

## CRECIMIENTO Y COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA DE *ARTHROSPIRA PLATENSIS* (DIVISION CYANOPHYTA) CULTIVADA A DIFERENTES SALINIDADES Y FUENTES DE NITRÓGENO

BERENICE LICETT<sup>1</sup>, MIGUEL GUEVARA<sup>2\*</sup>, NATHALIE LEMUS<sup>1</sup>, LUIS FREITES<sup>2</sup>, LOLYMAR ROMERO<sup>3</sup>,  
CÉSAR LODEIROS<sup>2</sup> & BERTHA ARREDONDO-VEGA<sup>4</sup>

<sup>1</sup>. Instituto de Investigaciones Agrícolas (INIA)

<sup>2</sup>. Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.  
miguevara2003@yahoo.es

<sup>3</sup>. Instituto Universitario de Tecnología de Cumaná.

<sup>4</sup>. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. (CIBNOR), Baja California, México.

RESUMEN: Se evaluó el efecto de la salinidad y la fuente de nitrógeno sobre el crecimiento y composición bioquímica de la microalga *Arthrospira platensis*. El crecimiento, medido como biomasa seca, se determinó cada 48 horas y la composición bioquímica al final del ensayo. El incremento de la salinidad y la fuente de nitrógeno produjo una disminución significativa en el crecimiento, contenidos de proteínas, clorofila *a*, carotenoides y ficocianina de esta microalga, presentando los mayores valores a 0 UPS y en nitrato de sodio ( $3,5 \pm 0,17$  mg/ml;  $57,5 \pm 4,41\%$ ;  $43,04 \pm 0,34$  µg/ml;  $15,1 \pm 0,76$  µg/ml y  $153 \pm 3,8$  µg/ml, respectivamente). Los carbohidratos y lípidos, por el contrario, alcanzaron sus máximos contenidos a 15 UPS y en nitrato de sodio ( $20,9 \pm 1,35\%$  y  $9,5 \pm 0,50\%$ , respectivamente). Los ácidos grasos saturados ( $50,04 \pm 2,32\%$ ) y monoinsaturados ( $22,46 \pm 1,82\%$ ) mostraron mayores concentraciones a 15 UPS y en urea; mientras los poliinsaturados alcanzaron sus máximos contenidos en urea pero a 0 UPS ( $44,11 \pm 3,32\%$ ). Se concluye que *A. platensis*, cultivada tanto con nitrato como con urea como fuentes de nitrógeno, representa un alimento alternativo para humanos y animales, así como también materia prima para las industrias farmacéuticas y biomédicas, debido a los altos contenidos de proteínas, ácidos grasos y ficocianina que posee.

Palabras Clave. *Arthrospira*, *Spirulina*, fuentes de nitrógeno, cianobacteria, urea, salinidad.

ABSTRACT: The effect of salinity and nitrogen source on growth and biochemical composition of *Arthrospira platensis* was evaluated. Growth, measured as dry biomass was determined every 48 hours and the biochemical composition at the end of experiment. Growth and the contents of protein, chlorophyll *a*, carotenoids and phycocyanin of this microalga were decreased when the salinity was increased. These parameters reached their highest concentrations at 0 ups in sodium nitrate ( $3.5 \pm 0.17$  mg/ml;  $57.5 \pm 4.41$  %;  $43.04 \pm 0.34$  µg/ml;  $15.1 \pm 0.76$  µg/ml y  $153 \pm 3.8$  µg/ml, respectively). Carbohydrates and lipids, however, reached their highest values at 15 UPS but also in sodium nitrate ( $20.9 \pm 1.35\%$  and  $9.5 \pm 0.50\%$ , respectively). The saturated fatty acids ( $50.04 \pm 2.32\%$ ) and monounsaturated fatty acids ( $22.46 \pm 1.82\%$ ) reached their highest values at 15 UPS in urea. While polyunsaturated fatty acids reached their maximum concentrations at 0 UPS but in urea ( $44.11 \pm 3.32\%$ ). We conclude that *A. platensis*, grown with nitrate or urea as nitrogen sources, represents an alternative source of food for humans and animals, as well as raw material for pharmaceutical and biotech industries.

Key words: *Arthrospira*, *Spirulina*, sources of nitrogen, cyanobacteria, urea, sodium nitrate, salinity.

### INTRODUCCIÓN

*Arthrospira* (llamada anteriormente *Spirulina*) es una microalga filamentosa de forma helicoidal, con un tamaño entre 200 y 250 µm, utilizada ampliamente como alimento en humanos y animales, debido principalmente a su alto grado de digestibilidad (88-92%), atribuible a la presencia

de mucopolisacáridos en la pared celular (RAMÍREZ & OLVERA 2006).

El crecimiento y la composición bioquímica de las microalgas pueden ser influenciadas por las condiciones de cultivo, tales como cantidad y calidad de compuestos nitrogenados (PIORRECK *et al.* 1984), irradiancias (TEDESCO

& DUERR 1989), temperaturas (YILMAZ 2012) y salinidad (HIFNEY *et al.* 2013), entre otros. De esta forma, se ha referido el mayor crecimiento de *Arthrospira* entre 25–40 °C, pH entre 10 y 11, iluminación de 30–50 klux y salinidades de 18–22 UPS (ZARROUK 1966).

Los altos contenidos de proteínas, ácidos grasos, pigmentos y minerales presentes en *Arthrospira* (RAMÍREZ & OLVERA 2006), demandados por las industrias biotecnológicas, han propiciado la realización de numerosas investigaciones con el propósito de maximizar la producción de un metabolito en especial. Tomando en consideración la importancia de *Arthrospira* como microorganismo de uso amplio en la biotecnología y los escasos reportes de su cultivo y aplicación en Venezuela, se planteó la evaluación del efecto de la salinidad y la fuente de nitrógeno sobre el crecimiento y la composición bioquímica de *A. platensis*, en virtud de establecer estrategias de cultivo para la obtención de componentes bioquímicos específicos de gran utilidad en las industrias de alimentos, farmacéuticas y acuícolas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Organismos y condiciones de cultivo

Se utilizó una cepa de *A. platensis* (BGAUDO-109), la cual está depositada en el Banco de Germoplasma de Algas de la Universidad de Oriente (BGAUDO), ubicado en el Instituto Oceanográfico de Venezuela.

