

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Diseño y optimización de un medio de cultivo para el crecimiento
de *Arthrospira platensis* en condiciones de laboratorio

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por
José Arturo Lobo de León
para optar al grado académico de Licenciado en Bioquímica y Microbiología

Guatemala

2018

Diseño y optimización de un medio de cultivo para el crecimiento
de *Arthrospira platensis* en condiciones de laboratorio

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades




Diseño y optimización de un medio de cultivo para el crecimiento
de *Arthrospira platensis* en condiciones de laboratorio

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por
José Arturo Lobo de León
para optar al grado académico de Licenciado en Bioquímica y Microbiología

Guatemala


2018

Vo:Bo.:

(f) 

Doctora Pamela Pennington

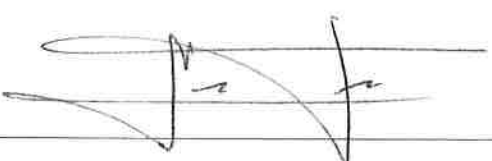
Tribunal Examinador:

(f) 

Doctora Pamela Pennington

(f) 

MSc. Carlos Rolz

(f) 

MSc. Julio Matute

Fecha de aprobación: Guatemala, 6 de abril de 2018.

PREFACIO

Este proyecto de investigación surge como parte integral de una propuesta enfocada en la creación de un fungicida biológico, el cual estaría destinado a combatir una variedad de hongos del género *Fusarium* que infectan a la planta del maíz. La relación entre ambos estudios se encuentra en los efectos antifúngicos y de control sobre los contaminantes micotóxicos que han probado tener los compuestos fenólicos, cuya presencia dentro de la composición bioquímica de algunas especies de cianobacterias ha demostrado ser bastante elevada.

He aquí que el interés por obtener este tipo de compuestos orgánicos sentó las bases para dilucidar una forma simple y rápida para producirlos dentro del laboratorio, sin la necesidad de llevar a cabo una síntesis orgánica, la cual, vista desde una perspectiva económica no es la opción más eficiente. Por lo que recurrir al crecimiento y producción de una biomasa medible de una cianobacteria, cuyo metabolismo representa una fuente importante de los compuestos de interés, se considera una ruta eficiente, rápida y menos costosa.

Tras una revisión exhaustiva de literatura especializada en el tema, se llegó a la conclusión de que la cianobacteria *Arthrospira platensis* es el organismo indicado para alcanzar el objetivo propuesto. Las características esenciales de *A. platensis*: su capacidad de propagarse en condiciones extremas sin riesgos de contaminación, y su naturaleza bioquímica, capaz de producir los compuestos fenólicos necesarios, generaron la idea esencial del presente estudio. Diseñar y optimizar un sistema experimental y un medio de cultivo para la propagación de la cianobacteria, tomando en cuenta las limitaciones físicas y económicas que esto implica al hacerlo dentro de un laboratorio de investigación.

Una vez definidos los parámetros y limitaciones, se procedió a intentar recrear en pequeña escala las condiciones ideales para obtener la mayor cantidad de biomasa de la cianobacteria, a partir de la cual, en estudios posteriores podrán realizarse con éxito las respectivas extracciones orgánicas, tanto de los compuestos de interés, como de otros compuestos que pueden ser utilizados en una amplia gama de estudios.

No sería posible plasmar en este pequeño espacio los agradecimientos a todas aquellas personas que se vieron involucradas, tanto en la realización de este proyecto de investigación, como en la formación de mi persona dentro del campo de la ciencia; por esa razón me remito a nombrar a quienes estuvieron siempre presentes y dispuestos a brindarme todo tipo de apoyo, permitiendo con su amplio conocimiento y aportaciones directas la realización de este estudio: Mis padres y hermanos, Doctora Pamela Pennington, Ingeniero Carlos Rolz, Licenciado Roberto de León, Ingeniero Luis Arévalo, Doctor Héctor Aguilar[†], Doctor Adrián Gil y MA. Maricruz Álvarez; a todos ellos mi más sincera admiración, respeto y agradecimiento.

CONTENIDO

PREFACIO	VI
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE CUADROS	XI
RESUMEN	XII
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	2
A. Objetivo general	2
B. Objetivos específicos	2
III. JUSTIFICACIÓN	3
IV. MARCO TEÓRICO	4
A. Cianobacterias	4
1. Generalidades	4
2. Importancia evolutiva	5
B. <i>Arthrospira platensis</i>	5
1. Morfología y taxonomía	5
2. Reproducción y ciclo de vida.....	8
3. Composición química	8
4. Aplicaciones	9
5. Ecología.....	10
C. Producción y optimización del crecimiento de <i>Arthrospira platensis</i>	10
1. Factores climáticos	10
2. Medio de cultivo y nutrientes	11
3. Agitación	12
4. pH	12
D. Cinética de crecimiento	12
E. Usos y aplicaciones futuras	13
V. METODOLOGÍA	15
A. HIPÓTESIS	15
B. PROCEDIMIENTO	15
1. Evaluación inicial de las condiciones de crecimiento de <i>Arthrospira platensis</i> .	15
2. Preparación de medio estándar de cultivo y medios experimentales	16
3. Inoculación de medios	16
4. Métodos de visualización del crecimiento bacteriano	17
5. Proceso de optimización del sistema experimental para el crecimiento de <i>Arthrospira platensis</i>	17
6. Optimización del medio de cultivo para <i>Arthrospira platensis</i>	17

7. Método del peso seco para determinación de biomasa	18
VI. RESULTADOS	19
A. Optimización de las condiciones de crecimiento de <i>Arthrospira platensis</i>	19
B. Optimización del sistema experimental y medios de cultivo para el crecimiento de <i>Arthrospira platensis</i>	20
C. Curvas de crecimiento.....	22
D. Parámetros cinéticos obtenidos del crecimiento de <i>Arthrospira platensis</i> en los diferentes medios:	29
VII. DISCUSIÓN	30
VIII. CONCLUSIONES	33
IX. RECOMENDACIONES	34
X. BIBLIOGRAFÍA	35
XI. ANEXOS	39
A. Anexo 1	39
Curva patrón peso seco y datos obtenidos en la determinación del peso seco	39
B. Anexo 2.....	40
C. Anexo 3.....	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imagen de <i>Arthrospira platensis</i> con microscopio electrónico	6
Figura 2. Micrografía óptica (100X) de filamentos de <i>Arthrospira platensis</i> deshidratados en forma plana y helicoidal. La barra representa 10 μm	7
Figura 3. Ciclo de vida de <i>A. platensis</i>	8
Figura 4. Curva de crecimiento de una población bacteriana.....	13
Figura 5. Sistemas experimentales propuestos para el cultivo de <i>Arthrospira platensis</i>	15
Figura 6. Formación de aglomeraciones dentro del medio de Zarrouk aprox. 11 días a partir del inóculo	19
Figura 7. Crecimiento visible y ausencia de aglomeraciones en el medio de Zarrouk a los 11 días con iluminación homogénea y filtración de los medios cada 5 días	19
Figura 8. Inoculación en medio de Zarrouk. Crecimiento lento y pobre 21 días a partir de la inoculación en ausencia de agitación constante.....	20
Figura 9. Diseño y optimización del sistema experimental en condiciones controladas	21
Figura 10. Crecimiento bacteriano visible (coloración verde) en todos los medios de cultivo 21 días a partir del inóculo dentro del sistema experimental optimizado	21
Figura 11. Crecimiento bacteriano en medio estándar 21 días a partir del inóculo previo a la optimización del diseño experimental.....	21
Figura 12. Curva de crecimiento de <i>A. platensis</i> en medio de Zarrouk (medio estándar muestra No.1) en un periodo de 21 días utilizando bicarbonato de sodio grado analítico en el medio.....	22
Figura 13. Curva de crecimiento de <i>A. platensis</i> en medio de Zarrouk (medio estándar muestra No. 2) en un periodo de 21 días utilizando bicarbonato de sodio grado analítico en el medio.....	22
Figura 14. Curva de crecimiento de <i>A. platensis</i> en medio de Zarrouk (medio estándar muestra No. 2) en un	23
Figura 15. Curva de crecimiento de <i>A. platensis</i> en el medio experimental # 1 (muestra 1) en un periodo de 21 días ([Nitrato de sodio] = 1.25 g/L; [Bicarbonato de sodio] = 9.00 g/L).....	24
Figura 16. Curva de crecimiento de <i>A. platensis</i> en el medio experimental # 1 (muestra 2) en un periodo de 21 días ([Nitrato de sodio] = 1.25 g/L; [Bicarbonato de sodio] = 9.00 g/L).....	24
Figura 17. Curva de crecimiento de <i>A. platensis</i> en el medio experimental # 2 (muestra 1) en un periodo de 21 días ([Nitrato de sodio] = 1.25 g/L; [Bicarbonato de sodio] = 18.00 g/L).....	25
Figura 18. Curva de crecimiento de <i>A. platensis</i> en el medio experimental # 2 (muestra 2) en un periodo de 21 días ([Nitrato de sodio] = 1.25 g/L; [Bicarbonato de sodio] = 18.00 g/L).....	25

Figura 19. Curva de crecimiento de <i>A. platensis</i> en el medio experimental # 3 (muestra 1) en un periodo de 21 días ([Nitrato de sodio] = 2.50 g/L; [Bicarbonato de sodio] = 9.00 g/L).....	26
Figura 20. Curva de crecimiento de <i>A. platensis</i> en el medio experimental # 3 (muestra 2) en un periodo de 21 días ([Nitrato de sodio] = 2.50 g/L; [Bicarbonato de sodio] = 9.00 g/L).....	26
Figura 21. Curva de crecimiento de <i>A. platensis</i> en el medio experimental # 4 (muestra 1) en un periodo de 21 días ([Nitrato de sodio] = 2.50 g/L; [Bicarbonato de sodio] = 18.00 g/L).....	27
Figura 22. Curva de crecimiento de <i>A. platensis</i> en el medio experimental # 4 (muestra 2) en un periodo de 21 días ([Nitrato de sodio] = 2.50 g/L; [Bicarbonato de sodio] = 18.00 g/L).....	27
Figura 23. Comparación de las curvas de crecimiento de <i>A. platensis</i> en los diferentes medios en un periodo de 21 días	28
Figura 24. Curva patrón del peso seco.....	39

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Taxonomía de <i>Arthrospira platensis</i>	7
Cuadro 2. Recetas del medio de Zarrouk y SSM.....	11
Cuadro 3. Receta del medio de Zarrouk modificado.....	16
Cuadro 4. Variación en las concentraciones de nitrato de sodio y bicarbonato de sodio a partir del medio estándar	16
Cuadro 5. Principales parámetros cinéticos obtenidos del crecimiento de <i>Arthrospira platensis</i> en los diferentes medios.....	29
Cuadro 6. Datos obtenidos en la determinación del peso seco	39
Cuadro 7. Absorbancias para determinación del peso seco.....	40
Cuadro 8. Datos de absorbancia obtenidos en los 21 días de cultivo	40
Cuadro 9. Biomasa obtenida en medio estándar analítico	41
Cuadro 10. Biomasa obtenida en medio estándar comercial	41
Cuadro 11. Biomasa obtenida en medio experimental # 1	42
Cuadro 12. Biomasa obtenida en medio experimental #2	42
Cuadro 13. Biomasa obtenida en medio experimental # 3	43
Cuadro 14. Biomasa obtenida en medio Experimental # 4.....	43

RESUMEN

Arthrospira platensis es una cianobacteria cuyo uso y aplicaciones se han extendido dentro del campo biomédico, nutricional, ambiental y social debido a su naturaleza bioquímica, la cual representa un alto contenido de proteínas, lípidos y compuestos fenólicos. Su capacidad para subsistir en condiciones extremas representa una ventaja importante, ya que el crecimiento y producción de la misma requiere del control de muy pocas variables. En este proyecto de investigación exploratorio, se diseñó y optimizó un sistema experimental dentro del laboratorio de investigación, y se evaluó la incidencia que posee la concentración de nitratos y bicarbonato dentro del medio de cultivo con respecto a la cantidad de biomasa obtenida de la cianobacteria en un período de 21 días. Bajo condiciones controladas, la mayor biomasa obtenida fue en el medio experimental con la menor concentración de nitrato de sodio (1.25 g/L) y la mayor de bicarbonato de sodio comercial (18 g/L). Se obtuvieron 0.603 g/L de biomasa de *A. platensis* con una velocidad media de crecimiento de 0.01g/día. La menor cantidad de biomasa obtenida (0.562 g/L) fue en el medio de Zarrouk modificado utilizando bicarbonato de sodio grado analítico con una velocidad de crecimiento de 0.009g/día. Esto muestra que la concentración de nitrato de sodio en el medio puede ser reducida, obteniéndose un incremento en la biomasa producida, y que el uso de bicarbonato comercial puede sustituir al de grado analítico, lo cual representa también una importante disminución de costos para el cultivo y producción de *A. platensis*.

I. INTRODUCCIÓN

Las cianobacterias representan una de las primeras formas de vida en el planeta, y desde hace muchos años el hombre ha sabido utilizarlas en su beneficio. Dentro del género *Arthrospira*, algunas especies de cianobacterias se caracterizan por su alto contenido en proteínas, aminoácidos, minerales, vitaminas y ácidos grasos (Ciferri, 1983). Tal es el caso de *Arthrospira platensis*, la cual se produce a gran escala y en algunas comunidades su consumo representa un suplemento dietético muy importante (Colla, 2007).

Actualmente se han realizado muchos estudios que se centran en el potencial que posee esta cianobacteria en el campo de la biotecnología y la medicina, por lo que los científicos se encuentran en la necesidad de realizar sus propios cultivos en menor escala y en condiciones de laboratorio (Merica, 2015). Debido a que la composición del medio de Zarrouk, que es el medio de cultivo más recomendado en la literatura para la producción de *A. platensis*, posee altas concentraciones de nitratos, y la contaminación de los compuestos nitrados en el ambiente es evidente (Melrose, 2015), en el presente estudio se plantea evaluar la incidencia de la reducción de nitratos y bicarbonatos dentro del medio de cultivo.

Se midió la cantidad de biomasa producida a los 21 días en 2 medios estándar y 4 medios experimentales, los cuales contenían diferentes concentraciones de nitrato de sodio y bicarbonato de sodio. Para determinar la biomasa, se recurrió a realizar una curva patrón de peso seco, la cual se utilizó para obtener, en base a la medida de absorbancias de cada muestra a lo largo del tiempo, sus respectivas curvas de crecimiento y la velocidad media de crecimiento.

