

# Cultivos discontinuos alimentados con urea de la cianobacteria *Phormidium* sp. en función de la salinidad y edad del cultivo

## Urea fed-batch cultures of the cyanobacterium *Phormidium* sp. as a function of the salinity and age of cultures

Lorena Jonte\*, Néstor Rosales-Loaiza\*\*, José Bermúdez-González\*\*\*, Ever Morales\*\*\*\*

### Resumen

Se comparó la eficiencia de sistemas de cultivos discontinuos alimentados versus cultivos discontinuos convencionales, en cuanto a concentración de nitrógeno, adicionando 0,2 mM de urea cada tres días al final de la fase exponencial, durante 21 días. Se realizaron cultivos con un volumen de 1500 mL a 15 y 35 UPS de salinidad, enriquecidos con medio ALGAL 8mM NaNO<sub>3</sub>, a 238 μmol q m<sup>-2</sup> S<sup>-1</sup>, aireación constante, fotoperiodo 12:12 horas y temperatura de 29 ±3°C. *Phormidium* sp. posee la capacidad de hidrolizar la urea; mostrando una asimilación de 65±7,07% de la misma, con la mayor producción (p<0,05) de clorofila a, ficocianina y proteínas de 20,26±1,24; 203,47±12,83 y 707,87±28,47 μg mL<sup>-1</sup> en los cultivos alimentados. La producción de pigmentos varío en el tiempo, independientemente a la salinidad y sistema de cultivo, mientras que la producción de proteínas y carbohidratos totales fue directamente proporcional a la edad del cultivo, con valores máximos de 612,74 ± 5,41 μg mL<sup>-1</sup> y 8,96±0,08 mg mL<sup>-1</sup> respectivamente a los 31 días. La síntesis de lípidos y EPS fueron influenciadas (p<0,05) por la salinidad, presentando los máximos de lípidos a 15 UPS con 12,22±2,91 μg mL<sup>-1</sup>, y los EPS se incrementaron a 35 UPS con 2,00 ± 0,26 y 2,03 ± 0,15 mg mL<sup>-1</sup>. Estos resultados determinan que los cultivos de *Phormidium* sp. alimentados con urea y a salinidades de 15 y 35 UPS, representan una alternativa económica para la producción de clorofila a, ficocianina y proteínas, incrementándose un 31,04; 40,72 y 31,94 % respectivamente en comparación con cultivos no alimentados.

**Palabras clave:** clorofila, ficocianina, proteínas, cianobacteria, urea.

### Abstract

Fed-batch system efficiency versus batch cultures was compared in relation to nitrogen concentration, adding 0,2mM urea at the end of the exponential phase, during 21 days. Cultures were carried out in 1500 mL to 1.5 and 3.5 UPS of salinity, enriched with Algal medium 8mM NaNO<sub>3</sub>, 238 mol q m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, constant aeration, photoperiod 12:12 h. and 29 ±3°C. *Phormidium* sp. is able to hydrolyze urea; showing a total assimilation of 65±7.07%, with the highest (p< 0.05) chlorophyll a, phycocyanin and protein production of 20.26 ± 1.24, 203.47 ± 12.83 and 707.87 ± 28.47 μg mL<sup>-1</sup> in the fed-batch cultures. On the other hand, pigment production varies in time, regardless salinity and culture system. Proteins and total carbohydrate production were directly proportional to the age of cultures, with maximum values of 612.74 ± 5.41 μg mL<sup>-1</sup> and 8.96 ± 0.08 mg mL<sup>-1</sup>, respectively. Lipid and EPS were influenced (p< 0.05) by salinity, showing maximum of lipids at 15 UPS with 12.22±2.91 μg mL<sup>-1</sup>, and EPS at 15 and 35 UPS with 2.00 ± 0.26 and 2.03 ± 0.15 mg mL<sup>-1</sup>. These results determine that *Phor-*

\* Magíster Scientiarum en Microbiología. Laboratorio Central Carabobo, C.A. Hidrológica del Centro, Valencia, Venezuela. lorenajonte@gmail.com

\*\* Magíster Scientiarum en Microbiología. Laboratorio de Microorganismos Fotosintéticos, Departamento de Biología. Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela. nestoralgae@yahoo.com

\*\*\* Magíster Scientiarum en Microbiología. Laboratorio de Microorganismos Fotosintéticos, Departamento de Biología. Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela. josebermudezg@yahoo.com

\*\*\*\* Autor de Correspondencia. Doctor en Ciencias Biológicas. Laboratorio de Microorganismos Fotosintéticos, Departamento de Biología. Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela. evermster@gmail.com.  
Dirección: Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia. Bloque A-1, Grano de Oro, Av. Universidad, Apdo. 526, Maracaibo, Venezuela.

*midium* sp. cultures fed with urea, to salinities of 15-35 UPS, represent an economic alternative for chlorophyll a, phycocyanin and protein production, with an increase of 31.04, 40.72 and 31.94% respectively in comparison with non-fed cultures.

**Key words:** chlorophyll, phycocyanin, proteins, cyanobacterium, urea.

**Recibido:** mayo 15 de 2012

**Aprobado:** octubre 31 de 2013

## Introducción

El cultivo de microalgas y cianobacterias se ha estudiado ampliamente en biotecnología, por su capacidad de emplear eficazmente la energía solar para la producción de compuestos orgánicos, tales como, lípidos, glicerol, pigmentos, ficobilinas, hidrocarburos y polisacáridos. Así mismo, pueden proporcionar sustitutos proteicos, vitaminas, aminoácidos; compuestos biológicamente activos como toxinas, inhibidores enzimáticos, antivirales, antibióticos y marcadores fluorescentes para inmunología. Además, presentan potencial en cuanto a la producción de energía, dado que una vez extraídos los productos de interés, una fracción de la biomasa producida en forma de residuos celulares puede convertirse en metano o alcohol (Paniagua-Michel, 1994; Shivaun *et al.*, 1997; Viera Costa *et al.*, 2004; Yim *et al.*, 2004). Sin embargo, el cultivo de estos microorganismos presenta algunos problemas, como son la necesidad de un conocimiento profundo de la fisiología y bioquímica de las especies a cultivar, la verificación de los resultados de laboratorio a escala, el alto costo de los nutrientes empleados y en la tecnología de recuperación de la biomasa. Por lo que, se han dirigido numerosos estudios en la búsqueda de fuentes alternativas de nutrientes y sistemas de cultivos para la disminución de estos costos (Cohen & Vonshak, 1990; De Philippis & Vincenzini, 1998; Olguin *et al.*, 2001; Ungsethaphand *et al.*, 2007).

