



**UNIVERSIDAD ESTATAL
“PENÍNSULA DE SANTA ELENA”
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
CARRERA DE BIOLOGÍA MARINA**

**INFLUENCIA DE LA SALINIDAD EN LA PRODUCCIÓN DE
BIOMASA Y SU INCIDENCIA SOBRE LA COMPOSICIÓN
BIOQUÍMICA DE *Arthrospira maxima*.**

**TRABAJO DE TITULACIÓN
Previo a la obtención del Título de:
BIÓLOGO MARINO**

**AUTOR: CHRISTIAN DUVAN LÓPEZ SALDARRIAGA
TUTOR UPSE: ING. JIMMY AGUSTÍN VILLÓN MORENO, M. Sc.
TUTOR EXTERNO: BLGO. GABRIEL RENATO CASTRO, M.Sc.**

**LA LIBERTAD – ECUADOR
2018**

**UNIVERSIDAD ESTATAL
“PENÍNSULA DE SANTA ELENA”
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
ESCUELA DE BIOLOGÍA MARINA**

**INFLUENCIA DE LA SALINIDAD EN LA PRODUCCIÓN DE
BIOMASA Y SU INCIDENCIA SOBRE LA COMPOSICIÓN
BIOQUÍMICA DE *Arthrospira maxima*.**

**TRABAJO DE TITULACIÓN
Previa a la obtención del Título de:
BIÓLOGO MARINO**

**AUTOR: CHRISTIAN DUVAN LÓPEZ SALDARRIAGA
TUTOR UPSE: ING. JIMMY VILLÓN MORENO, M. Sc.
TUTOR EXTERNO: BLGO. GABRIEL RENATO CASTRO, M.Sc.**

LA LIBERTAD – ECUADOR

2018

DECLARACIÓN EXPRESA

La responsabilidad por hechos, ideas y resultados expuestos en este trabajo de titulación, me corresponden exclusivamente, y el patrimonio intelectual de la misma, a la Universidad Estatal Península de Santa Elena.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Christian Duvan López Saldarriaga', written over a horizontal line.

Christian Duvan López Saldarriaga

CI. 0927081323

DEDICATORIA

Este trabajo va dedicado a Dios, quien me dio la fortaleza y sabiduría para conseguir ésta meta importante en mi vida.

A toda mi querida familia, que nunca dejaron de apoyarme y que siempre confiaron en mí, su ayuda fue indispensable para culminar éste periodo de estudio, y que el día de hoy se ve reflejado en mi desarrollo personal y profesional.

También dedico este trabajo con mucho amor y cariño a mi madre Marta Edit Saldarriaga Alzate por su apoyo incondicional a la distancia y a mi padre Franklin López Soriano (+) que desde el cielo me protege y desea lo mejor para mí, lo llevo siempre en mi corazón.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Estatal Península de Santa Elena y sus docentes que brindaron sus conocimientos y valores fundamentales en mi crecimiento tanto personal como profesional, en especial al Ing. Jimmy Villón, M.Sc. por su guía y colaboración.

Al Ing. Walter Intriago por su amabilidad, financiamiento y facilidades ofrecidas para utilizar las dependencias de BIOGEMAR S.A.

Al personal técnico de Microalgas Oleas de México S.A. de C.V. por la amistad y aporte científico brindado. En especial al Blgo. Gabriel Renato Castro, M.Sc. por brindarme su apreciable amistad y valiosa colaboración.

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN



Blga. Mayra Cuenca Zambrano, Mgt.
Decana (e)
Facultad de Ciencias del Mar



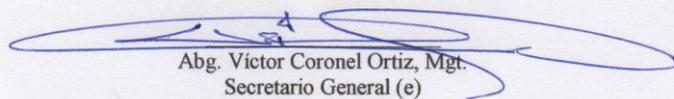
Blga. Tanya González Banchón, Mgt.
Directora (e)
Carrera de Biología Marina



Blga. Erika Salavarría Palma, Ph.D.
Docente de área



Ing. Jimmy Villón Moreno, M.Sc.
Tutor



Abg. Victor Coronel Ortiz, Mgt.
Secretario General (e)

Influencia de la salinidad en la producción de biomasa y su incidencia sobre la composición bioquímica de *Arthrospira maxima*.

López-Saldarriaga Christian^{1*}, Jimmy Villón Moreno¹, Walter Intriago², Gabriel Renato Castro³

¹ Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Estatal Península de Santa Elena (UPSE), La Libertad, Ecuador.

² BIOGEMAR SA., Mar Bravo-Salinas, Ecuador.

³ Microalgas Oleas de México SA. De C.V., Guadalajara-Jalisco, México.

*E-mail: duvan1696@hotmail.com

Resumen

Arthrospira maxima es una cianobacteria filamentosa del orden Oscillatoriales capaz de producir biomasa de alta calidad nutricional en condiciones de cultivo con estrés salino, esto puede ser utilizado por el sector acuícola de la provincia de Santa Elena –Ecuador el cual posee fuentes limitadas de agua dulce y requiere de producción de alimentos vivos con alto contenido nutricional. En el presente estudio se realizó un diseño experimental con el objetivo de determinar la concentración de agua de mar que alcance la mejor estequiometría química para ser efectiva como medio de cultivo en la producción de biomasa de *A. maxima*. Se cultivó tres tratamientos en salinidades (12, 20 y 35 UPS) por triplicado utilizando como base el medio Jourdan y se comparó con el control en agua dulce. El ensayo con mejores características de crecimiento se obtuvo en 20UPS, logrando producir biomasa de 1,70 g.L⁻¹ durante 13 días de cultivo, con una tasa de crecimiento $\mu=0,21 \text{ día}^{-1}$ sin diferencias significativas respecto al control ($P>0,05$), además el análisis bioquímico arrojó un porcentaje proteínico de 48,3 %, carbohidratos 14,2%, lípidos 12,78%, para fibras, cenizas y otros en un 24,05 % destacando los ácidos grasos poliinsaturados tipo omega 6 como el γ -linoleico (GLA), así mismo una alta acumulación de ficobiliproteínas como la ficocianina (C-PC) considerada un importante prebiótico, por consiguiente los ensayos de 12UPS y 20 UPS registraron 44,20y 43,35mg/g de C-PC respectivamente.

Palabras clave: *A. maxima*, salinidad (UPS), producción de biomasa, ficocianina y análisis bioquímico.

Abstract

Arthrospira maxima is a filamentous cyanobacterium included into the order Oscillatoriales, that strain has the ability to produce biomass of high nutritional quality in conditions of culture with saline stress, that characteristic represent an advantage for the aquaculture sector of the province of Santa Elena -Ecuador which has limited sources of fresh water and requires production of live foods with high nutritional content. Thus, in the present study an experimental design was carried out with the aim of define the concentration of seawater that get the best chemical stoichiometry to be effective as a culture medium in the production of *A. maxima* biomass. three salinity treatments was grown (12, 20 and 35 PSU) in triplicate using the Jourdan medium as a base and compared with the control in fresh water. The test with better growth characteristics was obtained in 20 PSU, showed biomass of 1.70 gL⁻¹ during 13 days of culture, with a growth rate $\mu = 0.21 \text{ day}^{-1}$ without significant differences respect to the control ($P > 0.05$), in addition the biochemical analysis showed a protein percentage 48.3%, carbohydrates 14.2%, lipids 12.78%, for fibers, ashes and others in a 24.05 % emphasizing polyunsaturated omega 6 type fatty acids such as γ -linoleic (GLA), also a high accumulation of phycobiliproteins such as phycocyanin (C-PC) considered as an important probiotic, therefore the 12PSU and 20 PSU trials recorded 44.20 and 43.35 mg/g respectively.

Key words: *A. maxima*, salinity (PSU), biomass production, phycocyanin y biochemical analysis.

Introducción

Las cianobacterias se consideran tradicionalmente microorganismos cosmopolitas con capacidades extraordinarias para aclimatarse a variaciones ambientales extremas (Vonshak, 2012). En la mayoría de los casos, la adaptación de cianobacterias dulceacuícolas a sistemas marinos consiste en un ajuste funcional, que involucra cambios en los parámetros bióticos y abióticos, los cuales favorecen la actividad biológica normal en un ambiente alterado o estresado (Nübel, 2000). *Arthrospira* es un género de cianobacterias filamentosas fototróficas, de forma helicoidal fácilmente encontrada en cuerpos de agua alcalinos como: ríos, lagos y manantiales, cuyo origen es en América Central, extendiéndose hacia América del Sur (Ramírez & Olvera, 2006).

Actualmente *Arthrospira* y *Spirulina* son dos géneros de cianobacterias de distinta taxonomía, genética y ultraestructura química y; para llegar a ésta conclusión ha tenido que pasar por varias denominaciones desde su origen, una amplia revisión de Vonshak (2002), considera que investigadores como Geitler (1932), Gomont (1893), Stizenberger (1852), erróneamente consideraron la fusión de éstos dos géneros dentro del mismo orden Oscillatoriales, por la morfología del filamento también llamado tricoma enroscado en forma de hélice similar en ambos, luego tras estudios realizados por reconocidos científicos Anagnostidis (1988), Desikachary (1959), Komarek (1988), han compartido la separación de *Spirulina* y *Arthrospira*, principalmente por la talla del tricoma entre 12-75 μm y 95-150 μm , forma del tilacoides parietal y radial respectivamente, helicidad y distintos patrones en la pared celular. Búsqueda más reciente presenta el perfil de ácidos grasos y contenido de ácido γ -linolenic (GLA) es alto en *Arthrospira*, mientras que en *Spirulina* están ausentes, Cohen & Vonshak (1991), por lo que ubica a *Spirulina* dentro del orden *Spirulinales*, familia *Spirulinaceae* y *Arthrospira* dentro del orden Oscillatoriales, familia Microcoleaceae. Sin embargo *Spirulina* se ha definido actualmente como el nombre comercial que involucra a las especies *A. platensis* y *A. maxima* (Gabriel Renato Castro, Comunicación personal, 18 de octubre, 2018).

