and percentage of proteins in two sources of nitrogen (nitrate and urea) at three concentrations (f/2, 2f and 4f). Values are the average of n=6; data in brackets correspond to the standard deviation.

	Nitratos			Urea		
	f/2	2f	4f	f/2	2f	4f
Peso seco (g/L)	0,28 a (0,03)	0,28 a (0,03)	0,32 a (0,03)	0,25 a (0,03)	0,44 b (0,08)	0,31 a (0,03)
Mat. orgánica (g/L)	0,083 a (0,007)	0,084 a (0,009)	0,086 a (0,012)	0,127 b (0,018)	0,162 bc (0,043)	0,129 b (0,018)
Cenizas (g/L)	0,195 b (0,027)	0,192 b (0,024)	0,232 bc (0,019)	0,127 a (0,024)	0,274 c (0,048)	0,177 ab (0,013)
Proteínas (%)	15,46 ab (5,90)	18,07 bc (3,67)	15,08 ab (3,84)	23,74 c (4,21)	11,03 a (2,13)	14,16 ab (2,90)

Letras diferentes indican diferencias significativas a  $p < 0,05$ .



**Fig. 2.** Electroforesis desnaturalizante con SDS-PAGE de muestras de la microalga *Chaetoceros muelleri*, con  $\text{NO}_3^-$  como fuente de Nitrógeno (teñida con nitrato de plata): (f/2) Mezcla total de proteínas extraídas del medio f/2. (2f) Mezcla total de proteínas extraídas del medio 2f. (4f) Mezcla total de proteínas extraídas del medio 4f. (STD) Marcador de peso molecular (Bio-Rad) de amplio rango.

**Fig. 2.** Denaturant electrophoresis with SDS-PAGE sample of the microalgae *Chaetoceros muelleri*, with  $\text{NO}_3^-$  as a source of nitrogen (stained with silver nitrate): (f/2) total mixture of proteins extracted from the f/2 medium. (2f) total mixture of proteins extracted from the 2f medium. (4f) total mixture of proteins extracted from the 4f medium. (STD) Marker of molecular weight (Bio-Rad) of wide range.

siendo ligeramente mayor en los cultivos crecidos con urea, detectando que fue significativamente más alta en el medio 2f con urea. La producción del material orgánico fue mayor empleando urea que cuando se utilizó nitratos, independientemente de la concentración en el medio de cultivo, contrario a la cantidad del material inorgánico (cenizas) (Tabla 2).

La proporción de proteínas fue distinta entre fuentes y concentraciones, pero la tendencia fue a ser más alta en los cultivos crecidos con urea, a excepción del medio 2f (Tabla 2).

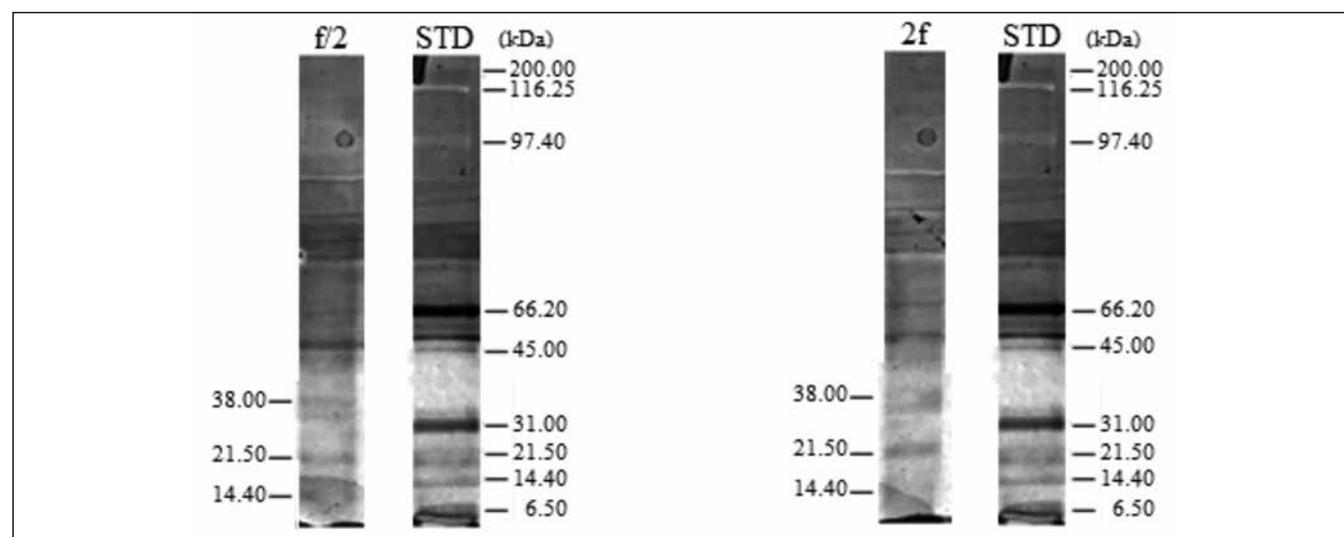
**Patrón electroforético.** El patrón electroforético llevado a cabo sobre SDS-PAGE mostró bandas en el tratamiento 2f de  $\text{NO}_3^-$ , alcanzando a separarse aproximadamente en 8 bandas, que oscilan entre 6,50 a 87,50 kDa; los tratamientos f/2 y 4f del mismo medio presentaron bandas de aproximadamente 6,50 a 38,00 kDa (Fig. 2). Con respecto a los tratamientos con urea se encontraron bandas únicamente en los tratamientos f/2 y 2f, presentando 4 bandas que fluctuaron de 6,50 a 38,00 kDa (Fig. 3).

