



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

Evaluación del crecimiento y la actividad
metabólica de *Arthrospira maxima* cultivada
en diferentes concentraciones de NaHCO_3 ,
 NaNO_3 , NH_4Cl , K_2HPO_4 y NaCl

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

HUGO FRUTERO MARTÍNEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. HUGO VIRGILIO PERALES VELA



TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme realizar mis estudios de licenciatura y lograr un paso importante en mi vida profesional. Así como a cada uno de los académicos que conforman la carrera de biología, ya que sin su apoyo, conocimientos y paciencia no sería posible formar buenos profesionistas en esta carrera tan bonita.

Al laboratorio de Bioquímica de la Unidad de Morfología y Función (UMF) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala UNAM, donde se llevó a cabo, el presente proyecto de investigación.

Al Dr. Hugo Virgilio Perales Vela por permitirse su tiempo y esfuerzo en ser mi asesor de este proyecto de tesis, es para mí un gran honor haber trabajado bajo su tutoría, su enseñanza es invaluable, la cual me ha permitido plantearme metas más grandes, gracias por sus consejos y por su amistad.

A la Dra. Martha Ofelia Salcedo Álvarez por su enorme dedicación como docente, siempre apoyando y dándonos consejos a todos los que tuvimos la oportunidad de ser sus alumnos.

A los profesores: a la M. en C. Josefina Vázquez, a la M. en C. Marisol A., al Dr. Alfonso Lugo, a la M. en C. Gloria G. y a la M. en C. María Guadalupe O. Muchísimas gracias por su enorme dedicación como docentes y por su gran amistad.

Al comité de revisión de este proyecto de tesis: al Dr. Hugo Perales, a la Dra. Martha Salcedo, a la M. en C. Gloria Garduño, a la Dra. Lucía Pavón y al Biól. Omar Angeles.

A mis grandes amigos y colegas, por todas esas experiencias dentro y fuera de la universidad: José Luis, Arturo, Marcos Yair, Damián, Fabiola, Michelle, Aarón, Liz, Hazete y Sarahí.

A Dianita Tapia, por todo su apoyo que me ha dado de seguir adelante con la culminación de este trabajo, por escucharme y darme buenos consejos cuando más lo necesitaba, pero sobre todo le agradezco por todo el cariño que me ha brindado.

Dedicatoria

A mis padres: Ana Bertha y Luis, por su gran cariño y apoyo incondicional que me han brindado en el transcurso de mi vida, que me ha llevado a alcanzar este logro; a quienes jamás encontrare la forma de agradecerles, siendo este triunfo más suyo que mío.

A mis hermanos: Monserrat y Miguel Ángel, por su cariño y por estar siempre pendiente de mis logros.

A mis tíos Ana, Román, Ángel, quienes siempre me mostraron un gran apoyo y motivación por perseguir mis metas. Y a todos mis primos: Román, Fernanda, Víctor, José Omar, Daniela, Uriel, Calos y Daniel.

ÍNDICE	Página
Resumen	7
1. Introducción	8
1.1 Historia del cultivo de <i>Arthrospira</i>	10
1.2 Características biológicas de <i>Arthrospira</i>	12
1.3 Taxonomía de <i>Arthrospira</i>	13
1.4 Distribución de <i>Arthrospira</i>	14
1.5 Ecología de <i>Arthrospira</i>	14
1.6 Importancia de <i>Arthrospira</i>	16
2. Antecedentes	17
2.1 Composición bioquímica	17
2.2 Pigmentos	19
2.2.1 Clorofila	19
2.2.2 Ficobiliproteínas	20
2.2.3 Carotenoides	21
2.3 Biotecnología de algas	21
2.4 Sistemas de cultivo de <i>Arthrospira</i>	22
2.5 Efecto de los nutrientes en el crecimiento	24
2.5.1 Carbono	25
2.5.2 Nitrógeno	25
2.5.3 Fósforo	26
2.5.4 Salinidad	27
2.6 Fotosíntesis en cianobacterias	28
3. Justificación	29
4. Hipótesis	30
5. Objetivo General	30
6. Objetivos Particulares	30
7. Materiales y métodos	31
7.1 Organismo	31
7.2 Condiciones de mantenimiento previo a la fase experimental	31
7.3 Protocolo experimental	32
7.4 Variables experimentales de respuesta	33
8. Resultados y Discusión	35
A. Obtención de curva de crecimiento	35
B. Efectos en la deficiencia de bicarbonato de sodio	36
C. Efectos en la deficiencia de nitrato de sodio	41
D. Efecto en las deficiencias de cloruro de amonio	46
E. Efecto de las deficiencias de fosfato de potasio	52
F. Efecto de las deficiencias de cloruro de sodio	56
G. Estimación de costos en el cultivo de <i>A. maxima</i>	61
9. Conclusiones	62
10. Bibliografía	65
11. Apéndice 1. Análisis de resultados mediante ANOVA con Tukey	75

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

	Página
Figura 1. Esquema de una célula de cianobacteria filamentosa.	12
Tabla 1. Composición bioquímica total de <i>Arthrospira sp.</i>	17
Tabla 2. Composición química total de algunos alimentos de la dieta del ser humano y diferentes microalgas	18
Figura 2. Esquema de la estructura general de las clorofilas.	19
Figura 3. (a): Esquema de un ficobilisoma y picos de absorción luminosa de chl a, PBP's y carotenoides.	20
Figura 4. Sistemas de cultivo.	23
Figura 5. Diagrama de la membrana fotosintética de una célula de cianobacteria mostrando los 5 supercomplejos de la CTE.	28
Figura 6. Cianobacteria <i>Arthrospira maxima</i> .	30
Figura 7. Unidad experimental, botella de vidrio redonda (Schott-Duran ®) con una trayectoria de luz de 11 cm y un volumen de trabajo de 900 ml.	31
Figura 8. Mediciones de las tasas fotosintéticas y respiratorias mediante un oxímetro (Oxygraph, Hansatech ®, U.K.).	34
Figura 9. Curva de crecimiento de <i>Arthrospira maxima</i> cultivo en lote.	35
Figura 10. Efecto de las concentraciones de NaHCO ₃ sobre el crecimiento volumétrico de <i>A. maxima</i> .	37
Figura 11. Efecto de las concentraciones de NaHCO ₃ sobre el crecimiento relativo de <i>A. maxima</i> .	37
Figura 12. Efecto de las concentraciones de NaHCO ₃ sobre la tasa de duplicación de <i>A. maxima</i> .	38
Figura 13. Efecto de las concentraciones de NaHCO ₃ sobre clorofila a específica de <i>A. maxima</i> .	39
Figura 14. Efecto de las concentraciones de NaHCO ₃ sobre la tasa fotosintética y respiratoria de <i>A. maxima</i> .	40
Figura 15. Efecto de las concentraciones de NaNO ₃ sobre el crecimiento volumétrico de <i>A. maxima</i> .	42
Figura 16. Efecto de las concentraciones de NaNO ₃ sobre el crecimiento relativo de <i>A. maxima</i> .	42
Figura 17. Efecto de las concentraciones de NaNO ₃ sobre la tasa de duplicación de <i>A. maxima</i> .	43
Figura 18. Efecto de las concentraciones de NaNO ₃ sobre clorofila a específica de <i>A. maxima</i> .	43
	44

Figura 19. Efecto de las concentraciones de NaNO_3 sobre la tasa fotosintética y respiratoria de <i>A. maxima</i> .	45
Figura 20. Efecto de las concentraciones de NH_4Cl sobre el crecimiento volumétrico de <i>A. maxima</i> .	48
Figura 21. Efecto de las concentraciones de NH_4Cl sobre el crecimiento relativo de <i>A. maxima</i> .	48
Figura 22. Efecto de las concentraciones de NH_4Cl sobre la tasa de duplicación de <i>A. maxima</i> .	49
Figura 23. Efecto de las concentraciones de NH_4Cl sobre clorofila <i>a</i> específica de <i>A. maxima</i> .	50
Figura 24. Efecto de las concentraciones de NH_4Cl sobre la tasa fotosintética y respiratoria de <i>A. maxima</i> .	52
Figura 25. Efecto de las concentraciones de K_2HPO_4 sobre el crecimiento volumétrico de <i>A. maxima</i> .	52
Figura 26. Efecto de las concentraciones de K_2HPO_4 sobre el crecimiento relativo de <i>A. maxima</i> .	53
Figura 27. Efecto de las concentraciones de K_2HPO_4 sobre la tasa de duplicación de <i>A. maxima</i> .	54
Figura 28. Efecto de las concentraciones de K_2HPO_4 sobre clorofila <i>a</i> específica de <i>A. maxima</i> .	55
Figura 29. Efecto de las concentraciones de K_2HPO_4 sobre la tasa fotosintética y respiratoria de <i>A. maxima</i> .	56
Figura 30. Efecto de las concentraciones de NaCl sobre el crecimiento volumétrico de <i>A. maxima</i> .	58
Figura 31. Efecto de las concentraciones de NaCl sobre el crecimiento relativo de <i>A. maxima</i> .	58
Figura 32. Efecto de las concentraciones de NaCl sobre la tasa de duplicación de <i>A. maxima</i> .	59
Figura 33. Efecto de las concentraciones de NaCl sobre clorofila <i>a</i> específica de <i>A. maxima</i> .	59
Figura 34. Efecto de las concentraciones de NaCl sobre la tasa fotosintética y respiratoria de <i>A. maxima</i> .	61
Tabla 3. Estimación de los costos en la preparación del medio Zarrouk.	62

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP – Adenosín Trifosfato

Chl – Clorofila

CTE – Cadena transportadora de electrones

FAO/WHO -- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

GLA – Ácido gamma-linoleíco

IFP – Instituto Frances del Petróleo

LHC – Complejo cosechador de luz

PBPs – Ficobiliproteínas

PFD – Densidad de flujo fotónico

PUFAs – Ácidos Grasos Poliinsaturados

PS – Peso seco

PSI – Fotosistema I

PSII – Fotosistema II

RuBisCO – ribulosa-1,5-bisfosfato

Resumen

En este trabajo se estudió a la cianobacteria *Arthrospira* la cual tiene una larga historia de consumo humano en México durante la época de los aztecas, quienes cosechaban *Arthrospira* en el Lago de Texcoco, Estado de México. Actualmente, esta cianobacteria es utilizada como suplemento alimenticio debido a sus características nutricionales ya que es una fuente de alto nivel proteico, rica en vitaminas (A, E y complejo B) y aminoácidos esenciales, minerales, ácidos grasos esenciales como lo es el ácido gamma-linoléico y pigmentos antioxidantes como los carotenoides. Este trabajo fue diseñado para abaratar los costos a partir del medio de cultivo Zarrouk; se probaron distintas concentraciones por separado de las sales: NaHCO_3 , NaNO_3 , NH_4Cl , K_2HPO_4 , y NaCl (en el medio de cultivo Zarrouk), para evaluar la concentración de biomasa y la actividad metabólica de *A. maxima*. Cada experimento se mantuvo a una temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$, una PFD de $400 \mu\text{moles} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ de luz blanca actínica (400-700nm), un fotoperiodo 12/12 (luz/oscuridad) y una biomasa inicial (cultivo semilla) proveniente de un medio Zarrouk completo (con 96 h de sincronización). Los resultados nos muestran que las concentraciones de sales, probadas por separado, a partir del medio Zarrouk, para el caso del NaHCO_3 se puede disminuir en un 75%, el NaNO_3 se puede disminuir un 25 % y el K_2HPO_4 se puede disminuir un 87.5 % sin afectar sus concentraciones en biomasa algal y de clorofila y sin afectar sus tasas fotosintéticas y respiratorias. Para el caso del NH_4Cl , al sustituirlo por el NaNO_3 a partir del medio Zarrouk se obtuvo que se puede utilizar una concentración de $110 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de NH_4Cl sin llegar a ser aparentemente tóxico para la célula y sin afectar sus concentraciones en biomasa algal y de clorofila, sin embargo, si hay una ligera disminución en la actividad fotoquímica. Y finalmente, esta cepa se puede cultivar con una concentración de salinidad de $27.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de NaCl (27 veces más la concentración del medio Zarrouk) sin que se vea afectada su concentración de biomasa, sin embargo, en la concentración de clorofila y en la actividad fotoquímica se ven ligeramente desfavorecidas, pero sin perderse la cinética del cultivo.

1. Introducción

Las cianobacterias son organismos procariontes (Eubacterias) capaces de llevar a cabo la fotosíntesis oxigénica reductora. En este trabajo se estudió a la cianobacteria *Arthrospira* la cual posee clorofila *a* y pigmentos accesorios como las ficocianinas, ficoeritrinas y aloficocianinas, conocidas como ficobiliproteínas o PBPs (García-Pichel, 2003). Esta cianobacteria tiene una larga historia de consumo humano en México y en África; alrededor del año 1300 d.C. los aztecas cosechaban *Arthrospira* en el Lago de Texcoco, Estado de México, filtrando y secando al sol la biomasa de algas en las orillas arenosas del lago (Ciferri, 1983; Abdulqader *et al.*, 2000). En el mismo periodo o incluso antes en el Lago Chad (o Lago Kossorom), en el norte de África, también era cosechada por los pobladores de la zona (Abdulqader *et al.*, 2000). Años después en 1962 el doctor Clement junto con el Instituto Francés del Petróleo (IFP) relacionaron el consumo de *Arthrospira* con la buena salud de la que gozaban las personas de la tribu Kanebu que vivían a la orilla del Lago Chad, el IFP se interesó en esta cianobacteria e iniciaron los primeros trabajos sobre los crecimientos de *Arthrospira* en el Lago de Texcoco (Srivastava, 2007). Así volvió a centrarse la atención sobre este microorganismo y se realizó el primer estudio sistemático y detallado de la fisiología y los requerimientos de crecimiento que sentó las bases para instalar las primeras plantas de producción a gran escala de *Arthrospira* (Vonshak, 1997^b).

Las microalgas y cianobacterias han atraído recientemente el interés debido a su potencial para producir diversos productos que van desde los biocombustibles como el biodiésel, biogás, bioetanol e hidrógeno; hasta los compuestos bioquímicos de alto valor comercial como los pigmentos, ácidos grasos, antioxidantes, etc. (Borowitzka, 1999; Spolaore *et al.*, 2006). Además, muestran un gran potencial para el tratamiento de aguas residuales, ya que pueden eliminar los nutrientes excedentes como el N, P y K principalmente, sin embargo, a concentraciones superiores de nutrientes pueden resultar tóxicos para las células (Vonshak, 1997^a; Abinandan & Shanthakumar, 2015).

La cianobacteria *Arthrospira*, es utilizada debido a su uso tradicional en la alimentación para el ser humano, la aplicación como alimentos funcionales,

nutracéuticos e inclusive alimento para animales, sobre todo en la industria acuícola. Su uso se debe a sus características nutricionales ya que es una fuente de alto nivel proteico, rica en vitaminas (A, E y complejo B) y aminoácidos esenciales, minerales, ácidos grasos esenciales como lo es el ácido gamma-linoléico y pigmentos antioxidantes como los carotenoides (FAO, 2008). Diversos estudios evidencian que su aplicación terapéutica potencial es preponderante en las áreas de: anticancerígenas, antivirales y en la reducción del colesterol (Cheng-Wu, 1996; Qureshi & Ali, 1996; Belay, 2002). Además, presenta función inmunomoduladora (Cheng-Wu, 1996) y efectividad probada en la protección a la radiación (Takeuchi *et al.*, 2002). Por otro lado, uno de sus pigmentos, la ficocianina, un pigmento azul que las cianobacterias utilizan para captar luz UV, es ampliamente utilizado como marcador fluorescente de células, macromoléculas (en investigación biomédica) y en técnicas fluorescentes altamente sensibles (Boussiba & Richmond, 1979; Eriksen, 2008).

Además, un gran problema a nivel global en el que puede aportar *Arthrospira* es en la desnutrición, de acuerdo con la FAO del 30 al 50% de la población mundial se encuentra desnutrida; la pobreza alimentaria es uno de los principales problemas que padecen los países en desarrollo, muchas familias no tienen el suficiente ingreso para alimentarse adecuadamente, lo cual evidentemente repercute en el desarrollo de los individuos, las familias y la sociedad (Rangel, 2009). En países en desarrollo, la desnutrición representa un grave problema por lo que la producción de fuentes alternativas de alimento, de alta calidad, es de suma importancia (Ramírez-Moreno & Olvera-Ramírez, 2006). La diversificación de los alimentos es un elemento importante de la seguridad alimentaria, aunque esto no impide que se deba conceder prioridad al aumento de las posibilidades de obtener fuentes baratas de energía a través de los ingresos para quienes sufren desnutrición (Martínez & Villezca, 2003).

Finalmente, es importante mencionar las variables abióticas que mayormente afectan el crecimiento de las microalgas y cianobacterias, en donde encontramos: la luz, la temperatura, macro y micronutrientes, el pH y la turbulencia (o aireación);

condiciones y elementos que son esenciales en su metabolismo fotoautótrofo (Grover, 1991; Kirk, 1994; Brönmark & Hansson, 2005).

1.1 Historia del cultivo de *Arthrospira*

Los primeros registros en el consumo de *Arthrospira* en México datan a partir de la cultura azteca en el siglo XV. Tenochtitlán, la capital de los aztecas, había sido construida en una isla dentro del Lago de Texcoco, en cuyas aguas salobres (al noroeste de la ciudad de Tenochtitlán) crecía masivamente esta cianobacteria que era utilizada para consumo humano. La alimentación de los aztecas se mantenía una dieta a base de maíz (80% de la dieta) (Paniagua-Michel *et al.*, 1993), jitomate, chile, frijol, calabaza, chayote, cacao, cebolla, nopal, chíá, amaranto, hueva de mosco, algunas aves y *Arthrospira*, entre otros alimentos (Rojas, 1998). El llamado *tecuítlatl*, nombre náhuatl que se refiere al extracto o “desecho de las piedras” que era como le conocían a la cianobacteria *Arthrospira*, El primer registro de la historia que se tiene acerca del consumo de *Arthrospira* como alimento para humanos proviene de Bernal Díaz del Castillo, uno de los acompañantes de las tropas de Hernán Cortés, quien señaló en 1521 que el *tecuítlatl* era cosechado de las aguas del Lago de Texcoco, colada, secada al sol y vendida en el mercado de Tenochtitlán (Díaz del Castillo, 1976). El *tecuítlatl* se comía con maíz o con una salsa hecha de una mezcla de chiles y tomates (Ciferri, 1983; Rojas, 1998).

Con la llegada de la conquista española en México y con el transcurrir de los años se fue perdiendo la tradición en el consumo de esta cianobacteria, además se cree que con la gran expansión demográfica del momento se contaminaron radicalmente las aguas del lago de Texcoco lo cual no garantizaba la pureza de este alimento. Y no fue sino hasta el siglo XX que se redescubrió, en 1962 el doctor Clement junto con el Instituto Francés del Petróleo (IFP) relacionaron el consumo de *Arthrospira* con la buena salud nutricional de la que gozaban las personas, así volvió a centrarse la atención sobre este microorganismo y se realizó el primer estudio sistemático y detallado de la fisiología y los requerimientos de crecimiento que sentó las bases para instalar las primeras plantas de producción a gran escala de *Arthrospira* (Ciferri, 1983; Rojas, 1998; Vonshak, 1997^b). En 1967, la empresa Sosa Texcoco,

S. A., con el apoyo técnico del Dr. Clement y del IFP que se encontraba estudiando el aprovechamiento del alga *Arthrospira* en África Central; se desarrolló la instalación de una planta piloto semi-industrial con una capacidad de producción de una tonelada diaria de alga seca. Con esa producción, Sosa Texcoco S.A. encabezaba a nivel mundial, la fabricación de este producto (Anónimo, 1991; Vonshak, 1997^b). Cabe mencionar que una década antes de la producción biotecnológica de *Arthrospira* por Sosa Texcoco en México, ya se cultivaba y comercializaban otras algas como *Chlorella*, *Dunaliella*, *Scenedesmus*, *Porphyridium*, *Euglena*, *Chlamydomonas*, *Phormidium*, *Botryococcus* y *Haematococcus pluvialis* en países como Japón, Tailandia, Estados Unidos y Alemania (Becker, 1994; Borowitzka, 1999). En cuanto a la producción de *Arthrospira* hacia 1997 México no tenía competidores, solamente existían algunas pequeñas plantas productoras en Japón y en Tailandia, pero su producción era muy baja comparada con la de México. La mayor parte de la *Arthrospira* que producía la empresa Sosa Texcoco, se exportaba, los principales compradores eran Estados Unidos, Japón y algunos países europeos; *Arthrospira* se empacaba en presentaciones de tabletas y capsula adicionadas con vitamina A y D (Gibbs, 1982). Además de la gran importancia de *Arthrospira* en México también fue cultivada en África en el mismo periodo de los aztecas, inclusive pudo ser algunos años antes; se menciona que alrededor del año 1300 en el Lago Chad (o Lago Kossorom), ubicado en norte de África entre la República de Chad y Camerún, también era cosechada por los pobladores de la zona que era la tribu Kanaembous quienes vivían a las orillas de este lago (Leonard, 1966; Ciferri, 1983; Abdulqader *et al.*, 2000). Tiempo después en 1963 un científico belga de nombre Jean Leonard, comenzó una expedición en el lago Chad, en donde él fue el primero que inicio la documentación de las características biológicas de esta cianobacteria y además llevo a cabo un análisis de su contenido proteico, obteniendo un valor cercano al 50% de su peso seco algal (Leonard, 1966). En 1976, investigadores de la Oficina de Investigación Científica y Tecnológica Ultramarina de París (ORSTOM, por sus siglas en francés), realizaron un estudio sobre los valores nutricionales de esta cianobacteria ya que se rumoraba que los kanaembous eran personas con buen

estado físico, sanos, altos y sobre todo, grandes corredores; esto les hizo interesarse por el aprovechamiento de esta cianobacteria, por lo que realizaron un nuevo análisis proteico en el cual se obtuvo un intervalo de 62 a 68% del peso seco, sorprendiendo aún más que el estudio realizado por Leonard (Ciferri, 1983). Este nuevo aporte motivó en México a realizar nuevos estudios de la cianobacteria que crecía en el antiguo lago de Texcoco, el IFP siguió brindando servicios y asistencia tecnológica a la empresa mexicana, finalmente el *tecuítlatl* fue identificado oficialmente como *Spirulina maxima* (ahora *Arthrospira maxima*).

1.2 Características biológicas de *Arthrospira*

La cianobacteria *Arthrospira* se presenta como un filamento simple, solitario, pluricelular y de forma helicoidal. Sus tricomas, cilíndricos multicelulares en hélice abierta, están compuestos de células cilíndricas que experimentan fisión binaria en un solo plano perpendicular al eje principal. La elongación (multiplicación) del tricoma ocurre a través de múltiples divisiones celulares intercalares a lo largo de todo el filamento, la multiplicación ocurre solo por fragmentación y es intracelular, involucrando la destrucción de la célula intercalar (Komárek, 1992; Vonshak & Tomaselli, 2000). El diámetro de las células varía dentro del género, en el caso de *A. maxima* está entre 5 a 7 μm (Ciferri, 1983), la distancia entre cresta y cresta de una vuelta de la hélice se encuentra en el intervalo de 20 a 60 μm , este intervalo que define la arquitectura de la hélice es altamente dependiente de las condiciones ambientales y de crecimiento, condiciones que además van a determinar el contenido y cantidad de metabolitos presentes (Vonshak, 1997^a). El ancho del tricoma de las poblaciones de *A. maxima* muestreadas en la naturaleza oscila entre aproximadamente 6.5 a 9 μm , mientras que de largo varía típicamente de 15 a 170 μm (Komárek & Anagnostidis, 2005) Tanto *A. fusiformis* como *A. maxima* suelen tener abundancia de vacuolas de gas, también llamados aerotopos, que ayudan a posicionar el organismo en la columna de agua.

