UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE QUITO

CARRERA5 DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE FICOCIANINA A PARTIR DE *Arthrospira platensis* EN MEDIOS DE CULTIVOS ZARROUK, JORDAN Y MEDIO ARTESANAL.

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:

Ingenieras en Biotecnología

AUTORES:

EMILY NATASHA CARRANZA JIJÓN

IVETH STEPHANIA CARTAGENA EGAS

TUTOR:

DANIEL ALBERTO FREIRE BALSECA

Quito-Ecuador

2023

CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Nosotros, Carranza Jijón Emily Natasha con documento de identificación N° 0803559152 y Cartagena Egas Iveth Stephania con documento de identificación N° 1750077453; manifestamos que:

Somos los autores y responsables del presente trabajo; y, autorizamos a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Quito, 27 de febrero del 2023

Atentamente,

Carranza Jijón Emily Carranza
0803559152

Cartagena Egas Iveth Stephania
1750077453

CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

Nosotros, Carranza Jijón Emily Natasha con documento de identificación N° 0803559152 y Cartagena Egas Iveth Stephania con documento de identificación N° 1750077453; expresamos nuestra voluntad y por medio del presente documento cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del Trabajo experimental: "Evaluación de la producción de ficocianina a través de *Arthrospira platensis* en medio Zarrouk, Jordan y artesanal", el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniería en biotecnología, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribimos este documento en el momento que hacemos la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, 27 de febrero del 2023

Atentamente,

Carranza Jijón Emily Carranza
0803559152

Cartagena Egas Iveth Stephania
1750077453

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Daniel Alberto Freire Balseca con documento de identificación N° 1720534468 docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación "Evaluación de la producción de ficocianina a través de *Arthrospira platensis* en medio Zarrouk, Jordan y artesanal", realizado por Carranza Jijón Emily Natasha con documento de identificación N° 0803559152 y Cartagena Egas Iveth Stephania con documento de identificación N° 1750077453, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, 27 de febrero del 2023

Atentamente,

DANIEL ALBERTO FREIRE BALSECA
CI:1720534468

Ing. Daniel Alberto Freire Balseca
1720534468

DEDICATORIA

El presente trabajo de titulación está dedicado a mi familia por darme su cariño, por ser mi inspiración y motivación a lo largo de mi carrera universitaria, en especial a mi madre María Fernanda Jijón quien me ha enseñado como ser una buena estudiante, una buena profesional y sobre todo una gran persona, quien con su paciencia y esfuerzo me ha permitido culminar esta etapa y prepararme para el futuro. Al igual que dedicar este logro a mi abuelita Ney Josefina Mendoza quien me ha dado el apoyo incondicional en cada paso que he dado, por ser una mujer a la que admiro infinitamente y quien no dudó ni un segundo en lo lejos que podría llegar.

- Emily Natasha Carranza Jijón

Dedico de manera especial este trabajo de titulación a mi abuelo Jorge Cartagena que siempre me supo dar palabras de aliento para seguir con mi carrera universitaria y que siempre creyó en mí hasta el final, a mi padre Santiago por siempre brindarme su apoyo y confianza a mi pequeño hermano Martin por darle mucha alegría a mi vida y a mi madre Iveth por enseñarme a esforzarme por lo que quiero, por enseñarme a ser una persona consecuente y sobre todo buena hija. Dedico también este trabajo de titulación a toda mi familia por nunca dejar de apoyarme y siempre sentirse orgullosos de mis logros.

- Iveth Stephania Cartagena Egas

AGRADECIMIENTOS

Al haber culminado esta etapa universitaria para iniciar nuestra carrera profesional, queremos expresar nuestro agradecimiento de manera especial a la Universidad Politécnica Salesiana y a los docentes que lo conforman ya que nos han enseñado con paciencia, dedicación, y esmero todo lo que se requiere para poder brindar nuestros conocimientos en el área laboral; al mismo tiempo queremos dar un reconocimiento muy particular al Ing. Daniel Freire tutor de tesis quien supo guiarnos en todo el trabajo de titulación, quien con sus enseñanzas y sobre todo con su paciencia y perseverancia nos ayudó a culminar esta etapa universitaria y nos preparó como unas buenas profesionales.

Agradecer a nuestros compañeros de Universidad, en especial a nuestra compañera Paula Calderón quien nunca dejo que decaigamos a lo largo de los años, quienes con sus risas, momentos, conocimientos y problemas nos hicieron mejores personas, mejores amigos y gracias a ellos y a sus enseñanzas estamos aquí y somos buenos seres humanos.

A mi compañera de tesis y amiga de universidad, Iveth Cartagena; gracias por tu paciencia por tu esfuerzo siempre, por el apoyo y soluciones que me brindaste en todos los problemas universitarios y personales.

A mi compañera Emily Carranza que no solo me acompañaste en la vida universitaria fuiste mi amiga, confidente y compañera en la vida cotidiana, gracias por ser una excelente persona conmigo y por siempre apoyarme en los momentos duros que pasé.

Agradecemos a todos los que fueron parte de nuestra vida universitaria, al igual a esa persona especial Alejandra Caragolla que no pudo culminar la carrera con nosotros, pero siempre llevaremos en nuestro corazón como una amiga excepcional.

RESUMEN

En este trabajo de titulación se evaluó el efecto de las diferentes composiciones del medio de cultivo Zarrouk, Jordan y Artesanal sobre el crecimiento y la producción de ficocianina de la cianobacteria *Arthrospira platensis* utilizando como testigo agua de mar. Se presentaron curvas de crecimiento que fueron elaboradas con los datos de la cámara de Sedgwick-Rafter para su conteo celular, este fue determinado durante un mes, evaluando tres días a la semana. El porcentaje de ficocianina de esta cianobacteria fue medido mediante formula y técnicas de ruptura celular, obteniendo así la técnica de sonicador por 20 min y 12 horas de congelación lenta como el procedimiento para obtener el mejor resultado. Se debe movilizar las muestras siempre cubiertas con papel aluminio para evitar su foto degradación. Se realizaron dos mediciones, una intermedia y una final todas por duplicado para evitar un error significativo en una etapa de muerte de la cianobacteria. El ensayo se realizó con un modelo DCA completamente al azar.

Se concluye que *Arthrospira platensis,* tiene un buen crecimiento y producción de ficocianina en todos los tratamientos propuestos, sin embargo, el tratamiento artesanal sería la mejor opción ya que se pudo notar mediante conteo celular un mayor número de filamentos, al igual que un porcentaje de pigmento del 14.26%, concluyendo así que las concentraciones de ficocianina fueron superiores en los tratamientos Artesanal y Zarrouk y sería una opción viable.

Los resultados obtenidos en el programa estadístico Infostat nos indican que no hubo diferencias significativas ($p>0,05$) con respecto al porcentaje de ficocianina entre los tratamientos de las microalgas cultivadas en las mismas condiciones de laboratorio. Mientras que el resultado del análisis del factor de crecimiento de Excel mostró que existen diferencia entre los tratamientos con respecto a la división celular corroborando

que el tratamiento en donde existe mayor división y cantidad del pigmento es el medio artesanal, se concluyó además la importancia de evaluar ficocianina a los 15 días de su desarrollo.

Palabras Clave. *Arthrospira*, , cianobacteria, crecimiento, ficocianina, pigmento.

ABSTRACT

In this titration work, the effect of different compositions of Zarrouk, Jordan and Artesanal culture media on the growth and phycocyanin production of the cyanobacterium Arthrospira platensis was evaluated using seawater as a control. Growth curves were presented and elaborated with data from the Sedgwick-Rafter chamber for cell counting, which was determined during one month, evaluated three days a week. The percentage of phycocyanin of this cyanobacteria was measured by formula and cell rupture techniques, obtaining the sonicator technique for 20 min and 12 hours of slow freezing as the procedure to obtain the best result. Samples should always be mobilized covered with aluminum foil to avoid photo degradation. Two measurements were performed, one intermediate and one final, all in duplicate to avoid significant error in a cyanobacterial death stage. The assay was performed with a completely randomized DCA model.

It is concluded that Arthrospira platensis, has a good growth and production of phycocyanin in all the proposed treatments, however, the artisanal treatment would be the best option since it could be noted by cell counting a greater number of filaments, as well as a percentage of pigment of 14.26%, thus concluding that the concentrations of phycocyanin were higher in the Artisanal and Zarrouk treatments and would be a viable option.

The results obtained in the statistical program Infostat indicate that there were no significant differences ($p>0.05$) with respect to the percentage of phycocyanin between the treatments of the microalgae cultivated under the same laboratory conditions. While the result of the Excel growth factor analysis showed that there were differences between the treatments with respect to cell division, corroborating that the treatment with the highest cell division was the one with the highest number of cells.

The results of the Excel growth factor analysis showed that there is a difference between the treatments with respect to cell division, corroborating that the treatment with the highest division and amount of pigment is the handmade medium, and also concluded the importance of evaluating phycocyanin 15 days after its development.

Key words. Arthrospira, cyanobacteria, growth, phycocyanin, pigment.

Índice de contenido

1 Introducción 1

2 Fundamentación teórica 3

2.1 Cianobacterias ... 3

2.1.1 Ventajas ... 3

2.1.2 Desventajas ... 4

2.1.3 Composición ... 4

2.2 *Arthrospira plantensis* ... 4

2.2.1 Estructura de *Arthrospira platensis* ... 6

2.2.2 Contenido de *Arthrospira platensis*, Spirulina ... 7

2.2.3 Características de *Arthrospira platensis* ... 10

2.3 Pigmentos fotosintéticos ... 11

2.3.1 Ficocianina ... 11

2.4 Producción y crecimiento. ... 13

2.5 Medios de cultivo ... 14

2.5.1 Fuente de Carbono ... 14

2.5.2 Fuente de Nitrógeno ... 15

2.5.3 Fuente de Fósforo ... 15

2.5.4 Luz ... 15

2.5.5 pH ... 15

2.5.6 Medio de cultivo Zarrouk ... 16

2.5.7 Medio de cultivo Jordan ... 16

2.6 Curva de crecimiento ... 17

3 Materiales y métodos 18

3.1 Material biológico (Muestra) ... 18

3.2 Identificación ... 18

3.3 Procedimiento de siembra y elaboración de medio de cultivo 18
3.4 Extracción de ficobiliproteínas 20
3.4.1 Cálculo del porcentaje de ficocianina..... 21
3.5 Diseño experimental 22
3.6 Composición de los medios de cultivo del deseño experimental. 23
3.7 Conteo de tricomas 25
3.8 pH, conductividad y temperatura..... 26
4 Resultados y discusiones 28
4.1 Identificación de *Arthrospira platensis*, Spirulina..... 28
4.2 Contenido de pigmentos de la cianobacteria *Arthrospira platensis* a diferentes tratamientos..... 28
4.3 Diseño experimental y crecimiento de *Arthrospira platensis* 30
4.3.1 Curvas de crecimiento de los diferentes tratamientos 33
4.4 Análisis estadístico 38
4.5 Análisis de varianza de un factor..... 39
4.6 pH, conductividad y temperatura..... 41
5 Conclusiones y recomendaciones 43
6 Bibliografía 45
7 Anexos 48

Índice de tablas

Tabla 1: Taxomía de A. platensis 5

Tabla 2: Aminoácidos presentes en la Spirulina. 7

Tabla 3: Vitaminas presentes en la Spirulina. 8

Tabla 4: Minerales presentes en la Spirulina 8

Tabla 5: Ácidos grasos presentes en la Spirulina 9

Tabla 6: Carbohidratos presentes en la Spirulina 9

Tabla 7: Pigmentos presentes en la Spirulina 10

Tabla 8: Compuestos (ficobiliproteínas) y sus longitudes de onda de absorbancia 12

Tabla 9: Grados de libertad 23

Tabla 10: Planteamiento del diseño experimental 23

Tabla 11: Porcentajes de ficocianina obtenidos en las dos mediciones 29

Tabla 12: Datos recolectados de conteo celular del tratamiento Zarrouk 32

Tabla 13: Resultados de pH, conductividad y temperatura 42

Índice de figuras

Figura 1 Arthrospitra platensis a través de un microscopio 40x. 6

Figura 2. Estructura conformacional de la Ficocianina. 12

Figura 3. Erlenmeyer con Spirulina de 5 tubos de ensayo con inoculo inicial 20

Figura 4. Composición de medio de cultivo Zarrouk modificado..... 24

Figura 5. Composición del medio de cultivo Jordan modificado..... 24

Figura 6. Composición de medio de cultivo artesanal 25

Figura 7. Composición de medio de cultivo agua de mar. 25

Figura 8. Arthrospira platensis vista al microscopio óptico en 60x 28

Figura 9. Frascos Erlenmeyer de 250 mL con los diferentes tratamientos..... 31

Figura 10. Frascos Erlenmeyer de 250 mL con los diferentes tratamientos consumidos 31

Figura 11. Especificaciones para el conteo celular de una muestra diluida 32

Figura 12. Curvas de crecimiento del tratamiento Zarrouk modificado y sus tres repeticiones..... 33

Figura 13. Curvas de crecimiento del tratamiento Control (agua de mar) y sus tres repeticiones A, B y C..... 34

Figura 14. Curvas de crecimiento del tratamiento con medio de cultivo Artesanal y sus tres repeticiones A, B y C..... 35

Figura 15. Curvas de crecimiento del tratamiento Jordan modificado y sus tres repeticiones A, B y C..... 36

Figura 16. Morfología de algas verde-azules y su formación de necridios y hormogonios 37

Figura 17. Resultados obtenidos del análisis de varianza de un factor realizado en Excel en función del día 15 con el número de células sobre mililitro..... 40

Índice de anexos

Anexo 1: Tabla para la recolección de datos con la cámara de Sedgwick-Rafter..... 48

Anexo 2: Resultados de la primera medición de % de ficocianina 49

Anexo 3: Resultados de la segunda medición de % de ficocianina..... 49

1 Introducción

Arthrospira platensis es una especie del filo de las cianobacterias también conocidas como algas azul verdes, las mismas que utilizan para su crecimiento fuentes de luz, CO_2 o HCO_3 y al agua como donante de electrones, crece como tricomas filamentosos y helicoidales y su reproducción ocurre por fisión binaria (Jung et al., 2021).