Arthrospira tiene la capacidad de desarrollarse en diversas condiciones ambientales, esto se debe a que posee un complejo sistema ultraestructural, además produce antioxidantes y sustancias osmóticas que bloquean el daño celular, y le permiten tolerar factores estresores como soluciones con pH alcalino, altas temperaturas, aguas salobres, marinas e hipersalinas (Liu et al., 2016; Vonshak, 2002). Furmaniak et al., (2017), señala que la secuenciación del genoma para el género *Arthrospira* da un fuerte argumento de la capacidad de adaptación que posee esta especie a diferentes variaciones de temperatura, alcalinidad y amplias concentraciones de sales, lo cual es una respuesta fisiológica otorgada por unos antiportadores (Nap-A tipo Na^+/H^+), presentes en las membranas de transporte e involucradas en la tolerancia de salinidad y alcalinidad. Otra estrategia, es la absorción de solutos compatibles (trehalosa, glucosilglicerol, glucosylglycerato) en células cianobacterianas, cuya función es exhibir efectos protectores hacia macromoléculas sensibles y así disminuir el efecto de la salinidad (Furmaniak et al., 2017).

Especies del género *Arthrospira* han sido ampliamente producida y comercializada por su alto valor nutricional, principalmente cómo fuente proteínica para consumo animal y humano, así como en la extracción de pigmentos hidrosolubles como la ficocianina constituyendo el 10% de la biomasa seca, de la misma manera se aprovechan compuestos activos útiles tales como polisacáridos y ciertos oligómeros que demuestran mejorar el crecimiento de bacterias benéficas en la microflora intestinal de humanos y animales, siendo utilizados como un potencial probiótico, bioestimulantes en la industria agrícola y agentes antioxidantes para elaborar cosméticos (de Jesus Raposo, de Morais & de Morais, 2016; Aiello-Mazarri, Morales & Rosales, 2014; Leema et al., (2010). El género *Arthrospira* es ampliamente utilizado para producción de biomasa a gran escala, cotizada por su riqueza nutricional al contener: proteínas (55 a 60%), carbohidratos (12-20%), lípidos (6-12%), vitaminas (B12 y pro-vitamina A), minerales (hierro y calcio), compuestos con fuerte actividad antioxidante (β -caroteno, C-ficocianina y aloficocianina), inulina (polisacárido con potencial inmunomodulatorio) y ácido γ -linoleico (GLA) (Furmaniak et al.,2017; Rojas, 2017).

Hoy en día la producción de *A. maxima*, atraviesa algunas limitantes de carácter económico al momento de ser cultivada a escala masiva, entre ellas se identifican las siguientes: elevado costo de fuentes de CO₂ para la producción de biomasa, escasos sistemas de cultivos eficientes, amplios requerimientos de carbonatos (NaHCO₃- Na₂CO₃) , sales minerales de alto valor para la preparación de medios específicos (Zarrouk y SOT) para el cultivo de *Spirulina* (Ogawa, 1970), y alta demanda de agua dulce, aproximadamente una tonelada de agua dulce para producir un kilogramo de biomasa seca (Liu et al., 2016). Por ésta razón el actual estudio busca plantear métodos alternativos empleando agua de mar, recurso que se encuentra en grandes cantidades en el perfil costero del Ecuador continental, específicamente en la Provincia de Santa Elena, es necesario desarrollar actividades que involucren el uso de agua marina para reducir el uso de agua dulce. La composición química del agua de mar provee de 50 elementos entre macro y micronutrientes idóneos y compuestos orgánicos, para el crecimiento de ésta cianobacteria, sin embargo también conserva algunos bioelementos secundarios (Ca⁺² y Mg⁺²) en exceso que al incrementar el pH precipitan carbonatos y fosfatos, razón por la cual se requiere un pretratamiento para remover el exceso de los cationes (Faucher, Coupal & Leduy, 1979; Gagneux et al., 2007; Jourdan, 2006).

La empresa BIOGEMAR S.A., ubicada en Mar Bravo-Salinas, se dedica a la producción de larvas de camarón blanco (*Litopenaeus vanammei*), a la vez produce microalgas para enfrentar las necesidades específicas en el desarrollo de sus cultivos, principalmente con la utilización de las especies *Thalassiosira weissflogii*, *Tetraselmis suecica*, y *Chaetoceros gracilis*. Sin embargo se requiere de fuentes primarias de alimento que presenten condiciones nutricionales adecuadas, es así que se considera que *A. maxima* pudiera ser un importante cultivo a desarrollar.

Este trabajo evaluó a escala de laboratorio la producción de biomasa y composición bioquímica de *Arthrospira maxima*, en tres concentraciones de salinidad (12 UPS, 20 UPS y 35 UPS), empleando agua de mar y enriqueciendo el cultivo con medio Jourdan (Jourdan, 2006).

Materiales y métodos

En el año 2017 BIOGEMAR S.A., se vincula en la investigación para integrar la cianobacteria *Arthrospira maxima* dentro de sus matrices de producción, dando inicio a la primera etapa de investigación dirigida a la conservación de la cepa, para luego ser escaladas en diferentes medios de agua de mar, previamente se consiguió una adaptación a 10 UPS, resultando la estabilización de la cepa en medio marino, posteriormente se continuó con las pruebas en distintas aplicaciones salinas de 12 UPS, 20 UPS y 35 UPS para la obtención de los primeros datos de cinética de crecimiento como biomasa para los análisis bioquímicos. La siguiente etapa consistió en el análisis bioquímico, para ello se trasladó la investigación a las instalaciones de Microalgas Oleas de México SA de CV, Guadalajara, México para el posterior procesamiento de las muestras. Durante la estancia se realizaron los *screening* bioquímicos de las biomásas, utilizando protocolos establecidos por el grupo Microalgas Oleas, resultando la cuantificación de proteínas, carbohidratos, lípidos, cenizas y otros.

Tratamiento del agua de mar para precipitación de cationes en exceso (Mg⁺² y Ca⁺²).

El agua de mar proveniente de Mar Bravo, se obtuvo por bombeo hasta el laboratorio BIOGEMAR S.A., la cual fue filtrada a través de una zeolita 5 μ hasta 0,5 μ , esterilizada con rayos UV y control de variables físico químico (Salinidad-35 UPS y pH-8.1) para precipitar sales (Mg⁺² y Ca⁺²) en exceso, se empleó la metodología propuesta por Faucher et al., (1979), modificando la cantidad de sales: 5,88 g/L NaHCO₃ para formar CO₃²⁻, 2,0 g/L de NaOH y ajustar el pH a 9.2, manteniendo una temperatura de 35°C durante 2 horas, luego se dejó por 12 horas en reposo y después se recuperó el sobrenadante del agua de mar (SAM: Agua de mar tratada usada en todos los medios de cultivo), cuyas concentraciones de los elementos y sales resultantes antes y después del tratamiento al agua de mar (**Tabla 1**). Para la cuantificación de minerales, por triplicado se usaron kits de *ECO Visocolor*, (MACHEREY-NAGEL, 2006).

Tabla 1. Composición química del agua de mar antes y después de realizar el proceso de precipitación de Mg⁺² y Ca⁺² (Faucher et al., 1979).

Elemento	Concentración mg/L*	Concentración mg/L**	Forma
Carbonatos	125	5700	CaCO ₃
Calcio	400	275	Ca ²⁺
Nitrato	0,5	0,5	NO ₃ ⁻
Potasio	380	335	K ⁺
Sulfatos	300	300	SO ₄ ²⁻
Fosfatos	3	3	PO ₄ ³⁻
Magnesio	874	80	Mg ⁺²

*Antes

**Después

Microorganismo e inóculo.

Se empleó 1 L de cepa (OLEO 5) de *A. maxima* de la colección Microalgas Oleas de México, la misma que fue mantenida y replicada para generar inóculo hasta 4 L (biomasa de 1,3 g.L⁻¹) en agua dulce en condiciones controladas con medio Jourdan (Jourdan, 2006) y luz constante a partir de fluorescente de 40 watts equivalentes a 85 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ determinado con un medidor de irradiancia marca-Hydrofarm LGBQM Quantum PAR Meter Micromol Sensor y una temperatura de 26 ± 2 °C, a un fotoperiodo de 14:10 luz/Oscuridad. El siguiente paso fue adaptar el inóculo una salinidad conocida de 10 UPS con la cual se estabilizó el cultivo.

Adaptación de la cepa *A. maxima* en diferentes concentraciones de salinidad.