La organización celular de *Arthrospira* es la típica de los procariontes (Eykelburg, 1979) (Figura 1). La pared celular es gram-negativa y está rodeada por un polisacárido mucilaginoso difluente que la envuelve, se caracteriza por tener una fila

de poros alrededor del tricoma (Vonshak & Tomaselli, 2000). La pared celular delgada tiene cuatro capas, una de ellas electro-densa, fácilmente detectable bajo el microscopio óptico, que corresponde a la capa de peptidoglicanos (Eykelenburg, 1979).

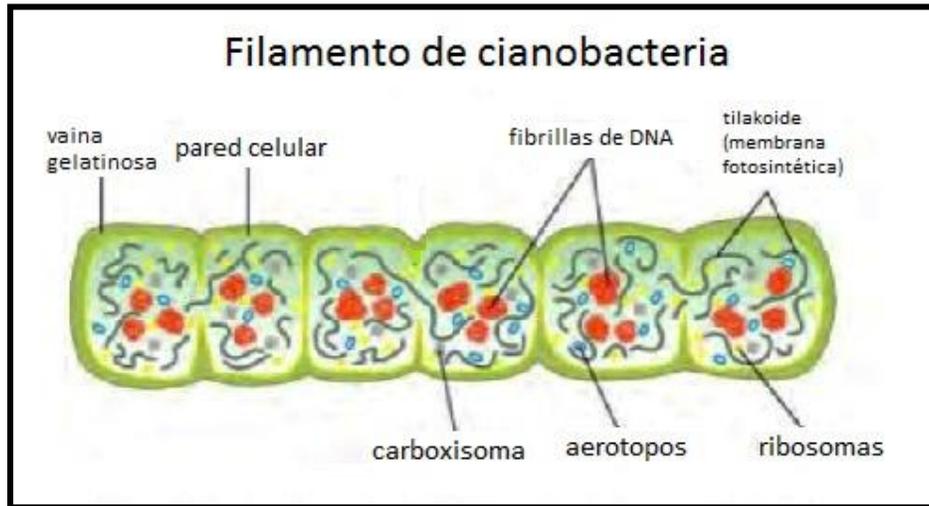


Figura 1. Esquema de un filamento de cianobacteria (Ceballos *et al.*, 2008).

1.3 Taxonomía de *Arthrospira*

La taxonomía y la nomenclatura de esta cianobacteria que era nombrada comercialmente como *Spirulina* y que durante mucho tiempo fue confundida con este género, se debatió durante casi todo el siglo XX. Varias preguntas han sido resueltas sólo en las últimas décadas con la ayuda de la microscopía electrónica, el análisis bioquímico, y recientemente, gracias al apoyo del análisis molecular, dentro del contexto de lo que comúnmente se conoce como "enfoque polifásico". El género *Arthrospira* fue descrito por Stizenberger ex Gomont en 1892, donde el primero había observado los septos en algunas formas oscilatoriáceas en espiral helicoidal, propuso que esas formas se incluyeran en un nuevo género, *Arthrospira* (Stizenberger, 1852). Esta distinción fue confirmada más tarde por Gomont (1892) en su estudio taxonómico sobre los Oscillatoriaceae. A continuación, se muestra la clasificación del género, con base en Komárek, 1992.

Imperio: Prokaryota
Dominio: Bacteria
Filo: Cyanophyta
Clase: Cyanophyceae
Orden: Oscillatoriales
Familia: Microcoleaceae
Género: *Arthrospira*
(Komárek, 1992)

El género *Arthrospira* ha llegado a ser universalmente aceptado, al menos por los taxonomos, como el nombre de los organismos utilizados en el cultivo en masas. Con el objetivo de aclarar más la posición sistemática de *Arthrospira spp.* comúnmente utilizado para operaciones de cultivo en masas (básicamente hablando de *A. maxima* y *A. fusiformis*), Komárek y Anagnostidis (2005) y Komárek y Hauer (2011) han instado recientemente a abandonar definitivamente el nombre comercial “espirulina”, recomendando su sustitución con el nombre taxonómicamente correcto de *Arthrospira*.

1.4 Distribución de *Arthrospira*

Las especies de *Arthrospira* son cianobacterias planctónicas que forman poblaciones masivas en cuerpos de agua tropicales y subtropicales caracterizados por crecer en aguas alcalinas y salinas, es decir, con altos niveles de carbonato, bicarbonato y un pH de hasta 11 (Ilitis, 1970; Busson, 1971; Clément, 1971). La mayoría de las especies de *Arthrospira* han sido aisladas en donde se llegan a formar crecimientos masivos o “blooms” de ellas, se han descrito algunas especies de este género como cosmopolitas, se considera a *A. platensis*, *A. maxima* y *A. jenneri* típicas de ambientes salinos tropicales (Vonshak & Tomaselli 2000). Algunas especies se han registrado en aguas dulces, pero sin esa predominancia. Otras especies, aún más restringidas, se han reportado en ríos, (*A. okensis*); manantiales, (*A. massartii*) y estanques (*A. spirulinoides*, *A. gomontiana* y *A. tenuis*). De las 43 especies registradas del género *Arthrospira*, sólo *A. maxima* y *A. platensis* se han

registradas como benéficas para la salud (Vonshak, 1997^a; Vonshak & Tomaselli, 2000).

La abundante ocurrencia de las especies *A. platensis* y *A. maxima* en aguas salinas, alcalinas, tropicales y subtropicales han permitido reconocer estos ambientes como típicos del género (Vonshak & Tomaselli 2000). Mientras que *A. platensis* se encuentra más ampliamente distribuida en África, Asia y el sur de América, *A. maxima* parece estar confinada en América central (México y California-USA) y en menor medida en el sur y centro de México, esta especie represento el principal componente fitoplanctónico del Lago de Texcoco, Edo. de Mex. en la década de los 60's y 70's (Tomaselli, 1997).

1.5 Ecología de *Arthrospira*

Las cianobacterias juegan un papel muy importante en los procesos biológicos en el planeta ya que junto con las microalgas realizan el 50 % de la fotosíntesis, producto de la cual se libera una gran cantidad de oxígeno al ambiente favoreciendo procesos aeróbicos. El género *Arthrospira* es un componente del fitoplancton en cuerpos de aguas alcalinas principalmente, aunque nueve de las veintitrés especies han sido reportadas para ambientes marinos. En agua dulce se encuentran en ríos, lagos o inclusive como componentes del bentos, sobre piedras o plantas sumergidas, mientras que en el mar se localizan en la zona intermareal rocosa, estuarios, marismas y manglares (Ciferri, 1983; Komárek & Lund, 1990). Se ha reportado que especies de *Arthrospira* se encuentran en medios acuosos con una salinidad entre 2.5 a 30 g·L⁻¹ donde también predominan ciertas cianobacterias y diatomeas; pero cuando la salinidad es superior a 30 g·L⁻¹ la población de algas se compone casi exclusivamente de especies de *Arthrospira* (Iltis, 1970). Los estudios detallados de Iltis (1970) establecieron una correlación directa entre la densidad de biomasa de *Arthrospira* y la salinidad del agua. Las floraciones masivas ocurren a valores de salinidad de 22 a 60 g·L⁻¹, altas concentraciones de carbonato-bicarbonato (pH 8.5–11.0) y temperaturas de 25 a 40 °C.

Por otra parte, *Arthrospira* junto con otras poblaciones de fotótrofos de los lagos permanentes y temporales de los trópicos, mantienen la densidad del zooplancton,

como por ejemplo del rotífero, las densidades de ambos varían según la estación, siendo más productivas las poblaciones cuando las temperaturas están por arriba de 30 °C (Iltis & Riou-Duwat, 1971). En algunos lagos, *Arthrospira* constituye un excelente alimento para los peces cíclidos de la Tilapia (Coe, 1966; Bergman *et al.*, 2003). Otro consumidor de *Arthrospira* y otras cianobacterias filamentosas grandes como *Anabaenopsis* es el flamenco *Phoenicopterus minor*, el color rosado de estas aves proviene del carotenoide pigmentos originarios de cianobacterias (Fox, 1976).

1.6 Importancia de *Arthrospira*

En el aspecto del valor nutrimental para el ser humano que posee *Arthrospira* radica precisamente en la gran variedad de macro y micronutrientes que contiene, algunos de los cuales no pueden ser sintetizados por el organismo humano (Ramírez-Moreno & Olvera-Ramírez, 2006). Los principales aportes nutricionales de esta cianobacteria son su alto contenido proteico (alrededor del 60 al 70% de su peso seco), vitaminas (como A, E y complejo B), minerales y lípidos, entre estos componentes, destaca la presencia del ácido graso poliinsaturado gama-linoleico, el cual posee efectos benéficos para la salud y que además solo se obtiene a partir de la dieta (Muhling *et al.*, 2005). Desde un punto de vista dietético, su consumo ofrece diferentes ventajas, entre las que se encuentra la presencia de la mayor parte de los aminoácidos recomendados por la FAO, buena digestibilidad y bajo contenido de ácidos nucleicos (menor al 5% de peso seco algal) (Sánchez *et al.*, 2003). Debido a su alto contenido proteico y su fácil asimilación, se utiliza en dietas de niños y adultos desnutridos y/o anémicos, así como en deportistas para mejorar su desempeño (Srivastava, 2007). Se le considera un alimento excelente, exento de toxicidad y poseedor de propiedades correctoras de ataques virales, anemia, crecimiento tumoral y malnutrición.

Además, posee varios metabolitos que son de gran interés biotecnológico como los carotenoides en particular el β -caroteno, las ficobiliproteínas, los exopolisacáridos (EPS), lípidos, proteínas, vitaminas y minerales (Ramírez-Moreno & Olvera-Ramírez, 2006). En el ámbito de la industria ganadera, conlleva al realce de la coloración de piel y yema de huevos, en gallináceos y flamencos; aceleración de

crecimiento, maduración sexual y aumento de fertilidad en bovinos (Sánchez *et al.*, 2003).

2. Antecedentes

2.1 Composición bioquímica

El alto contenido de proteínas de varias especies de microalgas y cianobacterias fue una de las principales razones para considerar a estos organismos como una fuente no convencional de proteínas. La composición bioquímica de estos microorganismos puede variar debido a sus tasas de crecimiento, fases de su ciclo de vida, con las condiciones ambientales y nutrientes en donde crece (Richmond, 1986; Fernández-Reiriz *et al.*, 1989).

En términos de nutrición, *A. maxima* es una fuente de alimento que cuenta con un alto nivel proteico como principal característica, además es rica en vitaminas (A, E y complejo B), aminoácidos esenciales, minerales, ácidos grasos esenciales (ácido gamma-linoléico) y poder antioxidante, debido a la presencia de ciertos carotenoides (Tabla 1) (FAO/WHO, 1973; Becker, 1994; Cohen 1997; Sánchez *et al.*, 2003; Ozdemir *et al.*, 2004; El-Baky *et al.*, 2008). Cabe mencionar, la OMS y la FAO recomiendan a *A. maxima* como una proteína equilibrada y además es comparable con otros alimentos básicos de referencia (Tabla 2) (Becker, 1994; FAO/WHO, 2008).

Sin embargo, hoy en día existen dificultades para incorporar el material algal en preparaciones alimenticias apetecibles, es decir, la propagación de la proteína algal tiene muy poca difusión a nivel global. Hasta la fecha, la mayoría de las preparaciones de microalgas se comercializan como suplemento alimenticio en cápsulas, polvos de microalga (como condimento en comidas y zumos naturales), como alimento para animales principalmente en la avicultura y acuicultura, o incluso como cosméticos.

Composición bioquímica de <i>Arthrospira sp.</i>			
Compuesto	Contenido %	Compuesto	Contenido %
Proteínas	60-70	Vitamina B6	0,5-0,7mg
Leucina	5,9-6,5	Cobalamina B12	0,15-0,25mg
Valina	7,5	Vitamina E	5-7mg
Isoleucina	6,8	Vitamina K	2,2mg
Lisina	2,6-3,3	Ácido fólico	4-5mg
Fenilalanina	2,6-3,3	Ácido pantoténico	0,5-0,8mg
Metionina	1,3-2,0	Biotina	5µg
Triptófano	1,0-1,6	Minerales	mg
Tirosina	2,6-3,3	Potasio	1-4
Ácido Glutámico	7,3-9,5	Sodio	0,45-0,5
Ácido Aspártico	5,2-6,0	Fósforo	0,3-0,7
Cisteína	0,5-0,7	Calcio	0,1-0,4
Carbohidratos	15-20	Magnesio	0,1-0,2
Glicerol	7,4	Fierro	0,03-0,05
Glucosa	7,5	Manganeso	0,005
Ramnosa	1,1	Zinc	0,003
Fucosa	3,3	Cobre	0,0012
Ribosa	7,1	Cromo	0,28
Xilosa	2,5	Pigmentos	6
Manosa	1,9	Clorofila a	0,8-1,5
Galactosa	6,2	Carotenoides	0,648
D-Glucosamina	2,12	β-caroteno	1,8
Otros	2,6	Equinenona	1,3-1,7
Ácidos grasos	3-6,5	b-criptoxantina	0,7-0,9
Ácido mirístico	0,23	3'-hidroxiequinenona	0,8-1,3
Ácido palmítico	2,76	Zeaxantina	3
Ácido palmitoleico	1,26	Diatoxantina	0,6
Ácido γ-linoleico	1,11	Cantaxantina	0,6
Ácido linoleico	0,57	Mixoxantofila	1,6-,12
(GLA)		Oscillaxantina	0,4-0,6
Ácido oleico	1-15,5	No identificados	0,4-0,52
Otros	20,88 mg	Ficocianina	1,9-3,0
Vitaminas			
Provitamina A	0,11-0,2		
Tiamina B1	3-4 mg		
Riboflavina B2	2,5-3,5mg		
Niacina B3	0,01		

Tabla 1. Composición bioquímica total de *Arthrospira sp.* (% en base al peso seco de la biomasa); se indica la unidad correspondiente o en blanco porcentajes. Tabla elaborada a partir de los datos de Becker (1994), Belay (1997), Cohen (1997) y Sánchez *et al.* (2003).

Producto	Proteínas	Carbohidratos	Lípidos
huevo	47	4	41
carne	43	1	1
leche	26	38	28
pan	39	38	1
arroz	8	77	2
soya	37	30	20
<i>Arthrospira maxima</i>	60-71	13-16	7
<i>Arthrospira platensis</i>	46-63	8-14	4-9
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	50-56	8-18	16-40

Tabla 2. Composición química total de algunos alimentos de la dieta del ser humano y diferentes microalgas (% de materia seca) tabla extraída de Becker (1994).

2.2 Pigmentos

Los sistemas fotosintéticos de cianobacterias, al igual que las plantas terrestres se construyen alrededor del pigmento primario, la clorofila *a* (Chl *a*), pero además contienen complejos de recolección de luz (LHC) llamados ficobilisomas que son pigmentos secundarios que le permite a la célula captar energía en un intervalo de absorción distinto a las clorofilas permitiendo a la célula poseer mayor eficacia fotosintética (Schliep *et al.*, 2013).

2.2.1 Clorofila

La molécula de clorofila *a*, consiste en un anillo tetrapirrol que contiene un átomo de magnesio central y un alcohol terpenoide de cadena larga (figura 2), estas moléculas están unidas no covalentemente a las apoproteínas. Todas las Chl tienen dos bandas principales de absorción: azul o verde azulado (450-475 nm) y rojo (630-675 nm). La Chl *a* está presente en los centros de reacción del pigmento-proteína, en donde se acompañan de los ficobilisomas en la recolección de la luz (Scheer, 1991). El contenido de chl *a* total que llega a tener *Arthrospira* varía del 0,8 al 1.5 % del peso seco.

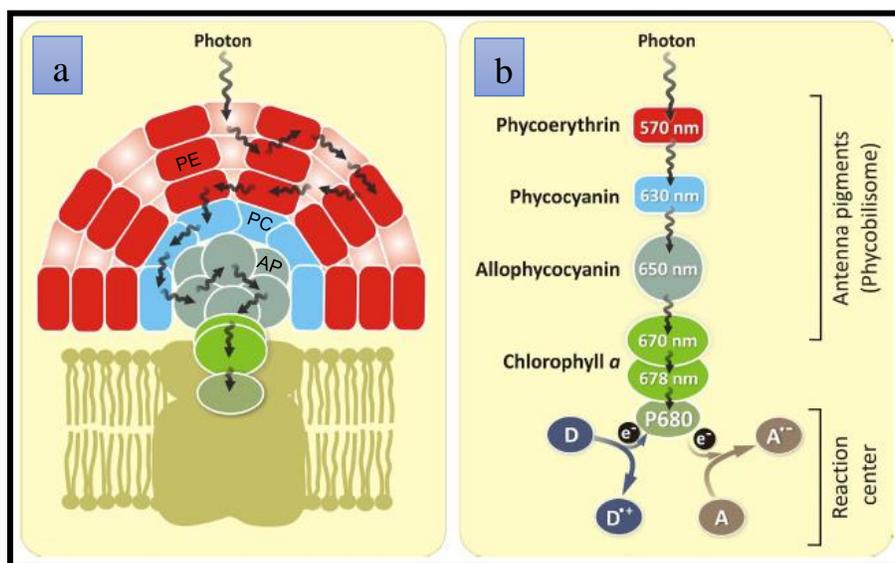


Figura 3. (a): esquema de la organización de un ficobilisoma donde PE: Ficoeritrina, PC: Ficocianina y AP: Aloficocianina. Y (b): transferencia de la energía de los fotones a través de una serie de moléculas hasta alcanzar el CR de chl a en el PS II (P680) (Govindjee & Dmitriy, 2011).

2.2.3 Carotenoides

Finalmente, otro grupo de pigmentos secundarios que presenta *Arthrospira* son los carotenoides, estos son metabolitos secundarios, compuestos derivados de los lípidos (ésteres de ácidos grasos), que al ser hidrofóbicos pueden encontrarse asociados a membranas o a pigmentos como la clorofila (Meléndez-Martínez *et al.*, 2007). El carotenoide más abundante de esta cianobacteria es la xantofila (luteína), el contenido de xantofila de *Arthrospira* liofilizada es considerable, llegando a $6.9 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Otro carotenoide abundante en *Arthrospira* es mixoxantofila, un carotenoide monocíclico unido a ramnosa, β -caroteno y zeaxantina (Paoletti *et al.*, 1971). Se ha demostrado que cultivos de *Arthrospira* al aire libre tienen mayor concentración de carotenoides en su biomasa que los cultivos cerrados, principalmente a temperaturas de entre 33 a 37 °C (Vincenzini *et al.*, 1986).

2.3 Biotecnología de algas

A pesar de que las microalgas se han utilizado desde la antigüedad, principalmente como fuente de alimento, el interés que se ha despertado en su estudio es reciente,

a partir de los años 50 es que se empieza con el desarrollo de medios de cultivo para su propagación, así como las metodologías para su cosecha, dando origen a la biotecnología algal (Arredondo & Vázquez, 1991).

A grandes rasgos la biotecnología consiste en hacer que los organismos “trabajen” en nuestro beneficio mediante un conjunto de técnicas que, combinadas con nuestro conocimiento de la biología de los seres vivos, orienta la vida de éstos hacia procesos de interés económico-social para la humanidad (Álvarez & Gallardo, 1989).

Algunas ventajas del cultivo de microalgas según Vonshak (1997 ^a) son:

- 1.- Se consideran sistemas biológicos muy eficientes cosechando la energía solar para la producción de componentes orgánicos a través de la fotosíntesis.
- 2.- Pueden ser inducidas para producir altas concentraciones de algún compuesto de valor comercial específico, como proteínas, carbohidratos, lípidos o pigmentos.
- 3.- Crecen bajo un ciclo de vida simple, en la mayoría de los casos sin ningún tipo de estadio sexual, permitiéndoles completar su ciclo de vida en unas cuantas horas.
- 4.- Para muchas regiones que sufren una baja productividad debido a suelos pobres o falta de agua dulce, el cultivo de microalgas, que pueden crecer usando agua marina o salobre y sobre tierras pobres, probablemente son la única manera de incrementar la productividad y asegurar una reserva de proteínas.

2.4 Sistemas de cultivo de *Arthrospira*

Para poder elegir el sistema de cultivo más adecuado es importante conocer la biología del alga y tener en cuenta el tipo de producto final que se desea obtener. Por ejemplo, los cultivos de microalgas a escala comercial generalmente requieren la habilidad de producir toneladas de biomasa algal al menor costo posible. Para esto se necesitan cultivos que van desde 10,000 hasta 1, 000,000 de litros por lo que la mayor parte de estos cultivos son al aire libre (Borowitzka, 2005). Los cultivos masivos pueden ser cerrados o abiertos, los últimos son los más abundantes y antiguos (figura 4) (Álvarez & Gallardo 1989).

Los sistemas cerrados permiten una iluminación uniforme, obtención de altas concentraciones de biomasa, esterilización efectiva del reactor, bajos niveles de contaminación, fácil monitoreo y control de parámetros operacionales (Torzillo, 1997). Sin embargo, estos sistemas son muy costosos y presentan dificultades para el escalamiento del cultivo, además utilizan iluminación artificial que eleva los costos. En cambio, en los sistemas al aire libre se utiliza luz solar, sin embargo, sólo un pequeño número de especies de algas pueden crecer exitosamente en este tipo de sistemas (Borowitzka, 1999).

Arthrospira es una candidata destacada para cultivarla al aire libre, debido a que son termófilas (35-37°C) y alcalófilas (pH= 10); propiedades que facilitan el mantenimiento de cultivos monoalgales (Cohen, 1997). Los sistemas de producción algal pueden ser divididos en 4 fases: cultivo, cosecha, secado y empaquetado. Cada uno de estos pasos son determinantes en la obtención de productos de alta calidad (Belay, 1997).

Al elegir un sistema de cultivo deben ser tomados en cuenta diferentes factores para mejorar la productividad fotosintética, que incluyen la presencia de nutrientes, la agitación cuidadosa de los estanques de cultivo, regulación del oxígeno, los niveles de pH y la temperatura (Borowitzka, 1999; Carlozzi & Pinzani, 2004).

El medio de cultivo más utilizado para el crecimiento de *Arthrospira* es el medio Zarrouk, ya que tiene la característica de tener una alta alcalinidad, es rico en nitrógeno y fosforo; además de contener ciertos micronutrientes como el sulfato de titanio (III), que otros medios de cultivo no ocupan y es esencial en el metabolismo de *Arthrospira*; sin embargo, hay diversos estudios que indican que el bicarbonato de sodio, el nitrato de sodio y el fosfato de potasio están sobrados en este medio de cultivo, lo que lo convierte en costoso y poco rentable. Por otro lado, la gran mayoría de los estudios sobre el cultivo de *Arthrospira* son en *A. platensis*, por lo que se requiere conocer más sobre la cinética de crecimiento en *A. maxima*.

