

Evaluación del crecimiento de *Spirulina platensis* UTEX 1926 cultivada en medios salinos, utilizando CO₂ como fuente de carbono

Rojas, Daniela.¹; Vargas, Gabriel.²; Sáez, Alex.¹

¹ Grupo de Investigación en Ciencias Biológicas y Bioprocesos CIBIOP, Escuela de Ciencias Básicas, Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad EAFIT, drojaso@eafit.edu.co, asaez@eafit.edu.co

² I&D Cementos Argos S.A., gvargasva@argos.com.co

Abstract

The cell growth of *Spirulina platensis* and the production their metabolites, are affected by factors such as the supply of nutrients and physical-chemical parameters such as salinity, pH, temperature and light availability. The reduction of the use of fresh water and the reduction of production costs of *Spirulina platensis* culture; the use of sea water is implemented, due to its content of several inorganic constituents that are available to the primaries producers such as microalgae and cyanobacteria. In this study the cell growth of the *Spirulina platensis* UTEX 1926 and the production of metabolites under various concentrations of salinity, sodium nitrate and dipotassium phosphate were evaluated in order to obtain the most suitable condition and the understanding of physiological that intervene in the metabolism of cyanobacteria. A Central Composite Design (CCD) was applied and each treatment was performed thrice. The strain was cultivated in 1000mL flasks, with an air stream enriched with 7% CO₂, photoperiod 12:12 under artificial light (LED) with an intensity of 55±4μmol/m²s and temperature on average 27°C±3. The results showed that *Spirulina platensis* UTEX 1926 reached a cellular concentration of 2197mg/L when concentrations of 38,546g/L, 0,727g/L, 0,855g/L salinity, sodium nitrate and dipotassium phosphate respectively were used. In addition, under these concentrations of nutrients, 203mg/L of proteins, 4mg/L of phycocyanin and 3mg/L of exopolysaccharides were obtained. Finally the cost per unit of mass is 0,19US for the chosen condition, being a means of low cost compared to the Zarrouk medium (0,74US per unit mass).

Keywords: *Spirulina platensis*; Carbon dioxide capture; Saline medium.

I. INTRODUCCIÓN

Las cianobacterias son microorganismos procariotas, formadas por unos 150 géneros y más de 2000 especies [1], entre ellas se encuentra el género *Spirulina* considerada una de las principales protagonistas en la biotecnología microalgal [2], debido a que durante varias décadas ha sido utilizada como alimento suplementario para humanos y animales como crustáceos, moluscos y peces [3] en Asia, África y Sur América [4]. Actualmente el cultivo de *Spirulina* con fines industriales se ha extendiendo por diferentes países, ya que su uso se fundamenta no solo por su amplia gama de compuestos y su alto valor nutricional al contener: proteínas (55 a 60%), carbohidratos (12 a 20%), lípidos (6 a 8%), fibra, vitaminas (vitamina B12 y pro-vitamina A), minerales

(hierro), ácidos grasos (gamma-linolénico) y compuestos bioactivos con actividad antioxidante (b-caroteno, ficocianina y aloficocianina) [5], sino también por poseer una alta tasa de crecimiento y un metabolismo variable capaz de adaptarse a diferentes ambientes en comparación con otros microorganismos [6].

Spirulina crece naturalmente en casi todos los ambientes acuáticos (aguas alcalinas, entornos marinos) [7], en la mayoría de los ambientes terrestres [8] y en múltiples condiciones climáticas como hielo del Ártico, aguas termales (50°C), desiertos y superficies rocosas [9]; pero, la gran mayoría de las especies de *Spirulina* aisladas para producción a gran escala provienen de soluciones alcalinas y de aguas salobres, las cuales se

caracterizan por tener altos niveles de carbonato-bicarbonato y pH alcalinos [10]. De manera que el cultivo sintético de esta cianobacteria, requiere de fuentes de carbono como dióxido de carbono o bicarbonato, nitrógeno en forma de nitrato y nitrito, fósforo como fosfato de hidrógeno [11], y otros nutrientes menores como Mg, Zn, Fe, K, Na, que participan en los procesos enzimáticos como cofactores y en la producción de la biomasa [12].

Desde 1966, el medio Zarrouk ha sido el medio sintético más utilizado como estándar para el cultivo de *Spirulina* [13]. Sin embargo, la necesidad de medios más económicos ha llamado la atención de los investigadores con el fin de disminuir el uso de agua dulce [14] que corresponde a tan solo el 3,5% del total de agua que conforma la tierra (71%) [15]; al igual que reducir los costos asociados a las sales minerales, que constituyen una parte importante en los valores de producción, considerándose como el segundo factor con mayor influencia después de la mano de obra [7]. El CO₂ como fuente de carbono económica se ha implementado en los cultivos, cuando es obtenido como desecho industrial, porque funciona como una estrategia cuando se buscan disminuir los gases de efecto invernadero mediante la mitigación biológica [12], puesto que por cada 100t de biomasa microalgal producidas se consumen 183t de CO₂ [16]. Asimismo se estudian medios alternativos que utilizan aguas servidas, efluentes industriales y agua de mar, que contienen muchos de los nutrientes requeridos por las cianobacterias; pero estas a su vez, suelen ser suplementadas con mínimas cantidad de nutrientes específicos [17] que aporten la cantidad necesaria de las principales fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo con el fin de lograr el óptimo crecimiento del microorganismo y la mayor producción de metabolitos.

En 1979 Faucher propuso por primera vez la utilización del agua de mar como fuente de minerales trazas para el cultivo de *Spirulina*. Planteó un medio enriquecido con K₂HPO₄ (0,5g/L), NaNO₃ (3,0g/L), y FeSO₄ (0,01g/L) [13]. Del mismo modo, Devanathan y colaboradores en el 2013, investigaron cuatro cepas de *S. platensis* aisladas de diversos lugares y cultivadas con éxito en un medio con agua de mar enriquecida con diferentes

concentraciones de NaHCO₃, NaNO₃ y K₂HPO₄, adicionalmente se cultivaron en agua de mar sin suplementar y medio Zarrouk como control, concluyendo que el cultivo comercial de *S. platensis* mediante el uso de agua de mar con algunos nutrientes es una opción para la reducción de costos [17] [14]. Es por esto que el cultivo de *Spirulina* utilizando medios con agua de mar ofrece ventajas sobre los cultivos tradicionales [18].

Se sabe que el crecimiento celular de *S. platensis* y la producción de metabolitos de interés industrial [3], son afectados por las condiciones de crecimiento; factores como el suministro de nutrientes, el control de parámetros físico-químicos como la salinidad, el pH, la temperatura y la disponibilidad de la luz [19], son fundamentales en el rendimiento y direccionamiento del metabolismo celular de las cianobacterias [20]. Por consiguiente, el medio de cultivo juega un papel fundamental en el metabolismo microalgal. Sin embargo, aún no se tiene suficiente información sobre la incidencia de la salinidad, el nitrato de sodio (NaNO₃) y el fosfato dipotásico (K₂HPO₄) en el cultivo de *S. platensis* cuando es cultivada con inyección de CO₂ como fuente de carbono [21][22]. Con este trabajo se busca evaluar el crecimiento celular de *Spirulina platensis* UTEX 1926 y la producción de proteínas, ficocianina y exopolisacáridos con diferentes concentraciones de salinidad, nitrato de sodio y fosfato dipotásico, que permitan comprender los aspectos fisiológicos que intervienen en el metabolismo de la cianobacteria.

II. METODOLOGÍA

Microorganismo

Se empleó la cianobacteria *Spirulina platensis* UTEX 1926 adquirida del banco de microalgas de la Universidad de Texas (UTEX: *The Culture Collection of Algae*).

Medio de cultivo

Para la preparación de los medios salinos evaluados, se utilizó agua y sal de mar comercial (SMC) "Sal Montemar Grano N°2" obtenida de la Guajira - Riohacha, a la cual se le determinaron los

elementos químicos presente mediante la técnica de *Fluorescencia de rayos X (FRX)*. Adicionalmente, el medio salino se enriqueció con NaNO_3 y K_2HPO_4 y las concentraciones utilizadas variaron según el diseño experimental.

Para la propagación celular y la adaptación de la cepa se utilizó el medio Zarrouk [23][13] con modificación (*MZM*) (Tabla 1), en donde se reemplazó el cloruro de sodio (NaCl) por *SMC*, bajo la misma concentración. El *MZM* se utilizó como control en todos los ensayos realizados.

Así mismo, se usó agua de mar proveniente del mar caribe (Tolú-Sucre) (*AMT*) ubicada en las coordenadas geográficas $9^{\circ}27'12.6''\text{N}$ $75^{\circ}36'59.9''\text{W}$ al norte de Colombia, como medida de comparación respecto a los ensayos realizados para el cultivo de *S. platensis*. La determinación de los elementos químicos se realizó en estado sólido, al igual que la *SMC* por la técnica *FRX*.

Tabla 1. Medio Zarrouk con modificaciones

Reactivo	Concentración g/L
NaNO_3	2,50
K_2HPO_4	0,50
<i>SMC</i>	1,00
K_2SO_4	1,00
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,20
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,04
EDTA	0,11

*inyección de CO_2 como fuente de carbono
2

Para los medios utilizados, tanto en el diseño experimental como en los controles, se les ajustó el pH a 10 con hidróxido de sodio (NaOH) al 8N, este parámetro se censo y controló durante el desarrollo del experimento, las sales se adicionaron en solución, a excepción del *AMT* que solo tuvo inyección CO_2 como fuente de carbono y los medios no se esterilizaron al igual que para el control *AMT*

y los medios salinos, no se les realizó un pretratamiento de precipitación de Ca^+ y Mg^+ como es descrito por autores como Faucher (1979) [13] y Abu Affan (2015) [24], esto con el fin de no encarecer el proceso de producción al pensarse en una escala piloto a futuro. Finalmente, la salinidad del *AMT* se determinó por método gravimétrico (34,5g/L), en donde se evapora el contenido de agua y se pesa el contenido de los sólidos, los cuales representan las sales minerales disueltas en una muestra de agua [25].

