

TESIS DE MAESTRÍA
PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS

“Efecto de diferentes fuentes de nitrógeno y de fósforo sobre la producción y la composición de la biomasa microalgal de *Arthrospira (Spirulina) plantensis* LMPA55”

Autor: Ing. Ricardo R. Mateucci
Director de Tesis: Dr. Busto, Víctor Daniel

Buenos Aires - 2018

Agradecimientos

A la Universidad Tecnológica Nacional por haberme otorgado la Beca Bicentenario para cursar la Maestría en Procesos Biotecnológicos.

A la UTN – Facultad Regional Buenos Aires y a los docentes de la Maestría en Procesos Biotecnológicos, por la formación que me brindaron y la calidad académica con la que se desempeñaron.

Al Departamento de Ingeniería Química por haberme brindado las instalaciones para el desarrollo de este trabajo y por el estímulo que constantemente he recibido.

A la Dra. Ana María Giulietti y al Dr. Isaac Marcos Cohen, por su asesoramiento y sus importantes aportes.

Al Dr. Víctor Busto por su dirección en este trabajo.

A mis compañeros de cátedra Agustina, Susana, Victoria, Julieta, Marina y Darío, por comprender la importancia de este trabajo.

A mis compañeros del Proyecto de Microalgas Julieta, Paola, Federico, Nahuel y Maximiliano, por su colaboración en las mediciones experimentales.

A María del Carmen Gutiérrez por su colaboración, su orientación, su apoyo, por lo que me ha enseñado y por estar siempre presente.

A Paola Álvarez por sus sugerencias, su ayuda desinteresada y sobre todo por su amistad.

A los pilares fundamentales de mi vida, Francisco y Marina, por su amor incondicional.

Índice

1. Resumen y <i>abstract</i>	1
1.1 Resumen	1
1.2 <i>Abstract</i>	2
2. Introducción	4
2.1. Generalidades de las microalgas	4
2.2. <i>Spirulina (Arthrospira) platensis</i>	6
2.3. Bioproductos de interés	9
2.4. Medios de cultivo	15
2.4.1 <i>Nitrógeno como nutriente</i>	16
2.4.2 <i>Fósforo como nutriente</i>	20
2.5. Fuentes alternativas de nitrógeno y fósforo	24
3. Objetivos	26
4. Metodología	27
4.1. Cepa empleada.....	27
4.2. Mantenimiento de la cepa	27
4.3. Medio de cultivo.....	28
4.4. Condiciones estándar de cultivo	30
4.5. Determinación de la biomasa.....	32
4.6. Estimación de parámetros cinéticos de crecimiento	34
4.7. Cuantificación de proteínas.....	35
4.8. Cuantificación de lípidos.....	39
4.9. Cuantificación de carbohidratos.....	41
4.10. Cuantificación de pigmentos	44
4.10.1. <i>Clorofila y carotenoides</i>	45
4.10.2. <i>Ficocianina</i>	46
4.11. Diseños experimentales	47
4.11.1. <i>Influencia del nitrato de sodio</i>	49
4.11.2. <i>Influencia del cloruro de amonio</i>	51
4.11.3. <i>Influencia de la urea</i>	53
4.11.4. <i>Influencia del fosfato ácido de potasio</i>	55
4.11.5. <i>Influencia del fosfato monocálcico</i>	57
4.11.5.1. <i>Incorporación del fosfato monocálcico al medio de cultivo (ensayo preliminar)</i>	57

4.11.5.2. <i>Ensayo de influencia del fosfato monocálcico (ensayo final)</i>	59
4.12. Tratamiento de datos y análisis estadístico	62
5. Resultados	63
5.1. Influencia del nitrato de sodio.....	63
5.2. Influencia del cloruro de amonio	68
5.3. Influencia de la urea	70
5.4. Influencia del fosfato ácido de potasio	76
5.5. Influencia del fosfato monocálcico.....	82
5.5.1. <i>Incorporación del fosfato monocálcico al medio de cultivo</i>	82
5.5.2. <i>Ensayo de influencia del fosfato monocálcico</i>	83
6. Discusión	90
6.1. Influencia del nitrato de sodio, del cloruro de amonio y de la urea	90
6.2. Influencia del fosfato ácido de potasio y del fosfato monocálcico	92
7. Conclusiones	95
8. Bibliografía	97