Se pudo determinar que sí existe una incidencia en la reducción de la concentración de nitratos en el medio de cultivo, por lo que bajo las condiciones de temperatura, iluminación y agitación establecidas, es posible afirmar que un medio con menor concentración de nitrato de sodio es viable para la producción de la cianobacteria *A. platensis*.

II. OBJETIVOS

A. Objetivo general

Evaluar el crecimiento de *Arthrospira platensis* en términos de biomasa con respecto al tiempo en diferentes medios de cultivo y en condiciones reproducibles dentro del laboratorio.

B. Objetivos específicos

- Diseñar un sistema experimental reproducible que cumpla con los requisitos mínimos que promuevan el crecimiento de *Arthrospira platensis* dentro del laboratorio de investigación.
- Determinar la concentración de nitratos y bicarbonatos dentro del medio de cultivo que optimice la cinética de crecimiento de *Arthrospira platensis*.
- Proponer un método estandarizado para la producción de *Arthrospira platensis* que pueda ser utilizado en estudios posteriores como fuente de compuestos orgánicos útiles en el área de la alimentación, salud y biotecnología.

III. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, el interés que ha surgido por el estudio, tanto en el área científica como en la comercial, del uso de microorganismos reproducibles en condiciones de laboratorio, constituye uno de los aspectos fundamentales a considerar para maximizar su producción a un costo menor. En el caso de organismos como *Arthrospira platensis*, que, como resultado de su metabolismo, produce una extensa variedad de compuestos biológicos, la optimización de los medios y condiciones para su crecimiento en condiciones reproducibles y a menor escala tiene un impacto importante en el avance de nuevos descubrimientos y aplicaciones de este microorganismo.

Uno de los factores que representa una ventaja al considerar la producción de *A. platensis* en mayores cantidades es que la acumulación sustancial de la biomasa de la cianobacteria representa una fuente biológica idónea de metabolitos de interés. Es por esto que la necesidad de generar una alta cantidad de células vivas, a una velocidad considerablemente rápida, sin tener que incurrir en gastos muy elevados, obliga al científico a realizar un estudio profundo sobre el organismo de interés, para lograr recrear en condiciones de laboratorio el ambiente natural de propagación del mismo.

Varios son los métodos reportados en la literatura que han demostrado ser viables para el crecimiento de *A. platensis*. Sin embargo, la elección del medio y las condiciones de crecimiento afectan directamente la composición bioquímica del microorganismo; por ello, el análisis previo del metabolismo y otros aspectos bioquímicos de *A. platensis* determinan el punto de partida para establecer el medio más eficiente para el crecimiento de células vivas con contenidos metabólicos específicos.

Debido a que la optimización del medio de cultivo de cualquier organismo prioriza la alta producción del mismo a un costo menor; en este caso se propone evaluar la composición y condiciones de un medio óptimo para la producción de biomasa con alto contenido de compuestos fenólicos, los cuales podrán ser utilizados en estudios posteriores para promover su uso como agentes control de hongos y micotoxinas.

IV. MARCO TEÓRICO

A. Cianobacterias

1. Generalidades. Las cianobacterias, a pesar de ser conocidas comúnmente como algas azul verdosas, su naturaleza procariota, las diferencia de las algas eucariotas. La morfología de estos microorganismos representa la gama más amplia conocida dentro de los procariotas (Vargas, 1998). Las cianobacterias pueden existir como una simple y diminuta célula, y también pueden llegar a formar colonias de complejas estructuras filamentosas, compuestas por células individuales que se conocen como tricomas, los cuales están rodeados de una vaina mucilaginosa (Merican, 2015). Las segmentaciones y pigmentaciones que pueden exhibir estas estructuras varían entre amarillo-café, rojo o violeta, ocultando la naturaleza azul verdosa de la célula. Debido a que las agrupaciones celulares en forma de colonias pueden llegar a formar estas ramificaciones tan extensas, a pesar de su naturaleza microscópica, las cianobacterias pueden llegar a ser visibles al ojo humano y cubrir rocas, sedimentos, suelos y hasta ecosistemas acuáticos completos (Drews, 1982).

Dos tipos de células especializadas se presentan en algunos géneros de cianobacterias capaces de formar filamentos. Una de ellas, denominada acinetos, participa durante la fase vegetativa o de latencia del microorganismo, en donde se depositan los nutrientes necesarios para sobrevivir a ambientes hostiles en forma de esporas, las cuales se separan de los tricomas y tienen la capacidad de germinar y convertirse en nuevos tricomas cuando las condiciones ambientales son las favorables (Fay, 1987). Los heterocistos, por su parte, participan en la fijación de nitrógeno en ambientes aeróbicos, el cual es utilizado en la síntesis de constituyentes celulares que contienen nitrógeno, lo cual es también significativo en su participación como principales fijadores de nitrógeno biológico (Merican, 2015).

La reproducción asexual de las cianobacterias se lleva a cabo como en la mayoría de las formas unicelulares, en algunos casos por bipartición; en otros mediante la formación de endosporas, gemación y en el caso de las colonias filamentosas, la división celular a lo largo del filamento se produce paralelamente al crecimiento del mismo (Fay, 1987). Procesos de transferencia de material genético se han observado en algunas especies de cianobacterias; la transformación y transducción de cianobacterias han sido objeto de estudio como un factor evolutivo (Coleman *et al.* 2006).

Por otro lado, las cianobacterias comparten algunos aspectos con algas, como que el proceso fotosintético sea el medio principal para la obtención de carbono y energía, y que el pigmento del sistema captor de luz es la clorofila *a*, que, en el caso de las cianobacterias, es potenciado por pigmentos accesorios como las ficobilinas. Sin embargo, estudios recientes han revelado que algunas cianobacterias contienen también clorofila *b* y al menos una especie que contiene clorofila *d* (Muyashita *et al.* 2003).

2. **Importancia evolutiva.** El registro fósil de las cianobacterias indica que hasta hace 700 millones de años, estos fueron los organismos fotosintéticos dominantes de los océanos, ya que mediante la formación de estromatolitos impidieron, tal y como sucede en algunos ambientes en la actualidad, con la formación de capas finas en las superficies acuáticas, el crecimiento de otros organismos (Knoll, 2008). El proceso de fotosíntesis oxigénica parece haberse dado hace alrededor de 2450-2320 millones de años, período en el que el oxígeno acumulado en la atmósfera dio paso a la oxigenación de los océanos. Luego la formación de formas de vida eucariotas dio una ventaja notable a las cianobacterias, ya que el resultado de haber sobrevivido dentro de células primitivas de eucariotas quimioheterótrofos, resultó en la integración total de una cianobacteria dentro de la célula huésped para formar un organelo, el cloroplasto (Keeling, 2004).

B. *Arthrospira platensis*

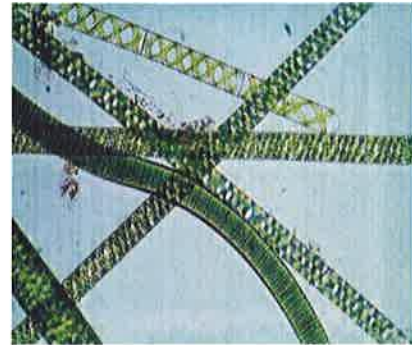
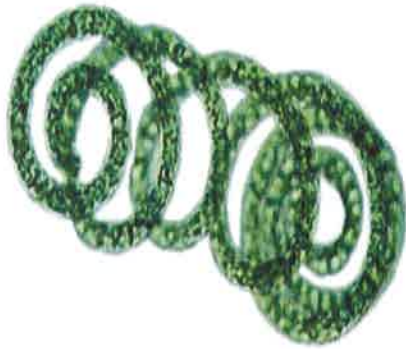
Arthrospira platensis es una cianobacteria planctónica fotosintética filamentosa que puede llegar a producir grandes cantidades de biomasa en diferentes ambientes. Este microorganismo crece tanto en medios acuáticos tropicales como subtropicales, los cuales se caracterizan por sus altos niveles de carbonato y bicarbonato con un alto valor alcalino (pH entre 9 y 11) (Colla, 2007).

Durante siglos, el hombre ha cosechado *A. platensis* desde regiones que abarcan el continente africano, como en el lago Chad, hasta el lago Texcoco en México, habiendo utilizando tradicionalmente el producto como fuente de alimento debido a su alto contenido proteico (Vonshak, 1997).

1. **Morfología y taxonomía.** La clasificación taxonómica de las cianobacterias, como la de todos los organismos vivos, ha representado uno de los retos más complejos de la ciencia moderna. En la actualidad, el consenso que implica una comparativa bioquímica, estructural y fisiológica entre organismos está basado en los criterios propuestos por Woese en 1960. Estos criterios, basados en la digestión *in vivo* del componente 16S rRNA marcado con la T1 ribonucleasa, sustentan la teoría de que la descendencia de los cloroplastos está altamente relacionada con las cianobacterias, mientras que la mitocondria se deriva de la subdivisión proteobacteria. En 1989 con la incorporación de la propuesta de Iwabe, respecto a la construcción del árbol filogenético en base a la duplicación genética de secuencias comunes; Woese, Kandler y Wheelis introdujeron la nueva clasificación de dominios (Bacteria, Archaea y Eucarya) estableciendo la taxonomía de las cianobacterias dentro del dominio Bacteria (Fitch, 1995).

Arthrospira platensis se encuentra clasificada como una cianobacteria multicelular filamentosa. Bajo el microscopio, los filamentos azul verdosos se observan compuestos por células cilíndricas conformadas en tricomas helicoidales (Figura 1).

Figura 1. Imagen de *Arthrospira platensis* con microscopio electrónico



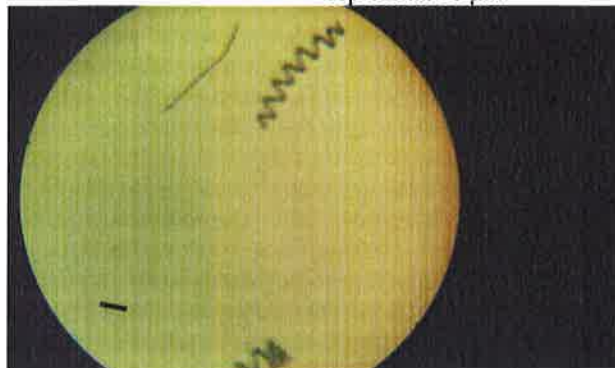
(Karali, 2011)

La forma helicoidal es característica del género *Arthrospira*, sin embargo, los parámetros referentes al largo y dimensiones de la hélice varían entre especies. El diámetro de las células puede variar entre 1 y 3 micrómetros en las especies más pequeñas y entre 3 y 12 en las más grandes. *A. platensis* posee valores >35 a 50 micrómetros de diámetro de hélice con 80 micrómetros de enrollamiento en espiral. Con respecto a los tricomas, en *A. platensis* se han observado de hasta 20 mm de longitud (Ciferri, 1983).

Imágenes resueltas con microscopía electrónica han revelado que la pared celular está compuesta de una capa externa análoga a la pared celular de las bacterias Gram-negativas; una tercera capa compuesta de proteínas que se unen helicoidalmente a los tricomas, mientras que la segunda capa se pliega hacia dentro de los filamentos, dando origen entre ellas a una capa interna que hace posible la septación (Drews, 1982). Sin embargo, en algunos casos las capas pueden separarse, dejando a las células septadas únicamente por la capa de peptidoglicanos, estirando el filamento y por ende perdiendo su característica forma helicoidal, suceso que ocurre también en filamentos compuestos por células deshidratadas o muertas (Ciferri, 1983).

Las variaciones macromorfológicas (Figura 2) ocurren normalmente en el género *Arthrospira*; sin embargo no es un aspecto que se ha tomado en cuenta para hacer subdivisiones dentro del género. Los filamentos de *Arthrospira* pueden adoptar, en casos extremos, una forma plana recuperando su forma helicoidal cuando regresan a condiciones óptimas (Karali, 2011).

Figura 2. Micrografía óptica (100X) de filamentos de *Arthrospira platensis* deshidratados en forma plana y helicoidal. La barra representa 10 μm .



(Foto: Jose Lobo, 2018)

Estos parámetros morfológicos se han utilizado en la actualidad para diferenciar las especies dentro del género *Arthrospira*, ya que, debido a diferencias entre taxónomos en los años 50, aún existía cierta confusión entre los términos *Espirulina*, *Spirulina* y *Arthrospira*. Sin embargo, todos estos parámetros se han incluido finalmente dentro del género *Arthrospira* englobando a aquellas cianobacterias alimentarias que se conocen en la actualidad comercialmente como Spirulina (Tomaselli, 1997). Así también, se ha llegado a la conclusión de que los nombres cianobacterias y algas azul verdosas son términos compatibles; siendo el primero en relación a la taxonomía y filogenia, mientras que el segundo se remite a la correlación ecológica y biológica de estos microorganismos (Castenholz, 1989).

En el Cuadro No. 1 se resume la taxonomía de *A. platensis* de acuerdo a la base de datos del proyecto de clasificación taxonómica de cianobacterias.

Cuadro 1. Taxonomía de *Arthrospira platensis*

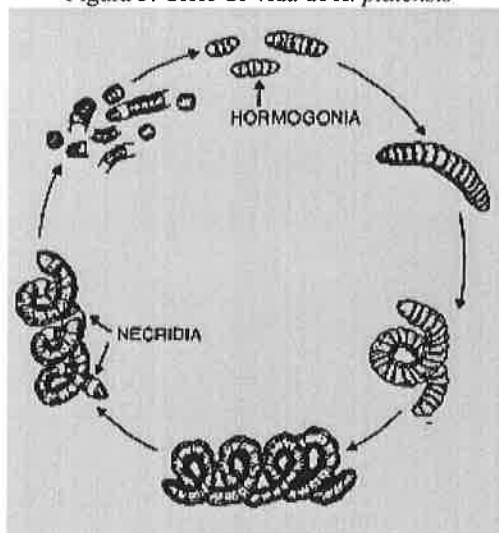
Dominio: Bacteria
Phylum: Cyanobacteria
Clase: Cyanophyceae
Orden: Oscillatoriales
Familia: Phormidiaceae
Género: Arthrospira
Especie: platensis

(Komárek J. y Hauer T.; 2014)

2. **Reproducción y ciclo de vida.** Como se aprecia en la Figura 3, las células de *A. platensis* se disponen en filamentos capaces de multiplicarse por bipartición (Melorose, 2015). Generalmente, la división en dirección a los extremos del filamento es más marcada, y durante este ciclo ocurren tres etapas fundamentales.