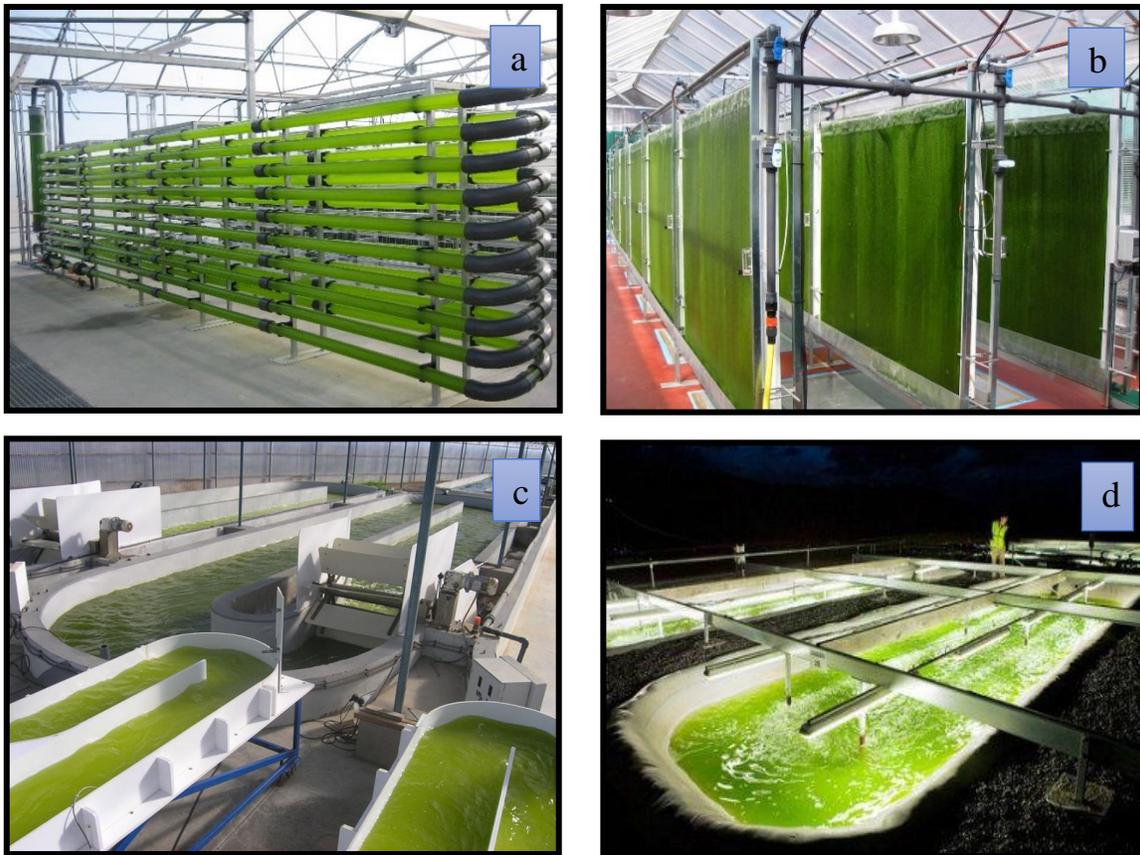


Figura 4. Sistemas de cultivo. Cerrados: (a) tubular; (b) flat. Y Abiertos: (c) raceway; (d) piscina a ras de suelo.

2.5 Efecto de los nutrientes en el crecimiento

El crecimiento de cianobacterias en muchos ecosistemas está limitado por la disponibilidad del nitrógeno y fósforo y la importancia de la relación entre los dos, pero además para el caso de *Arthrospira* se debe tener en cuenta que crece en ambientes alcalinos con un pH de entre 9 a 11, esta característica se la proporciona en gran parte los HCO_3^- , por lo que el carbono genera un mecanismo de amortiguación en un sistema carbonato-bicarbonato- CO_2 . Otro factor importante para obtener rendimientos altos de biomasa de *Arthrospira* es en presencia de temperaturas que oscilen entre los 30 a los 35 °C, si bien, la luz se considera el factor ambiental más importante para los organismos fotosintéticos, la temperatura afecta a todas las actividades metabólicas, así como la disponibilidad y absorción de nutrientes (Vonshak, 1997 ^a).

2.5.1 Carbono

La fotosíntesis es un proceso por el cual el carbono inorgánico y la energía luminosa se convierten en materia orgánica. El carbono es un nutriente esencial que contribuye a todos los compuestos orgánicos y el principal elemento de biomasa en las cianobacterias (Markou & Georgakakis, 2011; Raven, 2012^a). Por lo tanto, una concentración adecuada de carbono permite un rápido crecimiento y acumulación de metabolitos de interés. Las cianobacterias utilizan carbono tanto en forma orgánica como inorgánica, el carbono en el caso de los cultivos de *Arthrospira* utilizan principalmente HCO_3^- como fuente de carbono en una concentración de $16.8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Badger *et al.*, 2006; Price *et al.*, 2008). Es bien sabido que *Arthrospira* prospera en aguas muy alcalinas con alto pH, alrededor de 9-11, el suministro de carbono en forma de carbonato de sodio o bicarbonato sódico para el control del pH en el medio de cultivo (Vonshak, 1997^a y Çelekli & Dönmez, 2006). Por otra parte, cuando el HCO_3^- o el NaCl o la salinidad total llega a concentraciones aún más altas, por arriba de los $35 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ la absorción de nutrientes se ve afectada, debido al efecto osmótico y a la toxicidad iónica que sufre la célula, ya que el organismo estará más enfocado en liberar los iones que se encuentran en exceso y en menor medida en metabolizar los nutrientes demandados por las células.

2.5.2 Nitrógeno

El nitrógeno es el segundo elemento más abundante en la biomasa de las cianobacterias y además es un componente de los ácidos nucleicos (ADN y ARN), aminoácidos y pigmentos, como las clorofilas y la ficocianina (Markou *et al.*, 2014). El nitrógeno también se puede utilizar en formas orgánicas e inorgánicas. Las formas más comunes de nitrógeno inorgánico utilizado para muchas cianobacterias son compuestos N combinados, en su mayoría NO_3^- y NH_4^+ , ocasionalmente NO_2^- (Galván *et al.*, 1996; Falkowski & Raven, 2007; Martiny, *et al.*, 2009). El orden en el que las cianobacterias prefieren usar nitrógeno inorgánico es $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_3^- \rightarrow \text{N}_2$. La cianobacteria *Arthrospira* no usa otra fuente de nitrógeno hasta que se usa todo el amonio del medio, debido a que es una fuente de nitrógeno ya reducido, por lo tanto, la absorción y la asimilación consumen menos energía. Ya que *Arthrospira* es capaz de utilizar diversas formas de nitrógeno y dependiendo la fuente esta afecta

el rendimiento, así como la composición bioquímica de las algas. El NO_3^- parece ser la forma preferida de nitrógeno al menos para la mayoría de las especies cultivadas de *Arthrospira*. El medio Zarrouk que fue el medio que se utilizó en este trabajo tiene una concentración de $2.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaNO_3 siendo la única fuente de nitrógeno. Es importante mencionar que las limitaciones de nitrógeno también afectan el crecimiento de la biomasa, como lo menciona Çelekli & Yavuzatmaca (2009), ellos reportan que cuando hay un aumento ($3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) o disminución ($0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) del NaNO_3 se ve afectada la producción de su biomasa con cambios significativos a partir de 5 días de cultivo y además menciona que las concentraciones por arriba de $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaCl afectan la asimilación del NaNO_3 . Otras respuestas típicas a la limitación de nitrógeno es la decoloración de las células (Disminución de clorofilas y un aumento de los carotenoides) y la acumulación de compuestos de carbono orgánicos tales como polisacáridos y PUFAs (Becker, 1994).

2.5.3 Fósforo

Hay muy pocos estudios sobre la cinética de captación de fósforo en *Arthrospira* y estudios comparativos sobre diversas formas de fósforo en el crecimiento y la actividad fotosintética son escasos. El fósforo se usa como una moneda de energía en las reacciones de señalización y conducción, y también es un componente básico en productos bioquímicos tan críticos para la vida como los ácidos nucleicos y las membranas lipídicas. El fósforo es un componente importante en los trifosfatos de nucleósido como el ATP y GTP (Merchant & Helmann, 2012). Hay dos formas principales de pensar sobre el fósforo en la célula; la presencia de compuestos bioquímicos ricos en fósforo y el tipo de enlace de fósforo en compuestos que contienen fósforo. El PO_4 es ampliamente aceptado como la forma preferida de fósforo para el crecimiento microalgal y *Arthrospira* es parte de esto, en sí el PO_4 en gran parte se considera como la única fuente de fósforo inorgánico (Benitez-Nelson 2000; Paytan & McLaughlin 2007). Cabe mencionar que hay una estrecha relación en la asimilación del medio del Nitrógeno-fósforo, esta relación se explica en gran medida debido a que el requerimiento celular de fósforo está relacionado con la necesidad de que el ARN sintetice las proteínas adicionales (transportadores y

reductasas de NO_3^- y NO_2^-) involucradas en la asimilación de N oxidado en comparación con la asimilación de N reducido como N orgánico y NH_4^+ , aunque este requisito adicional no es tan grande como el de las proteínas adicionales y su recambio, en el caso de la fijación de N_2 (Raven, 2012^b y 2013). Además, los requerimientos de fósforo y otros (como Fe y Mo) varían dependiendo de la forma de N combinada. Por ejemplo, la NO_3^- reductasa requiere Fe y Mo, mientras que la NO_2^- reductasa requiere Fe, además de cualquier otro requisito para Fe y Mo en la asimilación de NH_4^+ y N orgánico (Raven 1988; Kustka *et al.*, 2003). Abordando las concentraciones de fósforo en el medio de cultivo Zarrouk, un ejemplo es un estudio realizado por Celekli *et al.* (2009) han estudiado el efecto de la concentración de fosfato ($0,25-1 \text{ g L}^{-1}$) a diferentes niveles de pH (8.5-10.5) en la producción de biomasa de *Arthrospira platensis*, se encontró una producción máxima de biomasa a una concentración de fosfato de $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y un pH de 10. Es importante tener en cuenta que las limitantes en las concentraciones de carbono, nitrógeno y fósforo tendrán un impacto en la cantidad y composición bioquímica de la biomasa algal.

2.5.4 Salinidad

La respuesta de las cianobacterias a los cambios en el entorno osmótico ha atraído una atención considerable ya que son habitantes de muchos de los biotopos caracterizados por grandes variaciones en las salinidades y, por lo tanto, pueden servir como organismos modelo para el estudio de la respuesta de los organismos fotosintéticos al estrés osmótico. En los últimos 40 años se han publicado muchos estudios sobre la respuesta de las cianobacterias a diferentes ambientes salinos: (I): el papel específico de los compuestos orgánicos como osmorregulantes (Borowitzka, 1986), (II): la modificación en la actividad de la fotosíntesis y la respiración (Vonshak & Richmond, 1981), y (III): las variaciones en el patrón de síntesis de proteínas (Hagemann *et al.*, 1991). Como ya se ha mencionado, *Arthrospira* crece en ambientes halófilos donde la salinidad total ronda de 10 a $35 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (compuesta principalmente por $\text{NaCl} + \text{NaHCO}_3$). Sin embargo, en un trabajo realizado por Vonshak *et al.* (1988) quienes reportaron que al cultivar *A. platensis* con medio Zarrouk probando la tolerancia a la salinidad, usando una concentración

de $35 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaCl, obtuvieron rendimientos de biomasa ligeramente menor que el control ($1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaCl) y además, no se ve afectada la actividad fotosintética y respiratoria; pero cuando aumentaron la concentración de salinidad a $58.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaCl obtuvieron que la biomasa se reduce un 60% con respecto al control ($1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaCl) pero además hay una disminución notoria en la fotosíntesis aunque la respiración se ve aumentada. Vonshak (1997^a), mencionada a mana de conclusión que la alta salinidad provoca que las células de *Arthrospira* sean menos eficientes en el manejo de la energía luminosa y haya una disminución en el contenido proteico en sus células.

2.6 Fotosíntesis en cianobacterias

Todas las formas de vida en la Tierra dependen directa o indirectamente de la fotosíntesis como fuente de energía para su metabolismo y crecimiento, como ya sabemos la fotosíntesis proporciona el mayor suministro de energía y la entrada de carbono a los biosistemas de la Tierra; la fotosíntesis representa un proceso único de conversión de energía solar, en este proceso, los compuestos inorgánicos y la energía luminosa se convierten en materia orgánica mediante fotoautótrofos. *Arthrospira*, capta la energía mediante el pigmento primario clorofila *a* (Chl *a*) (Scheer, 1991). *Arthrospira* utiliza la clorofila *a* para realizar la fotosíntesis oxigénica, es decir, extrae los protones y electrones de la molécula donante H_2O para reducir el CO_2 . La fotosíntesis oxigénica puede expresarse como una reacción redox impulsada por energía luminosa, en la que el CO_2 y el H_2O se convierten en hidratos de carbono $(\text{CH}_2\text{O})_n$ y O_2 . Para la asimilación de carbono *Arthrospira* utiliza la vía C3, es decir, la carboxilasa autotrófica inicial es la Rubisco que incorpora el CO_2 en el ciclo Calvin-Benson-Bassham. Las cianobacterias presentan estructuras en el citoplasma reconocidos como carboxisomas, que son inclusiones citoplasmáticas que contienen enzimas involucrados en la fijación de CO_2 , tal es el caso de la enzima Rubisco, también en estas estructuras se encuentra la anhidrasa carbónica una enzima encargada de metabolizar el HCO_3^- a CO_2 y así incrementar la tasa de carboxilación de la enzima Rubisco (Badger *et al.*, 1980; Jørgensen, 1987; Vonshak & Guy, 1992; Giordano *et al.*, 2005; Raven 2009). Estos procariontes, no tienen

cloroplasto, sin embargo en la región periférica interna de la célula se encuentran láminas de membranas fotosintéticas, tilakoides, dispuestos en paralelo a la superficie celular y en adición a los carboxisomas; las membranas fotosintéticas contienen cinco complejos principales: ficobilisoma (antena de recolección de la luz), el fotosistema II (PS II) y el fotosistema I (PS I) (ambos contienen un centro de reacción), el citocromo b6/f y la ATP sintasa (figura 5); que mantienen la cadena transportadora de electrones (CTE) y la fotofosforilación (Badger *et al.*, 1980 y Jørgensen, 1987)

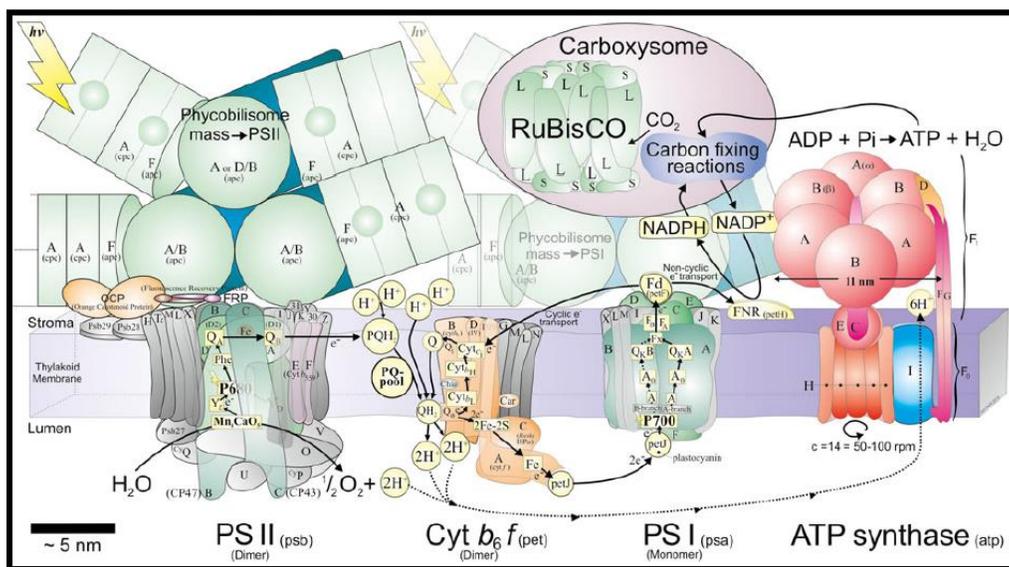


Figura 5. Diagrama de la membrana fotosintética de una célula de cianobacteria mostrando los 5 supercomplejos de la CTE y la ATP sintasa (Borowitzka *et al.*, 2016).

3. Justificación

Por lo anterior, el interés del presente trabajo es conocer los parámetros óptimos para un sistema de cultivo cerrado en lote “batch discontinuo”, de la cianobacteria *Arthrospira maxima* una cepa aislada en la zona del antiguo lago de Texcoco a partir de la modificación de las concentraciones por separado de las sales: $NaHCO_3$, $NaNO_3$, NH_4Cl , K_2HPO_4 , y $NaCl$, en el medio de cultivo Zarrouk, siendo este trabajo un estudio preliminar y que podría ser utilizado como una herramienta para futuros estudios o diseños aplicativos en biotecnología de microalgas. Además, los estudios sobre el cultivo de *A. maxima* son muy limitados, la mayoría de ellos están enfocados en *A. platensis*.

4. Hipótesis

La cinética de crecimiento y la actividad metabólica de *Arthrospira maxima*, se verán afectadas al disminuir las concentraciones por separado de NaHCO_3 , NaNO_3 , K_2HPO_4 , y NaCl (en este último aumentar) a partir del medio Zarrouk estándar, durante ocho días de cultivo en lote. Perturbando principalmente la cantidad de biomasa celular, concentración de clorofila *a* y la actividad fotoquímica.

5. Objetivo General

- Determinar la respuesta en el crecimiento y actividad fotoquímica de *Arthrospira maxima* cultivada durante ocho días, modificando las concentraciones por separado de NaHCO_3 , NaNO_3 , NH_4Cl , K_2HPO_4 , y NaCl a partir del medio Zarrouk.

6. Objetivos Particulares

- Determinar la tasa de crecimiento y de duplicación en *A. maxima* cultivada durante ocho días, modificando las concentraciones por separado de NaHCO_3 , NaNO_3 , NH_4Cl , K_2HPO_4 , y NaCl a partir del medio Zarrouk.
- Determinar la concentración total de clorofila *a* de *A. maxima* cultivada durante ocho días, modificando las concentraciones por separado de NaHCO_3 , NaNO_3 , NH_4Cl , K_2HPO_4 , y NaCl a partir del medio Zarrouk.
- Determinar la actividad fotosintética y respiratoria por liberación de oxígeno en *A. maxima* cultivada durante ocho días, modificando las concentraciones por separado de NaHCO_3 , NaNO_3 , NH_4Cl , K_2HPO_4 , y NaCl a partir del medio Zarrouk.

7. Materiales y métodos

7.1 Organismo

Se utilizó la cianobacteria *Arthrospira maxima* aislada en un muestreo de agua en un sitio cercano a la presa Nabor Carrillo sobre la autopista Peñón-Texcoco localizado en las coordenadas geográficas (19°28'27"N 99°59'20"W) en el municipio de Texcoco, Estado de México (figura 6). La muestra se trasladó al laboratorio donde fue sembrada en el medio de cultivo Zarrouk (Zarrouk, 1966).



Figura 6. Cianobacteria *Arthrospira maxima*, cepa que fue utilizada en la elaboración de este trabajo, vista al microscopio óptico con un aumento a 400 veces.

7.2 Condiciones de mantenimiento previo a la fase experimental

El mantenimiento de los organismos (cultivos semilla), así como los tratamientos experimentales fueron cultivados con el medio Zarrouk (Zarrouk, 1966) con la siguiente composición: (g/L de agua destilada) NaCl 1.0; CaCl₂ 0.04; NaNO₃ 2.5; FeSO₄ · 7H₂O 0.01; Na₂-EDTA 0.08; K₂SO₄ 1.0; MgSO₄ · 7H₂O 0.2; NaHCO₃ 16.8; K₂HPO₄ 0.50; (mg/L de agua destilada) ZnSO₄ · 7H₂O 0.222; CuSO₄ · 5H₂O 0.079; MoO₃ 0.015; H₃BO₃ 2.86; MnCl₂ · 4H₂O 1.81; NH₄VO₃ 0.023; K₂Cr₂(SO₄)₄ · 2H₂O 0.096; NiSO₄ · 7H₂O 0.048; Na₂WO₄ · 2H₂O 0.018; Ti₂(SO₄)₃ 0.040; Co(NO₃)₂ 6H₂O 0.044; pH 10.

Las células se mantuvieron sobre un régimen de cultivo en lote discontinuo en las siguientes condiciones de crecimiento: temperatura (28 ± 2 °C), PFD de $400 \mu\text{moles} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ de luz blanca actínica (400-700nm), fotoperiodo (12/12 luz/oscuridad y con un flujo de aire de $200 \text{ ml} \cdot \text{m}^{-1}$. Se utilizaron como unidades experimentales de cultivo, botellas de vidrio redondas de 1 L (Schott-Duran ®) con una trayectoria de luz de 11 cm y un volumen de trabajo de 900 ml (biorreactor) (figura 7). Para todos los experimentos se utilizaron inóculos sincronizados en la mitad de la fase exponencial, células con un crecimiento de 96 h de cultivo aproximadamente.



Figura 7. Unidad experimental, botella de vidrio redonda (Schott-Duran ®) con una trayectoria de luz de 11 cm y un volumen de trabajo de 900 ml (biorreactor), presenta un sistema de aireación que cuenta con un filtro con apertura de $0.25 \mu\text{m}$.

7.3 Protocolo experimental

Cada tratamiento se mantuvo en biorreactores en lote discontinuo sobre un régimen de cultivo con las siguientes condiciones de crecimiento: temperatura (28 ± 2 °C), PFD de $400 \mu\text{moles} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ de luz blanca actínica (400-700nm), fotoperiodo (12/12 luz/oscuridad), y con un flujo de aire de $200 \text{ ml} \cdot \text{m}^{-1}$. Se utilizaron como unidades experimentales de cultivo botellas de vidrio redondas de 1 L (Schott-Duran ®) con una trayectoria de luz de 11 cm y un volumen de trabajo de 900 ml (biorreactor), utilizándose 2 biorreactores por cada tratamiento (figura 7).

Las células posteriormente a las 96 h de sincronización fueron expuestas en experimentos separados a las siguientes concentraciones de medio Zarrouk, modificando únicamente las siguientes concentraciones de sales: el primer experimento con 2.15, 4.2, 8.4, 12.6 y (16.8-testigo) g·L⁻¹ de NaHCO₃; el segundo experimento con 0.37, 0.62, 1.25, 1.87 y (2.5-testigo) g·L⁻¹ de NaNO₃; el tercer experimento con (Zarrouk completo-testigo), 44, 66, 88 y 110 mg·L⁻¹ de NH₄Cl; el cuarto experimento con 0.075, 0.125, 0.25, 0.37 y (0.5 testigo) g·L⁻¹ de K₂HPO₄ y el quinto experimento con (1.0 testigo), 9.6, 18.2, 27.3 y 36 g·L⁻¹ de NaCl.

Las unidades experimentales se inocularon con 220±30 mg·L⁻¹ de alga en 800ml de medio Zarrouk modificado de acuerdo a cada experimento, obteniéndose un volumen de trabajo de 900ml. Cada experimento tuvo una duración de 8 días.

7.4 Variables experimentales de respuesta

a) Determinación del crecimiento por peso seco (PS)

El crecimiento se determinó a través del peso seco. Se tomaron alícuotas de 100 ml de cada muestra experimental (n=3) y se filtraron por vacío en membranas de nitrocelulosa de 5.0 µm de diámetro de poro (Millipore ®). Previamente, las membranas se llevaron a peso constante manteniéndolas a 70°C por 24 h. Una vez filtradas las muestras, se secaron en un horno a 70°C por 24 h, para después determinar el PS de la biomasa seca de acuerdo a Vonshak (1986):

La tasa de crecimiento relativo (μ) se determinó según la siguiente fórmula:

$$\mu = (\ln X_2 - \ln X_1) / d$$

Donde X_2 es el peso seco a los 8 días, X_1 es el peso seco al tiempo 0 y d es 8 días.