El inóculo de cuatro litros con salinidad de 10 UPS, fue homogenizado con el fin de alcanzar una concentración general, para luego ser adicionado en los distintos experimentos, los mismos que inicialmente tuvieron una concentración de biomasa (0,2-0,3 g.L⁻¹), nutridos con medio de cultivo Jourdan y mantenidos durante 13 días (**Tabla 2**). Se emplearon tres tratamientos por triplicado en matraz Erlenmeyer de 1L con concentraciones de salinidad en 12 UPS, 20 UPS y 35 UPS respectivamente, suministrando luz continua de 85 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, una temperatura de 26 ± 2 °C, un fotoperiodo de 14:10 luz/oscuridad y adición continua de aire, los tres tratamientos se prepararon con concentraciones diferentes de agua de mar: para el tratamiento 12UPS (2/3 agua dulce : 1/3 agua de mar, v/v), 20UPS (1/3 agua dulce : 2/3 agua de mar, v/v) y 35UPS (Agua de mar sin diluir), los parámetros fisicoquímicos (pH y salinidad) fueron monitoreados usando un medidor multi-parámetro Marca Numak, modelo MPC-, considerando la salinidad del agua de mar pretratada (SAM) en unidades prácticas de salinidad (UPS) para cada medio de cultivo después de precipitar Ca⁺² y Mg⁺² para los tratamientos.

Tabla 2. Composición de los elementos del medio de cultivo usado para el cultivo de *A. maxima* en agua de mar, utilizando como base el medio Jourdan (Jourdan, 2006).

Compuesto	Control (g l ⁻¹)	12 UPS (g l ⁻¹)	20UPS (g l ⁻¹)	35UPS (g l ⁻¹)
<i>NaHCO3</i>	5,880	5,70	5,70	5,70
<i>K2HPO4</i>	0.165	0.165	0.165	0.165
<i>NaNO3</i>	0,921	1,5	1,5	1,5
<i>NaCl</i>	2.0	0.0	0.0	0.0
<i>MgSO4.7H2O</i>	0.070	0.070	0.070	0.070
<i>FeSO4.7H2O</i>	0.004	0.004	0.004	0.004

Monitoreo de cinética de crecimiento.

Peso seco y densidad óptica.

Las muestras se colectaron en días alternos y se controló el crecimiento turbidométricamente (Leduy and Therien, 1977) midiendo a una densidad óptica (D.O) de 750 nm con espectrofotómetro UV-V Thermo Scientific, como sustancia patrón para los cultivos con salinidad se usó SAM y agua destilada para el control. La concentración de peso seco se determinó usando 20 ml de cultivo homogenizado de *A. maxima*, fueron filtrados a través de papel filtro Whatman GF-3 de 45 mm y lavados por tres veces con agua destilada. Después se secó la biomasa a 60 °C durante 4 horas, finalmente el filtro que contiene la biomasa seca fue pesado, (Sánchez, 2003).

Ficocianina

Se tomó 5 mg de biomasa seca, fueron introducidos en tubos falcón de 15ml de capacidad, adicionando 5 ml de buffer de fosfatos pH 7.4, homogenizando inmediatamente a 2500 rpm y dando 4 ciclos de congelación y descongelación, luego se centrifugó a 5500 rpm para aclarar la muestra, retirar el sobrenadante en tubos Eppendorf de 2ml y centrifugó nuevamente (HERMLE Z 206 A, Labortechnik GmbH) a las mismas condiciones, (Grupta et al., 2017), finalmente se realizó la lectura de las absorbancias en el espectrofotómetro UV-visible, a longitudes de onda: 620 y 650 nm (Bennet & Bogorad, 1973).

La concentración de ficocianina se determinó a partir de la siguiente ecuación:

$$C - \text{ficocianina (mg/g)} = \left[\frac{(A_{620} - 0,72 \times A_{650})}{7,38} \right]$$

Dónde, Ficocianina C-PC en mg/g. A_{620} =absorbancia a 620 nm y A_{650} = absorbancia a 650nm.

Obtención de biomasa

La cosecha de *A. maxima* se realizó de forma artesanal, filtrando el volumen de cada matraz por una membrana de 30 μ , para posteriormente eliminar los residuos de sales con tres enjuagues de agua destilada, se secó en estufa a 35°C de temperatura en un lapso de 24 horas y finalmente se maceró hasta obtener una biomasa cuyo material fue conservado en tubos falcón de 15 ml previamente rotulados, los mismos que se deben mantener en un lugar seco y oscuro para conservar las propiedades químicas.

Análisis bioquímicos

Para proteínas se empleó el método de Slocombe et al., (2012), con ensayo de Lowry, (1951) usando BSA proteína estándar, para determinación de carbohidratos totales se utilizó el método fenol colorimétrico descrito por Dubois et al., (1956) usando glucosa como estándar. La cuantificación de lípidos totales se evaluó por el método en frío propuesto por Folch et al., (1957) mejorado por Bligh y Dyer (1959), basado en la adición de cloroformo (CHCl_3), metanol (CH_3OH) y agua (H_2O) en proporciones 2:1:0.8, respectivamente. El perfil de ácidos grasos se determinaron a partir de los extractos lipídicos de la biomasa de *A.*

maxima éstos fueron esterificados con el método de transesterificación en caliente con trifloruro de boro (BF₃), descrito por Carreón, Rodríguez & López (2007), los ésteres metílicos de ácidos grasos fueron analizados a través de un cromatógrafo de gases (GC System, Modelo G1530A).

Los análisis se realizaron en el laboratorio Microalgas Oleas de México S.A. de CV sede Parque Tecnológico Universidad, ITESO.

Análisis estadístico y cálculos de crecimiento

Los resultados de peso seco, ficocianina y contenido bioquímico general fueron expresados como media \pm desviación estándar, la cual es dada por el método estadístico de Fisher, con una distribución del 95 % de confianza. Se determinó la normalidad de los datos mediante prueba Kolmogorov-Smirnov K-S ($P=0,082>0,05$), igualdad de varianzas o homocedasticidad con prueba de Levene ($P=0,107>0,05$). Para establecer diferencias de producción de biomasa y composición bioquímica resultantes en cada tratamiento con salinidad, se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA), Arcones & Wang, (2006), utilizando el Software Statgraphics Centurion XVI.II Versión 16.

Arredondo & Voltolina, (2007):

La tasa máxima de crecimiento específico (μ_{\max}) fue definido como el incremento de la biomasa por unidad de tiempo, durante la fase logarítmica y fue calculado siguiendo la siguiente fórmula:

$$\mu_2 = \left[\frac{\ln \left(\frac{X_2}{X_1} \right)}{\ln 2} \right] / (t_2 - t_1)$$

Donde X₁ es la biomasa inicial y X₂ es biomasa final; mientras que T₁ es tiempo inicial y T₂ el tiempo final.

La productividad fue calculada siguiendo el método descrito por Richmond, (2004):

$$P = X_2 \times Vol \times \mu_2$$

Donde P es la productividad, V es el volumen del cultivo (litros), X es la producción de biomasa en 1 litro de medio de cultivo (g.L⁻¹), y μ_2 es la tasa máxima de crecimiento específico (μ_{\max} dia⁻¹)

El tiempo de duplicación y/o de generación (t_g) es el tiempo necesario para que se duplique la población, cuando se usan logaritmos naturales, el tiempo de duplicación puede ser calculado como:

$$t_g = \left[\frac{\ln 2}{\mu_2} \right]$$

Donde μ_2 es igual a la tasa máxima de crecimiento específico (μ_{\max}).

Análisis de resultados

Las concentraciones de Ca^{2+} y Mg^{2+} en el agua de mar previa al proceso de precipitación fueron de 400 y 874 mg L^{-1} respectivamente, (**Tabla 1**), Después del tratamiento con 5,88 g L^{-1} NaHCO_3 y 2 g L^{-1} NaOH , los cationes decrecieron en el sobrenadante de agua de mar (SAM), tales concentraciones fueron Ca^{2+} 275 mg L^{-1} y Mg^{2+} 80 mg L^{-1} , por lo tanto las tasas de precipitación resultaron de 31,25 % y 90,84 %, respectivamente.

La curva de crecimiento de cada uno de los ensayos, no mostró claramente una fase de adaptación para ninguno de los tratamientos, consecuentemente todos crecieron simultáneamente hasta el día 9, posterior a éste periodo 12UPS y 35UPS presentó su fase estacionaria, mientras que Control y 20UPS continuaron el crecimiento, al final del cultivo los máximos valores de biomasa (g.L^{-1}) se registraron en el control y 20 UPS, 1,70 g.L^{-1} y 1,68 g.L^{-1} , respectivamente, mientras que los valores mínimos estuvieron en 12UPS (1,22 g.L^{-1}) y 35 UPS (1,22 g.L^{-1}), en éste último tratamiento, durante el primer día de cultivo se produjo más biomasa respecto a todos los ensayos y al control, resultado indicativo de que las condiciones salinas altas aceleran el crecimiento en los tres primeros días de cultivo, otorgado por el estrés salino, pero luego empieza a detenerse y finalmente es similar que 12 UPS que desde un principio su crecimiento es más lento, por lo que éstas concentraciones son menos favorables para el desarrollo del cultivo, a diferencia del ensayo con 20UPS donde se obtuvo el crecimiento óptimo para una buena preservación en la viabilidad de las células de *A. maxima* en medio Jourdan, éstos fueron muy cercanos al control, (Gráfico 1).