La microalga *A. platensis* fue cultivada, por triplicado, durante 20 días, en botellas de vidrio de 3 l de capacidad, contentivas de 2,5 l de medio de cultivo Zarrouk (ZARROUK 1966) con una concentración de nitrógeno de 29 mM. Se ensayaron dos salinidades (0 y 15 UPS) y dos fuentes de nitrógeno (nitrate de sodio y urea). Los medios de cultivo se prepararon con agua destilada y agua de mar filtrada (filtros GFC, 1,2 µm), las cuales se esterilizaron en autoclave a 120 °C, 15 min y 15 PSI. Los cultivos se ajustaron a pH 10 y estuvieron expuestos a  $25 \pm 1$  °C,  $390 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  de irradiancia, fotoperiodo luz:oscuridad: 12:12 y aireación constante de 200 ml/ min.

### Determinación de los parámetros de crecimiento

Desde el inicio del ensayo y cada 48 h se tomaron muestras de 5 ml, por triplicado, de los cultivos de *A. platensis* para determinar su crecimiento poblacional.

### Crecimiento poblacional

El crecimiento poblacional de *A. platensis* se analizó a través de la determinación de la biomasa seca, la cual se realizó mediante el sistema de filtración Millipore®, filtrándose 5 ml, por triplicado, de cultivo a través de filtros de fibra de vidrio de 0,45 µm de tamaño de poro, y posteriormente se lavaron con 5 ml de formiato de amonio 0,5 M (pH 7,5) y se secaron en estufa a 60 °C hasta masa constante.

### Evaluación de la composición bioquímica

Las muestras para los análisis bioquímicos se tomaron al final del ensayo (5 ml por triplicado), se centrifugaron durante 10 min a  $7000 \times g$  (25 °C). Los *pellets* obtenidos fueron congelados a -80 °C hasta la realización de los análisis e incluyeron: Proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos grasos y pigmentos.

Las proteínas y carbohidratos totales se realizaron según el método de Lowry (LOWRY *et al.* 1951) y DUBOIS *et al.* (1956), respectivamente. La extracción de los lípidos se realizó de acuerdo a BLIGH & DYER (1959) y la cuantificación a través del método de la carbonización de MARSH & WEINSTEIN (1966). Los lípidos totales se sometieron a esterificación siguiendo las recomendaciones dadas en SATO & MURATA (1988) y los ésteres metílicos se analizaron a través de cromatografía de gases-espectrometría de masa.

El contenido de clorofila *a* y carotenoides totales se determinó de acuerdo a la metodología de WEGMANN & METZNER (1971), y ficocianina por BOUSSIBA & RICHMOND (1980).

### Análisis de los resultados

Los resultados de los parámetros de crecimiento y composición bioquímica de la biomasa de *A. platensis* obtenidos a diferentes salinidades y fuentes de nitrógeno, previo cumplimiento de los supuestos de homogeneidad de variancias, se analizaron a través de ANOVA de dos factores con un nivel de significancia de  $\alpha = 0,05$ . La existencia de diferencias significativas se contrastó mediante el método de comparaciones múltiples de Scheffé (ZAR 1984), empleándose en ambos análisis el paquete estadístico Statgraphics plus 4.1.

## RESULTADOS

El crecimiento de *A. platensis* en todos los tratamientos ensayados se mantuvo sin cambios durante los cuatro

primeros días, lo cual es indicativo de una fase de adaptación. A partir de allí, se observó un incremento hasta los días 14-16, para luego entrar en una fase estacionaria hasta el final del ensayo (Fig. 1).

El crecimiento de *A. platensis* mostró diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en las diferentes salinidades ( $F_s = 178,57$ ) y fuentes de nitrógeno ( $F_s = 29,35$ ), observándose el mayor crecimiento poblacional de  $3,5 \pm 0,17$  mg/ml en nitrato de sodio 0 UPS

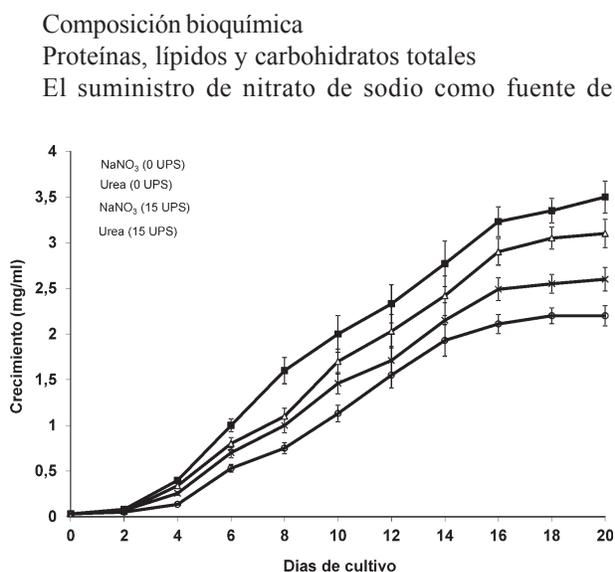


Fig. 1. Crecimiento de *Arthrospira platensis* (mg/ml) cultivada a diferentes salinidades (0 y 15 UPS) y fuentes de nitrógeno ( $\text{NaNO}_3$  y Urea).

nitrógeno produjo en *A. platensis* una mayor acumulación de proteínas, carbohidratos y lípidos totales, mientras la salinidad ocasionó diferentes respuestas en la síntesis de estas macromoléculas, donde las proteínas alcanzaron sus mayores concentraciones a 0 UPS y los carbohidratos y lípidos se acumularon en mayor cantidad en los cultivos sometidos a 15 UPS (Fig. 2).

El contenido de proteínas mostró diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en las diferentes salinidades ( $F_s = 19,55$ ) y fuentes de nitrógeno ( $F_s = 19,29$ ), alcanzando su máxima concentración ( $57,5 \pm 4,41\%$ ) (Fig.2) en nitrato de sodio a 0 UPS.

Los contenidos de carbohidratos mostraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en las distintas salinidades ( $F_s =$

$72,72$ ) y fuentes de nitrógeno ( $F_s = 114,74$ ), alcanzando la máxima concentración de  $20,9 \pm 1,35\%$  en nitrato de sodio a 15 UPS. Similarmente, bajo estas mismas condiciones de cultivo, se obtuvieron los mayores contenidos de lípidos totales ( $9,5 \pm 0,50\%$ ) y con diferencias significativas entre las salinidades ( $F_s = 9,8$ ) y las fuentes de nitrógeno ( $F_s = 16,35$ ) (Fig. 2).