## DISCUSIÓN

**Crecimiento.** Al comparar la densidad celular entre las dos fuentes de nitrógeno ( $\text{NO}_3^-$  y urea), éstas fueron mayores con la fuente orgánica, con un promedio de  $2,42 \times 10^6$  cel/mL, mientras que las concentraciones menores fueron con  $\text{NO}_3^-$  en los medios f/2 y 2f. Esta microalga puede crecer indistintamente de la fuente de nitrógeno, ya que al utilizar nitratos el alga tiene las enzimas nitrato y nitrito reductasa, mientras que

cuando usa urea utiliza dos enzimas, urea amidoliasa (UALa-sa) y ureasa (Richmond, 2004). En investigaciones realizadas por Conover (1975) y Peers et al. (2000) encontraron que la urea es una buena fuente de nitrógeno para las diatomea marina (*Thalassiosira fluviatilis*, *T. pseudonana* y *T. weissflogii*), y que las tasas de crecimiento fueron similares con respecto a otras fuentes de nitrógeno ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ ). Una de las razones de este comportamiento lo fundamentan Huppe y Turpin (1994). Estos autores expresaron que la asimilación del  $\text{NO}_3^-$  es energéticamente más costosa y requiere más poder reductor. La actividad ureasa en los medios con urea produjo probablemente un gasto energético menor al gasto necesario para la producción de proteínas (Serpa y Calderón 2006).

**Biomasa.** La biomasa y la materia orgánica en base seca tendió a ser mayor al emplear urea como medio de cultivo. En estudios realizados por Piña et al. (2007) reportaron un valor promedio de 0,371 g/L de biomasa seca en los cultivos de *Chaetoceros muelleri* que crecieron con urea, similar a lo registrado en esta investigación a pesar de que en ese estudio crecieron en recipientes de 3L. En términos generales, las cenizas fueron mayores cuando se empleó  $\text{NO}_3^-$  como fuente de nitrógeno. Los resultados encontrados muestran que la biomasa estuvo constituida principalmente por materia inorgánica, lo cual es debido a que la pared celular está constituida por sílice; esto es característico de esta clase de microalgas (Barsanti y Gualtieri, 2005). Piña et al. (2007) reportaron que para este tipo de microalgas la mayor porción de biomasa seca lo constituyen las cenizas, igual que en este estudio.



**Fig. 3.** Electroforesis desnaturalizante con SDS-PAGE de muestras de la microalga *Chaetoceros muelleri*, con urea como fuente de Nitrógeno (teñida con nitrato de plata): (f/2) Mezcla total de proteínas extraídas del medio f/2. (2f) Mezcla total de proteínas extraídas del medio 2f. (STD) Marcador de peso molecular (Bio-Rad) de amplio rango.

