



**UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL**  
**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES**

**CARRERA DE BIOLOGÍA**

**Trabajo de titulación previo a obtener el grado académico de  
Bióloga**

**Efectos de tres fuentes nitrogenadas sobre el crecimiento,  
productividad y composición bioquímica de la cianobacteria  
*Arthrospira* sp.**

**Autor: Karla Pamela Naranjo Luna**

**Tutor: Blgo. Ever Dario Morales Avendaño, Ph.D.**

**Guayaquil – Ecuador**

**2019**



**UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL**  
**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES**  
**CARRERA DE BIOLOGÍA**  
**UNIDAD DE TITULACIÓN**

**ANEXO 4**

Guayaquil, 27 de febrero del 2019

Sra.  
Blga. Dialhy Coello Salazar, MSc.  
**DIRECTORA DE CARRERA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES**  
**UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL**  
Ciudad.-

De mis consideraciones:

Envío a Ud. el Informe correspondiente a la tutoría realizada al Trabajo de Titulación Efectos de tres fuentes nitrogenadas sobre el crecimiento, productividad y composición bioquímica de la cianobacteria *Arthrospira* sp., de la estudiante Karla Pamela Naranjo Luna indicando ha cumplido con todos los parámetros establecidos en la normativa vigente:

- El trabajo es el resultado de una investigación.
- El estudiante demuestra conocimiento profesional integral.
- El trabajo presenta una propuesta en el área de conocimiento.
- El nivel de argumentación es coherente con el campo de conocimiento.

Adicionalmente, se adjunta el certificado de porcentaje de similitud y la valoración del trabajo de titulación con la respectiva calificación.

Dando por concluida esta tutoría de trabajo de titulación, **CERTIFICO**, para los fines pertinentes, que la estudiante está apta para continuar con el proceso de revisión final.

Atentamente,

**Blgo. Ever Dario Morales Avendaño, Ph.D**  
**TUTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN**  
**C.I. 0959966342**



**UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL**  
**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES**  
**CARRERA DE BIOLOGÍA**  
**UNIDAD DE TITULACIÓN**

**ANEXO 5**

**RÚBRICA DE EVALUACIÓN MEMORIA ESCRITA TRABAJO DE TITULACIÓN**

**TÍTULO DEL TRABAJO:** Efectos de tres fuentes nitrogenadas sobre el crecimiento, productividad y composición bioquímica de la cianobacteria *Arthrospira* sp.

**AUTOR:** KARLA PAMELA NARANJO LUNA

ASPECTOS EVALUADOS	PUNTAJE MÁXIMO	CALF.
<b>ESTRUCTURA ACADÉMICA Y PEDAGÓGICA</b>	<b>4.5</b>	<b>4.5</b>
Propuesta integrada a Dominios, Misión y Visión de la Universidad de Guayaquil.	0.3	0.3
Relación de pertinencia con las líneas y sublíneas de investigación Universidad/Facultad/Carrera.	0.4	0.4
Base conceptual que cumple con las fases de comprensión, interpretación, explicación y sistematización en la resolución de un problema.	1	1
Coherencia en relación a los modelos de actuación profesional, problemática, tensiones y tendencias de la profesión, problemas a encarar, prevenir o solucionar de acuerdo al PND-BV.	1	1
Evidencia el logro de capacidades cognitivas relacionadas al modelo educativo como resultados de aprendizaje que fortalecen el perfil de la profesión.	1	1
Responde como propuesta innovadora de investigación al desarrollo social o tecnológico.	0.4	0.4
Responde a un proceso de investigación – acción, como parte de la propia experiencia educativa y de los aprendizajes adquiridos durante la carrera.	0.4	0.4
<b>RIGOR CIENTÍFICO</b>	<b>4.5</b>	<b>4.5</b>
El título identifica de forma correcta los objetivos de la investigación.	1	1
El trabajo expresa los antecedentes del tema, su importancia dentro del contexto general, del conocimiento y de la sociedad, así como del campo al que pertenece, aportando significativamente a la investigación.	1	1
El objetivo general, los objetivos específicos y el marco metodológico están en correspondencia.	1	1
El análisis de la información se relaciona con datos obtenidos y permite expresar las conclusiones en correspondencia a los objetivos específicos.	0.8	0.8
Actualización y correspondencia con el tema, de las citas y referencia bibliográfica.	0.7	0.7
<b>PERTINENCIA E IMPACTO SOCIAL</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
Pertinencia de la investigación.	0.5	0.5
Innovación de la propuesta proponiendo una solución a un problema relacionado con el perfil de egreso profesional	0.5	0.5
<b>CALIFICACIÓN TOTAL *</b>	<b>10</b>	<b>10</b>

\*El resultado será promediado con la calificación del Tutor Revisor y con la calificación de obtenida en la Sustentación oral.

**Blgo. Ever Darío Morales Avendaño, Ph.D**  
**TUTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN**  
**C.I. 0959966342**

FECHA: lunes 27 de febrero del 2019



**UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL**  
**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES**  
**CARRERA DE BIOLOGÍA**  
**UNIDAD DE TITULACIÓN**

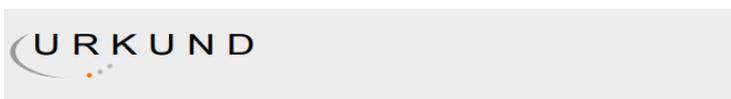
**ANEXO 6**

Guayaquil, 27 de febrero del 2019

**CERTIFICADO PORCENTAJE DE SIMILITUD**

Habiendo sido nombrado Ever Dario Morales Avendaño, tutor del trabajo de titulación certifico que el presente trabajo de titulación ha sido elaborado por Karla Pamela Naranjo Luna, C.I.: 0950721084, con mi respectiva supervisión como requerimiento parcial para la obtención del título de Bióloga.

Se informa que el trabajo de titulación Efectos de tres fuentes nitrogenadas sobre el crecimiento, productividad y composición bioquímica de la cianobacteria *Arthrospira* sp., ha sido orientado durante todo el periodo de ejecución en el programa antiplagio (URKUND) quedando el 1% de coincidencia.



**Urkund Analysis Result**

**Analysed Document:** Karla Documento para URKUND-1.docx (D48152236)  
**Submitted:** 2/21/2019 4:24:00 AM  
**Submitted By:** darevmo52@yahoo.com  
**Significance:** 1 %

**Sources included in the report:**

Evaluación de crecimiento de espirulina bajo alternativas de fertilización orgánica e inorgánica.docx (D30296830)  
TESIS KAROL SÁNCHEZ.pdf (D40818877)

**Instances where selected sources appear:**

2

**Blgo. Ever Dario Morales Avendaño, Ph.D**  
**TUTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN**  
**C.I. 0959966342**



**UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL**  
**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES**  
**CARRERA DE BIOLOGÍA**  
**UNIDAD DE TITULACIÓN**

**ANEXO 7**

Guayaquil, 14 de marzo del 2019

Sra.  
Blga. Dialhy Coello Salazar, MSc.  
**DIRECTORA DE CARRERA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES**  
**UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL**

De mis consideraciones:

Envío a Ud. el Informe correspondiente a la **REVISIÓN FINAL** del Trabajo de Titulación Efectos de tres fuentes nitrogenadas sobre el crecimiento, productividad y composición bioquímica de la cianobacteria *Arthrospira* sp., de la estudiante NARANJO LUNA KARLA PAMELA. Las gestiones realizadas me permiten indicar que el trabajo fue revisado considerando todos los parámetros establecidos en las normativas vigentes, en el cumplimiento de los siguientes aspectos:

Cumplimiento de requisitos de forma:

- El título tiene un máximo de 20 palabras.
- La memoria escrita se ajusta a la estructura establecida.
- El documento se ajusta a las normas de escritura científica seleccionadas por la Facultad.
- La investigación es pertinente con la línea y sublíneas de investigación de la carrera.
- Los soportes teóricos son de máximo 25 años.
- La propuesta presentada es pertinente.

Cumplimiento con el Reglamento de Régimen Académico:

- El trabajo es el resultado de una investigación.
- El estudiante demuestra conocimiento profesional integral.
- El trabajo presenta una propuesta en el área de conocimiento.
- El nivel de argumentación es coherente con el campo de conocimiento.

Adicionalmente, se indica que fue revisado, el certificado de porcentaje de similitud, la valoración del tutor, así como de las páginas preliminares solicitadas, lo cual indica que el trabajo de investigación cumple con los requisitos exigidos.

Una vez concluida esta revisión, considero que la estudiante NARANJO LUNA KARLA PAMELA está apta para continuar el proceso de titulación. Particular que comunicamos a usted para los fines pertinentes.

Atentamente,

Blgo. Telmo Ariel Escobar Troya, MSc.  
**TUTOR REVISOR**  
C.I. 0201316650



**UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL**  
**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES**  
**CARRERA DE BIOLOGÍA**  
**UNIDAD DE TITULACIÓN**

**ANEXO 8**

**RÚBRICA DE EVALUACIÓN MEMORIA ESCRITA TRABAJO DE TITULACIÓN**

**TÍTULO DEL TRABAJO:** Efectos de tres fuentes nitrogenadas sobre el crecimiento, productividad y composición bioquímica de la cianobacteria *Arthrospira sp.*

**AUTORA:** KARLA PAMELA NARANJO LUNA

ASPECTOS EVALUADOS	PUNTAJE MÁXIMO	CALF.
<b>ESTRUCTURA ACADÉMICA Y PEDAGÓGICA</b>	<b>4.5</b>	<b>4.5</b>
Propuesta integrada a Dominios, Misión y Visión de la Universidad de Guayaquil.	0.3	0.3
Relación de pertinencia con las líneas y sublíneas de investigación Universidad/Facultad/Carrera.	0.4	0.4
Base conceptual que cumple con las fases de comprensión, interpretación, explicación y sistematización en la resolución de un problema.	1	1
Coherencia en relación a los modelos de actuación profesional, problemática, tensiones y tendencias de la profesión, problemas a encarar, prevenir o solucionar de acuerdo al PND-BV.	1	1
Evidencia el logro de capacidades cognitivas relacionadas al modelo educativo como resultados de aprendizaje que fortalecen el perfil de la profesión.	1	1
Responde como propuesta innovadora de investigación al desarrollo social o tecnológico.	0.4	0.4
Responde a un proceso de investigación – acción, como parte de la propia experiencia educativa y de los aprendizajes adquiridos durante la carrera.	0.4	0.4
<b>RIGOR CIENTÍFICO</b>	<b>4.5</b>	<b>4.5</b>
El título identifica de forma correcta los objetivos de la investigación.	1	1
El trabajo expresa los antecedentes del tema, su importancia dentro del contexto general, del conocimiento y de la sociedad, así como del campo al que pertenece, aportando significativamente a la investigación.	1	1
El objetivo general, los objetivos específicos y el marco metodológico están en correspondencia.	1	1
El análisis de la información se relaciona con datos obtenidos y permite expresar las conclusiones en correspondencia a los objetivos específicos.	0.8	0.8
Actualización y correspondencia con el tema, de las citas y referencia bibliográfica.	0.7	0.7
<b>PERTINENCIA E IMPACTO SOCIAL</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
Pertinencia de la investigación.	0.5	0.5
Innovación de la propuesta proponiendo una solución a un problema relacionado con el perfil de egreso profesional	0.5	0.5
<b>CALIFICACIÓN TOTAL *</b>	<b>10</b>	<b>10</b>

\* El resultado será promediado con la calificación del Tutor Revisor y con la calificación de obtenida en la Sustentación oral.

**Blgo. Telmo Ariel Escobar Troya, MSc.**  
**DOCENTE TUTOR REVISOR**  
 No. C.I. 0201316650

**FECHA: jueves 14 de marzo del 2019**



**UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL**  
**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES**  
**CARRERA DE BIOLOGÍA**  
**UNIDAD DE TITULACIÓN**

**ANEXO 10**



**REPOSITORIO NACIONAL EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA**

FICHA DE REGISTRO DE TESIS/TRABAJO DE GRADUACIÓN			
<b>TÍTULO Y SUBTÍTULO:</b>	Efectos de tres fuentes nitrogenadas sobre el crecimiento, productividad y composición bioquímica de la cianobacteria <i>Arthrospira</i> sp.		
<b>AUTOR (ES) (apellidos/nombres):</b>	Naranjo Luna Karla Pamela		
<b>REVISOR(ES)/TUTOR(ES) (apellidos/nombres):</b>	<b>Revisor:</b> Escobar Troya Telmo Ariel <b>Tutor:</b> Morales Avendaño Ever Dario		
<b>INSTITUCIÓN:</b>	Universidad de Guayaquil		
<b>UNIDAD/FACULTAD:</b>	Facultad de Ciencias Naturales		
<b>MAESTRÍA/ESPECIALIDAD:</b>			
<b>GRADO OBTENIDO:</b>	Bióloga		
<b>FECHA DE PUBLICACIÓN:</b>	Abril, 2019	<b>No. DE PÁGINAS:</b>	110
<b>ÁREAS TEMÁTICAS:</b>	Desarrollo biotecnológico, conservación y aprovechamiento sostenible de los recursos naturales.		
<b>PALABRAS CLAVES/KEYWORDS:</b>	<i>Arthrospira</i> sp., fuentes nitrogenadas, agua de mar, relación N:P, asimilación de nutrientes.		
<b>RESUMEN/ABSTRACT (150-250 PALABRAS):</b>	<p>El presente estudio tuvo como finalidad la evaluación de tres fuentes nitrogenadas, sobre el crecimiento, productividad y composición bioquímica de <i>Arthrospira</i> sp., en cultivos discontinuos en agua de mar suplementada con una fuente de nitrógeno (fertilizantes grado comercial: <math>\text{NH}_4\text{NO}_3</math> 12 mM, <math>(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4</math> 12 mM y <math>\text{NH}_2\text{COCH}_2</math> 10 mM), <math>\text{K}_2\text{HPO}_4</math>, <math>\text{NaHCO}_3</math>, y cofactores (<math>\text{NiSO}_4</math>, <math>\text{Na}_2\text{MoO}_4</math> y <math>\text{FeSO}_4</math>), y medio estándar Zarrouk; flujo continuo de aire y pulsos de <math>\text{CO}_2</math> para mantener el pH (<math>9,9 \pm 0,3</math>). Los resultados mostraron que la mayor concentración de clorofila <i>a</i> se obtuvo en el cultivo con <math>\text{NH}_4\text{NO}_3</math> (<math>13,87 \text{ mg L}^{-1}</math>) y la de biomasa con <math>(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4</math> (<math>2,22 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}</math>), superando en un 58,3% al control; y productividad de <math>0,28 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}</math>. Por otra parte, la composición bioquímica varió en cada tratamiento, obteniendo así mayor producción de proteínas y ficobiliproteínas con <math>\text{NH}_4\text{NO}_3</math>: <math>393,92 \pm 0,08 \text{ mg g}^{-1}</math> y <math>39,39 \pm 2,2 \text{ mg g}^{-1}</math>; mayor producción de carbohidratos con <math>\text{NH}_2\text{COCH}_2</math>: <math>228,69 \pm 0,01 \text{ mg g}^{-1}</math>, 27,8% más que el control; y la mayor producción de lípidos con <math>(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4</math>: <math>276,24 \pm 17,24 \text{ mg g}^{-1}</math>, 9,1% sobre el control. En cuanto a la asimilación de nitrógeno y fósforo del medio, no hubo diferencias significativas entre control y tratamiento. Estos resultados muestran que los medios aquí formulados son una alternativa viable en el cultivo de <i>Arthrospira</i> sp. puesto que para producir un 1 kg de biomasa seca de esta cianobacteria con medio Zarrouk se invierten \$590, mientras que con los medios formulados, aproximadamente entre \$57 y \$90.</p>		
<b>ADJUNTO PDF:</b>	<input checked="" type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO	
<b>CONTACTO CON AUTOR/ES:</b>	<b>Teléfono:</b> 0967178014	<b>E-mail:</b> karlita.n.81@gmail.com	
<b>CONTACTO CON LA INSTITUCIÓN:</b>	<b>Nombre:</b> Facultad de Ciencias Naturales		
	<b>Teléfono:</b> 043080777 – 043080758		
	<b>E-mail:</b> fcnn@ug.edu.ec		



UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES  
CARRERA DE BIOLOGÍA  
UNIDAD DE TITULACIÓN

ANEXO 11

Guayaquil, 14 de marzo del 2019

## CERTIFICACIÓN DEL TUTOR REVISOR

Habiendo sido nombrado **EVER DARIO MORALES AVENDAÑO**, DOCENTE TUTOR, del trabajo de titulación Efectos de tres fuentes nitrogenadas sobre el crecimiento, productividad y composición bioquímica de la cianobacteria *Arthrospira* sp., certifico que el presente trabajo de titulación, elaborado por **NARANJO LUNA KARLA PAMELA**, con C.I. No. 0950721084, con mi respectiva supervisión como requerimiento parcial para la obtención del título de BIOLOGA, en la Carrera de Biología/Facultad de Ciencias Naturales, ha sido **REVISADO Y APROBADO** en todas sus partes, encontrándose apta para su sustentación.

Blgo. Telmo Ariel Escobar Troya, MSc.

DOCENTE TUTOR REVISOR

C.I. 0201316650



**UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL**  
**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES**  
**CARRERA DE BIOLOGÍA**  
**UNIDAD DE TITULACIÓN**

**ANEXO 12**

**LICENCIA GRATUITA INTRANSFERIBLE Y NO EXCLUSIVA PARA EL USO  
NO COMERCIAL DE LA OBRA CON FINES ACADÉMICOS**

Yo, KARLA PAMELA NARANJO LUNA, con C.I. No. 0950721084, certifico que los contenidos desarrollados en este trabajo de titulación, cuyo título es Efectos de tres fuentes nitrogenadas sobre el crecimiento, productividad y composición bioquímica de la cianobacteria *Arthrospira* sp., son de mi absoluta propiedad y responsabilidad Y SEGÚN EL Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN\*, autorizo el uso de una licencia gratuita intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la presente obra con fines académicos, en favor de la Universidad de Guayaquil, para que haga uso del mismo, como fuera pertinente.

**KARLA PAMELA NARANJO LUNA**  
**C.I. No. 0950721084**

\*CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN (Registro Oficial n. 899 - Dic./2016) Artículo 114.- De los titulares de derechos de obras creadas en las instituciones de educación superior y centros educativos.- En el caso de las obras creadas en centros educativos, universidades, escuelas politécnicas, institutos superiores técnicos, tecnológicos, pedagógicos, de artes y los conservatorios superiores, e institutos públicos de investigación como resultado de su actividad académica o de investigación tales como trabajos de titulación, proyectos de investigación o innovación, artículos académicos, u otros análogos, sin perjuicio de que pueda existir relación de dependencia, la titularidad de los derechos patrimoniales corresponderá a los autores. Sin embargo, el establecimiento tendrá una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra con fines académicos.



UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES  
CARRERA DE BIOLOGÍA  
UNIDAD DE TITULACIÓN

ANEXO 13

**Efectos de tres fuentes nitrogenadas sobre el crecimiento, productividad y composición bioquímica de la cianobacteria *Arthrospira* sp.**

**Autora:** Karla Pamela Naranjo Luna

**Tutor:** Blgo. Ever Dario Morales Avendaño, Ph.D.

**RESUMEN**

El presente estudio tuvo como finalidad la evaluación de tres fuentes nitrogenadas, sobre el crecimiento, productividad y composición bioquímica de *Arthrospira* spp., en cultivos discontinuos en agua de mar suplementada con una fuente de nitrógeno (fertilizantes grado comercial:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  12 mM,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  12 mM y  $\text{NH}_2\text{CONH}_2$  10 mM),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaHCO}_3$ , cofactores ( $\text{NiSO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  y  $\text{FeSO}_4$ ), medio estándar Zarrouk; flujo continuo de aire y pulsos de  $\text{CO}_2$  para mantener el pH ( $9,9 \pm 0,3$ ). Los resultados mostraron que la mayor concentración de clorofila *a* se observó en el cultivo con  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ( $13,87 \text{ mg L}^{-1}$ ) y la de biomasa con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ( $2,22 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$ ), superando en un 58,3% al control; y productividad de  $0,28 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . Por otra parte, la composición bioquímica varió en cada tratamiento, obteniendo así mayor producción de proteínas y ficobiliproteínas con  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ :  $393,92 \pm 0,08 \text{ mg g}^{-1}$  y  $39,39 \pm 2,2 \text{ mg g}^{-1}$ ; mayor producción de carbohidratos con  $\text{NH}_2\text{CONH}_2$ :  $228,69 \pm 0,01 \text{ mg g}^{-1}$ , 27,8% más que el control; y la mayor producción de lípidos con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ :  $276,24 \pm 17,24 \text{ mg g}^{-1}$ , 9,1% sobre el control. En cuanto a la asimilación de nitrógeno y fósforo del medio, no hubo diferencias significativas entre control y tratamiento. Estos resultados muestran que los medios aquí formulados son una alternativa viable en el cultivo de *Arthrospira* spp. puesto que para producir un 1 kg de biomasa seca de esta cianobacteria con medio Zarrouk se invierten \$590, mientras que con los medios formulados, aproximadamente entre \$57 y \$90.

**Palabras clave:** *Arthrospira* spp., fuentes nitrogenadas, agua de mar, relación N:P, asimilación de nutrientes.



UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES  
CARRERA DE BIOLOGÍA  
UNIDAD DE TITULACIÓN

ANEXO 14

**Effects of three nitrogen sources on the growth, productivity and biochemical composition of cyanobacteria *Arthrospira* sp.**

**Author:** Karla Pamela Naranjo Luna

**Tutor:** Blgo. Ever Dario Morales Avendaño, Ph.D.

**ABSTRACT**

The present study was aimed the evaluation of three nitrogenous sources, on the growth, productivity and biochemical composition of *Arthrospira* spp. in discontinuous or *batch* culture in seawater supplemented with a nitrogen source (commercial grade fertilizers: 12 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 12 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y 10 mM  $\text{NH}_2\text{CONH}_2$ ),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaHCO}_3$ , cofactors ( $\text{NiSO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  y  $\text{FeSO}_4$ ), Zarrouk standard medium; continuous flow of air and  $\text{CO}_2$  pulses to maintain pH ( $9,9 \pm 0,3$ ). The results showed that the highest concentration of chlorophyll *a* was observed in the culture with  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ( $13,87 \text{ mg L}^{-1}$ ), and the highest concentration of biomass with  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ( $2,22 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$ ), surpassing 58,3 % the control; and productivity of  $0,28 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . On the other hand, the biochemical composition varied in each treatment, thus obtaining higher production of proteins and phycobiliproteins with  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ :  $393,92 \pm 0,08 \text{ mg g}^{-1}$  and  $39,39 \pm 2,2 \text{ mg g}^{-1}$ , respectively, 23,2 % less than the control; higher production of carbohydrates with  $\text{NH}_2\text{CONH}_2$ :  $228,69 \pm 0,01 \text{ mg g}^{-1}$ , 27,8 % more than the control; and higher lipid production with  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ :  $276,24 \pm 17,24 \text{ mg g}^{-1}$ , 9,1 % over the control. Regarding the assimilation of nitrogen and phosphorus in the medium, there were no significant differences between control and treatment. These results show that the media formulated here are a viable alternative in the cultivation of *Arthrospira* spp. since to produce 1 kg of dry biomass of this cyanobacterium with Zarrouk medium, \$590 are invested, while with the formulated media, approximately between \$57 and \$90.

**Keywords:** *Arthrospira* spp., nitrogenous sources, seawater, N: P ratio, nutrient assimilation.

©**Derechos de Autor**

Karla Pamela Naranjo Luna

2019

## **DIRECTOR DE TESIS**

En mi calidad de Tutor de esta Tesis certifico que, el presente trabajo ha sido elaborado por la señorita Karla Pamela Naranjo Luna, por lo cual autorizo su presentación



**Blgo. Ever Darío Morales Avendaño, Ph.D.**  
**Director de tesis**

## **DEDICATORIA**

A mis padres, por su amor, apoyo y motivación en mis estudios.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, por ser el pilar principal en mi vida.

A mis padres, por su apoyo y motivación durante el desarrollo de mis estudios.

AL Blgo. Xavier Álvarez Montero, Ph.D. mentor en el estudio de las cianobacterias.

Al PhD. Ever Morales Avendaño por su dirección y aporte en este trabajo de investigación.

A la Dra. Olga Arévalo, directora del Laboratorio de Química Ambiental, por sus consejos y orientación.

A mi novio, Carlos Asitimbay por su motivación.

A mis compañeras de laboratorio, Andrea Cruz, Génesis Chonillo e Ingrid Mercado, por el apoyo prestado para poder culminar esta investigación.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN .....	1
CAPÍTULO I.....	3
1.1. Planteamiento del problema .....	3
1.2. Objetivos .....	4
1.2.1. Objetivo General .....	4
1.2.2. Objetivos Específicos .....	4
1.3. Justificación e importancia .....	5
1.4. Hipótesis .....	7
CAPÍTULO II .....	8
2.1. Antecedentes .....	8
2.2. Marco teórico .....	11
2.2.1. Generalidades de las cianobacterias.....	11
2.2.2. Estructura celular de las cianobacterias.....	13
2.2.3. Inclusiones celulares .....	15
2.2.4. Fisiología nutricional.....	16
2.2.5. Género <i>Arthrospira</i> .....	23
2.2.6. Composición bioquímica .....	23
2.2.7. Aplicaciones.....	25
2.2.8. Cultivo .....	28
2.2.9. Fertilizantes en el cultivo de cianobacterias .....	32
2.2.10. Ciclo de vida .....	32
2.2.11. Estado del género .....	33
CAPÍTULO III .....	35
3.1. Materiales y métodos.....	35
3.1.1. Microorganismo .....	35

3.1.2.	Diseño experimental .....	35
3.1.3.	Preparación de medios de cultivo .....	36
3.1.4.	Condiciones de cultivo de <i>Arthrospira</i> spp. ....	37
3.1.5.	Determinación de clorofila <i>a</i> .....	38
3.1.1.	Determinación de tasa de crecimiento específica $\mu$ .....	38
3.1.2.	Determinación de peso seco en biomasa .....	39
3.1.3.	Evaluación de composición bioquímica .....	39
3.1.4.	Determinación de concentración de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), urea ( $\text{NH}_2\text{CONH}_2$ ) y fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) en sobrenadante .....	43
3.1.5.	Análisis estadísticos .....	44
3.1.6.	Análisis de costo de biomasa.....	44
CAPÍTULO IV .....		45
4.1.	Resultados .....	45
4.1.1.	Determinación de clorofila <i>a</i> .....	45
4.1.2.	Determinación de tasa de crecimiento específica ( $\mu$ ) .....	46
4.1.3.	Determinación de peso seco .....	47
4.1.4.	Evaluación de composición bioquímica .....	49
4.1.4.1.	Determinación de proteínas .....	49
4.1.4.2.	Determinación de ficobiliproteínas .....	50
4.1.4.3.	Determinación de carbohidratos de biomasa .....	51
4.1.4.4.	Determinación de lípidos de biomasa .....	52
4.1.5.	Determinación de nutrientes en sobrenadante .....	53
4.1.6.	Análisis de costos de biomasa.....	53
Discusión.....		56
Conclusiones .....		60
Recomendaciones .....		61

Referencias Bibliográficas .....	62
Apéndices o Anexos .....	91

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Diseño experimental del estudio: factores evaluados y variables respuesta.....	35
<b>Tabla 2.</b> Constitución del medio de cultivo estándar Zarrouk (Zarrouk, 1966). 36	
<b>Tabla 3.</b> Constitución de medios de cultivo en agua de mar suplementados con fertilizantes agrícolas (1 L). .....	37
<b>Tabla 4.</b> Concentración de nitrógeno efectivo. ....	53
<b>Tabla 5.</b> Costo de producción de 1 L de medio de cultivo estándar Zarrouk. ...	54
<b>Tabla 6.</b> Costo de producción de 1 L de medio de cultivo con agua de mar suplementada con fertilizantes ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y $\text{NH}_2\text{CONH}_2$ ) y sales nutritivas. ....	54
<b>Tabla 7.</b> Parámetros físico-químicos evaluados del agua de mar. ....	91
<b>Tabla 8.</b> Volumen de soluciones para elaboración de curva patrón de proteínas. ....	91
<b>Tabla 9.</b> Volumen de soluciones para elaboración de curva patrón de carbohidratos. ....	92
<b>Tabla 10.</b> Volumen de soluciones para elaboración de curva patrón de lípidos. ....	93