Fluorescencia de rayos X (FRX)

Las muestras *SMC* y *AMT*, se llevaron a horno durante 3 horas a 60°C y posteriormente se molieron en un *Molino Herzong* garantizando su paso por malla de acero inoxidable N°200, nuevamente se secaron a 100°C durante 1 hora y se pesó 6,4g de cada una de las muestras; estas se homogenizaron junto con cera para la formación de un compactado “pastilla” que se prensó a 150Mpa, el producto obtenido se analizó en el Axios PANalytical para la determinación de los elementos químicos presentes en las muestras, a excepción del nitrógeno.

Condiciones de cultivo

Se realizó la evaluación del crecimiento celular y la producción de metabolitos como proteínas, exopolisacáridos (*EPS*) y ficocianina (*PC*) de *S. platensis*, en matraces de 1000mL, bajo los siguientes parámetros: volumen de trabajo 1000mL, concentración inicial del inóculo 0,3g/L, temperatura promedio $27^{\circ}\text{C} \pm 3$, luz artificial (LED) con una intensidad de $55 \pm 4 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, y se suministró una corriente de aire enriquecida con 7% de CO_2 (el porcentaje de CO_2 se definió por ensayos anteriores). El CO_2 se inyectó cada 12 horas y su concentración se midió con un analizador de gases chimenea *Lamcon 4*, para garantizar la entrada de este gas al sistema (Imagen 1).



Imagen 1. Cultivo de *S. platensis* en Erlenmeyer de 1000mL

Determinación de la concentración celular

El crecimiento celular de *S. platensis*, se cuantificó mediante el método de pesos seco cada 36 horas, en balanzas de humedad *Sartorius Mark-3*, por 25 días de cultivo. Para esta técnica se utilizaron filtros estériles de nitratos de celulosa *Sartorius stedim Biotech.*, con tamaño de poro de 0,45µm y diámetro de 47mm.

Cuantificación de proteínas totales

Se tomó 10mL de suspensión celular y se centrifugó a 4000rpm a 5°C y se descartó el sobrenadante. Posteriormente, el pellet obtenido se hidrolizó con 5mL de NaOH a 1N y se llevó a baño maría durante 60 minutos a 80°C, la muestra se dejó enfriar a temperatura ambiente y se centrifugó para obtener el extracto alcalino. Finalmente a 0,5mL del sobrenadante se le aplicó el método de Lowry modificado [26].

Cuantificación de ficocianina

Se tomó 10mL de suspensión celular y se centrifugó a 4000rpm a 5°C y se descartó el sobrenadante. Luego se adicionó 4mL de agua acidulada con pH4 con el fin de lavar el pellet y quitar las trazas de las sales provenientes del medio de cultivo que pudieran afectar la ficobiliproteína. Se centrifugó nuevamente y al pellet se le agregó 10mL de Buffer fosfato-potasio al 0,1M con pH7. Las muestras se mantuvieron fuera de la luz directa, para evitar la fotoxidación del pigmento. Después, se procedió a romper la membrana celular mediante diversas técnicas como sonicación [27], choque térmico (freezer -84°C y baño maría 65°C) [28] y

centrifugación [29], permitiendo obtener el material intracelular, en el cual se cuantificó la cantidad de PC mediante la ecuación 1, que ha servido de referencia para autores como Silveira *et al.* (2008) [30], Martelli *et al.* (2013) [31], Marín *et al.* (2015) [32], entre otros.

Ec. 1 [33]

$$PC = \frac{A_{621} - (0,474 \times A_{652})}{5,34}$$

Donde:

[PC] ($\frac{mg}{L}$) Contenido de PC presente en la muestra

A_{621} Absorbancia para medir PC

A_{652} Absorbancia para medir aloficocianina

Cuantificación de exopolisacáridos

La suspensión celular se filtró y se tomó 1mL de medio libre de células, al cual se le adicionó etanol frío al 96% en una relación 1:4, se homogenizó y se dejó a -20°C por 24 horas. Posteriormente, se centrifugó a 4200rpm a 10°C por 20 minutos, y se descartó el sobrenadante. Al pellet formado se le añadió 5mL de NaOH al 1M y se llevó a baño maría a 60°C durante una hora con intervalos de homogenización cada 15 minutos. Para terminar, se tomó 1mL de muestra y se aplicó el método de Dubois (fenol - ácido sulfúrico) para la cuantificación de los EPS [34].

Diseño experimental

Para la determinación de la influencia de la concentración de salinidad, NaNO₃ y K₂HPO₄ en el crecimiento celular y la producción de metabolitos (proteínas, PC y EPS) se utilizó una superficie de respuesta mediante un Diseño Central Compuesto (DCC) con un valor de $\alpha=1,41$. El diseño implicó la realización de 15 tratamientos experimentales cada uno con tres réplicas para un total de 45 corridas (Tabla 2).

Tabla 2: Valores utilizados en el Diseño central compuesto (DCC) para los factores salinidad, NaNO_3 y K_2HPO_4

Factores (g/L)	$-\sqrt{2}$	-1	0	+1	$+\sqrt{2}$
Salinidad	30,00	31,45	35,00	38,55	40,00
NaNO_3	0,00	0,73	2,50	4,27	5,00
K_2HPO_4	0,00	0,15	0,50	0,85	1,00

El análisis estadístico de los resultados se realizó por medio de un análisis de varianza (ANOVA) usando los Software RStudio versión 0.99.902 y Design Expert versión 9 (versión de prueba), con un nivel de significancia del 95%; los supuestos que se verificaron fueron normalidad, homocedasticidad e independencia de los datos, tanto gráficamente como numéricamente a través de Shapiro Wilk, Bartlett, y Durbin Watson respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para el desarrollo del experimento mediante la utilización de medios salinos, se realizó una comparación de elementos químicos entre la SMC y el AMT por el método FRX (Tabla 3). Se determinó que el AMT y la SMC cuentan con componentes similares, sin embargo, respecto a las concentraciones se observaron diferencias, esto se debe a que en los cuerpos de agua, se encuentran elementos denominados conservativos y no conservativos [35]. Los primeros son aquellos que se presentan en una concentración relativamente constante en cualquier ambiente marino como el cloro y el sodio, los cuales mostraron una diferencia de 1,33% y 2,48% respectivamente. Por otra parte, los segundos, son los que se encuentran en menor proporción y presentan variaciones debido al componente biótico del ecosistema como el caso del fósforo (52,38%), hierro (14,43%), bromo (31,25%) y cobalto (87,5%), los cuales juegan un papel importante en la productividad primaria junto con el nitrógeno [36].

A pesar de que los elementos presentes en una muestra de agua son los que determinan la salinidad, esta cambia constantemente en el mar según la época del año y su ubicación, ya que es muy probable que las regiones con alta salinidad

sea donde predomina la evaporación y las regiones con baja salinidad, donde se dan mayores precipitaciones [37] y escorrentías o aporte de aguas dulces de los ríos.

Tabla 3. Determinación de los elementos químicos de la SMC y del AMT mediante análisis FRX

Analito	Componente	SMC%	AMT%
Cloro (Cl)	Cl	56,310	57,010
Sodio (Na)	Na_2O	39,110	38,140
Silicio (Si)	SiO_2	1,280	1,350
Azufre (S)	SO_3	1,060	1,080
Magnesio (Mg)	MgO	0,920	0,970
Calcio (Ca)	CaO	0,780	0,810
Potasio (K)	K_2O	0,260	0,350
Aluminio (Al)	Al_2O_3	0,140	0,130
Hierro (Fe)	Fe_2O_3	0,083	0,097
Cobalto (Co)	Co_3O_4	0,016	0,002
Bromo (Br)	Br	0,022	0,032
Estroncio (Sr)	SrO	0,010	0,013
Fósforo (P)	P_2O_5	0,010	0,021

Es por esta razón, que se evaluaron diferentes concentraciones salinas dado que las sales minerales presentes en el mar varían entre 30g a 40g en un litro de solución y la adición de elementos importantes para el desarrollo de la cianobacteria como son el nitrógeno en forma de NaNO_3 y el fósforo como K_2HPO_4 .

Antes de la evaluación del DCC, se realizó una adaptación a la cepa por tres generaciones con el fin de que las células estuvieran adaptadas a la SMC, basándonos en estudios previos que han demostrado que la adaptación de *S. platensis* a altas concentraciones salinas, logran desarrollar mecanismos para mantener el crecimiento y la actividad fotosintética en condiciones extremas

como lo muestra Lamela y Márquez en el 2000 [21] y Dhiab y colaboradores en el 2007 [38].

En cuanto al DCC, el análisis de los datos se llevó a cabo en el programa Design Expert versión 9, en dos bloques. Esto se realizó con el objetivo de comprender los factores que influyen en el crecimiento y producción de metabolitos de la cianobacteria *S. platensis* y así mismo, evaluar las regiones óptimas para la producción de biomasa, proteínas, EPS y PC.

Biomasa

Al realizar el análisis estadístico por medio del análisis de varianza (ANOVA), se puede determinar los factores que tienen influencia sobre la variable de respuesta: biomasa. En la Tabla 4 se observa que la producción de biomasa se ve influenciada por la concentración de los tres factores evaluados salinidad, NaNO₃ y K₂HPO₄, con valores de $p < 0,0001$, $p = 0,0171$ y $p = 0,0061$ respectivamente, también se aprecia la influencia de las interacciones salinidad*NaNO₃ ($p = 0,0132$), NaNO₃*K₂HPO₄ ($p = 0,0049$), salinidad*salinidad ($p = 0,0011$), NaNO₃*NaNO₃ ($p = 0,0387$) y K₂HPO₄*K₂HPO₄ ($p < 0,0001$), presentando efectos significativos (*valor P* < 0,05) sobre la concentración celular final pasados los 25 días de cultivo. La ecuación 2, establece el modelo cuadrático y representa que el modelo es significativo (*valor p* < 0,0001 o un *valor F* de 9,53)

Tabla 4. Análisis ANOVA para la concentración de biomasa.