**Fig. 3.** Denaturant electrophoresis with SDS-PAGE sample of the microalgae *Chaetoceros muelleri*, with urea as nitrogen source (stained with silver nitrate): (f/2) total mixture of proteins extracted from the f/2 medium. (2f) total mixture of proteins extracted from the 2f medium. (STD) Marker of molecular weight (Bio-Rad) of wide range.

**Patrón electroforético.** El patrón electroforético de este organismo fitoplanctónico mostró un mayor contenido de bandas para los tratamientos con  $\text{NO}_3^-$  (f/2, 2f y 4f): el tratamiento 2f presentó el mayor número de bandas. Esto es debido probablemente a la cantidad de proteína presentada en el tratamiento, mientras que los tratamientos con urea presentaron pocas bandas, probablemente debido a algún factor que interfirió con la metodología usada en esta investigación.

En investigaciones realizadas mediante electroforesis con SDS-PAGE por Básaca et al. (2009) en *Rhodospirillum rubrum*, y Swanson y Glazer (1990) y Gallardo et al. (2010) en cianobacterias (ej., *Spirulina* sp.) encontraron bandas similares en muestras distintas de microalgas, de 14 y 22 kDa, y una banda de alrededor 27 y 28 kDa aproximadamente, que contuvo subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  ficobiliproteínas. Además, Básaca et al. (2009) encontraron  $\beta$ -ficoeritrina, de entre 25 y 30 kDa, en muestras de *R. rubrum*, similares a las bandas encontradas en las muestras de *Chaetoceros muelleri*, las cuales pueden contener estos pigmentos.

En un perfil electroforético realizado por Tanoue (1992, 1996) y Moncheva et al. (2003) de un organismo fitoplanctónico, obtuvieron bandas de 14, 29, 40, 48, 60 y 72 kDa, las cuales coinciden con el patrón de bandeado encontrado para esta microalga. Katz et al. (2007) llevaron a cabo una electroforesis de membranas plasmáticas de *Dunaliella salina* y encontraron 14 bandas, de aproximadamente 90 a 600 kDa. La banda de 87,50 kDa encontrada en el patrón electroforético de *Chaetoceros muelleri* podría corresponder a un conjunto de proteínas de membranas de bajo peso molecular, informado previamente por Katz et al. (2007).

La importancia de los requerimientos nutricionales y su impacto en la producción de metabolitos de interés químico y biológico, en los distintos sectores industriales (Rebollos et al., 2000, 2001), aunado a los bajos costos de producción, debería abrir más campo a investigaciones para mejorar la comprensión dinámica de la población de las algas. Esto es debido a que las poblaciones de microalgas son un componente esencial en el crecimiento y la eficiencia de las cadenas alimenticias (Neori, 2010).

## CONCLUSIONES

En general se encontró que los parámetros productivos de los cultivos de *Chaetoceros muelleri* que crecieron en el medio a base de urea como fuente de nitrógeno, fueron mayores que con los medios formulados a base de nitratos. Las concentraciones celulares, tasas de crecimiento, biomasa orgánica y proporción de proteínas fueron más altos con urea que con nitratos. Asimismo, fue evidente que cuando se empleó una cantidad elevada de nitrógeno, independientemente de la fuente, no se reflejó en la producción de biomasa y proporción de proteínas.

## AGRADECIMIENTOS

Un especial reconocimiento a los técnicos del laboratorio del DICTUS Álvaro Murguía L. y Lauro Mercado C. por su apoyo en el cultivo de microalgas. También agradecemos al Instituto de Acuicultura del Gobierno del Estado de Sonora a través del CREMES por su apoyo en la culminación de esta investigación.