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Crecimiento de *Arthrospira* spp. determinado mediante concentración de clorofila *a* en cultivo en *batch*, en medio Zarrouk (control) y medio constituido de agua de mar suplementada con fertilizantes agrícolas (a):  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  12 mM; b):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  12 mM; c):  $\text{NH}_2\text{CONH}_2$  10 mM), bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) y fosfato de potasio dibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ); en fotobiorreactores de 200 mL con fotoperiodo luz : oscuridad (n=3). .....45
- Figura 2.** Tasa de crecimiento específica ( $\mu$ ) en cultivo en *batch* de *Arthrospira* spp. en medio Zarrouk (control) y medio constituido de agua de mar suplementada con fertilizantes agrícolas (tratamientos: a)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  12 mM; b)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  12 mM; c)  $\text{NH}_2\text{CONH}_2$  10 mM), bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) y fosfato de potasio dibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) (n=3). .....46
- Figura 3.** Peso seco en cultivo en *batch* de *Arthrospira* spp. en medio Zarrouk (control) y medio constituido de agua de mar suplementada con fertilizantes agrícolas (tratamientos: a)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  12 mM; b)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  12 mM; c)  $\text{NH}_2\text{CONH}_2$  12 mM), bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) y fosfato de potasio dibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) (n=3). .....47
- Figura 4.** Contenido proteico de biomasa húmeda en cultivo en *batch* de *Arthrospira* spp. en medio Zarrouk (control) y medio constituido de agua de mar suplementada con fertilizantes agrícolas (tratamientos: a)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  12 mM; b)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  12 mM; c)  $\text{NH}_2\text{CONH}_2$  10 mM), bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) y fosfato de potasio dibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) (n=3). .....49
- Figura 5.** Contenido de ficobiliproteínas en cultivo en *batch* de *Arthrospira* spp. en medio Zarrouk (control) y medio constituido de agua de mar suplementada con fertilizantes agrícolas (tratamientos: a)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  12 mM; b)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  12 mM; c)  $\text{NH}_2\text{CONH}_2$  10mM), bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) y fosfato de potasio dibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) (n=3). .....50
- Figura 6.** Concentración de carbohidratos en biomasa en cultivo en *batch* de *Arthrospira* spp. en medio Zarrouk (control) y medio constituido de agua de mar

suplementada con fertilizantes agrícolas (tratamientos: a)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  12 mM; b)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  12 mM; c)  $\text{NH}_2\text{CONH}_2$  10 mM), bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) y fosfato de potasio dibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) (n=3). .....51

**Figura 7.** Concentración de lípidos en biomasa en cultivo en *batch* de *Arthrospira* spp. en medio Zarrouk (control) y medio constituido de agua de mar suplementada con fertilizantes agrícolas (tratamientos:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  12 mM;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  12 mM;  $\text{NH}_2\text{CONH}_2$  10 mM), bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) y fosfato de potasio dibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) (n=3). .....52

**Figura 8.** Curva patrón para determinación de concentración de proteínas. ....91

**Figura 9.** Curva patrón para determinación de concentración de carbohidratos.  
.....92

**Figura 10.** Curva patrón para determinación de concentración de lípidos. ....93

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Análisis físico-químico del agua de mar.....	91
<b>Anexo 2.</b> Preparación de curva patrón de proteínas.....	91
<b>Anexo 3.</b> Preparación de curva patrón de carbohidratos. ....	92
<b>Anexo 4.</b> Preparación de curva patrón de lípidos.....	93

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C	grados centígrados
$\mu$	tasa de crecimiento específica
$\mu \text{ d}^{-1}$	tasa de crecimiento específica por día
$\mu\text{L}$	microlitro
$\mu\text{m}$	micrómetro
$\mu\text{mol}$	micromol
$\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	densidad de flujo fotónico (irradiancia lumínica)
Chl <i>a</i>	clorofila <i>a</i>
cm	centímetro
CO <sub>2</sub>	dióxido de carbono
FeSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	sulfato de hierro heptahidratado
g L <sup>-1</sup>	gramos litro
g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	gramos litro día
HClO <sub>4</sub>	ácido perclórico
HCO <sub>3</sub>	bicarbonato
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	ácido sulfúrico
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	dicromato de potasio
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	fosfato de potasio dibásico
kt año <sup>-1</sup>	kilo tonelada año
M	molar
mg kg <sup>-1</sup>	miligramo kilogramo
mg L <sup>-1</sup>	miligramo litro

mg g <sup>-1</sup>	miligramo gramo
mL	mililitro
mM	milimolar
nm	nanómetro
N:P	relación nitrógeno fósforo
N <sub>2</sub>	nitrógeno molecular
NaCl	cloruro de sodio
NaHCO <sub>3</sub>	bicarbonato de sodio
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	molibdato de sodio
NaNO <sub>3</sub>	nitrate de sodio
NaOH	hidróxido de sodio
Na <sub>3</sub> PO <sub>5</sub>	fosfato de sodio
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	sulfato de amonio
NiSO <sub>4</sub>	sulfato de níquel
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	nitrate
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	nitrito
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	amonio
NH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>	urea
PCC	Pasteur Culture Collection
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	fosfato
rcf o g	fuerza centrífuga relativa o fuerza g
rpm	revoluciones por minuto
v/v	relación volumen volumen

## **Efectos de tres fuentes nitrogenadas sobre el crecimiento, productividad y composición bioquímica de la cianobacteria *Arthrospira* sp.**

**Autora:** Karla Pamela Naranjo Luna

**Tutor:** Blgo. Ever Dario Morales Avendaño, PhD

### **RESUMEN**

El presente estudio tuvo como finalidad la evaluación de tres fuentes nitrogenadas, sobre el crecimiento, productividad y composición bioquímica de *Arthrospira* spp., en cultivos discontinuos en agua de mar suplementada con una fuente de nitrógeno (fertilizantes grado comercial:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  12 mM,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  12 mM y  $\text{NH}_2\text{CONH}_2$  10 mM),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaHCO}_3$ , cofactores ( $\text{NiSO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  y  $\text{FeSO}_4$ ), medio estándar Zarrouk; flujo continuo de aire y pulsos de  $\text{CO}_2$  para mantener el pH ( $9,9 \pm 0,3$ ). Los resultados mostraron que la mayor concentración de clorofila *a* se observó en el cultivo con  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ( $13,87 \text{ mg L}^{-1}$ ) y la de biomasa con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ( $2,22 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$ ), superando en un 58,3% al control; y productividad de  $0,28 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . Por otra parte, la composición bioquímica varió en cada tratamiento, obteniendo así mayor producción de proteínas y ficobiliproteínas con  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ :  $393,92 \pm 0,08 \text{ mg g}^{-1}$  y  $39,39 \pm 2,2 \text{ mg g}^{-1}$ ; mayor producción de carbohidratos con  $\text{NH}_2\text{CONH}_2$ :  $228,69 \pm 0,01 \text{ mg g}^{-1}$ , 27,8% más que el control; y la mayor producción de lípidos con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ :  $276,24 \pm 17,24 \text{ mg g}^{-1}$ , 9,1% sobre el control. En cuanto a la asimilación de nitrógeno y fósforo del medio, no hubo diferencias significativas entre control y tratamiento. Estos resultados muestran que los medios aquí formulados son una alternativa viable en el cultivo de *Arthrospira* spp. puesto que para producir un 1 kg de biomasa seca de esta cianobacteria con medio Zarrouk se invierten \$590, mientras que con los medios formulados, aproximadamente entre \$57 y \$90.

**Palabras clave:** *Arthrospira* spp., fuentes nitrogenadas, agua de mar, relación N:P, asimilación de nutrientes.

## Effects of three nitrogen sources on the growth, productivity and biochemical composition of cyanobacteria *Arthrospira* sp.

**Author:** Karla Pamela Naranjo Luna

**Tutor:** Blgo. Ever Dario Morales Avendaño, PhD.

### ABSTRACT

The present study was aimed the evaluation of three nitrogenous sources, on the growth, productivity and biochemical composition of *Arthrospira* spp. in discontinuous or *batch* culture in seawater supplemented with a nitrogen source (commercial grade fertilizers: 12 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 12 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y 10 mM  $\text{NH}_2\text{CONH}_2$ ),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaHCO}_3$ , cofactors ( $\text{NiSO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  y  $\text{FeSO}_4$ ), Zarrouk standard medium; continuous flow of air and  $\text{CO}_2$  pulses to maintain pH ( $9,9 \pm 0,3$ ). The results showed that the highest concentration of chlorophyll *a* was observed in the culture with  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ( $13,87 \text{ mg L}^{-1}$ ), and the highest concentration of biomass with  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ( $2,22 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$ ), surpassing 58,3 % the control; and productivity of  $0,28 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . On the other hand, the biochemical composition varied in each treatment, thus obtaining higher production of proteins and phycobiliproteins with  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ :  $393,92 \pm 0,08 \text{ mg g}^{-1}$  and  $39,39 \pm 2,2 \text{ mg g}^{-1}$ , respectively, 23,2 % less than the control; higher production of carbohydrates with  $\text{NH}_2\text{CONH}_2$ :  $228,69 \pm 0,01 \text{ mg g}^{-1}$ , 27,8 % more than the control; and higher lipid production with  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ :  $276,24 \pm 17,24 \text{ mg g}^{-1}$ , 9,1 % over the control. Regarding the assimilation of nitrogen and phosphorus in the medium, there were no significant differences between control and treatment. These results show that the media formulated here are a viable alternative in the cultivation of *Arthrospira* spp. since to produce 1 kg of dry biomass of this cyanobacterium with Zarrouk medium, \$590 are invested, while with the formulated media, approximately between \$57 and \$90.

**Keywords:** *Arthrospira* spp., nitrogenous sources, seawater, N: P ratio, nutrient assimilation.

## INTRODUCCIÓN

Las cianobacterias son microorganismos procariotas Gram-negativos que tienen la capacidad de sintetizar carbono orgánico a partir de carbono inorgánico, utilizando la energía lumínica, proceso conocido como fotosíntesis oxigénica (Gutu & Kehoe, 2012). Poseen una morfología simple, carecen de orgánulos internos (Vincent, 2009). Además de un sistema altamente elaborado y organizado de estructuras fotosintéticas, los tilacoides cianobacterianos, que contienen clorofila *a* (Liberton *et al.*, 2013). Asimismo, poseen estructuras compuestas por ficobiliproteínas, los ficobilisomas, ubicados en la superficie externa de los tilacoides, que mejoran la captación de luz y la transferencia de energía a los centros de reacción fotosintéticos (Sukenik, Zohary, & Padisak, 2009).

Las cianobacterias al igual que otros organismos fotosintéticos, pueden adaptarse a la intensidad y tipo de luz del medio, regulando los complejos de pigmentos antena, los centros de reacción fotoquímica y las enzimas de fijación del dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) para poder optimizar la absorción y utilización de la energía lumínica, proceso conocido como adaptación cromática (Gutu & Kehoe, 2012). Adicionalmente, pueden crecer en un amplio rango de concentraciones de CO<sub>2</sub>, desde CO<sub>2</sub> en el aire hasta concentraciones nanomolares de CO<sub>2</sub> disueltas en medios acuosos, regulado a través del mecanismo de concentración de carbono inorgánico (MCC) (Sukenik *et al.*, 2009).

Al igual que las microalgas, presentan requerimientos nutricionales basados en soluciones nutritivas compuestas de sales químicas y agua, que conjuntamente con la energía lumínica y CO<sub>2</sub> potencian el crecimiento y producción de biomasa. La masificación de estos microorganismos requiere de un alto consumo de energía, agua y nutrientes (Singh & Sikarwar, 2014), nutrientes esenciales como carbono, nitrógeno, fósforo, azufre, hierro, potasio, y otros, tomando en cuenta la relación universal de Redfield C:N:P de la composición elemental del fitoplancton, que indica que todos los elementos esenciales deben estar en

proporciones adecuadas y en forma química disponible en el medio de cultivo (Spaargaren, 1996), proporción que varía en relación a la plasticidad de los organismos fotosintéticos (García *et al.*, 2018).

*Arthrospira* spp. es una cianobacteria filamentosa fotosintética de interés comercial por su rica composición en proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos, lípidos, vitaminas y pigmentos, extensamente utilizada en alimentación, productos farmacéuticos y cosméticos (Sánchez, Bernal-Castillo, Rozo, & Rodríguez, 2003). Su cultivo está asociado a variables físicas y químicas, como temperatura, pH, intensidad lumínica y fuentes de carbono y nitrógeno, y dado que este microorganismo habita en ambientes alcalinos y con presencia de sales, es posible su cultivo con sales inorgánicas (Ferreira, Rodrigues, Converti, Sato, & Carvalho, 2010).

Su costo de producción está directamente relacionado a la composición del medio de cultivo empleado (sales de nitrato grado analítico), por ello, es esencial el empleo de sustancias similares a las sales grado analítico de los medios de cultivo estándar (Kumari, Pathak, & Guria, 2015). En consecuencia, algunos autores han estudiado el uso de fertilizantes grado comercial principalmente urea y sales de amonio, que contienen nutrientes esenciales como carbono, nitrógeno y fósforo, como sustituyentes de la fuente de nitrógeno del medio de cultivo (Ak, Oğuz, Benas, & Göksan, 2013; Muhamad *et al.*, 2015; Sukumaran *et al.*, 2018).

Por lo anteriormente descrito, el presente estudio pretende evaluar tres fuentes nitrogenadas (fertilizantes:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_2\text{CONH}_2$ ) en el cultivo discontinuo o *batch* de la cianobacteria *Arthrospira* spp. y determinar su factibilidad como posible fuente alterna al  $\text{NaNO}_3$  propio del medio de cultivo estándar Zarrouk, con la finalidad de reducir costos de producción, utilizando productos de fácil adquisición en el mercado.

## CAPÍTULO I

### 1.1. Planteamiento del problema

*Arthrospira* spp. presenta una compleja composición bioquímica basada en proteínas, lípidos, carbohidratos, pigmentos, minerales, vitaminas, etc., compuestos considerados de alto valor nutricional y con potencial biotecnológico, y en consecuencia, relevantes para industrias farmacéuticas, cosméticas, nutracéuticas, médicas y agropecuarias (Mostafa & Gawish, 2009).

La producción a gran escala de esta cianobacteria implica el uso de nutrientes elementales (macro y micronutrientes) en el crecimiento, productividad y composición bioquímica, estos nutrientes de grado analítico presentan elevados costos, y su uso para producción masiva de microorganismos autótrofos hace el proceso poco sostenible. Por esta razón, se ha evaluado el uso de diferentes fuentes de nutrientes que cumplan con los requerimientos adecuados para la síntesis y producción de metabolitos, tanto de microalgas como cianobacterias. Dentro de esas fuentes podemos mencionar los fertilizantes, que presentan precios asequibles en el mercado o son de fácil adquisición, así como también aguas residuales (Maldonado, 2014).

En consecuencia, el presente estudio busca evaluar y comparar la eficiencia de tres fertilizantes grado comercial en medios de cultivo para *Arthrospira* spp., como una alternativa económica en la producción a gran escala de microorganismos autótrofos sin que se vea afectado el crecimiento, productividad y composición bioquímica. Conocimiento que podría contribuir a empresas nacionales (Andespirulina – MEDCU – Mertens & Aso.) en la optimización de medios de cultivo para la producción de *Arthrospira* spp..

## 1.2. Objetivos

### 1.2.1. Objetivo General

- Evaluar el efecto de tres fuentes nitrogenadas en el crecimiento, productividad y composición bioquímica de *Arthrospira* spp.

### 1.2.2. Objetivos Específicos

- Evaluar el crecimiento de *Arthrospira* spp. medido como concentración de clorofila *a* y tasa de crecimiento específica ( $\mu$ ) en cultivos discontinuos con tres fuentes nitrogenadas.
- Cuantificar la productividad de *Arthrospira* spp. determinada por peso seco en cultivos discontinuos con tres fuentes nitrogenadas.
- Determinar la composición bioquímica en biomasa de *Arthrospira* spp. en cultivos discontinuos con tres fuentes nitrogenadas.
- Analizar la asimilación de las fuentes nitrogenadas y fosfato en el cultivo discontinuo de *Arthrospira* spp.

### 1.3. Justificación e importancia

Las cianobacterias son un grupo diverso de microorganismos procariotas capaces de realizar la fotosíntesis oxigénica, con diversidad morfológica (unicelular o pluricelular), estructural y fisiológica que les permite adaptarse a diferentes parámetros ambientales (Rosales-Loaiza, Guevara, Lodeiros, & Morales, 2008; Abed, Dobretsov, & Sudesh, 2009). Por esta razón, su importancia biotecnológica como fuente en la producción de compuestos bioquímicos de gran valor económico y aplicaciones en el sector farmacéutico y nutracéutico (Nuhu, 2013), agropecuario (Sahu, Priyadarshani, & Rath, 2012; Rincón Rodríguez *et al.*, 2013), biorremediación (Pilco & Viera, 2014), biocombustibles (Pamar, Kumar, Pandey, Gnasounou, & Madamwar, 2011), tratamiento de aguas residuales (Mezzomo *et al.*, 2010) y bioplásticos (Torrado, 2016).

*Arthrospira* (*Spirulina*) es una cianobacteria alcalófila filamentosa multicelular que ha ganado el interés de la comunidad científica por su contenido proteico (60-70%), de carbohidratos (15-25%), ácidos grasos esenciales (18%), minerales, vitaminas, pigmentos fotosintéticos (clorofila a, ficobiliproteínas y carotenoides) y polisacáridos (Mostafa & Gawish, 2009; Bhowmik, Dubey, & Mehra, 2010; Castro *et al.*, 2015). Por su característica composición bioquímica, se utiliza como suplemento alimenticio para animales y humanos (Devanathan & Ramanathan, 2012; Rincón *et al.*, 2013), como colorante en las industrias farmacéuticas, cosmética y alimentaria (Marrez, Naguib, Sultan, Daw, & Higazy, 2013), biofertilizante (Albuja, Araujo, & López, 2011; García, 2016) y otros. Además de poseer actividad antimicrobiana (Usharani, Srinivasan, Sivasakthi, & Saranraj, 2015), antioxidante (Piñero, Bermejo, & Villar, 2001) e inmunosupresora (Abed *et al.*, 2009).

El cultivo de *Arthrospira* spp. requiere de un suministro de nutrientes, basado en macronutrientes (azufre, calcio, carbono, fósforo, hidrógeno, magnesio, nitrógeno, oxígeno y potasio) y micronutrientes (cobalto, cobre, hierro, manganeso y molibdeno), en concentraciones que dependen del objetivo de estudio y de la especie estudiada (Ochoa, 2016). La relación N:P es esencial en

los medios de cultivo puesto que mientras más próxima se encuentre a la composición del microorganismo en estudio, mayor será el crecimiento y asimilación de nutrientes (Gonzalez, 2010).

La producción a gran escala de esta cianobacteria implica una variedad de reactivos de grado analítico que no son sostenibles para llevar a volúmenes mayores. Por tanto, algunos autores han evaluado el uso de fertilizantes de diferente composición química para abaratar costos de producción, mostrando resultados favorables en la obtención de biomasa en relación a medios de cultivo estándares (Guzmán-Murillo *et al.*, 2007; Mezzomo *et al.*, 2010; Madkour *et al.*, 2012; Kumari *et al.*, 2015; Muhamad *et al.*, 2015; Burgos-Rada, Jiménez-Forero, & Ramírez-Merlano, 2016; Ochoa, 2016). Sin embargo, son pocos los estudios sobre la influencia de este tipo de nutrientes en la composición bioquímica, crecimiento y productividad de *Arthrospira* spp. (Madkour *et al.*, 2012; Muhamad *et al.*, 2015).

Gran parte de investigaciones realizadas están enfocadas específicamente en microalgas y el efecto de variaciones en las condiciones de cultivo (nutrientes, intensidad lumínica, pH, temperatura, salinidad) (Muñoz-Peñuela *et al.*, 2011; Ortiz-Moreno, Cortés-Castillo, Sánchez-Villarraga, Padilla, & Otero-Paternina, 2012; Burgos-Rada *et al.*, 2016; Ochoa, 2016; Panta, Macay, Moncayo, & Vélez, 2016; Silva-Benavides, 2016).

Esta investigación pretende determinar el efecto de tres fuentes nitrogenadas sobre el crecimiento, productividad y composición bioquímica de *Arthrospira* spp. El estudio está basado en la formulación de tres medios de cultivo constituidos de agua de mar (micronutrientes en su composición), suplementada con fuentes nitrogenadas provenientes de fertilizantes grado comercial (urea,  $\text{NH}_2\text{CONH}_2$ ; nitrato de amonio,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; y sulfato de amonio,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) y  $\text{NaHCO}_3$ , compuesto fundamental en el cultivo de *Arthrospira* spp.; debido a que es esencial como fuente de carbono para su crecimiento y de igual modo, contribuye a alcalinizar el medio. Además del uso de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  para mantener la relación N:P (10:1) del medio de cultivo estándar Zarrouk ( $\text{NaNO}_3 - \text{K}_2\text{HPO}_4$ ) (Zarrouk, 1966).

#### 1.4. Hipótesis

##### **Hipótesis nula ( $H_0$ ):**

El crecimiento, productividad y composición bioquímica de *Arthrospira* spp. en cultivo con diferentes fuentes nitrogenadas de grado comercial no varía en relación al medio de cultivo estándar Zarrouk.

##### **Hipótesis alternativa ( $H_a$ ):**

El crecimiento, productividad y composición bioquímica de *Arthrospira* spp. en cultivo con diferentes fuentes nitrogenadas de grado comercial varía en relación al medio de cultivo estándar Zarrouk.

## CAPÍTULO II

### 2.1. Antecedentes

La cianobacteria *Arthrospira* (*Spirulina*) se encuentra disponible en el mercado bajo diferentes especificaciones y presentaciones, como tabletas, cápsulas, polvo o líquido, y se produce en al menos 22 países como Benín, Brasil, Burkina Faso, Chad, Chile, Costa de Marfil, Costa Rica, Cuba, Ecuador, España, Madagascar, Myanmar, Perú, Tailandia, Togo y Vietnam. El cultivo de esta cianobacteria fue registrado por los colonizadores españoles desde el siglo XVI en el lago Texcoco, México, donde los pobladores aztecas la cosechaban, secaban al aire libre y utilizaban para la elaboración de alimentos como tortas y tortillas (Arias, 2010; Gómez & Gracia, 2013; Argento, Sempere, & van Lierde, 2016).

El cultivo comercial a gran escala se produjo a partir del año 70 en México, siendo los principales productores Estados Unidos, Japón, India y China, seguido de Rusia, Francia, Alemania, Israel, Italia y España, que realizan estudios y producciones significativas (Ponce, 2013).

La creciente demanda en la producción biotecnológica de microalgas y cianobacterias, ha impulsado la investigación y desarrollo de nuevas formas y medios de cultivo para aumentar la obtención de compuestos de interés comercial, como aquellos basados en fertilizantes grado comercial, por su fácil disponibilidad en el mercado y bajos costos (Guzmán-Murillo *et al.*, 2007).

Acién *et al.* (2012) enuncian en su estudio que el mercado de biomasa microalgal produce 5 kt año<sup>-1</sup> con un costo de producción de \$25 000 t<sup>-1</sup>. Por ejemplo, la astaxantina (carotenoide) producida por la microalga *Haematococcus pluvialis* presenta un tamaño de mercado de \$200 millones año<sup>-1</sup>, con un precio de \$2 000 kg<sup>-1</sup> (Acién, & Molina-Grima, 2013). Actualmente, se estima que la producción anual de *Arthrospira* spp. es de aproximadamente 3000 ton por parte de China, India, EE.UU., Myanmar y Japón (Spolaore, Joannis-Cassan, Duran, & Isambert, 2006; Priyadarshani & Rath, 2012).

De, Chaudhury & Bhattacharyya (1999), estudiaron el efecto de fuentes nitrogenadas grado comercial (fosfato de amonio dibásico, nitrato de sodio, nitrato de amonio y cloruro de amonio) en la acumulación de ácido  $\gamma$ -linolénico en *Spirulina platensis*. Los resultados mostraron que el fosfato amonio dibásico es la fuente nitrogenada más adecuada para el crecimiento de *S. platensis*, con un aumento en el contenido de ácido  $\gamma$ -linolénico ( $35,5 \pm 0,13\%$ , p/p) a concentraciones bajas de nitrógeno ( $0,041 \text{ g de N L}^{-1}$ ), comparable al control con nitrato de sodio ( $31,2 \pm 0,23\%$ , p/p). Además el contenido de lípidos en biomasa seca fue de  $12,2 \pm 0,03\%$ , p/p para fosfato de amonio dibásico, mientras que para nitrato de sodio,  $14,1 \pm 0,012\%$ , p/p.

Vieira *et al.* (2001) estudiaron el uso de diferentes concentraciones (10 – 30 – 50 mM) de fuentes de nitrógeno grado comercial (cloruro de amonio, fosfato ácido de amonio, nitrato de amonio, urea y sulfato de amonio) en un fotobiorreactor aireado, con temperatura a  $30^\circ\text{C}$ , iluminación de 1900 lux y fotoperiodo 12 h-luz / 12 h-oscuridad, durante un período de 672 h. La máxima producción de biomasa se produjo en el medio control con nitrato de sodio (10 mM:  $1,559 \text{ g L}^{-1}$ ; 30 mM:  $1,992 \text{ g L}^{-1}$ ; 50 mM:  $1,628 \text{ g L}^{-1}$ ), seguido de nitrato de amonio (10 mM:  $0,993 \text{ g L}^{-1}$ ) y urea (10 mM:  $0,910 \text{ g L}^{-1}$ ).

Avila-Leon *et al.* (2012) evaluaron el efecto de diferentes tasas de dilución ( $0,04 - 0,44 \text{ d}^{-1}$ ) y concentraciones de urea (0,5 – 5 mM) en el crecimiento, parámetros cinéticos, composición de biomasa y eliminación de nitrógeno en el cultivo continuo de *Arthrospira platensis*. Los mejores resultados fueron observados con 5 mM de urea, obteniendo una concentración máxima de biomasa en estado estacionario de  $1,415 \text{ g L}^{-1}$ , sin embargo, el contenido de proteínas disminuyó y aumento en relación a la tasa de dilución (18,6 - 70,9%). La asimilación de nitrógeno alcanzó el 99% en estado estacionario.

Bezerra *et al.* (2013) estudiaron el efecto del uso combinado de  $\text{CO}_2$  puro y  $\text{CO}_2$  liberado de la fermentación alcohólica, urea como fuente de nitrógeno combinado e intensidad lumínica ( $60 - 120 - 240 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) en cultivo en *batch* en un fotobiorreactor tubular como alternativa factible y barata para cultivar *Arthrospira platensis*. El tipo de fuente de carbono no mostró influencia

en los parámetros de cultivo; la intensidad lumínica ( $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y la sustitución de nitrato de sodio por urea no presentaron diferencias significativas en la concentración celular y productividad,  $2968 \pm 24 \text{g m}^{-3}$  y  $428 \pm 4,0 \text{g m}^{-3} \text{d}^{-1}$  –  $2960 \pm 35 \text{g m}^{-3}$  y  $425 \pm 5,9 \text{g m}^{-3} \text{d}^{-1}$ , respectivamente.

Cruz-Martínez *et al.* (2015) evaluaron el crecimiento y composición bioquímica de *Arthrospira (Spirulina) platensis* en un fotobiorreactor tubular usando nitrato de amonio como fuente de nitrógeno en cultivo en *batch*, obteniendo resultados favorables en la máxima concentración celular, productividad y rendimiento de biomasa sobre nitrógeno de  $4710 \pm 34,4 \text{mg L}^{-1}$ ,  $478,9 \pm 3,8 \text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$  y  $15,87 \pm 0,13 \text{mg g}^{-1}$ , respectivamente.

Los resultados aquí descritos sugieren que es posible utilizar fertilizantes agrícolas grado comercial como fuentes de nitrógeno alternativas al uso de nitrato de sodio en el cultivo de *Arthrospira* spp., con el fin de disminuir el costo de producción que implica el uso de diferentes sales en medios de cultivo estándar.

## 2.2. Marco teórico

### 2.2.1. Generalidades de las cianobacterias

Las cianobacterias son un grupo diverso de procariotas fotosintéticos que han existido desde aproximadamente 3,5 mil millones de años, jugando un papel importante en la acumulación de oxígeno en la atmósfera primaria de la Tierra y permitiendo de esta manera el desarrollo de formas de vida aeróbicas (Chaurasia, 2015). Fueron los antecesores evolutivos de plastidios vegetales (cloroplastos), que se transformaron en un orgánulo celular por endosimbiosis en algas y plantas superiores (Vothknecht & Westhoff, 2001; Kulasooriya, 2011). Además, participaron en la captura de carbono a través del ciclo reductivo de pentosa fosfato o ciclo de Calvin-Benson-Bassham; y el ciclo del nitrógeno mediante la incorporación de nitrógeno en la bioma (Flores & Herrero, 2005; Parmar, Singh, Pandey, Gnansounou, & Madamwar, 2011).

Estos microorganismos contribuyen con aproximadamente el 30% de oxígeno liberado a la atmósfera terrestre por año a través de la fotosíntesis oxigénica (Peleato, 2011). La fotosíntesis oxigénica es un proceso que tiene lugar en dos etapas: (i) reacciones en luz: la energía lumínica se convierte en energía química, proporcionando un reductor bioquímico ( $\text{NADPH}_2$ ), un compuesto de alta energía (ATP) y oxígeno molecular ( $\text{O}_2$ ), teniendo como donador de electrones una molécula de agua ( $\text{H}_2\text{O}$ ), y (ii) reacciones en oscuridad: el  $\text{NADPH}_2$  y ATP se emplean en la reducción de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) en materia orgánica (carbohidratos) (García-Pichel, 2009; Masojídek, Torzillo, & Koblížek, 2013).