Factor	Biomasa Valor $p < 0,05$
A-Salinidad	<0,0001
B-NaNO ₃	0,0171
C-K ₂ HPO ₄	0,0061
AB	0,0132
AC	0,6608
BC	0,0049
A ²	0,0011
B ²	0,0387
C ²	<0,0001

Ec. 2

$$X = 2585,45 + 138,72 \cdot A + 66,90 \cdot B + 78,11 \cdot C + 85,38 \cdot A \cdot B + 14,46 \cdot A \cdot C + 98,21 \cdot B \cdot C - 202,04 \cdot A^2 - 122,39 \cdot B^2 - 280,84 \cdot C^2$$

Donde

X: Biomasa *A*: Salinidad *B*: NaNO₃ *C*: K₂HPO₄

En la figura 1, se muestra la superficie de respuesta para la variable biomasa, con el factor fosfato definido en 0,5g/L. Se observa la región óptima demarcada en color rojo donde alcanza concentraciones de biomasa alrededor de los 2645mg/L respecto a los 3 factores evaluados. Se sugiere que la mayor producción de biomasa se da entre valores de 33,5g/L a 40g/L para la concentración salina, en cuanto a los factores NaNO₃ y K₂HPO₄ demostraron mayor concentración celular entre 1g/L a 5g/L y 0,35g/L a 0,85g/L, respectivamente.

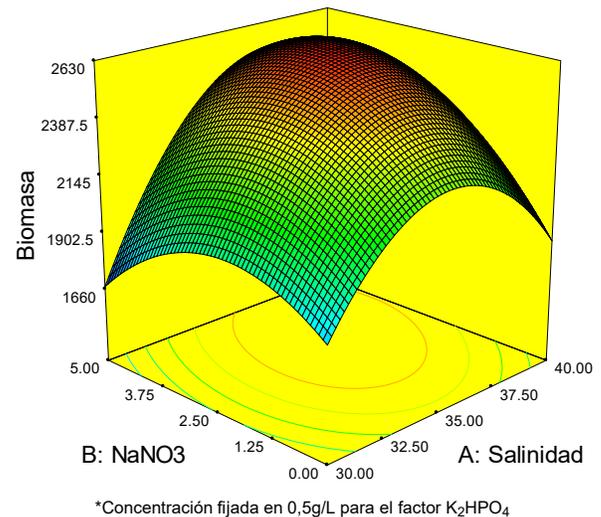


Figura 1. Superficie de respuesta para la optimización de la variable respuesta biomasa.

Se pudo determinar para este ensayo, que la cianobacteria *S. platensis* requiere concentraciones por encima de los 33,5g/L de salinidad, para una alta producción de biomasa, demostrando que las cianobacterias presentan una capacidad de crecer tanto en medios salinos (agua de mar 30g/L a 40g/L) como en no salinos (MZM), logrando una

mayor probabilidad de colonizar diversos ambientes acuáticos, comparados con aquellos que son estrictamente de aguas dulces o halófilos [39]. La adaptación de la cepa a altas concentraciones salinas, se puede deber a dos mecanismos de acción explicados en 1996 por Vonshak [40], refiriéndose a la acumulación de compuestos osmorreguladores dentro de la célula y a un cambio en la actividad fotosintética. Así mismo lo sugiere Berry *et al* (2003), indicando que la cepa presenta procesos bioenergéticos en el citoplasma y en la membrana tilacoide como estrategias especiales de adaptación a las altas concentraciones salinas [33].

Shabani y colaboradores (2016), basaron su investigación en comparar la captura de CO₂ en un medio salino artificial (34mS/cm), agua pura (3μS/cm) y en agua natural (12mS/cm) para las cepas *S. platensis* y *Chlorella vulgaris*, indicando que las cepas crecieron bien bajo concentraciones entre 0,3% a 10% de CO₂, concluyendo que *S. platensis* se cultiva mejor en el agua de mar artificial que *C. vulgaris* logrando una captura de CO₂ del 0,419g/L/d a una concentración del 10% [41]. En nuestra investigación se evaluaron medios salinos elaborados con SMC que iban desde 49mS/cm (30g/L) a 61mS/cm (40g/L), utilizando el CO₂ como fuente de carbono a una concentración del 7% para el cultivo de *S. platensis*, logrando en todos los tratamientos evaluados que la cepa tuviera crecimiento celular (1590 a 2645mg/L), esto demuestra ser una estrategia interesante para la captura de gases de efecto invernadero, al igual que la utilización de otro tipo de aguas, donde la demanda de agua dulce cada vez es mayor, y se prevé que para el año 2030 el mundo tendrá que enfrentarse a un déficit mundial del 40% de agua [15].

A su vez Pierre *et al* (2011), evaluaron diferentes concentraciones salinas (13 a 35g/L) y de CO₂ (0 a 2%) para el cultivo de *S. platensis*, alcanzando concentración celular de aproximadamente 1300, 1250, 1190, 1000mg/L pasados los 20 días de cultivo a las concentraciones salinas de 13, 25, 30, 35g/L respectivamente, obteniendo las condiciones óptimas en 13g/L de salinidad y un porcentaje de CO₂ del 1% [42]. Considerando estos resultados, respecto a los presentados en esta investigación, se

ha encontrado diferencias importantes sobre la producción de biomasa en relación a las concentraciones salinas, esto puede atribuirse a los factores genéticos y adaptación de la cepa y a las diferentes condiciones de cultivo, provocando un efecto en el comportamiento fisiológico de *S. platensis*.

Para alcanzar altas producciones de biomasa se requieren concentraciones de NaNO₃ entre 1g/L a 5g/L, esto se debe a que tanto el tipo, como la cantidad de la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo puede influir en el crecimiento y/o en la composición de la biomasa. Autores como Sassano (2007) [43] y Vasilieva (2011) [44] han demostrado que la concentración del nitrógeno es determinante en importantes cambios del metabolismo primario de las cianobacterias, al igual que la fuente de nitrógeno empleada (KNO₃ o NaNO₃), con el fin de asegurar los más altos rendimientos de biomasa.

Además, los valores de K₂HPO₄ para lograr una alta producción de biomasa se encuentra entre 0,35g/L a 0,85g/L, ya que la cepa en ausencia de esta fuente de fósforo disminuye la producción celular y a altas concentración produce un efecto inhibitorio en las células. El fosfato es uno de los nutrientes principales requerido para el crecimiento de la cianobacteria y la producción de sus moléculas orgánicas tales como ácido nucleico y fosfolípidos [45]. En el análisis del DCC, una concentración de 0g/L de K₂HPO₄ (salinidad 30,2g/L y NaNO₃ 4,7g/L) logra una concentración de 968mg/L de biomasa, siendo un valor bajo comparado con 2556mg/L alcanzado a 0,5g/L de K₂HPO₄ (salinidad 35,1g/L y NaNO₃ 2g/L). Sin embargo, la generación de biomasa para el tratamiento que no contenía fuente de fósforo, pudo ser posible gracias a que el inoculo provenía de un medio en presencia de K₂HPO₄, es por esto que se dice que bajo mínimas concentraciones de K₂HPO₄, la *S. platensis* logra la generación de biomasa, ya que las microalgas y las cianobacterias tienen un mecanismo de almacenamiento de fósforo como polifosfatos intracelular [46], no obstante, Celekli *et al* (2009) en su investigación evaluó la influencia de las concentraciones de fosfato en la producción de biomasa para *S. platensis*, determinando que 0,5g/L de fosfato era la mejor condición para la producción

de biomasa (2213mg/L) y esta disminuía cuando la concentración de fosfato era de 1g/L (797mg/L) [45], estos resultados concuerdan con los encontrados en nuestra investigación, donde se obtuvo una concentración celular de 2556mg/L y 1226mg/L a 0,5g/L y a 1g/L (salinidad 30,4g/L y NaNO₃ 0,05g/L) de fosfato respectivamente.

Proteínas

Se pudo determinar qué los factores que tienen influencia sobre la variable proteínas (Tabla 5) son la concentración de salinidad, nitrato y fosfato con valores de $p=0,0009$, $p=0,0342$ y $p=0,0005$, respectivamente y las interacción salinidad*K₂HPO₄ ($p<0,0001$), NaNO₃*K₂HPO₄ ($p<0,0001$) y NaNO₃*NaNO₃ ($p<0,0001$), mostrando efectos significativos (valor $p<0,05$) sobre la producción de proteínas a los 25 días de cultivo. La ecuación 3, establece el modelo cuadrático y representa que el modelo es significativo (valor $p<0,0001$ o un valor F de 17)

Tabla 5. Análisis ANOVA para la concentración de proteínas.

Factor	Proteínas Valor p<0,05
A-Salinidad	0,0009
B-NaNO ₃	0,0342
C-K ₂ HPO ₄	0,0005
AB	0,1973
AC	<0,0001
BC	<0,0001
A ²	0,1609
B ²	< 0,0001
C ²	0,8126

Ec. 3

$$\text{Proteínas} = 136,87 + 10,81 * A - 6,52 * B + 11,36 * C + 4,83 * A * B - 16,00 * A * C - 26,42 * B * C + 9,05 * A^2 + 32,44 * B^2 + 1,51 * C^2$$

Donde

X: Biomasa A: Salinidad B: NaNO₃ C: K₂HPO₄

Las proteínas representan más del 50% del peso seco total de las microalgas, teóricamente se dice que la *S. platensis* tiene entre un 46 a 63% de proteínas [26]. La producción de proteínas se ve afectada bajo condiciones de estrés, como por ejemplo las limitaciones de la fuente de nitrógeno en el medio. En experimentos realizados por Duran *et al* (2011) [47], se encontró que incubando microalgas en un medio libre de nitrógeno durante seis días, el contenido de proteínas totales y solubles se reducía sustancialmente, adicionalmente evidenciaron una reducción provocada por la escasez de nitrógeno en proteínas específicas, tales como la rubisco, que está implicadas en la fijación del CO₂.