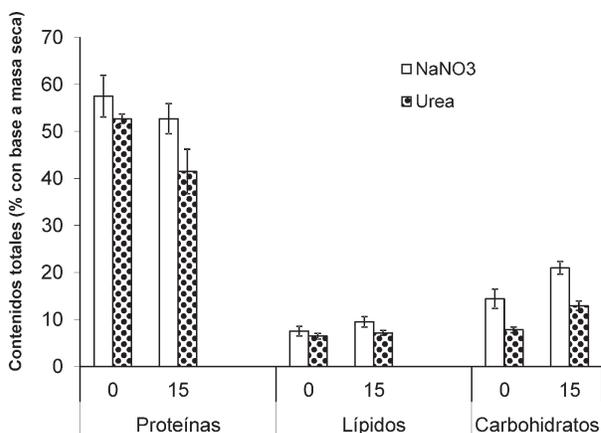


Fig. 2. Contenidos totales (porcentaje con base a masa seca) de proteínas, lípidos y carbohidratos de *Arthrospira platensis* cultivada a diferentes salinidades (0 y 15 UPS) y fuentes de nitrógeno ( $\text{NaNO}_3$  y Urea).

### Ácidos grasos

Los ácidos grasos determinados en *A. platensis* en las diferentes salinidades y fuentes de nitrógeno se presentan en la Tabla I. Se observa la influencia de la salinidad y fuente de nitrógeno sobre la síntesis de estos compuestos. Los cultivos sembrados a 15 UPS y suplementados con urea produjeron mayores concentraciones de ácidos grasos saturados ( $50,04 \pm 2,32\%$ ) y monoinsaturados ( $22,46 \pm 1,82\%$ ). Por su parte, los ácidos grasos poliinsaturados alcanzaron también sus máximas concentraciones en urea pero a 0 UPS ( $44,11 \pm 3,32\%$ ).

Entre los ácidos grasos saturados, el que mostró mayor concentración fue el ácido palmítico (16:0), con contenidos porcentuales entre 35,38 y 42,80%, obteniéndose la mayor concentración en nitrato de sodio a 0 UPS (Tabla I). El ácido oleico (18:1n-9) fue el ácido graso monoinsaturado con mayor concentración ( $13,21 \pm 0,71\%$ ), en los cultivos tratados con urea a 15 UPS.

TABLA 1. Perfil de los ácidos grasos (porcentaje del total de ácidos grasos) de la microalga *Arthrospira platensis* cultivada a diferentes salinidades (0 y 15 UPS) y fuentes de nitrógeno ( $\text{NaNO}_3$  y Urea).

Ácidos grasos	$\text{NaNO}_3$ 0 UPS	$\text{NaNO}_3$ 15 UPS	Urea 0 UPS	Urea 15 UPS
14:0	0,55 ±0,05	0,45±0,04	0,32±0,03	0,73±0,07
15:0	0,12±0,01	0,02±0,00	0,10±0,00	0,32±0,02
16:0	42,80±1,71	40,79±1,63	35,38±1,42	41,81±1,67
17:0	0,17±0,01	0,19±0,01	0,15±0,01	0,58±0,03
18:0	2,43±0,19	3,51±0,28	2,87±0,23	6,61±0,53
<b>Σ Saturados</b>	<b>46,07±1,98</b>	<b>44,96±1,97</b>	<b>38,81±1,69</b>	<b>50,04±2,32</b>
16:1n-9	2,93±0,29	2,96±0,30	3,64±0,36	3,18±0,32
16:1n-7	5,66±0,45	6,82±0,55	8,32±0,67	6,06±0,48
18:1n-9	4,73±0,29	3,84±0,25	5,12±0,30	13,21±0,71
<b>Σ Monoinsaturados</b>	<b>13,32±1,10</b>	<b>13,62±1,12</b>	<b>17,08±1,98</b>	<b>22,46±1,82</b>
18:2n-6	18,41±1,66	19,29±1,74	21,59±1,94	16,97±1,53
18:3n-6	21,23±1,27	22,13±1,99	21,90±1,31	10,32±0,93
20:3n-6	0,64±0,06	0,00±0,00	0,63±0,06	0,00±0,00
<b>Σ Poliinsaturados</b>	<b>40,27±2,99</b>	<b>41,42±3,73</b>	<b>44,11±3,32</b>	<b>27,30±2,46</b>
<b>Σ Totales</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

Con relación a los ácidos grasos poli-insaturados, el ácido gama linolénico (18:3 n-6) fue el más acumulado en *A. platensis*, alcanzando su máxima concentración ( $22,13 \pm 1,99\%$ ) en los medios con nitrato y a 15 UPS.

#### Clorofila *a* y Carotenoides totales

El contenido de clorofila *a* mostró diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las salinidades ( $F_s = 822,26$ ) y las fuentes de nitrógeno estudiadas ( $F_s = 74,75$ ), observándose que un incremento de la salinidad provocó un descenso de su contenido (Fig. 3A). La mayor concentración de clorofila *a* se obtuvo en nitrato de sodio a 0 UPS ( $43,04 \pm 0,34 \mu\text{g/ml} = 1,2\%$ ), mientras que los menores contenidos se registraron en urea a 15 UPS ( $23,3 \pm 1,00 \mu\text{g/ml}$ ).

Los carotenoides totales por volumen de cultivo (Fig. 3B) mostraron una tendencia similar a la observada en la síntesis de clorofila *a*. Estos pigmentos mostraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las salinidades ( $F_s = 646,20$ ) y las fuentes de nitrógeno estudiadas ( $F_s = 154,80$ ) alcanzando sus máximas concentraciones en nitrato de sodio a 0 UPS ( $15,1 \pm 0,76 \mu\text{g/ml} = 0,43\%$ ). Los menores contenidos se observaron en urea a 15 UPS ( $3,6 \pm 0,66 \mu\text{g/ml}$ ).

#### Ficocianina

Las concentraciones del pigmento ficocianina (Fig. 3C) mostró diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) tanto en las

salinidades ( $F_s = 420,38$ ) como en las fuentes de nitrógeno ( $F_s = 220,53$ ), observándose sus mayores concentraciones en nitrato de sodio a 0 UPS ( $153 \pm 3,8 \mu\text{g/ml} = 4,37\%$ ) y las menores en urea a 15 UPS ( $54 \pm 9,1 \mu\text{g/ml}$ ). Es evidente que este pigmento, así como la clorofila *a* y los carotenoides totales disminuyeron sus concentraciones al aumentar la salinidad de los cultivos.

## DISCUSIÓN

En la presente investigación se demostró la influencia de la salinidad y la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo sobre el crecimiento y la composición bioquímica de *A. platensis*.