Este proceso tiene lugar en las membranas tilacoides de procariotas y eucariotas fotosintéticos (Wollman, Minai, & Nechushtai, 1999). En condiciones aeróbicas, las cianobacterias utilizan el fotosistema I y II, mientras que en condiciones anaeróbicas, utilizan el fotosistema I. Son microorganismos fotoautótrofos mayormente, aunque algunas especies pueden ser heterótrofas, asimilan glucosa como fuente de carbono y energía, en oscuridad (Singh, Tiwari, Rai, & Mohapatra, 2011).

Las cianobacterias se encuentran en una amplia gama de entornos, tanto en ambientes acuáticos como terrestres (Rodríguez & Triana, 2006). Al ser organismos versátiles, ostentan una diversidad morfológica (unicelular o pluricelular), estructural y fisiológica, que les permite adaptarse a diferentes parámetros ambientales (Rejmánková, Komárek, & Komárková, 2004; Rosales-Loaiza *et al.*, 2008; Abed *et al.*, 2009), llegando a ocupar hábitats con niveles extremos de disponibilidad de oxígeno (O<sub>2</sub>) o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), humedad, luz, radiación solar (300 – 700 nm), salinidad y temperatura (Rodríguez & Triana, 2006; Sompong, Anuntalabhochai, Cutler, Castenholz, & Peerapornpisal, 2008; Shevela, Pishchalnikov, & Eichacker, 2013). Se encuentran entre los organismos más exitosos en ambientes altamente salinos (Whitton & Potts, 2012).

Presentan requerimientos de crecimiento, como: energía lumínica [radiación fotosintéticamente activa, por sus siglas en inglés, PAR (400 – 700 nm)], dióxido de carbono y nutrientes inorgánicos, para poder llevar a cabo sus funciones metabólicas celulares (Parmar *et al.*, 2011), estas a su vez se encuentran fuertemente influenciadas por la disponibilidad de nutrientes (Oliver, Whitton, Hamilton, Brookes, & Ganf, 2012). El PAR es la radiación solar que pueden utilizar los organismos por medio de la fotosíntesis y que puede ser expresada como densidad de flujo fotónico fotosintético ( $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) (Wandji, Espinar, Blanc, & Wald, 2015), es el factor principal y limitante de la eficiencia de los cultivos de organismos fotosintéticos (Vonshak, 2002).

Las cianobacterias presentan diferentes respuestas a la limitación de nutrientes, pudiendo clasificarse en respuestas generales y específicas. Las respuestas generales son consecuencias de tensiones ocasionadas por el cese de la actividad anabólica (acumulación de carbohidratos, reducción del rendimiento fotosintético, reducción del contenido celular, aumento de la tasa de absorción específica del nutriente limitante). Mientras que las respuestas específicas son todos aquellos procesos de aclimatación a las limitaciones de nutrientes (modificación de las funciones metabólicas y fisiológicas para compensar la restricción de nutrientes) (Schwarz & Turpin, 1991; Forchhammer, 2005; Oliver *et al.*, 2012).

Algunos fotótrofos oxigénicos tienen la capacidad de sintetizar aminoácidos para la producción de proteínas; carbohidratos (almidón, azúcares y, polisacáridos en forma de glucógeno como estrategia frente a condiciones adversas, la degradación de glucógeno proporciona carbono y energía a la célula); lípidos en forma de glicerol, ácidos grasos poliinsaturados ( $\omega$ -3 y  $\omega$ -6) y  $\gamma$ -linolénico; minerales, pigmentos fotosintéticos (Chl *a*, ficobiliproteínas (c-ficocianina, c-ficoeritrina y aloficocianina) y carotenoides ( $\beta$ -caroteno, equinenona y mixoxantofila)), vitaminas y sustancias antioxidantes (de Loura, Dubacq, & Thomas, 1987; Hahn & Schleiff, 2014; Rosales, Vera, Aiello-Mazzarri, & Morales, 2016).

Por lo anteriormente expuesto se explica su importancia biotecnológica como fuente en la producción de compuestos bioquímicos de gran valor económico y con aplicaciones en varias industrias.

### **2.2.2. Estructura celular de las cianobacterias**

Normalmente la célula cianobacteriana se presenta externamente rodeada por una cubierta fibrosa, el glucocáliz, asociada a la membrana externa, enriquecida con carbohidratos y cumpliendo la función de proteger a la célula de la desecación y en la pérdida y retención de nutrientes esenciales (Gantt, 2004). Posee una envoltura similar a la pared celular de las bacterias Gram-negativas, diferenciándose por la presencia de una capa de peptidoglicano más gruesa, comparable a las bacterias Gram-positivas (Durai, Batool, & Choi, 2015). La pared celular incluye la presencia de lipopolisacáridos (LPSs) en la membrana externa, esenciales para la supervivencia, contribuyendo a la estabilidad e integridad de la membrana y constituyendo el primer sistema de defensa de la célula (Gemma, Molteni, & Rossetti, 2016).

La envoltura celular consta de membrana externa, capa de peptidoglicano, membrana plasmática o citoplasmática, y en algunos casos, ciertas especies pueden presentar la capa S o capa superficial. La capa S es una matriz cristalina formada por una única proteína de tipo glicoproteína (representa el 15% del contenido proteico de la célula) que cubre la superficie de la célula (Hahn &

Schleiff, 2014), cumpliendo la función como capa protectora o participando en la adhesión y reconocimiento celular (Hoiczky & Hansel, 2000).

La capa de peptidoglicano otorga protección mecánica y por su rigidez, determina la forma de la célula. Tanto la membrana externa como plasmática, poseen complejos proteicos (canales o complejos transportadores) que favorecen el paso de solutos y moléculas pequeñas por medio de las membranas. La membrana externa está compuesta principalmente por lipopolisacáridos y proteínas, y en menor medida de carotenoides y lípidos (Gantt, 2004).

La membrana plasmática por consiguiente, está constituida sustancialmente por lípidos, proteínas y carotenoides. Los carotenoides en las membranas no fotosintéticas presentan dos funciones importantes en la célula, como: estabilizante, al aumentar la tolerancia osmótica de las membranas, disminuyendo la permeabilidad al agua; y como barrera, al proteger a los lípidos (ácidos grasos insaturados) de la membrana de las especies reactivas de oxígeno. Las membranas de las cianobacterias poseen dos tipos de lípidos: fosfoglicerolípidos y galactolípidos (Woitzik, Weckesser, & Jürgens, 1988; Hahn & Schleiff, 2014).

Dentro de los lípidos que se encuentran incorporados en las membranas de las células cianobacterianas tenemos: ácidos saturados: esteárico (C18:0), láurico (C12:0), mirístico (C14:0), palmítico (C16:0); ácidos omega ( $\omega$ ) 3:  $\alpha$  – linolénico (C18:3n3c); ácidos omega ( $\omega$ ) 5: miristoleico (C14:1n5); ácidos omega ( $\omega$ ) 6: linoleico (C18:2n6c),  $\gamma$ -linolénico (C18:3n6c); ácidos omega ( $\omega$ ) 7: palmitoleico (C16:1n7); y ácidos omega ( $\omega$ ) 9: oleico (C18:1n9c); la composición de ácidos grasos dependerá del hábitat donde se encuentran o cultivan las células (Hahn & Schleiff, 2014).

Las membranas fotosintéticas, los tilacoides, se encuentran formando un sistema intracelular de doble membrana que alberga los constituyentes involucrados en captación y utilización de la energía lumínica, donde se genera NADP<sup>+</sup> (Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato) y ATP (Adenosín Trifosfato) para la síntesis de carbohidratos a partir de CO<sub>2</sub> (Rast, Heinz, & Nickelsen,

2015). Los tilacoides se encuentran en la membrana plasmática de forma paralela, radial o en pequeñas pilas desordenadas, su disposición depende de la especie y del estado fisiológico, y se encuentran formando un compartimento cerrado y separado dentro de la célula (García-Pichel, 2009; Battchikova & Aro, 2014).

Sobre la superficie externa estromal de la membrana tilacoidal, se encuentran los ficobilisomas en hileras (Tandeau, 2003; Gantt, 2004; Stadnichuk, Krasilnikov, & Zlenko, 2015), estructuras supramoleculares que cumplen la función de antenas de recolección de luz. Estos complejos supramoleculares se encuentran constituidos por tres clases de polipéptidos: ficobiliproteínas, polipéptidos enlazadores y proteínas asociadas al ficobilisoma (Sidler, 2004), la composición varía en función de la especie de cianobacteria y de las condiciones ambientales, como: disponibilidad de nutrientes, intensidad lumínica y temperatura (Mörschel, 1982; Sidler, 2004).

Las ficobiliproteínas representan aproximadamente el 40 – 50% del contenido total de proteína soluble de la célula (Schluchter & Glazer, 1999; Colyer, Klinkade, Viskari, & Landers, 2005). Los colores brillantes de estos polipéptidos se deben a la presencia de grupos prostéticos de tetrapirrol lineales unidos por enlaces covalentes, conocidos como ficobilinas (Glazer, 1994; Stadnichuk *et al.*, 2015). En cianobacterias, se distinguen tres tipos de ficobiliproteínas: ficocianina (610 – 625 nm, pigmento azul oscuro), aloficocianina (650 – 660 nm, pigmento verde azulado) y ficoeritrina (490 – 570 nm, pigmento rojo) (Pandey, Pandey, & Sharma, 2013; Khazi, Demirel, & Dalay, 2018).

### **2.2.3. Inclusiones celulares**

- **Gránulos de glucógeno:** localizados en el citoplasma entre las membranas tilacoidales y que almacenan carbono (compuestos de polímeros de glucosa) (Lee, 2008; Belay, 2013).

- **Gránulos de lípidos:** próximos a la superficie celular, fuente de lípidos para la síntesis de las membranas (Ramírez-Moreno & Olvera-Ramírez, 2006).
- **Gránulos de cianoficina:** copolímeros de arginina y ácido aspártico que almacenan nitrógeno (Colyer *et al.*, 2005).
- **Cuerpos de polifosfato:** cuerpos esféricos presentes en células adultas y ausentes en células en crecimiento o en medios con déficit de fosfato, que almacenan fosfato (Ramírez-Moreno & Olvera-Ramírez, 2006; Sotiroudis & Sotiroudis, 2013).
- **Carboxisomas:** orgánulos intracelulares especializados que forman micro-compartimientos compuestos completamente por proteínas y que encapsulan las enzimas anhidrasa carbónica (CA) y ribulosa-1, 5-bifosfato carboxilasa / oxigenasa (RubisCO). Estos orgánulos desempeñan un papel central en el ciclo global del carbono, al formar parte del mecanismo de concentración de CO<sub>2</sub> que consiste en un sistema de transporte activo de adquisición de carbono inorgánico. Entre las especies más relevantes de carbono inorgánico tenemos, CO<sub>2</sub> disuelto y el HCO<sub>3</sub> (Rae, Long, Badger, & Price, 2013).
- **Vesículas de gas:** estructuras huecas localizadas en los espacios intertilacoidales, apiladas hexagonalmente y con extremos cónicos, que ayudan a la flotabilidad y motilidad del organismo (Kulasooriya, 2011; Belay, 2013).

## 2.2.4. Fisiología nutricional

### 2.2.4.1. Nitrógeno

Las diferentes fuentes de nitrógeno combinado del medio natural, como: NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> y NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (nitrógeno inorgánico); NH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub> y aminoácidos (nitrógeno orgánico) o nitrógeno atmosférico (nitrógeno molecular), son asimiladas y

transformadas intracelularmente en  $\text{NH}_4^+$ , a excepción del  $\text{NH}_4^+$  que entra directamente a formar compuestos celulares (Florencio, 1999; Sakamoto & Bryant, 2001).

El  $\text{NH}_4^+$  es la forma de nitrógeno inorgánico más reducida y por ende, predilecta por los fototrófos oxigénicos debido a que es energéticamente favorable (la reducción de  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NO}_2^-$  y de  $\text{NO}_2^-$  a  $\text{NH}_4^+$  puede consumir aproximadamente el 30% de los electrones producidos durante la oxidación fotosintética del agua) (Sakamoto, Inoue-Sakamoto, & Bryant, 1999), al ser asimilado directamente y transformado en compuestos útiles, su utilización restringe el uso de otras fuentes alternativas mediante la disminución de enzimas asimiladoras de nitrógeno y la inhibición de los sistemas de transporte de nitrógeno, proceso conocido como “control global de nitrógeno” (Herrero *et al.*, 2001).

El  $\text{NH}_4^+$  tiende a transformarse en  $\text{NH}_3$  en medios con temperatura y pH elevados (a pH 7,0 predomina el nitrógeno en forma de ion amonio mientras que a pH 10,0 el amoníaco), compuesto tóxico en altas concentraciones para microorganismos fotosintéticos (Konig *et al.*, 1987). Concentraciones elevadas de 15 -16 mM de amoníaco en el medio pueden tienden a inhibir el crecimiento y consecuentemente, provocan la muerte celular (Ferreira *et al.*, 2010). Por lo tanto, el suministro de diferentes fuentes de nitrógeno en un medio de cultivo debe ser controlada debido a que su exceso o bajos niveles pueden conducir a la inhibición del crecimiento (Converti *et al.*, 2006).

El  $\text{NH}_3$  es una pequeña molécula sin carga que en medios alcalinos es fácilmente asimilable por los microorganismos, debido a que se difunde relativamente fácil a través de las bicapas lipídicas (permeable al amoníaco mientras que impermeable a iones de amonio) impulsado por el gradiente de pH. Además, la temperatura es un factor que influye en la disponibilidad de nitrógeno en el medio, debido a que altas temperaturas pueden conducir a la pérdida por emisión de gases cuando las sales inorgánicas se hidrolizan a  $\text{NH}_3$  en el medio (Boussiba, Resch, & Gibson, 1984; Carvalho, Bezerra, Matsudo, & Sato, 2013).

Las formas  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$  se asimilan y reducen en el interior de la célula a  $\text{NH}_4^+$  mediante la acción de las enzimas nitrato reductasa y nitrito reductasa,

respectivamente (Flores & Herrero, 2005). La forma  $\text{NH}_2\text{CONH}_2$  se hidroliza a  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{CO}_2$  en medios alcalinos o por acción de la enzima ureasa, enzima dependiente de níquel (Sakamoto & Bryant, 2001). La ureasa es una enzima constitutiva que no está regulada por compuestos que poseen nitrógeno y que participa en el ciclo de la urea, el cual asocia las reacciones anabólicas y catabólicas con el objetivo de asignar carbono y nitrógeno a los compuestos metabólicos (Allen *et al.*, 2011).

Dentro del grupo de las cianobacterias, se encuentran especies capaces de fijar  $\text{N}_2$  y reducirlo a  $\text{NH}_4^+$  (cianobacterias diazotróficas), aunque existen ciertas cepas de cianobacterias no diazotróficas que pueden realizar dicha acción, en ausencia de células especializadas (heterocisto) (Esteves-Ferreira *et al.*, 2017). La fijación de  $\text{N}_2$  y reducción a  $\text{NH}_4^+$  es una reacción metabólica energéticamente costosa y catalizada por la enzima nitrogenasa (Stal, 2015).

El amonio intracelular producto de la asimilación de compuestos constituidos de nitrógeno, se incorpora a los esqueletos carbonados a través de la ruta Glutamina Sintetasa-Glutamato 2-Oxoglutarato Aminotransferasa (ruta GS-GOGAT) (Chaffin & Bridgeman, 2014; Esteves-Ferreira, Inaba, Fort, Araújo, & Sulpice, 2018).

El control de la ruta GS-GOGAT es dependiente de ATP, Fe y NADH (equivalentes reductores) y eficiente a bajas concentraciones de  $\text{NH}_4^+$  (Brown & Herbert, 1977; Esteves-Ferreira *et al.*, 2018), esta ruta es esencial para mantener los niveles intracelulares de diferentes metabolitos, principalmente cuando se generan cambios en las condiciones nutricionales de las cianobacterias. La enzima Glutamina Sintetasa (GS) además de catalizar la incorporación de ATP de  $\text{NH}_4^+$  a glutamato, formando glutamina, es fundamental dado que participa en la síntesis de proteínas y actúa como donador de grupos amida en la biosíntesis de amino azúcares, pirimidinas y purinas en la mayoría de los microorganismos (Florencio, 1999; Eisenberg, Gill, Pfluegl, & Rotstein, 2000).

La enzima Glutamato 2-Oxoglutarato Aminotransferasa (GOGAT) cataliza el transporte de un grupo amida de glutamina a 2-oxoglutarato (2-OG), liberando dos moléculas de glutamato, las aminotransferasas pueden transferir los grupos

amino desde el glutamato a otras cadenas principales de carbono para la formación de aminoácidos (Flores & Herrero, 2005; Esteves-Ferreira *et al.*, 2018).

La enzima glutamato deshidrogenasa (GDH) se encuentra presente en diferentes grupos de cianobacterias, cataliza la síntesis de glutamato a partir de amonio y 2-OG, reacción dependiente de NADH (Nicotinamida Adenina Dinucleótido, forma reducida). La ausencia de esta enzima no afecta la asimilación de nitrógeno y el crecimiento exponencial (Rangel, Gómez-Baena, López-Lozano, Diez, & García-Fernández, 2009). El 2-OG es la cadena de carbono necesaria para la asimilación de nitrógeno e intermediario en el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) (Steinhauser, Fernie, & Arau, 2012).

#### **2.2.4.2. Carbono**

El metabolismo del carbono en cianobacterias está constituido por una serie de reacciones bioquímicas que comprende una red compleja: el ciclo de Calvin-Benson-Bassham (CBB), glucólisis, vía de la pentosa fosfato (PP) y el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) también conocido como ciclo de Krebs o ácido cítrico. Esta red permite que las células conviertan el carbono inorgánico ( $\text{CO}_2$ ) y carbono orgánico (glucosa, xilosa, acetato) en precursores metabólicos para la producción de biomasa (Xiong *et al.*, 2015).

Las cianobacterias desempeñan un rol importante en el ciclo global del carbono, mediante la generación de  $\text{O}_2$  y agotamiento de  $\text{CO}_2$  (Cameron, Sutter, & Kerfeld, 2014). El mecanismo de concentración de  $\text{CO}_2$  (CCM) consta de tres sistemas de transporte activo de  $\text{HCO}_3^-$  y dos sistemas de absorción de  $\text{CO}_2$  [carbono inorgánico ( $\text{C}_i$ )] conjuntamente con la asociación de complejos especializados (Price, Badger, Woodger, & Long, 2008). Estos sistemas se encuentran en la membrana plasmática y membrana tilacoidal, y ayudan a la acumulación de  $\text{HCO}_3^-$  en el citoplasma de la célula (Badger & Price, 2003).

El carboxisoma contiene a la enzima ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa / oxigenasa (RubisCO) y anhidrasa carbónica carboxisómica (CA), la CA convierte el  $\text{HCO}_3^-$  contenido en el citoplasma en  $\text{CO}_2$ , proporcionando elevadas

concentraciones de CO<sub>2</sub> entorno a la RuBisCO (principal enzima fijadora de CO<sub>2</sub>) y en consecuencia, aumentando significativamente la fijación de carbono (Price *et al.*, 2008; Durall & Lindblad, 2015). La absorción de C<sub>i</sub> requiere de fuentes de energía como ATP, NADPH o ferredoxina reducida o el acoplamiento a un gradiente electroquímico de Na<sup>+</sup> (Badger & Price, 2003).

La fijación de C<sub>i</sub> se realiza a través del ciclo de Calvin-Benson-Bassham mediante la RubisCO, en dos reacciones: i) carboxilación: cataliza la fijación de CO<sub>2</sub> mediante ribulosa-1,5-bifosfato (RuBP) y su conversión a una forma orgánica, 3-fosfoglicerato (3-PG)); y ii) oxigenación: utiliza O<sub>2</sub> y RuBP para producir 3-fosfoglicerato (3-PG) y 2-fosfoglicolato (2-PG) (Rae, Long, Whitehead, *et al.*, 2013). El 2-PG se convierte en glicolato y puede ser metabolizado en la fotorrespiración, vía del glicerato o por descarboxilación (Durall & Lindblad, 2015).

Las cianobacterias también pueden degradar carbohidratos a través de la vía glucolítica Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), vía oxidativa de la pentosa Fosfato (OPP), vía de la fosfoacetolasa (PC) y vía Entner-Doudoroff (ED) (Chen *et al.*, 2016; Xiong *et al.*, 2015).

Las vías EMP, OPP, PC y ED, se encuentran asociadas al ciclo de CBB para convertir la energía y carbono de una forma más eficiente y como estrategia de gestión de energía. Además, las cianobacterias poseen varias versiones del ciclo del TCA, ciclo que sirve para la producción de 2-oxoglutarato (precursor en la asimilación de amonio) y presenta dos funciones: i) oxida unidades de dos carbonos derivadas de la acetil coenzima A (CoA) que genera CO<sub>2</sub> y la forma reducida dinucleótido de adenina de nicotinamida (NADH), que proporciona los electrones para el proceso de fosforilación oxidativa y metabolitos precursores (oxaloacetato, 2-oxoglutarato (2-OG) y en algunos casos, succinato) para la biosíntesis de compuestos celulares (aminoácidos, proteínas, ácidos grasos, entre otros) (Zhang & Bryant, 2011; Steinhauser *et al.*, 2012).

Durante años, se consideró al ciclo del TCA incompleto debido a la ausencia del complejo funcional 2-oxoglutarato deshidrogenasa, que convierte el 2-oxoglutarato en succinil-CoA y este a su vez, se convierte en succinato a través

de succinato-CoA ligasa. Sin embargo, estudios recientes han determinado que el ciclo del TCA se puede completar mediante derivaciones metabólicas: (i) derivación de 2-oxoglutarato descarboxilasa (2-OGDC), (ii) derivación del ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) y (iii) derivación de glioxilato, las tres derivaciones resultan en la síntesis de succinato (donador de electrones para la fosforilación oxidativa) (Steinhauser *et al.*, 2012; Esteves-Ferreira *et al.*, 2018).

Estas variantes del ciclo del TCA otorgan adaptabilidad ambiental a las cianobacterias, por ejemplo, la vía GABA desempeña un papel clave en la tolerancia celular al estrés ácido, térmico y oxidativo, y la derivación de glioxilato permitiendo que la cianobacteria asimile acetato como fuente de carbono y energía (Steinhauser *et al.*, 2012).

El metabolismo del carbono permite un flujo estable a los componentes celulares importantes (proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, etc.), sin embargo, ha evolucionado en respuesta a las variaciones ambientales para la sobrevivencia de las células. Tal adaptabilidad evolutiva se refleja en diversas estrategias metabólicas, como: uso de compuestos de almacenamiento de carbono (glucógeno, polihidroxi butirato, etc.), versatilidad bioenergética (las cianobacterias pueden energizarse mediante la fotosíntesis oxigénica y la respiración) que les permite cambiar hacia modos fotoautotróficos, fotomixotróficos o fotoheterotróficos (Xiong, Cano, Wang, Douchi, & Yu, 2017).

No solo el metabolismo del nitrógeno está implicado en las respuestas a los factores ambientales, sino que el mecanismo de concentración de CO<sub>2</sub> también juega un papel importante desde la fotosíntesis hasta la síntesis de metabolitos (Esteves-Ferreira *et al.*, 2018). Además, ambos metabolismos se encuentran funcionalmente conectados por el metabolito 2-OG, precursor de la ruta GS-GOGAT, que es convertido en succinato en la ruta del ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) (Schwarz, Orf, Kopka, & Hagemann, 2014; Zhang, Qian, Chang, Dismukes, & Bryant, 2016).

### **2.2.4.3. Fósforo**

El fosfato desempeña tres funciones importantes en la célula: da forma y estructura a los componentes celulares; fuente de energía (ATP), energía almacenada directamente en el interior de la célula mediante la conversión a polifosfato o indirectamente por medio de la generación de carbohidratos; portador de información, proporciona información (señales ambientales e internas) y respuestas adaptativas (Dignum, Matthijs, Pel, Laanbroek, & Mur, 2005).

Las limitaciones de fósforo en las cianobacterias generan cambios en el tamaño de la célula, coloración de la célula (blanqueamiento-clorosis), lisis celular, fosforilación, fotoinhibición, etc., de la misma forma estos microorganismos presentan estrategias de sobrevivencia: (i) reducción o regulación de tasas fisiológicas (tasa de crecimiento – composición bioquímica), (ii) compensación de limitación de nutrientes (uso de depósitos de fosfato) y (iii) adquisición o desarrollo de sistemas de captación eficientes de formas químicas alternativas de fósforo (Florencio, 1999; Dignum *et al.*, 2005).

La restricción de fosfato es un limitante del crecimiento de microorganismos fototrófos puesto que su sistema de membranas interno, tilacoides, consisten en gran parte de fosfolípidos, por lo tanto, la falta de disponibilidad de fosfato repercutiría en el funcionamiento de los fotosistemas, y este en consecuencia, en la fijación de carbono mediante la fotosíntesis (acumulación de lípidos) (Hahn & Schleiff, 2014).

### **2.2.4.4. Hierro**

El hierro es un elemento esencial para el crecimiento celular, forma parte de proteínas fundamentales en la catálisis de reacciones involucradas en la fotosíntesis, respiración, fijación y asimilación de nitrógeno, síntesis de fotopigmentos y síntesis de ADN (Wang *et al.*, 2010).

Una de las manifestaciones más significativas de la limitación de Fe en cianobacterias es la clorosis, por lo que, ante una restricción, las enzimas que poseen este elemento en su composición para la asimilación de nitrógeno

pueden degradar las reservas de ficobiliproteínas y emplearlas como fuente de nitrógeno (Wilhem, 1995). Aunque algunas especies han mostrado respuestas adaptativas como: sustitución de proteínas que contienen hierro por homólogos funcionales que no lo contienen (e. g. ferredoxina reemplazada por flavodoxina, aceptor de electrones en la fotosíntesis) (Carr & Mann, 2004).

El hierro es un elemento involucrado en diversos procesos fisiológicos pero existe poca información sobre la influencia, requisitos y disponibilidad en *Arthrospira* spp. (Belay, 2013).

### **2.2.5. Género *Arthrospira***

*Arthrospira* ubicado anteriormente dentro del género *Spirulina*, es una cianobacteria procariota Gram-negativa filamentosa no heterocística perteneciente a la familia Oscillatoriaceae que incluye 15 diferentes especies y crece en medios alcalinos y ambientes cálidos (Gutiérrez-Salmeán, Fabila-Castillo, & Chamorro-Cevallos, 2015; Cuellar-Bermúdez *et al.*, 2017).

Una de las características morfológicas principales del género, es la disposición de tricomas cilíndricos multicelulares en una hélice abierta. Los tricomas están compuestos por células cilíndricas más cortas que amplias (diámetro medio de 8  $\mu\text{m}$ ) en una variedad de formas, encontrándose solitarios, envueltos en una delgada capa, mostrando constricciones en las paredes transversales más o menos pronunciadas y ápices levemente o absolutamente atenuados (Ali & Saleh, 2012). Las paredes transversales a menudo se encuentran enmascaradas por numerosas vesículas de gas. Los filamentos poseen una longitud variable (aproximadamente 100 – 200  $\mu\text{m}$ ) y diámetro de 6 – 12  $\mu\text{m}$ , las dimensiones de la célula, el grado de enrollamiento y la longitud de los filamentos varía con relación a la especie (Sotiroudis & Sotiroudis, 2013).

### **2.2.6. Composición bioquímica**

*Arthrospira* posee un contenido en proteínas alrededor del 60 – 70% de su peso seco, proporción excelente en relación a los alimentos de origen vegetal que

poseen un 35%, carne de animales y pescado 15 – 25%, leche en polvo 35%, huevos 12%, granos 8 – 14% y leche entera 3% (Henrikson, 2009). Contiene proteínas de alto valor nutricional, debido a la presencia de aminoácidos esenciales en su composición (leucina, valina, isoleucina, metionina, cisteína, etc.), los que representan cerca de la mitad del contenido proteínico (Marrez, Naguib, Sultan, Daw, & Higazy, 2014; Gutiérrez-Salmeán *et al.*, 2015). Dentro de las proteínas que posee *Arthrospira*, se encuentran las ficobiliproteínas (C-ficocianina y aloficocianina). Las ficocianinas representan alrededor del 15 – 25% de la biomasa seca (Sotiroudis & Sotiroudis, 2013).

La fracción lipídica representa del 5 – 10% del peso seco (Gutiérrez-Salmeán *et al.*, 2015), siendo los principales lípidos los fosfatidil glicerol (PG), monogalactosil diacilglicerol (MGDG) y sulfoquinovosil diacilglicerol (SQDG) (Sotiroudis & Sotiroudis, 2013). Los ácidos grasos constituyen la mitad de la composición lipídica, principalmente los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs, por sus siglas en inglés) como: ácidos  $\omega$ -3: estearidónico, eicosapentaenoico y docosahexaenoico, ácidos  $\omega$ -6: araquidónico, linoleico,  $\gamma$ -linolénico (Habib, Parvin, Huntington, & Hasan, 2008); ácidos  $\omega$ -9: oleico; y ácidos saturados: palmítico (Koru, 2012; Sotiroudis & Sotiroudis, 2013).