Para la obtención de biomasa de microalgas y cianobacterias, es importante la realización de estudios sobre los nutrientes más adecuados en medios de cultivos, que permitan un incremento del crecimiento y una mayor síntesis de pigmentos, proteínas y lípidos; lo cual es clave para la producción a gran escala de estos microorganismos, ya que su coste puede ser uno de los factores determinantes de la viabilidad económica en las plantas de producción. En cuanto a las fuentes nitrogenadas, el empleo de urea constituye una fuente alternativa económica (Viera Costa *et al.*, 2004; Ungsethaphand *et al.*, 2009), en comparación al empleo de  $\text{KNO}_3$  y/o  $\text{NaNO}_3$  (Sanchez Luna *et al.*, 2004). El uso de urea como medio de cultivo ha dado excelentes resultados en cultivos de

*Spirulina platensis*, sobre todo cuando se emplea en un sistema de cultivo alimentado o "fed-batch". (Danesi *et al.*, 2002).

Entre los bioprocesos utilizados en cultivos de microorganismos fotosintéticos se considera la modalidad de sistemas de cultivo discontinuo alimentado en relación al discontinuo no alimentado. En este sentido, el alimentado permite que el microorganismo, utilice un nutriente a intervalos de tiempo, favoreciendo así su cinética de crecimiento con la adición extra de este sustrato (Sánchez Luna *et al.*, 2004; Soletto *et al.*, 2005). El cultivo alimentado puede ser seleccionado cuando se requiera escalar el volumen de cultivo, con la posterior adición de algún nutriente específico o medio de cultivo fresco; lo cual induce una extensión de la fase exponencial y en consecuencia un aumento en la densidad celular en fase estacionaria en relación a un cultivo discontinuo convencional. Esta modalidad de cultivo es útil en procesos donde el crecimiento celular y/o la formación de producto son sensibles a la concentración del sustrato limitante, a fin de evitar los efectos de inhibición por sustrato o de metabolitos tóxicos del metabolismo celular (Crueger & Crueger, 1993; Rangel-Yagui *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2004).

*Phormidium* sp. es una cianobacteria, de hábitat bentónico, presente tanto en cuerpos de agua dulce como agua salada, con capacidad de producir biopolímeros de interés en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética. Además, también ha sido utilizada exitosamente para el tratamiento de efluentes de origen doméstico y agro-industrial (Bar-Or & Shilo, 1987; De La Noüe *et al.*, 1993; Cañizares-Villanueva *et al.*, 1994; De Philippis & Vincenzini, 1998; Vicente-García *et al.*, 2004).

El presente trabajo consistió en evaluar el crecimiento y composición bioquímica de *Phormidium* sp., en presencia de urea, como fuente de nitrógeno alternativa en un sistema de cultivo discontinuo alimentado. Igualmente, se determinó el efecto de la salinidad a 15 y 35 unidades prácticas de salinidad (UPS) y la edad del cultivo durante 31 días.

## Materiales y métodos

**Microorganismo en estudio:** la cianobacteria *Phormidium* sp. fue aislada de la Laguna de Gato Negro, laguna de agua salada localizada entre las coordenadas geográficas 10° 47' de Latitud Norte y 71° 38' Longitud Oeste, en la Costa Noroeste del Lago de Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela.

**Condiciones de cultivo y evaluación de la biomasa:** los cultivos se realizaron a las salinidades de 15 y 35 UPS y enriquecida inicialmente con medio inorgánico ALGAL (Fábregas *et al.*, 1984) a la concentración de 8mM de nitrato, un volumen de 1500 mL, en envases de vidrio autoclavables de 3000 mL. Los cultivos fueron, iniciados con un inóculo a 0,1 unidades de absorbancia a 750 nm ( $DO_{750}$ ) y equivalentes a  $0,4 \pm 0,02$  mg mL<sup>-1</sup> de biomasa de la cianobacteria. Todos fueron mantenidos a  $29 \pm 3^\circ\text{C}$ , aireación constante con un caudal de desplazamiento del volumen del cultivo de  $4,95 \pm 0,03$  mL s<sup>-1</sup>, iluminación unilateral a una intensidad luminosa de 236  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , sometidos a un ciclo de luz:oscuridad 12:12 horas.