La disminución del crecimiento de *A. platensis* al incrementar la salinidad en los cultivos también ha sido evidenciada en *A. maxima* por LÁMELA & MÁRQUEZ-ROCHA (2000) y TAMBIEV *et al.* (2011). Lo anterior pudiera deberse a la desviación de la energía destinada para la división celular hacia la síntesis de solutos compatibles, permitiéndole sobrevivir ante este estrés, tal como ha sido descrito por OREN (1999).

El mayor contenido de biomasa de *A. platensis* obtenido en esta investigación ( $3,5 \pm 0,17 \text{ mg/ml}$ ) es superior a los determinados por OLIVEIRA *et al.* (1999);  $2,4 \text{ mg/ml}$ , en *A. platensis* y *A. maxima*. Esta diferencia puede

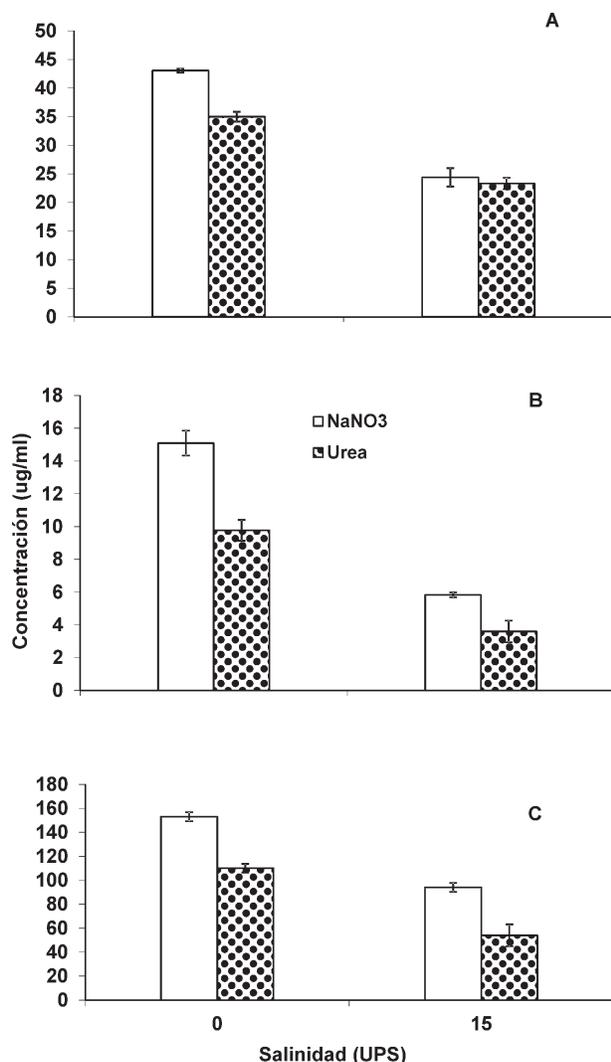


Fig. 3. Contenido ( $\mu\text{g/ml}$ ) de clorofila *a* (A), carotenoides totales (B) y ficocianina (C) de *Arthrospira platensis* cultivada a diferentes salinidades (0 y 15 UPS) y fuentes de nitrógeno ( $\text{NaNO}_3$  y Urea).

estar soportada en las temperaturas y la cantidad de luz recibida en los cultivos, debido a que los anteriores autores utilizaron  $30^\circ\text{C}$  con luz continua, y en este trabajo se utilizó  $25^\circ\text{C}$  con fotoperiodo 12:12.

En otras investigaciones se han referido contenidos de biomasa superiores a los logrados en esta investigación. Así, VOLKMAN *et al.* (2008) al cultivar *A. platensis* con agua desalinizada (0UPS) obtuvieron una producción de biomasa de  $4,95\text{ mg/ml}$ . Esta diferencia puede deberse a las distintas condiciones de cultivo, entre éstas la irradiancia

( $140\ \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ), la cual fue menor a la implementada en esta investigación ( $390\ \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ).

La microalga *A. platensis* creció en las dos salinidades ensayadas, resultando el mayor crecimiento celular a la salinidad más baja, lo cual pudiera coadyuvar con la plasticidad fisiológica de esta microalga para colonizar hábitat estuarinos y de agua dulce. En esta investigación también quedó evidenciada la influencia de la fuente de nitrógeno sobre el crecimiento de *A. platensis*, observándose el mayor crecimiento con nitrato de sodio en comparación con la urea.

Después del carbono, el nitrógeno es el elemento que contribuye con la producción de biomasa y composición bioquímica de las células microalgales. Así mismo, las fuentes nitrogenadas varían en cuanto a la influencia ejercida sobre la fisiología microalgal (COHEN 1986).

Los resultados obtenidos en esta investigación son similares a los reportados por VIEIRA *et al.* (2001), quienes al cultivar *A. platensis* en diferentes fuentes de nitrógeno obtuvieron los mayores contenidos de biomasa ( $1,9\text{ mg/ml}$ ) en los cultivos suplementados con nitrato de sodio, lo cual evidencia que esta cianobacteria activa su maquinaria metabólica asimilando rápidamente el nitrato de sodio por ser una molécula metabolizada más velozmente en comparación con la urea.

El uso de urea y amonio como fuentes alternativas de nitrógeno ha sido sugerido por numerosos investigadores, como una manera de disminuir los costos de producción de biomasa de *Arthrospira* (BOUSSIBA 1989); sin embargo, estos compuestos ocasionan, en la mayoría de los casos, bajos rendimientos de biomasa. Por ejemplo, SASSANO *et al.* (2004), al utilizar urea como fuente de nitrógeno en el cultivo de *A. platensis*, obtuvieron una máxima concentración de biomasa de  $1,6\text{ mg/ml}$ .

Los efectos adversos de amonio y urea en los cultivos de *Arthrospira* y otras microalgas se debe a un descenso del pH del medio producidos por estos compuestos, el cual llega a alcanzar valores inferiores a siete, perjudicial para *Arthrospira*, debido a que su nivel de pH óptimo está entre 9-11 (FIDALGO 1995).