Los carbohidratos constituyen el 15 – 25% del peso seco de *Arthrospira* spp., conteniendo carbohidratos como: glucosa, fructuosa, sacarosa, glicerol, manitol y sorbitol, en pequeñas cantidades; casi todos los carbohidratos asimilables poseen glucosamina (1,9% del peso seco), ramnosamina (9,7%) o glucógeno (0,5%). El fosfato de mesoinositol (fuente de fósforo orgánico e inositol) es el único carbohidrato importante en nutrición, presente en cantidades suficientes y el cual es ocho veces mayor que el contenido de inositol de la carne de res y mucho mayor que algunas verduras (Falquet, 2006).

El contenido de ácidos nucleicos es de aproximadamente 4 – 6% de peso seco (Falquet, 2006). La vitamina B<sub>12</sub> (cianocobalamina) se encuentra presente en mayor proporción, por lo general, se encuentra solo en alimentos de origen vegetal. Además, hay presencia de provitamina A ( $\beta$ -caroteno), vitamina B<sub>1</sub> (tiamina), B<sub>2</sub> (riboflavina), B<sub>3</sub> (nicotinamida), B<sub>6</sub> (piridoxina), B<sub>9</sub> (ácido fólico),

vitamina C, vitamina D y vitamina E (Habib *et al.*, 2008; Aouir, Amiali, Bitam, Benchabane, & Raghavan, 2017; Shabana, Gabr, Moussa, El-Shaer, & Ismaiel, 2017).

*Arthrospira* es una fuente rica en potasio, calcio, cromo, cobre, hierro, magnesio, manganeso, fósforo, selenio, sodio y zinc, su contenido mineral es dependiente del medio de cultivo (Habib *et al.*, 2008). La concentración de hierro es sustancialmente más elevada que los cereales (150 – 250 mg kg<sup>-1</sup> y 580 – 1800 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente), a la vez estas cianobacterias no presentan pericarpo como los alimentos de origen vegetal, por lo que, no presentan oxalatos que quelan el hierro y disminuyen su capacidad de absorción (Gutiérrez-Salmeán *et al.*, 2015). La cantidad de calcio, fósforo y magnesio es comparable a la leche, con la excepción de que el exceso de fósforo no produce descalcificación (Falquet, 2006).

### **2.2.7. Aplicaciones**

Históricamente *Arthrospira* ha sido utilizada como complemento alimenticio por su contenido en aminoácidos, proteínas, minerales, vitaminas, etc., los antiguos habitantes de Tecnochtitlán (Ciudad de México) la denominaron *tecuitlatl*, que era colectada como lodo azul, secada al sol y consumida en forma de pan. Mientras que los pobladores de Kanem y Lac en Chad (África), la denominaron *dihé*, la consumían y vendían en forma de biscocho (Ramírez-Moreno & Olvera-Ramírez, 2006).

La principal aplicación de *Arthrospira* ha sido como suplemento alimenticio para animales (aves, peces, crustáceos, etc.) y humanos, como: polvo, tabletas, cápsulas, sustituto de harinas, en pastas, bebidas, entre otros (Henrikson, 2009; Hosseini, Shahbazizadeh, Khosravi-Darani, & Mozafari, 2013; Torres, Parra, Rojas, Fernández-Gómez, & Valero, 2014).

Mariey, Samak, & Ibrahim (2012) reportaron en su estudio que gallinas ponedoras alimentadas con "*Spirulina*" mejoraron su rendimiento reproductivo y productivo; y Zahroojian, Moravej, & Shivazad (2013) observaron que el color de

la yema de huevo mejoró estéticamente comparado al control (gallinas alimentadas con trigo y soya).

En acuicultura, se utiliza “*Spirulina*” como sustituto parcial de harina de pescado en la dieta del langostino *Penaeus monodon* para mejorar el crecimiento, inmunidad y viabilidad (Sivakumar, Sundararaman, & Selvakumar, 2018); para reducir enfermedades en peces (Ragap, Khalil, Mutawie, & Mutawie, 2012); como aditivo en la alimentación de la larva del camarón *Litopenaeus schmitti* (Ceballos, Cerecedo, Villarreal, Galindo López, & Pérez-Jar, 2007).

En medicina, *Arthrospira* presenta una serie de metabolitos con importantes propiedades farmacológicas como: actividad antimicrobiana (El-Baz, El-Senousy, El-Sayed, & Kamel, 2013; Chakraborty, Jayaswal, & Pankaj, 2015), antioxidante (Pleonsil, Soogarun, & Suwanwong, 2013), anticancerígena (Konícková *et al.*, 2014; El Sadek *et al.*, 2017; Jiang *et al.*, 2017), antitumoral (Wang & Zhang, 2016), antiinflamatoria (Quader, Islam, Saifullah, Majumder, & Hannan, 2013), hiperlipidémica y antihipertensiva (Torres-Duran, Ferreira-Hermosillo, & Juarez-Oropeza, 2007; Memije-Lazaro, Blas-Valdivia, Franco-Colín, & Cano-Europa, 2018). Además, los extractos de “*Spirulina*” se destacan como ingrediente activo en productos de dermocosmética (Delsin, Mercurio, Fosaa, & Campos, 2015).

El-Sheekh, Hamad, & Gomaa (2014) investigaron el efecto hepatoprotector e hipolipidémico de *Arthrospira* (*Spirulina*) en ratas y humanos, demostrando que el tratamiento con *Arthrospira* spp. disminuye los niveles de hiperlipidemia mediante la corrección del perfil lipídico y el aumento de lipoproteínas de alta densidad. Concordando con el trabajo realizado por Bashandy *et al.* (2011) que evaluaron el efecto hepatoprotector e hipolipidémico de *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* en ratas administradas con cloruro de mercurio (HgCl<sub>2</sub>), obteniendo resultados significativos en la reducción de la hepatotoxicidad inducida por HgCl<sub>2</sub> y modificando el perfil lipídico a través de las propiedades antioxidantes de *Arthrospira* spp..

Wang & Zhang (2016) en su estudio “*Caracterización y actividad antitumoral de hidrolizados de proteína de Arthrospira platensis (Spirulina platensis) usando*

*hidrólisis en dos etapas*”, demostraron la capacidad antitumoral de los péptidos de *Arthrospira* spp., además de su baja citotoxicidad, por lo que sugieren su uso en nutracéuticos y productos farmacéuticos.

Sagara *et al.* (2017) evaluaron el efecto de extractos no proteicos de *Arthrospira* spp. sobre la neurotoxicidad causada por la acumulación de hierro en el cerebro *in vitro*, obteniendo resultados favorables en la protección de las células neuronales contra los trastornos neurodegenerativos.

Juszkiewicz *et al.* (2018) analizaron la respuesta del sistema inmune a la suplementación con extracto de “*Spirulina*” en individuos expuestos a ejercicio físico máximo, concluyendo que el extracto puede proteger a los atletas contra un déficit de la función inmune y prevenir el deterioro del mismo, asociado al ejercicio extenuante.

Appel *et al.* (2018) demostraron que el extracto polisacárido de alto peso molecular de *Arthrospira platensis* (Immulina®) además de poseer efectos potenciadores del sistema inmunológico, también exhibe propiedades antiinflamatorias e inhibición de histamina de los mastocitos (respuesta inflamatoria alérgica).

Medina-Jaritz *et al.* (2011) en su estudio sobre “*Actividad antimicrobiana de extractos acuosos y metanólicos de Arthrospira maxima*” mostraron que los extractos acuosos presentaron actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* y *Candida albicans*, excepto *Bacillus subtilis*, mientras que los extractos metanólicos contra todos los microorganismos utilizados en el ensayo.

*Arthrospira* spp. es considerado un biosorbente muy eficiente en el tratamiento de aguas residuales (Dolatabadi & Hosseini, 2016; Zinicovscaia, Yushin, Shvetsova, & Frontasyeva, 2018); y como un excelente fertilizante por ser amigable con el medio ambiente (Albuja *et al.*, 2011; Aung, 2011; Anitha, Bramari, & Kalpana, 2016).

## 2.2.8. Cultivo

### 2.2.8.1. Intensidad lumínica

Uno de los principales factores determinantes en el cultivo de *Arthrospira* spp. es la luz, dado que al ser un organismo fotosintético, utiliza la luz como fuente de energía (Vonshak, 2002). Por lo tanto, se han realizado numerosos estudios para determinar el efecto de la intensidad lumínica sobre el crecimiento y composición bioquímica de *Arthrospira* spp. Por ejemplo, Zarrouk (1966) evaluó diferentes factores físicos y químicos, entre ellos la intensidad lumínica, en el crecimiento de *Spirulina maxima*; Kumar, Kulshreshtha, & Singh (2011) evaluaron diferentes rangos de temperatura e intensidad lumínica en *Arthrospira (Spirulina) platensis*; Trabelsi *et al.* (2009) determinaron el efecto de la temperatura e intensidad lumínica en el crecimiento y producción de sustancias poliméricas extracelulares de *Arthrospira platensis*.

### 2.2.8.2. Diodos emisores de luz (luz LED)

El uso de luces LED en laboratorio se ha vuelto una tendencia popular, Markou (2014) evaluó el efecto de diferentes diodos emisores de luz (blanco, verde, rosado y rojo) sobre la composición bioquímica de *Arthrospira*, obteniendo así, con LED rojo y rosado mayor producción de biomasa (30,89 y 30,69 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>). Sin embargo, el contenido de biomasa se vio modificado por la influencia de la diferencia de longitudes de ondas de luz, mayor contenido de clorofila (1,42 %), ficocianina (17,6 ± 2,4 %), carbohidratos (11,3 %) y lípidos (6 %) con LED azul y mayor contenido de proteínas (50,1 y 49,8 %) con LED blanca y verde. Se atribuye la mayor concentración de pigmentos fotosintéticos a la capacidad de los mismos para absorber diferentes longitudes de onda, por otro lado, el proceso de adaptación de los compuestos de la biomasa aún no es claro.

Así mismo, otros autores (Madhyastha & Vatsala, 2007; Wang, Fu, & Liu, 2007; Ravelonandro, Ratianarivo, Joannis-Cassan, Isambert, & Raherimandimby, 2008; Chen *et al.*, 2010) han estudiado el efecto de las luces LED en el cultivo de microorganismos fotosintéticos, obteniendo resultados similares o contradictorios. Dicha contradicción se sugiere puede deberse al cambio en el

color de la luz empleados en la iluminación de los cultivos (Furmaniak *et al.*, 2017).

### **2.2.8.3. Radiación ultravioleta (UV)**

Las cianobacterias han desarrollado mecanismos de defensa como: cambios en la flotabilidad de los tricomas o su rotación, reparación de ADN dañado, síntesis de proteínas, muerte celular programada y síntesis de compuestos absorbentes de UV (aminoácidos-micosporina y el alcaloide indol escitonemina) (Wu *et al.*, 2005; Moon, Kim, & Chung, 2012; Rastogi *et al.*, 2014). También es importante mencionar que a temperatura óptima de crecimiento, los daños causados por la luz UV son pequeños, visibles a exposiciones prolongadas (hasta 8 horas) y resultan en la formación de estructuras helicoidales más estrechas. Este cambio en su morfología aumenta la tolerancia a condiciones de elevada radiación (Furmaniak *et al.*, 2017; Gao & Ma, 2008).

### **2.2.8.4. Salinidad**

*Arthrospira* es una cianobacteria alcalófila halófila que crece en ambientes naturales en un rango de salinidad de 1.1 a 300 g L<sup>-1</sup>, mientras que en laboratorio de 8.5 a 200 g L<sup>-1</sup> (Furmaniak *et al.*, 2017). Se han evaluado diferentes concentraciones de salinidad para determinar un mayor rendimiento en la obtención de biomasa (Almahrouqi *et al.*, 2015; Kouhgardi, Moazami, Ghorbani-Vaghei, & Maghsoudloo, 2015; Quintero *et al.*, 2016) para tales estudios se han utilizado medios de cultivo como medio Zarrouk (Zarrouk, 1966), Spirulina Medium (Aiba & Ogawa, 1977), Schlösser (Schlösser, 1982) y Paoletti (Paoletti, Pushparaj, & Tomaselli, 1985), que contienen una cantidad sustancial de sales y su composición varía ligeramente.

### **2.2.8.5. Fuente de nitrógeno**

Las cianobacterias del género *Arthrospira* se cultivan en medios que tienen como fuente principal de nitrógeno, KNO<sub>3</sub> o NaNO<sub>3</sub>, no obstante, hay registros de numerosos estudios con fuentes de nitrógeno diferentes y baratas. La urea es una forma de nitrógeno combinado muy estudiada, debido a su fácil adquisición y su bajo costo en el mercado. Sin embargo, su uso a elevadas concentraciones

tiende a volverse tóxico dañando el fotosistema II y en condiciones alcalinas, se convierte a amoníaco, resultando negativo debido a su pérdida en forma de gas (Carvalho, Francisco, Almeida, Sato, & Converti, 2004; Ferreira *et al.*, 2010; Avila-Leon *et al.*, 2012).

Así mismo, se ha estudiado el efecto de la privación de nitrógeno en medios de cultivo, Deschoenmaeker *et al.* (2014) estudiaron el efecto de la falta de nitrógeno en *Arthrospira* spp. cepa PCC 8005, observando la presencia de estrategias de supervivencia como: reprogramación global del carbono y nitrógeno, degradación de proteínas y cianoficina como fuente endógena de nitrógeno cuando el nitrógeno exógeno es limitado, entre otras.

#### **2.2.8.6. Fuente de carbono**

Otro componente importante en el cultivo de *Arthrospira* es la fuente de carbono, generalmente, una mezcla de carbonato y bicarbonato, sales que contribuyen a elevar el pH del medio (Markou & Georgakakis, 2011). Los organismos fotosintéticos durante el cultivo asimilan bicarbonato y liberan carbonato, este producto conduce al aumento progresivo del pH y en consecuencia, disminuyen la eficiencia fotosintética y detienen el crecimiento, este proceso se evita con la suplementación de pulsos de CO<sub>2</sub>, suficientes para mantener el pH en un rango óptimo (Soletto *et al.*, 2008).

El CO<sub>2</sub> es el producto de emisión de los procesos industriales, que se libera a la atmósfera y contribuye al efecto invernadero, este producto podría ser utilizado en las granjas de cultivo de microorganismos fotosintéticos, capaces de captar luz y fijar CO<sub>2</sub>, aportando de esta forma a la reducción de la contaminación ambiental (Maeda, Owada, Kimura, Omata, & Karube, 1995; Matsudo, Bezerra, Converti, Sato, & Carvalho, 2011). Además, la biomasa obtenida puede utilizarse para obtener gases energéticos como biohidrógeno y biometano mediante la combustión, gasificación o procesos de fermentación anaeróbica (Cheng *et al.*, 2011).

### 2.2.8.7. Cultivo en interiores y exteriores

El cultivo de organismos fotosintéticos ha sido ampliamente estudiado para determinar un proceso de obtención de biomasa más económico a escala industrial (Ranganathan, Amal, Savithri, & Haridas, 2017). Entre los sistemas de cultivo más utilizados a nivel industrial tenemos: fotobiorreactores (sistemas cerrados) que permiten controlar las condiciones de cultivo (pH, intensidad de la luz, suplementación de CO<sub>2</sub>, contaminación), y estanques al aire libre (sistemas abiertos) (Chisti, 2007; Apel & Weuster-Botz, 2015).

Dentro de los sistemas abiertos, los estanques o raceway son los sistemas más utilizados para el cultivo masivo de organismos fototróficos, debido a su moderado costo de construcción y mantenimiento (Schenk *et al.*, 2008). Sin embargo, factores ambientales como la intensidad de la luz, temperatura y riesgos de contaminación influyen en el rendimiento de la producción de biomasa (Naqqiuddin, Sukumaran, Alimahrouqi, Omar, & Ismail, 2015).

Los raceways son estanques construidos en concreto o tierra compacta y revestidos con plástico, con una profundidad no mayor a 30 cm y sistema de mezclado (rueda de paletas, bombas y *airlifts*) para permitir la exposición de las células a la radiación solar y CO<sub>2</sub> (Shen, Yuan, Pei, Wu, & Mao, 2009). Algunas de las grandes industrias que cuentan con este sistema de cultivo son: Cyanotech (EE.UU.), Earthrise Farms (U.S.), Inner Mongolia Biological Engineering (China), Nature Beta Technologies (Israel), Parry Agro Industries (India) y Tianjin Lantai Biotechnology (China) (Walker, Purton, Becker, & Collet, 2005).

La cianobacteria *Arthrospira* a diferencia de las microalgas, tiene mayor tolerancia a crecer en condiciones ambientales extremas, por ello, es adecuada para cultivo a nivel industrial (Naqqiuddin *et al.*, 2015). La producción industrial de *Arthrospira* ha existido durante años en países como Australia, China, Chad, India, Israel, Japón, Malasia y Myanmar (FAO, 2016).

### **2.2.9. Fertilizantes en el cultivo de cianobacterias**

Los fertilizantes agrícolas grado comercial se emplean como estrategia alternativa a medios de cultivos estándares, con el propósito de disminuir los costos de producción sin afectar los valores nutricionales de los microorganismos fotosintéticos (Sipaúba- Avarés, Donadon, Berchielli, & Scardoeli, 2017).

Los fertilizantes inorgánicos son factibles debido a que están ampliamente disponibles en el mercado, presentan menores costos, se disuelven fácilmente, poseen una composición definida (contenido en nitrógeno y fósforo, principalmente) y mantienen un pH moderado en el medio (Tew, Conroy, & Culver, 2006). Algunos autores han evaluado el uso de fertilizantes agrícolas en el cultivo de organismos fotosintético, obteniendo resultados significativos en el crecimiento, productividad y composición bioquímica (Madkour *et al.*, 2012; Kumari *et al.*, 2015; Muhamad *et al.*, 2015; Burgos-Rada *et al.*, 2016; Silva-Benavides, 2016).

### **2.2.10. Ciclo de vida**

La división celular de *Arthrospira* ocurre por fisión binaria en tres etapas, de forma intercalar múltiple a lo largo del filamento o tricoma (Tomaselli, 2002; Sánchez *et al.*, 2003; Ali & Saleh, 2012)

- 1)** Fragmentación del tricoma: rotura del tricoma por destrucción de una célula intercalar, de sacrificio o de lisis (necridio). Las necridias son células especializadas únicas, que permiten la fragmentación del tricoma con la formación de segmentos cortos u hormogonias.
- 2)** Crecimiento: los segmentos cortos u hormogonios crecen longitudinalmente y toman la forma helicoidal.
- 3)** Maduración del tricoma: formación de células de necridio.

### 2.2.11. Estado del género

*Arthrospira* fue reportada primera vez por Stizenberger (1852), a partir del cual muchas especies de este género han sido descritas y aisladas, aunque su clasificación taxonómica ha sido fuente de confusión por muchos años (Mühling, 2000).

Geiter (1932) en su revisión sobre Cyanophyceae, invalido el género *Arthrospira* e incluyo todas las especies con estructura enrollada helicoidal dentro del género *Spirulina*, establecido por Turpin (1827). Una característica adicional que ocasionó confusión en la distinción de estos géneros fue la ocurrencia de tricomas rectos en cultivos de *Arthrospira* (Mühling, 2000; Sili, Torzillo, & Vonshak, 2012).

La aparición de tricomas rectos de *Arthrospira* se observan con frecuencia en laboratorio y en cultivos en masa, sugiriendo que el cambio en la estructura helicoidal a una forma recta puede deberse a períodos prolongados de aclimatación o estrés ambiental (limitación de la disponibilidad de nutrientes y luz, alteración de los niveles de oxígeno y dióxido de carbono) (Chaiyasitdhi *et al.*, 2018); característica que advierte una mayor capacidad de supervivencia. La composición bioquímica y propiedades nutricionales no se ven perjudicadas por la alteración de la forma de los tricomas (Hongsthong *et al.*, 2007; Sili *et al.*, 2012).

Rippka, Deruelles, Waterbury, Herdman, & Stanier (1979) sugirieron la revisión de ambos géneros en base a técnicas avanzadas, concluyendo así una distinción en la ultraestructura, basada en la observación de una fila de poros alrededor del tricoma en las paredes transversales de *Arthrospira*, y varias filas de poros en el sitio cóncavo de la espiral de las pares transversales del tricoma de *Spirulina*.

La separación de los géneros *Arthrospira* y *Spirulina* ha sido convenida por varios autores (Rippka *et al.*, 1979; Rosemarie Rippka, Waterbury, & Stanier, 1981; Anagnostidis & Komárek, 1988) y aceptada en el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey (Castenholz, Rippka, & Herdman, 1989). Aceptación basada en características como tamaño y helicidad del tricoma, estructura de la

pared celular y patrón de poros, vesículas de gas, patrón de disposición de las tilacoides, motilidad y fragmentación de los tricomas, contenido de GC y oligonucleótidos del ARNr 16S (Vonshak, 2002).

Actualmente, aún existe confusión en la denominación científica de *Arthrospira*, manifestada en la literatura y por la comercialización de productos bajo el nombre incorrecto de *Spirulina*. Sin embargo, Tomaselli, Palandri, & Tredecini (1996) para resolver este desacuerdo sugirieron usar la denominación taxonómicamente correcta en libros y revistas científicas, y en productos comerciales, el nombre común "Spirulina" siempre que se especifique el nombre correcto del organismo cultivado (Mühling, 2000).

## CAPÍTULO III

### 3.1. Materiales y métodos

#### 3.1.1. Microorganismo

Se utilizó la cianobacteria *Arthrospira* spp., proveniente del banco de cepas de microalgas y cianobacterias del Laboratorio de Microbiología y Parasitología del Centro de Investigación en Biología de la Universidad de Santiago de Compostela (CIBUS), y conservada y cultivada en el Laboratorio de Química Ambiental de la Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Guayaquil (UG).

#### 3.1.2. Diseño experimental

El diseño consistió de un arreglo factorial de 3x3 (tres repeticiones por cada tratamiento y control), con un total de 18 unidades experimentales; donde el factor evaluado fue la fuente de nitrógeno (Tabla 1). Los ensayos fueron llevados a cabo individualmente.

Se utilizó el medio estándar Zarrouk (Zarrouk, 1966) como control y medios formulados con fertilizantes agrícolas como tratamientos; mismo que se describen a continuación en el apartado, preparación de medios de cultivo.

**Tabla 1.** Diseño experimental del estudio: factor evaluado y variables respuesta.

Medios de cultivo	Factor evaluado		Variable respuesta
	Fuente de nitrógeno	Réplicas	
Control	NaNO <sub>3</sub>	3	Clorofila <i>a</i>
Tratamiento 1	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	3	Tasa de crecimiento
Control	NaNO <sub>3</sub>	3	específica
Tratamiento 2	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3	Peso seco
Control	NaNO <sub>3</sub>	3	Productividad
Tratamiento 3	NH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>	3	Composición bioquímica

### 3.1.3. Preparación de medios de cultivo

#### Medio estándar Zarrouk

Inicialmente, se preparó una solución stock de micronutrientes disueltos en agua destilada, tal y como se describe en la Tabla 2; llevada a esterilización en autoclave a 121°C por 15 min. En base a esta solución y a los macronutrientes descritos en la Tabla 2, se preparó 1 L de medio de cultivo, y el pH ajustado a  $9,9 \pm 0,2$ ; el bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) se disolvió en agua destilada y esterilizado por separado para evitar la precipitación de las sales. La solución de micronutrientes se agregó luego de esterilizadas las soluciones de macronutrientes.

**Tabla 2.** Constitución del medio de cultivo estándar Zarrouk (Zarrouk, 1966).

<b>Sales</b>	<b>mM</b>
<b>Solución de macronutrientes</b>	
$\text{NaHCO}_3$	214.4
$\text{NaNO}_3$	29.4
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	2.9
$\text{K}_2\text{SO}_4$	5.7
$\text{NaCl}$	17.1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.8
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0.5
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.04
EDTA	0.3
<b>Solución de micronutrientes 1 mL</b>	
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0.046
$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0.009
$\text{Zn SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.0008
$\text{Na}_2\text{MoO}_4$	0.00009
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0.0003

#### Medios de cultivo con fertilizantes

Se prepararon soluciones stock de cada fuente nitrogenada, disueltos en agua de mar filtrada estéril, previo análisis fisicoquímico (Anexo 1), de cada solución stock se tomó un volumen específico para obtener una concentración final en el

medio de cultivo de 12 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 12 mM de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y 10 mM de  $\text{NH}_2\text{CONH}_2$ .

Adicionalmente, se agregó (Tabla 3) bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) como fuente de carbono inorgánico para el crecimiento de *Arthrospira* spp.; con la adición de bicarbonato, el pH alcanza medio alcalino; el pH de los medios de cultivo tendía a ser ácido (pH 5 – 6) debido a la presencia de los fertilizantes; y fosfato de potasio dibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) como fuente de fósforo para mantener la relación N:P 10,1 del medio de cultivo estándar Zarrouk (Zarrouk, 1966). Además de los cofactores: sulfato de níquel ( $\text{NiSO}_4$ ), molibdato de sodio ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ ) y sulfato de hierro ( $\text{FeSO}_4$ ), para permitir el correcto funcionamiento de la actividad enzimática. Previamente, se prepararon soluciones stock de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  y cofactores ( $\text{NiSO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  y  $\text{FeSO}_4$ ) en agua de mar filtrada estéril.

Los medios de cultivo y soluciones stock de fertilizantes,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  y cofactores fueron preparados con agua de mar filtrada estéril para evitar la precipitación del fósforo causada por la esterilización en autoclave; sin embargo, aun así una parte del fósforo tendía a precipitar. El pH de los medios de cultivo se ajustó con  $\text{NaOH}$  1N a  $10,1 \pm 0,2$ .

**Tabla 3.** Constitución de medios de cultivo en agua de mar suplementados con fertilizantes agrícolas (1 L).

Tratamiento 1		Tratamiento 2		Tratamiento 3	
Composición	mM	Composición	mM	Composición	mM
$\text{NaHCO}_3$	47,6	$\text{NaHCO}_3$	47,6	$\text{NaHCO}_3$	47,6
$(\text{NH}_4)\text{NO}_3^*$	12	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4^*$	12	$\text{NH}_2\text{CONH}_2^*$	10
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	1,2	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	1,2	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	1
$\text{Na}_2\text{MoO}_4^{**}$	0,00009	$\text{Na}_2\text{MoO}_4^{**}$	0,00009	$\text{NiSO}_4^{**}$	$7 \times 10^{-7}$
$\text{FeSO}_4^{**}$	0,04	$\text{FeSO}_4^{**}$	0,04	pH	10,1
pH	10,1	pH	10,1		

\* = fuente nitrogenada

\*\* = cofactor catalizador de conversión de compuestos de nitrógeno

### 3.1.4. Condiciones de cultivo de *Arthrospira* spp.

El crecimiento de *Arthrospira* spp. se realizó mediante el sistema de cultivo discontinuo o *batch*, fotoautotróficamente en fotobiorreactores por triplicado de

200 mL de capacidad con un diámetro de 41 mm, con suministro de flujo continuo de aire y adición de pulsos de CO<sub>2</sub> para mantener el pH (9,9 ± 0,6), temperatura de 30°C; irradiancia de 51,3 μmol fotón m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>; ciclo circadiano 12 h luz / 12 h oscuridad. Previo al comienzo de los ensayos, la cepa fue aclimatada en botellas de 500 mL a las condiciones de experimentación (García, 2011; Álvarez, 2016).

### 3.1.5. Determinación de clorofila *a*

El contenido de clorofila *a* se determinó diariamente siguiendo la metodología propuesta por Talling & Driver (1963) modificado por Álvarez (2016): 1 mL de muestra de cultivo, se centrifugaron a 17100 g por 15 min a 4°C y el sobrenadante obtenido se descartó. Al pellet se le adicionó 1 mL de metanol al 95% (v/v) y se sonicó a 20 kHz durante 30 s, las muestras se almacenaron a 4°C por 24 horas y se centrifugaron a 17100 g por 10 min a 4°C.

El extracto metanólico se leyó en espectrofotómetro a densidad óptica de 665 nm; la concentración de clorofila *a* se determinó mediante la Ecuación 1:

$$\text{Ecu. 1.} \quad Cl\ a \ (mg\ L^{-1}) = DO_{665\ nm} \times 13.9$$

Donde, *DO* es igual a densidad óptica (665 nm) y 13,9 es una constante.

### 3.1.1. Determinación de tasa de crecimiento específica $\mu$

La velocidad o tasa de crecimiento específica ( $\mu = \text{día}^{-1}$ ) se determinó a partir de los datos de concentración diaria de clorofila *a* de cada muestra, empleando la Ecuación 2, propuesta por Arredondo & Voltolina (2007).

$$\text{Ecu. 2.} \quad \mu = \frac{\ln(N_2 - N_1)}{t_2 - t_1}$$

Donde  $N_1$  y  $N_2$  representan la concentración de clorofila *a* en los tiempos  $t_1$  y  $t_2$ .