El crecimiento de la cianobacteria, se siguió mediante turbidez a 750 nm de longitud de onda y masa seca por la metodología propuesta por Utting (1985). La velocidad de crecimiento y la tasa de duplicación fueron calculadas según las fórmulas propuestas por Lobban *et al.* (1988) y en los cultivos alimentados fue calculada, tomando los valores de masa seca, antes de la fase estacionaria y final de la misma (Binaghi *et al.*, 2003). Los pigmentos liposolubles fueron extraídos en metanol al 99% y determinados espectrofotométricamente utilizando las ecuaciones propuestas por Marker *et al.* (1980) para cuantificar clorofila a y por Britton (1985) para carotenoides totales. Los pigmentos hidrosolubles, las ficobiliproteínas, fueron extraídas por choque osmótico y determinadas según la fórmula de Bennet & Bogorad (1973). La determinación de proteínas totales se siguió por el método de Lowry *et al.* (1951), modificado por Hebert *et al.* (1971). El contenido lipídico se realizó mediante el método de carbonización de Marsh & Weinstein (1966); y los carbohidratos totales por el método fenol-sulfúrico de Dubois *et al.* (1956), con las modificaciones realizadas por Kochert (1978). Los exopolisacáridos (EPS) se obtuvieron por precipitación del sobrenadante con etanol (1:3 v/v). La presencia de enzima ureasa, según McFaddin (2000), mientras que la cuantificación del nitrógeno amoniacal y total Kjeldahl, al final del experimento se realizó por el Standard Methods for Examination the Water and Wastewater 21th (2005).

**Diseño experimental y análisis estadístico:** se comparó la eficiencia del sistema de cultivo discontinuo alimentado versus cultivos discontinuo convencional, en cuanto a la concentración de nitrógeno, mediante la adición de 0,2 mM de urea cada tres días a los cultivos al final de la fase exponencial, durante 21 días. El crecimiento de la cianobacteria se siguió cada tres días, la producción de EPS se evaluó al final del bioensayo, mientras que los pigmentos y composición bioquímica se determinaron al inicio, durante las fases exponencial y estacionaria de crecimiento, para estimar los cambios en la composición bioquímica de los diferentes cultivos en función de la alimentación con urea, la salinidad (15 y 35 UPS) y la edad del cultivo. Los datos obtenidos se compararon mediante una ANOVA de medidas repetidas, utilizando el Paquete Estadístico SPSS 10.0 para Windows. Se realizó la prueba de Bonferroni como prueba posterior (*post hoc*) asumiendo varianzas iguales. Todos los análisis fueron declarados significativos al nivel  $p < 0,05$ .

**Resultados y discusión:** los cultivos alimentados se iniciaron al final de la fase exponencial de cultivos discontinuos convencionales. Por lo tanto, para efectos de las comparaciones en la discusión de los resultados, se asignan los términos: cultivos alimentados (A), y a los controles discontinuos "no alimentados"(C).

La adición de urea a los cultivos, no incrementó la biomasa de *Phormidium* sp. al final de la fase estacionaria. La masa seca, no mostró diferencias significativas entre 15 y 35 UPS ( $p > 0,05$ ), con valores entre  $1,34 \pm 0,11$  y  $1,43 \pm 0,07$  mg mL<sup>-1</sup>; observándose una disminución de la tasa de crecimiento en los cultivos alimentados (tabla 1). En *Spirulina platensis*, cultivada bajo régimen alimentado con urea (0,36 y 1,1 mM de urea) y comparada con KNO<sub>3</sub> (1,1 mM), no se encontraron diferencias, indicando que el uso de urea como fuente nitrogenada permite minimizar los costos del cultivo con los mismos rendimientos que el KNO<sub>3</sub> (Danesi *et al.*, 2002).

Por otra parte, al comparar la masa seca en función a la edad del cultivo, se observa que este aumenta significativamente ( $p < 0,05$ ) en el tiempo (figura 1), debido a la tendencia de las células en aumentar la talla y acumular metabolitos en fase estacionaria, que generalmente está acompañada de una disminución en la tasa de crecimiento (Hadden-Carter & Storr, 1984; Rosales *et al.*, 2005).

Considerando la capacidad de ciertas microalgas y cianobacterias de hidrolizar la urea, principalmente bajo las condiciones alcalinas por acción de la enzima ureasa (Carvajal *et al.*, 1980; Collier *et al.*, 1999; Danesi

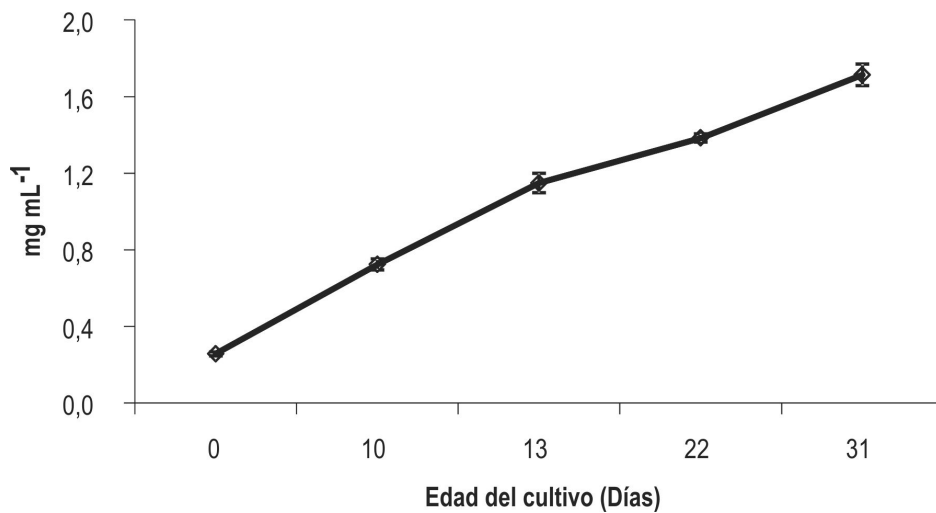
**Tabla 1.** Masa seca, velocidad de crecimiento y tasa de duplicación de *Phormidium* sp. en función a la modalidad de cultivo y la salinidad (15 y 35UPS)

	C 15 UPS	A 15 UPS	C 35 UPS	A 35 UPS
Masa seca <sup>(1)</sup>	1,38 ±0,09	1,43 ±0,07	1,34 ±0,11	1,39 ±0,02
μ <sup>(2)</sup>	0,15 ±0,01	0,11 ±0,01	0,13 ±0,03	0,11 ±0,01
Td <sup>(3)</sup>	4,54 ±0,48	6,05 ±0,29	5,69 ±1,52	6,13 ±0,45
pH final	8,14	8,14	7,93	8,06

<sup>1</sup> Promedio de masa seca (mg mL<sup>-1</sup>) en fase estacionaria.