Esta cianobacteria tiene diferentes propiedades que se ha aprovechado en la industria: alimentaria, acuacultura, cosmética, gracias a su alto contenido de proteínas, aminoácidos esenciales (Flores & Ruiz, 2017), vitaminas, ácidos grasos, minerales, carbohidratos y pigmentos. En el área de salud humana ha tenido un mayor impacto debido a sus propiedades terapéuticas como: antioxidante, antinflamatoria, inmunomoduladores y anticancerígenas (Jung et al., 2021).

En la actualidad se emplea *Arthrospira platensis* en la producción de ficobiliproteínas estas se dividen en tres grupos ficoeritrina, ficocianina y aloficocianina. Siendo de interés biotecnológico la ficocianina la cual es utilizada principalmente como sustituto de colorante sintético (González et al., 2016) , mencionando el azul brillante FCF , como agente anti radicales libres en colorantes cosméticos, aditivo nutricional o como pigmento natural ya sea en dulces, helados y bebidas (Fukui et al., 2004).

Sin embargo, existen varios aspectos desconocidos con respecto a la fisiología de crecimiento en medios de cultivo con agua de mar (Lamela & Marquez, 2000) y actualmente no existe información disponible. Dando como problemática la baja productividad de ficocianina a partir de *Arthrospira platensis* debido a la escaza información la cual es la causa principal de la poca información acerca de técnicas de masificación en un ámbito industrial.

Esta situación ha llevado a la búsqueda de nuevas fuentes alternativas de medio de cultivo, en las cuales se incluyan el uso de agua de mar (Romero et al., 2018) con el fin de obtener datos acerca de la biomasa y rendimientos a bajo costo de producción.

Debido a su alta eficiencia en las diferentes industrias, es necesario plantear una metodología la cual ayude a la alta productividad de este pigmento (PC o ficocianina) en condiciones de laboratorio. Por esta razón nuestro objetivo principal es evaluar la producción de ficocianina a través de *Arthrospira platensis* utilizando tres medios de cultivo con alto contenido de sales simulando así su ambiente natural.

2 Fundamentación teórica

2.1 Cianobacterias

Las cianobacterias o también conocidas como algas “verdes azules”, son organismos procariontes fotoautotróficos oxigénicos que tienes la característica de tener una gran diversidad metabólica ya que son capaces de convertir biomasa a partir de la energía solar hasta 5 veces con mayor eficiencia que las plantas superiores (Mora et al., 2002; Romero et al., 2017)

Estos microrganismos realizan fotosíntesis aeróbica y que contribuyen a la producción de oxígeno, introducción de nitrógeno atmosférico al agua, entre otros papeles fundamentales para el ecosistema, se considera uno de los organismos más antiguos del planeta y se encuentra presente en casi todos los cuerpos de agua existentes (Bonilla et al., 2013).

2.1.1 Ventajas

Estas características han sido utilizadas por la ingeniería ambiental y la biotecnología para varios fines, siendo unos de los principales la biorremediación de ambientes contaminados como fertilizantes, producción de energía, producción de metabolitos secundarios de interés en la farmacología y además como fuente alimenticia para el consumo humanos, peces, moluscos, crustáceos, aves, entre otros animales (Mora et al., 2002; Romero et al., 2017).

Debido a sus características ya mencionadas estos microorganismos con diversa morfología (filamentosos, cadenas o colonias, unicelulares, etc.) poseen moléculas bioactivas tales como compuestos antibacterianos, antivirales, antitumorales, anticoagulantes, las cuales son de gran interés para el hombre y el ambiente, estos

metabolitos son producidos como una respuesta química de defensa al encontrarse en un ambiente altamente competitivo con otros microorganismos (Rodríguez et al., 2022).

2.1.2 Desventajas

La proliferación de las cianobacterias causa algunos impactos negativos a nivel ambiental enfocándose principalmente en el agua, sea potable o aquella que es empleada para uso recreativo como la pesca, etc. Lo que causa también la muerte de peces y plantas dañando así el ecosistema acuático, a nivel económico causan daños financieros en industrias agrícolas, daños de bienes inmuebles en las zonas costeras y en la salud ya que al ser consumidas estas toxinas, puede provocar en los humanos un problema en el hígado (hepatotoxinas), en el sistema nervioso (neurotoxinas), problemas en piel, en otro órganos a nivel renal , problemas respiratorios, crecimiento tumoral entre otras enfermedades más (Gunther, 2021).

Debido al cambio climático, al aumento de la temperatura, una mayor duración de la estratificación térmica, patrones hidrológicos alterados, el tiempo de estadía en el agua, suministro de nutrientes, da como resultado una elevada floración de las cianotoxinas y provocan que las cianobacterias se vuelvan más resistentes (Gunther, 2021).

2.1.3 Composición

Las cianobacterias están compuestas principalmente por proteínas las cuales van hasta el 50% del total de su peso seco, en conjunto con carbohidratos y lípidos llegan hasta un 90% del peso total en seco, el 10% faltante se constituye de ácidos nucleidos, minerales y pigmentos (Arredondo et al., 2017).

2.2 *Arthrospira plantensis*

El género *Arthrospira* que es una cianobacteria procariota se divide en tres subespecies principales *Arthrospira platensis*, *Arthrospira fusiformis y Arthrospira maxima* (García et al., 2021). A continuación, se muestra la taxonomía en la Tabla 1.

Tabla 1: Taxomía de *A. platensis*

Reino	**Monera**
Filo	Cyanobacteria
Clase	Cyanophyceae
Orden	Nostocales
Familia	Oscillatoriaceae
Genero	*Arthrospira*
Especie	*plantesis*

Fuente: (Silva, 2008).

Elaborado por: Las autoras, 2022

Esta cianobateria es comercializada por su alto contenido de ácidos grasos, proteínas, vitaminas esenciales y sus varios beneficios se atribuyen a sus componentes, como los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), clorofila terpenos y pigmentos que provienen de la fotosíntesis (Romero et al., 2017).

Un ejemplo especifico es en el área cosmética debido a sus efectos anti edad, antiarrugas, revitalizante o anti enrojecimiento de la piel, contiene vitaminas como por ejemplo la vitamina A o retinol la cual da muy buenos resultados absorbiendose en la epidermis, por lo tanto juega un papel fundamental en la reducción de arrugas, va a incrementar la hidratación de la piel y la disminución de la hiperpigmentación, la vitamina C que es la productora de la síntesis del colágeno previniendo el daño ocasionado por la luz solar, la vitamina E actúa contra las moléculas ROS (especies reactivas del oxígeno) ya que absorbe la energía de los rayos UV y es un excelente antiinflamatorio, la biomasa de

varias cianobacterias y micro algas es utilizada como un producto o como ingrediente de productos registrados (De la Roche & Galán, 2018).

2.2.1 Estructura de *Arthrospira platensis*

Arthrospira platensis o antes conocida como *Spirulina* tiene una forma de cilindro alargado, enrollado, espiral y multicelular (Manirafasha et al., 2018) con paredes transversales que crece con tricomas lo cuales son más largos en comparación con las otras subespecies, rodeadas de una lámina viscosa la cual permite realizar la fisión binaria el cual es su método de reproducción (Akimoto et al., 2012). Como se puede obervar en la Figura 1.

***Arthrospira platensis* (Spirulina)**

Figura 1 *Arthrospira platensis* a través de un microscopio 40x.

Elaborado por: Las autoras, 2022.

Así mismo tiene un mayor tamaño que las otras cianobacterias por lo cual le confiere la propiedad de facilitar la digestión y absorción en el cuerpo humano, debido a que no

posee celulosa en la membrana celular (Manirafasha et al., 2018) según varios estudios realizados *Arthrospira platensis* es conocida por su actividad eliminadora de radicales libres y antioxidante (Vernès et al., 2015).

Además, a nivel nutricional es muy cotizada por su particular contenido de: 50 % a 70% de proteínas descritas en la Tabla 2, 6% a 10% de lípidos, 20% de carbohidratos descritos en la Tabla 6, minerales (K, Ca, Fe, Mg, Zn) descritos en la Tabla 4, vitaminas (B1, B12, E) descritas en la Tabla 3, pigmentos descritos en la Tabla 7, ácidos grasos descritos en la Tabla 5, fibras (Vernès et al., 2015) medicamentos contra la hiperlipidemia, cáncer, daño hepático y renal, enfermedades neurodegenerativas y la diabetes (Romero et al., 2018).

2.2.2 Contenido de *Arthrospira platensis*, Spirulina

Tabla 2: Aminoácidos presentes en la Spirulina.

Aminoácidos esenciales		**Aminoácidos no esenciales**	
Nombre	**Contenido en porcentaje (%)**	**Nombre**	**Contenido en porcentaje (%)**
Valina	7.5	Cisteína	0,5 – 0,7
Leucina	5,9 – 6,5	Ácido glutámico	7,3 – 9,5
Lisina	2,6 – 3,3	Ácido aspártico	5,2 – 6,0
Isoleucina	6,8		
Fenilalanina	2,6 – 3,3		
Metionina	1,3 – 2,2		
Triptófano	1,0 – 1,6		

Fuente: (Sánchez et al., 2003; Vonshak, 2002)

Elaborado por: Las autoras, 2022

Tabla 3: Vitaminas presentes en la Spirulina.

Nombre	Contenido en porcentaje (%)
Provitamina A	0,11 – 0,2
Niacina B3	0,014
Tiamina B1	3 – 4 mg
Riboflavina B2	2,5 – 3,5 mg
Cobalamina B12	0,15 – 0,25 mg
Vitamina B6	0,5 – 0,7 mg
Vitamina E	5 – 7 mg
Vitamina K	2.2 mg
Ácido fólico	4 – 5 mg
Biotina	5 µg
Ácido pantoténico	0,5 – 0,8 mg

Fuente: (Sánchez et al., 2003; Vonshak, 2002)

Elaborado por: Las autoras, 2022

Tabla 4: Minerales presentes en la Spirulina

Nombre	Contenido en porcentaje (%)
Sodio	0,45 – 0,5
Potasio	1 – 14
Calcio	0,1 – 0,4
Fósforo	0,3 – 0,7
Hierro	0,03 – 0,05
Magnesio	0,1 – 0,2
Zinc	0,003
Manganeso	0,005
Cobre	0,0012
Cromo	0,28 mg

Fuente: (Sánchez et al., 2003; Vonshak, 2002)

Elaborado por: Las autoras, 2022

Tabla 5: Ácidos grasos presentes en la Spirulina

Nombre	Contenido en porcentaje (%)
Ácido palmítico	44,6 – 54,1
Ácido mirístico	0,23
Ácido gamma-linoleico	8 – 32
Ácido linolénico	11 – 31
Ácido oleico	1 – 15,5
Ácido palmitoleico	1,26
Otros	20,88

Fuente: (Sánchez et al., 2003; Vonshak, 2002)

Elaborado por: Las autoras, 2022

Tabla 6: Carbohidratos presentes en la Spirulina

Nombre	Contenido en porcentaje (%)
Manosa	1,9
D-Glucosamina	2,1
Fucosa	3,3
Xilosa	4,5
Glicerol	7,4
Glucosa	7,5
Ribosa	8,1
Galactosa	8,2
Ramnosa	17,1
No identificados	2,6

Fuente: (Sánchez et al., 2003; Vonshak, 2002)

Elaborado por: Las autoras, 2022

Tabla 7: Pigmentos presentes en la Spirulina

Nombre	Contenido en porcentaje (%)
Clorofila	0,8 – 1,5
Carotenoides	0,648
Oscillaxantina	3 – 5
Diatoxantina	5
Cantaxantina	5
Beta-criptoxantina	6 – 8
Equinenona	11 – 13
3'-hidroxiequinenona	7 – 11
Beta-caroteno	15
Zeaxantina	25
Mixoxantofila	13 - 17
Ficocianina	16 – 20
No identificados	3 - 4

Fuente: (Sánchez et al., 2003; Vonshak, 2002)

Elaborado por: Las autoras, 2022

2.2.3 Características de *Arthrospira platensis*

Es una cianobacteria verde azulada (Lee et al., 2022) lo que significa que realiza la fotosíntesis pero no contiene cloroplastos, al tener un mayor diámetro de sus hélices le da un ventaja de sobrevivencia ante ciertas condiciones ambientales como son los altos niveles de carbonato, bicarbonato y pH. El conocimiento de su fisiología es esencial y nos permite evaluar el grado de productividad y crecimiento (Akimoto et al., 2012).