### **3.1.2. Determinación de peso seco en biomasa**

Se empleó el método de Zhu & Lee (1997) que consistió en utilizar filtros de fibra de vidrio *Whatman*<sup>®</sup> GF/F de 47 mm de diámetro y 0,7 µm de diámetro de poro. Los filtros se secaron en estufa a 90°C durante 24 h, colocados en un desecador con SiO<sub>2</sub> (para evitar que los filtros adquieran humedad) y pesados en balanza analítica. Registrado los pesos, los filtros se devolvieron al secador y se procedió a filtrar 10 mL de cultivo de cada uno de los controles y tratamientos. Las sales presentes en los medios de cultivo se eliminaron por adición de 10 mL de HCO<sub>2</sub>NH<sub>4</sub> 0,5 mM (Formiato de Amonio) durante el filtrado.

Los filtros se secaron en estufa a 80°C por 24 h y pesados en balanza analítica. El peso seco se obtuvo de por diferencia entre el filtro con la muestra filtrada seca y el peso del filtro seco.

### **3.1.3. Evaluación de composición bioquímica**

#### **3.1.3.1. Determinación de proteínas**

La concentración de proteínas se determinó al final del ensayo, por el método de Lowry, Rosebrough, Farr, & Randall (1951) modificado por Herbert, Phipps, & Strange (1971). Se centrifugaron 10 mL de cultivo, eliminó el sobrenadante y al pellet se adicionó 2 mL de NaOH 1N, mezclado y llevado a baño termostático de 95 – 100°C durante 45 min. Las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente por 15 min y centrifugadas a 3800 g por 15 min.

Se transfirieron 100 µL de sobrenadante a tubos de ensayo (por triplicado); para preparar el blanco se reemplazó la muestra por agua destilada y se procedió al igual que el tratamiento de las muestras: a los 100 µL de sobrenadante se adicionaron 400 µL de agua destilada, 300 µL de NaOH 1N, agitados en vórtex, se añadieron 2 mL de solución Cu-Tartrato saturada (50 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 5% + 2 mL de CuSO<sub>4</sub> al 0,5% disuelto en tartrato de sodio potasio al 1%), se mezcló y dejó reaccionar por 10 min. Se agregaron 400 µL de Folin Ciocalteu diluido (v/v), mezclado inmediatamente y dejado 30 min a temperatura ambiente.

Las muestras se leyeron en espectrofotómetro a 750 nm contra el blanco. La concentración de las muestras se obtuvo por medio de la ecuación de la recta obtenida de la curva patrón de ASB (Anexo 2) y los valores de la lectura espectrofotométrica de las muestras.

### 3.1.3.2. Determinación de ficobiliproteínas

El contenido de ficobiliproteínas no se pudo determinar por métodos convencionales, a continuación se describen los métodos utilizados:

- **Método de Bennett & Bogorad (1973):** se centrifugó 5 mL de muestra de cultivo a 17100 g durante 15 min a 4°C. El sobrenadante se eliminó y al pellet se añadió 6 mL de buffer salino fosfato ( $\text{Na}_3\text{PO}_5$  0,01 M – NaCl 0,15 M, pH 7,0) y llevado a 4°C por 24 h. Posteriormente, las muestras se sometieron a un proceso de congelación y descongelación por un periodo mínimo de tres veces y centrifugaron a 17100 g durante 15 min a 4°C.
- **Método de extracción de ficobiliproteínas con glicerol:** 15 mL de cultivo se centrifugaron a 4000 rpm por 15 min, el sobrenadante se descartó y al pellet se le adicionó 4 gotas de glicerol. Las muestras se agitaron en vórtex para una completa homogenización y llevadas a congelación durante 1 h, luego, se descongelaron, añadieron 4 mL de agua destilada y llevadas al vórtex. Las muestras fueron sometidas a congelación y descongelación hasta extracción de ficobiliproteínas (Morales, 2012).
- **Sonicación prolongada a 4°C:** 10 mL de cultivo se centrifugaron a 8000 rpm por 15 min, agregaron 4 mL de agua destilada fría y sonicaron durante 5 min a 4°C. La muestra se centrifuga y utiliza el sobrenadante para la cuantificación de ficobiliproteínas en espectrofotómetro (Betancourt, 1997).
- **Congelación y descongelación a 4°C:** se centrifugaron 10 mL de cultivo a 8000 rpm por 15 min y agregaron 4 mL de agua destilada fría, las muestras se someten a choque osmótico (congelación y descongelación)

tres veces sucesivas a 4°C, se centrifugaron y el sobrenadante se utilizó para determinar el contenido de ficobiliproteínas de la biomasa (Betancourt, 1997).

- **Extracción de ficobiliproteínas con soluciones de extracción:** a la biomasa húmeda obtenida por centrifugación a 8000 rpm durante 15 min se aplican soluciones de extracción, en este estudio se ensayaron dos soluciones por separado (cloruro de sodio 0,15 M; cloruro de calcio 0,17 M). Las muestras se homogenizaron en vórtex, almacenaron por 24 h, centrifugadas y el sobrenadante leído en espectrofotómetro (Betancourt, 1997).

El contenido de ficobiliproteínas (ficocianina (PC), aloficocianina (APC) y ficoeritrina (PE)) en biomasa se determinaron por espectrofotometría a las densidades ópticas de 560, 615 y 652 nm, la concentración de, utilizando las Ecuaciones 3, 4 y 5, detalladas en el método de Bennett & Bogorad (1973):

$$\text{Ecu. 3. } \quad \text{PC } (\mu\text{g L}^{-1}) = \frac{\text{DO}_{615} - 0.474 (\text{DO}_{652})}{5.34}$$

$$\text{Ecu. 4. } \quad \text{APC } (\mu\text{g L}^{-1}) = \frac{\text{DO}_{652} - 0.208 (\text{DO}_{615})}{5.09}$$

$$\text{Ecu. 5. } \quad \text{PE } (\mu\text{g L}^{-1}) = \frac{\text{DO}_{562} - 0.241 (\text{PC}) - 0.849 (\text{APC})}{9.62}$$

Entre los métodos descritos, cabe mencionar que por congelación y descongelación reiterada, se extrajo el contenido de ficobiliproteínas pero no es su totalidad, por tal motivo, en base a estudios realizados con *Arthrospira* spp. por Ferreira (2015) y Álvarez (2016), que obtuvieron concentraciones de ficobiliproteínas entre 9 – 11 % del contenido proteico, se obtuvo un factor de conversión que ayudo en la determinación de la concentración de ficobiliproteínas.

### 3.1.3.3. Determinación de carbohidratos

La determinación de carbohidratos se realizó al final del ensayo, por el método de Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers, & Smith (1956): 1 mL de muestra de cultivo se centrifugó a 17100 g durante 15 min a 4°C, se desechó el sobrenadante y el

pellet fue resuspendido en 1 mL de NaOH 1N, llevado a agitación en vórtex, sonificado 30 s a 4°C y centrifugado a 17100 g por 15 min a 4°C.

Se transfirieron 100 µL de sobrenadante a tubos de ensayo de vidrio (por triplicado) y agregaron 900 µL de agua destilada (dilución 1:10); para preparar el blanco se reemplazó la muestra por agua destilada, y se procedió de la siguiente forma tanto para el blanco como las muestras: se añadieron 25 µL de fenol al 80% (v/v), se agitó en vórtex y agregaron 2,5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, se agitó inmediatamente en vórtex, y dejó enfriar a temperatura ambiente durante 30 min.

Las muestras se leyeron en espectrofotómetro a 485 nm contra el blanco. La concentración de carbohidratos en biomasa se obtuvo por medio de la ecuación de la recta obtenida de la curva patrón de glucosa (Anexo 3) y los valores de la lectura espectrofotométrica de las muestras.

#### **3.1.3.4. Determinación de lípidos**

Se extrajo los lípidos de la biomasa, al final del ensayo, según Bligh & Dyer (1959): 15 mL de cultivo se centrifugaron a 3000 g por 10 min, descartó el sobrenadante y al pellet adicionó 3 mL de metanol y 1,5 mL de cloroformo. La mezcla se sonicó 2 min en frío y agitó 30 s en vórtex; muestra protegida de la luz. Luego de 20 min a temperatura ambiente, se centrifugó a 3900 g por 10 min y el sobrenadante se conservó y agregó 1,5 mL de cloroformo y 1,5 mL de agua destilada, y agitó en vórtex hasta homogenización. Se centrifugó a 3900 g por 5 min, la fase acuosa (superior) se retiró con pipeta Pasteur y a la fase orgánica se adicionó 0,5 mL de acetona para eliminar material traza del agua, y evaporó a 37°C por 24 h y re-suspendió en 1 mL de cloroformo.

El método de carbonización simple de Marsh & Weinstein (1966) se utilizó para la determinación espectrofotométrica de lípidos: 200 µL de muestra repartida por triplicado en tubos de ensayo de vidrio, se evaporaron, adicionaron 2 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado y llevados a carbonización simple por 15 min a 200°C; el blanco consistió de 2 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. Los tubos se enfriaron en frío y añadieron 3 mL de agua destilada, agitado en vórtex y vueltos a enfriar en refrigeración.

La concentración de lípidos en biomasa se determinó espectrofotométricamente a 375 nm; muestras leídas antes de 2 h. La concentración de lípidos en biomasa se obtuvo por medio de la ecuación de la recta obtenida de la curva patrón de tripalmitina – cloroformo (Anexo 4) y los valores de la lectura espectrofotométrica de las muestras.

#### **3.1.4. Determinación de concentración de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), urea ( $\text{NH}_2\text{CONH}_2$ ) y fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) en sobrenadante**

Se determinó los compuestos de nitrógeno ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_2\text{CONH}_2$  y  $\text{PO}_4^{3-}$ ) por medio del equipo, Fotómetro Lovibond MD600/MaxiDirect, siguiendo los protocolos establecidos en el manual del equipo, con sus respectivos kits de materiales y reactivos. La concentración de  $\text{NH}_4^+$  se midió en base al método de indofenol, que consiste en la reacción del amonio con silicato alcalino en presencia de cloro formando un complejo de indofenol verde – azul (Bolleter, Bushman, & Tidwell, 1961), y los resultados expresados en  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{NH}_4^+$ ; el contenido de  $\text{NO}_3^-$ , por el método del ácido cromotrópico (West & Ramachandran, 1966): los iones nitrato reaccionan en presencia de ácido sulfúrico formando ácido nítrico, producto de reacción se forma un complejo coloreado amarillo, resultados expresado en  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{NO}_3^-$ .

Por otro lado, la  $\text{NH}_2\text{CONH}_2$  se determinó por el método ureasa – indofenol (McCarthy, 1970), la ureasa disocia la urea generando  $\text{CO}_2$  y  $\text{NH}_3$ , el  $\text{NH}_3$  reacciona con salicilato e hipoclorito para formar un complejo indofenol verde, resultados expresados en  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{NH}_2\text{CONH}_2$ .

Finalmente, los  $\text{PO}_4^{3-}$  se determinan por el método del ácido fosfovanadomolibdato amarillo (Misson, 1908), el  $\text{PO}_4^{3-}$  reacciona con molibdato de amonio en presencia de vanadato de amonio para formar fosfovanadomolibdato amarillo, resultados expresados en  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{PO}_4^{3-}$ .

### **3.1.5. Análisis estadísticos**

El análisis estadístico y los gráficos se efectuaron con el programa *Prism* versión 8.0a de *GraphPad Software, Inc*®. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y el test de Tukey con un nivel de significancia de  $P \leq 0,05$  para evaluar las diferencias entre tratamientos y con el control. Los resultados se presentaron como medias junto con la desviación estándar.

### **3.1.6. Análisis de costo de biomasa**

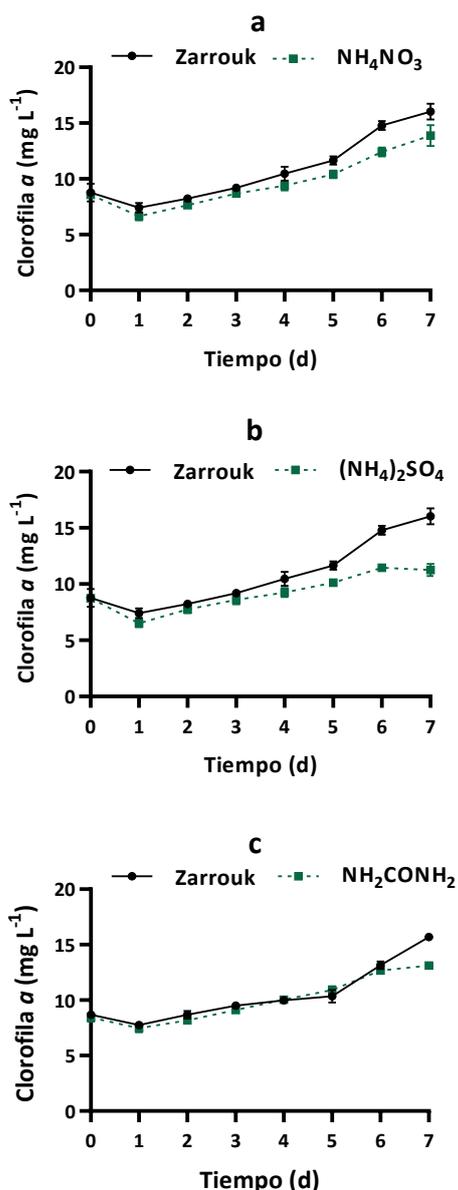
Se realizó un análisis de costos de las sales nutritivas empleadas en la elaboración de los medios de cultivo: medio estándar Zarrouk y medio con agua de mar suplementada con fertilizantes agrícolas grado comercial,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , y cofactores ( $\text{NiSO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  y  $\text{FeSO}_4$ ); para la obtención de un kilogramo de biomasa seca.

## CAPÍTULO IV

### 4.1. Resultados

#### 4.1.1. Determinación de clorofila *a*

Se midió diariamente la clorofila *a* para evaluar el crecimiento de *Arthrospira* spp., durante 7 días de cultivo.



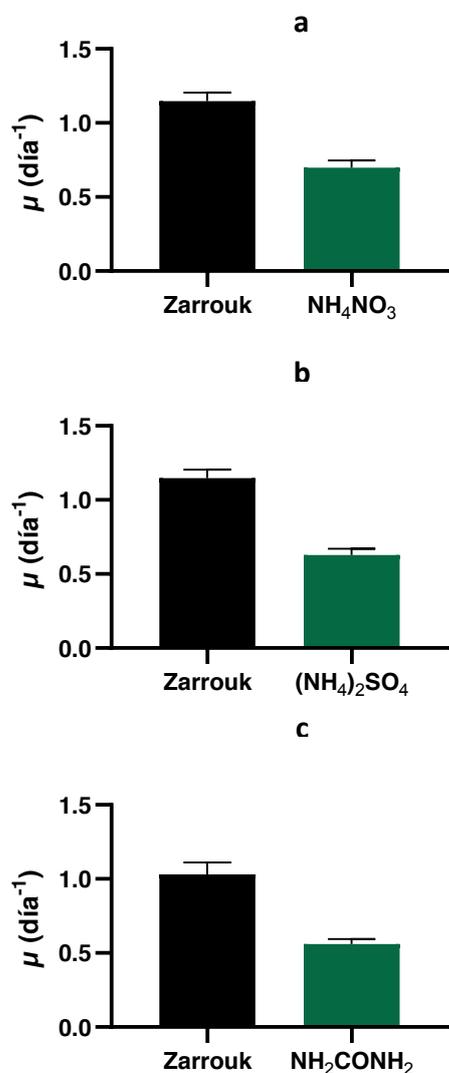
**Figura 1.** Crecimiento de *Arthrospira* spp. determinado mediante concentración de clorofila *a* en cultivo en *batch*, en medio Zarrouk (control) y medio constituido de agua de mar suplementada con fertilizantes agrícolas (a): NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 12 mM; b): (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 12 mM; c): NH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub> 10 mM), bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>) y fosfato de potasio dibásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>); en fotobiorreactores de 200 mL con fotoperiodo luz : oscuridad (n=3).

Las mayores concentraciones de clorofila *a* se determinaron en el medio control; por otro lado, el tratamiento con NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 12 mM (13,87 mg L<sup>-1</sup>) y NH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub> 10

mM (13,12 mg L<sup>-1</sup>) no presentaron diferencias significativas entre sí, siendo estos valores mayores a los obtenidos con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 12 mM (11,25 mg L<sup>-1</sup>) ( $P \leq 0,05$ ) (Figura 1 y Anexo 5). De modo que, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> alcanzó el mayor contenido de clorofila *a* entre los tres fertilizantes grado comercial evaluados.

#### 4.1.2. Determinación de tasa de crecimiento específica

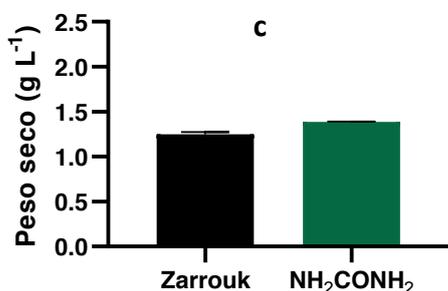
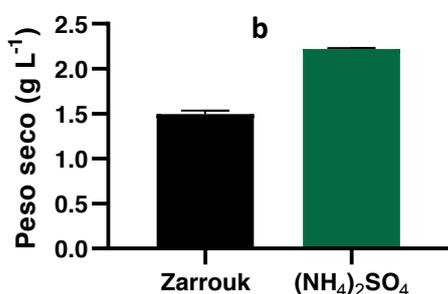
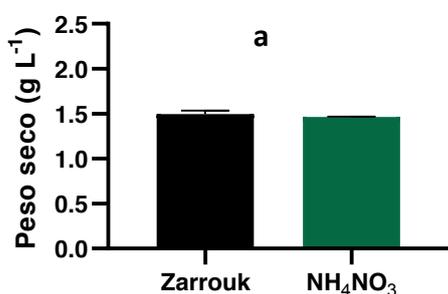
Para la determinación de la tasa de crecimiento específica ( $\mu = \text{día}^{-1}$ ) se tomaron en cuenta los días 5 y 6 del cultivo en *batch* de *Arthrospira* spp. debido a que en ese periodo de tiempo se observó el crecimiento en fase exponencial de una forma más pronunciada en controles y tratamientos (Figura 1).



**Figura 2.** Tasa de crecimiento específica ( $\mu$ ) en cultivo en *batch* de *Arthrospira* spp. en medio Zarrouk (control) y medio constituido de agua de mar suplementada con fertilizantes agrícolas (tratamientos: a) NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 12 mM; b) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 12 mM; c) NH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub> 10 mM), bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>) y fosfato de potasio dibásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (n=3).

Los valores más altos de  $\mu$  se registraron en el medio control de los tres ensayos:  $1,15 \pm 0,06 \text{ d}^{-1}$ ;  $1,15 \pm 0,06 \text{ d}^{-1}$ ;  $1,03 \pm 0,08 \text{ d}^{-1}$ ; mientras que para sus correspondientes tratamientos:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  12 mM:  $0,67 \pm 0,05 \text{ d}^{-1}$ ;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  12 mM:  $0,63 \pm 0,04 \text{ d}^{-1}$  y  $\text{NH}_2\text{CONH}_2$  10 mM:  $0,56 \pm 0,03 \text{ d}^{-1}$ . Estos valores de  $\mu$  indican que existen diferencias significativas entre el medio control y los tratamientos, al igual que entre tratamientos ( $P \leq 0,05$ ) (Figura 2 y Anexo 5).

#### 4.1.3. Determinación de peso seco



**Figura 3.** Peso seco en cultivo en *batch* de *Arthrospira* spp. en medio Zarrouk (control) y medio constituido de agua de mar suplementada con fertilizantes agrícolas (tratamientos: a)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  12 mM; b)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  12 mM; c)  $\text{NH}_2\text{CONH}_2$  12 mM), bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) y fosfato de potasio dibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) (n=3).

Por diferencia entre filtro seco y filtro con muestra seca, no se registró diferencias significativas entre  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  12mM ( $1,46 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$ ) y su respectivo control ( $1,49 \pm 0,04 \text{ g L}^{-1}$ ); por otro lado  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  12 mM ( $2,22 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$ ); y  $\text{NH}_2\text{CONH}_2$  10

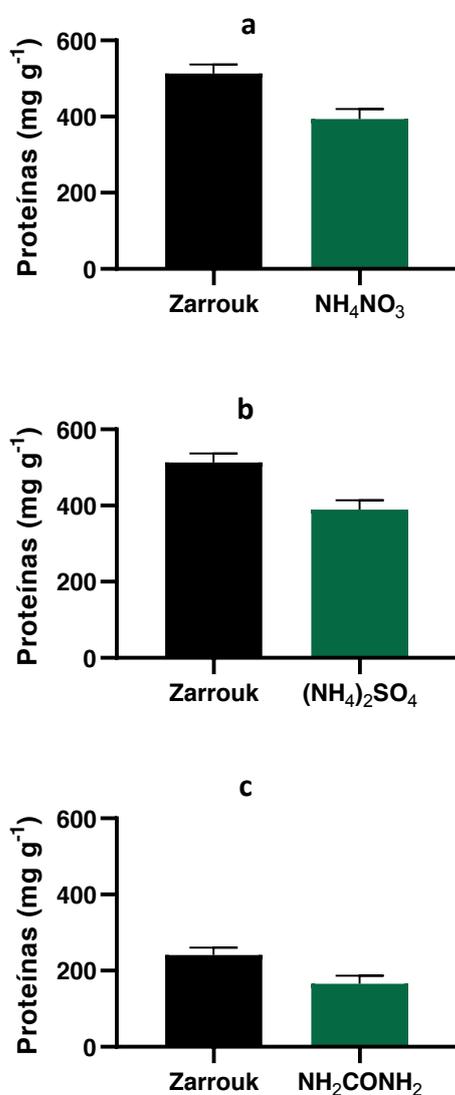
mM ( $1,39 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$ ), fueron significativamente diferentes del control ( $1,49 \pm 0,04 \text{ g L}^{-1}$  y  $1,25 \pm 0,02 \text{ g L}^{-1}$ ). Estos resultados indican que se pudo obtener mayor cantidad de biomasa seca en el cultivo de *Arthrospira* spp. con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Figura 3 y Anexo 5).

La productividad se determinó a partir de los datos obtenidos de peso seco, dando como resultado para los tratamientos:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  12 mM,  $0,18 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  12 mM,  $0,28 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ;  $\text{NH}_2\text{CONH}_2$  10 mM,  $0,17 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , por otro lado, para sus respectivos controles:  $0,19 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ;  $0,19 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ;  $0,16 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . Estos valores tanto de peso seco como de productividad, muestran que no existen diferencias significativas entre tratamientos y el control, a excepción de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  que se diferenció de su control ( $P \leq 0,05$ ).

#### 4.1.4. Evaluación de composición bioquímica de la biomasa

##### 4.1.4.1. Determinación de proteínas

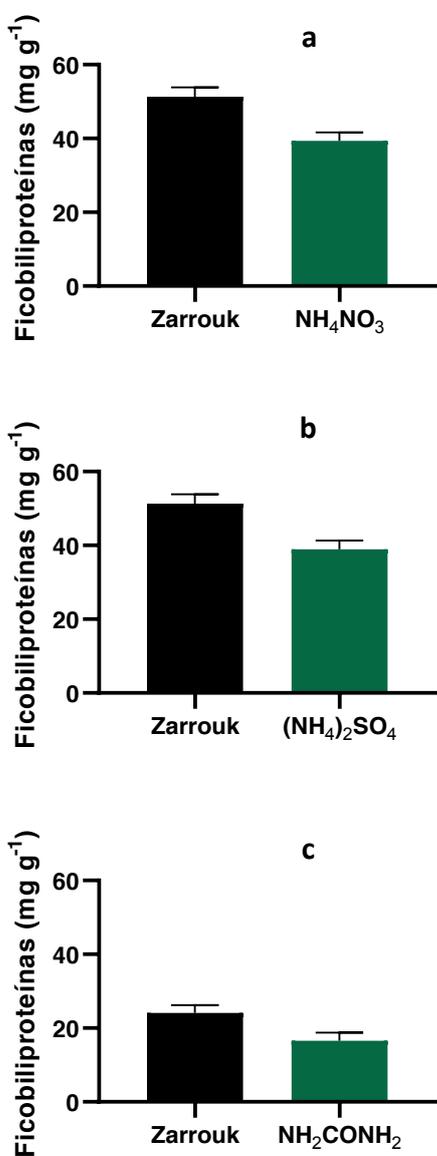
El medio control Zarrouk presento mayor concentración de proteínas, comparado con los tratamientos. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  12 mM y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  12 mM ( $393,920 \pm 0,076 \text{ mg g}^{-1}$ ,  $389,077 \pm 0,053 \text{ mg g}^{-1}$ ), sin embargo; estos valores fueron mayores a diferencia de  $\text{NH}_2\text{CONH}_2$  10mM ( $165,630 \pm 0,042 \text{ mg g}^{-1}$ ) ( $P \leq 0,05$ ) (Figura 4 y Anexo 6).



**Figura 4.** Contenido proteico de biomasa húmeda en cultivo en *batch* de *Arthrospira* spp. en medio Zarrouk (control) y medio constituido de agua de mar suplementada con fertilizantes agrícolas (tratamientos: a)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  12 mM; b)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  12 mM; c)  $\text{NH}_2\text{CONH}_2$  10 mM), bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) y fosfato de potasio dibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) (n=3).

#### 4.1.4.2. Determinación de ficobiliproteínas

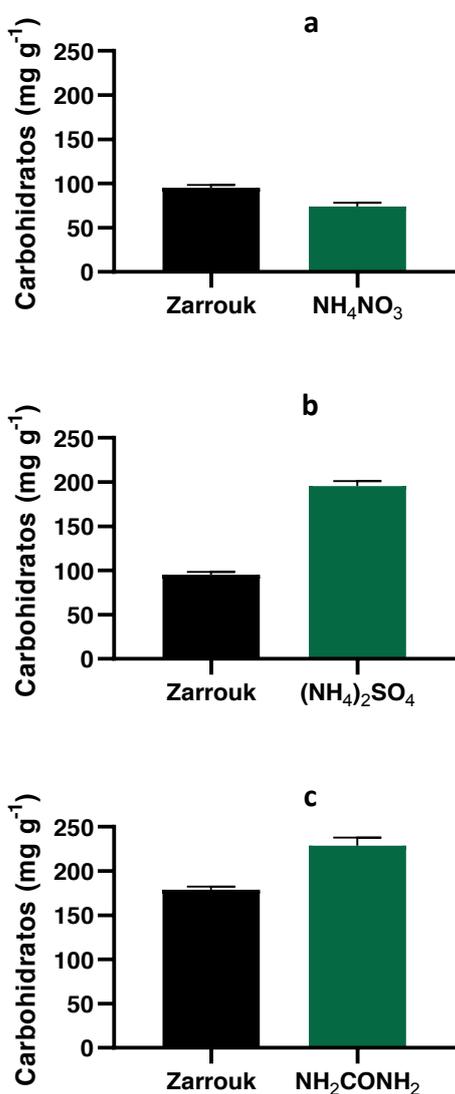
Se determinó mayor contenido de ficobiliproteínas en el medio control. Los tratamientos con  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  12 mM y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  12 mM ( $39,39 \pm 2,2 \text{ mg g}^{-1}$  y  $38,90 \pm 2,4 \text{ mg g}^{-1}$ ) no presentaron diferencias significativas entre ellos pero si con  $\text{NH}_2\text{CONH}_2$  10 mM ( $16,56 \pm 2,2 \text{ mg g}^{-1}$ ) ( $P \leq 0,05$ ); siendo los dos primeros, los que obtuvieron mayores concentraciones de ficobiliproteínas (Figura 5 y Anexo 6).



**Figura 5.** Contenido de ficobiliproteínas en cultivo en *batch* de *Arthrospira* spp. en medio Zarrouk (control) y medio constituido de agua de mar suplementada con fertilizantes agrícolas (tratamientos: a)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  12 mM; b)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  12 mM; c)  $\text{NH}_2\text{CONH}_2$  10mM), bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) y fosfato de potasio dibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) (n=3).