<sup>2</sup> Velocidad de crecimiento en div d<sup>-1</sup>.

<sup>3</sup> Tasa de duplicación en días. Salinidad expresada en UPS. C 15UPS y C 35UPS: Cultivos no alimentados. A15UPS y A35UPS: Cultivos alimentados.



**Figura 1.** Masa seca (mg mL<sup>-1</sup>) de *Phormidium* sp. en función a la edad del cultivo.

et al., 2002; Carvalho et al., 2004); se comprobó de forma cualitativa la presencia de esta enzima, tanto en los cultivos de *Phormidium* sp. como a las bacterias aisladas de los mismos. Luego de tres días de incubación con el medio selectivo para ureasa, *Phormidium* sp., se utilizó el nitrógeno proveniente de la urea y al hidrolizarla, la liberación del amoníaco y dióxido de carbono alcalinizan el medio observándose el viraje del color de amarillo a fucsia. Similares resultados reportan Berns et al. (1966) para *Phormidium luridum* al evaluar la actividad ureasa de cianobacterias. En contraste, el tubo control (sin inóculo) y las bacterias aisladas de los cultivos de *Phormidium*, no registraron cambios luego de cinco días de incubación. Además, en los cultivos de microorganismos que utilizan la urea pueden disminuir el pH, como producto de la liberación de H<sup>+</sup> debido a la actividad de la ureasa (Danesi

et al., 2002; Soletto et al., 2005). No obstante, los cultivos alimentados con urea no mostraron descenso del pH, presentando un nivel de pH similar a los cultivos no alimentados (tabla 1).

Igualmente, para comprobar el efecto de la adición de urea, se determinó la concentración de nitrógeno total Kjeldahl y nitrógeno amoniacal en el sobrenadante de los cultivos alimentados al final del experimento, obteniéndose valores de 0,12 y 0,10 mM de N Kjeldahl y 0,06 y 0,08 mM de nitrógeno amoniacal a 15 y 35 UPS de salinidad, respectivamente. Estos últimos sugieren una asimilación del 65,00 ± 7,07 % del sustrato en cada alimentación, por parte de la cianobacteria.

La adición de urea, permitió un incremento significativo (p<0,05) en la producción de pigmentos. Los máximos valores de clorofila a fueron 20,26 ± 1,24 y

**Tabla 2.** Contenido de pigmentos de *Phormidium* sp. en función de la modalidad del cultivo y la salinidad.

	C 15UPS	A 15UPS	C 35UPS	A 35UPS
Clorofila a	13,97 ± 1,03	20,26 ± 1,24*	15,25 ± 0,40	19,30 ± 1,59*
Carotenoides	3,70 ± 0,26	5,01 ± 0,31	4,22 ± 0,23	4,78 ± 0,46
Ficocianina	109,21 ± 12,41	149,94 ± 18,45	131,30 ± 11,96	203,47 ± 12,83*
Alofococianina	31,81 ± 3,98	47,19 ± 7,07	37,39 ± 4,46	55,58 ± 4,77*
Ficoeritrina	11,07 ± 1,46	15,09 ± 2,32	12,53 ± 1,19	17,79 ± 1,21*
PBT	152,08 ± 17,85	212,22 ± 27,83	181,23 ± 17,62	276,85 ± 18,81*

Salinidad expresada en UPS. Contenido de pigmentos expresado en  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . C 15UPS y C 35UPS: Cultivos no alimentados. A 15UPS y A 35UPS: Cultivos alimentados. PBT: Ficobiliproteínas totales.

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ ).

$19,30 \pm 1,59 \mu\text{g mL}^{-1}$ , en los cultivos alimentados a 15 y 35 UPS, respectivamente; lo cual corresponde a un incremento en la producción de clorofila a del 31,04 y 20,98%, en relación a los cultivos no alimentados. El contenido de carotenoides totales no presentó diferencias significativas entre los tratamientos ( $p > 0,05$ ). No obstante, en comparación a los cultivos controles, los alimentados registraron valores ligeramente altos, de  $5,01 \pm 0,31$  y  $4,78 \pm 0,46 \mu\text{g mL}^{-1}$  a 15 y 35 UPS de salinidad, respectivamente. El máximo valor de ficobiliproteínas, se obtuvo en los cultivos alimentados a 35UPS, con  $276,85 \pm 18,81 \mu\text{g mL}^{-1}$ , exhibiendo el máximo valor de ficocianina con  $203,47 \pm 12,83 \mu\text{g mL}^{-1}$ , lo cual representó un incremento de la producción en un 46,32 y 35,47 % sobre los cultivos no alimentados a 15 y 35 UPS de salinidad, respectivamente y de un 26,30% sobre el cultivo alimentado a 15 UPS de salinidad (tabla 2).

La relación clorofila a : carotenoides y ficocianina : alofococianina : clorofila a no varió significativamente ( $p > 0,05$ ) en los diferentes tratamientos. Por otro parte, la relación ficocianina : clorofila a, ficobiliproteínas totales: ficocianina: ficoeritrina, presentan un aumento en los cultivos a 35UPS alimentados con diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), respecto al resto de los tratamientos (tabla 3).

La producción de pigmentos con la edad del cultivo, registró un aumento a partir del noveno día en los cultivos alimentados, manteniéndose este incremento durante 19 días del régimen de alimentación hasta el día 22; para luego descender, independientemente de la adición de urea. La ANOVA de medidas repetidas, confirma no solo un aumento ( $p < 0,05$ ) en función a la edad del cultivo, también con la adición de urea a los

cultivos en la producción de clorofila a, carotenoides totales y ficobiliproteínas totales, con valores promedio de  $17,20 \pm 0,23$ ;  $4,43 \pm 0,07$  y  $205,59 \pm 4,28 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente (figura 2).