Mediante el análisis del DCC se encontró que bajo condiciones de estrés y teniendo alta salinidad en el medio, se da un aumento en la producción de proteínas, ya que se evidenció que la cianobacteria en presencia de concentraciones altas de nitrógeno (mayores a 3,5g/L), requiere de limitación de fósforo (menores a 0,15g/L) para lograr altas concentraciones de proteínas, contrario sucede cuando el nitrógeno se encuentra bajo limitaciones (menores a 1,5g/L), requiriendo que la fuente de fósforo este a valores por encima de 0,70g/L. En la figura 2, se muestra las superficies de respuesta para la variable proteína, con el factor fosfato definido en 0g/L (A), 0,5g/L (B) y 1g/L (C).

El nitrógeno y fósforo son dos fuentes fundamentales en la producción de proteínas, es por esto que la relación N:P juegan un papel importante en el medio [48] [49]; estudios indican que la relación N:P cambia respecto a la especie de microalga, por ejemplo *S. platensis* prefiere una relación N:P (5-10) más baja comparada con *Scenedemus Obliquus* (20-50) [50] [45]. No obstante, nuestra investigación sugiere que bajo condiciones de estrés cuando falta una de las dos fuentes y la alta salinidad en el medio, se da un cambio metabólico en la célula para producir proteínas, es decir, cuando la cianobacteria se encuentra a altas concentraciones de nitrógeno, su asimilación es factible para *S. platensis*, en cambio

cuando está es baja, requiere de la fuente de fósforo a niveles altos, con el fin de que se de modificación postraduccional de las enzimas asimiladoras del nitrógeno para lograr su asimilación [51].

Por otra parte, Vonshak *et al.* (1988 y 1996) [52] [40] y Rosales *et al.* (2005) [39], han explicado que el

aumento en el nivel de hidratos de carbono y proteínas refleja la necesidad de la osmorregulación intracelular con el fin de equilibrar la osmosis generada por el medio. La mayoría de los osmorreguladores se identifican como aminoácidos o carbohidratos. Adicionalmente, Rosales *et al*

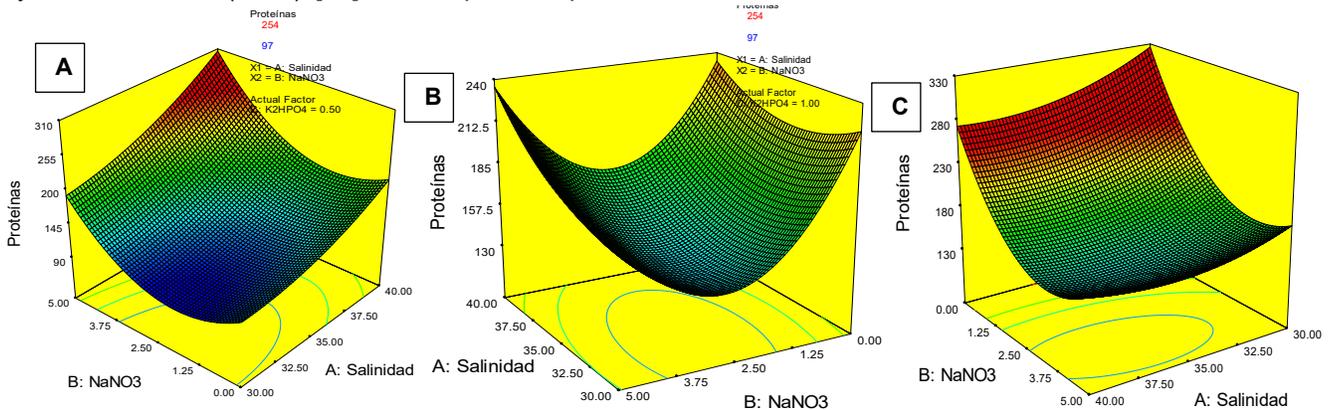


Figura 2. Superficie de respuesta para la optimización de la variable respuesta proteínas totales.

(2005), en su investigación, encontraron que los mayores valores de proteínas y carbohidratos se producían a 100‰ de salinidad para la cianobacteria *Synechococcus sp.* al igual que la cianofícea *Aphanothece sp.*

Ficocianina

La PC teóricamente alcanza cerca del 30% de la biomasa, pero su concentración en la célula depende de las condiciones de crecimiento, debido a que es un pigmento accesorio que captura la energía luminosa transfiriéndola a la clorofila a (Chl a), al igual que sirve como fuente de nitrógeno cuando la microalga se encuentra en deficiencia de este nutriente [21].

Mediante el análisis de varianza se determinó que las interacciones que influye en la producción de la PC (Tabla 6) pasado los 25 días de cultivo y mostrando un efecto significativo (*valor p*<0,05) fueron salinidad*K₂HPO₄ (*p*=0,0005) y NaNO₃*K₂HPO₄ (*p*=0,0121). La ecuación 4, establece el modelo cuadrático y representa que el modelo es significativo (*valor p*=0,0067 o un *valor F* de 3,19).

Tabla 6. Análisis ANOVA para la concentración de PC.

Factor	PC Valor <i>p</i> <0,05
A-Salinidad	0,8334
B-NaNO ₃	0,3262
C-K ₂ HPO ₄	0,1515
AB	0,7701
AC	0,0005
BC	0,0121
A ²	0,6530
B ²	0,0981
C ²	0,3707

Ec. 4

$$PC = 5,10 + 0,073*A + 0,35*B + 0,51*C - 0,12*A*B - 1,62*A*C + 1,13*B*C + 0,34*A^2 + 1,26*B^2 + 0,67*C^2$$

Donde

X: Biomasa *A*: Salinidad *B*: NaNO₃ *C*: K₂HPO₄

Según los datos arrojados en el DCC, para obtener una alta producción del pigmento azulado, se requieren concentraciones comprendidas entre 30g/L a 36g/L y valores mayores a 2,8g/L y 0,80g/L de salinidad, NaNO_3 y K_2HPO_4 respectivamente. La superficie de respuestas para la variable *PC* con el factor fosfato definido en 1g/L se muestra en la figura 3, evidenciando en color rojo la zona de mayor producción.

La *PC* hace parte de un grupo de proteínas antenas denominadas biliproteínas, las cuales tienen un papel importante en la fotosíntesis [33]. Su composición proteica se ve influenciada por la cantidad de nitrógeno y fósforo presente en el medio, como se explicó anteriormente. Es posible que debido a esto se requieran concentraciones mayores a 2,8g/L de NaNO_3 para alcanzar alta productividad, ya que, debido a su composición es consumida por la misma célula cuando se encuentra bajo limitaciones de nitrógeno [53]. Chen *et al.* (2013) mostró que el contenido máximo de *PC* normalmente aparece antes de que se dé una inanición de nitrógeno, mientras que disminuye dramáticamente después de que el nitrato se agota, también determinó que la fuente de nitrógeno desempeña un papel importante en el crecimiento de la cianobacteria, en la tasa de eliminación de CO_2 y en la productividad de *PC* [54]. Es por esto que la acumulación de *PC* dependerá de la concentración de nitrógeno. Además, el fósforo se requiere igualmente a valores por encima de los 0,80g/L según nuestro diseño para el mismo fin, debido a que se conoce que la fuente de fosfato es esencial para llevar a cabo las actividades metabólicas como la fotosíntesis y a su vez juega un papel importante en los procesos de señalización y de modificación postraduccional de las enzimas asimiladoras de nitrógeno [51].

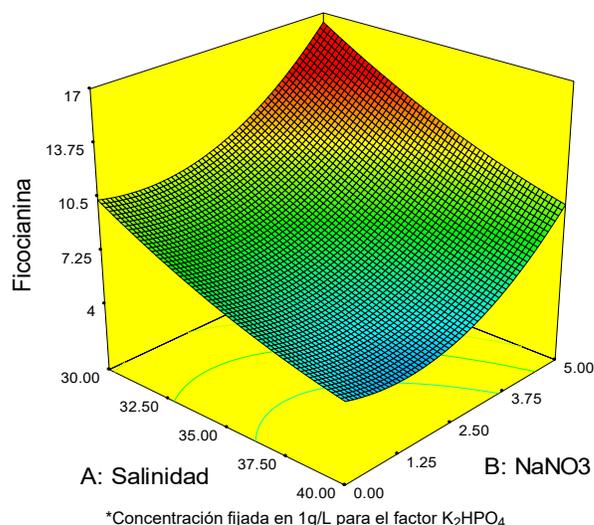


Figura 3. Superficie de respuesta para la optimización de la variable respuesta *PC*.

Nuestros resultados también sugieren que para alcanzar altas concentraciones de *PC* (15,29mg/L), se debe utilizar concentraciones entre 30 a 36g/L de salinidad, ya que se encontró que un aumento en este factor produciría una disminución en la variable.

En varias investigaciones (Ben Dhiab *et al.* 2007, Ravelonandro *et al.* 2011, Zhang *et al.* 2010) se habla que una concentración elevada de salinidad puede tener efectos sobre la fotosíntesis, particularmente en la modificación de los complejos colectores de energía, antenas o centros de reacción [40]. Estas modificaciones se producen específicamente en el PSII [42]. Sin embargo, se han obtenido resultados que demuestran que el aumento de la concentración salina mejora el crecimiento, la eficiencia fotosintética, la actividad fotosintética, la relación ficobilina/Chla y carotenoides/Cha en *S. platensis* [33]. Como se explica en el estudio de Zhang *et al.* (2010), quienes evaluaron el efecto del estrés salino en el transporte de electrones desde los ficobilisomas (*PBS*) hasta el PSII y PSI en *S. platensis*, determinando que la cianobacteria solo contiene dos ficobiliproteínas: aloficocianina (*APC*) y C-ficocianina (*CPC*) y la transferencia de energía hacia el PSII se da en la dirección: $\text{CPC} \rightarrow \text{APC} \rightarrow \text{núcleo PSII}$. Su investigación demostró que el estrés salino da lugar a una disminución en la transferencia de energía de

excitación de PBS a PSII, sin embargo se induce a su vez, un aumento en la actividad del PSI, concluyendo que un aumento en la actividad del PSI en las células adaptadas a la sal puede proteger el PSII [56].