La tasa de duplicación celular (td) se calculó según la siguiente fórmula:

$$td = \ln 2 / \mu$$

b) Determinación del pigmento fotosintético clorofila

El contenido específico de clorofila *a* por biomasa seca se cuantificó tomando 3 ml de cultivo de cada tratamiento (n=3). Las muestras se centrifugaron a 3,500 rpm por 10 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se eliminó y la pastilla de cada tubo se resuspendió con 3 ml de metanol al 100%. La mezcla metanólica se incubó en baño maría por 10 minutos a 60°C. Transcurrido este tiempo, la muestra se centrifugó a 3,500 rpm por 10 min a temperatura ambiente. El sobrenadante de cada tubo se aforó a 5 ml con metanol al 100%, para después leer su absorbancia a 665 nm de longitud de onda. La concentración total de clorofila *a* se determinó de acuerdo a la siguiente ecuación reportada por Vonshak (1986):

$$\text{Concentración de Clorofila } a \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = (\text{D.O a 665nm}) \times 13.9$$

c) Actividad fotosintética y respiratoria por oximetría

Las tasas fotosintética y respiratoria se midieron como liberación y consumo de oxígeno. Las mediciones se realizaron por medio de un oxímetro (Oxygraph, Hansatech®, U.K.) a 30°C por medio de un baño de agua circulante (figura 8). La tasa fotosintética por liberación de oxígeno se realizó iluminando la muestra con una fuente de luz roja (600-700nm) a una densidad de flujo fotónico (PFD) de 200 $\mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, durante 1 minuto. A su vez, se apagaba la fuente de luz durante 1 minuto para obtener las velocidades respiratorias por consumo de oxígeno, realizándose intercaladamente 3 registros de actividad fotosintética y 3 registros de actividad respiratoria por alícuota de 1 mL, evaluando tres alícuotas por cada tratamiento. Cada una de las alícuotas fue ajustada a una ABS de 0.4 a una longitud de onda de 750nm previo a ser colocadas dentro de la cámara del oxímetro donde se obtuvieron sus mediciones. Los resultados de la actividad fotosintética y respiratoria fueron relacionados con el PS de sus respectivos tratamientos para obtener un ajuste específico.

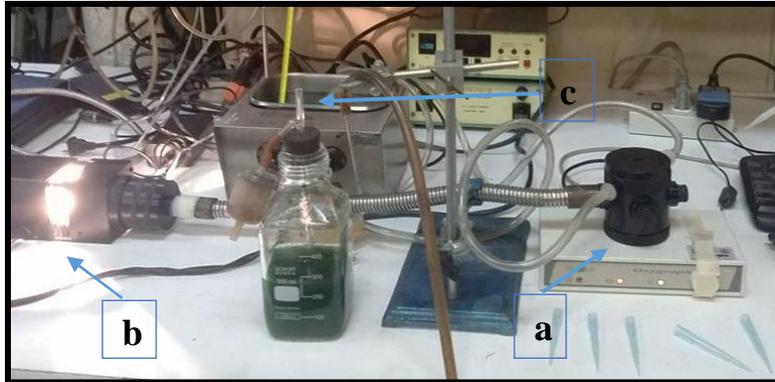


Figura 8. Mediciones de las tasas fotosintéticas y respiratorias mediante un oxímetro (Oxygraph, Hansatech®, U.K.) (a): electrodo y cámara del oxímetro; (b): fuente de luz; (c) regulación de la temperatura por medio de agua circundante.

8. Resultados y discusión

A. Curva de crecimiento

El primer experimento que se realizó fue para obtener la curva de crecimiento de la cepa *Arthrospira maxima*, en la cual se puede observar que a los 13 días de cultivo se logra alcanzar la etapa estacionaria llegando a una densidad celular de $2.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de PS de su biomasa, como se observa en la figura 9; nuestra curva de crecimiento de *A. maxima* tiene similitud a dos estudios realizados por Olguín *et al.* (2001) y Castro *et al.* (2015) en donde sus cultivos *Arthrospira sp.* y *Arthrospira platensis* fueron en sistemas cerrados, en lote discontinuo y con medio Zarrouk respectivamente, alcanzan la etapa estacionaria en un intervalo de 8 a 13 días relacionado a las diluciones en el medio Zarrouk que realizaron.

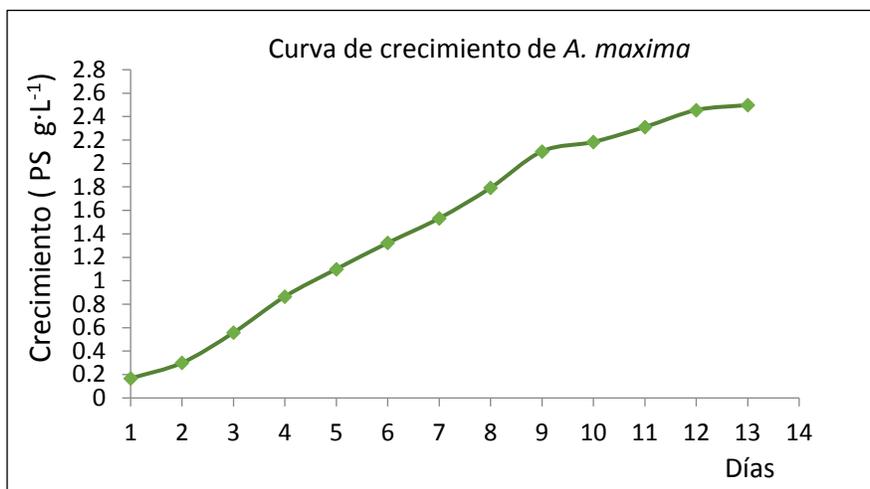


Figura 9. Curva de crecimiento de *Arthrospira maxima* cultivo en lote en un reactor cilíndrico (botella de vidrio Schott-Duran ®) con una trayectoria de luz de 11 cm y un volumen de trabajo de 1 L. Las condiciones de crecimiento fueron: Inóculo inicial (196 mg·L⁻¹), temperatura 28 ±2°C, PFD (400 μmoles · m⁻² · s⁻¹), fotoperíodo 12/12 (luz/oscuridad).

B. Efectos en la deficiencia de bicarbonato de sodio

El segundo experimento que se realizó fue para evaluar el efecto del NaHCO₃, para el crecimiento de biomasa algal en PS de *A. maxima* a los ocho días de exposición, se obtuvo que a partir del tratamiento con 8.4 g·L⁻¹ de NaHCO₃ se presenta una disminución de 220 mg·L⁻¹ de PS con respecto al grupo control, obteniéndose una concentración de biomasa de 1.18 g·L⁻¹ de PS al utilizar solamente el 50% de NaHCO₃ en el medio de cultivo. Cabe mencionar que la concentración de 8.4 g·L⁻¹ de NaHCO₃ resulto estadísticamente similar a las otras tres deficiencias probadas. Por otro lado, aunque la diferencia del tratamiento con la menor concentración de NaHCO₃ (2.1 g·L⁻¹) fue de <250 mg·L⁻¹ de PS el cultivo logró mantenerse en un comportamiento estable con respecto a la cinética que presenta *A. maxima* sin tener grandes pérdidas de biomasa, esto se puede observar en la figura 10.

Al evaluar la tasa de crecimiento relativo de los tratamientos, sin embargo, los tratamientos con concentración de 8.4 y 12.6 g·L⁻¹ de NaHCO₃, presentan valores de μ similares estadísticamente al grupo control, presentando 0.28 μ·d⁻¹ para ambas deficiencias y 0.30 μ·d⁻¹ para el control, por su parte cuando se utiliza una

concentración por debajo $8.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ NaHCO_3 el rendimiento de biomasa por día se ve afectado, esto se puede observar en la figura 11.

La diferencia de biomasa se observa de manera más notoria al enfocarnos en la obtención de las tasas de duplicación celular, esto debido a que en los tratamientos que se probaron la población se duplica en un intervalo de 2.46 a 2.6 días de manera directamente proporcional con la reducción del NaHCO_3 , distinto a la velocidad del grupo control en donde su duplicación fue en 2.3 días, esto se puede observar en la figura 12.

Por lo que se puede decir que el NaHCO_3 al 50% de la concentración del medio Zarrouk sigue siendo suficiente para no perder la cinética de cultivo de esta cepa y poder obtener concentraciones de biomasa con un rendimiento similar al control.

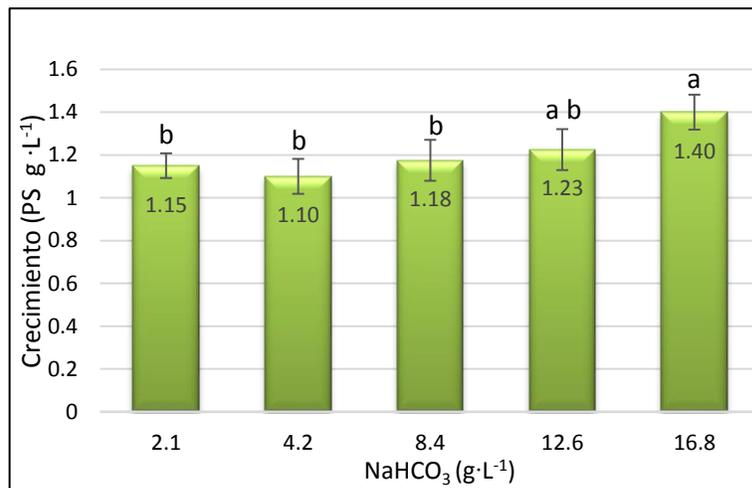


Figura 10. Efecto de las concentraciones de NaHCO_3 sobre el crecimiento volumétrico ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de PS) de *A. maxima* a los 8 días de exposición. ($n=3$) (letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a prueba de ANOVA-Tukey $p<0.05$).

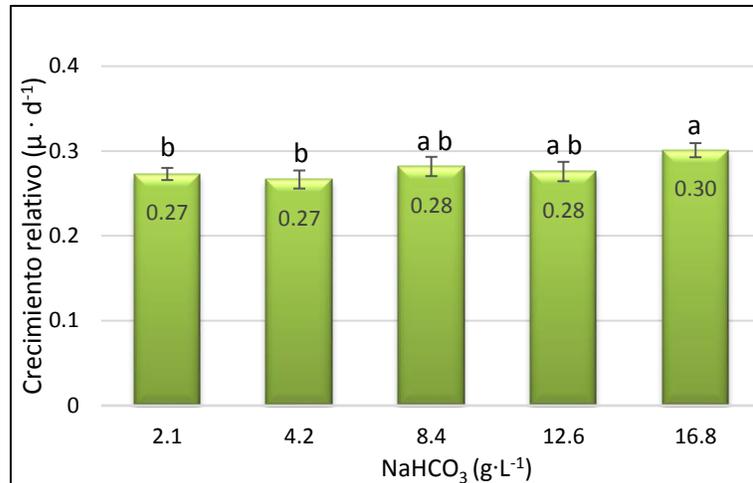


Figura 11. Efecto de las concentraciones de NaHCO₃ sobre el crecimiento relativo (μ·d⁻¹) de *A. maxima* a los 8 días de exposición. (n=3) (letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a prueba de ANOVA-Tukey p<0.05).

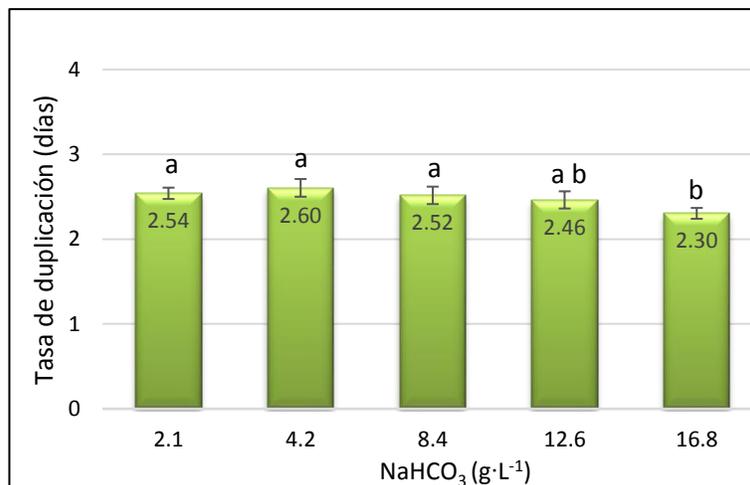


Figura 12. Efecto de las concentraciones de NaHCO₃ sobre la tasa de duplicación (días) de *A. maxima* a los 8 días de exposición. (n=3) (letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a prueba de ANOVA-Tukey p<0.05).

Es importante hacer énfasis nuevamente que nuestro cultivo semilla que se utilizó para evaluar tanto en este experimento como en los otros cuatro restantes, provenía de un medio de cultivo Zarrouk completo o “nuevo”, esta condición resulta crucial para aplicaciones biotecnológicas, ya que las células de *A. maxima* parece ser que almacenan energía en forma de biomoléculas y en el momento que se presenten las condiciones desfavorables en el medio de cultivo es cuando la célula empieza a

degradar algunas moléculas a cambio de no detener su replicación (Vonshak, 1997^a); es decir, el organismo mantiene la misma cantidad celular pero diferente cantidad y composición en sus carbohidratos, lípidos y proteínas. Ya es conocido que la disminución del NaHCO_3 hasta cierto punto no tiene efectos significativos en la cantidad de biomasa, por ejemplo, Olgúin *et al.* (2001) utilizaron medio Zarrouk con $9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaHCO_3 , a $32 \text{ }^\circ\text{C}$, con un fotoperíodo de 12h luz/oscuridad y con $144 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de fuente de luz, donde tuvieron crecimientos de *Arthrospira sp.* de $0.97 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de PS a los 6 días. Otro trabajo fue el de Castro *et al.* (2015) quienes utilizando medio Zarrouk con $9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaHCO_3 pero además se redujo el nitrato de sodio ($0.85 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaNO_3) los cultivos estuvieron a $32 \text{ }^\circ\text{C}$, y con $111 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de fuente de luz, donde tuvieron crecimientos de *A. platensis* de $2.05 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de PS a los 21 días. Por otra parte, Andrade & Costa (2008), crecieron *A. platensis* a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ con un fotoperíodo de 12h luz/oscuridad, 2500 Lux de iluminación y cultivados con medio Zarrouk diluído con agua destilada estéril al 20% v/v, donde tuvieron crecimientos de $1.44 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de PS a los 20 días. También, Radmann *et al.* (2007), encontraron rendimientos similares a un cultivo completo al diluir en un 20% el medio de cultivo Zarrouk, lo que crea la posibilidad de probar concentraciones más bajas, pero sin olvidarse de que el NaHCO_3 además de servir como la fuente de carbono para la célula tiene la función de ser un amortiguador manteniendo un pH alcalino, se sabe también que posterior a los 10 días de cultivo el pH empieza a acidificarse.

Por su parte, al evaluar la concentración de clorofila *a* específica de *A. maxima* en los tratamientos, se obtuvo que no existieron diferencias estadísticamente significativas, debido a que el tratamiento con la mayor deficiencia, siendo la de $2.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaHCO_3 tuvo una concentración de $8.31 \text{ mg de chl a}\cdot\text{g}^{-1}$ de PS, esta concentración no tuvo diferencia con respecto al grupo control que tuvo una concentración de $8.36 \text{ mg de chl a}\cdot\text{g}^{-1}$ de PS, como se observa en la figura 13; esto quiere decir, que a pesar de que los tratamientos con las concentraciones por debajo de $8.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaHCO_3 se ven afectadas ligeramente las concentraciones de biomasa algal, la concentración de clorofila *a* por cantidad de biomasa se

mantiene estadísticamente similar al grupo control, esta condición resulta económicamente relevante en aplicaciones biotecnológicas.

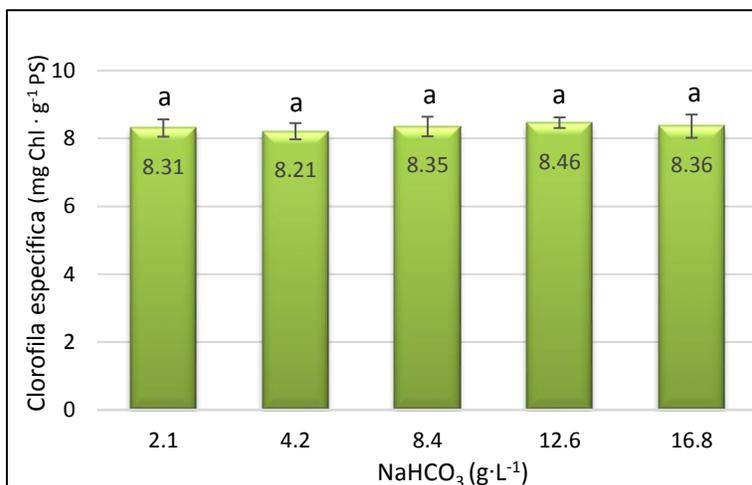


Figura 13. Efecto de las concentraciones de NaHCO₃ sobre clorofila *a* específica (mg de chl *a* · g⁻¹ de PS) de *A. maxima* a los 8 días de exposición. (n=3) (letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a prueba de ANOVA-Tukey p<0.05).

Por último, en este experimento se evaluaron las tasas fotosintéticas donde presentaron concentraciones de liberación de O₂ para cada tratamiento estadísticamente similares, siendo para el tratamiento con la concentración más baja (2.1 g·L⁻¹ de NaHCO₃) de 163.6 nmoles O₂ · g⁻¹ de PS · min, por su parte tuvo 180.6 nmoles O₂ · g⁻¹ de PS · min el grupo control, presentándose velocidades fotosintéticas intermedias entre los tratamientos probados, esto se puede observar en la figura 14; en esta misma figura se presentan los resultados de las tasas respiratorias de cada tratamiento en donde tampoco hubo diferencias estadísticamente significativas, presentando el tratamiento con la concentración más baja (2.1 g·L⁻¹ de NaHCO₃) una velocidad de consumo de O₂ de 93.6 nmoles O₂ · g⁻¹ de PS · min, esta concentración no tuvo diferencia con respecto al grupo control que tuvo una concentración de 99.7 nmoles O₂ · g⁻¹ de PS · min, presentándose velocidades respiratorias intermedias entre los tratamientos probados.

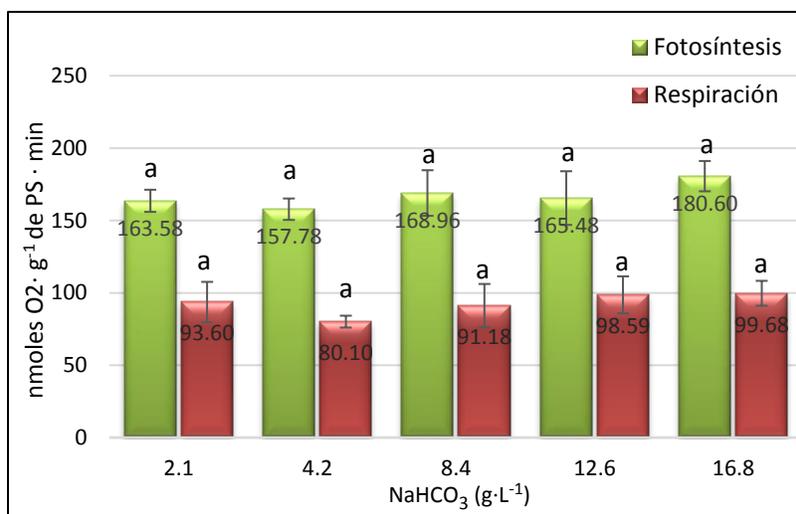


Figura 14. Efecto de las concentraciones de NaHCO₃ sobre la tasa fotosintética y respiratoria (nmoles O₂ · g⁻¹ de PS · min) de *A. maxima* a los 8 días de exposición. (n=3) (letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a prueba de ANOVA-Tukey p<0.05).

C. Efectos en la deficiencia de nitrato de sodio

El este experimento se evaluó el efecto del NaNO₃, para el crecimiento de biomasa algal en PS de *A. maxima* a los ocho días de exposición, se obtuvo que a partir del tratamiento con la concentración de 1.25 g·L⁻¹ de NaNO₃ se presenta una disminución de 240 mg·L⁻¹ de PS con respecto al grupo control, obteniéndose una concentración de biomasa para este tratamiento de 0.81 g·L⁻¹ de PS de biomasa. Además, este tratamiento resulta estadísticamente similar a los otros dos tratamientos probados por debajo de esta concentración. Por su parte el tratamiento con la concentración al 75% de nitrógeno (1.87 g·L⁻¹ de NaNO₃) resulto estadísticamente similar al control, obteniéndose 1.0 y 1.05 g·L⁻¹ de PS respectivamente. Por lo que se puede decir que el NaNO₃ al 75% de concentración a los 8 días de cultivo sigue teniendo un rendimiento óptimo al igual que el grupo control. Por otro lado, aunque la diferencia del tratamiento con la menor concentración de NaNO₃ (0.37 g·L⁻¹) fue de <320 mg·L⁻¹ de PS (con respecto al control) el cultivo se logró mantener en un comportamiento estable con respecto a la cinética que presenta *A. maxima*, esto se puede observar en la figura 15. Por su parte, al evaluar la tasa de crecimiento relativo los tratamientos con concentración de 0.37, 0.62, 1.25 g·L⁻¹ de NaNO₃ resultaron estadísticamente diferentes al grupo control, presentando el valor de 0.22 μ·d⁻¹ para la primera y 0.24

$\mu\cdot d^{-1}$, 0.24 en las dos últimas concentraciones. El tratamiento con concentración de $1.87\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaNO_3 también fue estadísticamente diferente al grupo control, aunque fue que tuvo el crecimiento relativo más cercano siendo 0.27 y $0.29\ \mu\cdot d^{-1}$, respectivamente, los valores de crecimiento relativo se pueden observar en la figura 16.

La diferencia en su crecimiento se observa de manera más notoria al enfocarnos en la obtención de las tasas de duplicación celular, esto debido a que en los tratamientos con 0.37 , 0.62 , $1.25\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaNO_3 la población se duplica en un intervalo de 3.09 a 2.89 días de manera directamente proporcional con la reducción de NaNO_3 , por su parte el tratamiento con la concentración de $1.87\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaNO_3 si resulto similar al grupo control, en donde la velocidad de duplicación obtenidas fue de 2.56 y 2.31 respectivamente, esto se puede observar en la figura 17.

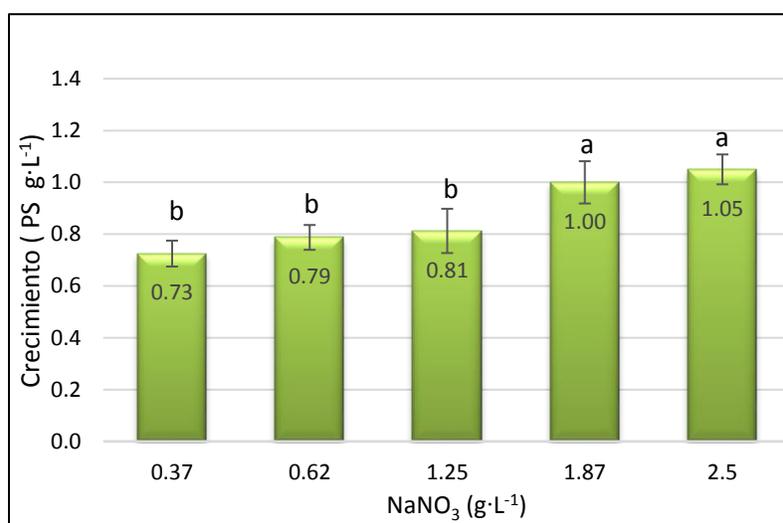


Figura 15. Efecto de las concentraciones de NaNO_3 sobre el crecimiento volumétrico ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ de PS) a los 8 días de exposición. ($n=3$) (letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a prueba de ANOVA-Tukey $p<0.05$).

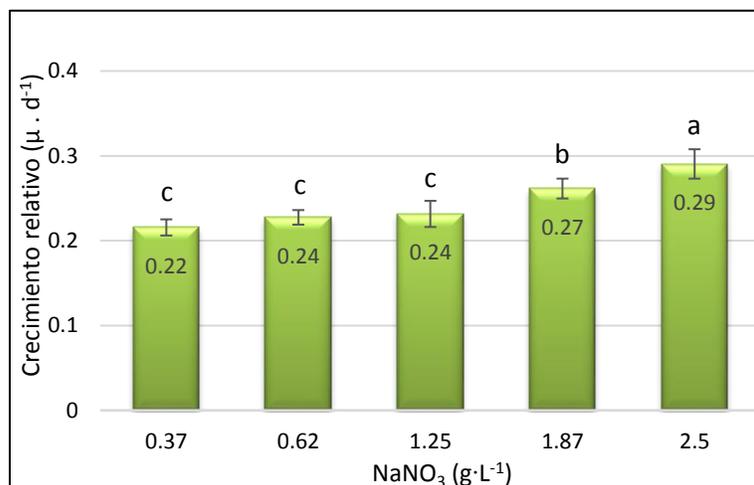


Figura 16. Efecto de las concentraciones de NaNO₃ sobre el crecimiento relativo ($\mu \cdot d^{-1}$) de *A. maxima* a los 8 días de exposición. (n=3) (letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a prueba de ANOVA-Tukey $p < 0.05$).