#### Composición bioquímica

##### Proteínas

Esta macromolécula mostró sus mayores contenidos

en bajas salinidades y en nitrato de sodio. La reducción de la síntesis de proteínas al incrementar la salinidad en los cultivos de *Arthrospira* puede deberse a la desviación de la energía destinada para la síntesis proteica de estos microorganismos hacia la producción de carbohidratos, lípidos y algunos aminoácidos funcionando como solutos compatibles para evitar la deshidratación celular (GONZÁLEZ & PEÑA 2002)

Resultados similares a los mostrados en la presente investigación fueron señalados por RAFIQUIL *et al.* (2005), quienes obtuvieron en *A. platensis* un 58-62% de proteínas en cultivos realizados en salinidades bajas (0 UPS) y nitrato como fuente de nitrógeno.

El incremento de la salinidad en los cultivos de *Arthrospira* ha mostrado tener efectos negativos en la síntesis proteica, tal como lo demostraron TREDICCI *et al.* (1986) en *A. maxima*, quienes observaron una disminución del contenido de proteínas desde 60% hasta 48% (con nitrato) y desde 65% hasta 60% (con urea), al incrementar la salinidad desde 0 hasta 35 UPS.

De forma similar, los estudios de VONSHAK *et al.* (1996) demostraron que *A. platensis*, al someterse a estrés salino, modifica su composición bioquímica, reduciendo el contenido de proteínas y clorofila *a* e incrementando los niveles de carbohidratos. Esta situación fue similar a la observada en la presente investigación.

El uso de fuentes nitrogenadas diferentes al nitrato, como lo son urea y amonio, dentro del rango de concentraciones no tóxicas, ha permitido obtener biomasa de *Arthrospira* con altos contenidos de proteínas; TREDICCI *et al.* (1986) obtuvieron contenidos proteicos con variaciones entre 3- 61% con nitrato, y desde 52 hasta 65% con urea. Otros autores como RIJN & SHILO (1986) reportaron en *Arthrospira* sp. 62,4% de proteínas cuando fue expuesta a 0 UPS con amonio como fuente de nitrógeno.

#### Carbohidratos

Los carbohidratos totales en las cianobacterias presentan un comportamiento variable y depende de la especie en particular y de la interacción de los factores físico-químicos establecidos en los cultivos. Estos compuestos son los componentes energéticos que los organismos, en general, utilizan más fácil y rápidamente para su metabolismo.

En esta investigación, los carbohidratos presentaron los mayores valores a la mayor salinidad y en nitrato de sodio. Esto permite inferir que esta cianobacteria a altas salinidades produce cambios fisiológicos, estimulados por los problemas de hidratación, conduciendo a un engrosamiento de las paredes celulares como mecanismo de adaptación al estrés salino. También es posible que esta cepa de *A. platensis* estimule la síntesis de carbohidratos relacionadas con la osmorregulación a altas salinidades. De igual forma se ha registrado la excreción de polisacáridos en cultivos con deficiencias de nutrientes y/o altas salinidades e irradiancias (BRÜLL *et al.* 2000).

En otras investigaciones se ha observado que el aumento en la salinidad puede inducir una mayor producción de carbohidratos, tal como lo menciona TADROS (1988), quien obtuvo en *A. platensis* un incremento en el contenido de carbohidratos desde 23% hasta 32% al aumentar la salinidad de los cultivos desde 5 hasta 29 UPS.

Los contenidos de carbohidratos obtenidos en la presente investigación a 15 UPS son superiores a los reportados por otros autores a 0 UPS. Así, OLIVEIRA *et al.* (1999) determinaron concentraciones de carbohidratos en *A. maxima* y *A. platensis*, cultivada a 25°C y 0 UPS, de 12 y 13%, respectivamente.

El uso de amonio y urea como fuentes de nitrógeno en los cultivos de diversas microalgas también ha promovido un incremento en la producción de carbohidratos. Así, RIJN & SHILO (1986) en cultivos mixtos de *Arthrospira* sp. y *Oscillatoria* sp. determinaron contenidos de 18% de carbohidratos al utilizar amonio. FIDALGO (1995) obtuvo en *Tetraselmis suecica* valores máximos de carbohidratos de 18 pg/cel en los cultivos suplementados con urea y en *Chaetoceros calcitrans*, 28% cuando usó amonio como fuente nitrogenada.

#### Lípidos

El contenido de lípidos, al igual que los carbohidratos, mostró sus mayores valores a la mayor salinidad y en nitrato de sodio como fuente de nitrógeno.

Resultados similares fueron obtenidos por TADROS (1988) con *A. platensis*, quienes observaron un aumento en el contenido de lípidos desde 8% hasta 10% al variar la salinidad desde 5 hasta 29 UPS. OLGUÍN *et al.* (2001) con *Arthrospira* sp. obtuvieron las mayores concentraciones

lipídicas (28,6%) a la mayor salinidad ensayada (20 UPS). El incremento en la acumulación de lípidos al aumentar la salinidad ha sido reportado en numerosas microalgas, discutiéndose como un mecanismo de osmoprotección (VÁZQUEZ & ARREDONDO 1991).

Al comparar los contenidos de lípidos de *Arthrospira*, de acuerdo a la fuente nitrogenada utilizada, se encuentra que tanto nitrato como urea o amonio producen cantidades importantes de esta macromolécula, variando de acuerdo con la interacción de los diversos factores ambientales involucrados (temperatura, salinidad, nutrientes, irradiancia, entre otros). Así por ejemplo, DANESI *et al.* (2002), al cultivar *A. platensis* con diferentes fuentes nitrogenadas a 0 UPS, encontraron la mayor acumulación de este metabolito (20,7%) en urea.

#### Ácidos grasos

La composición de los ácidos grasos de una especie microalgal determina su calidad nutricional. Los efectos benéficos de estos compuestos en los organismos que lo consumen, tales como la fortificación del sistema inmune, han propiciado su inclusión tanto en nutrición humana como en acuicultura (BELL *et al.* 1996).

La síntesis de estos compuestos estuvo influenciada por la salinidad y la fuente de nitrógeno utilizada. Los cultivos suplementados con urea produjeron mayores concentraciones de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados. A excepción del contenido de ácidos grasos poliinsaturados, la salinidad más alta promovió, de forma general, el incremento en la acumulación de los ácidos grasos.

Los ácidos grasos mayoritarios determinados en la presente investigación fueron: palmítico (16:0), linoleico (18:2 n-6), y gammalinolénico (18:3 n-6), los cuales conformaron entre el 72 -82% del total de los ácidos grasos analizados. Estos resultados coinciden con los publicados por OLIVEIRA *et al.* (1999) y MÜLING *et al.* (2005), quienes indicaron que los ácidos grasos palmítico, linoleico y gamalinoleico de diferentes cepas de *A. maxima* y *A. platensis* constituyen entre un 70-92% del total de los ácidos grasos totales.