En primer lugar, el tricoma maduro se divide en filamentos, producto de la formación previa de las células de necridio, las cuales son de aspecto granuloso, tabicados transversalmente, los cuales al abombarse le dan a la célula su característica forma bicóncava. La división celular se produce por segmentación de zonas determinadas conocidas como disyuntores, las cuales se producen debido al crecimiento longitudinal del tricoma para así adoptar la forma típica helicoidal (Abbeyes, 1989).

Figura 3. Ciclo de vida de *A. platensis*



(Melorose, 2015)

En los cultivos que se realizan dentro del laboratorio, el ciclo de vida de *A. platensis* ocurre también de una forma muy simple. Un tricoma maduro se rompe en varios fragmentos a través de la formación de necridias que padecen un proceso de lisis, dando como resultado la formación de discos bicóncavos segmentados. Esta fragmentación produce cadenas cortas de entre 2 y 4 células llamadas hormogonia, las cuales se separan del filamento parental para formar nuevos tricomas (Melorose, 2015).

3. **Composición química.** *Arthrospira platensis* posee un alto contenido proteico, aproximadamente entre 50 y 70% de su peso seco se considera como fuente de proteínas. Este porcentaje puede variar

dependiendo del fotoperíodo en el que se analice la muestra, obteniéndose los valores más altos al comienzo del período luminoso (Becker, 1982).

Cualitativamente, todos los aminoácidos esenciales están presentes; y aunque los aminoácidos azufrados son los que se encuentran en menor proporción, el valor biológico de las proteínas es bastante alto, y el nivel óptimo de las mismas podría alcanzarse suplementando el medio de enriquecimiento con una considerable cantidad de los mismos (Tiboni, 1985). Las células poseen una membrana plasmática rodeada por una pared celular multiestratificada, Gram-negativa, caracterizada por tener una fila de poros alrededor del tricoma (Sánchez *et al.* 2003).

Los carbohidratos constituyen entre un 15 y 25% del peso seco; encontrándose glucosa, fructosa y sacarosa en pequeñas cantidades en relación al porcentaje total. Sin embargo, la parte esencial la constituyen los polímeros como glucosanos y ramnosanos aminados; sin embargo, desde un punto de vista nutricional la sustancia más importante es el fosfato de mesoinositol como fuente de fósforo orgánico (Belay, 2002).

La concentración de lípidos totales se encuentra en un intervalo entre 5.6 y 7% del peso seco, en donde el monogalactosil ocupa el mayor porcentaje; también se encuentran digalactosil diglicéridos, sulfoquimovosil diglicérido y fosfatiglicerol. El ácido γ -linoleico representa casi el 40% de los ácidos grasos de *A. platensis*, porcentaje que puede ser considerado como uno de los más abundantes proporcionado en la naturaleza (Tiboni, 1985). Así también, se puede encontrar un alto porcentaje de ácido palmítico, aunque en menores proporciones con respecto al peso seco (ca. 25%) (Ciferri, 1983).

4. **Aplicaciones.** A pesar de que *A. platensis* ha sido consumida desde tiempos remotos en México y África Central, los cultivos sintéticos actuales se han centrado en, aparte de su valor nutritivo, también en sus propiedades terapéuticas hipocolesterolemiantes, inmunológica, antiviral y antimutagénica (Chamorro, 1996).

Recientemente, estudios sobre compuestos químicos que se encuentran en tejidos microbianos, tales como antibióticos, compuestos fenólicos, alcaloides, terpenos y proteínas han sido probados como inhibidores de rutas metabólicas que conllevan a la síntesis de algunas micotoxinas que producen algunos hongos patógenos de alimentos (Souza *et al.* 2011).

Los hongos patógenos se consideran uno de los principales problemas en la agricultura moderna, y debido a su potencial contaminación en los alimentos mediante la producción de micotoxinas, se ha considerado realizar estudios sobre el efecto de los extractos de microorganismos, tales como *A. platensis* para comprobar su actividad antifúngica (Souza *et al.* 2011).

5. **Ecología.** Desde el primer aislamiento que se realizó en 1827 por Turpin en un arroyo de agua dulce, el crecimiento de *A. platensis* se ha observado en una variedad de ambientes, como suelo, arena, pantanos, agua dulce y agua marina (Ciferri, 1983). De aquí que la capacidad de adaptación de esta cianobacteria sea extrema en comparación con otros microorganismos. En regiones como el Lago Chad y el Lago Texcoco *A. platensis* puede llegar a crecer como un monocultivo. Los cuerpos acuáticos en los que se ha encontrado esta cianobacteria, han sido clasificados de acuerdo a su alcalinidad. Así, aquellos que poseen una concentración salina (principalmente compuesta de carbonatos y bicarbonatos) < 2.5 g/L presentan una población variada de microorganismos; los que presentan un rango de alcalinidad de 2.5 a 30 g/L de concentración salina contienen casi exclusivamente poblaciones de cianobacterias, aunque aún es posible encontrar muchas especies de ellas. Sin embargo, cuando la concentración salina excede los 30 g/L se puede observar la presencia única de *A. platensis* (Ciferri, 1983).

La importancia de la concentración salina para el crecimiento de *A. platensis* ha sido confirmada en estudios posteriores, en los que a niveles de pH similares pero con concentraciones salinas diferentes, se ha logrado determinar que los medios en los que la concentración salina fluctúa entre los 20 a los 70 g/L parece ser el rango óptimo de ocurrencia (Vonshak, 2000).

Aunque en su mayoría, los estudios relacionados con la producción de *A. platensis* no reportan el crecimiento de otros microorganismos, parece existir una asociación mutualista entre bacterias Gram negativas, diatomeas y otras especies de cianobacterias del orden Chroococcales y *A. platensis*. A pesar de ello, las bacterias asociadas con los tricomas pueden ser fácilmente aisladas. Un extenso lavado de los tricomas con soluciones estériles, seguidas de un proceso de fragmentación mecánica y un tratamiento con luz UV ha demostrado ser un método eficiente para obtener cultivos puros de *A. platensis* (Tomaselli, 2000).

C. Producción y optimización del crecimiento de *Arthrospira platensis*

1. **Factores climáticos.** La temperatura del medio de cultivo es uno de los factores esenciales para la rapidez de crecimiento y la calidad de producción de *A. platensis*. Por debajo de los 20°C el crecimiento es nulo, siendo la temperatura óptima de crecimiento los 37°C; la iluminación también es indispensable. Sin embargo, se debe cuidar de no mantenerse una iluminación continua durante 24 horas, ya que durante la noche la cianobacteria continúa produciendo reacciones bioquímicas, siendo la respiración la más importante de ellas (Ramírez, 2006). La respiración disminuye la biomasa cuando la temperatura es elevada, por lo que la iluminación controlada en foto-períodos de tiempo 12/12 (día/noche) favorece el crecimiento de la misma. Dentro del laboratorio, la intensidad lumínica puede variarse entre 2000 y 5000 luxes, dependiendo de la densidad y agitación de los cultivos (Vonshak, 1984).

2. Medio de cultivo y nutrientes. Las exigencias nutricionales de la mayoría de las cianobacterias son pocas, aun así, el medio de cultivo de contar con los nutrientes mínimos requeridos para que pueda generarse una biomasa considerable. En el caso de *A. platensis*, se ha visto que crece en muchos medios, tanto sólidos, como líquidos. Entre estos están los medios BG11, ASM-1, Z8, DOBLEGA, BBM, AA, y KMC (Whitton, 1992); sin embargo, para el crecimiento de *A. platensis* los medios más utilizados son el medio de Zarrouk y el medio SSM ya que para prepararlos se necesita agua desmineralizada como base (Gitelson, 1996) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Recetas del medio de Zarrouk y SSM

Reactivo	Medio de Zarrouk (g/L)	Medio SSM (g/L)
NaCl	1.00	0.2
CaCl ₂	0.03	0.5
K ₂ S ₄	1.00	0.6
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.20	0.04
K ₂ HPO ₄	0.50	0.5
NaNO ₃	2.50	2.5
NaHCO ₃	10.5	15
Na ₂ CO ₃	7.60	5.5
EDTA	0.08	0.1
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.01	0.05

La concentración de sales en un medio óptimo de cultivo oscila entre los 27 y 70 g/L en la cual la principal fuente de carbono es el bicarbonato, el cual se disocia en el medio; el CO₂ se fija mediante el ciclo de Calvin para la síntesis de biomoléculas, mientras que los iones hidroxilo elevan el pH hasta un nivel de 11, el cual es aún tolerable por la cianobacteria (Ciferri, 1983).

Los micronutrientes proporcionados por el ácido etilendiamino tetracético (EDTA) funcionan como catalizadores de reacciones enzimáticas y procesos fisiológicos, así como facilitadores de la solubilidad de iones metálicos necesarios para la nutrición de *A. platensis* (González, 1995).

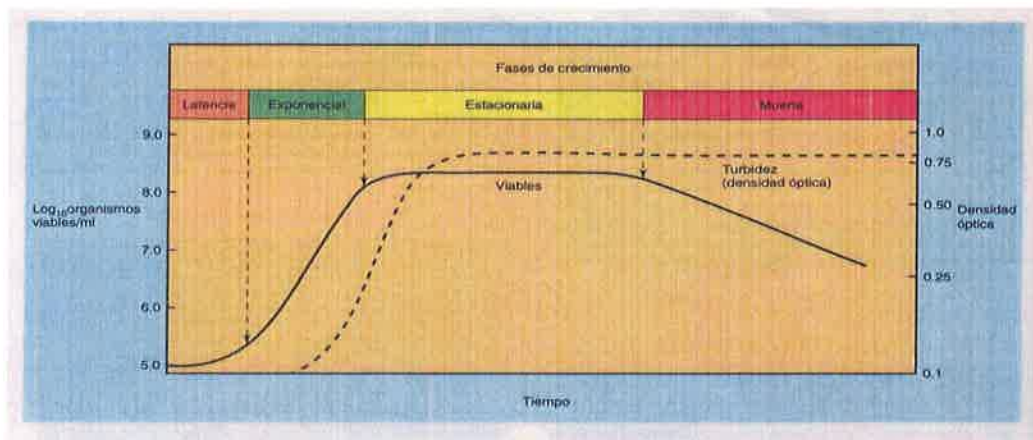
3. **Agitación.** La agitación es uno de los factores críticos en los cultivos de *A. platensis*, ya que con ella se evita la formación de sedimentos y se favorece la dispersión homogénea de la cianobacteria, así como la exposición a la luz de todos los filamentos, manteniendo el proceso fotosintético activo. Cuando la agitación es demasiado brusca, existe la posibilidad de la formación de espuma, la cual impedirá la penetración de la luz y el intercambio gaseoso dentro del cultivo. En el caso de los cultivos dentro de fotobiorreactores, es recomendable utilizar un compresor de aire de acuario como inyector de aire para proveer una agitación moderada y a la vez administrar un flujo de CO₂ como fuente de carbono (Morales, 2000).

4. **pH.** Una vez realizado el cultivo, la medición del pH es importante desde el punto de vista del desarrollo del mismo, ya que cuando el cultivo se alcaliniza por el consumo de carbono, se generan bases como NaOH. Por esta razón la medición del pH se utiliza como una evaluación cuantitativa de la cantidad de biomasa en el medio, empleando la relación a mayor biomasa, mayor degradación de bicarbonato y por lo tanto un consecuente aumento del pH (Pelizer, 2000).

D. Cinética de crecimiento

En un cultivo bajo condiciones controladas, el crecimiento de *A. platensis* posee 5 fases de desarrollo: La fase de adaptación al medio; la fase de crecimiento exponencial; la fase de crecimiento lineal; la fase estacionaria y la fase de muerte (Vonshak, 2000) (Figura 4). Obviamente, este comportamiento es ventajoso a la hora de hacer mediciones de producción de biomasa, ya que presenta una curva de crecimiento de tipo sigmoidea. Así, durante la fase de adaptación, la tasa de crecimiento con respecto al tiempo es baja, sin embargo, una vez adaptada la cianobacteria, ésta entra en la etapa de crecimiento exponencial y factores como la intensidad lumínica y los nutrientes presentes en el medio dejan de ser factores determinantes (Becker, 1982).

Figura 4. Curva de crecimiento de una población bacteriana



(Neidhart, 1990)

Para este tipo de crecimiento exponencial, la representación gráfica del logaritmo del número de células frente al tiempo genera una línea recta. La pendiente de la recta en la figura depende de la base del logaritmo utilizada, y dependiendo de la base, en la literatura se han asignado diferentes nombres a la pendiente y se han aplicado diferentes fórmulas para su estudio (Vonshak, 2000). También afectan a la pendiente las condiciones de crecimiento, que afecta a la frecuencia de los eventos de división celular y a la probabilidad de que ambas células hijas sobrevivan (Pelizer, 2000). Bajo condiciones controladas, las cianobacterias pueden duplicar su población cuatro veces al día. El crecimiento exponencial no puede continuar indefinidamente porque el medio llega pronto al agotamiento de nutrientes mientras se acumulan los desechos (Colla, 2007). Durante la fase estacionaria, la tasa de crecimiento disminuye como consecuencia del agotamiento de nutrientes y la acumulación de productos tóxicos (Pelizer, 2000). Esta fase se alcanza cuando las bacterias empiezan a agotar los recursos que están disponibles para ellas. Esta fase se caracteriza por un valor constante en el número de bacterias a medida que la tasa de crecimiento de las bacterias se iguala con la tasa de muerte bacteriana (Vonshak, 2000). Finalmente, en la fase de muerte, las condiciones desfavorables del ambiente del medio llevan a la muerte celular y consecuente liberación de materia orgánica (Becker, 1982).

E. Usos y aplicaciones futuras

Como se ha mencionado anteriormente, las cianobacterias han sido utilizadas como alimento o suplemento alimenticio. En el caso específico de *A. platensis* se ha cultivado y producido comercialmente como alimentos ricos en proteínas, vitaminas y sales minerales. El impacto de los efectos positivos en algunas aldeas en países subdesarrollados, ha sido tal que el desarrollo de sistemas de producción a nivel de comunidades se ha puesto en marcha en muchas partes del mundo como parte de un régimen alimenticio establecido, ya que los nutrientes necesarios para su crecimiento pueden obtenerse a partir de digestores

anaeróbicos como parte integral de un sistema que puede producir al mismo tiempo biogás como un producto secundario muy útil para las diversas tareas del hogar (Vonshak, 1997).

A. platensis representa también una fuente de compuestos bioactivos bastante amplia. Entre ellos, se incluyen lipopéptidos, aminoácidos, ácidos grasos, macrólidos y amidas. Los lipopéptidos adquieren gran importancia ya que poseen propiedades citotóxicas, antitumorales, antivirales, antibióticas, antimicóticas, herbicidas y hasta inmunosupresoras (Singh, 2005).