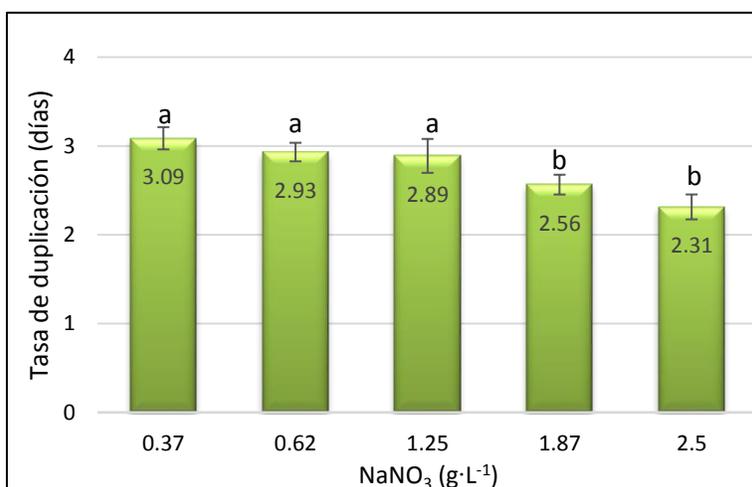


Figura 17. Efecto de las concentraciones de NaNO₃ sobre la tasa de duplicación (días) de *A. maxima* a los 8 días de exposición. (n=3) (letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a prueba de ANOVA-Tukey $p < 0.05$).

Al comparar nuestros resultados, por ejemplo, con un estudio realizado por Colla *et al.* (2007) encontraron algo similar, los cultivos de *A. platensis* estuvieron a 30 y 35 °C, 12 luz/12 oscuridad y con 32 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiación, donde obtuvieron que concentraciones por debajo de 1.87 g·L⁻¹ de NaNO₃ producen menor biomasa (≤ 0.21 g·L⁻¹ de PS) que la concentración de 2.5 g · L⁻¹, a 35 ° C de temperatura, sin embargo, cuando sus cultivos los crecen a una temperatura de 30 °C, concentraciones entre 0.62

y $2.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ no producen diferencias en la biomasa (0.82 a $0.92 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de PS), sus tratamientos fueron evaluados a los 20 días de exposición. Se encontró además que a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ y entre la concentración de 1.87 a $2.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaNO_3 se aumenta la producción de proteínas, lípidos y compuestos fenólicos. Sin embargo, Piorreck *et al.* (1984) encontraron que la concentración de nitrógeno tenía poca influencia en la composición total de lípidos y ácidos grasos de algunas cianobacterias, incluida *Spirulina platensis*, siendo la influencia del nitrógeno más marcada en las algas eucarióticas.

En otro trabajo, realizado por Çelekli y Yavuzatmaca (2009), sus cultivos de *A. platensis* estuvieron a $30 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, 12 h luz/12 h oscuridad y con $2,0 \text{ klux}$ de irradiación, donde obtuvieron que concentraciones de $2.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y $3.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaNO_3 producen la misma cantidad de biomasa, siendo de $2.6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de PS, ambas cantidades de biomasa menores que cuando se utiliza $2.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaNO_3 . En el mismo estudio, también probaron que concentraciones de 0.5 y $1.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaCl afectan la cantidad de biomasa cuando la concentración es de $2.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y $3.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaNO_3 , estando entre 0.8 a $1.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de PS (utilizando una concentración de $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaCl) y entre 1.0 a $2.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de PS (utilizando una concentración de $1.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaCl), los tratamientos fueron evaluados a 10 días de exposición. Es decir, a una menor concentración de NaCl se reduce la cantidad de biomasa para cualquier concentración de NaNO_3 , pero si la concentración de NaCl es mayor solo se afecta la cantidad de biomasa cuando la concentración está por debajo de $2.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaNO_3 .

Sin embargo, es crucial mencionar lo reportado por Vonshak *et al.* (1982) ellos mencionan que los cambios en la concentración de los nutrientes, principalmente en la fuente de nitrógeno y fósforo, pueden resultar en diferentes respuestas cinéticas de crecimiento y composición de la biomasa, así también los regímenes de luz/oscuridad son un factor para promover estas diferencias.

Por lo que de acuerdo a nuestros resultados, podemos decir, que si nos interesa obtener altas productividades de biomasa se puede reducir el NaNO_3 , pero manteniendo una temperatura cercana a los $30 \text{ }^\circ\text{C}$, por el contrario, si la intención es obtener mayor concentración de proteína (o algún otro bioproducto de alto valor agregado) no se recomienda reducir demasiado el NaNO_3 y además se podría cultivar a una temperatura cercana a los $35 \text{ }^\circ\text{C}$ ya que el nitrógeno estará sobrado en el medio.

Por su parte, al evaluar la concentración de clorofila *a* específica de *A. maxima* en los tratamientos, se pudo determinar que no existieron diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control, las concentraciones de chl *a* presentaron valores en un intervalo de 8.26 a 8.74 mg de chl *a* · g⁻¹ de PS, siendo 8.26 mg de chl *a* · g⁻¹ de PS en el tratamiento con menor concentración de nitrógeno (0.37 g·L⁻¹ de NaNO₃), como se observa en la figura 18. A pesar de que no se obtuvieron diferencias en nuestros valores de chl *a* específica, en un estudio realizado por Becker (1994) en donde menciona que la limitación de nitrógeno provoca variaciones en la composición de pigmentos celulares, donde la clorofila *a* y las PBP's disminuyen y los carotenoides se acumulan; además de la acumulación de compuestos de carbono orgánicos tales como polisacáridos y ciertos aceites (PUFAs).

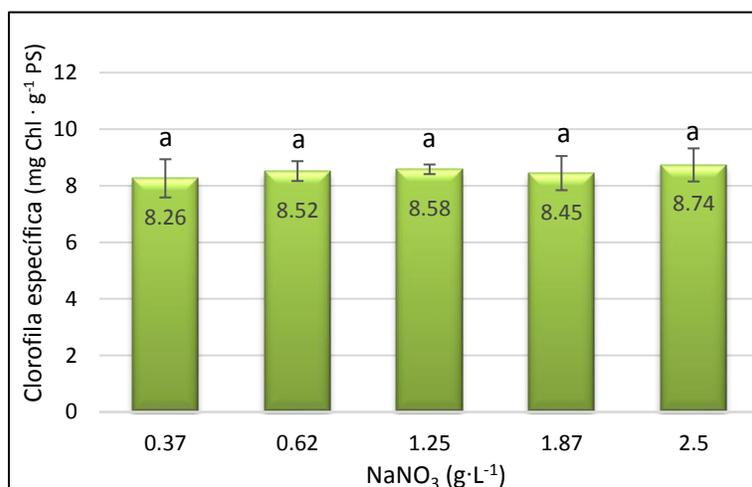


Figura 18. Efecto de las concentraciones de NaNO₃ sobre clorofila *a* específica (mg de chl *a* · g⁻¹ de PS) de *A. maxima* a los 8 días de exposición. (n=3) (letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a prueba de ANOVA-Tukey p<0.05).

Por último, en este experimento se evaluaron las tasas fotosintéticas, en donde presentaron concentraciones de liberación de O₂ para cada tratamiento estadísticamente similares, donde para el tratamiento con la menor concentración (0.37 g·L⁻¹ de NaNO₃) su tasa fotosintética fue de 122.9 nmoles O₂ · g⁻¹ de PS · min, siendo la velocidad para el grupo control de 141.7 nmoles O₂ · g⁻¹ de PS · min, presentándose velocidades fotosintéticas similares entre los otros tratamientos

probados, esto se puede observar en la figura 19; en esta misma figura se presentan los resultados de las tasas respiratorias de cada tratamiento, destacándose una disminución gradual en los valores de respiración, en donde las concentraciones de 0.37, 0.62 y 1.25 g·L⁻¹ de NaNO₃ tuvieron velocidades de consumo de O₂ diferentes al grupo control, presentando valores de 68.9, 80.1 y 77.9 nmoles O₂ · g⁻¹ de PS · min respectivamente, mientras que la velocidad de consumo de O₂ para el grupo control fue de 97.2 nmoles O₂ · g⁻¹ de PS · min.

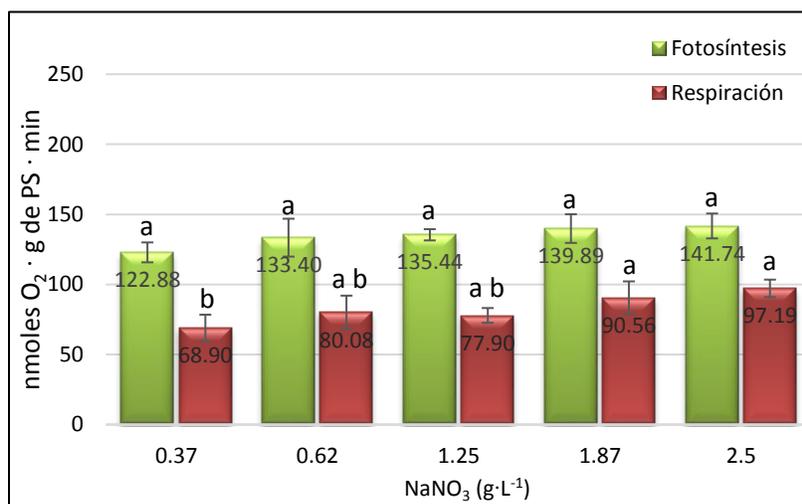


Figura 19. Efecto de las concentraciones de NaNO₃ sobre la tasa fotosintética y respiratoria (nmoles O₂ · g⁻¹ de PS · min) de *A. maxima* a los 8 días de exposición. (n=3) (letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a prueba de ANOVA-Tukey p<0.05).

D. Efecto en las deficiencias de cloruro de amonio

El este experimento se evaluó el efecto del NH₄Cl, para el crecimiento de biomasa algal en PS de *A. maxima* a los ocho días de exposición el tratamiento con la mayor concentración de NH₄Cl (110 mg·L⁻¹ de NH₄Cl) probada no produjo toxicidad en cuanto a la concentración de la biomasa celular y además fue el tratamiento con la concentración de biomasa más alta, siendo de 1.41 g·L⁻¹ de PS algal. Además, los tratamientos con las concentraciones de 88 y 66 mg·L⁻¹ de NH₄Cl fueron estadísticamente similares al tratamiento con la mayor concentración de NH₄Cl, para estos tratamientos la concentración de biomasa celular fue de 1.35 y 1.34 g·L⁻¹

¹ de PS algal, respectivamente. Por su parte, el tratamiento con la concentración de 44 mg·L⁻¹ de NH₄Cl tuvo una concentración de 1.25 g·L⁻¹ de PS algal.

Al evaluar la tasa de crecimiento relativo ocurre la misma tendencia en donde los tratamientos con 66, 88 y 110 mg·L⁻¹ de NH₄Cl fueron estadísticamente similares entre sí presentaron velocidades de crecimiento de 0.30, 0.29 y 0.30 μ·d⁻¹ respectivamente, como se observa en la figura 20. Por su parte, las tasas de duplicación celular de los tratamientos nos muestran valores estadísticamente similares con valores entre 2.29 a 2.43 días entre las concentraciones de 44 a 110 mg·L⁻¹ de NH₄Cl. Como se vio en nuestros resultados, los cuatro tratamientos probados tuvieron mayor crecimiento que el grupo control, es decir, las células crecen con mayor facilidad cuando tienen como fuente de nitrógeno al NH₄Cl que cuando se utiliza el NaNO₃, al menos hasta los 8 días de cultivo, ya que se sabe que el amonio llega a acidificar los medios ya sea por concentración elevada o por prolongación del tiempo de exposición al cultivo celular, pero también hay que tener en cuenta que es más complicado eliminar el amonio al momento de cosechar la biomasa. Sin embargo, el uso de NH₄Cl como fuente de nitrógeno resulta crucial en la producción de *A. maxima* a gran escala debido a que es una fuente de nitrógeno mucho más económica comparado con el NaNO₃ y además se obtienen rendimientos mayores ya que la célula gasta menos energía al tener una fuente de nitrógeno más reducida (NH₄Cl) por ende la replicación celular fue mayor que nuestro control. Aunque se debe tener cuidado en no rebasar concentraciones superiores de amonio para poder evitar la toxicidad.

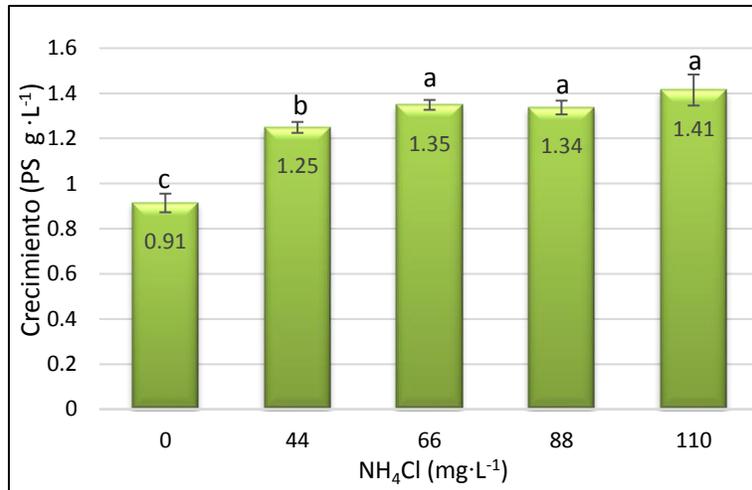


Figura 20. Efecto de las concentraciones de NH₄Cl sobre el crecimiento volumétrico (g · L⁻¹ de PS) a los 8 días de exposición. (n=3) (letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a prueba de ANOVA-Tukey p<0.05).

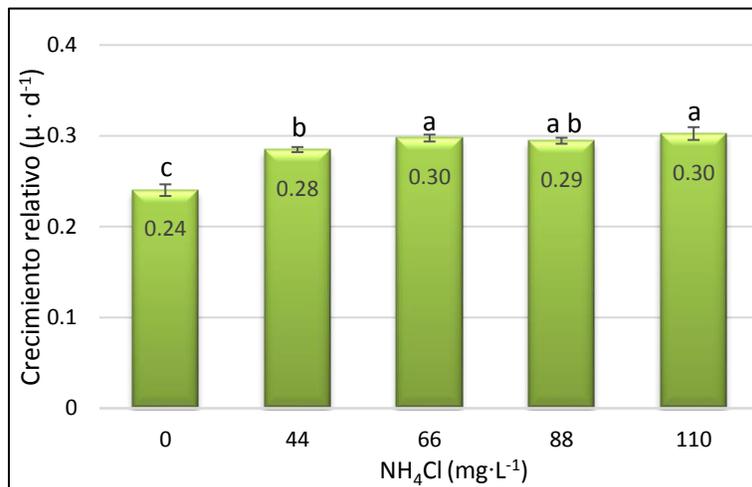


Figura 21. Efecto de las concentraciones de NH₄Cl sobre el crecimiento relativo (μ · d⁻¹) de *A. maxima* a los 8 días de exposición. (n=3) (letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a prueba de ANOVA-Tukey p<0.05).

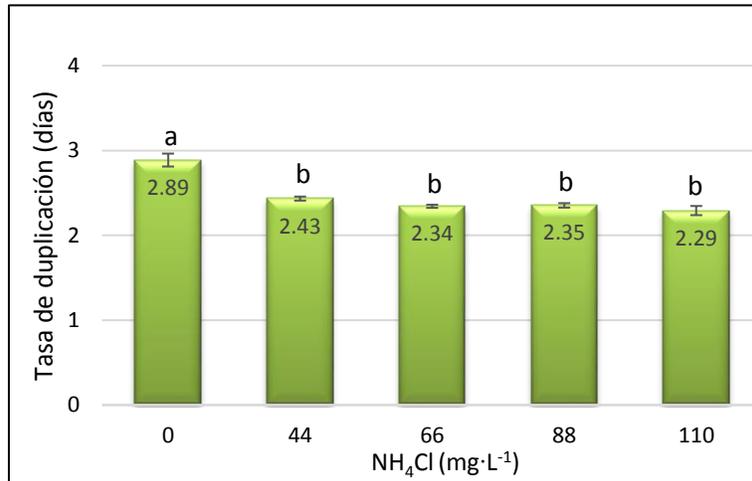


Figura 22. Efecto de las concentraciones de NH₄Cl sobre la tasa de duplicación (días) de *A. maxima* a los 8 días de exposición. (n=3) (letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a prueba de ANOVA-Tukey p<0.05).

AL comparar nuestros resultados, por ejemplo, con un estudio realizado por Carvalho *et al.* (2004) ellos encontraron algo similar, los cultivos de *A. platensis* estuvieron en lotes a 30 ° C, 12 luz/12 oscuridad y con 72 o 144 μmol photons m⁻² s⁻¹ de irradiación, utilizaron medio Zarrouk estándar al cual le fue remplazado el NaNO₃ con NH₄Cl en tres diferentes concentraciones (10.6, 122 y 1225 mg·L⁻¹ de NH₄Cl), donde obtuvieron crecimientos celulares de 0.9, 1.05 y 1.26 g·L⁻¹ de PS para las concentraciones de 10.6, 122 y 1225 mg·L⁻¹ de NH₄Cl respectivamente, estos valores cuando se expuso a baja irradiación (72 μmol photons m⁻² s⁻¹); en el caso de la irradiación a 144 μmol photons m⁻² s⁻¹ solo se hizo el experimento a la concentración de 10.6 mg·L⁻¹ de NH₄Cl y fue en este donde obtuvieron la mayor concentración de biomasa, siendo esta de 1.45 g·L⁻¹ de PS.

En otro estudio, realizado por Sassano *et al.* (2007), los cultivos de *A. platensis* estuvieron en lotes a 30 °C, 12 luz/12 oscuridad y con 180 μmol photons m⁻² s⁻¹ de irradiación, utilizaron medio Zarrouk estándar al cual le fue remplazado el NaNO₃ con NH₄Cl en dos diferentes concentraciones (53.5 y 535 mg·L⁻¹ de NH₄Cl), obtuvieron crecimientos celulares de 0.8 g·L⁻¹ de PS para la concentración baja de NH₄Cl y 1.4 g·L⁻¹ de PS para la concentración mayor de NH₄Cl, midieron a los 12 días de experimentación sus tratamientos.

Por último, en un estudio realizado nuevamente por Sassano *et al.* (2010), los cultivos de *A. platensis* estuvieron en lotes a 30 °C, 12 luz/12 oscuridad y con 108 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de irradiación, utilizaron medio Zarrouk estándar al cual le fue remplazado el NaNO_3 con NH_4Cl , las concentraciones utilizadas esta vez fueron (53.5, 267 y 535 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de NH_4Cl), obtuvieron crecimientos celulares de 0.42 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de PS para la concentración de 53.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NH_4Cl , de 0.59 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de PS para la concentración de 267 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NH_4Cl y de 0.78 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de PS para la concentración de 535 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NH_4Cl . Además, en este mismo estudio de Sassano *et al.* se obtuvieron las proporciones de su composición bioquímica, teniendo 18, 46 y 72 % de proteína; 7, 16 y 17 % de lípidos; 66, 29 y 3 de carbohidratos para cada concentración de NH_4Cl (53.5, 267 y 535 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) respectivamente. Es decir, aun cuando la fuente de nitrógeno tiene una concentración alta de NH_4Cl , pero sin llegar a la toxicidad, el contenido de proteínas y lípidos tiende a incrementar, por el contrario, cuando la concentración de nitrógeno es baja lo que tiende a aumentar es el contenido de polisacáridos y no así el de proteínas y lípidos.

Finalmente, de acuerdo a nuestros resultados obtenidos para esta cepa de *A. maxima*, el uso de esta cianobacteria podría ser de gran importancia no solo en metodologías limpias para su cultivo como alimento para el ser humano; pero además, puede ser una gran candidata en el campo de tratamiento de aguas residuales, debido a que el amoníaco es la forma contaminante más extendida de nitrógeno en aguas contaminadas y se podría incorporar en los proceso de saneamiento la utilización de esta cianobacteria para la absorción de este contaminante.

Por su parte, al evaluar la concentración de clorofila a específica de *A. maxima* en los tratamientos, se pudo determinar que a pesar de que las concentraciones probadas de NH_4Cl no afectan el crecimiento de biomasa algal entre sí, los tratamiento con 44 y 66 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de NH_4Cl presentaron menor contenido de chl a con respecto al grupo control (que fue el que contenía el mismo porcentaje de N pero como NaNO_3 que la concentración de 110 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de NH_4Cl) obteniéndose 10.9 y 11.2 $\text{mg de chl a}\cdot\text{g}^{-1}$ de PS respectivamente. Por su parte el grupo control a

pesar de haber sido el que menos biomasa produjo en este caso fue el que mayor chl *a* sintetizó, obteniéndose 12.75 mg de chl *a* · g⁻¹ de PS. Sin embargo, las concentraciones de 88 y 110 mg · L⁻¹ de NH₄Cl fueron similares al grupo control, presentando una concentración de 12.12 y 12.15 mg de chl *a* · g⁻¹ de PS respectivamente.

Un estudio realizado por Becker (1994) menciona que la limitación de nitrógeno, sin importar la fuente, provoca variaciones en la composición de pigmentos celulares, donde la clorofila *a* y las PBPs disminuyen y los carotenoides se acumulan; además de la acumulación de compuestos de carbono orgánicos tales como polisacáridos y ciertos aceites (PUFAs). Teniendo en cuenta que cuando se utiliza la NH₄Cl se agrega un % de nitrógeno menor comparado al utilizar el NaNO₃ como fuente de nitrógeno.

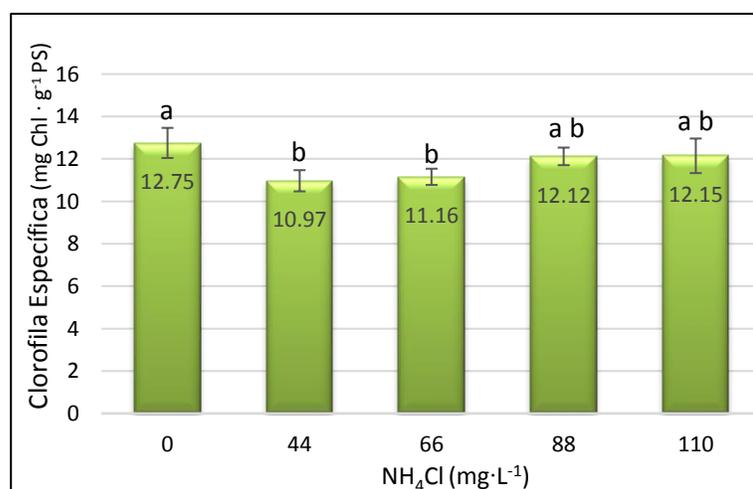


Figura 23. Efecto de las concentraciones de NH₄Cl sobre clorofila *a* específica (mg de chl *a* · g⁻¹ de PS) de *A. maxima* a los 8 días de exposición. (n=3) (letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a prueba de ANOVA-Tukey p<0.05).

Se evaluaron las tasas fotosintéticas de cada tratamiento, donde los tratamientos fueron similares entre sí, pero siendo sus velocidades de liberación de O₂ menores al grupo control, los valores que se obtuvieron para los tratamientos de 44, 66, 88 y 110 mg·L⁻¹ de NH₄Cl se encuentran en un intervalo de 109.8 a 112.5 nmoles O₂ · g⁻¹ de PS · min, esto se puede observar en la figura 24; en esta misma figura se

presentan los resultados de las tasas respiratorias de cada tratamiento en donde se mantiene el mismo comportamiento que se observó en las tasas fotosintéticas, es decir, las velocidades de consumo de O₂ son similares entre los tratamientos pero distintas al grupo control, los tratamientos de 44, 66, 88 y 110 mg·L⁻¹ de NH₄Cl presentaron valores en un intervalo de 83.4 a 89.63 nmoles O₂ · g⁻¹ de PS · min.