Es importante referir que tanto urea (0 UPS) como nitrato (0 y 15 UPS) promovieron una acumulación importante del ácido gammalinolénico (18:3 n-6), alcanzando concentraciones de hasta 22%, con respecto al total de los

ácidos grasos analizados. La importancia de la presencia del ácido gammalinolénico en *Arthrospira* al incorporar la biomasa de este microorganismo, como alimento en humanos, fortalecería la salud, dado a que este compuesto es precursor de algunas prostaglandinas y reduce en cierta medida la cantidad de colesterol en sangre (SÁNCHEZ *et al.* 2003), representando una alternativa en el manejo de enfermedades cardiovasculares y en el control del peso. Por otra parte, se ha demostrado que este ácido graso estimula el sistema inmune (WU & MEYDANI 1996) y atenúa los síntomas de la enfermedad de Parkinson y la esclerosis múltiple (COHEN 1997).

Resultados similares del contenido de este ácido graso fueron obtenidos por COHEN *et al.* (1993) y COLLA *et al.* (2004) en *A. platensis*, quienes reportan concentraciones de 19 -21%, al utilizar nitrato como fuente nitrogenada.

#### Pigmentos

El mayor contenido de clorofila *a* en *A. platensis* ocurrió en la salinidad más baja y en nitrato de sodio como fuente de nitrógeno. Este comportamiento también ha sido observado en *Dunaliella tertiolecta* por BEN-AMOTZ & AVRON (1983) y en *A. maxima* por LAMELA & MÁRQUEZ-Rocha (2000), quienes señalaron que las altas salinidades promueven en las microalgas, en general, una disminución del contenido de clorofila *a*. El efecto del estrés salino sobre la disminución del contenido de clorofila *a* se ha relacionado con el incremento ocasionado en el gradiente de pH a través de la membrana tiacoidal, lo cual causa reducción en la tasa de fotosíntesis (GILMOUR *et al.* 1985).

La clorofila *a* muestra mucha variabilidad de acuerdo con las condiciones de cultivo. Así, OLAIZOLA & DUERR (1990) y COHEN *et al.* (1993) reportaron en *A. platensis* contenidos de clorofila *a* de 2,3 y 1,44 %, respectivamente. Por su parte, LÁMELA & MÁRQUEZ-ROCHA (2000) señalan para *A. maxima* un 0,61% de este pigmento. Las discrepancias entre estos resultados con los obtenidos en la presente investigación (1,2%) puede deberse a la temperatura e irradiancias usadas por los anteriores autores, los cuales sometieron a la cianobacteria a 23°C y 230  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  y en este trabajo se aplicaron 25°C y 390  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ .

El uso de urea como fuente nitrogenada ha mostrado ser una alternativa para la producción de biomasa de *Arthrospira* con altos contenidos de clorofila *a*. Al

respecto, DANESI *et al.* (2002) cultivaron *S. platensis* en medio Zarrouk (0 UPS) con urea como fuente de nitrógeno, logrando concentraciones de 7,56 % de clorofila *a*, cifras superiores a las obtenidas con nitrato de sodio en este trabajo (1,2%). Por el contrario, los cultivos de *Arthrospira* suplementados con amonio muestran bajas concentraciones de este pigmento, tal como ha sido referido por RIJN & SHILO (1986), quienes reportaron en *Arthrospira* sp. 0,80% de clorofila *a*, al utilizar amonio como fuente de nitrógeno.

Los carotenoides totales mostraron un comportamiento similar al de la clorofila *a*; es decir, las máximas concentraciones se reportaron a la menor salinidad y con nitrato de sodio.

El incremento de la salinidad en microalgas eucarióticas halotolerantes tipo *D. salina* provoca una mayor acumulación de carotenoides totales (GUEVARA *et al.* 2005); sin embargo, en *Arthrospira* se ha visto un patrón inverso. Al respecto, KEBEDE (1997) determinó que el incremento de la salinidad desde 20 hasta 80 UPS provocó un descenso en la acumulación de carotenoides de *A. platensis*. De igual forma, LÁMELA & MÁRQUEZ-ROCHA (2000) observaron la disminución de los carotenoides totales desde 0,22% hasta 0,18% cuando la salinidad varió desde 0 hasta 35 UPS, usando nitrato de sodio como fuente de nitrógeno.

La ficocianina fue la fracción mayoritaria de los pigmentos en todos los tratamientos ensayados. Los mayores contenidos de este pigmento, al igual que el de clorofila *a* y carotenoides, se evidenciaron a la menor salinidad y en nitrato de sodio.

En *A. platensis* se han determinado altos contenidos de ficocianina en diferentes condiciones de cultivo. La baja intensidad luminosa promueve la mayor acumulación de ficocianina, debido a la funcionabilidad como pigmentos accesorios captando con mayor eficiencia las bajas intensidades luminosas y transfiriendo esta energía a la clorofila *a* (TOMASELLI *et al.* 1997). Por ello, la disminución del contenido de ficocianina al incrementar la salinidad en los medios de cultivo puede deberse a la pérdida de energía respiratoria y excretoria para contrarrestar el estrés iónico y osmótico como fue referido por KEBEDE (1997).

En *A. platensis*, COHEN *et al.* (1993), ZHANG *et al.* (1998) y OLVERA *et al.* (2000) obtuvieron 24%, 7% y 795 µg/ml de ficocianina, respectivamente. Estos contenidos son

superiores a los encontrados en la presente investigación (153 µg/ml = 4,37%), lo cual pudiera ser atribuido a las diferencias en las temperaturas e intensidades luminosas ensayadas; convenientemente los anteriores autores utilizaron 30 °C y 80 µmoles/m<sup>2</sup>/s.

LÁMELA & MÁRQUEZ-ROCHA (2000) determinaron en *A. máxima* contenidos de ficocianina similares a los encontrados en la presente investigación al utilizar medios de cultivos a 0 UPS y suplementados con nitrato de sodio. Estos mismos autores al incrementar la salinidad hasta 35 UPS, observaron la disminución en la concentración de ficocianina en *A. maxima*.

Los escasos reportes de cultivos de *Arthrospira* con amonio señalan que la concentración de ficocianina es inferior a la obtenida en cultivos fertilizados con nitrato. Así, RIJN & SHILO (1986) en cultivos de *Arthrospira* sp. determinaron contenidos de 1,90% de ficocianina al utilizar amonio como fuente nitrogenada. Lo anterior, a criterio de ULLRICH *et al.* (1984), puede deberse a los descensos del pH en los cultivos de *Arthrospira*, como se mencionó anteriormente, es perjudicial para esta microalga, dados a sus niveles óptimos están entre 9-11.