Arthrospira platensis habita en cuerpos de agua alcalina, contiene una taza de crecimiento óptima en climas tropicales con una temperatura de 25 a 35°C, temperaturas menores a los 25°C no la permitirán prosperar, pero si existirá crecimiento mientras que en

temperaturas que superen los 35°C pondrá en riesgo la supervivencia de esta cianobacteria (Ismaiel et al., 2016).

2.3 Pigmentos fotosintéticos

Las ficobiliproteínas son proteínas solubles en agua que se encuentran en cianobacterias y algas rojas, estas proteínas están compuestas por múltiples cromóforos tetrapirrólicos de cadena abierta (Romero et al., 2017) los cuales le permiten tener un alto coeficiente de absorción de luz en el rango verde y rojo naranja indicando así las longitudes de onda en la Tabla 8. Esto permite que varios microorganismos realicen fotosíntesis en aguas profundas en donde solo la luz verde penetra, estas contienen dos unidades una proteica y una denominada ficobilina las cuales se encuentran unidas mediante un enlace covalente a un aminoácido cisteína (Abalde Alonso et al., 1995).

Los pigmentos provenientes de las microalgas y cianobacterias tienen un potencial en ser antioxidantes, estos compuestos tienen la función de absorber la radiación ultravioleta B e inhibir enzimas que tienen una participación en inflamaciones dérmicas que van directamente relacionadas a la exposición solar. Es por esta razón que se le atribuye la propiedad de ser protector contra la radiación (De la Roche & Galán, 2018).

Conocemos a la ficocianina que contiene la C-ficocianina y la aloficocianina como pigmentos captadores de luz que cumplen una función de transferencia de energía en los fotosistemas también se lo llamada como una cascada de transferencia. Esta proteína posee un color azul brillante es ampliamente utilizada como colorante para productos alimenticos y para el área de cosmetología así mismo se lo puede utilizar en el área de investigación biomédica, nutraceútica y farmacéutica (González et al., 2016).

2.3.1 Ficocianina

Las ficobiliproteínas o FBP de dividen en ficoeritrobilinas y ficocianobilinas (aloficocianina y ficocianina) las cuales se clasifican en base a la longitud de onda en la que absorben (Abalde Alonso et al., 1995) las cuales se pueden observar en la Tabla 8.

Tabla 8: Compuestos (ficobiliproteínas) y sus longitudes de onda de absorbancia

aloficocianina A	**650 nm; azul claro**
aloficocianina B	λmax 671 nm
ficocianina	λmax 620 nm; azul
ficoeritrina	λmax 500-580 nm; rojo
ficoeritrocianina	λmax 568 nm

Fuente: (Abalde Alonso et al., 1995)

Elaborado por: las autoras, 2022

La ficocianina o pigmento azul tiene una estructura básica que consta de dos subunidades en forma de hélice denominados alfa y beta, este pigmento tiene un cromóforo que está unida a una apoenzima mediante un enlace tioester (Fukui et al., 2004; Lamela & Marquez, 2000).

Estructura conformacional de la Ficocianina

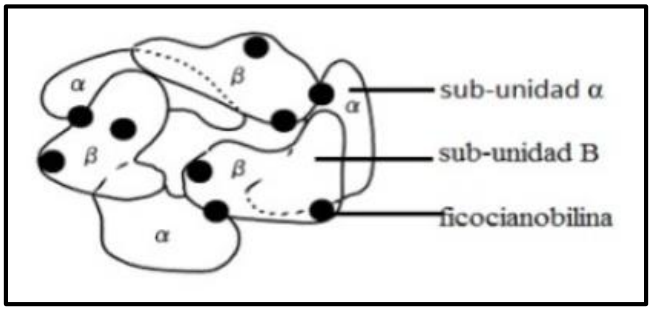

Figura 2. Estructura conformacional de la Ficocianina.

Adaptado de (Fukui et al., 2004)

En cuando a la biomasa la ficocianina se caracteriza por alcanzar cerca del 30%, pero cuando hablamos de concentración en la célula es importante mencionar que esta

dependerá de las condiciones ambientales para su crecimiento (Lamela & Marquez, 2000) (T°, fuente de C y N, pH y luz) (Lee et al., 2022) que pueden estimular o inhibir la biosíntesis y la acumulación de bioactivos específicos (Fukui et al., 2004).

2.4 Producción y crecimiento.

Es de conocimiento que varias cepas de *Arthrospira platensis* crecen o pueden crecer en varios medios de cultivo alcalinos (Romero et al., 2018) o medios de cultivo con agua de mar como principal componente reduciendo así los costos de producción (Lamela & Marquez, 2000). Para el crecimiento de microalgas es necesario utilizar nutrientes inorgánicos, luz, CO_2, sales minerales, nitratos, amonio, nitrógeno, fosforo, calcio, sodio, magnesio, entre otros. Los cuales deben asegurar el crecimiento, teniendo en cuenta los principales nutrientes que son el agua a pesar de servir cono transporte esta tiene la función de suministrar electrones (H^-) indispensables para poder realizar la reducción de CO_2 (Fernandez, 2014).

Por esa razón se elaboran medios de cultivo que tengan todos estos compuestos, es así que se define a un medio de cultivo como una disolución acuosa que ayuda a transportar todos estos nutrientes y sirven como suministro para las microalgas, al realizarlo es necesario medir las concentraciones para evitar una limitación en la producción de biomasa, la concentración y el crecimiento están directamente relacionados con la producción y evitaremos así una fotoinhibición (Fernandez, 2014).

El crecimiento del cultivo de cianobacterias puede ser expresado como el incremento en la biomasa, este puede ser determinado por el número de celular o recuento de ellas, peso seco entre otros, que pueden ser tomado en cuenta como métodos de cuantificación, sin embargo, el método más utilizado es el recuento celular en la cámara de Neubauer y Sedgwick Rafter al ser estos métodos sencillos y económicos (Chye & Han, 2018).

2.5 Medios de cultivo

Un medio de cultivo es aquel que se utiliza para el crecimiento de microorganismos en laboratorio, este aporta una gran cantidad de nutrientes, factores de crecimiento, condiciones fisicoquímicas necesarias para el desarrollo de su metabolismo (Cuevas, 2009; Fontalvo, 2018).

De una forma general los medios de cultivo deben estar compuestos de: fuente de carbono, nitrógeno, amortiguadores de pH como los más importantes (Fontalvo, 2018), estas sustancias o elementos pueden ser de origen orgánico o inorgánico, artificial o natural lo importante es que deben cumplir con su finalidad que es garantizar el crecimiento del microrganismo, su diferenciación, identificación y en algunos casos inhibir el desarrollo de otros microorganismo (Rodríguez & Zhurbenko, 2018).

Los cultivos de *Arthrospira platensis* se realizan en medios de cultivo costosos debido a que se incluyen un gran número de sales de grado analítico en agua dulce (Romero et al., 2018).

2.5.1 Fuente de Carbono

Para los cultivos fotosintéticos se recomienda utilizar el dióxido de carbono como principal fuente de carbono ya que logra dispersarse desde el exterior hasta el interior de la célula y es aprovechado en los procesos de fijación (Ramírez, 2020; Wen & Chen, 2003).

Se añade carbono al medio ya que es un principal componente de la biomasa, el crecimiento se puede ver afectado o limitado por este elemento ya sea de forma orgánica o inorgánica, otra forma de añadir carbono puede ser con glucosa o polisacáridos como: fructosa, almidón lactosa o galactosa (Wen & Chen, 2003). Otra forma de incrementar C al sistema es agregando bicarbonato (Fernandez, 2014).

2.5.2 Fuente de Nitrógeno

El nitrógeno es el segundo elemento más importante o limitante en los medios de cultivo de microalgas es el 5% aproximadamente del peso seco y además constituye los aminoácidos de los nucleótidos (Mora et al., 2002), se recomienda implementar nitrato aunque el amoniaco, la urea y las fuentes orgánicas también llegan a ser asimiladas por varias especies de microalgas y es importante en la síntesis de proteínas (Ramírez, 2020).

2.5.3 Fuente de Fósforo

El tercer elemento de principal demanda en los medios de cultivo es el fósforo ya que hace como intermediario metabólico, lipídico y enzimático (Fernandez, 2014). El fósforo reactivo es fácil de asimilar por las microalgas, de igual manera se recomienda en uso de fósforo hidrolizable con ácido y el fósforo orgánico ya que estos actúan de manera eficiente en los sistemas de cultivo (Ramírez, 2020).

2.5.4 Luz

Se debe tomar en cuenta las altas cantidades de luz (luz led y lámparas) las cuales no deben superar los 120 000 lux ya que esto perjudicará, la correcta exposición a luz permitirá que el cultivo crezca y se realice la fotosíntesis (Ismaiel et al., 2016).

2.5.5 pH

Otro factor importante es el pH el cual oscila entre 7.5 a 11 la variación de este permitirá desarrollar diferentes enzimas siendo así el pH 9 el óptimo para el crecimiento de las cianobacterias y también evita posiblemente la precipitación de NaCl (Lamela & Marquez, 2000), este pH mantiene las condiciones alcalinas lo que aumenta el rendimiento de biomasa de *Arthrospira platensis*, como consecuencia de un pH alto tendremos resultados altamente bajos (Ismaiel et al., 2016).

Se debe tener en cuenta la clasificación de los nutrientes de acuerdo a la cantidad necesario y la función, así tenemos los macronutrientes que tiene la función principal de mantener la presión osmótica y equilibrar los electrolitos, en esta sección se puede mencionar al cloruro de sodio, sales, sulfatos en la cual su concentración puede ir desde los 30 g/l si trabajamos con especies marinas y de 100 g/l en micro algas halófitas (Fernandez, 2014).

Cuando mencionamos valores de concentración debemos tomar en cuenta que esto va a depender de la especie con la que estemos trabajando, seguimos con los micronutrientes que su función principal es ser cofactor para las enzimas, su concentración va a ir desde un microgramo ya que en exceso puede ocasionar daño a nuestro cultivo (Fernandez, 2014).

2.5.6 Medio de cultivo Zarrouk

El medio de cultivo Zarrouk es utilizado para procesos de crecimiento de microalgas , debido a que este tiene la capacidad de doblar la población en la mitad del tiempo, comparándolo con otros medios de cultivo (Alvarado et al., 2019), al igual que incrementa la biomasa de estos microorganismos . Para este medio de cultivo se sugieren las siguientes cantidades para un litro de compuestos inorgánicos: $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.04 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.20 g; EDTA (Na), 0.08 g; $NaHCO_3$, 16.80 g; KNO_3 2.50 g; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.01 g; K_2SO_4, 1.00 g; K_2HPO_4, 0.50 g; NaCl, 1.00 g; H2O y agua destilada hasta aforar 1 litro del medio (Alvarado et al., 2019; Prieto & Lamas, 2021).

2.5.7 Medio de cultivo Jordan

Como una alternativa económica en relación al medio de cultivo Zarrouk se desarrolla el medio de cultivo Jordan el cual desde el punto de vista a escala este es un medio alternativo que promete la misma producción de clorofila y biomasa (Ramírez, 2020;

Raoof et al., 2006), la composición del medio de cultivo es: $NaHCO_3$: 7g/l, KNO_3: 2 g/l, NaCl: 5 g/l, $MgSO_4$. $7H_2O$: 0.2 g/l, $FeSO_4$. $7H_2O$: 0.01 g/l, K_2SO_4: 1 g/l.

2.6 Curva de crecimiento

Para la cinética de crecimiento de *A. platensis* se mencionan 5 fases principales en su desarrollo que se da bajo las condiciones que han sido controladas en laboratorio (luz, aireación, temperatura, y pH estables) (Muñoz et al., 2021).