Otros usos podrían obtenerse en el campo de la agricultura, aprovechando la característica fijación de nitrógeno de *A. platensis*, ya que esto podría reducir en gran medida el uso de combustibles fósiles utilizados en la producción de fertilizantes (Monaselidze *et al.* 1988). También cabe destacar que ya se han realizado estudios que involucran la modificación genética de algunas especies para hacerlas resistentes a los herbicidas, siendo capaces de fijar nitrógeno aún después de la aplicación de éstos (Pelizer *et al.* 1996). Los compuestos fenólicos obtenidos a partir de extractos crudos de cultivos de *Arthrospira platensis*, podrían tener un impacto sinérgico en la inhibición del crecimiento de hongos como *F. verticillioides* y *F. graminearum* (Pagnussatt *et al.* 2014).

Los pigmentos ficobilínicos pueden también ser utilizados como colorantes naturales en comidas y reemplazar los que se utilizan actualmente en la industria cosmética. La propiedad fluorescente de ellos también podría integrarse a las técnicas de marcaje de sondas moleculares (Kemka, 1997). Por su parte los polisacáridos contenidos en las amplias colonias de cianobacterias podrían utilizarse en la industria de procesamiento de alimentos; el PHB está siendo utilizado en la actualidad en la fabricación de plásticos biodegradables (Hillebrand, 1999). En el área de protección ambiental, las cianobacterias pueden fungir como potenciales biosensores a herbicidas y como agentes absorbentes de metales pesados, nutrientes minerales y compuestos orgánicos en aguas contaminadas (Kemka *et al.* 1997).

V. METODOLOGÍA

A. HIPÓTESIS

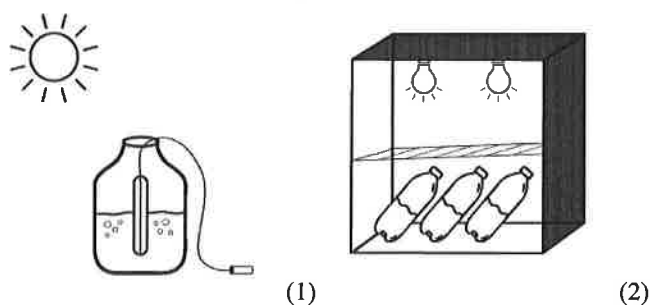
Hipótesis de trabajo: La concentración de nitrato de sodio y bicarbonato de sodio en el medio de cultivo incide en la tasa de crecimiento de *Arthrospira platensis*.

Hipótesis nula: La concentración de nitrato de sodio y bicarbonato de sodio en el medio de cultivo no incide en la tasa de crecimiento de *Arthrospira platensis*.

B. PROCEDIMIENTO

1. Evaluación inicial de las condiciones de crecimiento de *Arthrospira platensis*. Los ensayos iniciales del cultivo de *A. platensis* se llevaron a cabo tomando en cuenta los factores esenciales básicos para el crecimiento de la cianobacteria. Dos sistemas experimentales se pusieron a prueba inicialmente. El primero de ellos se implementó en un recipiente plástico cilíndrico, conteniendo un volumen de 8 L de medio Zarrouk e inoculando 1 mL de la cepa comercial “Microalgae culture Kit for *Arthrospira platensis*”. Spirulina, obtenida de AlgaeResearchSupply.com, con un burbujeo constante (oxigenación) abastecido por una bomba de aire marina 100 marca Cascade Heat, Aquarium Heater, luz natural y temperatura ambiente. El segundo sistema experimental se diseñó utilizando dos frascos de vidrio con tapón de rosca, inoculando 1 mL de la cepa antes mencionada en un volumen total de 150 mL de medio de Zarrouk. Ambos frascos se mantuvieron dentro de una recámara con condiciones de luz, temperatura controlada de 32,7°C y agitación manual al menos tres veces al día. La recámara de experimentación rectangular de 60 x 60 x 128 cm, se sometió a una condición lumínica de 35.62 $\mu\text{molquanta}/\text{m}^2$ (1830 lúmenes aproximadamente), generada por dos lámparas de luz LED, las cuales se programaron mediante un temporizador de 12/12 horas luz/oscuridad (Figura 5).

Figura 5. Sistemas experimentales propuestos para el cultivo de *Arthrospira platensis*. (1) Sistema sometido a condiciones ambientales con agitación constante. (2) Sistema con parámetros de temperatura e iluminación controlada; agitación manual.



2. Preparación de medio estándar de cultivo (Medio de Zarrouk modificado) y medios experimentales. El medio de cultivo estándar utilizado fue el medio de Zarrouk modificado (ver Cuadro 3), fijando el valor de pH en 9,8. Se aplicaron tratamientos previos y posteriores en la preparación de los medios para evaluar su eficiencia. Esterilización en autoclave, filtración de sales, alterando el orden de incorporación de ingredientes y los tiempos de agitación fueron algunos factores a tomar en cuenta.

Para la formulación de los medios experimentales se utilizó un diseño central compuesto de 2^2 factores con 6 puntos axiales, con el cual se obtuvieron las cantidades máximas y mínimas de nitrato de sodio y bicarbonato de sodio a utilizar en la preparación de los mismos, según lo reportado por Castro, 2014. En el Cuadro 4 se reportan las variaciones al medio estándar.

Cuadro 3. Receta del medio de Zarrouk modificado

Reactivo	g/L agua desmineralizada
NaCl	1.00
CaCl ₂	0.03
K ₂ S ₄	1.00
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.20
K ₂ HPO ₄	0.50
NaNO ₃	2.50
NaHCO ₃	10.5
Na ₂ CO ₃	7.60
EDTA	0.08
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.01

(Cornet, 1992)

Cuadro 4. Variación en las concentraciones de nitrato y bicarbonato a partir del medio estándar

Medios	Nitrato de sodio (g/L)	Bicarbonato de sodio (g/L)
Medio experimental # 1	1.25	9.00
Medios experimental # 2	1.25	18.0
Medio experimental # 3	2.50	9.00
Medio experimental # 4	2.50	18.0

3. Inoculación de medios. Los medios de cultivo, tanto el medio estándar como los medios experimentales se inocularon inicialmente con la cepa comercial de *A. platensis*, de dónde se obtuvieron subcultivos mantener el crecimiento de la cianobacteria a lo largo del tiempo. El inóculo inicial se fijó en un 20% v/v en relación al medio, obteniendo el volumen adecuado del inóculo mediante pipetas volumétricas y aforando con el medio correspondiente.

4. Métodos de visualización del crecimiento bacteriano. Inicialmente los métodos para detectar el crecimiento de *A. platensis* fueron métodos visuales basados en el cambio de color del medio con respecto al tiempo, así como la observación de muestras mediante microscopía óptica para descartar posibles contaminaciones. Posteriormente se determinó la biomasa y cinética de crecimiento mediante el método de peso seco y espectrofotometría a una longitud de onda de 670nm la cual es absorbida por los pigmentos de clorofila *a* y clorofila *b* (Pelizer, 2000), los cuales contienen un anillo de porfirina al que se encuentra unida una molécula de magnesio, el cual es el responsable de absorber la luz (Jeffrey, 1976).

5. Proceso de optimización del sistema experimental para el crecimiento de *Arthrospira platensis*. Debido a que el objetivo principal era optimizar el crecimiento de *A. platensis* en condiciones de laboratorio, se exigía que el sistema experimental englobara si no todas las necesidades biológicas del organismo, al menos los requisitos mínimos necesarios para obtener una biomasa medible.

Una vez establecidos los parámetros y condiciones de crecimiento de la cianobacteria, se ponderó el uso de una recámara con condiciones de temperatura e iluminación controladas como espacio físico para el mantenimiento y propagación de subcultivos para mediciones posteriores. Sin embargo, con el afán de optimizar las condiciones y espacio para llevar a cabo esta tarea, se procedió a adecuar una incubadora con agitación facilitada por el laboratorio del Centro de Ingeniería Bioquímica del Instituto de Investigaciones de la Universidad del Valle de Guatemala.

La incubadora es capaz de mantener una temperatura y una agitación constante. La temperatura se mantuvo fija a 32,7°C y la agitación se fijó a 115 rpm. Debido a que se necesitaba mantener un fotoperiodo regulado, y la compuerta de la incubadora es transparente, se procedió a crear una especie de cámara oscura cubriéndose con papel contact negro, con lo que se logró fijar un tiempo de oscuridad constante. El próximo paso consistió en instalar dos lámparas a la medida de la incubadora con dimensiones de 50 X 50 X 70 cm, para proveerla de 58.59 $\mu\text{molquanta}/\text{m}^2$ (3000 lúmenes aproximadamente), generada por dos lámparas tubulares fluorescentes de luz LED (6000 K y 85 lm/W), las cuales se conectaron a un temporizador de encendido/apagado programado para dar 12/12 horas luz/oscuridad.

6. Optimización del medio de cultivo para *Arthrospira platensis*. Una vez establecidas las variables óptimas del sistema experimental se procedió a evaluar y optimizar el medio de cultivo. Se tomaron en cuenta variables críticas para el crecimiento de *A. platensis*; a saber: presencia/ausencia de fuente de CO₂, oxigenación y características de reactivos. Se definió en cuanto a términos económicos y viabilidad del proyecto que se pueden obviar la administración de CO₂ y la oxigenación del sistema. Mientras que en cuanto a las características propias de los ingredientes del medio se evaluó la influencia del bicarbonato de sodio tipo comercial y grado analítico.

7. Método del peso seco para determinación de biomasa. Se prepararon diluciones patrón de un subcultivo de *A. platensis* equivalentes a 1, 1:10, 1:100 y 1:1000. Cada ensayo se realizó en triplicado. La curva se trazó con los datos obtenidos de la lectura de absorbancia contra el peso seco en 10 mL de la muestra. Cada una de las alícuotas se centrifugaron a 15000 rpm durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y la muestra se lavó cuatro veces con pequeñas cantidades de agua destilada para remover las sales remanentes dentro del tubo. Se dejó la muestra en el horno por dos días a 50°C. El peso seco se determinó como la diferencia entre el tubo tarado previamente y el tubo con la muestra.

A partir de la ecuación obtenida de la curva patrón de peso seco, se determinó la biomasa obtenida utilizando el programa de Microsoft Excel® ajustando la recta patrón de peso seco (calculada con el método de mínimos cuadrados) a los valores de absorbancia, los cuales se midieron cada 3 días por un período de 21 días.

Para el cálculo de la tasa de crecimiento (μ) se realizó un análisis de regresión de los datos de logaritmo natural de peso seco (g/L) con respecto al tiempo de cada uno de los ensayos. Así, la velocidad se estableció como la pendiente de la regresión (Ecuación 1).

$$\begin{aligned}dN/dt &= \mu N \\ N &= N_0 e^{\mu(t-t_0)}\end{aligned}$$

Lo que resulta en la siguiente ecuación: $\ln N - \ln N_0 = \mu (t-t_0)$ (Ecuación 1); siendo la constante de proporcionalidad μ , un índice de la velocidad de crecimiento que se denomina constante específica de velocidad de crecimiento (velocidad de crecimiento por unidad de biomasa) y tiene unidades de tiempo (1/horas).

Finalmente se calculó la tasa específica máxima de crecimiento a partir de los datos experimentales del cambio de biomasa celular con respecto al tiempo, estimando la pendiente de la fase exponencial de crecimiento (Ecuación 2).

$$\ln (C_{x2}/C_{x1}) = \mu(t_2-t_1) \quad \text{(Ecuación 2)}$$

VI. RESULTADOS

A. Optimización de las condiciones de crecimiento de *Arthrospira platensis*

El análisis del crecimiento de *A. platensis* durante los primeros 21 días permitió visualizar la adaptación de la cianobacteria a las condiciones del cultivo. Sin embargo, previo a la optimización del sistema experimental, un monitoreo visual de los cultivos a lo largo del tiempo, permitió detectar la formación de aglomeraciones bacterianas dentro del medio aproximadamente a los once días a partir del inóculo (Figura 6).

Debido a las dimensiones de la recámara, el uso de dos tipos de luz diferentes influyó en la formación de este tipo de aglomeraciones. El ajuste en la iluminación redujo la formación de aglomeraciones dentro del medio haciendo posible el proceso fotosintético para todos los microorganismos en igualdad de condiciones. Se realizó también una filtración de los medios con un filtro casero cada cinco días, reduciendo la presencia de sedimentos y aglomeraciones (Figura 7).

Figura 6. Formación de aglomeraciones dentro del medio de Zarrouk aprox. 11 días a partir del inóculo

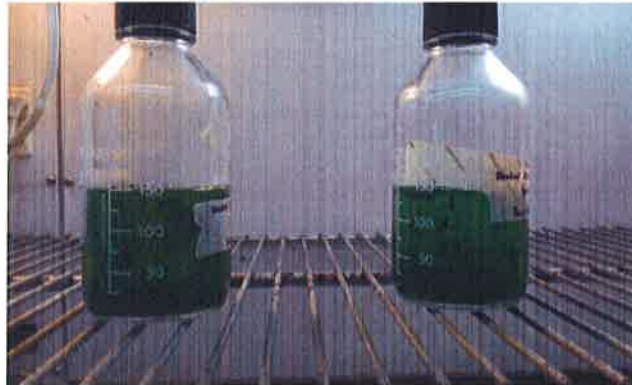


Figura 7. Crecimiento visible y ausencia de aglomeraciones en el medio de Zarrouk a los 11 días con iluminación homogénea y filtración de los medios cada 5 días



El análisis visual del desarrollo de las poblaciones bacterianas hizo posible detectar que la falta de agitación constante retrasaba la cinética de crecimiento bacteriano, ya que una agitación manual tres veces al día no permitía la homogeneización del cultivo (Figura 8).

Figura 8. Inoculación en medio de Zarrouk. Crecimiento lento y pobre 21 días a partir de la inoculación en ausencia de agitación constante.