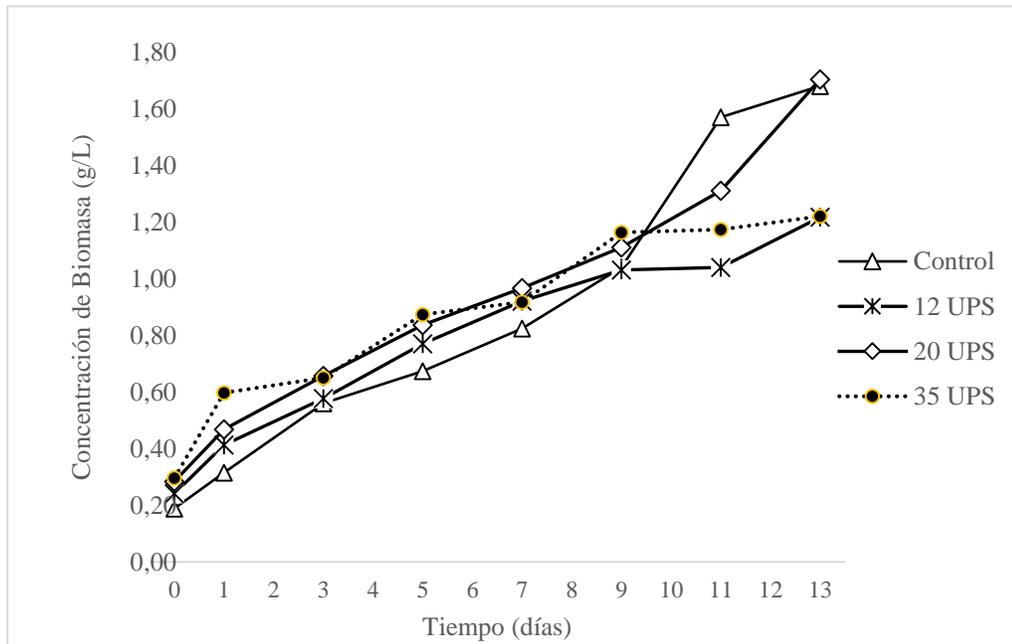


Gráfico 1. Producción de biomasa (g.L^{-1}) de *A. maxima* en ensayos con salinidades 12UPS-20UPS-35UPS-control, durante 13 días de cultivo.

La concentración de biomasa (g.L^{-1}) de *A. maxima* cultivada en todos los ensayos presentan una agrupación homogénea, es decir que no existen diferencias significativas entre cualquier par de medias (LSD de Fisher, $P=0,54$), y cada uno de los ensayos comparten similitud entre sí al igual que en el control, éste con una ligera tendencia a ser diferente de los ensayos presentando el 75 % de los datos en el diagrama de caja, y en 20 UPS el extremo superior del bigote o el máximo valor de biomasa es similar al control, (Tabla 3, Gráfico 2).

Tabla 3. Media \pm desv. estándar del análisis ANOVA respecto la concentración de biomasa en g.L^{-1} de *A. maxima* para cada tratamiento.

TRATAMIENTOS	MEDIAS	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
Control	0,952	0,107
12 UPS	0,852	0,069
20 UPS	1,022	0,085
35 UPS	0,942	0,06

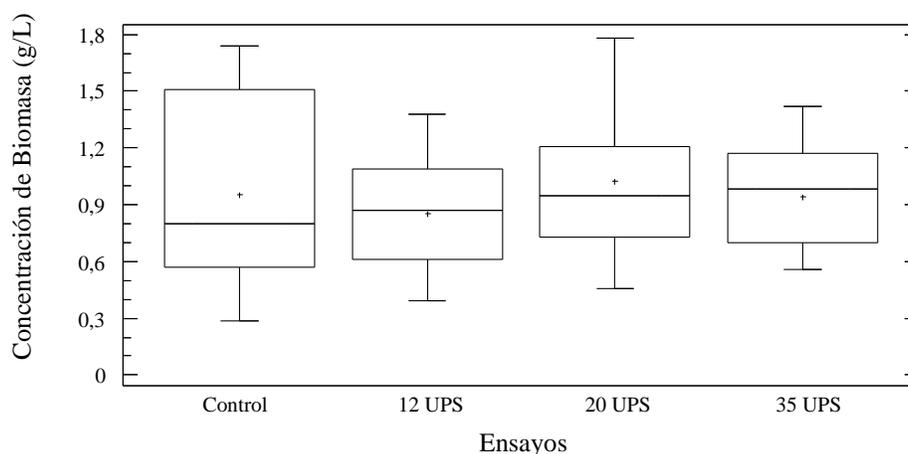


Gráfico 2. Diagrama de cajas de producción de biomasa (g.L^{-1}) vs ensayo.

Los valores de pH registrados durante el desarrollo de los cultivos, se mantuvieron entre 8.5 a 10.8 (Promedio: $9,72 \pm 0,58$), se observó en todos los ensayos realizados, que existe una relación directamente proporcional entre el pH y aumento de la biomasa, es decir que a medida que aumenta la biomasa de la cianobacteria, paralelamente aumenta el pH tanto en los ensayos como en el control, sin embargo a partir del quinto día los ensayos con menor concentración salina mantuvieron un pH superior a los tratamientos con mayor salinidad, es probable que la concentración alta de NaCl interviene en la reducción del pH en el medio, (Gráfico 3).

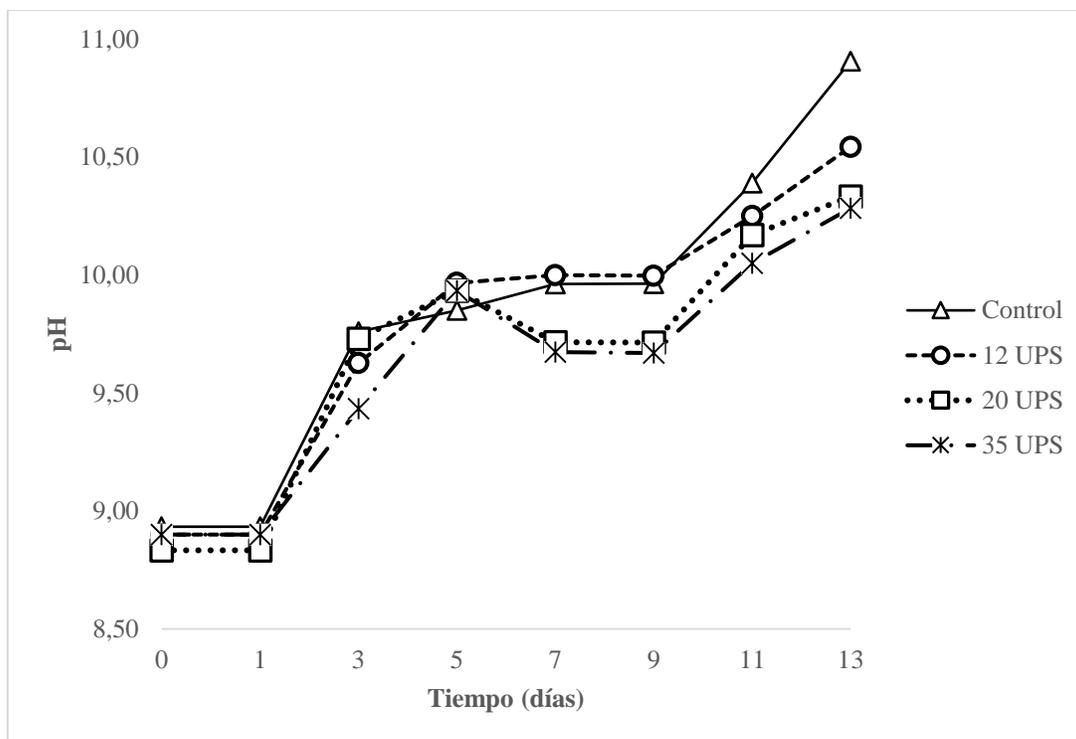


Gráfico 3. Variación del pH durante el cultivo de *A. maxima* en los ensayos con salinidad 12UPS-20UPS-35UPS-control, durante 13 días de cultivo).

La mejor tasa de crecimiento específica (μ_{max}), productividad y tiempo de duplicación fue obtenida en 20 UPS ($0,21 \pm 0,02 \text{ día}^{-1}$, $0,37 \pm 0,05 \text{ g.L}^{-1}.\text{día}^{-1}$ y $3,26 \pm 0,318 \text{ días}$, respectivamente) sin diferencias significativas (LSD de Fisher, $P > 0,05$) respecto a control ($0,24 \pm 0,004 \text{ día}^{-1}$, $0,41 \pm 0,02 \text{ g.L}^{-1}.\text{día}^{-1}$ y $2,86 \pm 0,05 \text{ días}$, respectivamente), al igual que los medios 12 y 20 UPS tampoco tuvieron diferencias significativas (LSD de Fisher, $P > 0,05$). Por el contrario la cinética tuvo un decrecimiento en 35UPS ($0,15 \pm 0,02 \text{ día}^{-1}$, $0,19 \pm 0,04 \text{ g.L}^{-1}.\text{día}^{-1}$, $4,46 \pm 0,715 \text{ días}$) y fue significativamente más bajo que el resto de los tratamientos (LSD de Fisher, $P < 0,05$), (Tabla 4).

Tabla 4. Principales parámetros cinéticos obtenidos del crecimiento de *A. maxima* en los diferentes ensayos con salinidad. ANOVA, LSD de FISHER, media \pm desv. Estándar.