La primera fase, es la fase de adaptación o latencia de la cianobacterias en la que buscamos que la spirulina se adapte a las condiciones del medio de cultivo elaborado, en esta etapa vamos a ver poco crecimiento (Ortiz et al., 2018).

La segunda fase, es la fase de crecimiento o exponencial en donde vamos a observar que nuestra cianobacterias ya está completamente adaptada y tenemos un incremento en su biomasa inicial , el tiempo va a ser un factor directamente proporcional a los valores de crecimiento exponencial (Muñoz et al., 2021).

La tercera fase, es la fase de un crecimiento lineal o estacionaria, en donde observamos que los nutrientes provenientes del medio se van disminuyendo y esto causa la inhibición de la biomasa y el aumento de la densidad celular (Muñoz et al., 2021).

La cuarta fase, es la fase de muerte en donde se ven alteradas las condiciones iniciales del medio de cultivo y de su alrededor como los factores de luz , la disminución de nutrientes, temperatura , entre otros factores (Muñoz et al., 2021; Ortiz et al., 2018).

3 Materiales y métodos

El presente trabajo experimental se realizó en la Universidad Politécnica Salesiana en los laboratorios de Ciencias de la Vida ubicados en las calles Isabel La Católica y Madrid bloque B.

3.1 Material biológico (Muestra)

La microalga *Arthrospira platensis* usada en este estudio fue obtenida de Los Andes Spirulina

3.2 Identificación

Para la identificación de microalgas utilizamos un microscopio óptico Motic RED-200 y una guía bibliográfica con iconografías que nos sirvan para observar las características de la spirulina, según Arenas & Cortella (1996) la morfología para la identificación de spirulina debe presentar: tricomas espiralados, levemente constrictos a nivel de los tabiques, no deben presentar vaina, las células deben ser más cortas que anchas con terminal redondeada y que no presente caliptra, se debe observar pequeñas granulaciones a nivel de los tabiques, las dimensiones celulares están en ancho entre 6 -10 µm; largo 1.5 – 5.3 µm, los tricomas deben tener un distancia entre 40 – 42 µm y el ancho de los espirales entre 24 a 30.7 µm.

3.3 Procedimiento de siembra y elaboración de medio de cultivo

3.3.1.1 Reactivos y medio de cultivo

Para realizar el medio artesanal propuesto se necesitaron los siguientes reactivos: bicarbonato 10g/l, KNO_3: 3g/l, K_2SO_4: 1g/l, K_2HPO_4:0.5 g/l, NaCl: 3g/l, $MgSO_4.7H_2O$: 0.1g/l, $FeSO_4.7H_2O$: 0.001g/l el cual es un medio modificado de Zarrouk.

Se realizaron los cálculos correspondientes con respecto del medio de cultivo de 1 litro para 100ml los cuales se pesaron en la balanza analítica Mettler Toledo ME204TE/00 y se transfirió a un frasco boeco de 500 ml posterior se aforo con agua destilada a 100 ml y se llevó a la autoclave horizontal Tuttnauer 3870M.

3.3.1.2 Técnica de siembra por inoculación o agitación

Para tomar el inoculo de una muestra, se deben seguir los siguientes pasos: para transferir la muestra a partir de un medio líquido o sólido a otro líquido, se debe usar el asa bacteriológica (de argolla), o en algunos casos se puede usar pipetas estériles o hisopos. Si se utiliza asas bacteriológicas, se debe inocular el microorganismo en el medio líquido (Sanz, 2011).

Para la siembra en medio de cultivo liquido se debe inclinar el tubo de ensayo en un ángulo de 30 grados y el asa de inoculación debe tocar la superficie interna del vidrio. Cuando el tubo es vuelto a su posición vertical, el área de inoculación queda sumergida debajo de la superficie, se puede agitar suavemente el asa en el interior del medio líquido (Sanz, 2011).

Se realizo esta técnica hasta obtener una cantidad de spirulina considerable en 10 tubos de ensayo con 10ml de medio de cultivo, estos se trasvasaron a un Erlenmeyer de 1000 ml con la cantidad de nuestro inoculo inicial de 5 tubos de ensayo y 100ml de medio de cultivo como se puede ver en la Figura 3.

Erlenmeyer con inoculo inicial

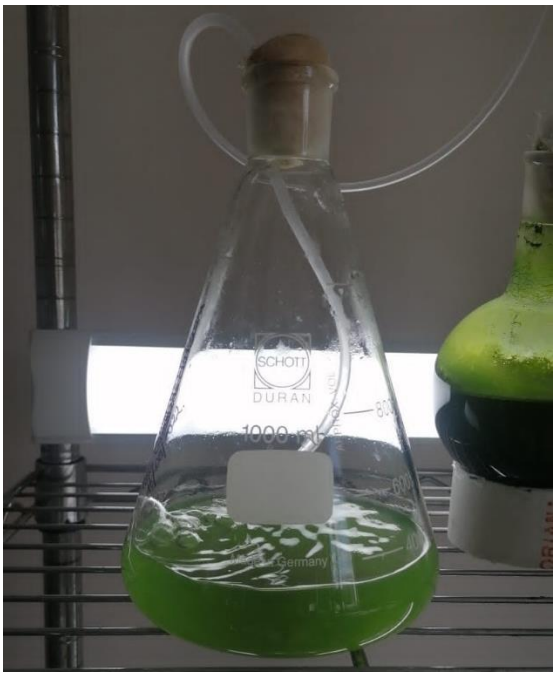

Figura 3. Erlenmeyer con Spirulina de 5 tubos de ensayo con inoculo inicial

Tomado por: Las autoras, 2022

3.4 Extracción de ficobiliproteínas

Se realizó la extracción de ficobiliproteínas mediante la técnica de extracción por filtración al vacío el cual el principio es que el fluido en nuestro caso líquido, pase por el medio permeable o papel filtro mientras que la parte sólida se queda retenida (Grau & Gorchs, 2009). Para este procedimiento fue necesario utilizar una bomba al vacío de marca Gast modelo DOA-P704-AA, papel filtro, un matraz Kitasato desarmable y 30 ml del cultivo con spirulina el equipo montado.

Para obtener el porcentaje de humedad, se realizó el mismo procedimiento de extracción de muestra húmeda, en el cual se aumentó el contenido de 30 ml a 100ml del cultivo con spirulina para obtener una buena cantidad de biomasa, posterior a la extracción raspamos con la espátula la biomasa del papel filtro para pasarla a una bandeja de aluminio y directamente al detector halógeno de humedad marca Mettler Toledo modelo HB43-S,

esta medición se realiza una sola vez, debido a que servirá de base para el cálculo de porcentaje de ficocianina posteriormente.

Para la preparación del buffer fueron necesarios 1.74 gr de Fosfato de potasio pesados en la balanza analítica marca Mettler Toledo modelo ME204TE/00, y aforamos con agua destilada hasta llegar a 100ml en un balón aforado, el buffer deberá tener un pH de 7 en el caso de sobrepasar el pH indicado se debe regular el pH con ácido clorhídrico.

Se pesaron 5 mg de microalga de la muestra húmeda obtenida en la balanza analítica marca Mettler Toledo modelo ME204TE/00 y se añadió 10 mL de Buffer fosfato de potasio previamente preparado, se llevó a vortex Fisher Brand 2215414 durante 5 minutos, luego se congeló la muestra por 12 horas en refrigeradora Indurama RI-405 a -4 °C, se sonicó en baño de ultrasonido marca Fisher Scientific modelo F5-60D durante 20 min. La muestra se llevó a la cetrifugadora marca Gemmy Industriale modelo PLC-05 por 10 min a 4000 rpm y se extrajo el sobrenadante para el análisis del pigmento ficocianina.

3.4.1 Cálculo del porcentaje de ficocianina

Para realizar el cálculo de porcentaje de ficocianina luego de realizar el proceso de extracción y lisis celular, con ayuda de una pipeta Pasteur recogemos alrededor de 2mL del sobrenadante y lo colocamos en celdas espectrofotométricas de cuarzo para obtener valores más reales.

Medimos en las siguientes longitudes de onda de absorbancia en la cuales se identifica ficocianina según bibliografía y que se encuentra en la Tabla 8, a 615 nm y 652 nm. Lo resultados obtenidos del espectrofotómetro marca Shimadzu UV mini modelo 1240 se los debe reemplazar en la siguiente fórmula para calcular el porcentaje de ficocianina:

$$(PC) = \frac{A615 - (0{,}474 * A652)}{5{,}34}$$

Se debe tener en cuenta el porcentaje de humedad para poder determinar el porcentaje de ficocianina se debe realizar el siguiente cálculo:

$$\%\ humedad = \frac{Peso\ muestra\ húmeda - peso\ muestra\ seca}{Peso\ muestra\ humeda} * 100$$

$$\%(Sol) = 100\% - \%\ humedad = \%(sol)$$

$$50mg * \%(Sol) = Constante\ de\ humedad$$

En donde los 50mg son de la muestra tomada inicialmente.

Para obtener el porcentaje de ficocianina se realizó el siguiente calculo:

$$\%(PC) = \frac{(\mathrm{PC})}{Constante\ de\ humedad} * 100$$

3.5 Diseño experimental

Se utilizó un modelo completamente al azar (DCA) establecido con cuatro tratamientos siendo nuestro T2 Medio de cultivo Jordán modificado, T3 Medio de cultivo Zarrouk modificado, T4 Medio de cultivo artesanal y un testigo experimental como nuestro T1 de agua de mar (producida en laboratorio) como podemos observar en la Tabla 10, cada uno de los tratamientos cuenta con tres repeticiones las cuales se calculan con los grados de libertad que se encuentran en la Tabla 9.

Posteriormente las muestras fueron llevadas a Erlenmeyer de 250 ml, en las que se utilizará 200 ml de cada medio de cultivo de cada tratamiento y 50 ml de *Arthrospira platensis.*

Tabla 9: Grados de libertad

Grados de libertad
GLE-Tx(r-1)
GL-12
r-4

Grados de libertad para el cálculo de las repeticiones

Elaborado por: Las autoras 2022

Tabla 10: Planteamiento del diseño experimental

T1- Testigo (Sal de mar)	**A**
T2- Medio de cultivo Jordan modificado	**B**
T3- Medio de cultivo Zarrouk modificado	**C**
T4- Medio de cultivo Artesanal	**D**

UNIDAD EXPERIMENTAL	**TRATAMIENTO**	**REPETICIONES**
1	A	1
2	B	1
3	C	1
4	D	2
5	A	2
6	B	2
7	C	3
8	D	3
9	A	3
10	B	4
11	C	4
12	D	4

Planteamiento del diseño experimental DCA balanceado con 3 repeticiones

Elaborado por: Las autoras 2022

3.6 Composición de los medios de cultivo del deseño experimental.

Zarrouk modificado

Medios de cultivo

Zarrouk M	g/L
NaHCO3	16.8
K2HPO4	0.5
KNO3	3
NaCl	1.0
MgSO4. 7H2O	0.2
FeSO4. 7H2O	0.01
K2SO4	1.0
CaCl2. 2H2O	0.04
EDTA	0,1

Figura 4. Composición de medio de cultivo Zarrouk modificado

Fuente: (Alvarado et al., 2019; Prieto & Lamas, 2021)

Jordan modificado

Medios de cultivo

Jordan M	g/L
NaHCO3	8
KNO3	2
NaCl	5
MgSO4. 7H2O	0,2
FeSO4. 7H2O	0,01
K2SO4	1

Figura 5. Composición del medio de cultivo Jordan modificado

Fuente: (Raoof et al., 2006)

Artesanal

Medio de cultivo

Artesanal	g/L
Sal en grano	7
KNO3	3
Urea	0,2
K2SO4	1
K2HPO4	0.5
EDTA	0,08
FeSO4. 7H2O	0,01

Figura 6. Composición de medio de cultivo artesanal

Fuente: Las autoras, 2023

Control, Agua de mar

Medio de cultivo

CONTROL	g/L
Sal en grano	25

Figura 7. Composición de medio de cultivo agua de mar.

Fuente: (Romero et al., 2018)

3.7 Conteo de tricomas

Para realizar el conteo de tricomas de la muestra la cual debe ser analizada e identificada anteriormente primero vamos a diluir la muestra 20 veces, lo que quiere decir que con una pipeta graduada vamos a tomar una pequeña alícuota de 0.5mL de muestra la cual se coloca en un tubo de ensayo y completamos con 9.5mL de agua destilada, este procedimiento de sebe repetir para las 12 muestras mencionadas en nuestro diseño experimental para los 4 tratamientos.

Se toma 1mL de la muestra diluida y se la coloca suavemente en la cámara de Sedgwick-Rafter teniendo mucho cuidado de no generar burbujas, se coloca la cámara en el microscopio y se debe esperar alrededor de 5 a 10 minutos a que las células se depositen al fondo de la cámara y facilitar el conteo.