## REFERENCIAS

- Andersen, R. (2005). Parameters of growth in cultures of microalgae. En: Andersen, R. (Ed.), *Algal culturing techniques*. Academic Press, China.
- Básaca-Loya, G.A., M.A. Valdez, E.A. Enríquez-Guevara, L.E. Gutiérrez-Millán y M.G. Burboa (2009). Extraction and purification of B-phycoerythrin from the red microalga *Rhodospirillum rubrum*. *Ciencias Marinas* 35: 359-368.
- Ben-Amotz, A. y M. Avron (1989). The biotechnology of mass culturing *Dunaliella* for products of commercial interest. En: R.C. Creswell, T.A. Rees y N. Shah (eds), pp. 90-114. *Algal and Cyanobacterial Biotechnology*. Longman Scientific and Technical Press, UK.
- Barsanti, L. y P. Gualtieri (2005). *Algae. Anatomy, biochemistry and biotechnology*. Edit. CRC Taylor & Francis Group. Edit. Amazon, p. 301.
- Box, E.P., S. Hunter y W.G. Hunter (2005). *Statistic for experimenter design, innovation and discovery*. Wiley Interscience Editorial, Second Ed. pp. 17-34.
- Brown, M.R. (2002). Nutritional value of microalgae for aquaculture. En: Cruz-Suárez L.E., Ricque-Marie D., Tapia-Salazar M., Gaxiola-Cortés M.G. y Simoes N. (eds), pp. 281-289. *Avances en Nutrición Acuicola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuicola*.
- Conover, S.A.M. (1975). Partitioning of nitrogen and carbon in cultures of the marine diatom *Thalassiosira fluviatilis* supplied with nitrate, ammonium, or urea. *Marine Biology* 32: 231-246.
- Gallardo-Casas, C., E. Cano-Europa, G., Lopez-Galindo, V. Blas Valdivia, R. Olvera Ramírez, M. Franco Colín y R. Ortiz-Butrón (2010). Las ficobiliproteínas de *Spirulina maxima* y *Pseudanabaena tenuis* protegen contra el daño hepático y el estrés oxidativo ocasionado por el  $\text{Hg}_2^+$ . *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 41: 30-35.
- Gatenby, C.M., D.M. Orcutt, D.A. Kreeger, B.C. Parker, V.A. Jones, y R.J. Neves (2003). Biochemical composition of three algal species proposed as food for captive freshwater mussels. *Journal of Applied Phycology* 15: 1-11.
- Guillard, R.R.L. y J.H. Ryther (1962). Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Husted and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian Journal of Microbiology* 8: 229-239.
- Huppe, H.C. y D.H. Turpin (1994). Integration of carbon and nitrogen metabolism in plant and algal cells. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45: 577-607.
- Iwamoto, H. (2003). Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products-major industrial species-*Chlorella*. En: Richmond, A. (ed.), pp. 255-263. *Handbook of Microalgae Biotechnology*. Blackwell Publishing, Oxford.