Ensayos	μ_{max} Velocidad de crecimiento (día^{-1})	Productividad ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$)	Tiempo de duplicación (días)	Maxima Biomasa ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
Control	$0,24 \pm 0,004$	$0,41 \pm 0,02$	$2,86 \pm 0,05$	$1,68 \pm 0,07$
12 UPS	$0,18 \pm 0,04$	$0,22 \pm 0,09$	$4,035 \pm 1,014$	$1,22 \pm 0,27$
20 UPS	$0,21 \pm 0,02$	$0,37 \pm 0,05$	$3,26 \pm 0,318$	$1,70 \pm 0,09$
35 UPS	$0,15 \pm 0,02$	$0,19 \pm 0,04$	$4,46 \pm 0,715$	$1,22 \pm 0,08$

Las bajas concentraciones de salinidad no influyen la producción de ficocianina (C-PC), debido a que se conservó éste pigmento a 12 UPS ($44,20 \pm 10,51$ mg/g) y 20 UPS ($43,35 \pm 11,21$ mg/g), valores que se aproximan al máximo (C-PC), obtenido en el control ($55,18 \pm 5,39$ mg/g). Mientras que a 35 UPS se registró la menor concentración de (C-PC) $14,03 \pm 4,91$ mg/g; en términos generales si existen diferencias estadísticamente significativas sobre la media y desviación estándar de ficocianina (C-PC) mg/g entre el mayor nivel de salinidad del ensayo 35 UPS y el resto de los tratamiento ($p=0,002$), Sin embargo el grupo Control versus 12UPS y 20 UPS no presentaron diferencias significativa, (Gráfico 4).

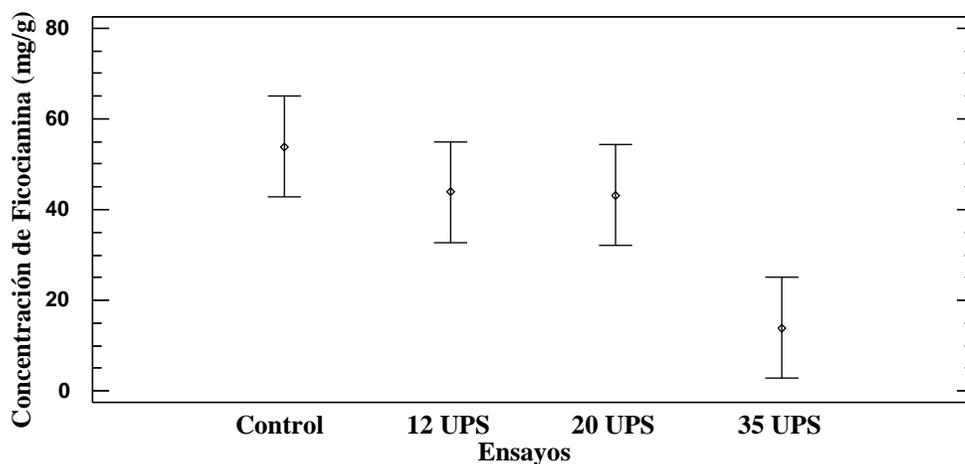


Gráfico 4. Producción de Ficocianina (C-PC) mg/g

El contenido de proteínas de *A. maxima* cultivada en control (medio Jourdan) fue significativamente más alto 68,87 % ($p=0,0064 < 0,05$) que los tratamientos con salinidad, los cuales están clasificados dentro de un grupo homogéneo, la producción de proteínas no difiere significativamente entre ninguno de los tratamientos. Se observó un decrecimiento a 35 UPS ($32,2 \pm 1,01$ %) registrándose el valor de proteínas más bajo; mientras que a menores concentraciones de salinidad es levemente afectado, es decir un porcentaje de proteínas es moderadamente alto a 12 UPS ($45,19 \pm 3,10$ %) y 20 UPS ($48,28 \pm 2,06$ %), éste último no tiene diferencias significativas respecto al control (comparaciones de Tukey), pero el contenido de proteínas en el control si es significativamente mayor que lo conseguido en 12 UPS y 35 UPS ($P=0,068 < 0,05$), Tabla 5.

Los carbohidratos de la biomasa en el control y los tratamientos tienen diferencias significativas ($P=0,000 < 0,05$), se observa que el contenido de carbohidratos aumentó en todas las salinidades probadas, pero la relación es indirectamente proporcional a los niveles de salinidad, es decir que a menor salinidad (12UPS= 24,10%) se produce mayor porcentaje de carbohidratos, caso contrario ocurre cuando aumenta la salinidad los carbohidratos disminuyen (35UPS 12,05 %). En relación a las cenizas ésta es directamente proporcional dado que a mayor salinidad mayor cantidad de cenizas. Puesto que $p=0,695 > 0,05$ no existe diferencia estadísticamente significativa entre la media de lípidos (%) entre un nivel y otro con un nivel del 95% de confianza, entonces resulta que el valor de lípidos es similar en todas las pruebas incluido el control, y el valor fluctúa entre 10,92 y 12,91 %. Tabla 5.

Tabla 5. Contenido de Proteínas, carbohidratos y lípidos de *A. maxima* cultivada en diferentes niveles de salinidad y control. ANOVA, LSD de FISHER, media± desv. Estándar
 (*) Otros: Fibras solubles, fibras insolubles y metales

Análisis bromatológico	Control	12UPS	20UPS	35UPS
Proteínas (%)	68,87± 8,94	45,19 ± 3,10	48,28 ± 2,06	32,216± 1,01
Carbohidratos (%)	6,72 ± 0,71	24,10 ± 5,61	14,269 ± 0,62	12,05± 4,58
Lípidos (%)	12,34 ± 1,99	12,57 ± 2,06	12,92 ± 2,35	10,92 ± 2,22
Cenizas (%)	6,470 ± 0,01	6,92 ± 1,88	10,59 ± 2,96	14,66 ± 1,54
*Otros (%)	5,83	15,27	14,05	32,79
Total (%)	100	100	100	100

El perfil de ácidos grasos se realizó únicamente en el ensayo con mejores características de crecimiento y productividad de *A. maxima*, en éste caso se eligió la biomasa obtenida en el ensayo 20UPS, y los ácidos grasos mayoritarios fueron descritos así: en su mayoría se registra el ácido palmítico (C-16) con 38,62 g/100g de aceite, seguido por el ácido γ -linoleico (C-18:3C) con 17,17 gr/100 g aceite y en tercer lugar el ácido linoleico (C-18:2C) con 14,96 gr/100gr, conformando el 80% de los ácidos grasos analizados, otros con valores inferiores entre 7-5 mg/100gr pertenecen al ácido oleico, ácido cáprico y ácido pentadecenoico (Gráfico 6).

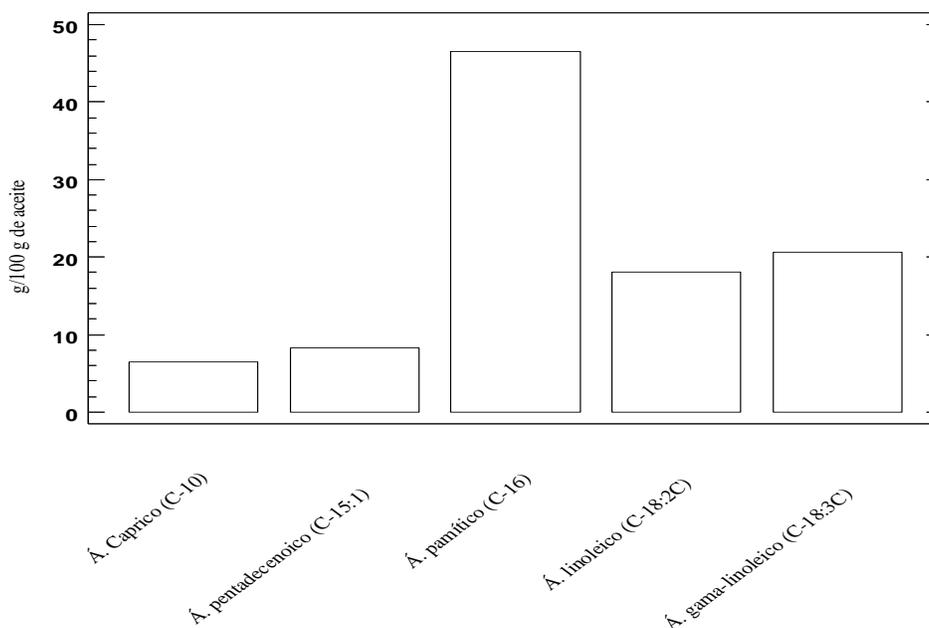


Gráfico 6. Perfil de ácidos grasos producidos por *A. maxima* cultivada en 20UPS.

Discusión

La remoción de sales del agua de mar fue de 31,25% Ca^{2+} y 90,84 % Mg^{2+} , valores que coinciden con lo presentados por Faucher et al., (1979), reduciendo en éste caso la cantidad de NaHCO_3 ($5,88 \text{ g L}^{-1}$) y NaOH (2 g L^{-1}), haciendo el medio favorable para el desarrollo de *Arthrospira maxima*. En tanto Leema et al., (2010) realizó un pretratamiento de agua de mar donde empleó concentraciones de $19,2 \text{ g L}^{-1}$ NaHCO_3 , ajustando pH: 9,2 con 6 g L^{-1} NaOH , logró precipitar Ca^{2+} en un 93%, y Mg^{2+} es removido en menor grado (31-70%), son proporciones de sales mayores a las utilizadas en éste estudio pero en ambos se demostró la misma eficiencia para obtener un pH óptimo y a la vez remover cationes. El NaHCO_3 utilizado en el pretratamiento sirve para enriquecer el agua de mar, ya que suministra una fuente de carbono y alcalinidad para el cultivo de *A. maxima*, sin embargo Affan et al., (2015), usó una técnica más económica para enriquecer el medio con carbón orgánico y a la vez precipitó cationes en exceso de 32,52% Ca^{2+} y 99,91% Mg^{2+} en agua de mar (31UPS), añadiendo carbono bituminoso (25 g L^{-1}) y NaOH ($7,50 \text{ g L}^{-1}$) por una hora a 30°C .