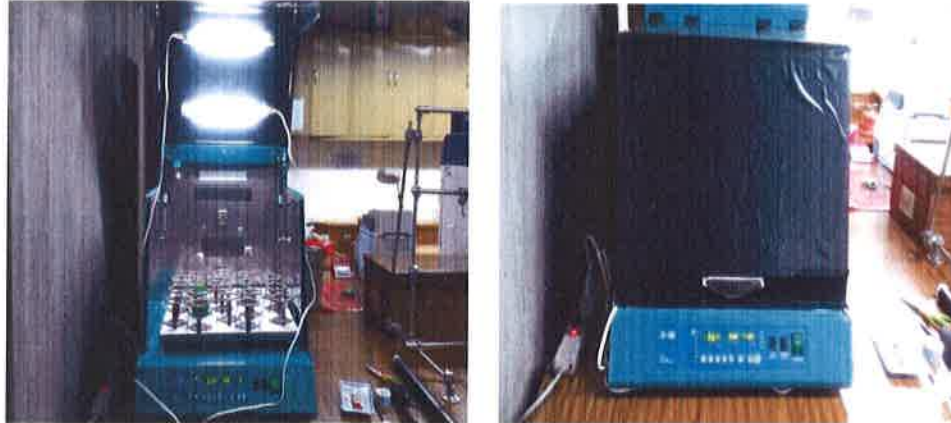
A lo largo del análisis del crecimiento bacteriano bajo las condiciones iniciales, se observó también que la formación de burbujas en la superficie del medio podría limitar la captación de luz, por lo que al limitar el intercambio gaseoso del medio con el ambiente externo incorporando frascos de vidrio con tapones de rosca y/o el uso de tapones de algodón, evitaron tanto la formación de burbujas como la evaporación del medio.

Es importante mencionar que al evaluar el tipo de reactivos, grado analítico o comercial, se encontró que al utilizar bicarbonato de sodio de marca comercial la evaporación del medio fue menor que al utilizar el reactivo de grado analítico, lo cual representa una ventaja importante en la optimización del gasto en reactivos para la preparación de medios.

B. Optimización del sistema experimental y medios de cultivo para el crecimiento de *Arthrospira platensis*

Se logró diseñar y optimizar un sistema experimental que se utilizó para el cultivo y producción de biomasa de *Arthrospira platensis*. Como puede observarse en la Figura 9, se logró mantener las condiciones necesarias para la adaptación del microorganismo al medio de cultivo dentro del sistema. Adaptando una incubadora a una temperatura constante de 37.2°C, un fotoperiodo de 12/12 horas luz/oscuridad, agitación constante a 115 rpm y la mínima interacción con el ambiente fuera de los frascos de cultivo, el crecimiento bacteriano fue visible en todos los medios (Figura 10).

Figura 9. Diseño y optimización del sistema experimental en condiciones controladas



Comparando las figuras 10 y 11 se puede comprobar la eficiencia del diseño experimental, observando la diferencia entre el crecimiento bacteriano dentro del sistema optimizado 21 días después de haber realizado el inóculo en igualdad de condiciones.

Figura 10. Crecimiento bacteriano visible (coloración verde) en todos los medios de cultivo 21 días a partir del inóculo dentro del sistema experimental optimizado



Figura 11. Crecimiento bacteriano en medio estándar 21 días a partir del inóculo previo a la optimización del diseño experimental



C. Curvas de crecimiento

Al evaluar el desarrollo de los cultivos mediante el método de peso seco y espectrofotometría, tanto en los medios estándar como en los medios experimentales, se pudo observar a lo largo del tiempo (21 días) las etapas de crecimiento bacteriano bien definidas; a saber: la fase de adaptación al medio, la fase exponencial y la fase estacionaria, lo que respalda las observaciones y correcciones hechas al diseño experimental mencionadas anteriormente. Como se observa en las curvas de crecimiento para cada medio, es posible afirmar que *Arthrospira platensis* es capaz de reproducirse en medios con concentraciones reducidas de nitratos y carbonatos, y por lo tanto sin necesidad de llevar a cabo un control permanente del pH del medio y la adición de una fuente externa de CO₂ gaseoso.

Figura 12. Curva de crecimiento de *A. platensis* en medio de Zarrouk (medio estándar muestra 1) en un periodo de 21 días utilizando bicarbonato de sodio grado analítico en el medio

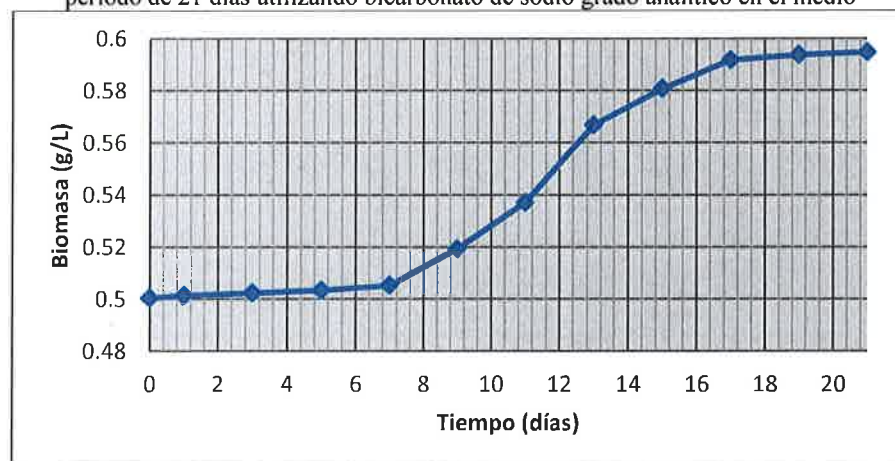


Figura 13. Curva de crecimiento de *A. platensis* en medio de Zarrouk (medio estándar muestra 2) en un periodo de 21 días utilizando bicarbonato de sodio grado analítico en el medio

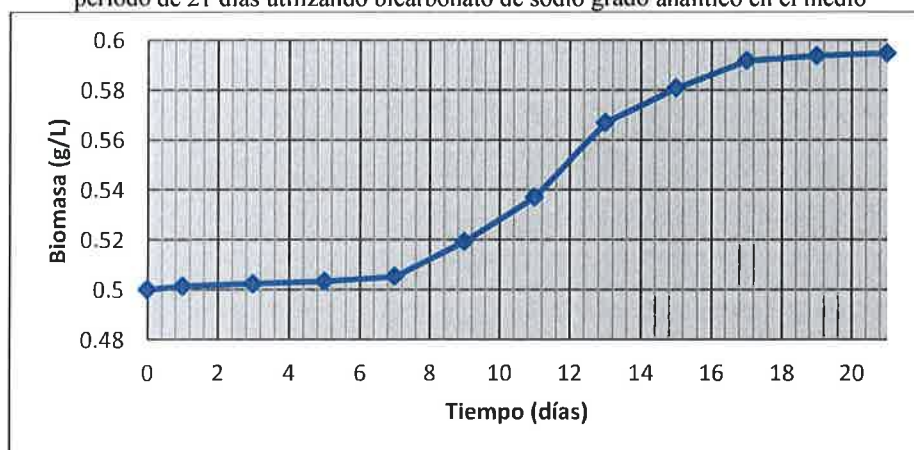


Figura 13. Curva de crecimiento de *A. platensis* en medio de Zarrouk (medio estándar muestra 1) en un periodo de 21 días utilizando bicarbonato comercial en el medio

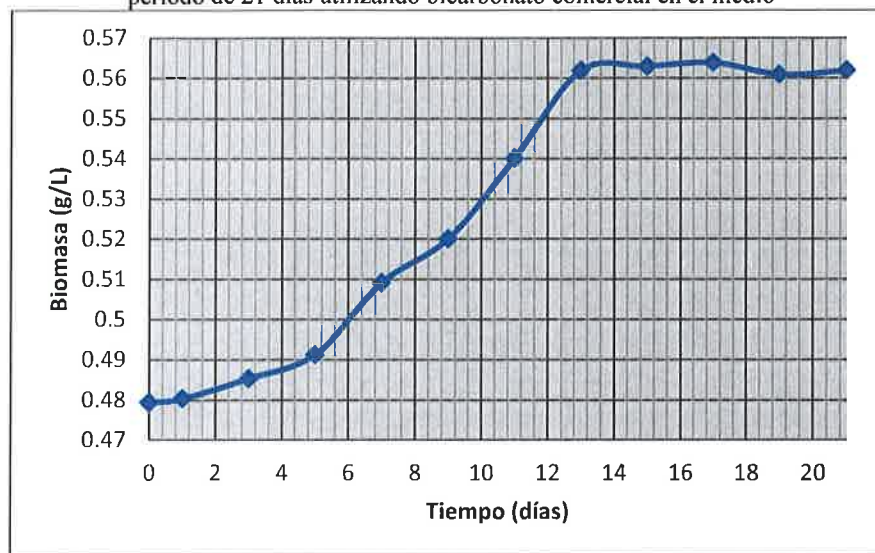


Figura 14. Curva de crecimiento de *A. platensis* en medio de Zarrouk (medio estándar muestra 2) en un periodo de 21 días utilizando bicarbonato comercial en el medio

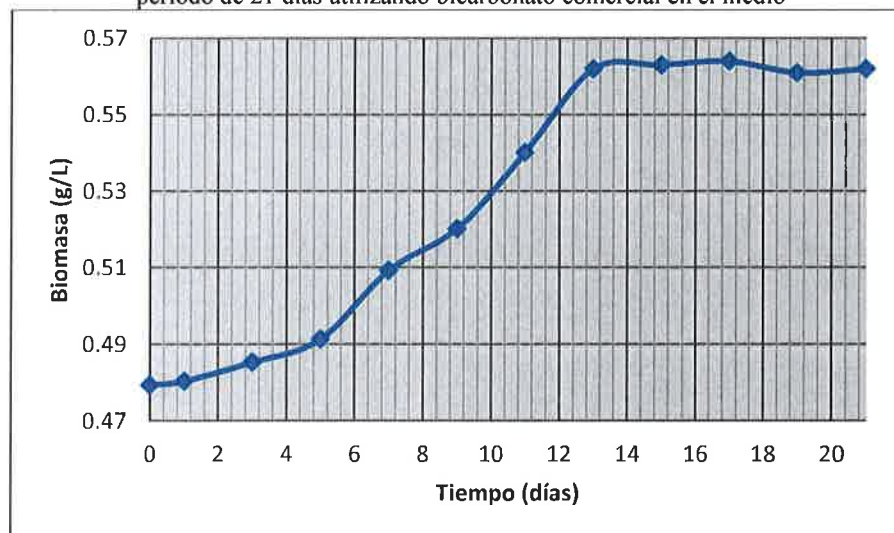


Figura 15. Curva de crecimiento de *A. platensis* en el medio experimental # 1 (muestra 1) en un periodo de 21 días ([Nitrato de sodio] = 1.25 g/L; [Bicarbonato de sodio] = 9.00 g/L)

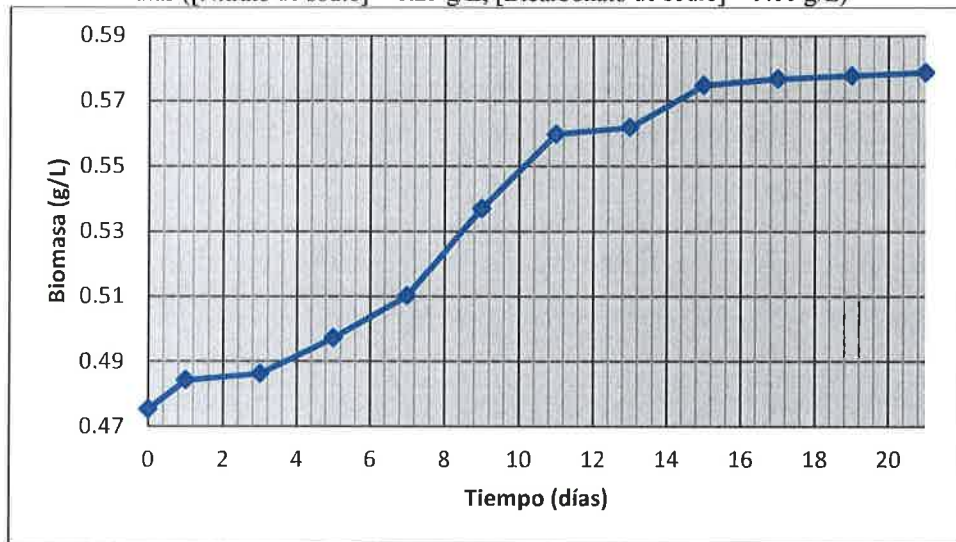


Figura 16. Curva de crecimiento de *A. platensis* en el medio experimental # 1 (muestra 2) en un periodo de 21 días ([Nitrato de sodio] = 1.25 g/L; [Bicarbonato de sodio] = 9.00 g/L)

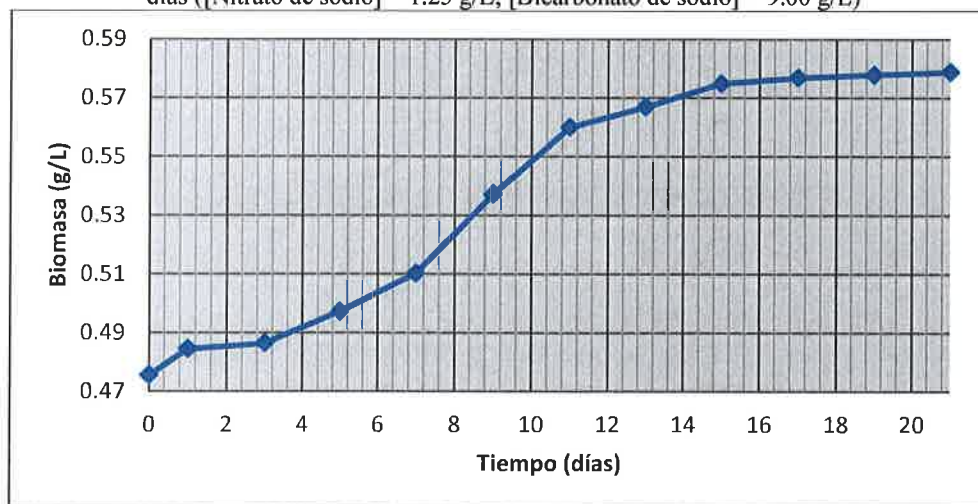


Figura 17. Curva de crecimiento de *A. platensis* en el medio experimental # 2 (muestra 1) en un periodo de 21 días ([Nitrato de sodio] = 1.25 g/L; [Bicarbonato de sodio] = 18.00 g/L)