La estimulación en la producción de pigmentos bajo regímenes de alimentación, ha sido reportada por Zhang & Chen (1997) quienes lograron el aumento de la producción de ficocianina de *Spirulina platensis* en cultivos alimentados con glucosa. Igualmente, Rangel-Yagui *et al.*, (2004) y Ungsethaphand *et al.*, (2009), obtuvieron la producción de biomasa enriquecida con pigmentos y proteínas en cultivos alimentados con urea. Así mismo, Soletto *et al.*, (2005), recomiendan evaluar la productividad de los cultivos alimentados en un rango entre 0,36 y 1,1 mM de urea. Mientras que, Sánchez Luna *et al.*, (2004), aseguran que debe haber un equilibrio entre la calidad de la biomasa y su productividad en el tiempo, al emplear urea como fuente de nitrógeno.

En cuanto al contenido de proteínas (tabla 4), también se registró un incremento ( $p < 0,05$ ) en los cultivos alimentados con urea, con valores de  $707,87 \pm 28,47$  y  $679,86 \pm 8,28 \mu\text{g mL}^{-1}$  a 15 y 35 UPS de salinidad respectivamente, lo que constituye un aumento en la producción de proteínas del 31,94 y 14,47 %, en relación a los cultivos no alimentados. En otras cianobacterias, como *Anabaena* PCC 7120 se ha descrito una correlación positiva entre la concentración de nitrógeno en el medio y el contenido intracelular de proteínas (Piorreck *et al.*, 1984; Loreto *et al.*, 2005; Colla *et al.*, 2007) y en *Spirulina platensis* incrementa el contenido proteínas en cultivos alimentados con un medio preparado a partir de excreta de pollo más  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  de urea con y sin bicarbonato (Ungsethaphand *et al.*, 2009). La pro-

**Tabla 3.** Relación entre pigmentos liposolubles e hidrosolubles en función a la modalidad del cultivo y la salinidad.

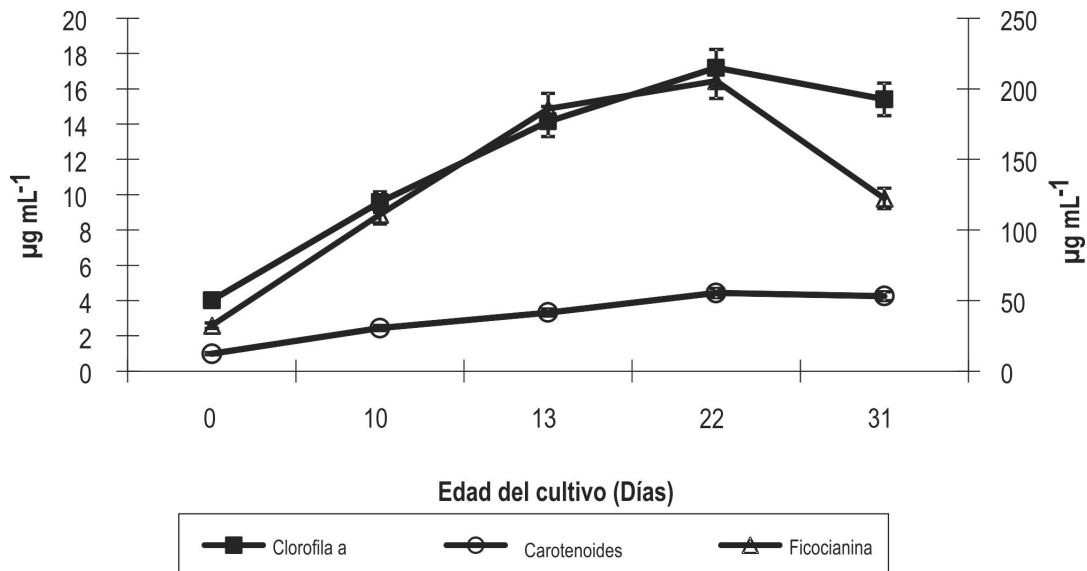
	C 15UPS	A 15UPS	C 35UPS	A 35UPS
<b>Chla : Car</b>	3,78	4,04	3,62	4,04
<b>PC : Chla</b>	7,82	7,40	8,61	10,54*
<b>PBT : Chla</b>	10,88	10,48	11,88	14,34*
PC : APC	3,43	3,18	3,51	3,66
PC : PE	9,87	9,94	10,48	11,44*
%PBT/Proteínas	31,57	29,98	31,17	40,72*

Salinidad expresada en UPS. Chla: Clorofila *a*, Car: Carotenoides, PC: Ficocianina, AP: Aloficocinina, PE: Ficoeritrina, PBT: Ficobiliproteínas totales. C 15UPS y C 35UPS: Cultivos no alimentados. A 15UPS y A 35UPS: Cultivos alimentados.

ducción de proteínas también fue superior ( $p < 0,05$ ) en los cultivos a 35 UPS en comparación a los cultivos a 15 UPS. De igual forma, para *Synechococcus sp.*, el aumento de la salinidad significa un aumento de la producción de proteínas (Rosales *et al.*, 2005).

El contenido de carbohidratos, fue mayor en los cultivos no alimentados a 15 y 35 UPS de salinidad, sin diferencias significativas entre ellos ( $p > 0,05$ ). Pero sí, con los cultivos alimentados ( $p < 0,05$ ), con valores de  $7,07 \pm 0,30$  y  $6,96 \pm 0,41$  mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente, expresando una disminución del 28,85 y 40,37 % en relación a los cultivos sin alimentación a 15 y 35 UPS respectivamente. Según Walach *et al.* (1984) y Ungsethaphand *et al.*, (2009) la disponibilidad de nitrógeno en el medio no estimula la síntesis de carbohidratos.