- Katz, A., P. Waridel, A. Shevchenko y U. Pick (2007). Salt-induced Changes in the Plasma Membrane Proteome of the Halotolerant Alga *Dunaliella salina* as Revealed by Blue Native Gel Electrophoresis and Nano-LC-MS/MS Analysis. The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. *Molecular and Cellular Proteomics* 6: 1459-1472.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature Lond. Nature* 227: 680-685.
- López Elías, J.A., C. Báez Dueñas y N. Huerta Aldaz (1995). Manual de técnicas analíticas aplicadas al cultivo de microalgas. Publicaciones Académicas CICTUS No. 5, 47 p.
- López Elías, J.A., D. Voltolina, C.O. Chavira-Ortega, B.B. Rodríguez-Rodríguez, L.M. Sáenz-Gaxiola, B. Cordero-Esquivel y M. Nieves (2003). Mass production of microalgae in six commercial shrimp hatcheries of the Mexican northwest. *Aquacultural Engineering* 29: 155-164.
- López-Elías, J.A., D. Voltolina, M. Nieves-Soto y L. Figueroa-Ortiz (2004). Producción y Composición de Microalgas en Laboratorios Comerciales del Noroeste de México. En: Cruz Suárez, L.E., Ricque Marie, D., Nieto López, M.G., Villarreal, D., Scholz, U. y González, M. (eds), pp. 636-649. Avances en Nutrición Acuicola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. 16-19 Noviembre, 2004. Hermosillo, Sonora, México.
- Mallo, J. y J. Fenucci (2004). Alimentación de protozoos del langostino *Pleoticus muelleri* Bate utilizando diferentes microencapsulados y especies de microalgas. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 39: 13-19.
- Moncheva, S., S. Gorinstein, G. Shtereva, F. Toledo, P. Arancibia-Avila, I. Goshev y S. Trakhtenberg (2003). Biomass, protein- and carbohydrate-composition of phytoplankton in Varna Bay, Black Sea. Rev. Kluwer Academic Publishers. *Hydrobiologia* 501: 23-28.
- Napolitano, G, R. Ackman y W. Ratnayake (1990). Fatty acid composition of three cultured algal species (*Isochrysis galbana*, *Chaetoceros gracilis* and *Chaetoceros calcitrans*) used as food for bivalve larvae. *Journal of the World Aquaculture Society* 21: 122-130.
- Neori, A. (2010). "Green water" microalgae: the leading sector in world aquaculture. Springer Science Business Media B.V. Pag. 1
- Peers, G.S., A.J. Milligan y P.J. Harrison (2000). Assay optimization and regulation of urease activity in two marine diatoms. *Journal of Phycology* 36: 523-528.
- Piña, P., M.A. Medina M. Nieves, S. Leal, J.A. López-Elías y M.A. Guerrero (2007). Cultivos de cuatro especies de microalgas con diferentes fertilizante utilizado en acuicultura. *Rev. Invest. Mar* 28: 225-236.
- Pulz, O. y W. Gross (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65: 635-48.
- Rao, R.A., R. Sarada, V. Baskaran y G.A. Ravishankar (2006). Antioxidant Activity of *Botryococcus braunii* Extract Elucidated in Vitro Models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 4593- 4599.
- Reboloso Fuentes, M.M., F.G. Acién Fernández, J.A. Sánchez Pérez y J.L. Guil Guerrero (2000). Biomass nutrient profiles of the microalga *Porphyridium cruentum*. *Food Chemistry* 70: 345-353.
- Reboloso-Fuentes, M.M., A. Navarro-Pérez, F. García-Camacho, J.J. Ramos-Miras y J.L. Guil-Guerrero (2001). Biomass nutrient profiles of the microalga *Nannochloropsis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 2966-2972.
- Richmond, A. (2004). Handbook of Microalgal Culture. Biotechnology and Applied Phycology. Blackwell Science, pp. 147-239.
- Sorokin, C. (1973). Dry weight, packed volume and optical density. En: Stein, J.R. (ed), p. 448. Handbook of Physiological Methods. Culture Methods and Growth Measurement. Cambridge University, Press. Cambridge.
- Serpa-Ibáñez, R.F. y A. Calderón-Rodríguez (2006). Efecto de diferentes fuentes de nitrógeno en el contenido de carotenoides y clorofila de cuatro cepas peruanas de *Dunaliella salina* teod. *Ecología Aplicada*, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima - Perú. Vol. 5, núm. 1-2, diciembre, 2006, p. 93-99.
- Spolaore, P., C. Joannis-Cassan, E. Duran, y A. Isambert (2006). Commercial application of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101: 87-96.
- Swanson, R.V. y A.N. Glazer (1990). Separation of phycobiliprotein subunits by reverse-phase high-pressure liquid chromatography. *Analytical Biochemistry* 188: 295-299.
- Tanoue, E. (1992). Occurrence and characterization of particulate proteins in the Pacific-ocean. Deep-Sea Research Part A. *Oceanographic Research Papers* 39: 743-761.
- Tanoue, E. (1996). Characterization of the particulate protein in Pacific surface waters. *Journal of Marine Research* 54: 967-990
- Treece, G. y M. Yates (1993). Manual de laboratorio para el cultivo de larvas de camarón peneido. Texas A&M University, Texas, 83 p.
- Vargas-Rodríguez, A., E. Ramón-Gallegos, M.L. Vega-Barrita, A. Cruz-Orea y R. Olvera-Ramírez (2006). Efecto *in vitro* de las ficobiliproteínas en el tratamiento de carcinoma cervicouterino. *Revista del Centro de Investigación*, Universidad La Salle. Vol. 7, 25: 5-12.
- Xin, L., H. Hong-ying, G. Ke, y S. Ying-xue (2010). Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalgae *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology* 101: 5494-5500.
- Yan, J.X., R. Wait, T. Berkelman, R.A. Harry, J.A. Westbrook, C.H. Wheeler y M.J. Dunn (2000). Modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry- *Electrophoresis* 21: 3666-3672.