La mayor producción de biomasa en cultivo batch o discontinuo fue de $1,70 \text{ g.L}^{-1}$ en 20 UPS a los 13 días de cultivo, estos resultados son similares a los presentados por Leema et al. (2010), donde la máxima biomasa ($2,75 \text{ g.L}^{-1}$) de *A. platensis* se obtuvo en el tratamiento SW2 (salinidad aproximada a 20 UPS), y una duración del cultivo de 25 días utilizando medio Zarrouk como control, en ambos estudios se comparte que la producción de biomasa de la cepa utilizada a la misma concentración de salinidad (20UPS) no presentó diferencias significativas ($P>0,05$) respecto a su control, a pesar de que el medio de cultivo y tiempo de duración fueron distintos en ambos estudios. Por otro lado Affan et al., (2015), determinó que la mejor producción de biomasa de *Spirulina maxima* es conseguida en salinidad 25 PSU, considerando que se cultivó con una cantidad de 1 g L^{-1} de K_2HPO_4 y $10,94 \text{ mg L}^{-1}$ de carbono orgánico total (TOC), mientras que el medio Jourdan usado en este estudio usó $0,165 \text{ g L}^{-1}$ de K_2HPO_4 y $5,88 \text{ g L}^{-1}$ NaHCO_3 . Rojas, (2017) sustenta que suministrar concentraciones de 2 g.L^{-1} de NaNO_3 y $0,5 \text{ g/L}$ de K_2PO_4 en cultivo de *Spirulina platensis* con salinidad ($35,1 \text{ g.L}^{-1}$) y 25 días de crecimiento alcanzan altas producciones de biomasa ($2,5 \text{ g.L}^{-1}$), en relación a éste estudio, a pesar de que 35 UPS no fue la mejor concentración para producir biomasa de *A. maxima*, si tuvo una buena respuesta al suministro de $1,5 \text{ g/L}$ de NaNO_3 y $0,165 \text{ g/L}$ de K_2PO_4 para lograr $1,22 \text{ g.L}^{-1}$ al cabo de 13 días de cultivo, esto se debe a que la tolerancia a salinidad varía entre cepas de cianobacterias, en éste caso *A. maxima* experimentó un efecto inhibitorio en altas concentraciones de salinidad.

Affan et al., (2015), determina valores similares de tasa de crecimiento, producción de biomasa y productividad de *S. maxima* crecida en agua de mar (20UPS), bajo raciones similares de nutrientes con lo obtenido en *A. maxima* crecida en 20 UPS. Liu et al. (2016), experimenta con cinco cepas de *Spirulina* cultivadas en medio Zarrouk, logrando altas tasas de crecimiento a condiciones salinas que contienen 400 mM NaCl (23,38 UPS) y 200 mM NaCl (11,17 UPS) y un efecto inhibitorio de crecimiento cuando la salinidad es de 600 mM NaCl (35,07 UPS) similar a lo obtenido en éste estudio.

La variación del pH durante el periodo de cultivo de éste estudio muestra valores que concuerda con lo registrado para las especies del género *Arthrospira*, entre ellas *A. maxima*, alcanzando un rango óptimo a pH 9 a 11, se cree que este comportamiento es ocasionado por el metabolismo de la cianobacteria quien libera grupos OH^- al medio alcalinizándolo a lo largo de su crecimiento, lo que garantiza que los cultivos sean menos contaminados por otros organismos competidores y depredadores, tipo microalgas, protozoarios o rotíferos, Berry et al. (2003).

Leema et al., (2010), demostró valores de ficocianina entre $39,64 \pm 2,00$ mg/g en 12UPS y $37,68 \pm 1,91$ mg/g en 20UPS para *A. platensis* cultivada en agua de mar con concentraciones iguales a las preparadas en el presente trabajo, mientras que los valores aquí superan en un grado mínimo lo acumulado por *A. maxima* a 20 UPS, sin embargo éste aumento mínimo puede ser producto del tiempo de cultivo, la cepa utilizada y el medio de cultivo (Jourdan) con menos saturación de sales que el medio Zarrouk. El contenido de ficocianina C-PC tiene una relación directa con el NO_3 suministrado, una cantidad de $1,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ NaNO_3 en medio Jourdan modificado permite que la concentración de C-PC se mantuviera en los ensayos con salinidad, por tanto no hay diferencia significativa respecto al control ($P > 0,05$), esto es confirmado en el estudio realizado por Grupta et al., (2018), en el cual evidencia que altas cantidades de nitrato de sodio ($3,5 \text{ g/L}$) favorecen la producción de biomasa y ficocianina C-PC (47 mg/g) en concentraciones de salinidad altas ($0,8\text{M}$ de NaCl) en *Spirulina platensis*, posiblemente alta concentración de nitrato (NaNO_3) mejore aún más la producción de biomasa y C-Ficocianina en *A. maxima*. Liu et al., (2016), determinó un incremento de ficocianina en dos cepas de *Spirulina platensis* (SP843 y SP972) cultivadas en medio Zarrouk y niveles moderados de salinidad 200mM y 400mM de NaCl aumentaron a 60 mg/g y 45 mg/g de ficocianina, respectivamente. Constatando en éste estudio que para *A. maxima* en influencia de salinidades moderadas 12 y 20UPS y con medio Jourdan logra mantener el contenido de C-ficocianina, mientras que el medio SOT en *S. platensis* es elevado en más de un 50 % respecto al control. Lamela & Márquez, (2000), determinan que los tratamientos con salinidad alta ($35 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), afectan severamente el contenido de C-ficocianina usando *A. maxima*, el mismo efecto se corroboró en el ensayo 35UPS con decrecimiento significativo de C-ficocianina directamente relacionada con la concentración alta de salinidad.

El contenido de proteínas fue influenciada por la salinidad del medio, por lo que las proteínas totales decrecen de 45,19 % en 12 UPS a 32,22 % para 35 UPS, éstos resultados comparten cierta similitud con otros estudios. Ravelonandro et al. (2011), determinó que el contenido de proteínas para *A. platensis* decrece considerablemente a 38 % para una salinidad de $35 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, mientras que un mayor contenido de proteínas de 50 % fue obtenido en salinidad de $13 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl , ubicando éste último como satisfactorio para aplicaciones alimenticias debido a que tuvo el porcentaje más cercano a los productos encontrados en el mercado mostrando que un 45-77% del peso seco de *Arthrospira* son proteínas (Furmaniak et al., 2017), de acuerdo a los ensayos de éste estudio el máximo valor proteínico 48,28 % fue obtenido en 20UPS, en la misma concentración salina, dos estudios tienen resultados cercanos con 46,67% y 46 % de proteínas en tratamiento (AKSM-2) y 20 g/L NaCl , respectivamente (Affan et al., 2015; Ravelonandro et al. 2011), considerándolo aún en el rango de alto valor nutricional. Algunos estudios no concuerdan con éstos resultados ya que

no evidencian una reducción en la síntesis de proteínas cuando existe un estrés salino, como por ejemplo, Leema et al. (2010), muestra mantener el contenido de proteínas de *A. platensis*, cercano al control 71,16% (medio Zarrouk) cuando es cultivado en medios con agua de mar diluida (SW 2-20UPS 65,20 % y SW 3-12 UPS 66,96 %), y Rojas, (2017) encontró que bajo condiciones de estrés y teniendo alta salinidad en el medio, se da un aumento en la producción de proteínas para *Spirulina platensis*, para esto usó altas concentraciones de nitrógeno (>3,5 g/L) que logran limitación de fósforo (<0,15g/L), cuya relación N:P equivale a 10-3 y permiten una mejor respuesta al estrés de salinidad. Ravelonandro et al., (2011), afirma que los carbohidratos están involucrados en la osmoregulación, para contrarrestar el estrés iónico ocasionado por la influencia de NaCl, y el contenido de carbohidratos es elevado en *A. platensis* cuando se desarrolla en agua de mar, debido a que sirven como osmoprotectores durante el proceso de aclimatación a un entorno con alto contenido de sal, Leema et al., (2010). En éste estudio se demuestra que el metabolismo de los carbohidratos es mayor en agua de mar concentrada a 12 y 20 UPS (24,10 % y 14,26 %, respectivamente), mientras que el control fue más bajo 6,72%. La salinidad no influye significativamente sobre el contenido de Lípidos, dado que no hay variación del control respecto a los tratamientos, y tanto el porcentaje de lípidos como el de cenizas (Aumenta con la salinidad) se encuentra dentro del rango de lo reportado para *Arthospira*, de 1.5 a 12% y 7,32 a 20,13%, respectivamente (Affan et al., 2015; Furmaniak et al., 2017).