Cabe destacar, que el contenido de proteínas y carbohidratos en los cultivos de *Phormidium sp.*, fue directamente proporcional a la edad del cultivo, obteniéndose el día 31 los máximos promedios de  $612,74 \pm 5,41$  µg mL<sup>-1</sup> y  $8,96 \pm 0,08$  mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente (figura 3). Esto concuerda con la baja tasa de duplicación y el aumento de la masa seca registrado; puesto que la baja tasa de duplicación en cianobacterias y microalgas permiten un incremento de la talla celular y de bioacumulación de macromoléculas (Hadden-Carter & Storr, 1984). Sin embargo, el tiempo de la alimentación también juega un papel importante en la producción de biomasa enriquecida (Viera Costa *et al.*, 2004). Al respecto, Sánchez Luna *et al.* (2004) señalan que con pulsos continuos de urea se obtuvo un crecimiento lineal de *Spirulina platensis*, durante el período



**Figura 2.** Producción de pigmentos (µg mL<sup>-1</sup>) de *Phormidium sp.* en función a la edad del cultivo

de tiempo de suministro de urea, aumentando la productividad celular; ya que se evita la posible limitación de nutrientes durante los períodos de interrupción de la alimentación.

En cuanto a los lípidos (tabla 4), se observó una ligera disminución en relación a la salinidad y la adición de urea; aunque no hubo diferencias ( $p > 0,05$ ) entre los tratamientos, con valores de  $9,84 \pm 1,35$  a  $12,22 \pm 2,91 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Como es bien conocido la acumulación de lípidos se produce generalmente como respuesta a una limitación de nitrógeno (Borowitzka, 1988). No obstante, Piorreck *et al.* (1984) señalan que las cianobacterias no muestran cambios significativos en el porcentaje y composición de lípidos y ácidos grasos cuando son cultivadas diferentes concentraciones de nitrógeno. Por otra parte, la salinidad disminuye la producción de lípidos en la microalga *Phaeodactylum tricorutum* y la cianobacteria *Synechococcus* sp. (Yongmanitchai & Ward, 1991; Rosales *et al.*, 2005).

En cuanto a la producción de lípidos en función a la edad del cultivo, se presentó un descenso promedio durante la fase exponencial hasta  $3,16 \pm 0,27 \mu\text{g mL}^{-1}$ , lo que significa una disminución del 52,40%, en relación al valor inicial de  $8,13 \pm 0,48 \mu\text{g mL}^{-1}$ . No obstante, al final del experimento aumenta hasta  $11,04 \pm 0,53 \mu\text{g mL}^{-1}$ , representado un incremento hasta un 64,94% en relación al valor inicial (figura 3).

La producción de EPS, fue mayor ( $p < 0,05$ ) en los cultivos a 35UPS de salinidad con y sin alimentación, con valores de 2,03 y 2,00  $\text{mg mL}^{-1}$  (tabla 4); lo que confirma que la salinidad incrementa la síntesis de EPS en cianobacterias aisladas de ambientes salinos. Mientras la adición de urea, que representa un incremento en la concentración de nitrógeno en el medio, no

estimuló la excreción de este polímero, resultados que se correlacionan con lo reportado en diversos estudios, donde la deficiencia de nitrógeno, parece estimular la producción de exopolisacáridos (Fresnedo *et al.*, 1992; De Philippis *et al.*, 1996; De Philippis & Vincenzini, 1998).

## Conclusiones

Los cultivos alimentados con urea, no incrementan la biomasa, ni la tasa de crecimiento de *Phormidium* sp. Sin embargo, la presencia de ureasa constituye una capacidad fisiológica de esta cianobacteria para utilizar urea en medios de cultivos. En cambio, sí parece estimular la producción de clorofila a y ficocianina bajo las condiciones de cultivo seleccionadas.

La producción de proteínas, se incrementa con la adición de urea a los cultivos, mientras que la de carbohidratos disminuye. En contraste, la producción de ambos metabolitos es directamente proporcional a la edad del cultivo. Por otra parte, la producción de lípidos y EPS no se ven influenciadas por la adición de urea, pero sí por la salinidad.

Estos resultados determinan que los cultivos discontinuos de esta cepa de *Phormidium* y alimentados con urea a las salinidades de 15 y 35 UPS, representan una alternativa económica para la producción de clorofila a, ficocianina y proteínas de interés en biotecnología.

## Agradecimientos

Al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico de la Universidad del Zulia, Venezuela, Programa de Investigación N° 0424-10.

**Tabla 4.** Producción de Proteína, Carbohidratos, EPS y Lípidos de *Phormidium* sp en función a la modalidad del cultivo y la salinidad (15 y 35UPS).

	C 15UPS	A 15UPS	C 35UPS	A 35UPS
Proteínas	481,75 $\pm$ 20,53	707,87 $\pm$ 28,47*	581,49 $\pm$ 10,11	679,86 $\pm$ 8,28*
Carbohidratos	7,07 $\pm$ 0,30	5,03 $\pm$ 0,65	6,96 $\pm$ 0,41	4,15 $\pm$ 0,11
EPS	0,37 $\pm$ 0,06	0,41 $\pm$ 0,03	2,03 $\pm$ 0,26	2,00 $\pm$ 0,15
Lípidos	12,22 $\pm$ 2,91	11,05 $\pm$ 1,27	11,05 $\pm$ 1,27	9,84 $\pm$ 1,35

Salinidad expresada en UPS. Producción de proteínas y lípidos expresada en  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Producción de carbohidratos totales y EPS expresada en  $\text{mg mL}^{-1}$ . C 15UPS y C 35UPS: Cultivos no alimentados. A 15UPS y A 35UPS: Cultivos alimentados. EPS: Exopolisacáridos.