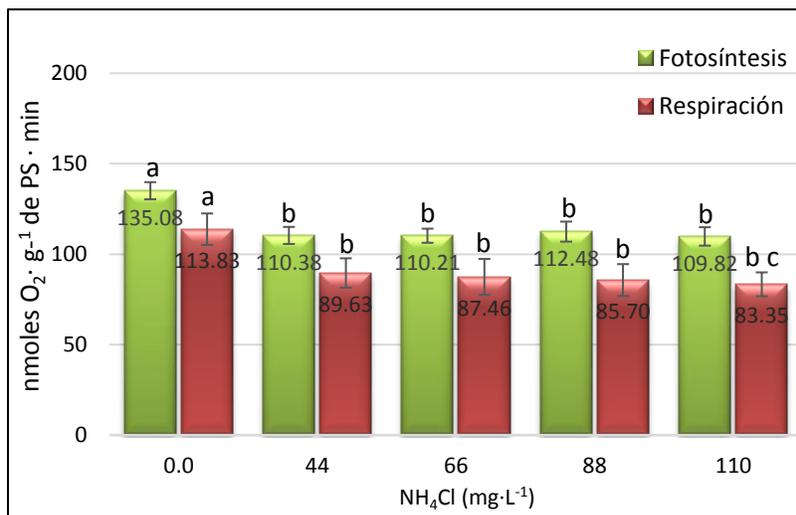


Figura 24. Efecto de las concentraciones de NH₄Cl sobre la tasa fotosintética y respiratoria (nmoles O₂ · g⁻¹ de PS · min) de *A. maxima* a los 8 días de exposición. (n=3) (letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a prueba de ANOVA-Tukey p<0.05).

E. Efecto de las deficiencias de fosfato de potasio

En este experimento se evaluó el efecto del K₂HPO₄, para el crecimiento de biomasa algal en PS de *A. maxima* a los ocho días de exposición, se obtuvo que todos los tratamientos tuvieron un crecimiento de biomasa menor con respecto al grupo control, en donde las concentraciones de 0.07, 0.125 y 0.37 g · L⁻¹ de K₂HPO₄ fueron estadísticamente similares, se obtuvo una biomasa de 1.23, 1.18 y 1.25 g · L⁻¹ de PS respectivamente. La concentración de 0.125 g · L⁻¹ de K₂HPO₄ fue la que tuvo mayor contenido de biomasa después del control, teniendo una disminución de 220 mg·L⁻¹ de PS que el grupo control, esto se puede observar en la figura 25.

Por su parte, al evaluar la tasa de crecimiento relativo para cada tratamiento, se mantuvo la misma tendencia, es decir, nuestros cuatro tratamientos presentaron estadísticamente menor biomasa que el grupo control; los cuatro tratamientos (0.07, 0.125, 0.25 y 0.37 g · L⁻¹ de K₂HPO₄) si fueron similares entre sí, presentando

velocidades de crecimiento relativo en un intervalo de 0.28 a 0.29 $\mu\cdot d^{-1}$, por su parte el grupo control tuvo 0.32 $\mu\cdot d^{-1}$, esto se puede observar en la figura 26.

Finalmente, en las tasas de duplicación, hay esa misma tendencia ya que ninguno de los tratamientos fue estadísticamente similar al grupo control; pero los 4 tratamientos (0.07, 0.125, 0.25 y 0.37 $g \cdot L^{-1}$ de K_2HPO_4) si fueron similares entre sí duplicándose la población en un intervalo de 2.37 a 2.46 días, mientras que para la población celular del grupo control fue en 2.2 días, como se observa en la figura 27. Como pudimos ver, a pesar de que los tratamientos probados tuvieron menor cantidad de biomasa con respecto al grupo control, los tratamientos lograron mantener en un comportamiento estable con respecto a la cinética que presenta *A. maxima* sin tener grandes pérdidas de biomasa, lo que resulta biotecnológicamente importante para reducir costos.

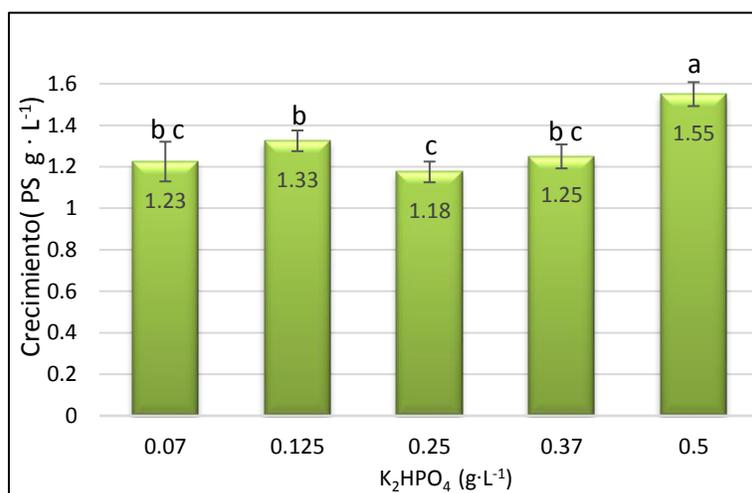


Figura 25. Efecto de las concentraciones de K_2HPO_4 sobre el crecimiento volumétrico ($g \cdot L^{-1}$ de PS) a los 8 días de exposición. ($n=3$) (letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a prueba de ANOVA-Tukey $p<0.05$).

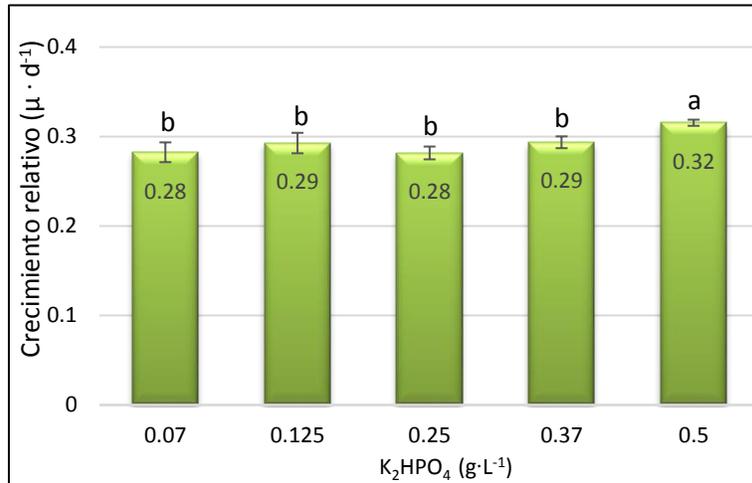


Figura 26. Efecto de las concentraciones de K₂HPO₄ sobre el crecimiento relativo (μ·d⁻¹) de *A. maxima* a los 8 días de exposición. (n=3) (letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a prueba de ANOVA-Tukey p<0.05).

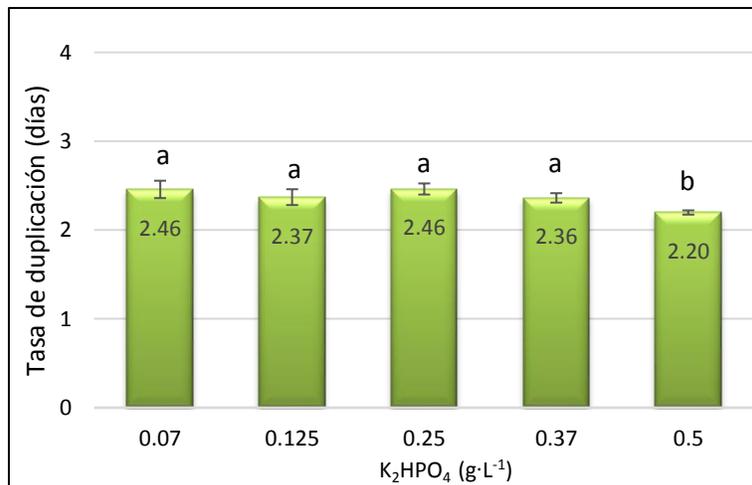


Figura 27. Efecto de las concentraciones de K₂HPO₄ sobre la tasa de duplicación (días) de *A. maxima* a los 8 días de exposición. (n=3) (letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a prueba de ANOVA-Tukey p<0.05).

Al comparar nuestros resultados, por ejemplo, un trabajo reportado por Markou *et al.* (2012) en donde ellos probaron las limitantes de K₂HPO₄, donde al reducir al 50% la cantidad de fosfato en el medio Zarrouk, es decir, se usó 0.25 g·L⁻¹ de K₂HPO₄ donde se obtuvo una tasa de crecimiento relativo de 0.28 μ·d⁻¹, incluso ligeramente superior a la que presento su grupo control que fue de 0.26 μ·d⁻¹. Además, en este mismo trabajo se encontró una relación directamente proporcional

con respecto a la cantidad de luz, en donde al aumentar la PFD el cultivo consume más rápido la fuente de fósforo cuando este es limitante ($\leq 0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de K_2HPO_4), consiguiendo tasas de crecimiento relativo en un intervalo de 0.29 a $0.32 \mu\text{d}^{-1}$. En este mismo estudio sus resultados demuestran que las concentraciones de proteína, lípidos y clorofila de la biomasa no se ven disminuidas, a pesar de utilizar el fósforo limitado e intensidades de luz baja.

Por otra parte, se observa en la figura 28 las concentraciones de clorofila a específica en donde los tratamientos con concentraciones de 0.07, 0.125 y $0.25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de K_2HPO_4 presentaron mayor chl a que el tratamiento con concentración de $0.37 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de K_2HPO_4 e incluso que el grupo control, es decir, se obtuvo en estos tres tratamientos chl a específica en un intervalo de 9.1 a $9.6 \text{ mg chl a} \cdot \text{g}^{-1}$ de PS, podemos decir que aparentemente la reducción del fósforo potencializa la síntesis de más cantidad de chl a, se sabe que el fósforo en exceso llega a afectar la asimilación de otros nutrientes, tal es el caso del ion Mg, componente fundamental en la clorofila y probablemente la cantidad de fósforo que tiene el medio Zarrouk estándar pudiera afectar ligeramente una mayor absorción de este ion. Aunque, como ya vimos Markou *et al.* (2012), indicaron que las limitantes en el contenido de fósforo no afectan la concentración de clorofila.

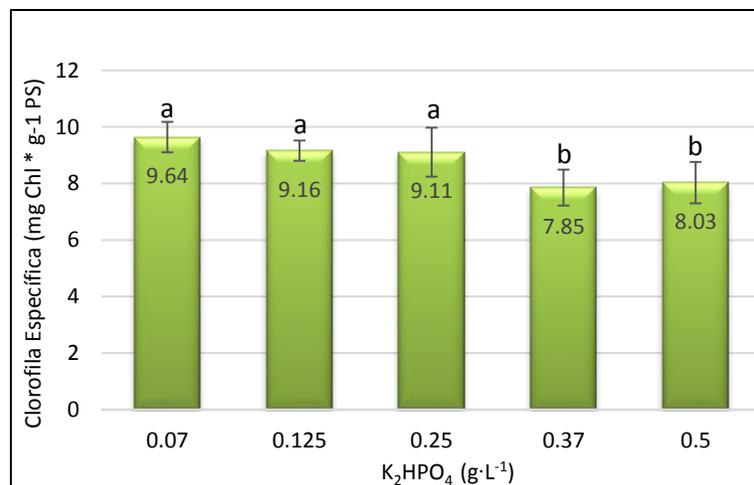


Figura 28. Efecto de las concentraciones de K_2HPO_4 sobre clorofila a específica (mg de chl a $\cdot \text{g}^{-1}$ de PS) de *A. maxima* a los 8 días de exposición. ($n=3$) (letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a prueba de ANOVA-Tukey $p < 0.05$).

Finalmente, en este experimento se evaluaron las tasas fotosintéticas de cada tratamiento, donde los dos tratamientos con las deficiencias más bajas de fósforo (0.07 y 0.125 g·L⁻¹ de K₂HPO₄) fueron estadísticamente similares al grupo control, así como el tratamiento con la concentración más próxima al grupo control (0.37 g·L⁻¹ de K₂HPO₄), presentando valores en un intervalo de 195.2 a 223.0 nmoles O₂ · g⁻¹ de PS · min. Sin embargo, del tratamiento con la concentración de 0.25 g · L⁻¹ de K₂HPO₄, fue una excepción ya que este sí tuvo menor actividad fotosintética, presentando un valor de 178.1 nmoles O₂ · g⁻¹ de PS · min, esto se puede observar en la figura 29; en esta misma figura se presentan los resultados de las tasas respiratorias de los tratamientos, donde presentaron velocidades de consumo de O₂ similares al grupo control, obteniéndose valores en un intervalo de 72.2 a 84.0 nmoles O₂ · g⁻¹ de PS · min.

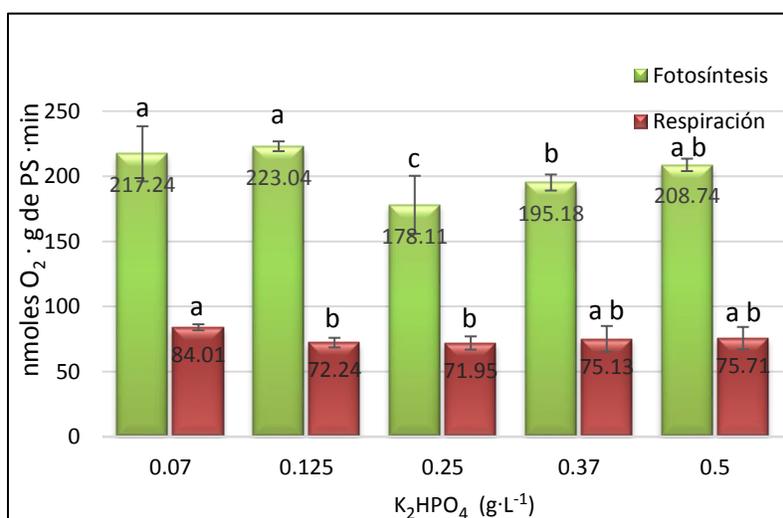


Figura 29. Efecto de las concentraciones de K₂HPO₄ sobre la tasa fotosintética y respiratoria (nmoles O₂ · g⁻¹ de PS · min) de *A. maxima* a los 8 días de exposición. (n=3) (letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a prueba de ANOVA-Tukey p<0.05).

F. Efecto de las deficiencias de cloruro de sodio

En este último experimento se evaluó el efecto del NaCl, para el crecimiento de biomasa algal en PS de *A. maxima* a los ocho días de exposición, donde se obtuvo que los tratamientos con las concentraciones de 9.6, 18.2 y 27.3 g·L⁻¹ de NaCl fueron estadísticamente similares al grupo control, presentando valores de biomasa de

1.03, 1.0 y 0.98 g·L⁻¹ de PS, respectivamente, sin embargo, el tratamiento con la mayor concentración de NaCl (36 g·L⁻¹ de NaCl) ya presentó una concentración de biomasa algal menor obteniéndose una disminución de 280 mg·L⁻¹ de PS con respecto al grupo control, esto se puede observar en la figura 30.

Por su parte, al evaluar la tasa de crecimiento relativo se mantiene la misma tendencia ya que los tratamientos con las concentraciones de 9.6, 18.2 y 27.3 g·L⁻¹ de NaCl de fueron estadísticamente similares al grupo control, presentando valores en un intervalo de 0.26 a 0.28 μ·d⁻¹, mientras que el tratamiento con la concentración mayor de salinidad presentó un valor menor que los otros tratamientos, obteniéndose un crecimiento de 0.23 μ·d⁻¹, esto se puede observar en la figura 31. Finalmente se puede observar que el crecimiento de biomasa en los tratamientos con la concentración de 9.6, 18.2 y 27.3 g·L⁻¹ se duplican a la misma velocidad que el grupo control en un intervalo de 2.36 a 2.46 días, esto se puede observar en la figura 32. Como se pudo ver, a pesar de que el tratamiento con 36 g·L⁻¹ de NaCl si tuvo menor cantidad de biomasa al final del experimento, logró mantenerse en un comportamiento estable con respecto a la cinética que presenta esta cepa de *A. maxima* sin tener grandes pérdidas de biomasa, lo que resulta biotecnológicamente importante para reducir costos, ya que los cultivos demandan grandes cantidades de agua dulce o potable y una gran alternativa sería cultivar con agua de mar diluida que podría ser enriquecida con nitrógeno, fósforo y con algunos micronutrientes que requiere esta cianobacteria.

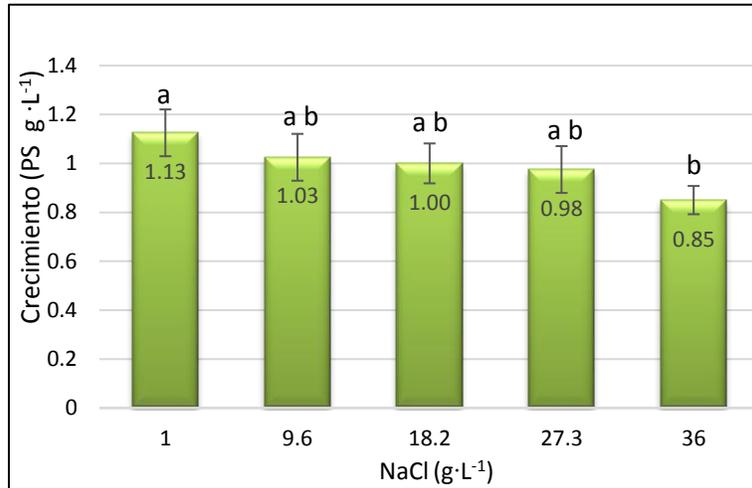


Figura 30. Efecto de las concentraciones de NaCl sobre el crecimiento volumétrico ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ de PS) a los 8 días de exposición. ($n=3$) (letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a prueba de ANOVA-Tukey $p<0.05$).

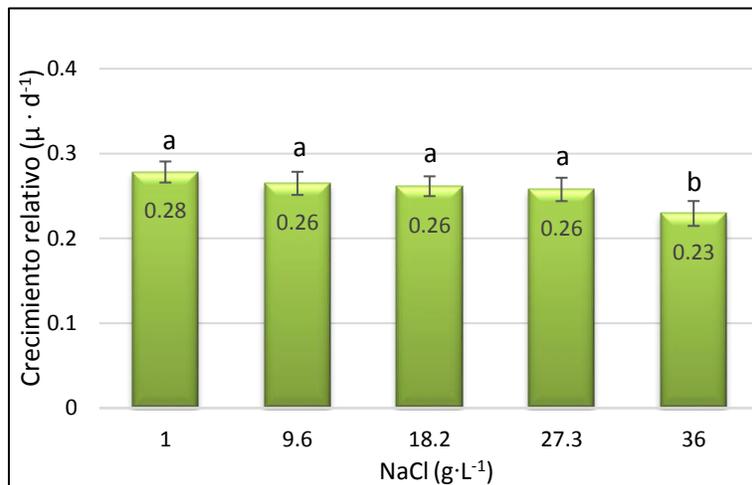


Figura 31. Efecto de las concentraciones de NaCl sobre el crecimiento relativo ($\mu \cdot \text{d}^{-1}$) de *A. maxima* a los 8 días de exposición. ($n=3$) (letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a prueba de ANOVA-Tukey $p<0.05$).

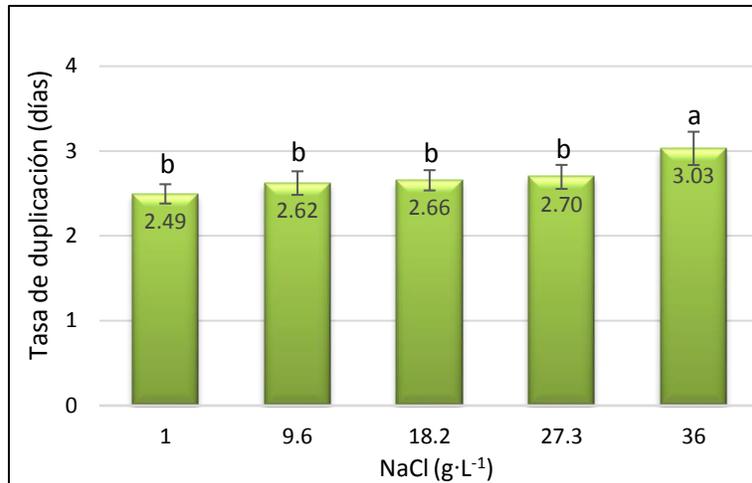


Figura 32. Efecto de las concentraciones de NaCl sobre la tasa de duplicación (días) de *A. maxima* a los 8 días de exposición. (n=3) (letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a prueba de ANOVA-Tukey $p < 0.05$).

Al comparar nuestros resultados, por ejemplo, un trabajo reportado por Vonshak y sus colaboradores, han estudiado ampliamente la respuesta de *Spirulina platensis* (*Arthrospira*) a estrés por salinidad (Vonshak *et al.*, 1988; 1996; Zeng & Vonshak, 1998). En conjunto, estos estudios revelan que (a) la tasa de crecimiento específica es menor que la del control a en el intervalo de 0.5 a 0.75 M, (b) las células cultivadas a menor densidad de flujo de fotones (PFD) pueden adaptarse mejor al estrés salino que las cultivadas a alta PFD, y (c) la fotoinhibición se potencializa bajo estrés salino.

La tolerancia en el género *Arthrospira* ya había sido reportada por Ciferri en 1983, este autor menciona que las condiciones óptimas para el crecimiento de *Arthrospira* se encuentran en un intervalo de 0.3 a 1.2 M de salinidad total (17.5 a 70.1 g·L⁻¹ de salinidad total). Esto demuestra que *A. maxima* es una cianobacteria con una amplia tolerancia a salinidad por lo que podría cultivarse de manera eficaz utilizando agua de mar que presente una concentración aproximada de hasta 36 g·L⁻¹ de NaCl.

Por su parte, al evaluar la concentración de clorofila *a* específica de *A. maxima* en los tratamientos, se pudo determinar que los cuatro tratamientos probados fueron estadísticamente similares entre sí, pero presentaron concentraciones muy por

debajo del grupo control, obteniéndose para el grupo control una concentración de chl a de $7.53 \text{ mg de chl a} \cdot \text{g}^{-1}$ de PS, por su parte los tratamientos presentaron concentraciones de chl a en un intervalo de 5.61 a $6.39 \text{ mg de chl a} \cdot \text{g}^{-1}$ de PS, esto se puede observar en la figura 33. Contrario a lo encontrado en este trabajo, Lu & Vonshak (2002), quienes reportan concentraciones de hasta de 0.8 M , las cuales no causan reducción en la concentración volumétrica de clorofila a.

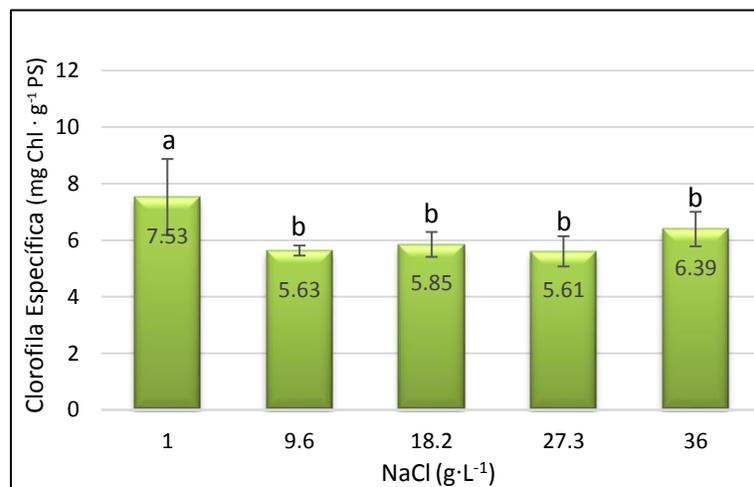


Figura 33. Efecto de las concentraciones de NaCl sobre clorofila a específica ($\text{mg de chl a} \cdot \text{g}^{-1}$ de PS) de *A. maxima* a los 8 días de exposición. ($n=3$) (letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a prueba de ANOVA-Tukey $p<0.05$).