Un 82 % representa la mayoría de los ácidos grasos acumulados por *A. maxima* en el tratamiento 20UPS, constituidos por ácido palmítico, ácido γ -linoleico muy común en cepas de *Spirulina* por ser de la serie ω -6 y ácido α -linoleico de la serie ω -3, ácido cáprico y pentadecenoico(C-18:2C), son similares con los resultados publicados por Maza et al. (2011), donde en un cultivo de *A. maxima* en fotobioreactores sin salinidad, los ácidos grasos mayoritarios fueron: palmítico (16:0) 43,843, linoleico (18:2n-6) 18,100 y gamma-linolénico (18:3n-6) 17,775, conformando entre el 77 a 78% del total de los ácidos grasos analizados,. El ácido γ -linoleico (GLA) es conocido por tener propiedades medicinales y necesarias para la síntesis de ácido araquidónico y prostaglandinas, además reduce lipoproteínas de baja densidad, y es 170 veces más efectivo que el ácido linoleico (LA), Beheshtipour et al. (2013).

Conclusiones

Arthospira maxima se adaptó a los tres ensayos en condiciones salinas, pero fue en el tratamiento 20 UPS donde se logró mejor cinética de crecimiento y productividad, así como concentraciones más elevadas de proteínas y ácidos grasos, destacando el gamma-linolénico (18:3n-6).

En 12 UPS *A. maxima* logró producir altos niveles de ficocianina y proteína, similar a lo obtenido en 20 UPS, por el contrario 35 UPS mostró un efecto inhibitorio tanto en la cinética de crecimiento como en la producción de proteínas.

El agua de mar tiene alto potencial nutritivo de origen natural que complementado con el medio Jourdan puede ser aprovechado para el cultivo de *A. maxima*.

Recomendaciones

Éstos resultados tienen que ser confirmados en unos mayores volúmenes de cultivo en sistemas abiertos, evaluando protocolos continuo o semicontinuo con la inclusión de diferentes tecnologías que mejoren el rendimiento del cultivo, junto a fuentes económicas de nutrientes como CO₂ y nitrógeno para aumentar la producción de biomasa de *A. maxima*. De manera transversal es importante considerar nuevas investigaciones que busquen la recuperación y reutilización del agua residual que generalmente está enriquecida con nutrientes disponibles para reintroducirlos en el cultivo o incluso en otros campos de carácter acuícola y agrícola.

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado bajo la dirección de la UPSE, gracias a la tutoría del Ing. Jimmy Villón Moreno, M.Sc., además fue apoyado por el Ing. Walter Intriago gerente general de BIOGEMAR S.A. con el soporte financiero y equipamiento durante el desarrollo de la investigación, el Blgo. Gabriel Renato Castro, M.Sc., director de Microalgas Oleas de México S.A. de C.V. quién aportó con el diseño de estudio, recopilación y análisis bioquímicos en México, al Blgo. David García, M.Sc., por la colaboración en la redacción del documento.

Bibliografía

- Affan, M. A., Lee, D. W., Jeon, S. M., Noh, J. H., Heo, S. J., Oh, C., & Kang, D. H. (2015). Bituminous coal and sodium hydroxide-pretreated seawater stimulates *Spirulina* (*Arthrospira*) *maxima* growth with decreased production costs. *Aquaculture*, 436, 121-126.
- Arcones, M. A., & Wang, Y. (2006). Some new tests for normality based on U-processes. *Statistics & probability letters*, 76(1), 69-82.
- Arredondo-Vega, B.O., & Voltolina, D. (2007). Determinación de pigmentos por espectrofotometría. Métodos y Herramientas analíticas en la evaluación de biomasa microalgal. Editado por Bertha Olivia Arredondo Vega y Domenico Voltolina. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, cap. 7, p. 64-67.
- Beheshtipour, H., Mortazavian, A. M., Mohammadi, R., Sohrabvandi, S., & Khosravi-Darani, K. (2013). Supplementation of *Spirulina platensis* and *Chlorella vulgaris* algae into probiotic fermented milks. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(2), 144-154.
- Bennett, A., & Bogorad, L. (1973). Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *The Journal of cell biology*, 58(2), 419-435.
- Berry, S., Bolychevtseva, Y. V., Rögner, M., & Karapetyan, N. V. (2003). Photosynthetic and respiratory electron transport in the alkaliphilic cyanobacterium *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*. *Photosynthesis research*, 78(1), 67-76.
- Bligh, G.E., y Dyer, J.W. (1959). A Rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 37(3):911-917.
- Carreón Palau, L., Rodríguez, J. D. Á., & López, M. A. (2007). Determinación de ácidos grasos por Cromatografía de gases espectrometría de masas. Métodos y Herramientas Analíticas en la Evaluación de la Biomasa Microalgal. Arredondo Vega BO y D. Voltolina (eds). Editorial CIBNOR.
- Cohen, Z., & Vonshak, A. (1991). Fatty acid composition of *Spirulina* and *Spirulina*-like cyanobacteria in relation to their chemotaxonomy. *Phytochemistry*, 30(1), 205-206.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356.
- De Jesus Raposo, M. F., de Morais, A. M. M. B., & de Morais, R. M. S. C. (2016). Emergentsources of prebiotics: seaweeds and microalgae. *Marine drugs*, 14(2), 27.

- Faucher, O., Coupal, B., & Leduy, A. (1979). Utilization of sea water–urea as a culture medium for *Spirulina maxima*. Canadian journal of microbiology, 25(6), 752-759.
- Folch, J., Less, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J Biol Chem, 226 (1), 497-509.
- Furmaniak MA, Misztak AE, Franczuk MD, Wilmotte A, Waleron M and Waleron KF (2017) Edible Cyanobacterial Genus *Arthrospira*: Actual State of the Art in Cultivation Methods, Genetics, and Application in Medicine. Front. Microbiol. 8:2541.
- Gagneux-Moreaux, S., Moreau, C., Gonzalez, J. L., & Cosson, R. P. (2007). Diatom artificial medium (DAM): a new artificial medium for the diatom *Hasleaostrearia* and other marine microalgae. Journal of applied phycology, 19(5), 549-556.
- Gupta, A., Mohan, D., Saxena, R. K., & Singh, S. (2018). Phototrophic cultivation of NaCl-tolerant mutant of *Spirulina platensis* for enhanced C-phycoerythrin production under optimized culture conditions and its dynamic modeling. Journal of phycology, 54(1), 44-55.
- Jourdan, J. P. (2006). Cultivez votre spiruline. Edt. Antenna Technologie: 146p <http://www.antenna.ch/documents/manuelJourdan2061.pdf>.
- Lamela, T., & Márquez-Rocha, F. J. (2000). Phycocyanin production in seawater culture of *Arthrospira maxima*. Ciencias marinas, 26(4), 607-619
- Leduy, A., & Therien, N. (1977). An improved method for optical density measurement of the semimicroscopic blue green alga *Spirulina maxima*. Biotechnology and bioengineering, 19(8), 1219-1224.
- Leema, J. M., Kirubakaran, R., Vinithkumar, N. V., Dheenan, P. S., & Karthikayulu, S. (2010). High value pigment production from *Arthrospira (A. maxima) platensis* cultured in seawater. Bioresource technology, 101(23), 9221-9227.
- Liu, C., Li, L. J., Wu, C. Y., Guo, K. N., & Li, J. H. (2016). Growth and antioxidant production of *A. maxima* in different NaCl concentrations. Biotechnology letters, 38(7), 1089-1096.
- Nübel, U., Garcia-Pichel, F., & Muyzer, G. (2000). The halotolerance and phylogeny of cyanobacteria with tightly coiled trichomes (*A. maxima* Turpin) and the description of *Halo A. maxima tapeticola* gen. nov., sp. nov. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 50(3), 1265-1277.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. Journal of Biological Chemistry, 193; 265-275.

- Maza, L. R., Guevara, M., Arredondo-Vega, B., Gómez, B., Licett, B., & Freites, L. (2011). Contenido De Lípidos, Ácidos Grasos, Exopolisacáridos Y Minerales De *Arthrospira maxima* Cultivada En Fotobiorreactores1. *Agronomía Trop*, 61(3-4), 231-240.
- MACHEREY-NAGEL, (2006). Kits Para Análisis de Agua VISOCOLOR®. (Online), Recuperado el 15/08/2018.URL:ftp://ftp.mn.net.com/espanol/Flyer_Catalogs/Analisis%20dagua/Fl.%20VISOCOLOR%20water%20test%20kit%20ES.pdf.
- Ogawa, T. (1970). Studies on the growth of *Spirulina platensis*:(I) On the pure culture of *Spirulina platensis*. *J. Ferment. Technol.*, 48, 361-367.
- Ramírez-Moreno, L., & Olvera-Ramírez, R. (2006). Uso tradicional y actual de *A. maxima* sp. (*Arthrospira* sp.). *Interciencia*, 31(9). Consultado el: 21/12/2017.
- Ravelonandro, P. H., Ratianarivo, D. H., Joannis-Cassan, C., Isambert, A., & Raherimandimby, M. (2011). Improvement of the growth of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* from Toliara (Madagascar): Effect of agitation, salinity and CO₂ addition. *Food and bioproducts Processing*, 89(3), 209-216.
- Richmond, A. (2004). Biological principles of mass cultivation. *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology*, 125-177.
- Rojas Osorio, D. (2017). Evaluación del crecimiento de *Spirulina platensis* UTEX 1926 cultivada en medios salinos, utilizando CO₂ como fuente de carbono (Master's thesis, Universidad EAFIT).
- Rosales, N., Morales, E., & Aiello-Mazarri, C., (2014). Producción De Biomasa De Cianobacterias Filamentosas Con Potencial Agroalimentario En Cultivos Por Lote Y Escalados (Tesis Doctoral). Universidad del Zulia, Maracaibo.
- Sánchez, M. R. (2003). Producción a escala piloto y composición química proximal de una cepa californiana de *Arthrospira maxima*. Tesis Maestría. Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana. 70 pg. Consultado el 19/21/2017.
- Slocombe, S.P., Ross, M., Thomas, N., McNeill, S., & Stanley, M.S. (2012) A rapid and general method for measurement of protein in micro-algal biomass. *Bioresource Technology* 129; 51-57.
- Vonshak, A. (Ed.) (2002). *A. maxima (Arthrospira platensis) Physiology, cell-biology and biotechnology*. Negev, Israel: Editorial Taylor & Francis, 1-8 p.
- Zarrouk, C. 1966. Contribution to the study of a Cyanophyceae influence of various physical and chemical factors on growth and phototsynthesis *A. maxima maxima*. Setch. and Gardner, Geithner (Ph.D. Thesis), University of Paris, Paris, 74 pp. Consultado el 19/21/2017.