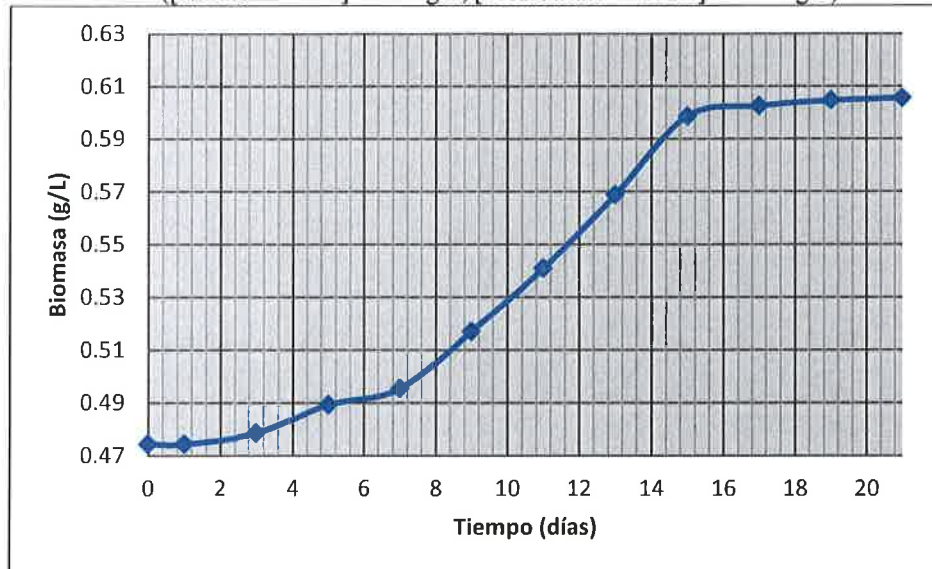


Figura 18. Curva de crecimiento de *A. platensis* en el medio experimental # 2 (muestra 2) en un periodo de 21 días ([Nitrato de sodio] = 1.25 g/L; [Bicarbonato de sodio] = 18.00 g/L)

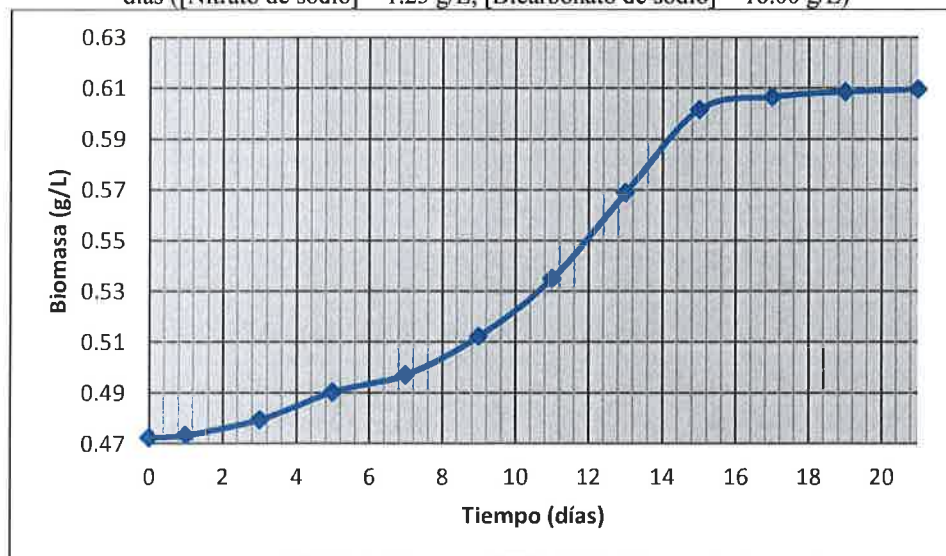


Figura 19. Curva de crecimiento de *A. platensis* en el medio experimental # 3 (muestra 1) en un periodo de 21 días ([Nitrato de sodio] = 2.50 g/L; [Bicarbonato de sodio] = 9.00 g/L)

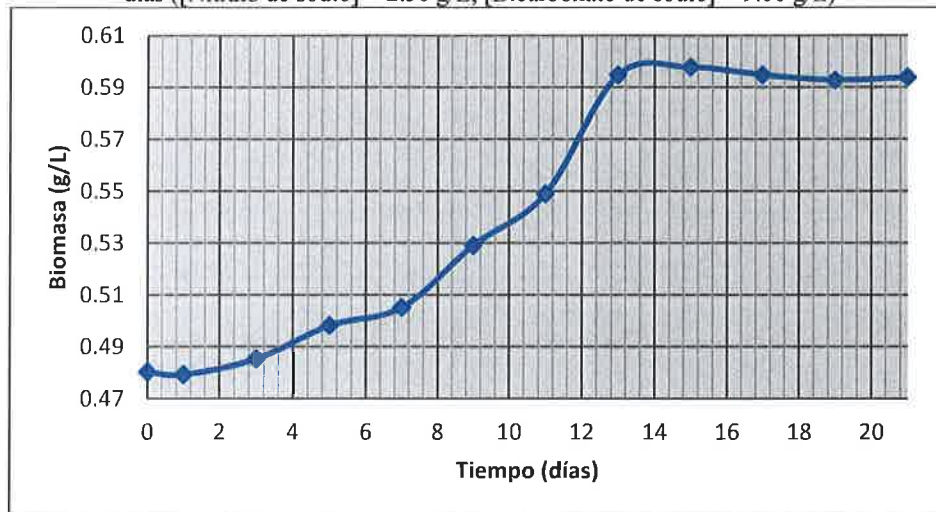


Figura 20. Curva de crecimiento de *A. platensis* en el medio experimental # 3 (muestra 2) en un periodo de 21 días ([Nitrato de sodio] = 2.50 g/L; [Bicarbonato de sodio] = 9.00 g/L)

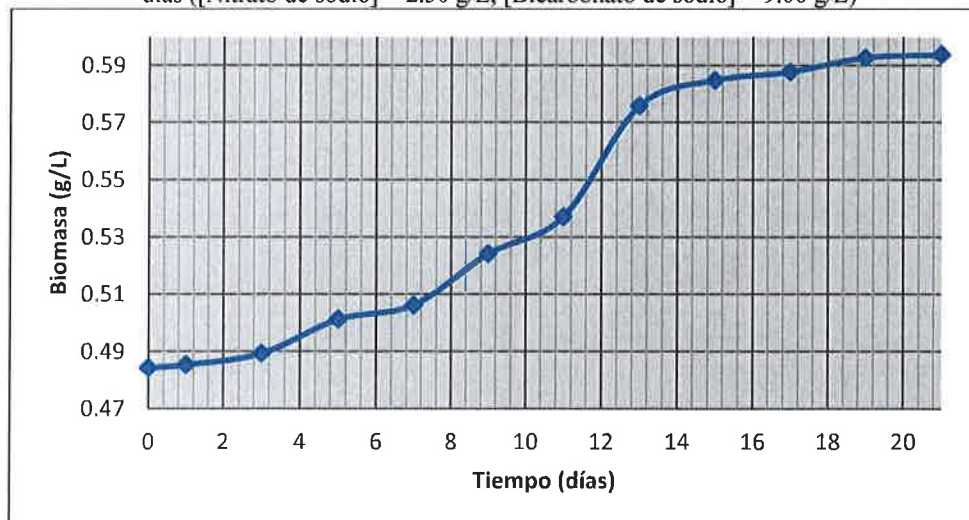


Figura 21. Curva de crecimiento de *A. platensis* en el medio experimental # 4 (muestra 1) en un periodo de 21 días ([Nitrato de sodio] = 2.50 g/L; [Bicarbonato de sodio] = 18.00 g/L)

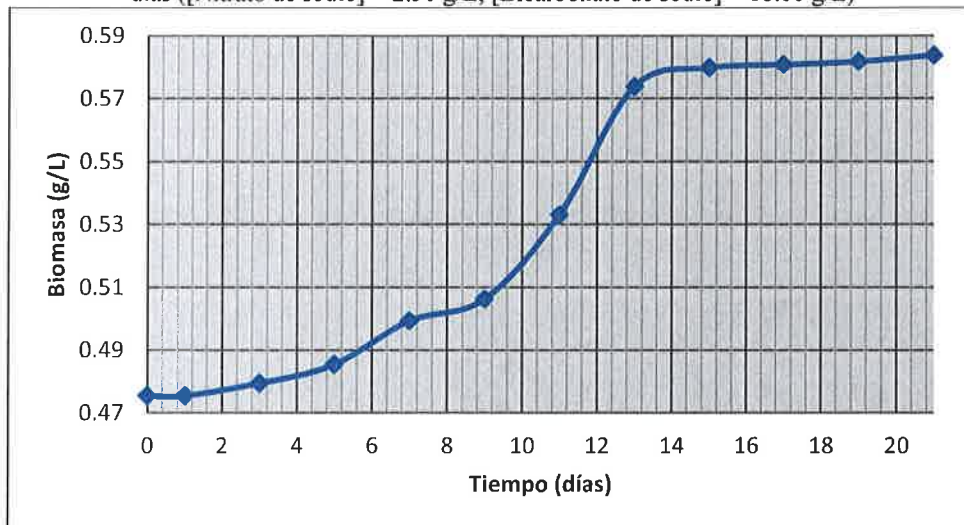


Figura 22. Curva de crecimiento de *A. platensis* en el medio experimental # 4 (muestra 2) en un periodo de 21 días ([Nitrato de sodio] = 2.50 g/L; [Bicarbonato de sodio] = 18.00 g/L)

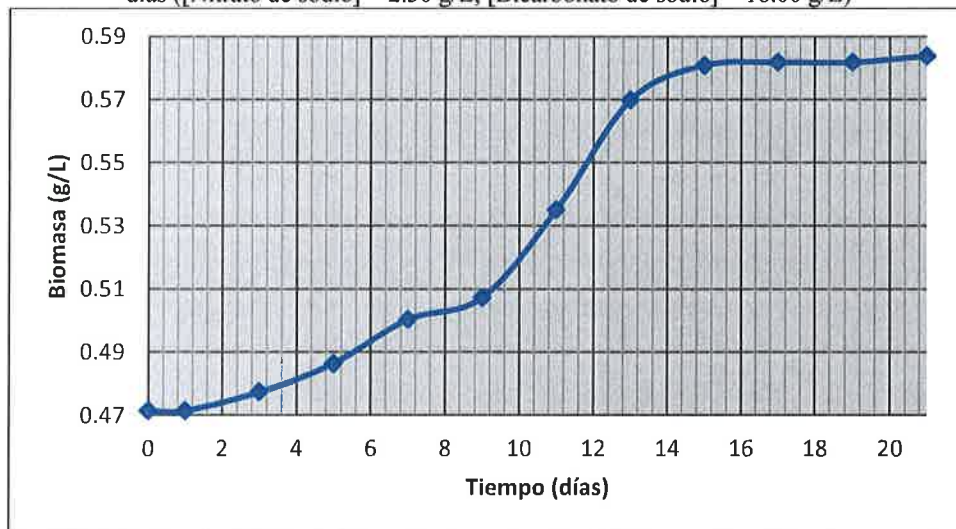
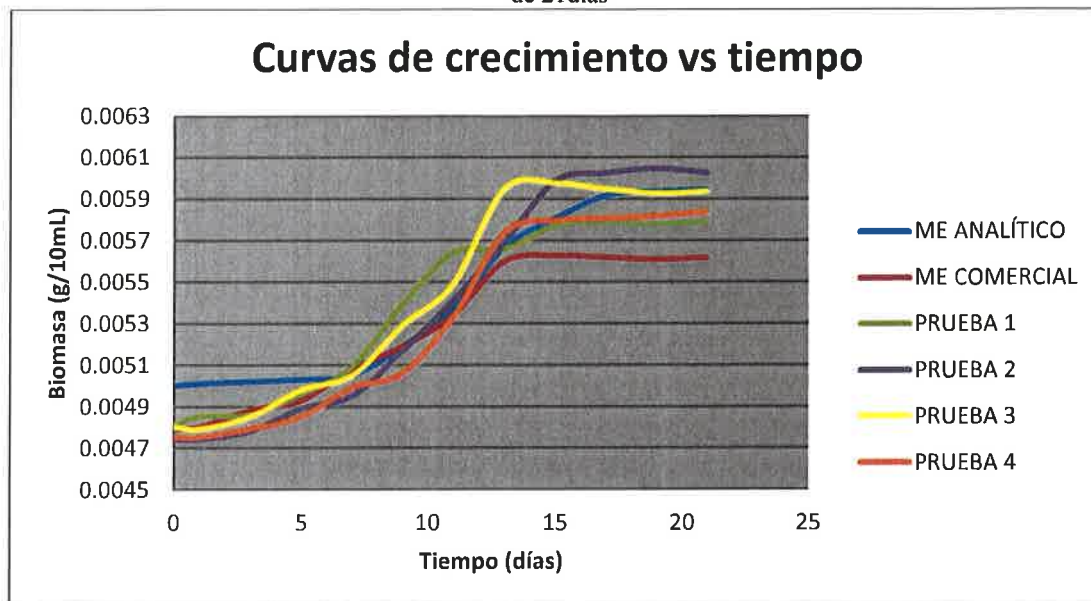


Figura 23. Comparación de las curvas de crecimiento de *A. platensis* en los diferentes medios en un periodo de 21 días



Al analizar las curvas de crecimiento para cada uno de los medios utilizados se observa que existe una diferencia en el comportamiento del desarrollo de *Arthrospira platensis* dependiendo de las cantidades de nitratos y bicarbonatos existentes en el medio. En cuanto a la productividad, se puede observar que el medio experimental # 2, con una concentración mínima de nitrato pero máxima de bicarbonato fue la que presentó la mayor tasa de crecimiento, alcanzando una biomasa de 0.610 g/L; la mínima biomasa obtenida se encuentra en el medio estándar con reactivo analítico, alcanzando una cifra de 0.562 g/L y una caída notable en su crecimiento a los 21 días.

D. Parámetros cinéticos obtenidos del crecimiento de *Arthrospira platensis* en los diferentes medios:

Cuadro 5. Principales parámetros cinéticos obtenidos del crecimiento de *Arthrospira platensis* en los diferentes medios

Medio	Velocidad de crecimiento (μ) (Muestra 1)	Tasa específica máxima de crecimiento (μ_{max})	Velocidad de crecimiento (μ) (Muestra 2)	Tasa específica máxima de crecimiento (μ_{max})	Máxima biomasa (g/L) (Muestra 1)	Máxima biomasa (g/L) (Muestra 2)
Medio estándar (analítico)	0.009	0.016	0.010	0.016	0.562	0.565
Medio estándar (comercial)	0.008	0.016	0.009	0.017	0.595	0.592
Medio experimental 1	0.011	0.018	0.013	0.014	0.579	0.579
Medio experimental 2	0.013	0.024	0.013	0.026	0.606	0.610
Medio experimental 3	0.014	0.022	0.014	0.022	0.594	0.594
Medio experimental 4	0.013	0.021	0.013	0.021	0.584	0.584

Las fases de adaptación más cortas se observan en la prueba experimental # 4 y en el medio estándar con bicarbonato de sodio comercial. Por el contrario se observó la fase de adaptación más larga en el medio estándar con bicarbonato de sodio grado analítico. El desarrollo de los cultivos en su fase logarítmica mostró una duración que osciló entre los 4 días aproximadamente.