Exopolisacáridos

Al realizar el análisis estadístico para los EPS, los supuestos de verificación no se cumplieron: normalidad (*valor* $p < 2,34e^{-05}$), homocedasticidad (*valor* $p = 2,2e^{-16}$) e independencia (*valor* $p = 0,0065$). Dado esto, se optó por realizar un análisis no paramétrico de los datos con el test de Kruskal-Wallis en el Software Statgraphics Centurion XVI Versión 16.1.18 mediante el análisis de cada factor respecto a la variable EPS de forma independiente.

Se encontró que hay diferencias significativas ($p = 0,0099$) para el factor fosfato evaluado entre los niveles determinados (0, 0,15, 0,5, 0,85 y 1g/L) (Tabla 7) (Figura 4), sin embargo no se puede estimar con certeza cuales son las diferencias entre los niveles, ya que se puede ver influenciado no solo por el factor analizado sino también por las concentraciones de los otros dos factores, puesto que no fueron evaluados a los mismos valores.

Tabla 7. Análisis No paramétrico para la concentración de EPS.

Factor	EPS Valor $p < 0,05$
A-Salinidad	0,4361
B-NaNO ₃	0,2784
C-K ₂ HPO ₄	0,0099

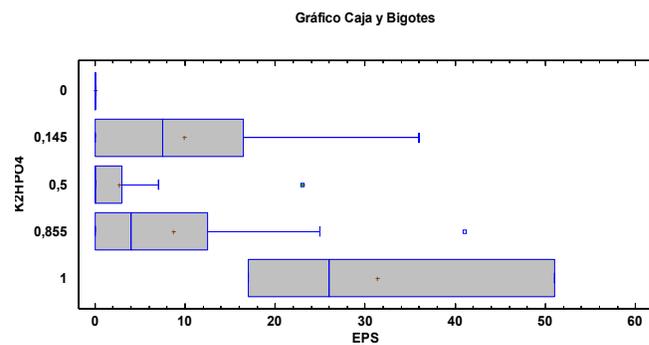
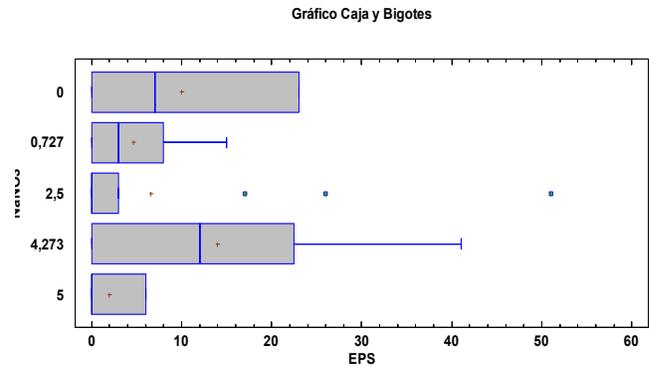
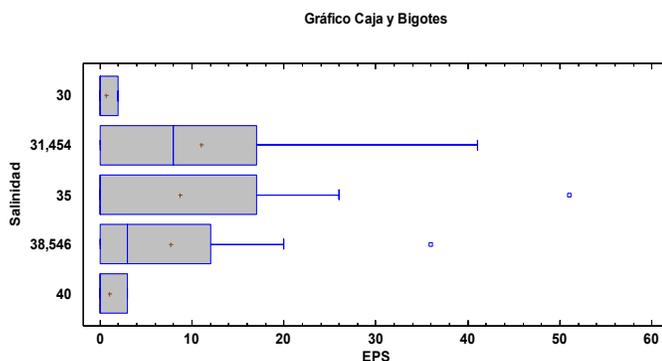


Figura 4. Gráficos de cajas y bigotes para la variable respuesta EPS con los tres factores evaluados.

En la figura 4, se evidencia para los factores salinidad y NaNO₃ un solapamiento de las medias, en cambio para el fosfato, se observa que a valores de 1g/L de K₂HPO₄ se da una mayor producción de polisacáridos. Con este trabajo se sugiere que la concentración de fosfato juega un papel en la producción de las EPS, sin embargo no se logró determinar un óptimo de producción. Es de aclarar, que pocas investigaciones se han realizado sobre los parámetros de cultivo y la elección de cepas para la producción de EPS. Sin embargo, han comenzado a adquirir atención debido a su capacidad biológica (antibacterianos, anticoagulante, antimutagénico, radioprotector, antioxidante, antiulceroso, anticancerígenos y antiinflamatorios) [57].

Las microalgas pueden excretar grandes cantidades de polisacáridos que representan una suma considerable de carbono orgánico, los cuales oscilan entre 0,5g/L hasta 20g/L pero muy pocos autores han investigado su producción [58]. Mishra

y Jha en el 2009, evaluaron los polímeros extracelulares producidos por *Dunaliella salina*, los cuales aumentaron con la concentración de NaCl en el medio de cultivo, alcanzando concentraciones de 944mg/L a 5M y 56mg/L a 0,5M de NaCl [59]. En nuestro trabajo alcanzamos concentraciones de 31mg/L de polisacáridos bajo las concentraciones de 35g/L, 2,5g/L y 1g/L de salinidad, NaNO₃ y K₂HPO₄ respectivamente.

Los polisacáridos excretados al medio se dan a menudo en medios con altos contenidos de sales, siendo una respuesta protectora de las células, para reducir la difusión y deshidratación, a su vez sirven como sumideros de energía y de carbono que responden a condiciones de estrés fisiológico [57]. Todavía es necesario más estudio para comprender los papeles precisos que desempeñan los EPS y las aplicaciones potenciales a nivel industrial.

Parámetros cinéticos

En la tabla 8 se observa un resumen de los tratamientos evaluados en el DCC junto con los valores reales y codificados, adicionalmente se encuentra las μ_{max} para cada tratamiento y los rendimientos para las variables respuestas.

La velocidad específica máxima de crecimiento (μ_{max}) se calculó con el modelo de Monod usando las relaciones lineales de Eadie-Hofstee y Langmuir según aplicó en cada caso. Se tomaron los valores de biomasa en la fase exponencial y como reactivo limitante los datos del nitrato consumido, los cuales se determinaron mediante espectrofotometría UV.

En este trabajo se alcanzó valores de μ_{max} que variaban entre 0,0005d⁻¹ a concentraciones de 30g/L salinidad, 2,5g/L NaNO₃ y 0,5g/L K₂HPO₄, hasta 0,0300d⁻¹ bajo 38,5g/L, 0,73g/L y 0,15g/L de salinidad, NaNO₃ y K₂HPO₄ respectivamente. Con el control MZM se alcanzó una μ_{max} de 0,0054d⁻¹. Para el tratamiento 11 del DCC y el control AMT no se determinó la μ_{max} , ya que no se adicionó fuente de nitrógeno; a pesar de esto, al tiempo cero se encontró una concentración de nitrato de 368mg/L y 519mg/L para el tratamiento 11 y AMT respectivamente, pudiéndose concluir que provenían del inóculo, que contenía una carga de

nitratos previa. Finalmente, estos resultados nos indican que la μ_{max} se ve afectada por los factores evaluados.

Generalmente muchos estudios experimentales de microalgas, se han reportado con el uso de modelos convencionales como Monod y Droop, considerando la tasa específica de crecimiento en función de factores ambientales como temperatura, luz, nivel de pH y nutrientes como CO₂, nitrógeno, fósforo o potasio. Para el crecimiento de las microalgas es necesarias cantidades específicas de estos factores, ya que cantidades extremas de cualquier de estos factores limitantes pueden resultar en un bajo crecimiento celular [60].

En el 2011 Ravelonandro *et al.* en su trabajo encontró que para la cepa *S. platensis*, sometida a diferentes concentraciones salinas, la μ_{max} variaba de 0,242d⁻¹ a 0,182d⁻¹ con 13g/L y 35g/L de salinidad y 1,6g/L y 0,9g/L de concentración celular respectivamente [42]. García en el 2013 realizó la valoración de varias especies con el fin de determinar la μ_{max} , permitiéndole una estimación de la tasa de fijación de CO₂. Encontró que la cianobacteria *Spirulina* alcanza una μ_{max} de 0,08d⁻¹ y una capacidad de captura de CO₂ de 0,7g/L.d, alcanzando una concentración celular de 2,9±0,01g/L, siendo esta microalga, junto con la *Chlorella vulgaris* las que presentaron mayor μ_{max} y fijación de CO₂ [61]. En el mismo año Chen *et al.* utilizaron los modelos de Monod y Haldane con el fin de ajustar la μ_{max} a diferentes intensidades de luz. Obteniendo una μ_{max} de 1,83d⁻¹ y 4,31d⁻¹ con el modelo de Monod y Haldane respectivamente. Sin embargo los datos tuvieron un mejor ajuste con el último modelo [54].

Para determinar el factor de conversión del nitrógeno celular para cada uno de los tratamientos, se empleó la ecuación 5, la cual ha sido utilizada por diferentes autores para hallar el rendimiento de biomasa respecto al nitrógeno ($Y_{X/N}$) [62]. Los resultados son mostrados en la tabla 9.