ANEXOS

Anexo 1.

Objetivos

General

- Determinar la producción de biomasa y composición bioquímica de *Arthrospira maxima* cultivada en tres niveles de salinidad a nivel de laboratorio.

Específicos

- Experimentar la adaptación de *A. maxima* mediante el cultivo a tres diferentes concentraciones de salinidad.
- Determinar el crecimiento y productividad de biomasa de *A. maxima* frente a las concentraciones de salinidad experimentadas.
- Analizar la composición bioquímica de la biomasa obtenida en cada uno de los tratamientos con salinidad

Hipótesis

Arthrospira maxima puede ser adaptada en agua de mar alcanzando niveles óptimos de producción de biomasa, manifestando cambios significativos en su estructura química.

Base de datos

Anexo 2. Monitoreo de biomasa y pH de cada una de las pruebas con salinidad durante 13 días.

Días	Ensayo- Réplicas	Biomasa (g.L⁻¹)	pH	Días	Ensayo- Réplicas	(Biomasa (g.L⁻¹))	pH
0	Control A	0,188	8,93	7	Control A	0,78	10,15
0	Control B	0,1800	8,91	7	Control B	0,8	9,75
0	Control C	0,1980	8,95	7	Control C	0,89	9,99
0	12A	0,2720	8,90	7	12A	0,65	10,16
0	12B	0,196	8,89	7	12B	1,02	9,98
0	12C	0,2560	8,91	7	12C	1,09	9,90
0	20A	0,2520	8,83	7	20A	1,04	9,65
0	20B	0,208	8,8	7	20B	0,91	9,72
0	20B	0,392	8,8600	7	20B	0,95	9,80
0	35A	0,356	8,90	7	35A	1,16	9,80
0	35B	0,272	8,85	7	35B	0,85	9,64
0	35C	0,26	8,9500	7	35C	0,74	9,60
1	Control A	0,345	8,9	9	Control A	1,18	9,96
1	Control B	0,285	8,96	9	Control B	1,11	10,07
1	Control C	0,315	8,93	9	Control C	0,83	9,87
1	12A	0,41	8,89	9	12A	0,74	9,74
1	12B	0,44	8,91	9	12B	1,14	10,23
1	12C	0,39	8,90	9	12C	1,21	10,02
1	20A	0,455	8,8	9	20A	1,1	9,85
1	20B	0,425	8,8600	9	20B	0,99	9,64
1	20B	0,525	8,83	9	20B	1,24	9,65
1	35A	0,665	8,85	9	35A	1,42	9,69
1	35B	0,56	8,9500	9	35B	1,09	9,84
1	35C	0,565	8,90	9	35C	0,98	9,48
3	Control A	0,56	9,78	11	Control A	1,62	10,38
3	Control B	0,57	9,73	11	Control B	1,51	10,39
3	Control C	0,55	9,77	11	Control C	1,58	10,37
3	12A	0,47	9,69	11	12A	0,86	10,40
3	12B	0,65	9,63	11	12B	1,01	10,10
3	12C	0,61	9,56	11	12C	1,25	10,25
3	20A	0,71	9,62	11	20A	1,16	10,17
3	20B	0,53	9,85	11	20B	1,21	10,15
3	20B	0,73	9,72	11	20B	1,56	10,18
3	35A	0,63	9,51	11	35A	1,34	9,97

3	35B	0,7	9,59	11	35B	1,17	9,58
3	35C	0,62	9,20	11	35C	1,01	10,61
5	Control A	0,67	10,00	13	Control A	1,74	10,99
5	Control B	0,69	9,70	13	Control B	1,6	10,95
5	Control C	0,66	9,85	13	Control C	1,7	10,78
5	12A	0,55	10,10	13	12A	0,91	10,53
5	12B	0,87	10,00	13	12B	1,36	10,52
5	12C	0,89	9,80	13	12C	1,38	10,54
5	20A	0,87	9,90	13	20A	1,61	10,30
5	20B	0,78	9,80	13	20B	1,78	10,36
5	20B	0,86	10,10	13	20B	1,72	10,33
5	35A	0,89	10,00	13	35A	1,17	10,32
5	35B	0,98	9,90	13	35B	1,18	10,23
5	35C	0,75	9,90	13	35C	1,31	10,28

Anexo 3. Determinación de parámetros cinéticos a partir de la biomasa de cada una de las pruebas con salinidad durante 13 días

Ensayos- réplicas	$\mu_{\max}(\text{día}^{-1})$	Productividad (g.L⁻¹.día⁻¹)	Tasa duplicación(días)
Control A	0,25	0,43	2,81
Control B	0,24	0,39	2,86
Control C	0,24	0,41	2,90
12A	0,13	0,12	5,17
12B	0,21	0,29	3,22
12C	0,19	0,26	3,71
20A	0,21	0,33	3,37
20B	0,24	0,42	2,91
20B	0,20	0,34	3,52
35A	0,13	0,15	5,25
35B	0,16	0,19	4,26
35C	0,18	0,24	3,86

Anexo 4. Base de datos para la determinación de Ficocianina (C-PC) en mg/g

Ensayos- réplicas	Absorbancia (nm)		g/ml	g/mg
	620	650	[C-PC]	[C-PC]
CA1	0,88	0,49	0,07	56,04
CA2	0,83	0,39	0,07	57,92
CB1	0,50	0,08	0,06	58,75
CB2	0,50	0,08	0,06	58,80
CC1	0,33	0,06	0,04	42,25
CC2	0,49	0,09	0,06	57,34
12A1	0,65	0,29	0,06	58,09
12A2	0,63	0,28	0,06	54,78
12B1	0,39	0,17	0,04	37,41
12B2	0,39	0,17	0,04	36,17
12C1	0,48	0,20	0,05	42,00
12C2	0,41	0,19	0,04	36,75
20A1	0,53	0,23	0,05	49,61
20A2	0,52	0,22	0,05	50,01
20B1	0,38	0,17	0,03	31,67
20B2	0,35	0,16	0,03	28,94
20C1	0,60	0,25	0,06	51,84
20C2	0,57	0,24	0,05	48,03
35A1	0,15	0,07	0,01	12,50
35A2	0,14	0,07	0,01	12,13
35B1	0,13	0,07	0,01	10,74
35B2	0,12	0,06	0,01	9,60
35C1	0,25	0,12	0,02	19,85
35C2	0,25	0,12	0,02	19,38

Anexo 5. Resultados de *Screening* bioquímico por triplicado de cada ensayo al final del cultivo.

Ensayos- réplicas	Proteínas	Carbohidratos	Lípidos	Cenizas	Otros	Total
Control A	59,68	6,94	10,53	6,47	16,39	100,00
Control B	69,38	7,30	14,47	6,47	2,38	100,00
Control C	77,54	5,92	12,01	6,47	-1,94	100,00
12A	62,48	17,79	14,15	9,04	-3,46	100,00
12B	34,61	28,50	13,34	5,46	18,09	100,00
12C	38,47	26,02	10,24	6,25	19,01	100,00
20A	50,52	14,60	10,21	7,41	17,26	100,00
20B	46,47	13,56	14,24	13,26	12,48	100,00
20B	47,84	14,65	14,30	11,10	12,10	100,00
35A	33,20	10,45	9,38	14,50	32,47	100,00
35B	31,19	9,28	9,91	13,22	36,40	100,00
35C	32,25	8,79	13,47	16,28	29,21	100,00

Anexo 6. Perfil de ácidos grasos para el ensayo 20 UPS

Cadena	Nombre TAGs	g/ 100 g de aceite
C-4	Ácido Butírico	0,03
C-10	Ácido cáprico	5,34
C-12	Ácido láurico	0,33
C-13	Ácido tridecanoico	0,00
C-14	Ácido mirístico	0,18
C-15	Ácido pentadecanoico	2,57
C-15:1	Ácido Pentadecenoico	6,93
C-16	Ácido Palmítico	38,62
C-16:1	Ácido Palmitoleico	2,64
C-17	Ácido Margárico	0,07
C-17:1	Ácido Heptadecenoico	0,33
C-18	Ácido Esteárico	1,42
C-18:1C	Ácido oleico	4,32
C-18:2TT	Total trans	0,12
C-18:2C	Ácido linoleico	14,97
C-18:3C	Ácido γ -Linolénico	17,18
C-20:2	Ácido Eicosadienoico	0,11
C-22	Ácido Behénico	0,16