Por último, en este experimento se evaluaron las tasas fotosintéticas, donde se obtuvo que los tratamientos con las concentraciones más altas de NaCl, es decir, los tratamientos con 27.3 y $36 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de NaCl tuvieron menor actividad fotosintética con respecto al grupo control, presentando valores de 59.7 y $63.0 \text{ nmoles O}_2 \cdot \text{g}^{-1}$ de PS $\cdot \text{min}$ respectivamente. Cabe mencionar que los tratamientos con las concentraciones de 9.6 y $18.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de NaCl sí tuvieron una actividad fotosintética similar al grupo control, obteniéndose valores de 78.4 y $81.4 \text{ nmoles O}_2 \cdot \text{g}^{-1}$ de PS $\cdot \text{min}$ respectivamente. Es bien sabido que en plantas y microalgas el estrés salino afecta el proceso de fotosíntesis y la maquinaria, exagera fotoinhibición, aumenta la respiración, y afecta a la síntesis y el metabolismo de hidratos de carbono y proteínas. Las cianobacterias son conocidas por producir sustancias orgánicas de bajo peso molecular como la sacarosa, glucosil-glicerol, glicina-betaína, y trehalosa

como agente de penetración compatible interna para proteger las membranas celulares y las proteínas contra el estrés salino (Vonshak *et al.*, 1996). En *Arthrospira*, Warr *et al.* (1985) fueron los primeros en demostrar que el ajuste osmótico al aumento de la salinidad se produjo a través de la acumulación de glucosil-glicerol y en cierta medida trehalosa, estos carbohidratos y principalmente el glucosil-glicerol se encargan de generar un cambio en la osmolaridad intracelular que conducirá a la adaptación de las células al estrés salino, al mantener un ambiente bioquímico óptimo para el funcionamiento celular.

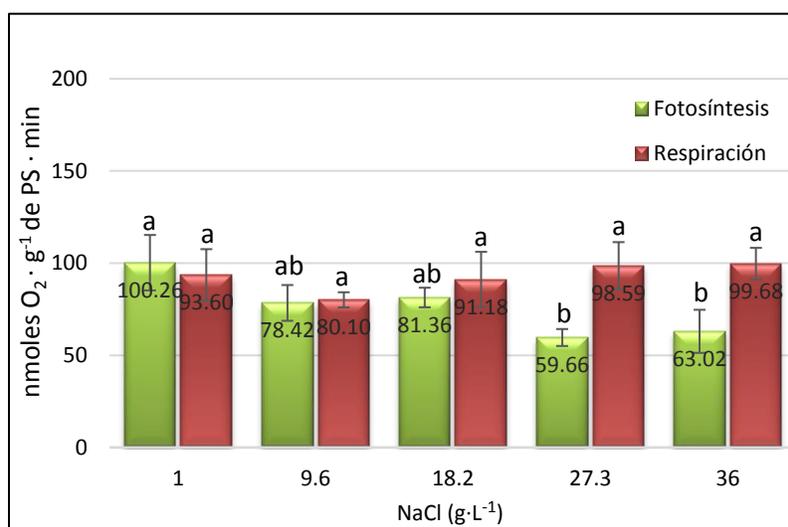


Figura 34. Efecto de las concentraciones de NaCl sobre la tasa fotosintética y respiratoria (nmoles O₂ · g⁻¹ de PS · min) de *A. maxima* a los 8 días de exposición. (n=3) (letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a prueba de ANOVA-Tukey p<0.05).

G. Estimación de costos en el cultivo de *A. maxima*

Para llevar a cabo el crecimiento de *A. maxima* en el medio Zarrouk, se obtuvieron los costos en la reducción de cada una de las sales modificadas en el medio, así como el costo en la preparación del medio Zarrouk completo, con la intención de poder visualizar de mejor forma cuál de las sales convendría disminuir en el medio y poder reducir los costos de operación en el cultivo, se muestran dichos costos en la siguiente tabla (tabla 3).

Reactivo (presentación de 1kg)	Costo del reactivo \$ MXN	Costo para preparar 100L de medio Zarrouk (L)	% de reducción recomendado
Zarrouk	N/A	\$ 1,590	N/A
NaHCO ₃	\$ 28	\$ 1,555	-75 %
NaNO ₃	\$ 1,700	\$ 1,272	-25 %
NH ₄ Cl	\$ 900	\$ 1,190	N/A
K ₂ HPO ₄	\$1,590	\$ 1,510	-87.5 %
NaCl	\$430	\$ 1,547 + (ahorro en agua)	+2,700 % (más)

Tabla 3. Estimación de los costos en la preparación del medio Zarrouk; Costos de los reactivos obtenidos de: www.velaquin.com.mx. N/A: No aplica.

9. Conclusión

El efecto en la modificación de las sales del medio de cultivo Zarrouk para cultivar *Arthrospira maxima* resulta crucial como una aplicación biotecnológica en la reducción de costos de operación. La cepa utilizada en este trabajo arrojó aspectos favorables en la reducción de las sales (probadas por separado) utilizadas y en la aclimatación de las células a la salinidad.

El efecto que generó en el crecimiento la reducción del NaHCO₃ sobre la cantidad de biomasa medida en PS fue que nuestros 4 tratamientos se mantuvieron los cultivos cinéticamente estables de acuerdo con el comportamiento que presenta esta cepa de *A. maxima*. Cuando la biomasa inicial proviene de un cultivo semilla con Zarrouk completo y únicamente con 96h de sincronización celular, se puede utilizar la reducción del NaHCO₃ como fuente de carbono en un 75% menos (2.1 g·L⁻¹ de NaHCO₃) que la concentración del medio de cultivo Zarrouk estándar, teniendo en cuenta cultivar a una temperatura cercana a 28 ±2°C.

Por su parte, el efecto que generó en el crecimiento la reducción del NaNO₃ sobre la cantidad de biomasa medida en PS fue que nuestros 4 tratamientos se

mantuvieron los cultivos cinéticamente estables de acuerdo con el comportamiento que presenta esta cepa de *A. maxima*. Cuando la biomasa inicial proviene de un cultivo semilla con Zarrouk completo y únicamente con 96h de sincronización celular, se puede utilizar la reducción del NaNO_3 como fuente de nitrógeno en un 25% menos ($1.87\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaNO_3) que la concentración del medio de cultivo Zarrouk estándar, teniendo en cuenta cultivar a una temperatura cercana a $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Es importante tener cuidado el no reducir demasiado la cantidad de nitrógeno del medio al cultivar esta cepa ya que como vimos en algunos trabajos se reporta una pérdida gradual en la proporción de proteínas totales.

Por su parte, el efecto que generó en el crecimiento al sustituir del medio Zarrouk el NaNO_3 por el NH_4Cl sobre la cantidad de biomasa medida en PS fue que también nuestros cuatro tratamientos se mantuvieron los cultivos cinéticamente estables de acuerdo con el comportamiento que presenta esta cepa de *A. maxima*. Cuando la biomasa inicial proviene de un cultivo semilla con Zarrouk completo y únicamente con 96h de sincronización celular, se puede utilizar la concentración de $110\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de NH_4Cl sin llegar aparentemente tóxico para la célula, al menos hasta los ocho días de exposición, teniendo en cuenta cultivar a una temperatura cercana a $28 \pm 2^\circ\text{C}$.

Por su parte, el efecto que generó en el crecimiento la reducción del K_2HPO_4 sobre la cantidad de biomasa medida en PS fue que nuestros 4 tratamientos se mantuvieron los cultivos cinéticamente estables de acuerdo con el comportamiento que presenta esta cepa de *A. maxima*, a pesar de eso, las deficiencias probadas alcanzaron tasas de crecimiento por debajo del grupo control. Cuando la biomasa inicial proviene de un cultivo semilla con Zarrouk completo y únicamente con 96h de sincronización celular, se puede utilizar la reducción del K_2HPO_4 como fuente de fósforo en un 87.5% menos ($0.07\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de K_2HPO_4) que la concentración del medio de cultivo Zarrouk estándar, teniendo en cuenta cultivar a una temperatura cercana a $28 \pm 2^\circ\text{C}$. La principal reducción en los costos de operación en los cultivos de *Arthrospira* es utilizar menos nitratos ya que es una de las sales de mayor costo, sin

embargo, como vimos en este trabajo también se podría reducir el fósforo como una segunda alternativa de ahorro.

Por último, el efecto que generó en el crecimiento el aumento de la salinidad, como NaCl, sobre la cantidad de biomasa medida en PS fue que nuestros 4 tratamientos se mantuvieron los cultivos cinéticamente estables de acuerdo con el comportamiento que presenta esta cepa de *A. maxima*. Cuando la biomasa inicial proviene de un cultivo semilla con Zarrouk completo y únicamente con 96h de sincronización celular, se puede aumentar la salinidad hasta 27 veces más (27.3 g·L⁻¹ de NaCl) que la concentración del medio de cultivo Zarrouk estándar, teniendo en cuenta cultivar a una temperatura cercana a 28 ±2°C.

Por su parte, el efecto que se genera en la concentración de clorofila *a*, únicamente se ve afectado considerablemente por el tratamiento con un aumento en la salinidad a partir de 9.6 g·L⁻¹ de NaCl, además el tratamiento con cloruro de amonio afecta ligeramente la concentración de clorofila *a*, en las concentraciones de 44 y 66 mg · L⁻¹ de NH₄Cl.

Por su parte, el efecto que se genera en la actividad fotoquímica, únicamente se ve afectado considerablemente por el tratamiento con un aumento en la salinidad a partir de 27.3 g·L⁻¹ de NaCl, además el tratamiento con cloruro de amonio afecta ligeramente la actividad fotoquímica, a partir de una concentración de 44 mg · L⁻¹ de NH₄Cl.

10. Referencias:

- Abdulqader G., Barsanti L. y Tredici, M. 2000. Harvest of *Arthrospira platensis* From Lake Kossorom (Chad) and its household usage among the Kananebu. *Journal of Applied Phycology* 12: 493-498.
- Abinandan, S. y Shanthakumar, S. 2015. Challenges and opportunities in application of microalgae (Chlorophyta) for wastewater treatment: a review, *Renew. Sust. Energ. Rev.* 52: 123–132.
- Andrade, M. R. y Costa, J. A. 2008. Culture of microalga *Spirulina platensis* in alternative sources of nutrients. *Ciênc. agrotec.*, Lavras, 32 (5): 1551-1556.
- Anónimo (1991) SOSA Texcoco, S.A. de C.V. (mimeografiado).
- Álvarez, M. & Gallardo, T. 1989. Una revisión sobre la biotecnología de las algas. *Botanica Complutensis* 15: 9-60.
- Arredondo B. y Vázquez R. 1991. Aplicaciones Biotecnológicas en el Cultivo de Microalgas. *Ciencia y Desarrollo* 17 (98): 99-111.
- Badger, M. R. 1980. Kinetic properties of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase from *Anabaena variabilis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 201:247–254.
- Badger, M. R., Price, G. D., Long, B. M. & Woodger, F. J. 2006. The environmental plasticity and ecological genomics of the cyanobacterial CO₂ concentrating mechanism. *Journal of Experimental Botany.* 57: 249–265.
- Becker, E.W., 1994. *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Belay, A. 1997. Mass culture of *Spirulina* outdoor-The Earthrise Farms Experience en: Vonshak A (Ed.) *Spirulina platensis (Arthrospira)*, Physiology, Cell-biology and Biotechnology. Taylor & Francis. New York: 131-158.
- Belay, A., 2002. The Potential Application of *Spirulina (Arthrospira)* as a Nutritional and Therapeutic Supplement in Health Management. *The Journal of the American Nutraceutical Association.* 5(2): 26-48.
- Benitez-Nelson, C. R. 2000. The biogeochemical cycling of phosphorus in marine systems. *Earth-Science Reviews* 51:109–135.
- Bergman, A. N., Laurent, P., Otiang'a-Oqwiti, G., Bergman, H. L., Walsh, P.J., Wilson, P., Wood, C. M. (2003) Physiological adaptation of the gut in the Lake Magadi tilapia, *Alcolapia grahami*, an alkaline-ad saline adapted teleost fish. *Comparative Biochemistry & Physiology* 136: 701–715.

- Borowitzka, L.J. (1986) Osmoregulation in blue-green algae. In: Round, P.E. and Chapman, O.J. (Eds), Progress in Phycological Research, Biopress 4: 243–256.
- Borowitzka, M.A. 1999. Comercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology* 70: 313-321.
- Borowitzka, M.A. 2005. Culturing Microalgae in Outdoors Ponds. En: Andersen R. (Ed.) Algal Culturing Techniques. Phycological Society of America. pp: 205-218.
- Borowitzka, M.A. 2013. Patents on cyanobacteria and cyanobacterial products and uses, Cyanobacteria: An Economic Perspective 329–338.
- Borowitzka, M.A., Beardall, J., Raven, A. 2016. The Physiology of Microalgae. Ed. Cham Switzerland: Springer.
- Boussiba, S. & Richmond, A. E. 1979. Isolation and characterization of phycocyanins from the blue-green alga *Spirulina platensis*. *Archives of Microbiology* 12: 155–159.
- Brönmark, C. y L., Hansson. 2005. The Biology of Lake and Ponds. 2° ed. Oxford University Press. Reino Unido. 285 p.
- Busson, F. 1971. *Spirulina platensis* (Gom.) Geitler et *Spirulina geitleri* J.de Toni, Cyanophycées Alimentaires, Service de Santé, Marseille.
- Carvalho, J. C., Francisco, F., Almeida, K., Sato, S., Converti, A., 2004. Cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* (Cyanophyceae) by fed-batch addition of ammonium chloride at exponentially increasing feeding rate. *Journal of Phycology*. 40: 589–97.
- Castro, G. F., Rizzo, R., Passos, T., Santos, B., Dias, D., Domingues, J., Gomes, K. 2015. Biomass production by *Arthrospira platensis* under different culture conditions. *Food Science and Technology Campinas* 35(1): 18-24.
- Carlozzi, P. y Pinzani, E. 2004. Growth Characteristics of *Arthrospira platensis* Culture Inside a New Close-Coil Photobioreactors Incorporating a Mandrel to Control Culture Temperature. *Wiley InterScience* Accesible en: www.interscience.wiley.com/DOI:10.1002/bit.20425
- Ceballos, J., Rosario, M., Alvarado, R., Sánchez, J. D., Sánchez, A., Hernández, R., Andrade, S. 2008. Manual de prácticas, biología de protistas. Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo. Facultad de Biología. <https://docplayer.es/77961893-Manual-lab-biologia-de-protista-fac-biologia.html>
- Çelekli, A., Dönmez, G., 2006. Effect of pH, light intensity, salt and nitrogen concentration on growth and b-carotene accumulation by a new isolate of *Dunaliella sp.* *World Journal Microbiology and Biotechnology*, 22, 183–189.

- Çelekli, A. y Yavuzatmaca, M. 2009. Predictive modeling of biomass production by *Spirulina platensis* as function of nitrate and NaCl concentrations. *Bioresource Technology* 100: 1847–1851.
- Çelekli, A., Bozkurt, H. & Yavuzatmaca, M. 2009. Modeling of biomass production by *Spirulina platensis* as function of phosphate concentrations and pH regimes. *Bioresource Technology* 100: 3625–3629.
- Ciferri, O. 1983. *Spirulina*, the edible microorganism. *Microbiological Reviews* 47(4): 551-57.
- Cheng-Wu, Z.P., 1996. Effect of polysacchride and phycocyanin from *Spirulina* on peripheral blood and hematopoietic system of bone marrow in mice. *Proc. of 2nd Asia Pacific Conf. on algal biotech.* 18(3):327-331.
- Clément, G. 1971. Une nouvelle algue alimentaire: la *Spirulina*. *Instituto Pasteur* 4: 103.
- Coe, M. J. 1966. The biology of *Tilapia grahami* Boulenger in Lake Magadi, Kenya. *Acta Trop* 23:146–177.
- Cohen, Z. The chemicals of *Spirulina*. In: Vonshak, A., Ed. *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, cell-biology and biotechnology*. Taylor and Francis, London, 1997; 175-204.
- Colla, L. M., Reinehr, C. O., Reichert, C. and Costa, J. A. V., 2007. Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. *Bioresource Technology*, 98, p. 1489-1493.
- Díaz del Castillo, B. 1976. *Historia Verdadera de la Conquista de la Nueva España* (undécima ed.). (J. R. Cabañas, Ed.) México: Porrúa.
- El-Baky HH, El Baz FK, El-Baroty GS. 2008. Characterization of nutraceutical compounds in blue green alga *Spirulina*. *Journal of Medicinal Plants Research*; 2(10): 292-300.
- Eriksen, N.T., 2008. Production of phycocyanin – a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. *Applied Microbiology and Biotechnology* 80: 1–14.
- Eykelenburg, C. 1979. The ultrastructure of *Spirulina platensis* in relation to temperature and light intensity. *Antonie Van Leeuwenhoek J Microbiol* 45: 369–375.
- Falkowski, P.G. y Raven, J.A. 2007. *Aquatic photosynthesis*, 2nd edn. Princeton University Press, Princeton.
- FAO. 2008. A review of culture, production and use of *Spirulina* as food for humans and feeds for domestic animals and fish. pp. 33, *FAO Fisheries and Aquaculture Circular* No. 1034, Rome.

- FAO/WHO. Energy and protein requirement. Report of a Joint FAO/WHO ad hoc Expert Committee, vol. 52. Geneva: FAO; 1973.
- Fernández-Reiriz, M.J., Perez-Camacho, A., Ferreiro, M.J., Blanco, J., Planas, M., Campos, M.J., Labarta, U. 1989. Biomass production and variation in the biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. *Aquaculture* 83, 17– 37.
- Fox, D.L. 1976. *Animal biochromes and structural colours*, 2nd edn. University of California Press, Berkeley, p 433.
- Galván, A., Quesada, A., Fernández, E. 1996. Nitrate and nitrite are transported by different specific transport systems and by a bispecific transporter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem* 271:2088–2092
- Garcia-Pichel F., Belnap, J., Neuer, S., Schanz, F. 2003. Estimates of global cyanobacterial biomass and its distribution. *Archiv für Hydrobiologie, Supplement. Algological Studies* 109:213–228.
- Gibbs R. 1982. *Spirulina*, New Protein Concentrate. *R&D International Magazine of Scientific Research and Development in Mexico*. 2(6):5-8.
- Giordano, M., Beardall, J. y Raven, J. A. 2005. CO₂ concentrating mechanisms in algae: mechanisms, environmental modulation and evolution. *Annual Review of Plant Biology* 56: 99–151.
- Glazer, A. N. 1989. Light Guides-Directional energy transfer in a photosynthetic antenna. *J Cell Biol.* 264 (5): 1.
- Gomont, M. 1892. Monographie des Oscillariées. *Annales des Sciences Naturelles; Botanique, Serie 7*, 15: 263–368.
- Govindjee & Dmitriy, S. 2011. Adventures with cyanobacteria: a personal perspective. *Frontiers in Plant Science*. 2 (28): 1-17.
- Grover, J. 1991. Resource competition in a variable environment: phytoplankton growing according to the variable-internal-stores-model. *The American Naturalist* 138 (4): 811-835.
- Hagemann, M., Techel, D. & Rensing, L. 1991. Comparison of salt- and heatinduced alterations of protein synthesis in the cyanobacterium *Synechocystis sp.* PCC 6803, *Archives of Microbiology* 155: 587–592.
- Huang NC, Liu KH, Lo HJ, Tsay YF. 1999. Cloning and functional characterization of an *Arabidopsis* nitrate transporter gene that encodes a constitutive component of low-affinity uptake. *Plant Cell* 11:1381–1392.

- Iltis, A. 1970. Phytoplankton des eaux natronées du Kanem (Tchad). IV. Note sur les espèces du genre *Oscillatoria*, sous-genre *Spirulina* (Cyanophyta), Cah. O.R.S.T.O.M., série Hydrobiology 4: 129-134.
- Iltis, A. y Riou-Duwat, S. 1971. Variations saisonnières du peuplement en rotifères des eaux natronées du Kanem (Tchad). Cahiers - ORSTOM. Série hydrobiology 5:101–112.
- Jørgensen BB, Cohen Y, Des Marais DJ. 1987. Photosynthetic action spectra and adaptation to spectral light distribution in a benthic cyanobacterial. *Applied and Environmental Microbiology* 53:879–886.
- Kirk, J. 1994. Light and Photosynthesis in: *Aquatic Ecosystems*. Cambridge University Press. Reino Unido. 509p.
- Komárek, J. 1992. Diversita a moderní klasifikace sinic (Cyanoprokaryota). Diversity and modern classification of Cyanobacteria (Cyanoprokaryota).
- Komárek, J., Anagnostidis, K. 2005. Cyanoprokaryota – Part 2: oscillatoriales. In: Büdel B, Krienitz L, Gärtner G, Schagerl M (eds) *Süßwasser flora von Mitteleuropa 19/2*. Elsevier/Spektrum, Heidelberg, pp 341–353, 759 pp.
- Komárek, J., Hauer, T. 2011. CyanoDB.cz – On-line database of cyanobacterial genera. – Word-wide electronic publication, University of South Bohemia & Institute of Botany AS CR. <http://www.cyanodb.cz>.
- Komárek, J., Lund, J. W. G. 1990. What is “*Spirulina platensis*” in fact?. *Archiv für Hydrobiologie, Supplement* 85, 58:1–6.
- Kronzucker, H.J., Britto, D.T., Davenport, R.J., Tester, M. 2001. Ammonium toxicity and the real cost of transport. *Trends Plant Science* 6:336–337.
- Kustka, A., Sañudo-Wilhelmy, S., Carpenter, E. J., Capone, D. G., Raven, J. A. 2003. A revised estimate of the iron use for nitrogen fixation with special reference to the cyanobacterium *Trichodesmium* spp. (Cyanophyta). *Journal Phycology* 39:12–25
- Leonard, J. 1966. The 1964-65 belgian trans-saharan expedition. *Nature*, 209, 126-128.
- Lu, C. & Vonshak, A. 2002. Effects of salinity on photosystem II function in cyanobacterial *Spirulina platensis* cells. *Physiologia Plantarum* 114:405–413
- Markou, G. & Georgakakis, D. 2011. Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: a review, *Appl. Energy* 88 (10) 3389–3401

- Markou, G., Chatzipavlidis, I. and Georgakakis, D. 2012. Effects of phosphorus concentration and light intensity on the biomass composition of *Arthrospira (Spirulina) platensis*. *World Journal Microbiology and Biotechnology* 28: 2661–2670.
- Markou, G., Vandamme, D. and Muylaert, K. 2014. Microalgal and cyanobacterial cultivation: the supply of nutrients, *Water Research* 65: 186–202.
- Martínez, I. & Villezca, P. 2003. La alimentación en México: Un Estudio a Partir de la Encuesta Nacional de Ingresos y Gastos de los Hogares. *Revista de Información y Análisis*. Número 21: 26-37.
- Martiny AC, Kathuria S, Berube PM (2009) Widespread metabolic potential for nitrite and nitrate assimilation among *Prochlorococcus* ecotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* 106:10787–10792.
- Meléndez-Martínez, A. J., Vicario, I. M., & Heredia, F. J. 2007. Pigmentos carotenoides: consideraciones estructurales y fisicoquímicas. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 57, 109–117.
- Merchant, S. S., Helmann, J. D. 2012. Elemental economy: microbial strategies for optimizing growth in the face of nutrient limitation. *Advances in Microbial Physiology* 60: 91–210.
- Muhling, M., Belay, A. & Whitton, B. 2005. Variation in fatty acid composition of *Arthrospira (Spirulina)* strains. *Journal of Applied Phycology*. 17:137-146.
- Olguín, E. J., Galicia, S., Angulo-Guerrero, O. and Hernández, E. 2001. The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina* sp. (*Arthrospira*) grown on digested pig waste. *Bioresource Technology*, 77: 19-24
- Ozdemir G, Karabay NU, Dalay CM and Pazarbasi B. 2004. Antibacterial activity of volatile component and various extracts of *Spirulina platensis*. *Phytother. Res.* 18, 754–757.
- Paniagua-Michel, J., Dujardin, E., & Sironval, C. 1993. Crónica Azteca: el tecuitlatl, concentrado de alga spirulina, fuente de proteínas comestibles del pueblo azteca. *Cahiers Agricultures*, 2: 283-287.
- Paoletti, C., Materassi, C. and Pelosi, E. 1971. Lipid composition variation of some mutant strains of *Spirulina platensis*, *Annual Microbiology and Enzymology*, 21, 65.
- Paytan, A. y McLaughlin, K. 2007. The oceanic phosphorus cycle. *Chemical Reviews* 107:563–576.
- Piorreck, M., Baasch, K.H., Pohl, P., 1984. Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and bluegreen algae under different nitrogen regimes. *Phytochemistry* 23 (2), 207–216.