VII. DISCUSIÓN

En la literatura se reporta una gran variedad de métodos viables para la producción de *Arthrospira platensis* en condiciones de laboratorio. En este estudio se probaron medios de cultivo experimentales con diferentes concentraciones de nitrato y bicarbonato a las contenidas en el medio de Zarrouk. Se encontró que con una concentración de 1.25 g/L de nitrato de sodio y 18.00 g/L de bicarbonato se obtiene la mayor cantidad de biomasa (0.61 g/L) con una tasa de crecimiento de 0.013.

Se observó inicialmente que las condiciones ambientales de temperatura e iluminación, al no ser constantes, representan un problema para satisfacer las necesidades de reproducción del microorganismo, por lo que se optó por optimizar un sistema experimental en condiciones controladas para obtener resultados medibles.

Se probaron dos modelos experimentales para evaluar las variables críticas en el crecimiento de *A. platensis*. El primero de ellos se sometió a condiciones ambientales de temperatura e iluminación, haciendo uso de un recipiente plástico de gran capacidad (8 L), utilizando el medio de Zarrouk modificado como medio control. Utilizar recipientes demasiado grandes requiere no solo de una cantidad excesiva de medio, lo que repercute en un gasto económico bastante alto, sino también contar ya con un cultivo viable para facilitar su adaptación y reproducción en el medio. La aireación con una bomba de oxígeno para pecera, como fuente de agitación al medio, no es la más apropiada en contenedores que no poseen una forma rectangular, ya que al no poder colocarla en una posición ideal, se producen demasiadas burbujas, limitando la capacidad de la cianobacteria a acceder a las fuentes de luz y nutrientes.

El segundo de ellos, en condiciones controladas, demostró rápidamente ser un modelo más adecuado para lograr la reproducción de la cianobacteria. Utilizando frascos de vidrio de 250 mL e inoculando en medio de Zarrouk modificado, se mantuvieron dentro de una recámara con temperatura (32.5°C) e iluminación constante con dos tipos de luz LED, una bombilla de luz cálida de 6 W y una de luz blanca de 9W, que se traduce en una cantidad de 1350 lúmenes, que representa casi la mitad de los lúmenes sugeridos para el cultivo de *A. platensis*, que según lo reportado por Pedraza es de aproximadamente 3000 lúmenes.

En el segundo sistema experimental pudo apreciarse un crecimiento visible a partir de los 3-4 días, mientras que transcurrido un mes, en el primer modelo parecía no estar obteniendo ningún resultado medible. Factores como el fotoperiodo de 12/12 horas luz/oscuridad, la cual no se cumplía en el primer modelo, ya que la luz solar no incidía directamente sobre el cultivo por razones climatológicas, impedía que se realizara el proceso fotosintético necesario para que la cianobacteria pudiera adaptarse al medio. El no registrar una temperatura constante representó también uno de los mayores inhibidores del crecimiento bacteriano.

Se optó por optimizar las condiciones del segundo modelo experimental, el cual ya contaba con una temperatura e iluminación constante. Se descartó el uso de recipientes plásticos, debido a que la naturaleza filamentosa de *A. platensis* provocaba que se adhirieran anillos de conglomerados filamentosos en los bordes e incisiones del recipiente. Por lo que se optó por utilizar recipientes de vidrio de una capacidad adecuada y más asequible dentro del laboratorio.

Fue posible recrear el ambiente necesario para obtener los primeros cultivos de cianobacterias para la propagación del crecimiento de *A. platensis*, a saber: temperatura constante y controlada, iluminación constante con fotoperiodos regulados, inóculos viables, cantidades asequibles de reactivos para la preparación del medio y el espacio físico dentro del laboratorio.

Con el objeto de optimizar las condiciones de crecimiento se determinó que la luz blanca (400 nm de longitud de onda) es la que mejor sustituye a la luz del sol (Cuesta, 2006), por lo que se utilizó una lámpara con esas características, tomando en cuenta las medidas físicas de la recámara. Otro factor a considerar fue la agitación del medio. La imposibilidad de utilizar agitadores magnéticos por cuestiones prácticas y habiendo notado que la agitación manual no es la indicada, se procedió a solicitar el uso de una incubadora con agitación incorporada, cumpliendo así con la mayoría de condiciones físicas para poder centrar el objetivo del proyecto en la composición del medio de cultivo.

Se utilizó el medio de Zarrouk modificado por Cornet como medio control o medio estándar, ya que este es un medio alcalino que alcanza niveles de pH muy elevados (9-11), lo cual lo hace ideal para la supervivencia de *A. platensis*, y al mismo tiempo menos propenso a contaminaciones (Vonshak, 2000). A partir de la receta del medio de Zarrouk se establecieron las cantidades mínimas y máximas de nitratos y bicarbonato para obtener 4 medios experimentales. Se modificó el medio para evaluar la incidencia que tienen estos compuestos en el crecimiento de *A. platensis* y a partir de ello poder proponer un medio óptimo para el cultivo y propagación de la cianobacteria. De esta forma, luego de contar con un cultivo viable y controlado se pudo utilizar para inocular los medios experimentales y el control.

El estudio del crecimiento del cultivo de *A. platensis* en todos los medios pudo observarse dentro de las primeras 36 horas, por lo que al término de los 21 días se pudieron determinar las curvas de crecimiento de la cianobacteria en cada medio.

Tal y como se observa en las curvas de crecimiento durante la fase de adaptación, presente en todos los medios, *A. platensis* se adecuó en un intervalo de tiempo de entre 1-4 días, mientras que la fase logarítmica osciló entre los 4 y 6 días hasta llegar a su etapa estacionaria.

En los ensayos experimentales, el medio estándar con reactivo comercial, la prueba 3 y la prueba 4 son las que presentan la fase de adaptación más corta. En el caso de los medios experimentales sería posible explicar

este comportamiento por la naturaleza alta en nitratos que les provee una alcalinidad mayor, lo cual a su vez es más favorable para la adaptación y supervivencia de *A. platensis*.

Las curvas de crecimiento de cada uno de los medios revelan esta situación. Se observa cómo el crecimiento de la cianobacteria en el medio que contiene el bicarbonato de tipo comercial es más irregular en todas sus etapas, con una fase de adaptación demasiado corta, una pronunciada fase logarítmica y un repentino cambio a fase estacionaria. Se observaron inflexiones en todas las fases logarítmicas de las curvas de crecimiento utilizando este reactivo. Esto puede deberse a la rápida absorción del bicarbonato, ya que la presencia de algunos excipientes en el de tipo comercial puede prolongar la generación acelerada de iones OH⁻ que conducen a la etapa endógena de la población.

Esto también es importante ya que respalda en todo caso el uso del medio de Zarrouk como medio control, aun cuando no es el medio más productivo de todos. Se puede observar que las pruebas 2 y 3 son las que alcanzan una mayor cantidad de biomasa casi en el mismo periodo de tiempo.

Es interesante analizar que la proporción C/N en los medios es un factor muy importante. Los resultados observados con respecto a la biomasa obtenida respaldan esta afirmación, comparando los valores obtenidos en la prueba 2, en donde se obtuvo la mayor cantidad de biomasa, se tiene la menor concentración de nitrato de sodio, pero la mayor de bicarbonato, mientras que en la prueba 3, con la menor cantidad de biomasa obtenida, se tiene la mayor concentración de nitrato de sodio, pero la menor de bicarbonato. Otro factor a tomar en cuenta, es que debido a que no se contaba con un pHímetro que pudiese medir medios tan alcalinos, no se puede dar un dato exacto del pH de cada medio, pero lo que sí es posible afirmar es que de acuerdo a lo reportado por Monaselidze en 2002, el intervalo óptimo de pH para la viabilidad celular de *A. platensis* en el medio de Zarrouk oscila entre 9.4-10.3, por lo que pequeñas variaciones en el pH producto de la naturaleza del reactivo podría también influir en el comportamiento de la cianobacteria.

En cuanto a la fase exponencial, todos los medios presentaron un crecimiento notable entre los días 5 y 13, a excepción del medio estándar analítico que presentó su máximo crecimiento en el día 17. De los resultados se puede afirmar que las concentraciones de nitratos y carbonatos tienen una clara incidencia en el crecimiento de *A. platensis*, y obviamente al enfocarse en las concentraciones más favorables se puede ver que desde el punto de vista económico la prueba 2 corresponde al medio óptimo para cultivar, bajo estas condiciones, la cianobacteria *A. platensis*, alcanzando una biomasa muy similar a la que se obtendría con el medio de Zarrouk utilizando bicarbonato de sodio comercial. Sin embargo, si se corresponde con el valor mayor de biomasa obtenida y que al mismo tiempo, tomando en cuenta que el bicarbonato de sodio comercial es muy asequible, el medio óptimo para el cultivo y producción de la mayor cantidad de biomasa de *A. platensis* es el medio experimental 2 cuya concentración de nitrato de sodio es la menor (1.25 g/L) y la de bicarbonato es la mayor (18.00 g/L).

VIII. CONCLUSIONES

- El medio experimental que alcanzó la máxima cantidad de biomasa de *Arthrospira platensis* (0.602g/L) fue el medio experimental 2, con una concentración de nitrato de sodio de 1.25 g/L y 18 g/L de bicarbonato de sodio.
- El medio experimental que presentó menor incremento en biomasa, así como una de las mayores fases de adaptación, fue el medio experimental 1 el cual posee una concentración de nitrato de sodio de 1.25 g/L y 9.00 g/L de bicarbonato de sodio.
- La tasa de crecimiento más alta la presentó el medio experimental 3 (0.014 g/día) el cual contiene una concentración de 2.50 g/L de nitrato de sodio y 9.00 g/L de bicarbonato de sodio.
- De este estudio exploratorio se sospecha que las concentraciones de nitrato y bicarbonato dentro del medio de cultivo inciden en el crecimiento de *Arthrospira platensis*.

IX. RECOMENDACIONES

- Debido a que el presente es un proyecto de naturaleza exploratoria, se recomienda reproducir el método empleado utilizando muestras en triplicado, para así obtener un análisis estadístico demostrativo.
- Es importante tener en cuenta los valores exactos de pH dentro de un medio de cultivo para poder mantener controlada la producción de iones OH^- .
- Utilizar el medio experimental # 2 para propagar *Arthrospira platensis* y evaluar las proporciones de metabolitos contenidos en la cianobacteria que puedan ser de interés en estudios posteriores.
- Se recomienda realizar un análisis de la composición química del bicarbonato de sodio comercial para evaluar su participación en la absorción de nitrógeno por la cianobacteria.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Abbayes, H. 1989. *Botánica: Vegetales Inferiores*. Ed. Reverte S.A. Guadalajara México. Pp. 68-95
- Becker, E.W., Venkataraman, L.V. 1982. *Biotechnology and exploitation of algae -The Indian Approach*. Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ) – Agency for Technical cooperation (GTZ).
- Belay, A. 2002. *The potential application of Spirulina (Arthrospira) as a nutritional and therapeutic supplement in health management*. J. Ame. Nutra. Assoc. 5 (2): 27- 49.
- Castenholz, R.W., Waterbury, J.B. 1989. *Oxygenic photosynthetic bacteria*. Section 19, In: Staley, J.T., Bryant, M.P., Pfennig, N., Holt, J.G., Eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 3, Williams and Wilkins Co, Baltimore, USA. pp 1710-1806
- Castillo-Urueta, P. y Carmen Durán. *Aflatoxinas en Maíz Amarillo Usado para Elaborar Jarabes de Fructosa : ¿Existen Riesgos para la Salud ?*. (2016).
- Chamorro, G., Salazar, M., Araujo, K.G., Pereira, C., Ceballos, G. 2002. *Actualización en la farmacología de Spirulina (Arthrospira), un alimento no convencional*. ALAN. 52 (3): 720 – 741
- Ciferri, O. (1983). *Spirulina, the Edible Microorganism*. Microbiological Reviews, 47(4), 551–578.
- Coleman SP, Ross C, Paul VJ, Matthew S, Luesch H (2006). *Dragonamides C and D, linear lipopeptides from the marine cyanobacterium brown Lyngbya polychroa*. J Nat Prod 71:887–890.
- Colla, L. M., Oliveira Reinehr, C., Reichert, C., & Costa, J. A. V. (2007). *Production of biomass and nutraceutical compounds by Spirulina platensis under different temperature and nitrogen regimes*. Bioresource Technology, 98(7), 1489–1493.
- Drews G, Weckesser J. *Function, structure and composition of cell walls and external layers*. In: Carr NG, Whitton BA, editors. *The Biology of Cyanobacteria*. Boston: Blackwell Scientific Publications; 1982. pp. 333–357.
- Fay, P. and Van Baalen, C. [Eds] 1987. *The Cyanobacteria*. Elsevier, Amsterdam, 534 pp.
- Fernandes, G., Castro, S. De, Rizzo, R. F., Passos, T. S., Nascimento, B., Dias, S., & Domingues, J. R. (2015). *Biomass production by Arthrospira platensis under different culture conditions*. 35(1), 18–24.

Fitch, Walter. "On the Problem of Discovering the Most Parsimonious Tree" *The American Naturalist* 111, no. 978 (Mar. - Apr., 1995): 223-257.

Gitelson, A., Qiuang, H., Richmonds, A. 1996. *Photic volume in photobioreactors supporting ultrahigh population densities of the photoautotroph Spirulina Platensis*. *Appl. Envir. Microb.* 62 (2): 1570 – 1573

González-Fernández, C., & Ballesteros, M. (2012). *Linking microalgae and cyanobacteria culture conditions and key-enzymes for carbohydrate accumulation*. *Biotechnology Advances*, 30(6), 1655–1661.

González, M., Parra, O., Cifuentes, A. 1995. *Técnicas de cultivo de microalgas en laboratorio*. In: Alveal, K., Ferraio, M., Oliveila, E., Sar, E., Eds. *Manual de métodos ficológicos*. Universidad de Concepción, Concepción, Chile; pp. 219-250.

Hillebrand, H., C.D. Dürselen, D. Kirschtel, D. Pollinger & T. Zohary. 1999. *Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae*. *J. Phycol.* 35:403-424.

Karali, Fedor. *Arthrospira platensis*. *Bio203*. University of Wisconsin-La Crosse. 2011.

Keeling PJ. *The endosymbiotic origin, diversification and fate of plastids*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2010;365 (1541):729-748.

Kemka, N., T. Njiné, S.H.Z. Togouet, D. Niyitegeka, A. Monkiedje, S.F. Menbohan, M. Nola & P. Compère. 2003. *Quantitative importance of cyanobacteria populations in a hypertrophic shallow lake in the subequatorial African region Yaounde Municipal Lake, Cameroon*. *Arch. Hydrobiol.* 156:495-510.