Para iniciar el conteo se deben seleccionar entre 10 o 20 cuadricular al azar, se deben contar los tricomas individuales dentro de la cuadricula, excluyendo los que se encuentra en las líneas.

La cámara de Sedgwick-Rafter cuenta con las siguientes dimensiones 50 a 500 µm, el volumen de la cámara es de 1 mL y los lentes objetivos que se recomienda utilizar para esta técnica son los de 10X y 20X (Moreno et al., 2012)

Para realizar el cálculo en este caso de tricomas utilizamos la siguiente fórmula:

Factor de enumeración = $\frac{1000}{Área\ del\ disco\ W * 15x} = 1\ 000$

Tricomas / mL = $\frac{C * V\ final\ diluido}{A * V\ original\ de\ muestra * 1\ mL} * FDE$

N°/ mL = $\frac{C * 1000\ mm^3}{A * D * F}$ * FDE

En donde: C es el número total de tricomas contados, A es 1mm^2, D 1 mm, F es el número de celdas contadas al azar.

3.8 pH, conductividad y temperatura

Para la medición de pH, conductividad y temperatura vamos a utilizar el equipo OAKTON modelo PC 700 el cual nos ayudará con las mediciones de cada uno de los parámetros mencionados, se debe limpiar con agua destilada y con mucho cuidado los dos electrodos y sumergirlos en el medio de cultivo, se debe esperar alrededor de 1 a 2

minutos hasta que logre medir correctamente ya sea el pH y la conductividad de la muestra, se debe realizar la limpieza de los electrodos antes de cada medición.

4 Resultados y discusiones

4.1 Identificación de *Arthrospira platensis*, Spirulina

Para la identificación de se pudo corroborar a nivel microscópico como lo muestra la Figura 1 y también en la Figura 8 que esta cianobacteria es filamentosa, de forma cilíndrica con extremos redondeados, de color verle-azulado pálido, estas características junto con los expuesto por Manirafasha et al., 2018; Romero et al., (2018) nos permitieron concluir que la cianobacteria obtenida es *Arthrospira platensis.*

Morfología de *Arthrospira platensis*, Spirulina

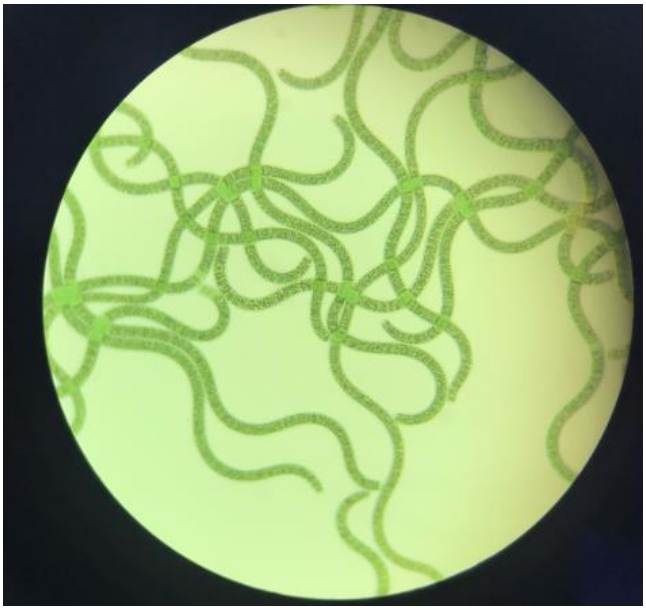

Figura 8. *Arthrospira platensis* vista al microscopio óptico en 60x

Tomado por: Las autoras. 2022

4.2 Contenido de pigmentos de la cianobacteria *Arthrospira platensis* a diferentes tratamientos.

Para obtener el porcentaje de ficocianina realizaremos 2 evaluaciones: intermedio y final, para así obtener datos reales que no sean afectados por el crecimiento de la cianobacteria y no obtener los datos en una fase de muerte de *Arthrospira platensis*, siguiendo los pasos

anteriores para el cálculo del porcentaje de ficocianina para cada muestra de nuestro diseño experimental, esto también se llevó a cabo con un control de ficocianina comercial al 10% para confirmar el correcto procedimiento.

Tabla 11: Porcentajes de ficocianina obtenidos en las dos mediciones

Tratamiento	% PC primera medición (15 días)	% PC segunda medición (27 días)
Z-1	19,13	10,68
Z-5	13,34	4,27
Z-9	14,35	12,68
T-2	5,05	3,58
T-6	9,74	6,31
T-10	10,84	2,14
A-3	10,35	8,70
A-7	11,71	3,30
A-11	14,26	4,16
J-4	10,67	7,02
J-8	13,82	15,76
J-12	16,17	4,32

Porcentajes de ficocianina obtenidos en la segunda y cuarta semana del diseño experimental.

Elaborado por: Las autoras, 2022

Algunos autores se han enfocado en la variación del cultivo para poder encontrar la mejor producción de biomasa o de algún metabolito en particular como la ficocianina, así lo menciona Khazi et al., (2018); Lamela & Marquez, (2000) es por esta razón que se evaluó diferentes medios de cultivo para poder obtener el mejor resultado en cuanto a crecimiento y producción de pigmentos.

Otro factor importante para el crecimiento de la cianobacteria es el efecto salino en Spirulina ya que es un parámetro que afecta su fisiología, así se menciona en el trabajo de Sharma et al., (2014), quienes reportaron mejoras en la producción de pigmentos como ficocianina cultivada en medio Zarrouk modificado utilizando 0,4 mol/L , al igual que en nuestro proyecto se trabajó con varios cambios en el medio de cultivo siendo así su formulación con 1 g/L de NaCl, 0.1 EDTA , sustituyendo $NANO_3$.

Murugan & Rajesh (2014), cultivaron dos especies de spirulina en agua de mar por 15 días a 27 °C e irradiancia de 1,7 klux, obteniendo una producción de biomasa y ficocianina en los cultivos con agua de mar comparables a la encontrada en los cultivos controles (medio Zarrouk), es por esta razón que se realizó la primera cuantificación a los 15 días de montar nuestro diseño experimental en donde se puede observar en la Tabla 11 que los porcentajes obtenidos son bastante buenos, dándonos a entender que a los 15 días de crecimiento de spirulina podremos obtener mayor cantidad de ficocianina.

Tomando en cuenta esta referencia trabajamos con agua de mar como control en nuestro diseño experimental utilizando 25 g/L de sal de mar e irradiación de 1,7 klux , para poder así comparar respuestas con estudios antes realizados. Sin embargo, muchos aspectos en cuanto a su condición como la temperatura, la tolerancia al estrés que se puede ocasionar y el crecimiento en medios de cultivo salinos son factores que aun tarda mucho en optimizarse y estandarizarse.

4.3 Diseño experimental y crecimiento de *Arthrospira platensis*

Se montó el diseño experimental con los 4 tratamientos y sus tres repeticiones, como se puede ver en la Figura 9 muestra un color verde claro, lo cual nos indica que *Arthrospira. platensis* se encuentra presente en todos los medios de cultivo, pero está en su fase inicial de crecimiento, mientras que en la Figura 10 se puede observar un color ver opaco lo cual nos muestra que *Arthrospira platensis* se pudo desarrollar en todos los medios de cultivo demostrando también que existe presencia de ficobiliproteínas por su color y que se ha consumido o evaporado casi en su totalidad en algunos casos el medio de cultivo.

Primeros días del diseño experimental montado en laboratorio.

Figura 9. Frascos Erlenmeyer de 250 mL con los diferentes tratamientos.

Fuente: Las autoras, 2022

Final del diseño experimental

Figura 10. Frascos Erlenmeyer de 250 mL con los diferentes tratamientos consumidos

Fuente: Las autoras, 2022

Para la elaboración de la curva de crecimiento se utilizó una hoja de control en donde se puede anotar todos los datos necesarios, se la puede encontrar en el Anexo 1, con la

recolección de datos vamos a reemplazarlos en la fórmula mencionada en metodología para obtener el número de tricomas en 1mL de muestra.

Especificaciones para el conteo celular

N° muestras	12 muestras por triplicado total de muestras 36
Volumen colectado	0,5 ml
Volumen final de dilución	0,5 ml de muestra en 0,9 ml de agua destilada, volúmen final 10 ml

Figura 11. Especificaciones para el conteo celular de una muestra diluida

Elaborado por: Las autoras, 2022

Luego de anotar los datos requeridos en la hoja de control que se encuentra en el Anexo 1 se reemplaza los datos obtenidos en la formula descrita en metodología, después de realizar el conteo durante 31 días realizamos además el cálculo de área bajo al curva en la cual nos indicara que mayor área mayor número celular, con la ayuda de los datos obtenidos se realizaran las curvas de crecimiento con respeto al número de días y el número de células por mililitros como se encuentra descrito en la Tabla 12.

Tabla 12: Datos recolectados de conteo celular del tratamiento Zarrouk

TRATAMIENTO	DÍAS	Cel/mL	Área bajo la curva
1-Z	**1**	47692,30769	**4762222,222**
	3	74358,97436	
	6	73162,39316	
	8	135384,6154	
	10	162564,1026	
	16	231794,8718	
	19	251794,8718	
	22	249743,5897	
	24	294358,9744	
	26	349743,5897	
	29	349743,5897	
	31	369230,7692	

Obtención de datos de conteo celular del tratamiento Zarrouk modificado repetición 1

Elaborado por: Las autoras, 2022

Esto se realizó para los 4 tratamientos y sus tres repeticiones dándonos como resultado 12 curvas de crecimiento.

4.3.1 Curvas de crecimiento de los diferentes tratamientos

Zarrouk modificado

Curvas de crecimiento del tratamiento Zarrouk

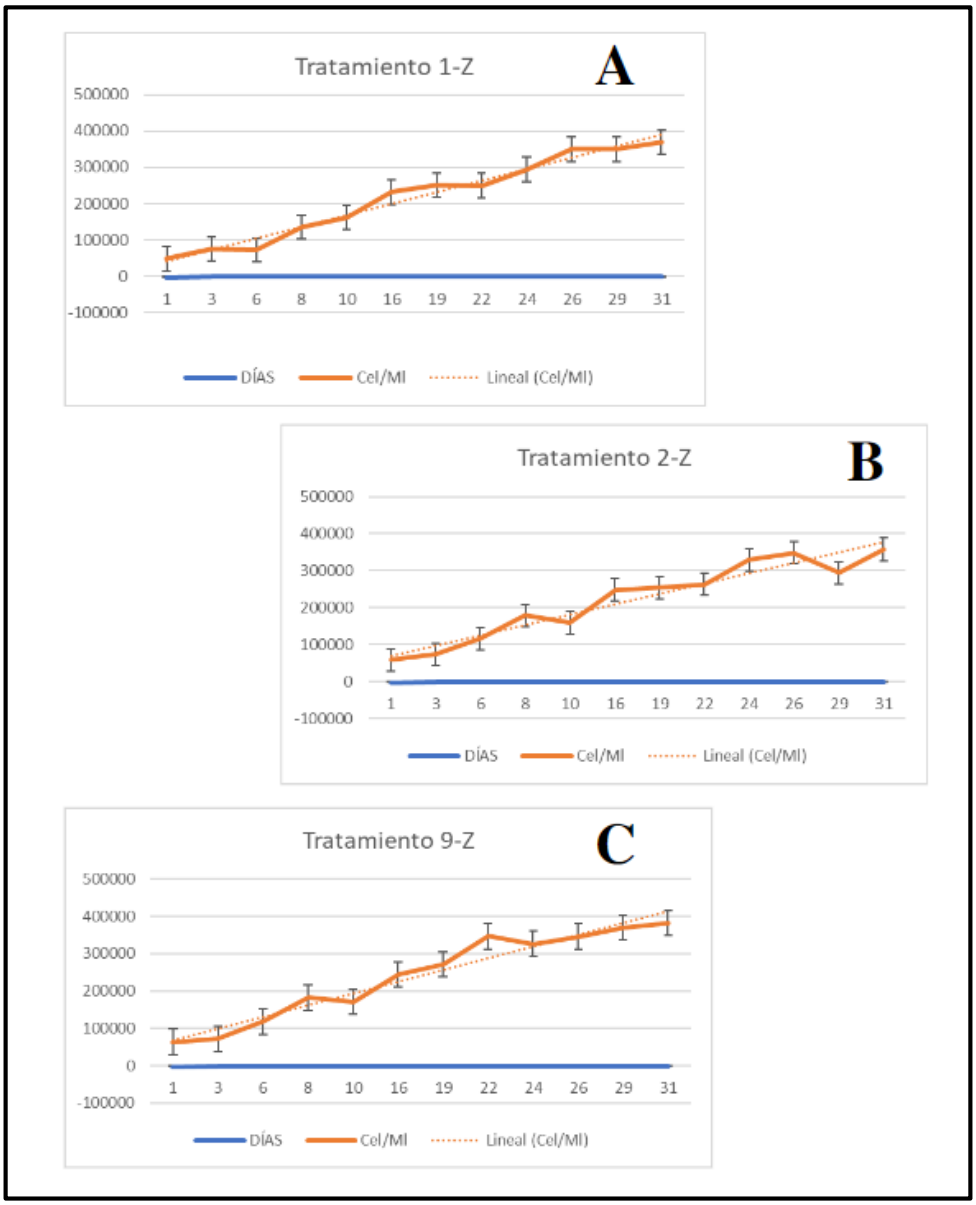

Figura 12. Curvas de crecimiento del tratamiento Zarrouk modificado y sus tres repeticiones