- Price, G. D., Badger, M. R., Woodger, F.J. y Long, B. M. 2008. Advances in understanding the cyanobacterial CO₂-concentrating-mechanism (CCM): functional components, C_i transporters, diversity, generic regulation and prospects for engineering into plants. *Journal of Experimental Botany*. 59:1441–1461.
- Qureshi, M. A. and Ali, R. A., 1996. *Spirulina platensis* exposure enhances macrophage phagocytic function in cats. *Immunopharmacol Immunotoxicol*; 18: 457–63.
- Radmann E.M., Reinehr C.O., Costa J.A.V., 2007. Optimization of the repeated batch cultivation of microalga *Spirulina platensis* in open raceway ponds. *Aquaculture* 265:118-126.
- Ramírez-Moreno L. y Olvera-Ramírez R. 2006. Uso Tradicional y Actual de *Spirulina* sp. (*Arthrospira* sp.) *Interciencia*. 31 (9): 657-663.
- Rangel G. 2009. “Déficit alimentario, el eslabón más débil de la pobreza” *La Jornada*, Guerrero, 3 abril 2009, Opinión, 1.
- Raven, J. A. 1988. The iron and molybdenum use efficiencies of plant growth with different energy, carbon and nitrogen sources. *New Phytologist*. 109:12–25.
- Raven, J. A. 2009. Contributions of anoxygenic and oxygenic phototrophy and chemolithotrophy to carbon and oxygen fluxes in aquatic environments. *Aquatic Microbial Ecology* 56: 177–192.
- Raven, J. A., 2012 ^a. Physiological Ecology, Carbon. En: Whitton B. (Ed.) *Ecology of Cyanobacteria II. Their Diversity in Space and Time*. New York London: (pp. 443-460).
- Raven, J. A., 2012 ^b. Protein turnover and plant RNA and phosphorus requirements in relation to nitrogen fixation. *Plant Science* 188–189:25–35.
- Raven, J. A. 2013. The evolution of autotrophy in relation to phosphorus requirement. *Journal of Experimental Botany* 64: 4023–4046.
- Rentsch, D., Schmidt, S., Tegeder, M. 2007. Transporters for uptake and allocation of organic nitrogen compounds on plants. *FEBS Lett* 581:2281–2289.
- Richmond, A., 1986. Cell response to environmental factors. In: Richmond, A. (Ed.), *Handbook of Microalgal Mass Culture*. CRC Press, Boca Raton, pp. 69– 99.
- Richmond, A. 2004. *Handbook of Microalgal Mass Culture*. Ed. Amos Richmond. CRC Press, Boca Raton.
- Ricketts, T. R. 1990. Uptake rate of various nitrogen sources by nitrate grown *Tetraselmis (Platymonas) striata*. *British Phycology Journal* 25:257–261.

- Rodrigues, M.S., Converti, A., Ferreira, L.S., Sato, S. & Carvalho, J.C.M. 2010. Fed-batch cultivation of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*: potassium nitrate and ammonium chloride as simultaneous nitrogen sources. *Bioresource Technology* 101:4491-4498.
- Rodrigues, M.S., Converti, A., Ferreira, L.S., Sato, S. & Carvalho, J.C.M. 2011. Influence of ammonium sulfate feeding time on fed-batch *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* cultivation and biomass composition with and without pH control. *Bioresource Technology* 102: 6587–6592.
- Rojas, R. T. 1998. La cosecha del agua en la Cuenca de México. México: CIESAS. Centro de Investigaciones y Estudios Superiores en Antropología Social.
- Sánchez, M., Bernal-Castillo, J., Rozo, C. y Rodríguez, I. 2003. *Spirulina* (*Arthrospira*): An Edible Microorganism. Review. *Universitas Scientiarum. Chemical Abstracts (CA)*. 8: 7-24.
- Sassano, C.E., Carvalho, J.C., Gioielli, L.A., Sato, S., Torre, P. & Converti, A. 2004. Kinetics and bioenergetics of *Spirulina platensis* cultivation by fed-batch addition of urea as nitrogen source. *Applied Microbiology and Biotechnology* 112: 143–150.
- Sassano, C.E., Gioielli, L.A., Almeida, K., Sato, S., Perego, P., Converti, A. y Carvalho, J.C., 2007. Cultivation of *Spirulina platensis* by continuous process using ammonium chloride as nitrogen source. *Biomass and Bioenergy*. 31: 593–598.
- Sassano, C.E., Gioielli, L.A., Ferreira, L., Rodrigues, M., Sato, S., Converti, A. y Carvalho, J.C., 2010. Evaluation of the composition of continuously-cultivated *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* using ammonium chloride as nitrogen source. *Biomass and Bioenergy*. 34: 1732–1738.
- Scheer, H. 1991. Chlorophylls. CRC Press, Boca Raton, 1257 pp.
- Schliep M, Cavigliasso G, Quinnell RG, Stranger R, Larkum AWD (2013) Formyl group modification of chlorophyll a: a major evolutionary mechanism in oxygenic photosynthesis. *Plant Cell Environ* 36:521–527.
- Spolaore, P., C. Joannis-Cassan, E. Duran, A. Isambert. 2006. Commercial applications of microalgae, *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101: 87–96.
- Srivastava P. 2007. Manual for *Arthrospira* Mass Production and Processing Using Rural Technology. Ajmer, Government College Ajmer.
- Stizenberger, E. 1852. *Spirulina* and *Arthrospira* (nov. gen.). *Hedwigia* 1:32–41.
- Takeuchi, T., Lu J., Yoshizaki, G. & Satoh, S. 2002. Effect on the grown and body composition of juvenile tilapia *Oreochromis niloticus* fed raw *Spirulina*. *Fisheries Science*; 68: 34-40.

- Tomaselli, L. 1997. Morphology, Ultraestructura and Taxonomy of *Arthrospira (Spirulina) platensis*. En: Vonsahk A (Ed.) *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, Cell-Biology and Biotechnology*. Taylor & Francis. Londres, RU. pp.1-15.
- Torzillo, G. y Vonsahk, A. 1994. Effect of light and temperatura on the photosynthetic activity of the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Biomass and Bioenergy*. 6, 399.
- Torzillo G. 1997. Tubular Bioreactors. En: Vonsahk A (Ed.) *Spirulina platensis (Arthrospira)*, *Physiology, Cell-biology and Biotechnology*. Taylor & Francis. pp: 101-115.
- Tsay YF, Chiu CC, Tsai CN, Ho CH, Hsu PL (2007) Nitrate transporters and peptide transporters. *FEBS Lett* 581:2290–2300.
- Vincenzini, M., De philippis, R. and ena, A. 1986. Carotenoid composition of *Spirulina platensis* and cyanospira Rippkae in different light conditions, *La Rivista delle Sostanze Grasse* 63: 171.
- Viskari, P.J., Kinkade, C.S., Colyer, C.L. 2001. Determination of phycobiliproteins bycapillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Electrophoresis* 22: 2327–2335.
- Vonsahk, A. 1986. Laboratory techniques for the cultivation of microalgae. In: *Handbook of Microalgal Mass Culture* (ed. A. Richmond), pp. 117–45. CRC Press, Boca Raton.
- Vonsahk, A. 1997 (a). *Spirulina Platensis (Arthrospira): Physiology, Cell-biology and Biotechnology*. Taylor & Francis. Londres.
- Vonsahk, A.1997 (b). *Outdoor Mass Production of Spirulina: The Basic Concept*. In: Vonsahk A (Ed.) *Spirulina Platensis (Arthrospira)*, *Physiology, Cell-biology and Biotechnology*. Taylor & Francis. Londres, 79-99.
- Vonsahk, A., Abeliovich, A., Boussiba, S., Arad, S., Richmond, A., 1982. Production of *Spirulina* biomass: effects of environmental factors and population density. *Biomass* 2: 175–185.
- Vonsahk, A. and Richmond, A. 1981. Photosynthetic and respiratory activity in *Anacystis nidulans* adapted to osmotic stress, *Plant Physiology* 68: 504p.
- Vonsahk, A., Guy, R. & Guy, M. 1988. The response of the filamentous cyanobacterium *Spirulina platensis* to salt stress. *Archives of Microbiology* 150: 417.
- Vonsahk, A. & Guy, R. 1992. Photoadaptation, photoinhibition and productivity in the blue-green alga *Spirulina platensis*, grown outdoors. *Plant, Cell & Environment* 15:613–616.

- Vonshak, A., Torzillo, G., Accolla, P., Tomaselli, L. 1996. Light and oxygen stress in *Spirulina platensis* (cyanobacteria) grown outdoors in tubular reactors. *Physiologia Plantarum* 97:175–179.
- Vonshak A. y Tomasselli L. 2000. *Arthrospira (Spirulina) Systematics and Ecophysiology*. En: Whitton, B. A. y Potts, M. (Eds.) *The Ecology of Cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers Dordrecht, Holanda. 505-522.
- Vonshak, A., Sili, C., y Torzillo, G. 2012. *Arthrospira (Spirulina)*. En Whitton, B.A. *Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time*. Springer Science Media. (677-705). Durham University, England.
- Vos, s. M., Bange, M. W., Dippner, J. W., Middelburg, J. J., Montoya, J. P., Ward, B. 2013. The marine nitrogen cycle: recent discoveries, uncertainties and the potential relevance to climate change. *Philos Trans R Soc Lond B* 368:20130121.
- Warr, S.R.C., Reed, R.H., Chudek, J.A., Foster, R., Stewart, W.D.P. 1985. Osmotic adjustment in *Spirulina platensis*. *Planta* 163:424-429.
- Zarrouk, C. 1966. Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima*. Ph D thesis, University of Paris, France.
- Zeng, M.T., Vonshak, A. 1998. Adaptation of *Spirulina platensis* to salinity-stress. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Molecular & Integrative Physiology* 120:113–118.

11. Apéndice

Análisis de resultados mediante ANOVA con Tukey

1. Bicarbonato de sodio

Crecimiento volumétrico de PS

```
Procedimiento ANOVA
Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Y
NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un
índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa 0.05
Error de grados de libertad 15
Error de cuadrado medio 0.007
Valor crítico del rango estudentizado 4.36699
Diferencia significativa mínima 0.1827

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento Media N T
      A A 1.40000 4 5
      B A 1.22500 4 4
      B 1.17500 4 3
      B 1.15000 4 1
      B 1.10000 4 2
```

Tasa de crecimiento relativo

```
Sistema SAS 16:13 Tuesday, April 6, 2017 80
Procedimiento ANOVA
Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Y
NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un
índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa 0.05
Error de grados de libertad 15
Error de cuadrado medio 0.000099
Valor crítico del rango estudentizado 4.36699
Diferencia significativa mínima 0.0217

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento Media N T
      A A 0.301021 4 5
      B A 0.281792 4 3
      B 0.275826 4 4
      B 0.272968 4 1
      B 0.266456 4 2
```

Tasa de duplicación

Procedimiento ANOVA				
Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Y				
NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.				
	Alfa			0.05
	Error de grados de libertad			15
	Error de cuadrado medio			0.008079
	Valor crítico del rango estudentizado			4.36699
	Diferencia significativa mínima			0.1963
Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.				
	Tukey Agrupamiento	Media	N	T
	A	2.60431	4	2
	A	2.54045	4	1
	A	2.51603	4	3
	A	2.46269	4	4
	B	2.30383	4	5

Clorofila específica

Procedimiento ANOVA				
Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Y				
NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.				
	Alfa			0.05
	Error de grados de libertad			15
	Error de cuadrado medio			0.069668
	Valor crítico del rango estudentizado			4.36699
	Diferencia significativa mínima			0.5763
Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.				
	Tukey Agrupamiento	Media	N	T
	A	8.4643	4	4
	A	8.3616	4	5
	A	8.3513	4	3
	A	8.3065	4	1
	A	8.2136	4	2

Fotosíntesis

16:13 Tuesday, April 6, 2017 100

Sistema SAS

Procedimiento ANOVA

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Y

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGMQ.

Alfa 0.05
 Error de grados de libertad 15
 Error de cuadrado medio 162.9309
 Valor crítico del rango estudentizado 4.36699
 Diferencia significativa mínima 27.871

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	T
A	180.602	4	5
A	168.956	4	3
A	165.478	4	4
A	163.582	4	1
A	157.776	4	2

Respiración

Procedimiento ANOVA

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Y

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGMQ.

Alfa 0.05
 Error de grados de libertad 15
 Error de cuadrado medio 87.16034
 Valor crítico del rango estudentizado 4.36699
 Diferencia significativa mínima 20.385

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	T
A	97.186	4	5
A	90.558	4	4
A	80.084	4	2
B	77.897	4	3
B	68.902	4	1

2.Nitrato de sodio

Crecimiento volumétrico de PS

Procedimiento ANOVA			
Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Y			
NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.			
Alfa			0.05
Error de grados de libertad			15
Error de cuadrado medio			0.004417
Valor crítico del rango estudentizado			4.36699
Diferencia significativa mínima			0.1451
Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.			
Tukey	Ágrupamiento	Media	N T
	A	1.05000	4 5
	A		
	A	1.00000	4 4
	B	0.81250	4 3
	B		
	B	0.78750	4 2
	B		
	B	0.72500	4 1

Tasa de crecimiento relativo

Procedimiento ANOVA			
Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Y			
NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.			
Alfa			0.05
Error de grados de libertad			15
Error de cuadrado medio			0.000168
Valor crítico del rango estudentizado			4.36699
Diferencia significativa mínima			0.0283
Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.			
Tukey	Ágrupamiento	Media	N T
	A	0.290422	4 5
	A		
	A	0.270658	4 4
	B	0.240742	4 3
	B		
	B	0.236695	4 2
	B		
	B	0.224833	4 1

Tasa de duplicación

Procedimiento ANOVA				
Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Y				
NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.				
Alfa				0.05
Error de grados de libertad				15
Error de cuadrado medio				0.019068
Valor crítico del rango estudentizado				4.36699
Diferencia significativa mínima				0.3015
Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.				
Tukey Agrupamiento	Media	N	T	
Â	3.08674	4	1	
Â	2.93110	4	2	
Â	2.88816	4	3	
B	2.56441	4	4	
B	2.31356	4	5	

Clorofila específica

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Y				
NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.				
Alfa				0.05
Error de grados de libertad				15
Error de cuadrado medio				0.263439
Valor crítico del rango estudentizado				4.36699
Diferencia significativa mínima				1.1207
Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.				
Tukey Agrupamiento	Media	N	T	
Â	8.7360	4	5	
Â	8.5814	4	3	
Â	8.5175	4	2	
Â	8.4460	4	4	
Â	8.2614	4	1	

Fotosíntesis

Procedimiento ANOVA			
Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Y			
NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.			
Alfa			0.05
Error de grados de libertad			15
Error de cuadrado medio			86.68174
Valor crítico del rango estudentizado			4.36699
Diferencia significativa mínima			20.329
Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.			
Tukey Agrupamiento	Media	N	T
	Â	141.743	4 5
	Â	139.886	4 4
	Â	135.440	4 3
	Â	133.397	4 2
	Â	122.876	4 1

Respiración

Procedimiento ANOVA			
Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Y			
NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.			
Alfa			0.05
Error de grados de libertad			15
Error de cuadrado medio			75.30495
Valor crítico del rango estudentizado			4.36699
Diferencia significativa mínima			18.948
Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.			
Tukey Agrupamiento	Media	N	T
	Â	90.335	4 5
	Â	84.174	4 4
	Â	74.439	4 2
B	Â	72.406	4 3
B			
B	Â	64.045	4 1
B			

3. Cloruro de amonio

Crecimiento volumétrico de PS

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Y

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	15
Error de cuadrado medio	0.001856
Valor crítico del rango estudentizado	4.36699
Diferencia significativa mínima	0.0941

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey	Agrupamiento	Media	N	T
	A	1.41450	4	5
	A	1.36500	4	3
	A	1.33700	4	4
B	A	1.33700	4	4
B		1.24900	4	2
B		1.24900	4	2
	C	0.91400	4	1

Tasa de crecimiento relativo

Procedimiento ANOVA

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Y

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	15
Error de cuadrado medio	0.000023
Valor crítico del rango estudentizado	4.36699
Diferencia significativa mínima	0.0105

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey	Agrupamiento	Media	N	T
	A	0.302547	4	5
	A	0.295862	4	3
	A	0.294598	4	4
B	A	0.294598	4	4
B		0.284880	4	2
B		0.284880	4	2
	C	0.240182	4	1

Tasa de duplicación

Procedimiento ANOVA				
Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Y				
NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.				
Alfa				0.05
Error de grados de libertad				15
Error de cuadrado medio				0.002074
Valor crítico del rango estudentizado				4.36699
Diferencia significativa mínima				0.0994
Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.				
Tukey Agrupamiento	Media	N	T	
	A	2.88726	4	1
	B	2.43313	4	2
	B			
C	B	2.35292	4	4
C	B			
C	B	2.34275	4	3
C	B			
C		2.29183	4	5

Clorofila específica

Procedimiento ANOVA				
Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Y				
NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.				
Alfa				0.05
Error de grados de libertad				15
Error de cuadrado medio				0.348037
Valor crítico del rango estudentizado				4.36699
Diferencia significativa mínima				1.2881
Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.				
Tukey Agrupamiento	Media	N	T	
	A	12.7540	4	1
	A			
B	A	12.1474	4	5
B	A			
B	A	12.1198	4	4
B				
B		11.1569	4	3
B				
B		10.9702	4	2

Fotosíntesis

Procedimiento ANOVA				
Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Y				
NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.				
Alfa			0.05	
Error de grados de libertad			15	
Error de cuadrado medio			23.34927	
Valor crítico del rango estudentizado			4.36699	
Diferencia significativa mínima			10.551	
Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.				
Tukey	Agrupamiento	Media	N	T
	A	135.082	4	1
	B	112.484	4	4
	B	110.376	4	2
	B	110.206	4	3
	B	109.821	4	5

Respiración

Procedimiento ANOVA				
Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Y				
NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.				
Alfa			0.05	
Error de grados de libertad			15	
Error de cuadrado medio			43.12498	
Valor crítico del rango estudentizado			4.36699	
Diferencia significativa mínima			14.339	
Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.				
Tukey	Agrupamiento	Media	N	T
	A	113.259	4	1
	B	89.059	4	2
	B	87.041	4	3
	B	84.810	4	4
	B	83.548	4	5

4. Fosfato de potasio

Crecimiento volumétrico de PS

Procedimiento ANOVA				
Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Y				
NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.				
Alfa				0.05
Error de grados de libertad				15
Error de cuadrado medio				0.004167
Valor crítico del rango estudentizado				4.36699
Diferencia significativa mínima				0.1409
Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.				
Tukey Agrupamiento	Media	N	T	
A	1.55000	4	5	
B	1.32500	4	2	
B				
C B	1.25000	4	4	
C B				
C B	1.22500	4	1	
C B				
C	1.17500	4	3	

Tasa de crecimiento relativo

Procedimiento ANOVA				
Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Y				
NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.				
Alfa				0.05
Error de grados de libertad				15
Error de cuadrado medio				0.000072
Valor crítico del rango estudentizado				4.36699
Diferencia significativa mínima				0.0185
Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.				
Tukey Agrupamiento	Media	N	T	
A	0.315406	4	5	
B	0.293561	4	4	
B				
B	0.292700	4	2	
B				
B	0.282385	4	1	
B				
B	0.281628	4	3	

Tasa de duplicación

Procedimiento ANOVA			
Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Y			
NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.			
Alfa			0.05
Error de grados de libertad			15
Error de cuadrado medio			0.004984
Valor crítico del rango estudentizado			4.36699
Diferencia significativa mínima			0.1542
Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.			
Tukey Agrupamiento	Media	N	T
	A	4	3
	A	4	1
	A	4	2
	A	4	4
	A	4	4
	B	4	5

Clorofila específica

Sistema SAS 16:13 Tuesday, April 6, 2017 60			
Procedimiento ANOVA			
Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Y			
NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.			
Alfa			0.05
Error de grados de libertad			15
Error de cuadrado medio			0.42227
Valor crítico del rango estudentizado			4.36699
Diferencia significativa mínima			1.4189
Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.			
Tukey Agrupamiento	Media	N	T
	A	4	1
	A	4	2
B	A	4	3
B	A	4	5
B		4	5
B		4	4

Fotosíntesis

Tukey Agrupamiento		Media	N	T
	A	223.039	4	2
B	A	217.241	4	1
B	A	208.740	4	5
B	C	195.178	4	4
	C	178.115	4	3

Respiración

Tukey Agrupamiento		Media	N	T
	A	84.014	4	1
B	A	75.706	4	5
B	A	75.127	4	4
B		72.241	4	2
B		71.951	4	3

5. Cloruro de sodio

Crecimiento volumétrico de PS

Tukey Agrupamiento		Media	N	T
	Á	1.12500	4	1
B	Á	1.02500	4	2
B	Á	1.00000	4	3
B	Á	0.97500	4	4
B		0.85000	4	5

Tasa de crecimiento relativo

Tukey Agrupamiento		Media	N	T
	Á	0.278224	4	1
	Á	0.264842	4	2
	Á	0.261438	4	3
B	Á	0.257676	4	4
B		0.229357	4	5

Tasa de duplicación

Sistema SAS		17:29 Wednesday, October 13, 2017 15	
Procedimiento ANOVA			
Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Y			
NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.			
Alfa			0.05
Error de grados de libertad			15
Error de cuadrado medio			0.021018
Valor crítico del rango estudentizado			4.36699
Diferencia significativa mínima			0.3166
Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.			
Tukey Agrupamiento	Media	N	T
A	3.0313	4	5
B	2.6955	4	4
B	2.6551	4	3
B	2.6224	4	2
B	2.4950	4	1

Clorofila específica

Sistema SAS		17:29 Wednesday, October 13, 2017 25	
Procedimiento ANOVA			
Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Y			
NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.			
Alfa			0.05
Error de grados de libertad			15
Error de cuadrado medio			0.537871
Valor crítico del rango estudentizado			4.36699
Diferencia significativa mínima			1.6014
Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.			
Tukey Agrupamiento	Media	N	T
A	7.5292	4	1
A	6.3931	4	5
B	5.8519	4	3
B	5.6346	4	2
B	5.6067	4	4

Fotosíntesis

Sistema SAS 17:29 Wednesday, October 13, 2017 30

Procedimiento ANOVA

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Y

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	15
Error de cuadrado medio	101.1771
Valor crítico del rango estudentizado	4.36699
Diferencia significativa mínima	21.963

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	T
A	100.256	4	1
B A	81.364	4	3
B A	78.424	4	2
B	63.018	4	5
B	59.658	4	4

Respiración

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Y

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	15
Error de cuadrado medio	134.9092
Valor crítico del rango estudentizado	4.36699
Diferencia significativa mínima	25.361

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	T
A	99.682	4	5
A	98.591	4	4
A	93.602	4	1
A	91.184	4	3
A	80.102	4	2