#### 4.1.4.3. Determinación de carbohidratos de biomasa

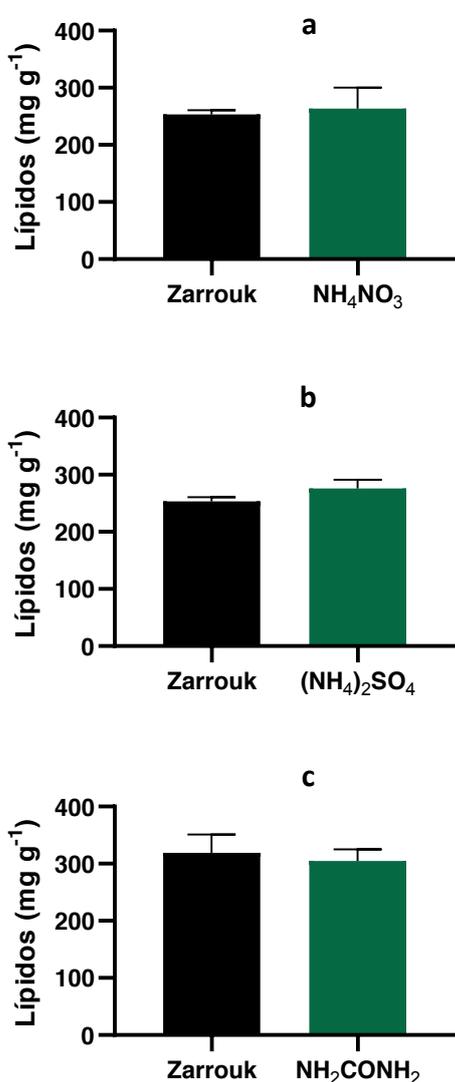
El contenido de carbohidratos en los tratamientos con  $\text{NH}_2\text{CONH}_2$  10 mM y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  12 mM fueron de  $228,69 \pm 0,01 \text{ mg g}^{-1}$  y  $195,42 \pm 0,002 \text{ mg g}^{-1}$ , valores mayores al control. Contrario a  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  12 mM ( $74,05 \pm 0,002 \text{ mg g}^{-1}$ ) que su concentración fue menor con relación al control. Demostrando así, que los tratamientos presentaron diferencias significativas entre ellos y con el control ( $P \leq 0,05$ ) (Figura 6 y Anexo 6).



**Figura 6.** Concentración de carbohidratos en biomasa en cultivo en *batch* de *Arthrospira* spp. en medio Zarrouk (control) y medio constituido de agua de mar suplementada con fertilizantes agrícolas (tratamientos: a)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  12 mM; b)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  12 mM; c)  $\text{NH}_2\text{CONH}_2$  10 mM), bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) y fosfato de potasio dibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) (n=3).

#### 4.1.4.4. Determinación de lípidos de biomasa

La concentración de lípidos obtenida; muestra que los tratamientos no presentaron diferencias significativas con el control ( $P \leq 0,05$ ). Siendo el tratamiento con  $\text{NH}_2\text{CONH}_2$  10 mM ( $304,68 \pm 16,06 \text{ mg g}^{-1}$ ) el que alcanzó mayor contenido lipídico con respecto a  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  12 mM y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  12 mM ( $263,75 \pm 22,63 \text{ mg g}^{-1}$  y  $276,24 \pm 17,23 \text{ mg g}^{-1}$ ) (Figura 7 y Anexo 6).



**Figura 7.** Concentración de lípidos en biomasa en cultivo en *batch* de *Arthrospira* spp. en medio Zarrouk (control) y medio constituido de agua de mar suplementada con fertilizantes agrícolas (tratamientos:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  12 mM;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  12 mM;  $\text{NH}_2\text{CONH}_2$  10 mM), bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) y fosfato de potasio dibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) ( $n=3$ ).

#### 4.1.5. Determinación de nutrientes en sobrenadante

Del análisis al inicio y final del ensayo de la concentración de nutrientes en los medios de cultivos ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_2\text{CONH}_2$  y  $\text{PO}_4^{3-}$ ) se determinó que *Arthrospira* spp. asimiló la forma amida de  $\text{NH}_2\text{CONH}_2$ ; amoniacal de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; amoniacal y nítrica de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; y el fosfato de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . No se siguió la evolución de asimilación diaria de los nutrientes debido a que no era el objeto de estudio pero si la determinación de la concentración final de las fuentes nitrogenadas en los medios a los 8 días de cultivo.

Los porcentajes de asimilación de nitrógeno varían entre 99,6 – 99,9%; de igual manera, el contenido de fósforo del medio de cultivo se asimiló en forma de ortofosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), entre 97,1 – 99,8%. Estos resultados muestran que la reducción de N y P del medio de cultivo no varían significativamente entre tratamientos y con el control (Tabla 4), y que la cianobacteria *Arthrospira* spp. absorbió los nutrientes del medio para su crecimiento.

**Tabla 4.** Concentración de nitrógeno efectivo.

	$\text{N}_0$ (mM N)	$\text{N}_f$ (mM N)	% asimilación de N
<b>Control</b>	4,89	0,0200	99,6
<b><math>\text{NH}_4\text{NO}_3</math></b>	4,19	0,0079	99,8
<b><math>(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4</math></b>	2,54	0,0014	99,9
<b><math>\text{NH}_2\text{CONH}_2</math></b>	4,66	0,0093	99,8

$\text{N}_0$  concentración inicial de nitrógeno (mM de N)  
 $\text{N}_f$  concentración final de nitrógeno (mM de N)

#### 4.1.6. Análisis de costos de biomasa

Por un litro, de medio de cultivo estándar Zarrouk se obtienen alrededor de 5 g de biomasa seca (BS) de *Arthrospira* spp. (Álvarez, 2016), mientras que de los resultados obtenidos, entre 1,3 y 1,9 g  $\text{L}^{-1}$  de BS. Estos valores nos indican que con medio Zarrouk se necesitan 200 L de agua destilada para producir 1 kg de BS, mientras que con los medios formulados en el presente estudio, entre 515 y 826 L de agua de mar; a pesar de que hay mayor consumo del recurso agua con

los medios formulados, el agua residual producto de la producción de biomasa podría ser reutilizada en los cultivos. Sin embargo, aún falta evaluar dicha reutilización.

Tomando en cuenta estos datos, se realizó el análisis de costo para la obtención de un kilogramos de biomasa seca de *Arthrospira* spp.; con medio Zarrouk el costo de producción es de aproximadamente \$440 (Tabla 5), en cambio, con los medios formulados, entre \$57 y \$90 (Tabla 6).

**Tabla 5.** Costo de producción de 1 L de medio de cultivo estándar Zarrouk.

Unidad (kg)	Sales nutritivas	Costo \$ sales	g L <sup>-1</sup> de cultivo	Costo \$ g de producto	Costo \$ Litro de cultivo
1	NaHCO <sub>3</sub>	25,18	18,0	0,03	0,45
0,5	NaNO <sub>3</sub>	28,90	0,5	0,06	0,14
1	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	55,90	2,5	0,06	0,03
0,5	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	55,70	1,0	0,11	0,11
0,5	NaCl	7,00	1,0	0,01	0,01
0,5	MgSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	41,30	0,2	0,08	0,02
0,5	CaCl <sub>2</sub> .2 H <sub>2</sub> O	37,70	0,08	0,07	0,01
0,5	FeSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	54,20	0,01	0,11	0,001
0,5	EDTA	49,07	0,08	0,10	0,01
0,5	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	65,00	2,86	0,13	0,37
0,5	MnCl <sub>2</sub> .4 H <sub>2</sub> O	75,12	1,81	0,15	0,27
0,5	ZnSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	40,10	0,22	0,08	0,02
0,5	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	48,10	0,02	0,09	0,002
0,5	CuSO <sub>4</sub> .5 H <sub>2</sub> O	59,67	0,07	0,12	0,01
1 L	Agua destilada	0,75			0,75
<b>Total \$</b>		<b>642,94</b>			<b>2,2</b>

**Tabla 6.** Costo de producción de 1 L de medio de cultivo con agua de mar suplementada con fertilizantes (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y NH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>) y sales nutritivas.

Unidad (kg)	Tratamiento 1	Costo \$	g L <sup>-1</sup> de cultivo	Costo \$ g de producto	Costo \$ Litro de cultivo
0,5	NaHCO <sub>3</sub>	12,59	4,00	0,02	0,10
0,5	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	27,95	0,17	0,05	0,01
0,5	NiSO <sub>4</sub>	41,95	0,0000001	0,08	0,0000001
50	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	32,15	0,21	0,0001	0,00003
1 L	Agua de mar	0,00			0,00
<b>Total \$</b>		<b>114,64</b>			<b>0,11</b>

<b>Unidad (kg)</b>	<b>Tratamiento 2</b>	<b>Costo \$</b>	<b>g L<sup>-1</sup> de cultivo</b>	<b>Costo \$ g de producto</b>	<b>Costo \$ Litro de cultivo</b>
0,5	NaHCO <sub>3</sub>	12,59	4,00	0,02	0,10
0,5	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	27,95	0,21	0,05	0,01
0,5	FeSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	54,20	0,01	0,11	0,001
0,5	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	48,10	0,00002	0,1	0,000002
50	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	32,15	0,43	0,0003	0,0001
1 L	Agua de mar	0,00			0,00
<b>Total \$</b>		<b>174,99</b>			<b>0,11</b>

<b>Unidad (kg)</b>	<b>Tratamiento 3</b>	<b>Costo \$</b>	<b>g L<sup>-1</sup> de cultivo</b>	<b>Costo \$ g de producto</b>	<b>Costo \$ Litro de cultivo</b>
0,5	NaHCO <sub>3</sub>	12,59	4,00	0,02	0,10
0,5	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	27,95	0,21	0,05	0,01
0,5	FeSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	54,20	0,01	0,11	0,001
0,5	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	48,10	0,00002	0,1	0,000002
50	NH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>	32,15	0,6	0,0004	0,0002
1 L	Agua de mar	0,00			0,00
<b>Total \$</b>		<b>174,99</b>			<b>0,11</b>

## Discusión

En el cultivo masivo de microorganismos autótrofos, los requerimientos nutricionales son uno de los factores fundamentales que controlan el crecimiento y productividad.

Este estudio se realizó con el fin de proporcionar un medio de cultivo económico y simple, que disminuya los costos de producción a gran escala de *Arthrospira* spp., además de la obtención de biomasa rica en nitrógeno y fósforo, con posibles aplicaciones en agricultura o como suplemento alimenticio. Para ello se sustituyó la fuente de nitrógeno grado analítico del medio de cultivo estándar Zarrouk (Zarrouk, 1966) por fertilizantes agrícolas grado comercial ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ;  $\text{NH}_2\text{CONH}_2$ ) como fuente de nitrógeno; y se adicionó  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  como fuente de fósforo, elemento precursor en la síntesis de aminoácidos;  $\text{NaHCO}_4$  como fuente de carbono, esencial para el metabolismo del carbono; y  $\text{NiSO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  y  $\text{FeSO}_4$ , como cofactores fundamentales para promover la actividad enzimática; todos estos reconstituidos en agua de mar.

Se evaluó estas tres diferentes fuentes nitrogenadas en el crecimiento, productividad y composición bioquímica de *Arthrospira* spp. Los fertilizantes empleados contaron con una composición en nitrógeno de:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 35,5% de nitrógeno total (forma nítrica: forma amoniacal);  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 21% de nitrógeno total (forma amoniacal y otros); y  $\text{NH}_2\text{CONH}_2$ , 46% nitrógeno total; porcentajes indicados en la etiqueta del producto; que se escogieron por ser baratos, fácil de adquirir y comúnmente empleados.

La concentración de las fuentes nitrogenadas utilizadas en los medios de cultivo fueron: 12 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , y 10 mM de  $\text{NH}_2\text{CONH}_2$ . Bajas concentraciones que se deben que a en condiciones de pH elevado ( $9,9 \pm 0,2$ ), propio del hábitat de *Arthrospira* spp. por ser una cianobacteria alcalófila, el amonio tiende a transformarse en amoniaco ( $\text{NH}_3$ ). El  $\text{NH}_3$  en concentraciones de 15 – 16 mM, en algunos casos puede provocar la muerte celular de ciertas especies de microorganismos autótrofos (Ferreira *et al.*, 2010). Por otro parte, 10 mM de  $\text{NH}_2\text{CONH}_2$  dan lugar a la formación de 15 mM de  $\text{NH}_3$  en el medio de cultivo (Mackerras & Smith, 1986). Por lo anteriormente expuesto y ensayos

previos, las concentraciones iniciales de  $\text{NH}_4$  para  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  de 31,23 mM y 18,90 mM, se redujeron, al igual que la del fósforo para mantener la relación 10,1 del medio de cultivo Zarrouk (29,4 mM de  $\text{NaNO}_3$  y 2,9 mM de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ).

Durante los primeros días de ensayos (día 0 – 3) se pudo evidenciar la disminución progresiva del pH del medio de cultivo de 9,9 a  $9,2 \pm 0,1$ . Esta respuesta según Baldoncini (2015) se debe a que cada mol de N contenido en  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  proporcionan 4 moles de  $\text{H}^+$ , mientras que cada mol de N de  $\text{NH}_2\text{CONH}_2$  libera 2 moles de  $\text{H}^+$ , hidrógeno que liberado tiende a acidificar el medio. Sin embargo, la disminución del pH fue regulado a través de pulsos de  $\text{CO}_2$  a pH cercano al óptimo de cultivo ( $9,5 \pm 0,1$ ). Tal y como se reporta en los estudios realizados por Bezerra-Pedrosa *et al.* (2013), Matsudo *et al.* (2011), Matsudo, Bezerra, Sato, Converti, & Monteiro de Carvalho (2012) en el cultivo de *Arthrospira platensis* con urea como fuente de nitrógeno y que lograron la estabilización del pH a  $9,5 \pm 0,2$  con pulsos de  $\text{CO}_2$ .

Se observaron tasas de crecimiento específica altas ( $\mu$ : 0,63-1,15  $\text{d}^{-1}$ ), mientras que, en el estudio realizado por Leema *et al.* (2010) con *A. platensis* en agua de mar, se registraron valores bajos de  $\mu$  (0,18-0,26  $\text{d}^{-1}$ ). Los valores altos de  $\mu$  confirman la eficiencia metabólica de esta cianobacteria filamentosa.

La mayor cantidad de biomasa seca entre los tratamientos con irradiancia lumínica de 51,3  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fue 2,22  $\text{g L}^{-1}$  con 12mM de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , seguido de 1,46  $\text{g L}^{-1}$  con 12mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , y 1,39  $\text{g L}^{-1}$  con 10mM de  $\text{NH}_2\text{CONH}_2$ . Por otra parte, en el estudio realizado por Murugan & Rajesh (2014) en el cultivo de *Spirulina platensis* en agua de mar a diferentes proporciones (1:4; 2:4; 3:4) se reportó biomasa seca de 1,52  $\text{g L}^{-1}$ , 2,72  $\text{g L}^{-1}$ , y 1,92  $\text{g L}^{-1}$ ; respectivamente. Además, es importante acotar que los autores no mencionan la intensidad lumínica empleada ni adición de pulsos de  $\text{CO}_2$ , de ser el caso. Por tanto, no se puede concluir totalmente que ninguno de estos factores tuvo incidencia sobre la concentración de biomasa obtenida.

Por el contrario, Vieira *et al.* (2001) en el cultivo de *Spirulina platensis* con diferentes fuentes nitrogenadas (en medio Zarrouk), concentraciones (10mM –

30mM – 50mM) e intensidad lumínica ( $25,65 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), reportaron  $0,99 \text{ g L}^{-1}$  de biomasa seca con 10 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , y  $0,91 \text{ g L}^{-1}$  de biomasa seca con 10 mM de  $\text{NH}_2\text{CONH}_2$ . Cabe resaltar que nuestros resultados fueron significativamente mejores en el cultivo con  $\text{NH}_2\text{CONH}_2$  10mM ( $1,39 \text{ g L}^{-1}$ ) y  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  12mM ( $1,46 \text{ g L}^{-1}$ ) que los obtenidos por estos autores.

La mayor concentración de proteínas (39,4 – 38,4 %) en los cultivos con  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  con respecto a  $\text{NH}_2\text{CONH}_2$  (16,6%), se deben a la presencia de la forma amoniacal en la composición elemental de los fertilizantes, puesto que el  $\text{NH}_4$  es asimilado directamente y direccionado a la síntesis de aminoácidos, por tanto, energéticamente favorable para las células. Sin embargo, estos porcentajes de proteínas son entre 7 – 12 % más bajos que el control. Bajos porcentajes de proteínas también reportados por Madkour *et al.* (2012) en el cultivo de *Spirulina platensis* con  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y  $\text{NH}_2\text{CONH}_2$ , 5 – 18%, menos que el control.

El mayor contenido de carbohidratos y lípidos con  $\text{NH}_2\text{CONH}_2$  (17,9% y 30,5%), se presume a la capacidad de la urea de actuar además de fuente de nitrógeno como fuente de carbono, asimismo el amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) producto de la hidrólisis de la urea es asimilado directamente por la célula, favoreciendo la aceleración del metabolismo celular y consecuentemente, aumentando la síntesis de lípidos (Dhup, Kannan, & Dhawan, 2016). Mientras que el mayor contenido de lípidos con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (27,6%), a que la forma oxidada del azufre ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) es utilizada por los microorganismos fotosintéticos en la síntesis de sulfolípidos (Schmidt, 1988). Estas diferencias en la composición bioquímica de *Arthrospira* spp. también se mencionan en los trabajos realizados por Ferreira *et al.* (2010) y Madkour *et al.* (2012).

De igual manera es importante acotar que algunos autores mencionan que este aumento en el contenido de carbohidratos y lípidos con  $\text{NH}_2\text{CONH}_2$  son producto de una respuesta adaptativa a la toxicidad a altas concentraciones de la misma (Avila-Leon *et al.*, 2012; Converti *et al.*, 2006; Danesi, Rangel-Yagui, Carvalho, & Sato, 2002).

El análisis final de nutrientes en el medio nos muestran que *Arthrospira* spp. puede utilizar de manera eficiente la forma de nitrógeno de los fertilizantes utilizados y fosfato, para la síntesis de proteínas, carbohidratos y lípidos, además de que las formas del nitrógeno (amoniacal, nítrica y amida) de las diferentes fuentes nitrogenadas empleadas son específicas para la síntesis de un componente en particular.

En términos económicos, la obtención de 1 kg de biomasa de *Arthrospira* spp. en medio Zarrouk tiene un costo aproximado de \$440, mientras que 1 kg de biomasa en medio con fertilizantes de grado comercial, alrededor de \$57 a \$90. Estos resultados nos indican que los fertilizantes son una alternativa sostenible en la producción y obtención de biomasa de *Arthrospira* sp; y que la molaridad de los fertilizantes utilizados podrían ser una pauta para experimentar con otras concentraciones y sistema de cultivo, como *fed-batch*, para evaluar con los datos aquí mencionados que fuente nitrogenada alcanza mayor rendimiento en biomasa (proteínas, carbohidratos y lípidos).

Además, los resultados muestran la importancia de la selección de una fuente de nitrógeno así como su concentración en los cultivos, ya que pueden modificar la actividad metabólica y consecuentemente la composición bioquímica y el valor nutricional de los microorganismos fotosintéticos oxigénicos. Modificación que podría ser útil en la obtención de compuestos de interés.

## Conclusiones

- Es posible el cultivo discontinuo o *batch* de *Arthrospira* spp. en medios con fertilizantes agrícolas de grado comercial ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ;  $\text{NH}_2\text{CONH}_2$ ); los valores de la tasa de crecimiento específica o velocidad de crecimiento específica, muestran la eficiencia metabólica de *Arthrospira* spp. frente a estas fuentes nitrogenadas.
- La cantidad de biomasa seca obtenida y productividad, varió en función de la fuente nitrogenada empleada, siendo  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  la fuente que mejor perfil mostró en la obtención de biomasa seca.
- Mediante la determinación de la concentración de proteínas, ficobiliproteínas, carbohidratos y lípidos de la biomasa, se determinó que la composición bioquímica de la biomasa de *Arthrospira* spp. se vio modificada por la forma de nitrógeno presente en cada fertilizante.
- El análisis de la concentración de las fuentes nitrogenadas y fosfato en el medio de cultivo al final del experimento mostro que *Arthrospira* spp. asimiló estos nutrientes de manera eficiente, siendo similar a la mostrada con el medio de cultivo estándar Zarrouk.
- Estos resultados demuestran la factibilidad del cultivo de *Arthrospira* spp. en medios con fertilizantes agrícolas de grado comercial, sugiriendo así que estas fuentes nitrogenadas representan una alternativa económica para la obtención de biomasa y de compuestos en particular: pigmentos, proteínas, carbohidratos y lípidos. Adicionalmente, se presentan como una alternativa sostenible para el medio ambiente, ya que se demostró que es mínima la cantidad de nitrógeno que *Arthrospira* spp. no pudo asimilar y por lo tanto, su uso no tendría posibilidad de impactos ambientales.

## Recomendaciones

- Evaluar otras concentración de nitrógeno y fósforo en cultivo de *Arthrospira* spp. con agua de mar suplementada con fertilizantes agrícolas grado comercial, respetando la relación N:P del medio estándar Zarrouk.
- Cuantificar el contenido de carotenoides y compuestos fenólicos en el cultivo de *Arthrospira* spp. en agua de mar suplementada con fertilizantes.
- Analizar la calidad nutricional de la biomasa de *Arthrospira* spp. obtenida del cultivo con agua de mar y fertilizantes.
- Ensayar otro tipo de sistema de cultivo, *fed-batch*, para evaluar los parámetros de crecimiento (clorofila *a*, velocidad o tasa de crecimiento específica y productividad) y composición bioquímica de *Arthrospira* spp.
- Determinar la cinética de asimilación de nitrógeno y fósforo en el cultivo de *Arthrospira* spp. con agua de mar suplementada con fertilizantes para optimizar la producción de biomasa rica en compuestos nitrogenados o carbonados.
- Medir variables, como: temperatura e intensidad lumínica, en la producción de biomasa y composición bioquímica de *Arthrospira* spp. en agua de mar suplementada con fertilizantes agrícolas.
- Evaluar la biomasa de *Arthrospira* spp. para posibles aplicaciones como biofertilizantes en agricultura.

## Referencias Bibliográficas

- Abed, R., Dobretsov, S., & Sudesh, K. (2009). Applications of cyanobacteria in biotechnology. *Journal of Applied Microbiology*, 106(1), 1–12. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03918.x>
- Acién, F., Fernández, J., & Molina-Grima, E. (2013). Economics of microalgae biomass production. En *Biofuels from Algae* (pp. 313–325). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59558-4.00014-0>
- Acién, F., Fernández, J., Magán, J., & Molina, E. (2012). Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it. *Biotechnology Advances*, 30(6), 1344–1353. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.02.005>
- Aiba, S., & Ogawa, T. (1977). Assessment of growth yield of a blue-green alga, *Spirulina platensis*, in axenic and continuous culture. *J. Gen. Microbiol.*, 102, 179–182.
- Ak, İ., Oğuz, M., Benas, K., & Göksan, T. (2013). Cost-effective production of *Arthrospira (Spirulina) platensis*. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 11(3–4), 1521–1525.
- Albuja, R., Araujo, P., & López, A. (2011). *Obtención de un biofertilizante a partir del residuo ultra fino de Spirulina platensis, mediante degradación anaerobia*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Ali, S., & Saleh, A. (2012). Spirulina - An overview. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(3), 9–15.
- Allen, A., Dupont, C., Oborník, M., Hhorák, A., Nunes-Nesi, A., McCrow, J., ... Bowler, C. (2011). Evolution and metabolic significance of the urea cycle in photosynthetic diatoms. *Nature*, 473, 203–209. <https://doi.org/10.1038/nature10074>
- Almahrouqi, H., Sukumaran, P., Naqqiuddin, M., Alsabahi, J., Omar, H., & Ismail, A. (2015). The effect of salinity on growth, biochemical composition and fatty acid profile of *Spirulina (Arthrospira platensis)* grown in sheltered outdoor

- conditions in Oman. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 6(2), 61–67.
- Álvarez, X. (2016). *Modulación de la producción y caracterización estructural de los exopolisacáridos en cianobacterias diazotróficas, y estudio de su utilización para el tratamiento del digestado líquido de la digestión anaeróbica de efluentes de una procesadora de pescado. Tesis Doctoral.*
- Anagnostidis, K., & Komárek, J. (1988). Modern approach to the classification system of cyanophytes 3, Oscillatoriales. *Algological Studies/Archiv Für Hydrobiologie*, 50–53(Suppl. 80), 327–472.
- Anitha, L., Bramari, G., & Kalpana, P. (2016). Effect of supplementation of *Spirulina platensis* to enhance the zinc status in plants of *Amaranthus gangeticus*, *Phaseolus aureus* and tomato. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 7, 289–299. <https://doi.org/10.4236/abb.2016.76027>
- Aouir, A., Amiali, M., Bitam, A., Benchabane, A., & Raghavan, V. (2017). Comparison of the biochemical composition of different *Arthrospira platensis* strains from Algeria, Chad and the USA. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 11(2), 913–923. <https://doi.org/10.1007/s11694-016-9463-4>
- Apel, A., & Weuster-Botz, D. (2015). Engineering solutions for open microalgae mass cultivation and realistic indoor simulation of outdoor environments. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 38(6), 995–1008. <https://doi.org/10.1007/s00449-015-1363-1>
- Appel, K., Munoz, E., Navarrete, C., Cruz-Teno, C., Biller, A., & Thiemann, E. (2018). Immunomodulatory and inhibitory effect of Immulina®, and Immunoges® in the IG-E mediated activation of RBL-2H3 cells. A new role in allergic inflammatory responses. *Plants*, 7(13), 1–14. <https://doi.org/10.3390/plants7010013>
- Argento, F., Sempere, C., & van Lierde, F. (2016). *Factibilidad técnica y económica de la producción de Spirulina*. Instituto Tecnológico de Buenos Aires.

- Arias, D. (2010). *Proyecto de factibilidad de producción y exportación de alga Spirulina en cápsulas de 400mg y en polvo de 100g al mercado de Brasil*. Universidad Politécnica Salesiana.
- Arredondo, B., & Voltolina, D. (2007). *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal*.
- Aung, K. (2011). Effect of *Spirulina* biofertilizer suspension on growth and yield of *Vigna radiata* (L.) Wilczek. *Universities Research Journal*, 4(1), 9–14.
- Avila-Leon, I., Chuei, M., Sato, S., & Carvalho, J. (2012). *Arthrospira platensis* biomass with high protein content cultivated in continuous process using urea as nitrogen source. *Journal of Applied Microbiology*, 112(6), 1086–1094. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05303.x>
- Badger, M., & Price, G. (2003). CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms in cyanobacteria: Molecular components, their diversity and evolution. *Journal of Experimental Botany*, 54(383), 609–622. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg076>
- Baldoncini, A. (2015). *Efectos de la aplicación de fertilizantes sobre el pH de suelos serie Oncativo*. Universidad Nacional de Córdoba.
- Bashandy, S., Alhazza, I., El-Desoky, G., & Al-Othman, Z. (2011). Hepatoprotective and hypolipidemic effects of *Spirulina platensis* in rats administered mercuric chloride. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5(2), 175–182. <https://doi.org/10.5897/AJPP10.330>
- Battchikova, N., & Aro, E. (2014). Proteomics in revealing the composition, acclimation and biogenesis of thylakoid membranes. En E. Flores & A. Herrero (Eds.), *The cell biology of cyanobacteria* (pp. 90–120). Sevilla.
- Belay, A. (2013). Biology and industrial production of *Arthrospira* (*Spirulina*). En A. Richmond & Q. Hu (Eds.), *Handbook of Microalgal Culture Applied Phycology and Biotechnology* (2nd ed., pp. 339–358). USA: John Wiley & Sons, Ltd.
- Bennett, A., & Bogorad, L. (1973). Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *The Journal of Cell Biology*, 58, 419–435.

<https://doi.org/10.1083/jcb.58.2.419>

- Betancourt, L. (1997). *Producción, purificación y caracterización de ficocianina de Synechococcus sp . I09201 aislada en aguas de Cuba*. Universidad de La Coruña.
- Bezerra, R., Chuei, M., Sato, S., Converti, A., & Carvalho, J. (2013). Fed-batch cultivation of *Arthrospira platensis* using carbon dioxide from alcoholic fermentation and urea as carbon and nitrogen sources. *Bioenergy Research*, 6(3), 1118–1125. <https://doi.org/10.1007/s12155-013-9344-1>
- Bhowmik, D., Dubey, J., & Mehra, S. (2010). Evaluating potential of *Spirulina* as inoculant for pulses. *Academic Journal of Plant Sciences*, 3(4), 161–164.
- Bligh, E., & Dyer, W. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911–917. <https://doi.org/dx.doi.org/10,1139/cjm2014-0700>
- Bolleter, W., Bushman, C., & Tidwell, P. (1961). Spectrophotometric determination of ammonia as indophenol. *Analytical Chemistry*, 33(4), 592–594.
- Boussiba, S., Resch, C., & Gibson, J. (1984). Ammonia uptake and retention in some cyanobacteria. *Archives of Microbiology*, 138(4), 287–292. <https://doi.org/10.1007/BF00410892>
- Brown, C., & Herbert, R. (1977). Ammonia assimilation in purple and green sulphur bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 1, 39–42.
- Burgos-Rada, C., Jiménez-Forero, J., & Ramírez-Merlano, J. (2016). Fertilizante comercial como medio de cultivo para clorófitas (*Desmodesmus opoliensis*) y su afectación en la cinética celular. *Revista de Investigación Pecuaria*, 147–148.
- Cameron, J., Sutter, M., & Kerfeld, C. (2014). The carboxysome: function, structure and cellular dynamics. En E. Flores & A. Herrero (Eds.), *The cell biology of cyanobacteria* (pp. 171–188).