Ec. 5

$$Y \frac{X}{N} = \frac{(X_m - X_i) \cdot V}{N_t}$$

Dónde:

$Y \frac{X}{N}$ = factor de conversión del nitrógeno celular (g/g)

X_m = máxima concentración celular obtenida (g/L)

X_i = concentración celular inicial (g/L)

N_t = cantidad total de nitrógeno añadido con el procedente del inoculo (g)

V = Volumen del cultivo (L)

Se presentaron los mayores factores de conversión de nitrógeno celular con los tratamientos que contenían 0,73g/L y 2,5g/L de NaNO_3 , esto se puede deber a que a baja concentración de nitrato, logra una mejor conversión a biomasa que los tratamientos con 4,3g/L y 5g/L de NaNO_3 , los cuales pueden tardar más tiempo e incluso no son

asimilados por completo quedando trazas en el medio de cultivo.

La asimilación del nitrógeno (tanto del NO_3 como el NH_4) por las microalgas es un proceso que está relacionado con el metabolismo del carbono, tanto en cultivos autotróficos como heterotróficos, debido a que el 55% del carbono asimilado está comprometido para la asimilación y metabolismo del nitrógeno. Según Huppe & Turpin, la variación en la concentración de carbono y nitrógeno pueden hacer más productiva a la microalga [47]

Se determinaron los rendimientos de proteínas ($Y_{P/X}$), PC ($Y_{PC/X}$) y EPS ($Y_{EPS/X}$), según el punto máximo de producción del metabolito en la cinética

Tabla 8. Resumen de datos para el DCC, μ_{max} y rendimientos específicos para las variables respuestas.

TRATAMIENTO	SALINIDAD		NaNO_3		K_2HPO_4		μ_{max} (d^{-1})	$Y_{X/N}$ (g/g)	$Y_{P/X}$ (g/g)	$Y_{PC/X}$ (g/g)	$Y_{EPS/X}$ (g/g)	
	Código	Real	Código	Real	Código	Real						
Factorial	1	1	38,5	1	4,3	-1	0,15	0,0047	0,56	0,107	0,008	0,012
	2	1	38,5	-1	0,7	1	0,85	0,0220	1,81	0,107	0,008	0,002
	3	-1	31,5	1	4,3	1	0,85	0,0031	0,55	0,124	0,005	0,014
	4	-1	31,5	-1	0,7	-1	0,15	0,0182	1,77	0,063	0,013	0,008
	5	1	38,5	-1	0,7	-1	0,15	0,0300	2,14	0,091	0,010	0,020
	6	-1	31,5	1	4,3	-1	0,15	0,0203	0,48	0,099	0,013	0,012
	7	-1	31,5	-1	0,7	1	0,85	0,0153	1,53	0,138	0,010	0,029
	8	1	38,5	1	4,3	1	0,85	0,0035	0,64	0,066	0,006	0,007
Axial	9	-1,41	30,0	0	2,5	0	0,50	0,0005	0,68	0,106	0,006	0,001
	10	1,41	40,0	0	2,5	0	0,50	0,0029	0,88	0,091	0,005	0,008
	11	0	35,0	-1,41	0	0	0,50	N/A	N/A	0,128	0,004	0,016
	12	0	35,0	1,41	5,0	0	0,50	0,0022	0,49	0,101	0,005	0,034
	13	0	35,0	0	2,5	-1,41	0	0,0016	0,65	0,109	0,007	0
	14	0	35,0	0	2,5	1,41	1	0,0031	0,77	0,104	0,005	0,018
Punto Central	15	0	35,0	0	2,5	0	0,50	0,0047	0,96	0,070	0,005	0
Control	MZM	1		2,5		0,50		0,0054	0,58	0,240	0,005	0,007
	AMT	34,5		N/A		N/A		N/A	N/A	0,059	0,002	0,002

*N/A No aplica *Los datos reales para los factores se encuentran en g/L

y respecto a la concentración celular del día de producción máxima. Se encontró que el control *MZM* tuvo el $Y_{P/X}$ (0,240g/g) más alto, lo contrario sucedió con el control *AMT* (0,059g/g) siendo el más bajo, en cuanto a los tratamientos evaluados en el DCC, estos variaron entre 0,070 a 0,128g/g. Los $Y_{PC/X}$ se dieron entre valores cercanos que oscilaban de 0,004g/g a 0,013g/g y los $Y_{EPS/X}$ de 0g/g a 0,034g/g, esto nos sugiere que es posible que los rendimientos respecto a la biomasa como hemos visto a lo largo de este documento si se ven afectados por las concentraciones salinas y las fuentes de nitrógeno y fósforo.

En la figura 5 se muestra una comparación entre el tratamiento 2 y 5, respecto a las cinéticas de crecimiento para los controles *MZM* y *AMT*. Se tomaron estos tratamientos, ya que sus valores fueron altos respecto a los demás tratamientos, en μ_{max} (0,022d⁻¹ y 0,030d⁻¹) y $Y_{N/X}$ (1,81g/g y 2,14g/L), y presentaron producciones de biomasa de 2197mg/L y 2055mg/L, proteínas 203mg/L y 159mg/L, *PC* 4mg/L y 10mg/L y *EPS* 3mg/L y 1mg/L para el tratamiento 2 y 5 respectivamente. Adicionalmente en la tabla 9 se muestra que son medios que presentan un bajo costo (0,19 y 0,14US) en comparación al control *MZM* (0,74US).

Se observa que las cinéticas para los tratamientos 2 y 5 y el control *ATM* presentan un comportamiento similar, con la diferencia de que los tratamientos 2 y 5 tienen una concentración celular mayor durante los días 1 y 18, ya que al día 25 el control *ATM* alcanza una alta concentración celular (2400mg/L). Para las cuatro cinéticas no se evidencia una fase de adaptación, esto se puede deber a que el inóculo provenía de un cultivo líquido bajo las mismas condiciones. En los tratamientos 2 y 5 se evidencia que al alcanzar los 18 días de cultivo inicia la fase estacionaria donde no se da un cambio en el crecimiento celular, caracterizándose por el valor constante del número de células ya que la tasa de crecimiento se iguala con la tasa de muerte debido al agotamiento de nutrientes o acumulación de productos tóxicos en el medio de cultivo. Para el control *MZM* se evidencia una fase exponencial definida desde el día 1 al 25, alcanzando una concentración celular de 1630mg/L, aunque

presentó la concentración de biomasa más baja en comparación a los otros tratamientos, este alcanza producciones de proteínas (319mg/L), *PC* (7mg/L) y *EPS* (9mg/L) altas. Esto nos indica la capacidad de la cepa *S. platensis* a la adaptación a altas concentraciones salinas y a medios con limitaciones de nutrientes.

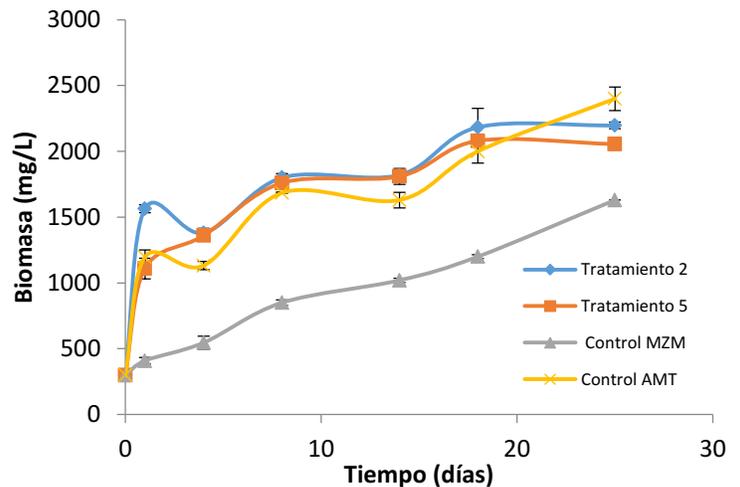


Figura 5. Cinética de crecimiento para los tratamiento 2 y 5 y los controles *MZM* y *AMT*.

Concentraciones óptimas

Con el fin de obtener un medio de cultivo optimizado para las variables respuestas, se definió un máximo para la producción de biomasa, ya que es uno de los parámetros más importante a la hora de producir a gran escala un cultivo de microalgas, debido a que nos indicaría el consumo de CO₂ en caso de utilizarse como estrategia para la mitigación de gases de efecto invernadero; los metabolitos proteínas y *PC* se definieron en el rango, es decir sin especificar valores, finalmente no se tomó en cuenta las *EPS*, pues no cumplía con los supuestos de verificación.

El programa arroja un total de 14 posibles soluciones para la optimización, para la elección del medio óptimo, se tuvo presente que la concentración de nitrato al igual que la de fosfato fuera la más baja, pues es uno de los factores principales de encarecer el proceso de producción de biomasa. También que la producción de metabolitos fuera alta al igual que la desabilidad.

0
 1 = A: Salinidad
 2 = B: NaNO₃
 Actual Factor
 C: K₂HPO₄ = 0,58

El medio elegido esta compuesto por 36,6g/L de salinidad, 3,4g/L de NaNO₃ y 0,58g/L K₂HPO₄, el cual produce teoricamente 2645mg/L de biomasa, 147mg/L de proteínas y 5,8mg/L de PC (figura 6) .

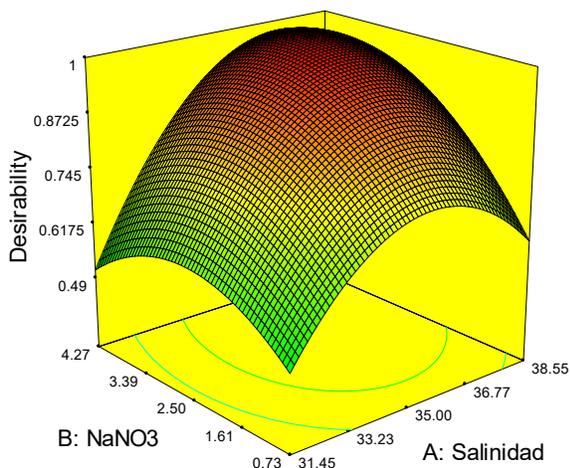


Figura 6. Superficie de respuesta para las concentraciones óptimas de producción de biomasa, proteínas y PC.