Knoll, Andrew. (2008). *Cyanobacteria and Earth History*. *The Cyanobacteria: Molecular Biology, Genomics and Evolution*.

Komárek J., J., Kaštovský, J. Jan Mareš & J. R. Johansen. 2014. *Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach*. *Preslia*. 86: 295-335.

Melrose, J., Perroy, R., & Careas, S. (2015). *Statewide Agricultural Land Use Baseline 2015*.

Merican, Faradina. (2015). *New Zealand Inventory of Biodiversity. Kingdoms Bacteria, Protozoa, Chromista, Plantae, Fungi*. Volume three, Chapter: 2. Canterbury University Press. Pp. 50-69.

Monaselidze, J., Barbakadze, Sh., Kvirikashvili, Sh., Majagaladze, G., Khachidze, D., Topchishvili, L. 2002. "Thermal characteristics of *Spirulina platensis* cells under nongrowing conditions at various values of pH medium". *Biomacromolecules*. 3:783-786.

Muyashita, Ikida, Fumiya Hamada, Akio Murakami, and Seiji Akimoto. *Adaptation of Divinyl Chlorophyll a/b-Containing Cyanobacterium to Different Light Conditions: Three Strains of Prochlorococcus marinus*. *The Journal of Physical Chemistry B* **2003**. 121 (39), 9081-9090.

Pagnussatt, F. A., Del Ponte, E. M., Garda-Bufferon, J., & Badiale-Furlong, E. (2014). *Inhibition of Fusarium graminearum growth and mycotoxin production by phenolic extract from Spirulina sp.* *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 108(1), 21–26.

Pelizer, L.H. Carvalho, J., Sato, S. 2000. *Spirulina platensis growth estimation by pH determination at different cultivation conditions*. *Electr. J. Biotech.* 5 (3): 251- 257.

Rodríguez, et al., 2006. (2006). *Evaluación del pH en el cultivo de Spirulina spp.(=Arthrospira) bajo condiciones de laboratorio*. Pp. 106.

Sánchez, M. R., Bernal J., Rozo C., Rodríguez I. 2003/b. *Spirulina (Arthrospira): An edible macroorganism: A review*. *Universitas Scientiarum*. 8 (1): 11–12.

Singh, S., Kate, B. N., & Banerjee, U. C. (2005). *Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: an overview*. *Critical Reviews in Biotechnology*, 25(3), 73–95.

Souza, M. M. De, Prietto, L., Ribeiro, A. C., Souza, T. D. de, & Badiale-Furlong, E. (2011). *Assessment of the antifungal activity of Spirulina platensis phenolic extract against Aspergillus flavus*. *Lavras*, 35(6), 1050–1058.

Tiboni, O., Ciferri, O. 1985. *The biochemistry and industrial potential of Spirulina sp.* *Ann. Rev. Microbiol.* 39: 503 – 526.

Tomaselli, M. y Gerdol R. (1997). *Vegetation of wetlands in the Dolomites*. *Diss. Bot.* 281: 88-89, Tab. 31.

Torre-hernández, M. E. De, Sánchez-rangel, D., Galeana-sánchez, E., & Plasencia-de, J. (2014). *Fumonisin-síntesis y función en la interacción Fusarium verticillioides-Maíz*. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 17(1), 77–91.

Vargas, M. A., Rodríguez, H., Moreno, J., Olivares, H., Campo, J. A. D., Rivas, J. and Guerrero, M. G. (1998). *Biochemical composition and fatty acid content of filamentous nitrogen-fixing cyanobacteria*. *Journal of Phycology*, 34: 812–817.

Vonshak, A., *Spirulina: Growth, Physiology and Biochemistry*. In: A. Vonshak (Ed.). *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, Cell-Biology and Biotechnology*. Taylor and Francis, London (1997).

Vonshak, A., Appendices. In: A. Vonshak, Ed. *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, Cell Biology and Biotechnology*. Taylor and Francis, London (1997b).

Vonshak, A., Cheung, S. M., Chen, F. *Mixotrophic growth modifies the response of Spirulina (Arthrospira) platensis (Cyanobacteria) cells to light*. *J. Phycol.*, 36, p. 675-679 (2000).

Vonshak, A. 1984. *Laboratory techniques for the cultivation of microalgae*. In: Richmond, A., Ed. *Handbook of microalgal mass culture*. CRC Press, Inc, Boca Ratón; pp. 117-134.

Whitton, B. 1992. *Diversity, ecology and taxonomy of the cyanobacteria*. In: Mann N, Carr N, Eds. *Photosynthesis*. Plenum Press; pp. 1-37.

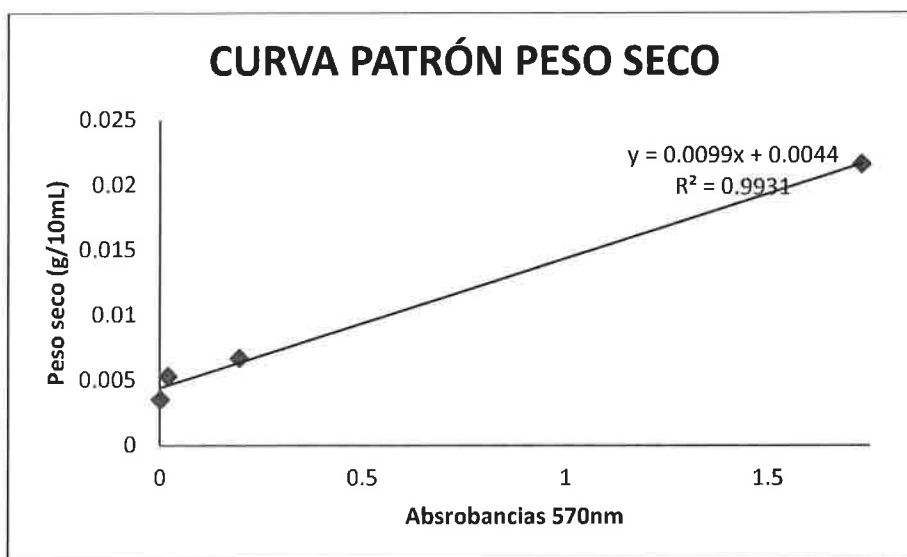
Zambrano, C. 2005. *Producción de biomasa y contenido de ácidos grasos en Spirulina máxima (Arthrospira) bajo diferentes concentraciones de fósforo reactivo soluble (FRS) y fotoperiodo*. Tesis Maestría. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Pp. 52-57.

XI. ANEXOS

A. Anexo 1

Curva patrón peso seco y datos obtenidos en la determinación del peso seco:

Figura 24. Curva patrón del peso seco



Cuadro 6. Datos obtenidos en la determinación del peso seco

Concentración	Peso tubo vacío (g)	Peso tubo + <i>A. platensis</i> (g)	Peso seco <i>A. platensis</i> (g)/10 mL	X	Peso seco (g)/L
	12.4121	12.4339	0.0218		
1	11.6083	11.6299	0.0216	0.0216	2.1600
	12.8123	12.8339	0.0216		
	11.9081	11.9147	0.0066		
0.1	11.4022	11.4087	0.0065	0.0065	0.6700
	19.5572	19.5642	0.0070		
	12.6035	12.6085	0.0050		
0.01	12.4271	12.4323	0.0052	0.0052	0.5300
	12.4283	12.4340	0.0057		
	12.7325	12.7359	0.0034		
0.001	12.0982	12.1018	0.0036	0.0036	0.3500
	12.5523	12.5558	0.0035		

Cuadro 7. Absorbancias para determinación del peso seco

Absorbancias	Peso seco g/10 mL
1.7311	0.0216
0.1966	0.0067
0.0207	0.0053
0.0018	0.0035

B. Anexo 2

Cuadro 8. Datos de absorbancia obtenidos en los 21 días de cultivo

DIA	ME (ANALÍTICO)	ME (COMERCIAL)	PRUEBA # 1	PRUEBA # 2	PRUEBA # 3	PRUEBA # 4
0	0.052	0.036	0.042	0.033	0.033	0.036
	0.064	0.037	0.033	0.030	0.042	0.029
1	0.052	0.038	0.043	0.034	0.033	0.037
	0.065	0.038	0.042	0.031	0.041	0.029
3	0.055	0.043	0.044	0.035	0.038	0.039
	0.065	0.047	0.044	0.037	0.047	0.035
5	0.055	0.049	0.053	0.045	0.053	0.041
	0.066	0.052	0.055	0.048	0.059	0.045
7	0.058	0.067	0.065	0.051	0.061	0.055
	0.067	0.064	0.068	0.055	0.064	0.058
9	0.074	0.078	0.095	0.079	0.091	0.063
	0.080	0.076	0.099	0.07	0.082	0.065
11	0.095	0.098	0.125	0.103	0.118	0.089
	0.094	0.085	0.118	0.093	0.095	0.093
13	0.120	0.120	0.128	0.126	0.171	0.136
	0.155	0.127	0.120	0.127	0.134	0.128
15	0.121	0.119	0.136	0.153	0.169	0.136
	0.156	0.123	0.133	0.160	0.143	0.139
17	0.170	0.117	0.138	0.156	0.130	0.138
	0.129	0.114	0.136	0.165	0.146	0.140
19	0.172	0.121	0.136	0.158	0.133	0.139
	0.131	0.116	0.136	0.167	0.149	0.141
21	0.173	0.122	0.138	0.157	0.134	0.141
	0.132	0.117	0.139	0.165	0.152	0.143

C. Anexo 3

Determinación biomasa con respecto al tiempo:

Cuadro 9. Medio estándar analítico

DIA	ABSORBANCIA (muestra 1)	Biomasa (g/L)	ABSORBANCIA (muestra 2)	Biomasa (g/L)
0	0.052	0.5002743	0.064	0.4999825
1	0.053	0.5012689	0.065	0.5015843
3	0.055	0.5022635	0.066	0.5034986
5	0.056	0.5032581	0.067	0.5033497
7	0.058	0.5052473	0.068	0.5003439
9	0.074	0.5191715	0.080	0.5189923
11	0.095	0.5370741	0.094	0.5354890
13	0.120	0.5669118	0.125	0.5645983
15	0.130	0.580836	0.129	0.5895383
17	0.150	0.5917765	0.142	0.5945980
19	0.152	0.5937657	0.145	0.5948537
21	0.153	0.5947603	0.145	0.5944583

Cuadro 10. Medio estándar comercial

DIA	ABSORBANCIA (muestra 1)	Biomasa (g/L)	ABSORBANCIA (muestra 2)	Biomasa (g/L)
0	0.036	0.4793880	0.037	0.4843098
1	0.038	0.4803826	0.038	0.4898549
3	0.043	0.4883393	0.047	0.4948739
5	0.049	0.4933122	0.052	0.5039843
7	0.064	0.5082311	0.064	0.5185583
9	0.067	0.5191715	0.076	0.5245094
11	0.078	0.5340904	0.085	0.5495849
13	0.098	0.5599497	0.127	0.5604950
15	0.120	0.5629334	0.128	0.5629489
17	0.119	0.5619389	0.124	0.5659939
19	0.117	0.5609443	0.125	0.5604593
21	0.117	0.5619389	0.126	0.5673940

Cuadro 11. Medio experimental # 1

DIA	ABSORBANCIA (muestra 1)	Biomasa (g/L)	ABSORBANCIA (muestra 2)	Biomasa (g/L)
0	0.042	0.4803826	0.033	0.4743958
1	0.043	0.4853555	0.042	0.4703495
3	0.044	0.4863501	0.044	0.4802384
5	0.053	0.4962968	0.055	0.4843746
7	0.065	0.5092256	0.068	0.4923943
9	0.095	0.5390633	0.099	0.5149584
11	0.125	0.5639285	0.118	0.5394843
13	0.128	0.5659172	0.120	0.5594930
15	0.136	0.5768577	0.133	0.5604932
17	0.138	0.5788469	0.135	0.5745090
19	0.139	0.5778523	0.136	0.5749580
21	0.139	0.5788469	0.136	0.5784398

Cuadro 12. Medio experimental #2

DIA	ABSORBANCIA (muestra 1)	Biomasa (g/L)	ABSORBANCIA (muestra 2)	Biomasa (g/L)
0	0.032	0.4744158	0.030	0.4744954
1	0.032	0.4744158	0.031	0.4754930
3	0.033	0.4783934	0.037	0.4792348
5	0.042	0.4893339	0.048	0.4834879
7	0.049	0.4953014	0.055	0.5032482
9	0.051	0.5171824	0.070	0.5294832
11	0.079	0.5410525	0.093	0.5605300
13	0.103	0.5689018	0.127	0.5839485
15	0.126	0.5987386	0.160	0.6140394
17	0.153	0.6027178	0.165	0.6343092
19	0.156	0.6047062	0.167	0.6394830
21	0.156	0.6027176	0.166	0.6323490

Cuadro 13. Medio experimental # 3

DIA	ABSORBANCIA (muestra 1)	Biomasa (g/L)	ABSORBANCIA (muestra 2)	Biomasa (g/L)
0	0.033	0.4803826	0.042	0.4939348
1	0.033	0.4793888	0.041	0.4902392
3	0.038	0.4853555	0.047	0.5039843
5	0.053	0.4982852	0.059	0.5294200
7	0.061	0.5052473	0.064	0.5495809
9	0.091	0.5291174	0.079	0.5304203
11	0.115	0.5490092	0.082	0.5603450
13	0.118	0.5947603	0.095	0.5803954
15	0.171	0.5977441	0.134	0.5800032
17	0.169	0.5947603	0.143	0.5873628
19	0.170	0.5927711	0.146	0.5853492
21	0.171	0.5937657	0.147	0.5899342

Cuadro 14. Medio Experimental # 4

DIA	ABSORBANCIA (muestra 1)	Biomasa (g/L)	ABSORBANCIA (muestra 2)	Biomasa (g/L)
0	0.036	0.4754096	0.029	0.4694382
1	0.037	0.4754546	0.029	0.4694382
3	0.039	0.4793884	0.035	0.4793884
5	0.061	0.4853555	0.064	0.4923874
7	0.055	0.4992798	0.058	0.4996849
9	0.063	0.5062419	0.065	0.5234983
11	0.091	0.5330958	0.093	0.5498430
13	0.121	0.5738739	0.123	0.5738739
15	0.138	0.5798415	0.139	0.5798455
17	0.139	0.5808368	0.141	0.5804538
19	0.140	0.5818306	0.142	0.5834036
21	0.142	0.5838198	0.143	0.5837329