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ ).

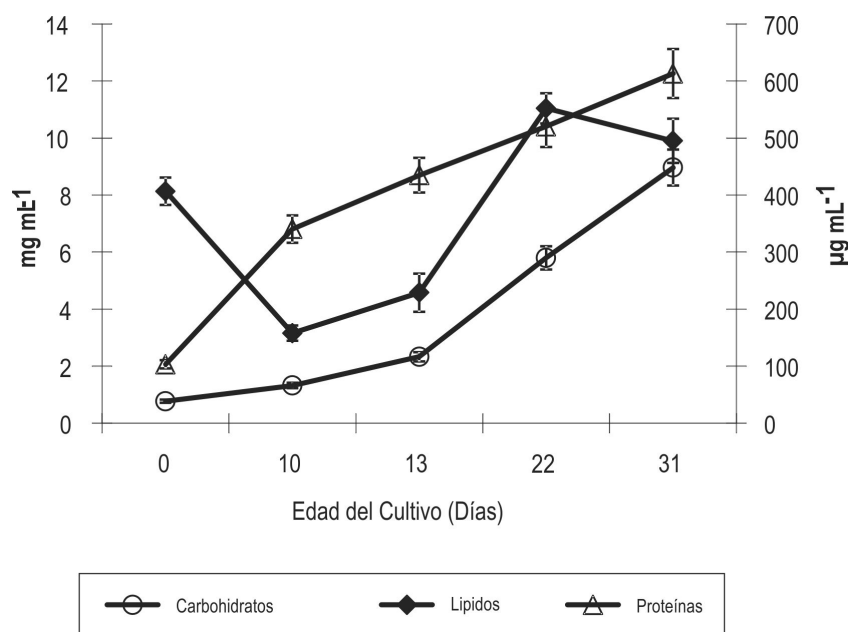


Figura 3. Contenido de carbohidratos, lípidos y proteínas ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) de *Phormidium* sp. en función a la edad del cultivo.

### Referencias bibliográficas

- APHA, AWWA y WPCF: 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21<sup>th</sup> Edition.
- Bar-Or Y. & Shilo M. 1987. Caracterization of macromolecular flocculants produced by *Phormidium* sp. strain J-1 and by *Anabaenopsis Circularis* PCC 6720. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53 : 2226-2230.
- Bennet A. & Bogorad L. 1973. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green algae. *J. Cell Biol.*, 58: 419-435.
- Berns D., Holohan P. & Scott E. 1966. Urease activity in blue green algae. *Science*, 152: 1077-1078.
- Binaghi L., Borghi A., Lodi A., Converti A. & Borghi M. 2003. Batch and fed-batch uptake of carbon dioxide by *Spirulina platensis*. *Process Biochem.*, 38: 1341-1346.
- Borowitzka M. 1988. Fats oils and hydrocarbons. En: Borowitzka M. y Borowitzka L. (eds). *Microalgal Biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge, RU. 257-287.
- Britton G. 1985. General carotenoids methods. *Met. Enzimol.*, 111: 113-158.
- Carvajal N., Fernández M., Rodríguez J. & Donoso M. 1980. Urease of *Spirulina maxima*. *Phytochem.*, 21:2821-2823.
- Cañizares-Villanueva RO., Ramos A., Lemus R., Gomez-Lojero C. & Travieso L. 1994. Growth of *Phormidium* sp. in aerobic secondary piggery waste-water. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 42(2-3):487-91.
- Carvalho J., Francisco F., Almeida K., Sato S. & Converti A. 2004. Cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* (Cyanophyceae) by fed-batch addition of ammonium chloride at exponentially increasing feeding rates. *J. Phycol.*, 40: 589-597.
- Cohen Z. & Vonshak A. 1990. Fatty acid composition of *Spirulina* and *Spirulina*-like cyanobacteria in relation to their chemotaxonomy. *Phytochem.*, 30:205-206.
- Colla, C., Reinehr C., Rcichert C. & Costa J. 2007. Production of biomass and nutraceutical compound by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. *Bioresour. Technol.*, 98: 1489-1493.
- Collier, J., Brahamsha B. & Palenik B. 1999. The marine cyanobacterium *Synecho coccus* sp. WH7805 requires urease (urea amidohydrolase EC 3.5.1.5) to utilize urea as a nitrogen source: molecular-genetic and biochemical analysis of the enzyme. *Microbiol.*, 145: 447-459.
- Crueger W. & Crueger A. 1993. *Biotechnologia. Manual de Microbiología Industrial*. Zaragoza. España. Editorial Acribia. 150.
- Danesi E., Rangel-Yagui C., Carvalho J. & Sato S. 2002. An investigation of the effect of replacing nitrate by urea in the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. *Biomass Bioenerg.*, 23: 261-269.
- De La Noüe J., Blier R., Dumas A., Laliberté G., Lavoie M., Essard P., McLaughlin I., Proulx D., Silvestre S. & Talbot P. 1993. Use of *Phormidium bohneri* (Cyanobacterium) for the biotreatment of polluting effluents. 6<sup>th</sup> International Conference on Applied Algology. České Budějovice, República Checa. 91.
- De Philippis R. & Vincenzini M. 1998. Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. *FEMS Microbiol. Rev.*, 22: 151-175.
- De Philippis R., Sili C. & Vincenzini M. 1996. Response of an exopolysaccharide-producing heterocystous cyanobacterium to changes in metabolic carbon flux. *J. Appl. Phycol.*, 8(4-5): 275-281.
- Dubois M., Gilles K., Hamilton J., Rebers P. & Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Ann. Chem.*, 28: 350-356.
- Fábregas J., Abalde J., Herrero C. & Cabezas B. & Veiga M. 1984. Growth of the marine microalga *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities. *Aquacul.*, 42: 207-215.
- Fresnedo, O. & Serra J. 1992. Effect of nitrogen starvation on the biochemistry of *Phormidium laminosum* (Cyanophyceae). *J. Phycol.*, 28: 786-793.
- Hadden-Carter P. & Storr J. 1984. Effects of acidic pH, Light and temperature on grow, morphology and photosynthesis of a green