Costo por unidad de masa

En la tabla 9, se evidencia el costo por unidad de masa para los diferentes tratamientos, no se tuvieron en cuenta los costos fijos de producción, pues estos son los mismos para todos los ensayo. Los precios de reactivos fueron tomados de la base de datos del proyecto “Captura de CO₂ con microalgas” al años 2016.

El aumento en el valor del medio de cultivo esta dado principalmente por la fuente de nitrógeno, para el caso de los tratamientos del DCC los valores oscilan entre 1,84US/L de medio (tratamiento 12) que contenía 5g/L de NaNO₃ a 0,10US/L de medio (tratamiento 11) que no tenía adición de fuente de nitrógeno. Para el control *MZM* el costo por litro es de 1,19US, teniendo presente que este medio está compuesto por 8 sales. Con esta comparación lo que se busca es encontrar un medio económico para la producción de la cianobacteria *S. platensis* que a su vez tenga altos rendimientos en la producción de biomasa y metabolitos.

Finalmente, se encontró una reducción del 75% en los costos por unidad de masa para el tratamiento 2 respecto al control *MZM*, indicándonos que es una buena estrategia el usos de medios salinos con adición de dos sales, la fuente de nitrógeno y la fuente de fósforo, a la hora de reducir costos de producción.

Tabla 9. Costos por unidad de masa para los tratamientos evaluados

Tratamiento	Costos por unidad de masa (US\$/g)
1	0,65
2	0,19
3	0,73
4	0,13
5	0,14
6	0,86
7	0,22
8	0,67
9	0,54
10	0,44
11	0,04
12	0,82
13	0,55
14	0,51
15	0,40
<i>MZM</i>	0,74
<i>AMT</i>	0

III. CONCLUSIONES

- Las muestras analizadas a pesar de contener los mismos elementos químicos, su concentración pueden varían según la región donde son tomadas. Sugiriéndose que el análisis elemental es un parámetro a tener en cuenta a la hora de realizar futuros

ensayos, pues la variación en las concentraciones de los elementos químicos puede intervenir en el crecimiento y desarrollo de la cianobacteria.

- Los factores salinidad, nitrato de sodio y fosfatos dipotásico tienen influencia sobre las variables respuestas biomasa, proteínas y ficocianina.
- Se determinó que el fósforo en condiciones extremas tiene una influencia negativa en la generación de biomasa.
- Es posible que las proteínas jueguen un papel fundamental en la osmorregulación de la célula, al igual que los polisacáridos.
- La ficocianina se vio afectada por las bajas concentraciones de nitrógeno debido a su composición proteica.
- Se concluye que las altas concentraciones salinas pueden tener cambios en el metabolismo de la cianobacteria *S. platensis*.
- Se logró demostrar que la cianobacteria presentan una capacidad de crecer tanto en medios salinos (agua de mar 30g/L a 40g/L) como en no salinos (*MZM*).
- Para el rendimiento de biomasa respecto al nitrógeno, es posible que las bajas concentraciones de nitrógeno logren una conversión más rápida respecto a las altas concentraciones, mostrando un mayor rendimiento en los tratamientos con 0,7g/L de NaNO_3 .
- El mayor rendimiento para la concentración de proteínas respecto a biomasa se dio para el control *MZM*, esto se puede deber a que este medio está diseñado para producción de metabolitos de interés como son las proteínas.

- Las cinéticas de crecimiento para los medios del DCC (tratamiento 2 y 5) y el agua de mar tuvieron un comportamiento similar, esto se pudo deber a la adaptación que tuvo la cepa a los medios salinos.
- Se encontró que los costos del medio de cultivo están asociados principalmente a la fuente de nitrógeno y que la utilización del agua de mar es una de las alternativas, no solo por la reducción de costos (75%), sino también en la disminución del uso de agua dulce.
- Finalmente, esta investigación nos lleva a pensar que existe la posibilidad de usar gases chimenea como fuente de carbono, ya que se evidencia un buen crecimiento bajo la inyección del 7% de CO_2 .

IV. RECOMENDACIONES

Se recomienda verificar las condiciones óptimas encontradas en el análisis del DCC, posteriormente a la verificación se sugiere escalar el proceso a FBR de 20L en condiciones naturales para su evaluación.

Se invita a seguir profundizando en la producción de *EPS* pues muestran un amplio interés que aún no se ha explotado a nivel industrial.

V. AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue apoyado principalmente por el proyecto CERN y cofinanciado por la empresa Cementos ARGOS S.A. y la Universidad EAFIT, Medellín-Colombia.

VI. REFERENCIAS

- [1] A. Parmar, N. K. Singh, A. Pandey, E. Gnansounou, and D. Madamwar, "Cyanobacteria and microalgae: a positive prospect for biofuels.," *Bioresour. Technol.*, vol. 102, no. 22, pp. 10163–72, Nov. 2011.
- [2] M. Coca, V. M. Barrocal, S. Lucas, G. González-Benito, and M. T. García-Cubero, "Protein production in *Spirulina platensis* biomass using beet vinasse-supplemented

culture media," *Food Bioprod. Process.*, vol. 94, no. April, pp. 1–7, 2014.

- [3] P. B. A. Dalle Zotte, A. Sartori, "Effect of dietary supplementation of Spirulina (*Arthrospira platensis*) and Thyme (*Thymus vulgaris*) on growth performance, apparent digestibility and health status of companion dwarf rabbits," *Livest. Sci.*, vol. 152, no. 2–3, pp. 182–191, 2013.
- [4] C. Streb, P. Richter, M. Ntefidou, M. Lebert, R. P. Sinha, and D. P. Häder, *Cyanobacterial responses to UV radiation*. 2004.
- [5] B. A. y et al. Lolymar Romero, Miguel Guevara, "Contenido de lípidos, ácidos grasos, exopolisacáridos y minerales de *Arthrospira maxima* cultivada en fotobiorreactores.," vol. 61, pp. 231–240, 2013.
- [6] Y. C. Seo, W. S. Choi, J. H. Park, J. O. Park, K.-H. Jung, and H. Y. Lee, "Stable Isolation of Phycocyanin from *Spirulina platensis* Associated with High-Pressure Extraction Process.," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 14, no. 1, pp. 1778–87, Jan. 2013.
- [7] V. Vasquez-villalobos, D. Vergaray, S. Suarez, A. Zamora, K. Gaspar, and X. Ecurra, "Proportional influence of sea water and bicarbonate on the production of *Spirulina sp.* biomass with light-emitting diode lighting," *Sci. Agropecu.*, vol. 5, pp. 199–209, 2014.
- [8] R. D. Andrade, R. Torres, and E. J. Montes, "OBTAINING OF FLOUR TO LEAVE OF THE CULTIVATION OF *Chlorella vulgaris* AND THEIR PROTEIN ANALYSIS," no. 4, pp. 50–57, 2006.
- [9] R. Wang, B. Peng, and K. Huang, "The research progress of CO₂ sequestration by algal bio-fertilizer in China," *J. CO₂ Util.*, vol. 11, pp. 67–70, 2014.
- [10] B. A. Whitton, "Ecology of cyanobacteria II: Their diversity in space and time," *Ecol. Cyanobacteria II Their Divers. Sp. Time*, vol. 9789400738, pp. 1–760, 2012.
- [11] A. Concas, M. Pisu, and G. Cao, "Novel simulation model of the solar collector of BIOCOIL photobioreactors for CO₂ sequestration with microalgae," *Chem. Eng. J.*, vol. 157, pp. 297–303, 2010.
- [12] S.-H. Ho, C.-Y. Chen, D.-J. Lee, and J.-S. Chang, "Perspectives on microalgal CO₂ - emission mitigation systems--a review.," *Biotechnol. Adv.*, vol. 29, no. 2, pp. 189–98, 2011.
- [13] O. Faucher, B. Coupal, and a Leduy, "Utilization of seawater-urea as a culture medium for *Spirulina maxima*.,," *Can. J. Microbiol.*, vol. 25, no. 6, pp. 752–9, 1979.
- [14] M. Abu Affan, D.-W. Lee, S.-M. Jeon, J.-H. Noh, and Heo, "Bituminous coal and sodium hydroxide-pretreated seawater stimulates *Spirulina (Arthrospira) maxima* growth with decreased production costs," *Aquaculture*, vol. 436, pp. 121–126, Jan. 2015.
- [15] NACIONES UNIDAS, "El Crecimiento Insostenible Y La Creciente Demanda Mundial De Agua," *Wwdr*, p. 12, 2015.
- [16] Y. Chisti, "Biodiesel from microalgae," *Trends Biotechnol.*, vol. 26, no. 3, pp. 126–131, 2007.
- [17] J. Devanathan and N. Ramanathan, "Utilization of seawater as a medium for mass production of *Spirulina platensis*---A novel approach," *Int. J. Recent Sci. Res.*, vol. 4, pp. 597–602, 2013.
- [18] R. Materassi, M. Tredici, and W. Balloni, "Spirulina culture in sea-water," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 19, no. 6, pp. 384–386, 1984.
- [19] et al. Noel Acacio, "β -caroteno y glicerol a partir de la microalga *Dunaliella sp.* en la salina Las Cumaraguas," vol. XXV, pp. 214–228, 2013.
- [20] E. S. Alvarez, "Producción y desarrollo de cultivo de algas para la captación de anhídrido carbonico y la producción de biocombustibles," 2013.
- [21] Lamela Teresa, "Phycocyanin production in seawater culture of *arthrospira maxima*," 2000.
- [22] J. T. Mary Leema, R. Kirubakaran, N. V. Vinithkumar, P. S. Dheenan, and S.