El estudio de la ficocianina tiene mucha importancia biotecnológica, por ser un compuesto con mucha aplicación en las industrias alimenticias, farmacológicas y biomédicas como nutrientes para humanos y animales, cosméticos, antioxidantes, antitumoral y marcadores fluorescentes, entre otros (LIU *et al.* 2005).

*A. platensis*, cultivada con nitrato o urea como fuente de nitrógeno, representa un alimento alternativo para humanos y animales, así como también materia prima para las industrias farmacéuticas y biomédicas, dado a sus altos contenidos de proteínas, ácidos grasos y ficocianina. Estudios adicionales que incluyan variaciones en la concentraciones de nutrientes y particularmente intensidades luminosas y temperatura deben ser ejecutados a fin de evaluar su interacción con la salinidad para optimizar el cultivo de este microorganismo en agua de mar.

## CONCLUSIONES

*A. platensis*, cultivada con nitrato o urea como fuente de nitrógeno, representa un alimento alternativo para humanos y animales, así como también materia prima para

las industrias farmacéuticas y biomédicas, por los altos contenidos de proteínas, ácidos grasos y ficocianina que posee.

Los contenidos de proteínas, lípidos, carbohidratos y pigmentos en *A. platensis* fueron mayores cuando se utilizó nitrato de sodio como fuente de nitrógeno.

Los ácidos grasos mayoritarios determinados en la presente investigación fueron: palmítico (16:0), linoleico (18:2 n-6), y gammalinolénico (18:3 n-6), los cuales conformaron entre el 72-82% del total de los ácidos grasos analizados.

#### AGRADECIMIENTO

Esta investigación fue financiada por el Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente (CI 02-030603-1282/06).

#### REFERENCIAS

- BELL, J., I. ASHTON, C. SECOMBES, B. WEITZEL, J. DICK. & J. SARGENT. 1996. Dietary lipid affects phospholipids fatty acid compositions, eicosanoid production and immune function in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *PLEFA* 54: 173-182.
- BEN-AMOTZ, A. & M. AVRON. 1983. On the factors' with determine massive a-carotene accumulation in the halotolerant alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiol.* 72: 593-597.
- BLIGH, E. & W. DYER. 1959. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917.
- BOUSSIBA, S & A. RICHMOND. 1980. C-phycoyanin as a storage protein in the blue-green alga *Spirulina platensis*. *Arch. Microbiol.* 125:143-147.
- \_\_\_\_\_. 1989. Ammonia uptake in the alkalophilic cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Plant Cell Physiol.* 30: 303-308.
- BRÜLL, L., Z. HUANG, J. THOMAS, B. PULSEN, E. COHEN & T. MICHAELSEN. 2000. Studies of polysaccharides from three edible species of *Nostoc* (Cyanobacteria) with different colony morphologies: Structural characterization and effect on the complement system of polysaccharides from *Nostoc commune*. *J. Phycol.* 36: 871-881.
- COHEN, Z. 1986. *Products from microalgae*. In: *Handbook of Microalgal Mass Culture*. Ed. Richmond. CRC Press, Boca Raton, USA. 421-454 pp.
- \_\_\_\_\_. 1997. *The chemicals of Spirulina*. In *Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology*. Ed. Taylor & Francis. Londres. U.K. 175-203 pp.
- \_\_\_\_\_, M. REUNGIFTCHACHAWALI, W. SIANGDUNG & M. TANTICHAROEN. 1993. Production and partial purification of algalinolenic acid and some pigments from *Spirulina platensis*. *J. Appl. Phycol.* 5: 109-115.
- COLLA, L., T. BERTOLIN & J. VIEIRA. 2004. Fatty acids profile of *Spirulina platensis* grown under different temperatures and nitrogen concentrations. *Z. Naturforsch.* 59: 55-59.
- DANESI, E., C. RANGEL, J. CARVALHO & S. SATO. 2002. An investigation of effect of replacing nitrate by urea in the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. *Biom. Bioenerg.* 23: 261-269.
- DUBOIS, M., K. GILLES, J. HALMILTON, P. REBERS & F. SMITH. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 2: 350-356.
- FIDALGO, J. 1995. Variabilidad bioquímica de microalgas marinas en cultivo en función de la fuente de nitrógeno. Trab. Grad. Ph D. Universidad de Coruña. España. 46pp.
- GILMOUR, D., M. HIPKINS, A. WEBBER, N. BAKER & A. BONEY. 1985. The effect of ionic stress on photosynthesis in *Dunaliella tertiolecta*. *Planta* 163: 250-256.
- GONZÁLEZ, J. & A. PEÑA. 2002. Estrategias de adaptación de microorganismos halófilos y *Debaryomyces hansenii* (Levadura halófila). *Rev. Latinoam. Microbiol.* 44 (3-4): 137-156.
- GUEVARA, M., C. LODEIROS, O. GÓMEZ, N. LEMUS, P. NUÑEZ, L. ROMERO, A. VÁSQUEZ & N. ROSALES. 2005.