Fuente: Las autoras, 2022

Tratamiento (Agua de mar)

Curvas de crecimiento del tratamiento con agua de mar

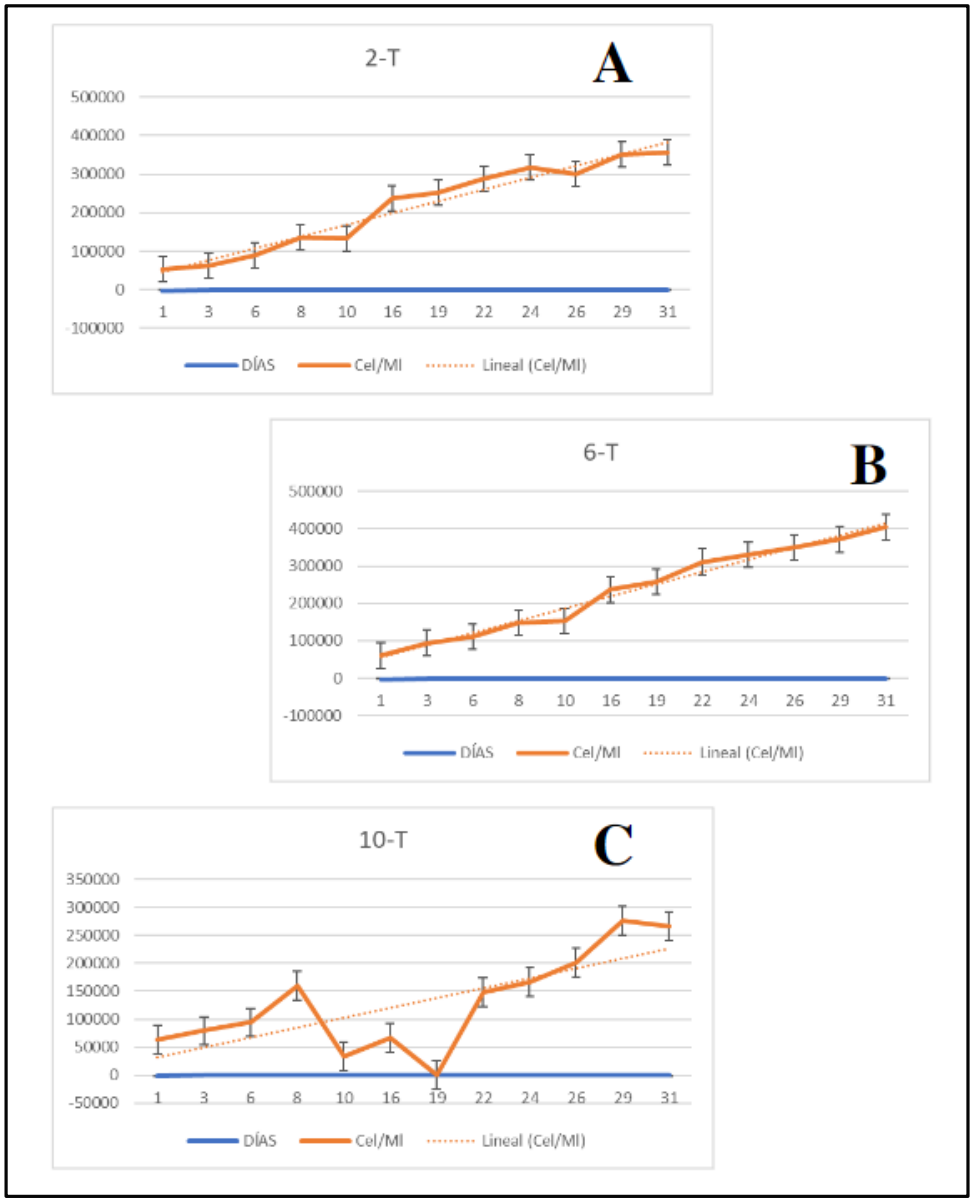

Figura 13. Curvas de crecimiento del tratamiento Control (agua de mar) y sus tres repeticiones A, B y C

Fuente: Las autoras, 2022

Medio de cultivo Artesanal

Curvas de crecimiento del tratamiento con medio de cultivo artesanal

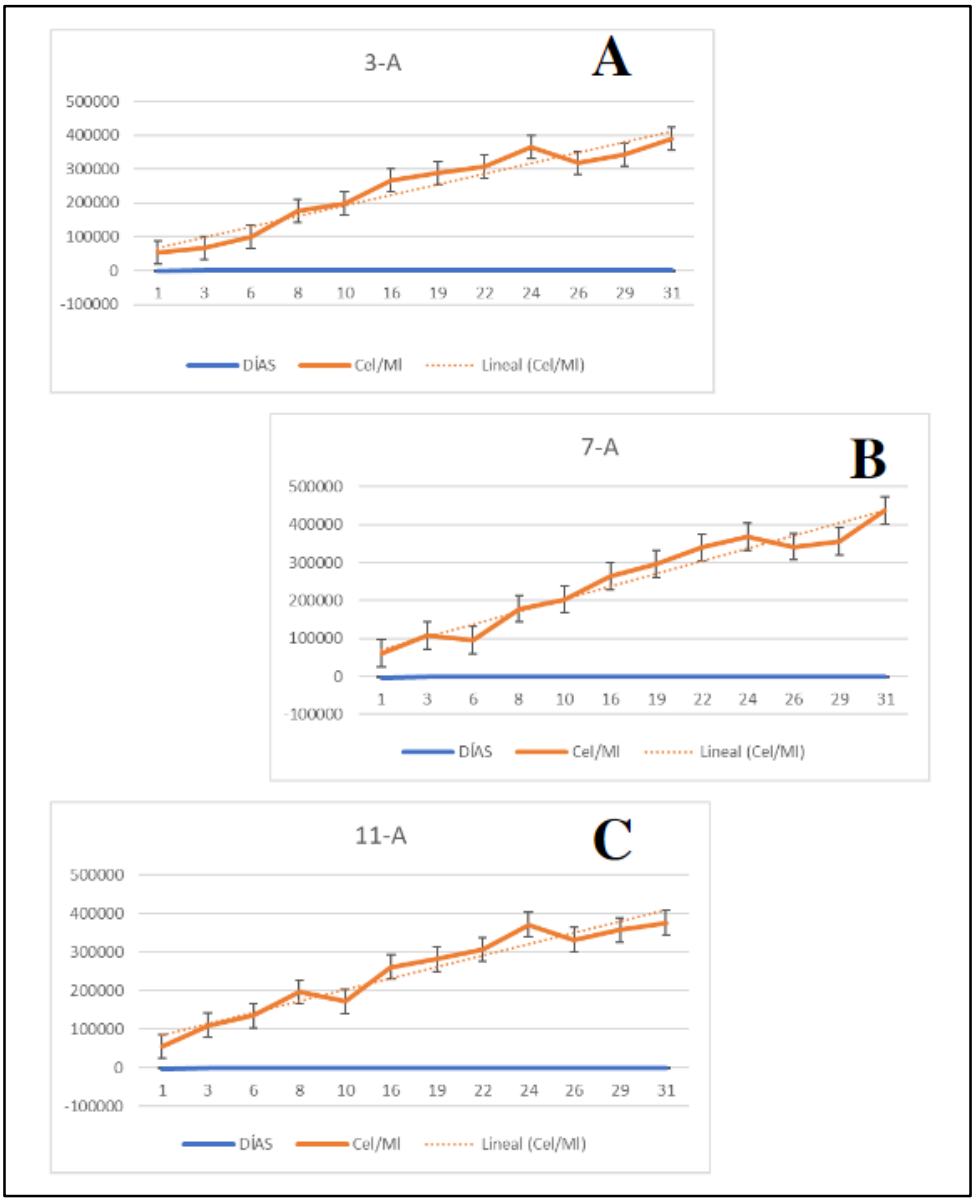

Figura 14. Curvas de crecimiento del tratamiento con medio de cultivo Artesanal y sus tres repeticiones A, B y C

Fuente: Las autoras, 2022

Jordan modificado

Curvas de crecimiento con el tratamiento Jordan modificado

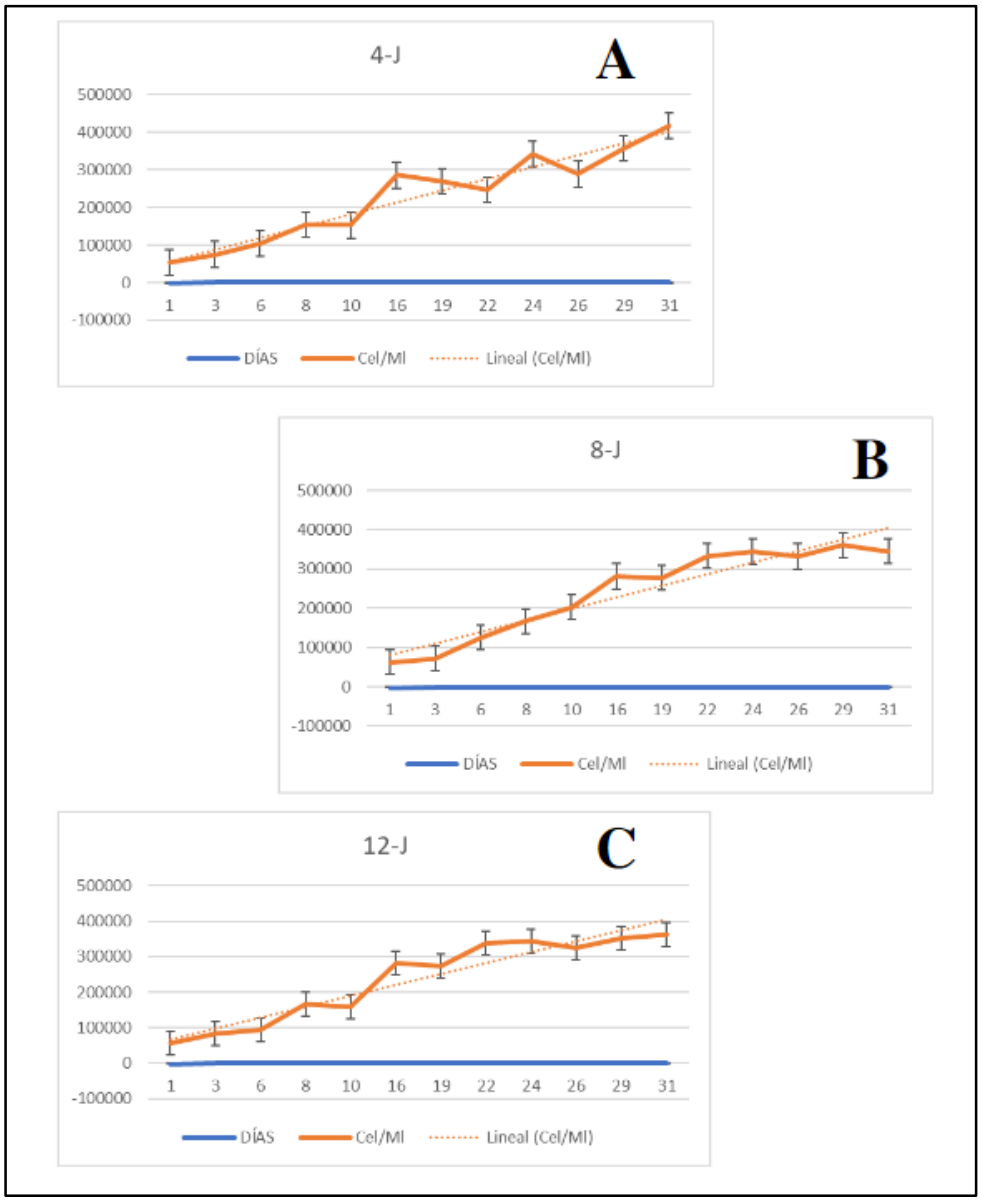

Figura 15. Curvas de crecimiento del tratamiento Jordan modificado y sus tres repeticiones A, B y C.