- Carr, N., & Mann, N. (2004). Oceanic cyanobacterial picoplankton. En *The molecular biology of cyanobacteria* (pp. 27–48).
- Carvalho, J., Bezerra, R., Matsudo, M., & Sato, S. (2013). Cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* by fed-batch process. En J. Lee (Ed.), *Biofuels from microalgae: Towards meeting advanced fuel standards* (pp. 781–805). USA: Springer New York.
- 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. *Journal of Phycology*, 40(3), 589–597. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2004.03167.x>
- Castenholz, R., Rippka, R., & Herdman, M. (1989). Subsection III, Orden Oscillatoriales. En J. Stanley, M. Bryant, N. Pfennig, & J. Holt (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (1st ed., p. 1771).
- Ceballos, J., Cerecedo, R., Villarreal, H., Galindo, J., & Pérez-Jar, L. (2007). Uso de la harina de *Spirulina platensis* como atrayente en el alimento para el camarón *Litopenaeus schmitti*. *Hidrobiológica*, 17(2), 113–117.
- Chaffin, J., & Bridgeman, T. (2014). Organic and inorganic nitrogen utilization by nitrogen-stressed cyanobacteria during bloom conditions. *Journal of Applied Phycology*, 26(1), 299–309. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0118-0>
- Chaiyasitdhi, A., Miphonpanyatawichok, W., Riehle, M., Phatthanakun, R., Surareungchai, W., Kundhikanjana, W., & Kuntanawat, P. (2018). The biomechanical role of overall-shape transformation in a primitive multicellular organism: A case study of dimorphism in the filamentous cyanobacterium *Arthrospira platensis*. *PLoS ONE*, 13(5), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196383>
- Chakraborty, B., Jayaswal, R. P., & Pankaj, P. P. (2015). Antimicrobial activity of *Spirulina platensis* extract against gram positive and gram negative bacteria- A comparative study. *International Journal of Current Pharmaceutical Review and Research*, 6(4), 212–214.

- Chaurasia, A. (2015). Cyanobacterial biodiversity and associated ecosystem services: introduction to the special issue. *Biodiversity and Conservation*, 24(4), 707–710. <https://doi.org/10.1007/s10531-015-0908-6>
- Chen, H., Wu, J., Wang, C., Fu, C., Shieh, C., Chen, C., ... Liu, Y.-C. (2010). Modeling on chlorophyll a and phycocyanin production by *Spirulina platensis* under various light-emitting diodes. *Biochemical Engineering Journal*, 53(1), 52–56. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2010.09.004>
- Chen, X., Schreiber, K., Appel, J., Makowka, A., Fährnich, B., Roettger, M., ... Gutekunst, K. (2016). The Entner–Doudoroff pathway is an overlooked glycolytic route in cyanobacteria and plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(19), 5441–5446. <https://doi.org/10.1073/pnas.1521916113>
- Cheng, J., Zhang, M., Song, W., Xia, A., Zhou, J., & Cen, K. (2011). Cogeneration of hydrogen and methane from *Arthrospira maxima* biomass with bacteria domestication and enzymatic hydrolysis. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(2), 1474–1481. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.11.009>
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25, 294–306. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.12.002>
- Colyer, C., Klinkade, C., Viskari, P., & Landers, J. (2005). Analysis of cyanobacterial pigments and proteins by electrophoretic and chromatographic methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382(3), 559–569. <https://doi.org/10.1007/s00216-004-3020-4>
- Converti, A., Scapazzoni, S., Lodi, A., & Carvalho, J. (2006). Ammonium and urea removal by *Spirulina platensis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33(1), 8–16. <https://doi.org/10.1007/s10295-005-0025-8>
- Cruz-Martínez, L., Jesus, C., Matsudo, M., Danesi, E., Sato, S., & Carvalho, J. (2015). Growth and composition of *Arthrospira (Spirulina) platensis* in a tubular photobioreactor using ammonium nitrate as the nitrogen source in a fed-batch process. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 32(2), 347–356. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20150322s00003062>

- Cuellar-Bermúdez, S., Barba-Davila, B., Serna-Saldivar, S., Parra-Saldivar, R., Rodríguez-Rodríguez, J., Morales-Davila, S., ... Chuck-Hernández, C. (2017). Deodorization of *Arthrospira platensis* biomass for further scale-up food applications. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *97*(15), 5123–5130. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8391j>
- Danesi, E., Rangel-Yagui, C., Carvalho, J., & Sato, S. (2002). An investigation of effect of replacing nitrate by urea in the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. *Biomass and Bioenergy*, *23*(4), 261–269. [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(02\)00054-5](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(02)00054-5)
- De, B., Chaudhury, S., & Bhattacharyya, D. (1999). Effect of nitrogen sources on gamma-linolenic acid accumulation in *Spirulina platensis*. *Journal of the American Oil Chemists Society*, *76*(3), 153–156.
- de Loura, I., Dubacq, J., & Thomas, J. (1987). The effects of nitrogen deficiency on pigments and lipids of cyanobacteria. *Plant Physiology*, *83*(4), 838–843. <https://doi.org/10.1104/pp.83.4.838>
- Delsin, S., Mercurio, D., Fosaa, M., & Campos, M. (2015). Clinical efficacy of dermocosmetic formulations containing *Spirulina* extract on young and mature skin: effects on the skin hydrolipidic barrier and structural properties. *Clinical Pharmacol Ogy & Biopharmaceutics*, *4*(4), 1–5. <https://doi.org/10.4172/2167-065X.1000144>
- Deschoenmaeker, F., Facchini, R., Leroy, B., Badri, H., Zhang, C., & Wattiez, R. (2014). Proteomic and cellular views of *Arthrospira* spp. PCC 8005 adaptation to nitrogen depletion. *Microbiology (United Kingdom)*, *160*(PART 6), 1224–1236. <https://doi.org/10.1099/mic.0.074641-0>
- Devanathan, J., & Ramanathan, N. (2012). Pigment production from *Spirulina platensis* using seawater supplemented with dry poultry manure. *Journal Of Alga Biomass Utilization*, *3*(4), 66–73.
- Dhup, S., Kannan, D., & Dhawan, V. (2016). Understanding urea assimilation and its effect on lipid production and fatty acid composition of *Scenedesmus* spp. *SOJ Biochemistry*, *2*(1), 1–7.

- Dignum, M., Matthijs, H., Pel, R., Laanbroek, H., & Mur, L. (2005). Nutrient limitation of freshwater cyanobacteria. In *Harmful Cyanobacteria* (pp. 65–86). [https://doi.org/10.1007/1-4020-3022-3\\_4](https://doi.org/10.1007/1-4020-3022-3_4)
- Dolatabadi, S., & Hosseini, S. (2016). Wastewater treatment using *Spirulina platensis*. *Journal of Chemical , Biological , and Physical Sciences*, *6*(4), 1239–1246.
- Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, *28*(3), 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Durai, P., Batool, M., & Choi, S. (2015). Structure and effects of cyanobacterial lipopolysaccharides. *Marine Drugs*, *13*(7), 4217–4230. <https://doi.org/10.3390/md13074217>
- Durall, C., & Lindblad, P. (2015). Mechanisms of carbon fixation and engineering for increased carbon fixation in cyanobacteria. *Algal Research*, *11*, 263–270. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.07.002>
- Eisenberg, D., Gill, H., Pfluegl, G., & Rotstein, S. H. (2000). Structure-function relationships of glutamine synthetases. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1477*, 122–145.
- El-Baz, F., El-Senousy, W., El-Sayed, A., & Kamel, M. (2013). *In vitro* antiviral and antimicrobial activities of *Spirulina platensis* extract. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, *3*(12), 52–56. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2013.31209>
- El-Sheekh, M., Hamad, S., & Goma, M. (2014). Protective effects of *Spirulina* on the liver function and hyperlipidemia of rats and human. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *57*(1), 77–86. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132014000100012>
- El-Sadek, D., Hamouda, R., Bassiouny, K., & Elharoun, H. (2017). *In vitro* antioxidant and anticancer activity of cyanobacteria. *Asian Journal of Medicine and Health*, *6*(3), 1–9. <https://doi.org/10.9734/AJMAH/2017/34457>

- Esteves-Ferreira, A., Inaba, M., Fort, A., Araújo, W., & Sulpice, R. (2018). Nitrogen metabolism in cyanobacteria: metabolic and molecular control, growth consequences and biotechnological applications. *Critical Reviews in Microbiology*, 0(0), 1–20. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2018.1446902>
- Esteves-Ferreira, A., Frota, J., Gomes, M., Alvarenga, L., Nunes-Nesi, A., & Araújo, W. (2017). Cyanobacterial nitrogenases: phylogenetic diversity, regulation and functional predictions. *Genetics and Molecular Biology*, 10(1), 261–275.
- Falquet, J. (2006). The nutritional aspects of *Spirulina*. *Antenna Technologies*, 1–25.
- FAO. (2016). *The state of world fisheries and aquaculture. Contributing to food security and nutrition for all*. Roma. <https://doi.org/10.5860/CHOICE.50-5350>
- Fernandes, G., Ferreira, R., Souza, T., Corrêa, B., da Silva, D., Domingues, J., & Gomez, K. (2015). Biomass production by *Arthrospira platensis* under different culture conditions. *Food Science and Technology*, 35(1), 18–24. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.6421>
- Ferreira, L., Rodrigues, M., Converti, A., Sato, S., & Carvalho, J. (2010). A new approach to ammonium sulphate feeding for fed-batch *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultivation in tubular photobioreactor. *Biotechnology Progress*, 26(5), 1271–1277. <https://doi.org/10.1002/btpr.457>
- Florencio, F. (1999). Biología molecular de la asimilación de amonio en cianobacterias. In *Biotecnología y Aplicaciones de Microorganismos Pigmentados* (pp. 147–167).
- Flores, E., & Herrero, A. (2005). Nitrogen assimilation and nitrogen control in cyanobacteria. *Biochemical Society Transactions*, 33(1), 164–167. <https://doi.org/10.13592/j.cnki.ppj.2014.0579>
- Furmaniak, M., Misztak, A., Franczuk, M., Wilmotte, A., Waleron, M., & Waleron, K. (2017). Edible cyanobacterial genus *Arthrospira*: Actual state of the art in cultivation methods, genetics, and application in medicine. *Frontiers in*

- Microbiology*, 8(2541), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02541>
- Gantt, E. (2004). Supramolecular membrane organization. En D. Bryant (Ed.), *The molecular biology of cyanobacteria* (pp. 119–138). Pennsylvania.
- Gao, K., & Ma, Z. (2008). Photosynthesis and growth of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* (Cyanophyta) in response to solar UV radiation, with special reference to its minor variant. *Environmental and Experimental Botany*, 63(1–3), 123–129. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.10.031>
- García-Pichel, F. (2009). Cyanobacteria. En *Encyclopedia of Microbiology* (3rd ed., pp. 107–124). <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00018-3>
- García, F. (2016). *Obtención de un biofertilizante a partir del cultivo de Spirulina platensis en aguas residuales domésticas provenientes del campamento de la estación de bombeo de crudo Rubiales*. Universidad de Manizales.
- Garcia, N., Sexton, J., Riggins, T., Brown, J., Lomas, M., & Martiny, A. (2018). High variability in cellular stoichiometry of carbon, nitrogen, and phosphorus within classes of marine eukaryotic phytoplankton under sufficient nutrient conditions. *Frontiers in Microbiology*, 9(543), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00543>
- García, R. (2011). *Producción de biomasa de microalgas rica en carbohidratos acoplada a la eliminación fotosintética de CO<sub>2</sub>*. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.1998.340812.x>
- Geiter, L. (1932). *Cyanophyceae*.
- Gemma, S., Molteni, M., & Rossetti, C. (2016). Lipopolysaccharides in cyanobacteria: A brief overview. *Advances in Microbiology*, 6(5), 391–397. <https://doi.org/10.4236/aim.2016.65038>
- Glazer, A. (1994). Phycobiliproteins - a family of valuable, widely used fluorophores. *Journal of Applied Phycology*, 6(2), 105–112. <https://doi.org/10.1007/BF02186064>
- Gómez, F., & Gracia, J. (2013). Mercado español de la espirulina.

- Gonzalez, L. (2010). *Influencia de la deficiencia de Nitrógeno y Fósforo en las interacciones competitivas entre Chlorella vulgaris y Scenedesmus acutus*.
- Gutiérrez-Salmeán, G., Fabila-Castillo, L., & Chamorro-Cevallos, G. (2015). Nutritional and toxicological aspects of *Spirulina* (*Arthrospira*). *Nutricion Hospitalaria*, 32(1), 34–40. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.32.1.9001>
- Gutu, A., & Kehoe, D. (2012). Emerging perspectives on the mechanisms, regulation, and distribution of light color acclimation in cyanobacteria. *Molecular Plant*, 5(1), 1–13. <https://doi.org/10.1093/mp/ssr054>
- Guzmán-Murillo, M., López-Bolaños, C., Ledesma-Verdejo, T., Roldan-Libenson, G., Cadena-Roa, M., & Ascencio, F. (2007). Effects of fertilizer-based culture media on the production of exocellular polysaccharides and cellular superoxide dismutase by *Phaeodactylum tricornutum* (Bohlin). *Journal of Applied Phycology*, 19(1), 33–41. <https://doi.org/10.1007/s10811-006-9108-9>
- Habib, M., Parvin, M., Huntington, T., & Hasan, M. (2008). *A review of culture, production and use of Spirulina as food for humans and feeds for domestic animals and fish*. *FAO Fisheries and Aquaculture Circular*. [https://doi.org/ISBN\\_978-92-5-106106-0](https://doi.org/ISBN_978-92-5-106106-0)
- Hahn, A., & Schleiff, E. (2014). The cell envelope. En *The cell biology of cyanobacteria* (pp. 29–87). Recuperado de <http://www.horizonpress.com/cyano2>
- Henrikson, R. (2009). *Earth food Spirulina*. Laguna Beach, CA: Ronore Enterprises, Inc. Recuperado de <http://www.smartmicrofarms.com/PDF.cfm/EarthFoodSpirulina.pdf>
- Herbert, D., Phipps, P., & Strange, R. (1971). Chemical analysis of microbial cells. *Methods Microbiology*, 5 (B), 209–344.
- Herrero, A., Muro-Pastor, A., & Flores, E. (2001). Nitrogen control in cyanobacteria. *Journal of Bacteriology*, 183(2), 411–425. <https://doi.org/10.1128/JB.183.2.411>

- Hoiczuk, E., & Hansel, A. (2000). Cyanobacterial cell walls: News from an unusual prokaryotic envelope. *Journal of Bacteriology*, *182*(5), 1191–1199. <https://doi.org/10.1128/JB.182.5.1191-1199.2000>
- Hongsthong, A., Sirijuntarut, M., Prommeenate, P., Thammathorn, S., Bunnag, B., Cheevadhanarak, S., & Tanticharoen, M. (2007). Revealing differentially expressed proteins in two morphological forms of *Spirulina platensis* by proteomic analysis. *Molecular Biotechnology*, *36*(2), 123–130. <https://doi.org/10.1007/s12033-007-0013-5>
- Hosseini, S. M., Shahbazizadeh, S., Khosravi-Darani, K., & Mozafari, M. (2013). *Spirulina paltensis*: Food and function. *Current Nutrition & Food Science*, *9*(3), 189–193. <https://doi.org/10.2174/1573401311309030003>
- Jiang, L., Wang, Y., Yin, Q., Liu, G., Liu, H., Huang, Y., & Li, B. (2017). Phycocyanin: A potential drug for cancer treatment. *Journal of Cancer*, *8*(17), 3416–3429. <https://doi.org/10.7150/jca.21058>
- Juszkiewicz, A., Basta, P., Petriczko, E., Machaliński, B., Trzeciak, J., Łuczowska, K., & Skarpańska-Stejnborn, A. (2018). An attempt to induce an immunomodulatory effect in rowers with *Spirulina* extract. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, *15*(9), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12970-018-0213-3>
- Khazi, M., Demirel, Z., & Dalay, M. (2018). Evaluation of growth and phycobiliprotein composition of cyanobacteria isolates cultivated in different nitrogen sources. *Journal of Applied Phycology*, 1–11. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1398-1>
- Koníčková, R., Vanková, K., Vaníková, J., Vánová, K., Muchová, L., Subhanová, I., ... Strnad, H. (2014). Anti-cancer effects of blue-green alga *Spirulina platensis*, a natural source of bilirubin-like tetrapyrrolic compounds. *Annals of Hepatology*, *13*(2), 273–283.
- Konig, A., Pearson, H., & Silva, S. (1987). Ammonia toxicity to algal growth in waste stabilization ponds. *Waf. Sci. Tech*, *19*(12), 115–122. Recuperado de <http://www.iwaponline.com/wst/01912/wst019120115.htm>

- Koru, E. (2012). Earth food *Spirulina (Arthrospira)*: production and quality standarts. En Y. El-Samragy (Ed.), *Food Additive* (pp. 191–202). <https://doi.org/10.5772/31848>
- Kouhgardi, E., Moazami, E., Ghorbani-Vaghei, R., & Maghsoudloo, T. (2015). The effect of different salinities on density of *Spirulina platensis* under laboratory conditions. *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences*, 4(3), 92–96.
- Kulasooriya, S. (2011). Cyanobacteria: Pioneers of planet earth. *Ceylon Journal of Science*, 40(2), 71–88.
- Kumar, M., Kulshreshtha, J., & Singh, G. (2011). Growth and biopigment accumulation of cyanobacterium *Spirulina platensis* at different light intensities and temperature. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42, 1128–1135.
- Kumari, A., Pathak, A., & Guria, C. (2015). Effect of light emitting diodes on the cultivation of *Spirulina platensis* using NPK-10:26:26 complex fertilizer. *Phycological Research*, 63(4), 274–283. <https://doi.org/10.1111/pre.12099>
- Lee, R. (2008). Cyanobacteria. En *Phycology* (4th ed., pp. 33–80).
- Leema, J., Kirubakaran, R., Vinithkumar, N., Dheenan, P., & Karthikayulu, S. (2010). High value pigment production from *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultured in seawater. *Bioresource Technology*, 101(23), 9221–9227. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.120>
- Liberton, M., Page, L., O'Dell, W., O'Neill, H., Mamontov, E., Urban, V., & Pakrasi, H. (2013). Organization and flexibility of cyanobacterial thylakoid membranes examined by neutron scattering. *Journal of Biological Chemistry*, 288(5), 3632–3640. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.416933>
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., & Randall, R. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275. [https://doi.org/10.1016/0304-3894\(92\)87011-4](https://doi.org/10.1016/0304-3894(92)87011-4)
- Mackerras, A., & Smith, G. (1986). Urease activity of the cyanobacterium

- Anabaena cylindrica*. *Journal of General Microbiology*, 132, 2749–2752.
- Madhyastha, H., & Vatsala, T. (2007). Pigment production in *Spirulina fussiformis* in different photophysical conditions. *Biomolecular Engineering*, 24(3), 301–305. <https://doi.org/10.1016/j.bioeng.2007.04.001>
- Madkour, F., Kamil, A., & Nasr, H. (2012). Production and nutritive value of *Spirulina platensis* in reduced cost media. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 38(1), 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2012.09.003>
- Maeda, K., Owada, M., Kimura, N., Omata, K., & Karube, I. (1995). CO<sub>2</sub> fixation from the flue gas on coal-fired thermal power plant by microalgae. *Energy Conversion and Management*, 36(6–9), 717–720. [https://doi.org/10.1016/0196-8904\(95\)00105-M](https://doi.org/10.1016/0196-8904(95)00105-M)
- Maldonado, E. (2014). *Evaluacion de la capacidad mixotrofica Graesiella emersonii (Chlorella emersonii) con sustratos amiláceos*.
- Mariey, Y., Samak, H., & Ibrahim, M. (2012). Effect of using *Spirulina platensis* algae as a feed additive for poultry diets: Productive and reproductive performance of local laying hens. *Egyptian Poultry Science Association*, 32(1), 201–215.
- Markou, G. (2014). Effect of various colors of light-emitting diodes (LEDs) on the biomass composition of *Arthrospira platensis* cultivated in semi-continuous mode. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(5), 2758–2768. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0727-3>
- Markou, G., & Georgakakis, D. (2011). Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review. *Applied Energy*, 88(10), 3389–3401. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.12.042>
- Marrez, D., Naguib, M., Sultan, Y., Daw, Z., & Higazy, A. (2013). Impact of culturing media on biomass production and pigments content of *Spirulina platensis*. *International Journal of Advanced Research*, 1(10), 951–961. Recuperado de <http://www.journalijar.com/uploads/2014-01->

- Marrez, D., Naguib, M., Sultan, Y., Daw, Z., & Higazy, A. (2014). Evaluation of chemical composition for *Spirulina platensis* in different culture media. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 5(4), 1161–1171.
- Marsh, J., & Weinstein, D. (1966). Simple charring method for determination of lipids. *Journal of Lipid Research*, 7(4), 574–576.
- Masojídek, J., Torzillo, G., & Koblížek, M. (2013). Photosynthesis in microalgae. En A. Richmond & Q. Hu (Eds.), *Handbook of microalgal culture: Applied phycology and biotechnology* (2nd ed., pp. 21–36). Wiley-Blackwell.
- Matsudo, M., Bezerra, R., Sato, S., Converti, A., & Monteiro, J. (2012). Photosynthetic efficiency and rate of CO<sub>2</sub> assimilation by *Arthrospira (Spirulina) platensis* continuously cultivated in a tubular photobioreactor. *Biotechnology Journal*, 7, 1412–1417. <https://doi.org/10.1002/biot.201200177>
- Matsudo, M., Bezerra, R., Converti, A., Sato, S., & Carvalho, J. (2011). CO<sub>2</sub> from alcoholic fermentation for continuous cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* in tubular photobioreactor using urea as nitrogen source. *Biotechnology Progress*, 27(3), 650–656. <https://doi.org/10.1002/btpr.581>
- McCarthy, J. (1970). A urease method for urea in seawater. *Limnology and Oceanography*, 15, 309.
- Medina-Jaritz, N., Perez-Solis, D., Ruiloba, F., S. L., & Olvera-Ramirez, R. (2011). Antimicrobial activity of aqueous and methanolic extracts from *Arthrospira maxima*. *Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*, 1267–1271.
- Memije-Lazaro, I., Blas-Valdivia, V., Franco-Colín, M., & Cano-Europa, E. (2018). *Arthrospira maxima (Spirulina)* and C-phycocyanin prevent the progression of chronic kidney disease and its cardiovascular complications. *Journal of Functional Foods*, 43, 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.01.013>

- Mezzomo, N., Galon, A., Siebert, R., Oliveira, P., Lago, M., Hemkemeier, M., ... Colla, L. (2010). Cultivation of microalgae *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) from biological treatment of swine wastewater. *Ciência E Tecnologia de Alimentos*, 30(1), 173–178. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612010000100026>
- Misson, G. (1908). Colorimetric estimation of phosphorus in steels. *Chemiker Zeitung*, 32, 633.
- Moon, Y., Kim, S., & Chung, Y. (2012). Sensing and responding to UV-A in cyanobacteria. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(12), 16303–16332. <https://doi.org/10.3390/ijms131216303>
- Morales, E. (2012). Extracción y determinación de pigmentos hidrosolubles a partir de cianobacterias y microalgas rodofitas. En *Manual de laboratorio: Algas en biotecnología*.
- Mörschel, E. (1982). Accessory polypeptides in phycobilisomes of red algae and cyanobacteria. *Planta*, 154(3), 251–258. <https://doi.org/10.1007/BF00387871>
- Mostafa, S., & Gawish, F. (2009). Towards to control *Biomphalaria alexandrina* snails and the free living larval stages of *Schistosoma mansoni* using the microalga *Spirulina platensis*. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 3(4), 4112–4119.
- Muhamad, N., Amar, M., Mashor, N., Zulkifly, S., Omar, H., & Ismail, A. (2015). The effect of different nitrogen sources on continuous growth of *Arthrospira platensis* in simple floating photobioreactor design in outdoor conditions. *Journal of Algal Biomass Utilization Biomass Utilization*, 6(4), 1–11.
- Mühling, M. (2000). *Characterization of Arthrospira (Spirulina) strains In accordance with the requirements for the degree of Doctor of Philosophy*. University of Durham.
- Muñoz-Peñuela, M., Ramirez-Merlano, J., Otero-Patemia, A., Medina-Robles, V., Cruz-Casallas, P., & Velasco-Santamaria, Y. (2011). Efecto del medio de

- cultivo sobre el crecimiento y el contenido proteico de *Chlorella Vulgaris*. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 25(3), 438–449.
- Murugan, T., & Rajesh, R. (2014). Cultivation of two species of *Spirulina* (*Spirulina platensis* and *Spirulina platensis* var. *lonar*) on sea water medium and extraction of C-phycoerythrin. *European Journal of Experimental Biology*, 4(2), 93–97.
- Naqqiuddin, M., Sukumaran, P., Alimahrouqi, H., Omar, H., & Ismail, A. (2015). Urban *Spirulina* cultivation guidelines for indoor and outdoor cultivation system. *Seminar Ekologi Malaysia*, 94–97. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.1025.8641>
- Nuhu, A. (2013). *Spirulina (Arthrospira)*: An important source of nutritional and medicinal compounds. *Journal of Marine Biology*, 8. <https://doi.org/dx.doi.org/10.1155/2013/325636>
- Ochoa, L. (2016). *Efecto de dos fertilizantes agrícolas comerciales sobre las microalgas “Tetraselmis suecica” (Kyllin) Butcher y “Chlorella vulgaris” Beijerinck*.
- Oliver, R., Whitton, B., Hamilton, D., Brookes, J., & Ganf, G. (2012). Physiology, blooms and prediction of planktonic cyanobacteria. En *Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time* (pp. 155–194). <https://doi.org/10.1007/978-94-007-3855-3>
- Ortiz-Moreno, M., Cortés-Castillo, C., Sánchez-Villarraga, J., Padilla, J., & Otero-Paternina, A. (2012). Evaluación del crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* en diferentes medios de cultivo en condiciones autotróficas y mixotróficas. *Orinoquia*, 16(1), 11–20. Recuperado de [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0121-37092012000100002](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0121-37092012000100002)
- Pamar, A., Kumar, N., Pandey, A., Gnasounou, E., & Madamwar, D. (2011). Cyanobacteria and microalgae: A positive prospect for biofuels. *Biosource Technology*, 102, 10163–10172.