- and a blue-green alga. Proceedings of the Second New York state. *Symposium on Atmospheric Deposition*, 217-226.
- Herbert D., Phipps P. & Straone R. 1971. Automated Chemical Analysis. In: Norris J. y Ribbons D. (Eds.), *Methods in microbiology*. Academic Press, Washington, EE.UU. 209-344.
- Kochert G. 1978. Carbohydrate determination by the phenol-sulfuric acid method. En Hellebust J. y Craigie J. (eds). *Handbook of Phycological Methods. Physiological and Biochemical Methods*. Cambridge University Press. Cambridge, RU. 95-97.
- Lobban C., Chapman D. & Kremer B. 1988. *Experimental Phycology: A laboratory manual*. Cambridge University Press. Nueva York, EE.UU. 295.
- Loreto C., Mora R., Marco E. & Morales E. 2005. Influencia del nitrato sobre la producción de biomasa, pigmentos y proteínas de la cianobacteria *Anabaena* sp. PCC 7120. *Ciencias*, 12(2): 137-143.
- Lowry O., Rosebrough H., Farr A. & Randall R. 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Biochem.*, 193: 265-275.
- McFaddin, J. 2000. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. 3<sup>a</sup> edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, EE.UU. 912.
- Marker A., Nusch E., Rai H. & Riamann, B. 1980. The Measurement of Photosynthetic Pigments in Freshwater and Standardization of Methods: Conclusions and Recommendations. *Arch. Hydrobiol., Egebn. Limnol.*, 14: 91-106.
- Marsh J. & Weinstein D. 1966. Simple charring method for determination of lipids. *J. Lipid Res.*, 7: 574-576.
- Olguin, E. J. Galicia, S. Angulo-Guerrero O. & Hernández E. 2001. The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina* sp. (*Arthrospira*) grown on digested pig waste. *Biores. Technol.*, 77: 19-24.
- Paniagua-Michel J. 1994. Biotecnología microalgal y obtención de productos químicos alimenticios. *Serie Científica UABCS*, 2: 109-119.
- Piorreck, M. Baasch K. & Pohl P. 1984. Biomass production, total protein, chlorophyll, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. *Phytochem.*, 23:207-216.
- Rangel-Yaguí C., Danesi E., Carvalho J. & Sato S. 2004. Chlorophyll production from *Spirulina platensis*: cultivation with urea addition by fed-batch process. *Biores. Technol.*, 92:133- 141.
- Rosales N., Ortega J., Mora R. & Morales E. 2005. Influencia de la salinidad sobre el crecimiento y composición bioquímica de la cianobacteria *Synechococcus* sp. *Cien. Mar.* 31(2) : 349-355.
- Sanchez Luna L., Converti A., Tonini G., Sunao S. & Carvalho J. 2004. Continuous and pulse feedings of urea as a nitrogen source in fed-batch cultivation of *Spirulina platensis*. *Aquacul. Engin.*, 31: 237-245.
- Shivaun D., McDonald K., & Jackman A. 1997. Effect of light irradiance on the production of sulfolipids from *Anabaena* 7120 in a fed-batch photobioreactor. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 67(1-2):139-152.
- Soletto D., Binaghi L., Lodi A., Carvalho J. & Converti A. 2005. Batch and fed-batch cultivations of *Spirulina platensis* using ammonium sulphate and urea as nitrogen sources. *Aquaculture*. 243: 217- 224.
- Ungsethaphand T., Peerapornpisa, Y., Whangchai N. & Sardud U. 2007. Productivity and chemical composition of *Spirulina platensis* using dry chicken manure as nitrogen sources, Proceedings of the 19th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology, Bangkok, Thailand. 43-48.
- Ungsethaphand T., Peerapornpisa Y. & Whangchai N. 2009. Production of *Spirulina platensis* using dry chicken manure supplemented with urea and sodium bicarbonate. *M. Int. J. Sci. Technol.*, 3(03): 379-387
- Utting S. 1985. Influence of nitrogen availability on the biochemical composition of three unicellular marine algae of commercial importance. *Aquaculture*. 56: 123-138.
- Vicente-García V., Ríos-Leal E., Calderón-Domínguez G., Cañizares-Villanueva R., & Olvera-Ramírez R. 2004. Detection, isolation, and characterization of exopolysaccharide produced by a strain of *Phormidium* 94a isolated from an arid zone of Mexico". *Biotechnol. Bioengin.*, 85(3): 306-310.
- Vieira Costa J., Linde G., Pires D., Martínez G. & Trapp K. 2004. Modelling of growth conditions for cyanobacterium *Spirulina platensis* in microcosms. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 16:15-18.
- Walach, M., Bazin M. & Pirt J. 1984. Computer control of carbon-nitrogen ratio in *Spirulina platensis*. *Biotechnol. Bioeng.*, 29: 520-528.
- Yim J., Kim S., Ahn S., Lee C., Rhee K. & Lee H. 2004. Antiviral effects of sulfated exopolysaccharide from the marine microalga *Gyrodinium impudicum* strain KG03. *Mar. Biotechnol.*, 6: 17-25.
- Yongmanitchai W. & Ward P. 1991. Growth of and omega-3 fatty acid production by *Phaeodactylum tricoratum* under different culture conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57(2) : 419-425.
- Zhang Y. & Chen F. 1997. High cell density mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucose for phycocyanin production using a fed-batch system. *Enzyme Microb. Technol.*, 20: 221-224.