Fuente: Las autoras, 2022

Como se puede observar en todas las curvas de crecimiento de todas los tratamientos y sus repeticiones vemos como *Arthrospira platensis* crece de manera exponencial, es a partir del día 8 en donde se pueden ver las diferencias en cuando al crecimiento.

El ciclo de la vida de la Spirulina empieza cuando un tricoma maduro se fragmenta mediante la formación de necridios (Figura 16), los cuales son afectados por la lisis

celular que dan lugar a discos bicóncavos de separación o un nuevo fragmento de filamento llamado hormogonio, esto nos da como resultado a que tengamos cadenas cortas de 2 a 4 células (Ciferri, 1983) volviendo este procedimiento indispensable para asegurar el crecimiento y la dispersión del organismo.

Necridio y hormogonio

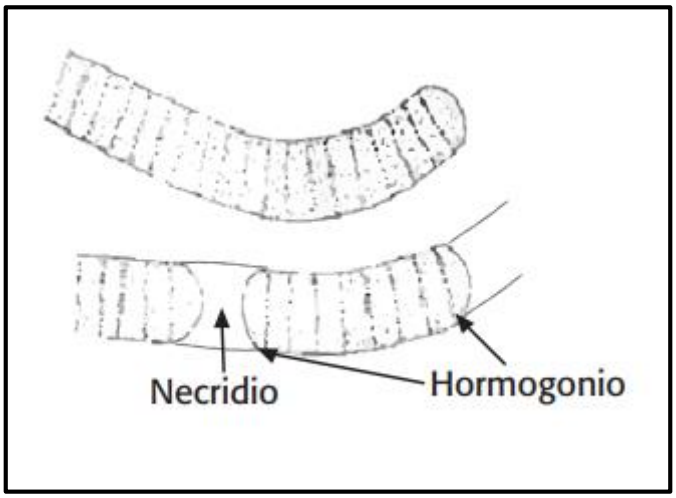

Figura 16. Morfología de algas verde-azules y su formación de necridios y hormogonios

Fuente: Modificación de Humm & Wicks, 1980 y Novelo, 2011

La formación de necridios que básicamente son células que se mueren dentro del tricoma no se pudo observar dentro del tratamiento con agua de mar Figura 13 ya que se observaron tricomas bastantes extensos de cadenas de hasta 15 células, esto se puede deber al estrés de la alta salinidad que se manejaba en este medio de cultivo llegando desde los 121 ms/cm hasta los 143ms/cm, evitando asi la formación de nuevos hormogonios y afectando en su curva de crecimiento.

Dentro de los dos mejores tratamientos y en donde se evidenció un crecimiento adecuado de *Arthrospira platensis* fue el medio de cultivo Zarrouk modificado y el medio de cultivo artesanal, en el medio de cultivo Zarrouk fue en donde a los 15 días de crecimiento se

obtuvieron mejores porcentajes de ficocianina y de crecimiento correspondientemente, se evidenció además, que si existía división celular y como se puede observar en las curvas de crecimiento A y B de la Figura 12 *Arthrospira platensis* llegó a su fase de muerte después de aprovechar todos los recursos de este medio de cultivo.

En cuanto al tratamiento con medio de cultivo artesanal, la primera semana de su crecimiento fue relativamente lenta, esto se puede deber a que en la composición del medio de cultivo se reemplazó la fuente de nitrógeno con urea, esto pudo llevar a que *Arthrospira platensis* busque una manera de asimilar esta fuente nueva de nitrógeno a la cual no está acostumbrada, por lo cual retraso su crecimiento como se puede observar en la Figura 14.

Este medio de cultivo artesanal mostró similitud en cuando a crecimiento y % de ficocianina con el medio de cultivo Zarrouk el cual es un medio ya estandarizado y que se ha vencido utilizando por años, la ventaja de este medio de cultivo artesanal es el costo ya que es más económico, además puede ser utilizado para nuevas investigaciones en cuanto a la asimilación y degradación de la urea en ambiente acuáticos contaminados del mismo.

4.4 Análisis estadístico

Se realizó un de análisis de Varianza (ANOVA) y el test de comparación de pares de Tukey con nivel de significancia de 0.05 empleando el programa Infostat, se emplearon los datos obtenidos de la primera, segunda medición del porcentaje de ficocianina y del área bajo la curva de cada uno de los tratamientos y sus repeticiones dándonos como resultado:

El p-valor de la primera medición es de 0.0706 el cual se puede encontrar en el Anexo 2 el cual nos muestra que si existe la probabilidad de obtener el resultado esperado ya es un

valor cercano al límite de significancia, pero de todas maneras los resultados mostrados en la tabla (Anexo 2) los resultados no fueron estadísticamente significativos.

En todos los tratamientos se obtuvo un buen porcentaje de ficocianina a los 15 día de crecimiento en todos los tratamientos y sus correspondientes repeticiones, dentro del resultado del test Tukey el resultado nos dice que no existen una diferencia significativa en cuento a los tratamientos dándonos como resultado que todos los tratamientos son viables para la producción de ficocianina a través de *Arthrospira platensis* en los diferentes medios de cultivo.

Se realizó el mismo procedimiento para la segunda medición de ficocianina, al cual arrojo un p-valor de 0.3674 (Anexo 2) el cual nos indica que existe una baja probabilidad de que el resultado sea óptimo, esto se puede deber a que el tiempo en que se realizó la segunda medición para el cálculo dé % de ficocianina la *Arthrospira platensis* ya se encontraba en una fase estacionaria y en algunos casos en fase de muerte por lo que interfirió directamente con la cantidad de ficocianina producida.

De manera resumida, no existen diferencia significativa entre cada uno de los tratamientos a nivel estadístico esto quiere decir que *Arthrospira platensis* se puede desarrollar en todos los medios de cultivo.

4.5 Análisis de varianza de un factor

Debido a que no se obtuvieron los resultados esperados con el análisis estadístico Anova en Infostat se realizó el análisis de varianza de un factor tomando en cuenta el número de células por mililitro del día 15 del diseño experimental en donde se mostraron los mejores resultados de porcentaje de ficocianina.

Al realizar el análisis de un factor se puede observar en la Figura 17 los resultados obtenidos nos muestran que el valor que se generó en F supera el valor crítico de F lo cual

nos indica que existen diferencias entre tratamientos así que se rechaza la hipótesis nula (Ho) y se acepta la hipótesis alterna la cual señala que si existen diferencia entre los tratamientos (H1).

Utilizando los datos obtenidos del análisis de varianza en Excel, se procede a realizar la prueba de Tuckey en donde determinamos la diferencia entre las medias de las muestras, si comparamos estas diferencias con el resultado de la prueba de Tuckey observamos que en los grupos: T1-T2, T2-T3, T2-T4 existen diferencias ya que sus valores medios sobrepasan el valor obtenido en la prueba de Tuckey, se deberá tener en cuenta otros factores fuera del análisis como puede ser costos de producción, disponibilidad de medios de cultivo, etc.

Resultados de análisis de factor de crecimiento en Excel

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	*Cuenta*	*Suma*	*Promedio*	*Varianza*
Columna 1	3	8368,5094	2789,503138	199198,07
Columna 2	3	3136,0562	1045,35206	369870,02
Columna 3	3	7124,5234	2374,841137	137000,91
Columna 4	3	8571,996	2857,331995	318562,67

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*	*Valor crítico para F*
Entre grupos	6376663,674	3	2125554,558	8,2978289	0,007725143	4,066180551
Dentro de los grupos	2049263,323	8	256157,9154			
Total	8425926,997	11				

Ho: T1=T2=T3=T4
H1: Las medias de los tratamientos son diferentes

Ftab > Fcal	Acepta Ho		
Fcal > Ftab	Acepta H1	Se acepta	Hay diferencia entre tratamientos
8,29>4,06			

Tabla Tukey	4,53	Resultado	1323,705779
Error	256157,9154		
N	3		

Prueva de tukey

	T 1	T 2	T 3	T 4
T1		1744,1511	414,6620009	-67,828857
T2			-1329,489077	-1811,9799
T3				-482,49086
T4				

x1-x2	si hay
x1-x3	no hay
x1-x4	no hay
x2-x3	si hay
x2-x4	si hay
x3-x4	no hay

Figura 17. Resultados obtenidos del análisis de varianza de un factor realizado en Excel en función del día 15 con el número de células sobre mililitro

Fuente: Las autoras, 2022

A pesar de no obtener los resultados esperados en las pruebas ANOVA en Infostat, se realizó un nuevo procedimiento tomando en cuenta el número de células y el porcentaje de ficocianina dándonos como resultado de que si existen diferencia entre los tratamientos. Se debe tener en cuenta que si se quiere evaluar la producción de ficocianina es muy importante el medio de cultivo en cuanto a la salinidad y evaluar a los 15 días en donde se muestran los mejores resultados de porcentaje de ficocianina obtenidos.

4.6 pH, conductividad y temperatura

Los valores de pH son importantes para el correcto desarrollo de *Arthrospira platensis* siendo asi el pH óptimo de 9 según el estudio de Lamela & Marquez, (2000) en nuestro caso se puede decir que el valor de pH si fue el esperado ya que en las mediciones obtenidas el valor del pH en los diferentes tratamientos se mantuvo estable en un rango de 9 a 10 como se puede observar en la Tabla 13.

Khazi et al., (2018) realizaron varios ensayos con *Arthrospira platensis* a fin de evaluar la biomasa producida por dicha cianobacteria en función de la variabilidad de temperatura, irradiación de luz y agitación, encontrando que 33 °C, 44 µmol photons/m2 s y 2,5 L/min de agitación fueron las condiciones que propiciaron el mayor crecimiento obteniendo 2,42 g/L.

Siguiendo ciertas recomendaciones de temperatura adaptándonos a los recursos que se tienen, tenemos como primer factor la temperatura en un rango de 17°C a 20°C (Tabla 13), utilizando el equipo JAD Air Pump SE-314 con un voltaje de 110v y 60Hz , fuente de poder de 2,5W , y una agitación de 2x3L/min a una presión de 0.012MPa esto nos permitió concluir que el medio para realizar el escalado en laboratorio en conjunto con las condiciones establecidas fueron las adecuadas para el crecimiento de *Arthrospira platensis.*

Tabla 13: Resultados de pH, conductividad y temperatura

Tratamiento	pH	Conductividad (ms/m)	T° (C°)	
			8AM	12PM
1-Z	10,17	68,12	17,90	20,86
5-Z	10,90	67,04		
9-Z	10,23	72,63		
2-T	10,26	109,92		
6-T	9,77	119,22		
10-T	9,81	118,95		
3-A	9,87	59,65		
7-A	10,13	63,17		
11-A	10,21	54,25		
4-J	10,09	56,98		
8-J	10,11	71,21		
12-J	10,00	68,81		

Resultados obtenidos durante un mes de medición en el diseño experimental.

Elaborado por: Las autoras 2023

5 Conclusiones y recomendaciones

La especie *Arthrospira platensis* es una cianobacterias que tiene mucho potencial en las diferentes industrias, es por esta razón que su interés se ha incrementado en los últimos años y se busca profundizar en su investigación y saber más acerca de sus diferentes propiedades, mencionando algunas en las diferentes áreas como: farmacéutica, medicinal, nutrición, alimentación y sus innumerables aplicaciones biotecnológicas.

El cultivo de spiriluna para la obtención de ficocianina carece de información, a pesar de que esta especie tiene un extenso potencial comercial por lo que es recomendable buscar varios artículos que sean relacionados a otras especies de cianobacterias y comparar sus especificaciones para una buena adaptación en el cultivo con el que se esté trabajando, al igual que seguir las condiciones de cultivo para *Arthrospira platensis* que han empelado algunos autores y asegurar su óptimo crecimiento y producción de biomasa, recopilando algunos artículos científicos se determinó un pH óptimo de 5-10 y temperaturas no mayores a 40ºC ya que la inestabilidad de las ficobiliproteinas inicia a partir de los 50ºC.

Así se llegó a la conclusión que para obtener la mayor productividad de pigmentos liposolubles se recomienda utilizar la técnica de congelación lenta durante 12 horas y sindicador durante 20 minutos para un buen resultado en la lisis celular, ya que al realizar la investigación se observó que las técnicas individualmente podrían ocasionar algunas fallas y obtener mayor cantidad de clorofila y no de ficocianina que es de nuestro interés.

Con esta investigación encontramos la mejor manera de cuantificar este pigmento para posteriormente establecer un método de extracción y poder escalarlo en un ámbito industrial, todos los tratamiento propuestos fueron muy similares esto nos indicó que hubo una buena adaptación de la cepa en los medios salinos dando como alternativa el uso de agua de mar (tratamiento control) o el tratamiento artesanal como un medio de

cultivo que reducirá altos costos de producción , sin embargo se pudo notar que la influencia de salinidad, nitrato de sodio y fosfatos tuvieron una incidencia en la respuesta de biomasa y ficocianina que se deberá tomar en cuenta si se buscara plantear algún medio diferente.