- Pandey, V., Pandey, A., & Sharma, V. (2013). Biotechnological applications of cyanobacterial phycobiliproteins. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2(9), 89–97.
- Panta, R., Macay, A., Moncayo, E., & Vélez, J. (2016). Crecimiento de las microalgas *Chaetoceros gracilis* e *Isochrysis galbana* con fertilizantes agrícolas, en laboratorio. *Revista La Técnica*, (16), 44–55.
- Paoletti, C., Pushparaj, B., & Tomaselli, L. (1985). Ricerche sulla nutrizione minerale di *Spirulina platensis*. En *Atti del XVII Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia* (pp. 833–839). Italy: Italian Society of Microbiology.
- Parmar, A., Kumar, N., Pandey, A., Gnansounou, E., & Madamwar, D. (2011). Cyanobacteria and microalgae: A positive prospect for biofuels. *Bioresource Technology*, 102(22), 10163–10172. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.08.030>
- Peleato, M. (2011). Las cianobacterias: Cooperación versus competencia.
- Pilco, M., & Viera, G. (2014). *Determinación de la eficiencia de biorremoción de metales pesados con cianobacteria Nostoc spp., de los páramos andinos: Papallacta, Pintag y Guamote; caso: efluente de curtiembre, Totoras-Ambato.*
- Piñero, J., Bermejo, P., & Villar, A. (2001). Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. *Il Farmaco*, 56, 497–500. [https://doi.org/10.1016/S0014-827X\(01\)01084-9](https://doi.org/10.1016/S0014-827X(01)01084-9)
- Pleonsil, P., Soogarun, S., & Suwanwong, Y. (2013). Anti-oxidant activity of holo- and apo-c-phycocyanin and their protective effects on human erythrocytes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 60, 393–398. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.06.016>
- Ponce, E. (2013). Superalimento para un mundo en crisis: *Spirulina* a bajo costo. *IDESIA*, 31(1), 135–139. <https://doi.org/10.4067/S0718-34292013000100016>

- Price, G., Badger, M., Woodger, F., & Long, B. (2008). Advances in understanding the cyanobacterial CO<sub>2</sub>-concentrating- mechanism (CCM): Functional components, Ci transporters, diversity, genetic regulation and prospects for engineering into plants. *Journal of Experimental Botany*, *59*(7), 1441–1461. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm112>
- Priyadarshani, I., & Rath, B. (2012). Commercial and industrial applications of micro algae – A review. *Journal of Algal Biomass Utilization*, *3*(4), 89–100.
- Quader, S., Islam, S., Saifullah, A., Majumder, F., & Hannan, J. (2013). *In-vivo* studies of the anti-inflammatory effects of *Spirulina platensis*. *The Pharma Innovation*, *2*(4), 70–80.
- Quintero, E., Arredondo, B., Flores, E., Virgen, M., Barrera, E., Carballo, M., & Maldonado, A. (2016). Selección de un medio de cultivo a nivel laboratorio para el cultivo de la cianobacteria *Spirulina* (*Arthrospira maxima*) y cuantificación de los nutraceuticos. *Investigación Y Desarrollo En Ciencia Y Tecnología de Alimentos*, *1*(1), 532–537. Recuperado de <http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume1/1/4/91.pdf>
- Rae, B., Long, B., Badger, M., & Price, G. (2013). Functions, compositions, and evolution of the two types of carboxysomes: polyhedral microcompartments That facilitate CO<sub>2</sub> fixation in cyanobacteria and some proteobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *77*(3), 357–379. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00061-12>
- Rae, B., Long, B., Whitehead, L., Förster, B., Badger, M., & Price, G. (2013). Cyanobacterial carboxysomes: Microcompartments that facilitate CO<sub>2</sub> fixation. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, *23*(4–5), 300–307. <https://doi.org/10.1159/000351342>
- Ragap, H., Khalil, R., Mutawie, H., & Mutawie, H. (2012). Immunostimulant effects of dietary *Spirulina platensis* on tilapia *Oreochromis niloticus*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, *2*(2), 26–31. Recuperado de [http://japsonline.com/admin/php/uploads/374\\_pdf.pdf](http://japsonline.com/admin/php/uploads/374_pdf.pdf)
- Ramírez-Moreno, L., & Olvera-Ramírez, R. (2006). Uso tradicional y actual de

- Spirulina* spp. (*Arthrospira* spp.). *Interciencia*, 31(9), 657–663. Recuperado de <http://www.redalyc.org/pdf/339/33912009.pdf>
- Ranganathan, P., Amal, J., Savithri, S., & Haridas, A. (2017). Experimental and modelling of *Arthrospira platensis* cultivation in open raceway ponds. *Bioresource Technology*, 242, 197–205. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.150>
- Rangel, O., Gómez-Baena, G., López-Lozano, A., Diez, J., & García-Fernández, J. (2009). Physiological role and regulation of glutamate dehydrogenase in *Prochlorococcus* spp. strain MIT9313. *Environmental Microbiology Reports*, 1(1), 56–64. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2008.00005.x>
- Rast, A., Heinz, S., & Nickelsen, J. (2015). Biogenesis of thylakoid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1847(9), 821–830. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.01.007>
- Rastogi, R., Sinha, R., Moh, S., Lee, T., Kottuparambil, S., Kim, Y., ... Han, T. (2014). Ultraviolet radiation and cyanobacteria. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 141, 154–169. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.09.020>
- Ravelonandro, P., Ratianarivo, D., Joannis-Cassan, C., Isambert, A., & Raherimandimby, M. (2008). Influence of light quality and intensity in the cultivation of *Spirulina platensis* from Toliara (Madagascar) in a closed system. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 83, 842–848. <https://doi.org/10.1002/jctb>
- Rejmánková, E., Komárek, J., & Komárková, J. (2004). Cyanobacteria - A neglected component of biodiversity: Patterns of species diversity in inland marshes of northern Belize (Central America). *Diversity and Distribution*, 10, 189–199. <https://doi.org/10.1111/j.1366-9516.2004.00077.x>
- Rincón, D., Semprún, A., Dávila, M., Velásquez, H., Morales, E., & Hernández, J. (2013). Producción de harina de *Spirulina máxima* para ser empleada como ingrediente en la elaboración de dietas para peces. *Zootecnia Tropical*, 31(3), 187–192.

- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J., Herdman, M., & Stanier, R. (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*, (111), 1–61.
- Rippka, R., Waterbury, J., & Stanier, R. (1981). Provisional generic assignments for cyanobacteria in pure culture. En M. Starr, H. Stolp, H. Trüper, A. Balows, & H. Schlegel (Eds.), *The Prokaryotes* (pp. 247–256).
- Rodriguez, A., & Triana, F. (2006). *Evaluación del pH en el cultivo de Spirulina spp. (Arthrospira) bajo condiciones de laboratorio. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología Industrial.*
- Rosales-Loaiza, N., Guevara, M., Lodeiros, C., & Morales, E. (2008). Crecimiento y producción de metabolitos de la cianobacteria marina *Synechococcus* spp. (Chroococcales) en función de la irradiancia. *Revista de Biología Tropical*, 56(2), 421–429.
- Rosales, N., Vera, P., Aiello-Mazzarri, C., & Morales, E. (2016). Comparative growth and biochemical composition of four strains of *Nostoc* and *Anabaena* (Cyanobacteria, Nostocales) in relation to sodium nitrate. *Acta Biológica Colombiana*, 21(2), 347–354. <https://doi.org/10.15446/abc.v21n2.48883>
- Sagara, T., Nishibori, N., Kishibuchi, R., & Morita, K. (2017). Non-protein components of *Arthrospira (Spirulina) platensis* protect PC12 cells against iron-evoked neurotoxic injury. *Journal of Applied Phycology*, 27(2), 849–855.
- Sahu, D., Priyadarshani, I., & Rath, B. (2012). Cyanobacteria -As potential biofertilizer. *CIBTech Journal of Microbiology*, 1(3), 2319–386720.
- Sakamoto, T., & Bryant, D. (2001). Requirement of nickel as an essential micronutrient for the utilization of urea in the marine cyanobacterium *Synechococcus* spp. PCC 7002. *Microbes and Environments*, 16(3), 177–184. <https://doi.org/10.1264/jsme2.2001.177>
- Sakamoto, T., Inoue-Sakamoto, K., & Bryant, D. (1999). A novel nitrate/nitrite permease in the marine Cyanobacterium *Synechococcus* spp. strain PCC 7002. *Journal of Bacteriology*, 181(23), 7363–7372. Recuperado de

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10572142>  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC103701>

- Sánchez, M., Bernal-Castillo, J., Rozo, C., & Rodríguez, I. (2003). *Spirulina (Arthrospira)*: an edible microorganism: a review. *Universitas Scientiarum*, 8(1), 7–24. <https://doi.org/10.11144/univ. sci..v8i1.4842>
- Schenk, P., Thomas-Hall, S., Stephens, E., Marx, U., Mussgnug, J., Posten, C., ... Hankamer, B. (2008). Second generation biofuels: High-efficiency microalgae for biodiesel production. *BioEnergy Research*, 1(1), 20–43. <https://doi.org/10.1007/s12155-008-9008-8>
- Schlösser, U. (1982). Sammlung von Algenkulturen. *Berichte Der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, 95(1), 181–276. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.1982.tb02862.x>
- Schluchter, W., & Glazer, A. (1999). Biosynthesis of phycobiliproteins in cyanobacteria. En G. Peschek, W. Löffelhardt, & G. Schmetterer (Eds.), *The phototrophic prokaryotes* (pp. 83–95). Boston. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4827-0\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4827-0_10)
- Schmidt, A. (1988). Sulfur metabolism in cyanobacteria. *Methods in Enzymology*, 167, 572–583.
- Schwarz, D., Orf, I., Kopka, J., & Hagemann, M. (2014). Effects of inorganic carbon limitation on the metabolome of the *Synechocystis* spp. PCC 6803 mutant defective in *glnB* encoding the central regulator PII of cyanobacterial C/N acclimation. *Metabolites*, 4(2), 232–47. <https://doi.org/10.3390/metabo4020232>
- Schwarz, R., & Forchhammer, K. (2005). Acclimation of unicellular cyanobacteria to macronutrient deficiency: emergence of a complex network of cellular responses. *Microbiology*, 151(8), 2503–2514. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27883-0>
- Shabana, E., Gabr, M., Moussa, H., El-Shaer, E., & Ismaiel, M. (2017). Biochemical composition and antioxidant activities of *Arthrospira (Spirulina)*

- platensis* in response to gamma irradiation. *Food Chemistry*, 214, 550–555.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.109>
- Shen, Y., Yuan, W., Pei, Z. J., Wu, Q., & Mao, E. (2009). Microalgae mass production methods. *Transactions of the ASABE*, 52(4), 1275–1287.  
<https://doi.org/10.13031/2013.27771>
- Shevela, D., Pishchalnikov, R., & Eichacker, L. (2013). Oxygenic photosynthesis in cyanobacteria. En *Stress Biology of Cyanobacteria* (pp. 3–40).  
<https://doi.org/10.1201/b13853-3>
- Sidler, W. (2004). Phycobilisome and phycobiliprotein structures. En D. Bryant (Ed.), *The molecular biology of cyanobacteria* (pp. 139–216). Pennsylvania.
- Sili, C., Torzillo, G., & Vonshak, A. (2012). *Arthrospira* (Spirulina). En *Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time* (pp. 1–760).  
<https://doi.org/10.1007/978-94-007-3855-3>
- Silva-Benavides, A. (2016). Evaluación de fertilizantes agrícolas en la productividad de la microalga *Chlorella sorokiniana*. *Agronomía Mesoamericana*, 27(2), 265. <https://doi.org/10.15517/am.v27i2.24361>
- Singh, G., & Sikarwar, N. (2014). An experimental study: using plant fertilizer as a potent culture media for *Chlorella vulgaris*. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinica Research*, 7(1), 7–9.
- Singh, R., Tiwari, S., Rai, A., & Mohapatra, T. (2011). Cyanobacteria: An emerging source for drug discovery. *Journal of Antibiotics*, 64(6), 401–412.  
<https://doi.org/10.1038/ja.2011.21>
- Sipaúba- Avides, L., Donadon, A., Berchielli, F., & Scardoeli, B. (2017). Development of low-cost culture media for *Ankistrodesmus gracilis* based on inorganic fertilizer and macrophyte. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 29.
- Sivakumar, N., Sundararaman, M., & Selvakumar, G. (2018). Evaluation of growth performance of *Penaeus monodon* (Fabricius) fed diet with partial replacement of fishmeal by *Spirulina platensis* (Sp) meal. *Indian Journal of Animal Research*, 1–6. <https://doi.org/10.18805/ijar.B-3438>

- Soletto, D., Binaghi, L., Ferrari, L., Lodi, A., Carvalho, J., Zilli, M., & Converti, A. (2008). Effects of carbon dioxide feeding rate and light intensity on the fed-batch pulse-feeding cultivation of *Spirulina platensis* in helical photobioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, *39*(2), 369–375. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.10.007>
- Sompong, U., Anuntalabhochai, S., Cutler, R., Castenholz, R., & Peerapornpisal, Y. (2008). Morphological and phylogenic diversity of cyanobacterial populations in six hot springs of Thailand. *ScienceAsia*, *34*(2), 153–162. <https://doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.2008.34.153>
- Sotiroudis, T., & Sotiroudis, G. (2013). Health aspects of *Spirulina* (*Arthrospira*) microalga food supplement. *Journal of the Serbian Chemical Society*, *78*(3), 395–405. <https://doi.org/10.2298/JSC121020152S>
- Spaargaren, D. (1996). The design of culture media based on the elemental composition of biological material. *Journal of Biotechnology*, *45*(2), 97–102. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(95\)00152-2](https://doi.org/10.1016/0168-1656(95)00152-2)
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *101*(2), 87–96. <https://doi.org/10.1263/jbb.101.87>
- Stadnichuk, I., Krasilnikov, P., & Zlenko, D. (2015). Cyanobacterial phycobilisomes and phycobiliproteins. *Microbiology*, *84*(2), 101–111. <https://doi.org/10.1134/S0026261715020150>
- Stal, L. (2015). Nitrogen fixation in cyanobacteria. En *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0021159.pub2>
- Steinhauser, D., Fernie, A., & Arau, W. (2012). Unusual cyanobacterial TCA cycles: not broken just different. *Trends in Plant Science*, *17*(9), 503–509. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.05.005>
- Stizenberger, E. (1852). *Spirulina* und *Arthrospira* (nov. gen.). *Hedwigia*, *1*, 32–34.

- Sukenik, A., Zohary, T., & Padisak, J. (2009). Cyanoprokaryota and other prokaryotic algae. En *Encyclopedia of Inland Waters* (pp. 138–148). <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-012370626-3.00133-2>
- Sukumaran, P., Nulit, R., Halimoon, N., Simoh, S., Omar, H., & Ismail, A. (2018). Formulation of cost-effective medium using urea as a nitrogen source for *Arthrospira platensis* cultivation under real environment. *Annual Research and Review in Biology*, 22(2), 1–12. <https://doi.org/10.9734/ARRB/2018/38182>
- Talling, J., & Driver, D. (1963). Some problems in the estimation of chlorophyll-a in phytoplankton. En *Proceedings of the Conference of Primary Productivity Measurement, Marine and Freshwater* (pp. 142–146).
- Tandeau, N. (2003). Phycobiliproteins and phycobilisomes: the early observations. *Photosynthesis Research*, 76(1909), 197–205. <https://doi.org/10.1023/A:1024954911473>
- Tew, K., Conroy, J., & Culver, D. (2006). Effects of lowered inorganic phosphorus fertilization rates on pond production of perch fingerlings. *Aquaculture*, 225(1–4), 436–444.
- Tomaselli, L. (2002). Morphology, ultrastructure and taxonomy of *Arthrospira (Spirulina) maxima* and *Arthrospira (Spirulina) platensis*. En A. Vonshak (Ed.), *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, cell-biology and biotechnology* (1st ed., pp. 1–15). Israel: Taylor & Francis.
- Tomaselli, L., Palandri, M., & Tredecchi, M. (1996). On the correct use of the *Spirulina* designation. *Archiv Fur Hydrobiologie*, 83, 539–548.
- Torrado, C. (2016). *Cultivo de cianobacterias para la producción de bioplásticos en un fotobioreactor tubular cerrado alimentado con digestato*. Escola Tècnica Superior d'Enginyeria de Camins, Canals i Ports.
- Torres-Duran, P., Ferreira-Hermosillo, A., & Juárez-Oropeza, M. (2007). Antihyperlipemic and antihypertensive effects of *Spirulina maxima* in an open sample of mexican population: A preliminary report. *Lipids in Health*

- and Disease*, 6(33), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-6-33>
- Torres, A., Parra, J., Rojas, D., Fernández-Gómez, R., & Valero, Y. (2014). Efecto de la suplementación de sémola de trigo con *Arthrospira platensis* sobre la calidad, aceptabilidad y composición física y química de espaguetis. *VITAE, Revista de La Facultad de Química Farmacéutica*, 21(2), 81–89.
- Trabelsi, L., Ben, H., Bacha, H., & Ghou, M. (2009). Combined effect of temperature and light intensity on growth and extracellular polymeric substance production by the cyanobacterium *Arthrospira platensis*. *Journal of Applied Phycology*, 21(4), 405–412. <https://doi.org/10.1007/s10811-008-9383-8>
- Turpin, D. (1991). Effects of inorganic N availability on algal photosynthesis and carbon metabolism. *Journal of Phycology*, (27), 14–20. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1991.00014.x>
- Turpin, P. (1827). *Dictionnaire d'histoire naturelle de Levrault*.
- Usharani, G., Srinivasan, G., Sivasakthi, S., & Saranraj, P. (2015). Antimicrobial activity of *Spirulina platensis* solvent extracts against pathogenic bacteria and fungi. *Advances in Biological Research*, 9(5), 292–298. <https://doi.org/10.5829/idosi.abr.2015.9.5.9610>
- Vieira, A., Leal, K., Oliveira, L., & Magagnin, G. (2001). Different nitrogen sources and growth responses of *Spirulina platensis* in microenvironments. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 17, 439–442. <https://doi.org/10.1023/A:1011925022941>
- Vincent, W. (2009). Cyanobacteria. En *Protists, Bacteria and Fungi: Planktonic and Attached* (pp. 226–232). <https://doi.org/10.1016/B978-012370626-3.00127-7>
- Vonshak, A. (Ed.). (2002). *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, cell-biology and Biotechnology*. Taylor & Francis. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Vothknecht, U., & Westhoff, P. (2001). Biogenesis and origin of thylakoid

- membranes. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1541(1–2), 91–101. [https://doi.org/10.1016/S0167-4889\(01\)00153-7](https://doi.org/10.1016/S0167-4889(01)00153-7)
- Walker, T., Purton, S., Becker, D., & Collet, C. (2005). Microalgae as bioreactors. *Plant Cell Reports*, 24(11), 629–641. <https://doi.org/10.1007/s00299-005-0004-6>
- Wandji, W., Espinar, B., Blanc, P., & Wald, L. (2015). Estimating the photosynthetically active radiation under clear skies by means of a new approach. *Advances in Science and Research*, 12, 5–10. <https://doi.org/10.5194/asr-12-5-2015>
- Wang, C., Fu, C., & Liu, Y. (2007). Effects of using light-emitting diodes on the cultivation of *Spirulina platensis*. *Biochemical Engineering Journal*, 37(1), 21–25. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.03.004>
- Wang, C., Kong, H., Wang, X., Wu, H., Lin, Y., & He, S. (2010). Effects of iron on growth and intracellular chemical contents of *Microcystis aeruginosa*. *Biomedical and Environmental Sciences*, 23(1), 48–52. [https://doi.org/10.1016/S0895-3988\(10\)60031-1](https://doi.org/10.1016/S0895-3988(10)60031-1)
- Wang, Z., & Zhang, X. (2016). Characterization and antitumor activity of protein hydrolysates from *Arthrospira platensis* (*Spirulina platensis*) using two-step hydrolysis. *Journal of Applied Phycology*, 28(6), 3379–3385. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0881-9>
- West, P., & Ramachandran, T. (1966). Spectrophotometric determination of nitrate using chromotropic acid. *Analytica Chimica Acta*, 35, 317–324.
- Whitton, B., & Potts, M. (2012). Introduction to the Cyanobacteria. In *Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time* (Vol. 9789400738, pp. 1–13). <https://doi.org/10.1007/978-94-007-3855-3>
- Wilhem, S. (1995). Ecology of iron-limited cyanobacteria: a review of physiological responses and implications for aquatic systems. *Aquatic Microbiol Ecology*, 9, 295–303.
- Woitzik, D., Weckesser, J., & Jürgens, U. (1988). Isolation and characterization

- of cell wall components of the unicellular cyanobacterium *Synechococcus* spp. PCC 6307. *Journal of General Microbiology*, (134), 619–627.
- Wollman, F., Minai, L., & Nechushtai, R. (1999). The biogenesis and assembly of photosynthetic proteins in thylakoid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1411(1), 21–85. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(99\)00043-2](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(99)00043-2)
- Wu, H., Gao, K., Villafañe, V., Helbling, E., Villafan, V., & Watanabe, T. (2005). Effects of solar UV radiation on morphology and photosynthesis of filamentous cyanobacterium *Arthrospira platensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 5004–5013. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.5004>
- Xiong, W., Cano, M., Wang, B., Douchi, D., & Yu, J. (2017). The plasticity of cyanobacterial carbon metabolism. *Current Opinion in Chemical Biology*, 41, 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.09.004>
- Xiong, W., Lee, T., Rommelfanger, S., Gjersing, E., Cano, M., Maness, P., ... Yu, J. (2015). Phosphoketolase pathway contributes to carbon metabolism in cyanobacteria. *Nature Plants*, 1(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/nplants.2015.187>
- Zahroojian, N., Moravej, H., & Shivazad, M. (2013). Effects of dietary marine algae (*Spirulina platensis*) on egg quality and production performance of laying hens. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 15, 1353–1360.
- Zarrouk, C. (1966). *Contribución à l'étuded'unecyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de Spirulina maxima*. Université De Paris.
- Zhang, S., & Bryant, D. (2011). The tricarboxylic acid cycle in cyanobacteria. *Science*, 334(6062), 1551–1553. <https://doi.org/10.1126/science.1210858>
- Zhang, S., Qian, X., Chang, S., Dismukes, G., & Bryant, D. (2016). Natural and synthetic variants of the tricarboxylic acid cycle in cyanobacteria: Introduction of the GABA Shunt into *Synechococcus* spp. PCC 7002.

*Frontiers in Microbiology*, 7, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01972>

Zhu, C., & Lee, Y. (1997). Determination of biomass dry weight of marine microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 9(2), 189–194. <https://doi.org/10.1023/A:1007914806640>

Zinicovscaia, I., Yushin, N., Shvetsova, M., & Frontasyeva, M. (2018). Zinc removal from model solution and wastewater by *Arthrospira (Spirulina) platensis* biomass. *International Journal of Phytoremediation*, 20(9), 901–908. <https://doi.org/10.1080/15226514.2018.1448358>

## Apéndices o Anexos

### Anexo 1. Análisis físico-químico del agua de mar

**Tabla 7.** Parámetros físico-químicos evaluados del agua de mar.

Parámetro	
pH	7,5
Salinidad (ppt)	31
Nitrato (mg L <sup>-1</sup> )	0,9
Fosfato (mg L <sup>-1</sup> )	0,9

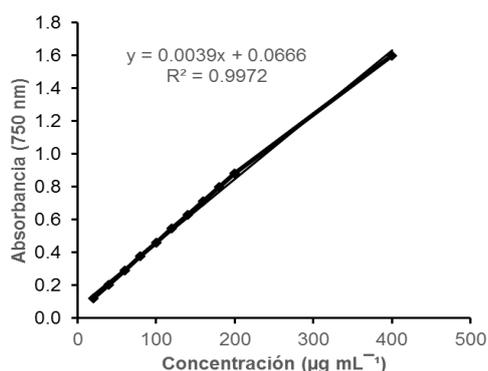
### Anexo 2. Preparación de curva patrón de proteínas

Se preparó una curva patrón con Albúmina de Suero Bovino (ASB) disuelta en NaOH 1N, en un rango de concentraciones de 0 a 400 µg mL<sup>-1</sup> (Tabla 8). Los patrones fueron leídos en espectrofotómetro a 750 nm.

**Tabla 8.** Volumen de soluciones para elaboración de curva patrón de proteínas.

<b>ASB (µL)</b>	0	25	50	75	100	200	400
<b>NaOH (µL)</b>	400	375	350	325	300	200	0

Los datos de absorbancia obtenidos se graficaron en diagramas de dispersión, obteniendo el R<sup>2</sup> (factor de correlación) y los valores de pendiente (b) e intersección (a), de la ecuación de la recta (Figura 8).



**Figura 8.** Curva patrón para determinación de concentración de proteínas.

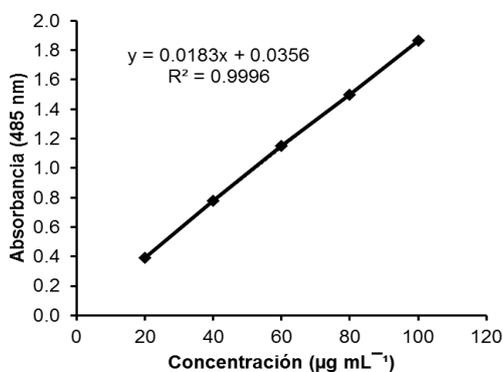
### Anexo 3. Preparación de curva patrón de carbohidratos

Partiendo de una solución stock de glucosa (10 mg de glucosa en 10 mL de NaOH 1N) se realizaron diluciones seriadas; solución de la que se tomó 1 mL y se añadió 9 mL de NaOH 1N (dilución 1:10 de glucosa). A partir de esta dilución se tomaron diferentes alícuotas (Tabla 9) para obtener diferentes concentraciones de glucosa y elaborar la curva patrón. Los patrones fueron leídos en espectrofotómetro a 485 nm.

**Tabla 9.** Volumen de soluciones para elaboración de curva patrón de carbohidratos.

<b>Disol. Glucosa 1:10 (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	0	200	400	600	800	1000
<b>Volumen NaOH 1N (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	1000	800	600	400	200	0
<b>Concentración (<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b>	0	20	40	60	80	100

Los datos de absorbancia obtenidos se graficaron en diagrama de dispersión, obteniendo el  $R^2$  (factor de correlación) y los valores de pendiente (b) e intersección (a), de la ecuación de la recta (Figura 9).



**Figura 9.** Curva patrón para determinación de concentración de carbohidratos.

## Anexo 4. Preparación de curva patrón de lípidos

### ▪ Preparación de curva patrón

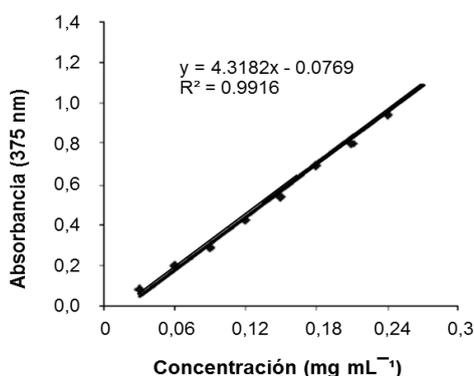
A partir de una solución stock de tripalmitina – cloroformo a una concentración final de 4,5 mg en 15 mL, se realizan diluciones hasta obtener concentraciones en el rango de 0,03 – 0,27 mg mL<sup>-1</sup> (Tabla 10).

Las soluciones con diferentes concentraciones de triplamitina – cloroformo se evaporaron a 37°C durante 24 h. Se re-suspendieron en 1 mL de cloroformo y repartieron por triplicado en tubos de ensayo de vidrio (200 µL). La muestra en los tubos de ensayo se evaporó, agregaron 2 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado y calentado a 200°C por 15 min; dejados enfriar en refrigeración por 5 min y añadido 3 mL de agua destilada, mezclado en vórtex y llevados a frío para enfriar. Los patrones fueron leídos en espectrofotómetro a 375 nm.

**Tabla 10.** Volumen de soluciones para elaboración de curva patrón de lípidos.

<b>Tripalmitina- Cloroformo (µL)</b>	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000
<b>Volumen Cloroformo (µL)</b>	900	800	700	600	500	400	300	200	100	0
<b>Concentración mg mL</b>	0,03	0,06	0,09	0,12	0,15	0,18	0,21	0,24	0,27	0,3

Los datos de absorbancia obtenidos se graficaron en diagrama de dispersión, obteniendo el R<sup>2</sup> (factor de correlación) y los valores de pendiente (b) e intersepto (a), de la ecuación de la recta (Figura 10).



**Figura 10.** Curva patrón para determinación de concentración de lípidos.

**Anexo 5. Parámetros cinéticos de *Arthrospira* spp. en medio de cultivo estándar Zarrouk y medio con tres diferentes fuentes nitrogenadas.**

Ensayo	Medio de cultivo	Parámetros cinéticos					
		X <sub>0</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	X <sub>m</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	t <sub>m</sub> (días)	μ (día <sup>-1</sup> )	PS (g L <sup>-1</sup> )	Q <sub>x</sub> (g L <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> )
1	Control	8,78 ± 0,80	16,04 ± 0,72	7	1,15 ± 0,06	1,49 ± 0,04	0,19 ± 0,005
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	8,57 ± 0,29	13,87 ± 0,94	7	0,69 ± 0,05	1,46 ± 0,01	0,18 ± 0,001
2	Control	8,78 ± 0,80	16,04 ± 0,72	7	1,15 ± 0,06	1,49 ± 0,04	0,19 ± 0,005
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	8,75 ± 0,25	11,25 ± 0,55	7	0,63 ± 0,04	2,22 ± 0,01	0,28 ± 0,002
3	Control	8,69 ± 0,18	15,68 ± 0,33	7	1,03 ± 0,08	1,25 ± 0,02	0,16 ± 0,003
	NH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>	8,44 ± 0,37	13,12 ± 0,08	7	0,56 ± 0,03	1,39 ± 0,01	0,17 ± 0,001

- Control medio de cultivo estándar Zarrouk  
X<sub>0</sub> concentración de inóculo inicial del medio de cultivo  
X<sub>m</sub> máxima concentración celular  
t<sub>m</sub> tiempo de duración del ensayo  
μ tasa de crecimiento específica  
PS peso seco  
Q<sub>x</sub> productividad celular

**Anexo 6. Composición bioquímica de *Arthrospira* spp. en medio Zarrouk (control) y medio constituido de agua de mar y fertilizantes agrícolas.**

<b>Ensayo</b>	<b>Medio de cultivo</b>	<b>Proteínas (mg g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Ficobiliproteínas (mg g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Carbohidratos (mg g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Lípidos (mg g<sup>-1</sup>)</b>
1	Control	512,72 ± 0,04	51,27 ± 2,56	95,18 ± 0,002	253,19 ± 8,59
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	393,92 ± 0,08	39,39 ± 2,22	74,05 ± 0,002	263,76 ± 22,63
2	Control	512,72 ± 0,04	51,27 ± 2,56	95,18 ± 0,002	253,19 ± 8,59
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	389,08 ± 0,05	38,91 ± 2,42	195,42 ± 0,002	276,24 ± 17,24
3	Control	240,90 ± 0,02	24,09 ± 2,11	178,97 ± 0,002	318,88 ± 29,01
	NH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>	165,63 ± 0,04	16,56 ± 2,22	228,69 ± 0,01	304,69 ± 16,06