- Karthikayulu, "High value pigment production from *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* cultured in seawater," *Bioresour. Technol.*, vol. 101, no. 23, pp. 9221–9227, 2010.
- [23] A. Richmond, *Handbook of microalgal culture biotechnology and applied phycology*. 2004.
- [24] M. Abu Affan, D.-W. Lee, S.-M. Jeon, J.-H. Noh, and Heo, "Bituminous coal and sodium hydroxide-pretreated seawater stimulates *Spirulina* (*Arthrospira*) *maxima* growth with decreased production costs," *Aquaculture*, vol. 436, pp. 121–126, 2015.
- [25] INVERMAR, "Manual de técnicas analíticas para la determinación de parámetros fisicoquímicos y contaminantes marinos (aguas, sedimentos y organismos)," *Man. Técnicas Analíticas para la Determ. Parámetros Fis. y Contam. Mar.*, p. 148, 2003.
- [26] D. V. Bertha Olivia Arredondo Vega, Beatriz Cordero Esquivel, "Determinación de proteínas por métodos espectrofotométricos," 2014.
- [27] R. Duangsee, N. Phoopat, and S. Ningsanond, "Phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* and extract stability under various pH and temperature," vol. 2, no. 04, pp. 819–826, 2009.
- [28] R. Bermejo and A. Ramos, "Pilot Scale Recovery of Phycocyanin from *Spirulina platensis* Using Expanded Bed Adsorption Chromatography," *Chromatographia*, vol. 75, no. 5–6, pp. 195–204, Feb. 2012.
- [29] C. C. Moraes, L. Sala, G. P. Cerveira, and S. J. Kalil, "C-Phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* wet biomass," vol. 28, no. 01, pp. 45–49, 2011.
- [30] S. T. Silveira, L. K. D. M. Quines, C. A. V. Burkert, and S. J. Kalil, "Separation of phycocyanin from *Spirulina platensis* using ion exchange chromatography.," *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 31, pp. 477–82, 2008.
- [31] G. Martelli, C. Folli, L. Visai, M. Daglia, and D. Ferrari, "Thermal stability improvement of blue colorant C-Phycocyanin from *Spirulina platensis* for food industry applications," *Process Biochem.*, vol. 49, no. 1, pp. 154–159, 2014.
- [32] J. Marín-Prida, A. Llópiz-Arzuaga, N. Pavón, G. Pentón-Rol, and G. L. Pardo-Andreu, "Aplicaciones de la C-Ficocianina: Métodos de obtención y propiedades farmacológicas/ Applications of C-Phycocyanin: Methods of purification and pharmacological properties," *Rev. Ciencias Farm. y Aliment.*, vol. 1, no. 1, pp. 29–43, 2015.
- [33] L. M. Rivas, "Purificación y estudio de la estabilidad termodinámica de la proteína antena ficocianina," 2012.
- [34] M. DuBois, K. a. Gilles, J. K. Hamilton, P. a. Rebers, and F. Smith, "Colorimetric method for determination of sugars and related substances," *Anal. Chem.*, vol. 28, pp. 350–356, 1956.
- [35] R. Chester and T. Jickells, "Marine Geochemistry," in *Marine Geochemistry*, 2012, pp. 127 – 129.
- [36] R. Chester and T. Jickells, "Marine Geochemistry," in *Marine Geochemistry*, 2012, pp. 163 – 165.
- [37] I. P. O. climate Change, "CAMBIO CLIMÁTICO 2014 IPCC," 2014.
- [38] R. Ben Dhiab, H. Ben Ouada, H. Boussetta, F. Franck, A. Elabed, and M. Brouers, "Growth, fluorescence, photosynthetic O₂ production and pigment content of salt adapted cultures of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*," *J. Appl. Phycol.*, vol. 19, no. 4, pp. 293–301, 2007.
- [39] R. Rosales, Nestor; Ortega, Jose; Mora, "Influence of salinity on the growth and biochemical composition of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. Néstor," vol. 31, pp. 349–355, 2005.
- [40] A. Vonshak, N. Kancharaksa, B. Bunnag, and M. Tanticharoen, "Role of light and photosynthesis on the acclimation process of the cyanobacterium *Spirulina platensis* to salinity stress," *J. Appl. Phycol.*, vol. 8, no. 2, pp. 119–124, 1996.
- [41] M. Shabani, M. H. Sayadi, and M. R. Rezaei, "response to different levels of salinity and CO₂," vol. 6, no. 2, pp. 53–61, 2016.

- [42] P. H. Ravelonandro, D. H. Ratianarivo, C. Joannis-Cassan, A. Isambert, and M. Raherimandimby, "Improvement of the growth of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* from Toliara (Madagascar): Effect of agitation, salinity and CO₂ addition," *Food Bioprod. Process.*, vol. 89, no. November 2009, pp. 209–216, 2011.
- [43] C. E. N. Sassano, L. a. Gioielli, K. a. Almeida, S. Sato, P. Perego, a. Converti, and J. C. M. Carvalho, "Cultivation of *Spirulina platensis* by continuous process using ammonium chloride as nitrogen source," *Biomass and Bioenergy*, vol. 31, no. November 2015, pp. 593–598, 2007.
- [44] a. K. Tambiev, S. G. Vasilieva, and a. a. Lukyanov, "Manifestation of salt tolerance of *Spirulina platensis* and *Spirulina maxima* cyanobacteria of the genus *Arthrospira* (*Spirulina*)," *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.*, vol. 66, no. 4, pp. 133–137, 2011.
- [45] A. Çelekli, M. Yavuzatmaca, and H. Bozkurt, "Modeling of biomass production by *Spirulina platensis* as function of phosphate concentrations and pH regimes," *Bioresource Technology*, vol. 100, no. 14. pp. 3625–3629, 2009.
- [46] G. Markou, I. Chatzipavlidis, and D. Georgakakis, "Effects of phosphorus concentration and light intensity on the biomass composition of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*," *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 28, no. 8, pp. 2661–2670, 2012.
- [47] B. C. Duran Estephany, Barajas Andres, Gonzáles Angel, "Influencia de la relacion carbono/nitrogeno en la producción de proteínas totales en *Chlorella vulgaris* UTEX 1803.," pp. 49–58, 2011.
- [48] A. C. Orrego, "Evaluación del crecimiento celular de cuatro especies de microalgas en fotobiorreactores de 20 L bajo diferentes velocidades de aire y concentración de CO₂," 2014.
- [49] L. Xin, H. Hong-ying, G. Ke, and S. Ying-xue, "Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp.," *Bioresour. Technol.*, vol. 101, no. 14, pp. 5494–5500, 2010.
- [50] N. . BULGAKOV and A. . LEVICH, "The nitrogen: Phosphorus ratio as a factor regulating phytoplankton community structure: Nutrient ratios," *Arch. für Hydrobiol.*, vol. 146, no. 0003–9136, pp. 3–22, 1999.
- [51] D. P. Singh and N. Singh, "Calcium and phosphate regulation of nitrogen metabolism in the cyanobacterium *Spirulina platensis* under the high light stress.," *Curr. Microbiol.*, vol. 41, pp. 368–373, 2000.
- [52] A. Vonshak, R. Guy, and M. Guy, "The response of the filamentous cyanobacterium *Spirulina platensis* to salt stress," *Arch. Microbiol.*, vol. 150, no. 5, pp. 417–420, 1988.
- [53] E. R. Ortega, *Obtención y purificación de ficoeritrina mediante cromatografía de absorción en lecho expandido. Escalado del proceso, caracterización fisicoquímica y aplicación como colorante natural.* 2012.
- [54] C. Y. Chen, P. C. Kao, C. J. Tsai, D. J. Lee, and J. S. Chang, "Engineering strategies for simultaneous enhancement of C-phycoyanin production and CO₂ fixation with *Spirulina platensis*," *Bioresour. Technol.*, vol. 145, pp. 307–312, 2013.
- [55] A. Vonshak, N. Kancharaksa, B. Bunnag, and M. Tanticharoen, "Role of light and photosynthesis on the acclimation process of the cyanobacterium *Spirulina platensis* to salinity stress," *J. Appl. Phycol.*, vol. 8, no. 2, pp. 119–124, 1996.
- [56] T. Zhang, H. Gong, X. Wen, and C. Lu, "Salt stress induces a decrease in excitation energy transfer from phycobilisomes to photosystem II but an increase to photosystem I in the cyanobacterium *Spirulina platensis*," *J. Plant Physiol.*, vol. 167, no. 12, pp. 951–958, 2010.
- [57] R. Xiao and Y. Zheng, "Overview of microalgal extracellular polymeric substances (EPS) and their applications," *Biotechnol. Adv.*, vol. 34, no. 7, pp. 1225–1244, 2016.
- [58] C. Delattre, G. Pierre, C. Laroche, and P.

Michaud, "Production, extraction and characterization of microalgal and cyanobacterial exopolysaccharides," *Biotechnol. Adv.*, vol. 34, no. 7, pp. 1159–1179, 2016.

- [59] A. Mishra and B. Jha, "Isolation and characterization of extracellular polymeric substances from micro-algae *Dunaliella salina* under salt stress," *Bioresour. Technol.*, vol. 100, no. 13, pp. 3382–3386, 2009.
- [60] A. Goli, A. Shamiri, A. Talaiekhosani, N. Eshtiaghi, N. Aghamohammadi, and M. K. Aroua, "An overview of biological processes and their potential for CO₂ capture," *Journal of Environmental Management*, vol. 183, pp. 41–58, 2016.
- [61] G. C. Rafael, "PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS RICA EN CARBOHIDRATOS ACOPLADA A LA ELIMINACIÓN FOTOSINTÉTICA DE CO₂," 2013.
- [62] E. D. Godoy Danesi, C. Oliveira Rangel-Yagui, S. Sato, and J. C. Monteiro de Carvalho, "Growth and content of spirulina platensis biomass chlorophyll cultivated at different values of light intensity and temperature using different nitrogen sources.," *Braz. J. Microbiol.*, vol. 42, pp. 362–73, 2011.