Es importante seguir desarrollando nuevos métodos de cuantificación y extracción que permitan la mayor optimización de recursos y mayor cantidad de pigmento y otros compuestos que sean de interés biotecnológico.

6 Bibliografía

Abalde Alonso, J. E., Cid Blanco, A., Fidalgo Paredes, J. P., Torres Vaamonde, J. E., & Herrero López, C. (1995). Microalgas: Cultivo y aplicaciones. In *Microalgas: Cultivo y aplicaciones*. https://doi.org/10.17979/spudc.9788497497695

Akimoto, S., Yokono, M., Hamada, F., Teshigahara, A., Aikawa, S., & Kondo, A. (2012). Adaptation of light-harvesting systems of Arthrospira platensis to light conditions, probed by time-resolved fluorescence spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, *1817*(8), 1483–1489. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2012.01.006

Alvarado, G., Barahona, A., Prieto, R., & Ramos, E. (2019). Estudio de la incorporación de diferentes geometrías en un fotobiorreactor a escala de planta piloto y su impacto en el cultivo de la *Microcystis aeruginosa*. *CONIA*, 175–183.

Arenas, P., & Cortella, A. (1996). Análisis Microscópico de Muestras Comerciales. *Acta Farm. Bonaerense*, *15*(1), 11–19.

Arredondo, B., Voltolina, D., Zenteno, T., Arce, M., & Gómez, G. (2017). Arredondo_B.Pdf. In *Métodos y herramientas analíticas en la evaluacion de la biomasa microalgal* (pp. 1–143).

Bonilla, S., Aubriot, L., & Piccini, C.-. (2013). Cianobacterias Y Cianotoxinas : In *Uruguay Ciencia* (Vol. 16, pp. 26–29).

Chye, B., & Han, Z. (2018). *Producción de proteínas al partir de la microalga Chlorella vulgaris enriqueciendo el medio de cultivo con fuentes de nitrógeno*. 23–24.

Ciferri, O. (1983). Spirulina, the edible microorganism. *Microbiological Reviews*, *47*(4), 551–578. https://doi.org/10.1128/mmbr.47.4.551-578.1983

Cuevas, L. (2009). M clínica icrobiología. *Universidad Europea de Madrid*, *1*, 236–265. https://www.sintesis.com/data/indices/9788490773185.pdf

De la Roche, J., & Galán, P. (2018). *Método de cultivo, sistema de cultivo y biomasa de consorcios de ad-hoc de microalgas y cianobacterias en biofilm con fines industriales.* https://patentimages.storage.googleapis.com/ea/40/57/66e0682e8d9fec/ES2673369A1.pdf

Flores, L., & Ruiz, A. (2017). Implementación de una metodología analítica para la cuantificación de proteínas en la microalga *Arthrospira platensis*. *Revista de La Sociedad Química Del Perú*, *83*(4), 371–381. https://doi.org/10.37761/rsqp.v83i4.219

Fontalvo, J. (2018). Preparación De Medios De Cultivos. *Manual de Practicas de Laboratorio de Microbiología*, 23–28. https://doi.org/10.2307/j.ctt1zk0mfb.6

Fukui, K., Saito, T., Noguchi, Y., Kodera, Y., Matsushima, A., Nishimura, H., & Inada, Y. (2004). Relationship between color development and protein conformation in the phycocyanin molecule. *Dyes and Pigments*, *63*(1), 89–94. https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2003.12.016

García, A. B., Longo, E., & Bermejo, R. (2021). The application of a phycocyanin extract obtained from Arthrospira platensis as a blue natural colorant in beverages. *Journal of Applied Phycology*, *33*(5), 3059–3070. https://doi.org/10.1007/s10811-021-02522-z

González, F., Riaño, B., Molinuevo, B., Blanco, S., García, M., Fallis, A. ., Romo, A., Santo, A., Luna, L., Guerrero, M., Rodríguez, H., Vargas, M., Antonio, J., Moreno, J., Europa, E., Valdivia, V., Sánchez, R., Manzo, P., Colín, M., … Butrón, R. (2016). Las microalgas como

productoras de pigmento con interés comercial. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 90, Issue February, pp. 77–80). https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004

Grau, M., & Gorchs, R. (2009). Técnicas Básicas De Experimentación En Química En Formato Digital. *La Química Como Materia Básica de Los Grados de Ingeniería*, *5*, 115–122.

Ismaiel, M., El-Ayouty, Y., & Piercey, M. (2016). Role of pH on antioxidants production by Spirulina (Arthrospira) platensis. *Brazilian Journal of Microbiology*, *47*(2), 298–304. https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.01.003

Jung, C., Braune, S., Waldeck, P., Küpper, J., Petrick, I., & Jung, F. (2021). Morphology and growth of arthrospira platensis during cultivation in a flat-type bioreactor. *Life*, *11*(6). https://doi.org/10.3390/life11060536

Khazi, M., Demirel, Z., & Dalay, M. (2018). Enhancement of biomass and phycocyanin content of *Spirulina platensis*. *Frontiers In Bioscience*, *10*, 276–286. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.05.012

Lamela, T., & Marquez, F. (2000). Producción de ficocianina en cultivos de *Arthrospira maxima* en agua de mar. *Ciencias Marinas*, *26*(4), 607–619. https://doi.org/10.7773/cm.v26i4.619

Lee, C., Bae, G., Bae, S., Suh, H., & Jo, K. (2022). Increased thermal stability of phycocyanin extracted from *Spirulina platensis* by cysteine addition during enzyme extraction. *Food Science and Technology (Brazil)*, *42*, 1–7. https://doi.org/10.1590/fst.15021

Manirafasha, E., Murwanashyaka, T., Ndikubwimana, T., Rashid Ahmed, N., Liu, J., Lu, Y., Zeng, X., Ling, X., & Jing, K. (2018). Enhancement of cell growth and phycocyanin production in Arthrospira (Spirulina) platensis by metabolic stress and nitrate fed-batch. *Bioresource Technology*, *255*, 293–301. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.12.068

Mora, R., Ortiz, N., Clemente, Y., Bermúdez, J., Avendaño, D., & Morales, E. (2002). Efecto del nitrato, irradiancia y salinidad sobre la produccion de clorofila de microalgas y aisladas en la región norooccidental de Venezuela. *Oceánides*, *17*(2), 73–83.

Moreno, J., Medina, C., & Albarracín, V. (2012). Aspectos ecológicos y metodológicos del muestreo, identificación y cuantificación de cianobacterias y microalgas eucariotas. *REDUCA (Biología)*, *5*(5), 110–125.

Muñoz, A., Pineda, J., Barrigas, D., & Pineda, C. (2021). Producción de espirulina (Arthrospira platensis). *Revista Biorrefinería*, *4*(4), 1–9.

Murugan, T., & Rajesh, R. (2014). Cultivation of two species of Spirulina (Spirulina platensis and Spirulina platensis var lonar) on sea water medium and extraction of C-phycocyanin. *European Journal of Experimental Biology*, *4*(2), 93–97. www.pelagiaresearchlibrary.com

Novelo, E. (2011). Cyanoprokaryota. Fascículo 90 Serie: Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán.Cyanoprokaryota. Fascículo 90 . In *Serie: Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán*. http://www.ibiologia.unam.mx/barra/publicaciones/floras_tehuacan/2012/F90_Cyan_comp.pdf

Ortiz, M., Romero, M., & Meza, L. (2018). La biorremediación con microalgas (Spirulina máxima, Spirulina platensis y Chlorella vulgaris) como alternativa para tratar la eutrofización de la laguna de Ubaque, Colombia. *Revista de Investigación, Desarrollo e Innovación*, *9*(1), 163–176. https://doi.org/10.19053/20278306.v9.n1.2018.8153

Prieto, R., & Lamas, D. (2021). Comparación de parámetros proximales entre aislados

comerciales y Arthrospira platensis Gomont, especie cultivada en condiciones controladas en Paraguay. *Steviana*, *13*(2), 28–38. https://doi.org/10.56152/stevianafacenv13n2a3_2021

Ramírez, L. (2020). Agrobiología. In *Agrobiología* (pp. 80–82). https://doi.org/10.4322/mp.2020.001

Raoof, B., Kaushik, B., & Prasanna, R. (2006). Formulation of a low-cost medium for mass production of Spirulina. *Biomass and Bioenergy*, *30*(6), 537–542. https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2005.09.006

Rodríguez, C., & Zhurbenko, R. (2018). Manual De Medios De Cultivo 2018. In *BioCen*. https://www.biocen.cu/wp-content/uploads/2021/05/Manual-MC-2018.pdf

Rodríguez, Lozano, C., & Alvarez, S. (2022). Potential use of some species of microalgae and cyanobacteria as erythrocyte agglutinators and bactericides. *Hidrobiologica*, *32*(1), 17–24. https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbs/hidro/2022v32n1/Rodriguez

Romero, L., Guevara, M., & Bernal, J. (2018). Crecimiento y pigmentos de *Spirulina subsalsa* cultivada a diferentes salinidades y concentraciones de nitrógeno. *Mutis*, *8*(2), 25–36. https://doi.org/10.21789/22561498.1402

Romero, L., Guevara, M., Gómez, B., Arredondo, B., Cortez, R., & Licet, B. (2017). Produción de pigmentos procedentes a Arthrospira maxima cultivada en fotobiorreactores. *Revista Colombiana de Biotecnología*, *19*(1), 108–114. https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v19n1.59671

Sánchez, M., Bernal, J., Rozo, C., & Rodríguez, I. (2003). Spirulina (Arthrospira): an edible microorganism: a review. In *Universitas Scientiarum* (Vol. 8, Issue 1, pp. 7–24).

Sanz, A. (2011). *Prácticas de microbiología*.

Sharma, G., Kumar, M., Ali, M., & Jasuja, N. (2014). Effect of carbon content, salinity and pH on Spirulina platensis for phycocyanin, allophycocyanin and phycoerythrin accumulation. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, *6*(4), 202–206. https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000144

Silva, L. (2008). Estudo do processo biotecnológico de produção, extração e recuperação do pigmento ficocianina da Spirulina Platensis. In *Dissertação de Pós-Graduação*.

Vernès, L., Granvillain, P., Chemat, F., & Vian, M. (2015). Phycocyanin from *Arthrospira platensis* . Production, Extraction and Analysis. *Current Biotechnology*, *4*(4), 481–491. https://doi.org/10.2174/2211550104666151006002418

Vonshak, A. (2002). *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, Cell-biology and Biotechnology.*

Wen, Z., & Chen, F. (2003). Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. *Biotechnology Advances*, *21*(4), 273–294. https://doi.org/10.1016/S0734-9750(03)00051-X

7 Anexos

Anexo 1: Tabla para la recolección de datos con la cámara de Sedgwick-Rafter

Determinación de microalgas																	
Proyecto:																	
Fecha de muestreo																	
N° muestras																	
Volumen colectado																	
Volumen final de dilución																	
Spirulina		Total de campos contados al azar													Total	Prom	Cel/ml
Muestra	N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	contado	edio	
	1																0
	2																0
	3																0
	1																0
	2																0
	3																0
	1																0
	2																0
	3																0
	1																0
	2																0
	3																0
	1																0
	2																0
	3																0
	1																0
	2																0
	3																0
	1																0
	2																0
	3																0
	1																0
	2																0
	3																0
	1																0
	2																0
	3																0
	1																0
	2																0
	3																0
	1																0
	2																0
	3																0
	1																0
	2																0
	3																0

Anexo 2: Resultados de la primera medición de porcentaje de ficocianina

1ra medicion

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
1ra medicion	12	0,57	0,40	22,20

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	79,69	3	26,56	3,47	0,0706
Tratamiento	79,69	3	26,56	3,47	0,0706
Error	61,15	8	7,64		
Total	140,84	11			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=7,22913

Error: 7,6441 gl: 8

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
T	8,54	3	1,60	A
A	12,11	3	1,60	A
J	13,55	3	1,60	A
Z	15,61	3	1,60	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Resultados obtenidos del software Infostat para la primera medición de ficocianina

Obtenido de: Infostat, 2022

Anexo 3: Resultados de la segunda medición de porcentaje de ficocianina

2da medicion

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
2da medicion	12	0,31	0,05	59,65

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	61,59	3	20,53	1,21	0,3674
Tratamiento	61,59	3	20,53	1,21	0,3674
Error	135,93	8	16,99		
Total	197,52	11			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=10,77800

Error: 16,9914 gl: 8

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
T	4,01	3	2,38	A
A	5,39	3	2,38	A
J	9,03	3	2,38	A
Z	9,21	3	2,38	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Resultados obtenidos del software Infostat para la segunda medición de ficocianina

Obtenido de: Infostat, 2022