- Carotenogénesis de cinco cepas del alga *Dunaliella* sp. (Chlorophyceae) aisladas de lagunas hipersalinas de Venezuela. *Rev. Biol. Trop.* 53 (3&5): 331-337.
- HIFNEY, A., A. ISSA & M. FAWZY. 2013. Abiotic stress induced production of betacarotene, allophycocyanin and total lipids in *Spirulina* sp. *J. Algal Biomass Utiln.* 4 (2): 16-27.
- KEBEDE, E. 1997. Response of *Spirulina platensis* (*Arthrospira fusiformis*) from lake Chitu, Ethiopia, to salinity stress from sodium salts. *J. App. Phycol.* 9: 551-558.
- LÁMELA, T & F. MÁRQUEZ-ROCHA. 2000. Phycocyanin production in sea water culture of *Arthrospira maxima*. *Cienc. Mar.* 26 (4): 607-619.
- LIU, B., X. ZHANG, M. GAO & X. CHU. 2005. Effects of CD59 on antitumoral activities of phycocyanin from *Spirulina platensis*. *Biomed. Pharmacother.* 59(10): 551-560.
- LOWRY, O., H. ROSEBROUGH, A. FARR & R. RANDALL. 1951. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- MARSH, J. & D. WEINSTEIN. 1966. Simple charring method for determination of lipids. *J. Lipids. Res.* 7:574-592.
- MÜHLING, M., A. BELAY & B. WHITTON. 2005. Variation in fatty acid composition of *Arthrospira* (*Spirulina*) strains. *J. App. Phycol.* 17:137-147.
- OLAIZOLA, M. & E. DUERR. 1990. Effects of light intensity and quality on the growth rate and photosynthetic pigment content of *Spirulina platensis*. *J. App. Phycol.* 2: 97-104.
- OLGUÍN, E., S. GALICIA, O. ANGULO & E. HERNANDEZ. 2001. The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina* sp. (*Arthrospira*) grown on digested pig waste. *Biores. Technol.* 77 (1): 19-24.
- OLIVEIRA, M., M. MONTEIRO, P. ROBBS & S. LEITE. 1999. Growth and chemical composition of *Spirulina maxima* and *Spirulina platensis* biomass at different temperatures. *Aquacult. Internat.* 7: 261-275.
- OLVERA, R., O. CAÑIZARES-VILLANUEVA & E. RÍOS-LEAL. 2000. Selección de cepas de microalgas y cianobacterias con potencial para la producción de pigmentos naturales. *An. Esc. Nac. Cienc. Biol. México.* 46 (1): 77-82.
- OREN, A. 1999. Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 334-348.
- PIORRECK M, K. BAASCH & P. POHL. 1984. Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. *Phytochem* 23(2):207-216.
- RAFIQUL, I., K. JALAL & M. ALAM. 2005. Environmental factors for optimization of *Spirulina* biomass in laboratory culture. *Biotechnology* 4(1): 19-22.
- RAMÍREZ, L. & R. OLVERA. 2006. Uso tradicional y actual de *Spirulina* sp. (*Arthrospira* sp.). *Interiencia* 31(9): 657-663.
- RIJN, J. & M. SHILO. 1986. Nitrogen limitation in natural populations of cyanobacteria (*Spirulina* and *Oscillatoria* spp.) and its effect on macromolecular synthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 52 (2): 340-344.
- SÁNCHEZ, M., J. BERNAL, C. ROZO & I. RODRÍGUEZ. 2003. *Spirulina* (*Arthrospira*): An edible microorganism. A review. *Rev. Univ. Sci.* 8(1): 1-10.
- SASSANO, C., J. CARVALHO, L. GIOIELLI, S. SATO, P. TORRE & A. CONVERTI. 2004. Kinetics and bioenergetics of *Spirulina platensis* cultivation by fed-batch addition of urea as nitrogen source. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 112: 143-150.
- SATO, N. & N. MURATA. 1988. Membranes Lipids. *Meth. Enzimol.* 167: 251-259.
- TADROS, M. 1988. *Characterization of Spirulina biomass for CELSS diet potential*. In: NASA-CR-185329. Ed. Tadros. Alabama, USA. 1-25 pp.

- TAMBIEV, A., S. VASILIEVA & A. LUKYANOV. 2011. Manifestation of salt tolerance of *Spirulina platensis* and *Spirulina maxima* cyanobacteria of the genus *Arthrospira* (*Spirulina*). *Moscow Uni. Biol. Sci. Bull.* 66: 133-137.
- TEDESCO, M & E. DUERR. 1989. Light, temperature and nitrogen starvation effects on the total lipid and fatty acid content and composition of *Spirulina platensis* UTEX 1928. *J. Appl. Phycol.* 1(3):201-209.
- TOMASELLI, L. 1997. Morphology, ultrastructure and taxonomy of *Arthrospira* (*Spirulina*) *maxima* and *Athrospira* (*Spirulina*) *platensis*. In: *Spirulina platensis* (*Arthrospira*): physiology, cell-biology and biotechnology. Ed. Taylor & Francis. Londres, England. 5pp.
- TREDECCI, M., T. PAPUZZO & L. TOMASELLI. 1986. Outdoor mass culture of *Spirulina maxima* in sea- water. *Appl. Microbiol. Biotech.* 24: 47-50.
- ULLRICH, W., M. LARSSON, C. LARSSON, S. LESCH & A. NOVACKY. 1984. Ammonium uptake in *Lemna gibba* G1, related membrane potential changes and inhibition of anion uptake. *Physiol. Plant.* 61: 369-376.
- VÁZQUEZ, R. & B. ARREDONDO-VEGA. 1991. Haloadaptation of the green alga *Botryococcus braunii* ('A' Race). *Phytochemistry* 30 (9): 2919-2925.
- VIEIRA, J., K. COZZA, L. OLIVEIRA & G. MAGAGNIN. 2001. Different nitrogen sources and growth responses of *Spirulina platensis* in microenvironments. *W. J. Microbiol. Biotech.* 17: 439-442.
- VOLKMANN, H., U. IMIANOVSKY, J. OLIVEIRA & E. SANT. 2008. Cultivation of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* in desalinator wastewater and salinated synthetic medium: protein content and amino-acid profile. *Brazilian J. Microbiol* 39:1-4.
- VONSHAK, A., N. KANCHARAKSA, B. BUNNAG & M. TANTICHAROEN. 1996. Role of light an photosynthesis on the cyanobacterium *Spirulina platensis* to salinity stress. *J. Appl. Phycol.* 8(2): 119-124.
- WEGMANN, K. & H. METZNER. 1971. Synchronization of *Dunaliella salina* cultures. *Archiv. Mikrobiol.* 78: 360-367.
- WU, D. & N. MEYDANI. 1996. Gamma-linolenic acid and immune function. In: *Gamma-Linolenic acid: Metabolism and its roles in nutrition and medicine*. Ed. S. Huang & D. Mills. AOCS Press, Champaign, France. 106-117 pp.
- YILMAZ, H. 2012. The proximate composition and growth of *Spirulina platensis* biomass (*Arthrospira platensis*) at different temperatures. *J. Anim. Vet. Adv.* 11(8): 1134-1138.
- ZAR, J. 1984. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, Englewoods Cliff, New Jersey. USA.
- ZARROUK, C. 1966. *Contribution l'étude d' ue cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croisse et la photosynth se de Spirulina maxima* (Setch et Gardner) Geitler. Trab. Grad. Doctor en Ciencias. Facultad de Ciencias, Universidad de Paris, Francia, 41 pp.
- ZHANG, X. 1998. Large scale cultivation of *Spirulina* in China: Today and tomorrow. *Biosyst. Stud.* 1(1): 66-73.

RECIBIDO: Abril 2013

ACEPTADO: Febrero 2014