1. Resumen y *abstract*

1.1 Resumen

Spirulina platensis fue la primer cianobacteria cultivada utilizando la biotecnología moderna. Su elevado contenido de proteínas, su composición particular en aminoácidos y ácidos grasos esenciales, y su contenido de vitaminas, hacen que resulte una microalga de interés para la alimentación humana y animal. No obstante, su biomasa resulta una fuente interesante de determinados productos como pigmentos y polisacáridos. Su uso se ha extendido desde la aplicación original en la alimentación, a la producción de productos químicos para diagnóstico clínico, investigación biológica, de uso cosmético y de aplicación terapéutica. Incluso ha sido considerada como materia prima potencial para la producción de biocombustibles.

Los medios para el cultivo de microalgas están conformados por distintas sustancias que sirven de nutrientes para su crecimiento y desarrollo. Los nutrientes que los componen se pueden clasificar, según su concentración en macronutrientes y en micronutrientes. Los macronutrientes participan en la formación de las moléculas estructurales, mientras que los micronutrientes cumplen un papel metabólico específico en la fisiología celular. Por lo tanto, la composición del medio de cultivo en macronutrientes, en especial en fósforo y en nitrógeno, influye en el crecimiento de las microalgas, afectando a la velocidad de crecimiento, a la producción de biomasa y a su composición bioquímica.

El medio de cultivo Zarrouk es el más comúnmente utilizado para el cultivo de *S. platensis*. El nitrato de sodio y el fosfato ácido de potasio son las fuentes de nitrógeno y de fósforo que lo componen. Se estudió la producción y la composición bioquímica de la biomasa para distintas concentraciones de estas fuentes. Se verificó que a bajas concentraciones de nitrato de sodio la velocidad específica de crecimiento de *S. platensis* manifestaba un aumento, lo que permitiría incrementar productividades con un menor costo de medio de cultivo. No obstante, a bajas concentraciones también se observó una disminución en los contenidos de proteínas y de ficocianina, dado que este pigmento podría ser utilizado como reserva frente una limitación de nitrógeno. En lo que respecta al fosfato ácido de potasio, no se observaron cambios significativos en la producción y la composición bioquímica de la biomasa, aún a bajas concentraciones, lo que se atribuiría a la capacidad de *S. platensis* para acumular fósforo en forma de gránulos de polifosfato.

Dado que el costo de los nutrientes representa un 25% del costo total de producción en el cultivo de microalgas, es conveniente emplear fuentes de nitrógeno y de fósforo económicas, y que permitan

conseguir productividades adecuadas. Tal es el caso de los fertilizantes (como la urea y los superfosfatos) que resultan ser fuentes alternativas de nutrientes económicamente atractivas.

Se estudió en el efecto de distintas concentraciones de cloruro de amonio y de urea, en la producción y la composición bioquímica de la biomasa de *S. platensis*. A bajas concentraciones de urea se observaron incrementos en la producción de la biomasa, en la velocidad específica de crecimiento, en el contenido de lípidos y en el contenido de carbohidratos. Estos resultados conducirían a posibles mejoras en las productividades y a una disminución en el costo del medio del cultivo. Si bien el cloruro de amonio y la urea son fuentes de nitrógeno fácilmente asimilables por *S. platensis*, a determinadas concentraciones resultan tóxicas para la microalga debido al amoníaco que se genera a partir de las mismas. Este efecto inhibitorio pudo ser verificado para ambas fuentes.

También se estudió el efecto de distintas concentraciones de fosfato monocálcico sobre *S. platensis*, el cual es parte de la composición de los fertilizantes superfosfato. Frente a esta fuente de fósforo no se observaron cambios significativos en la composición bioquímica de la biomasa, por lo que su uso resultaría atractivo dado que permitiría reducir el costo de cultivo. Sin embargo, la escasa solubilidad del fosfato monocálcico representa una desventaja para el cultivo por la turbidez que genera. Esta turbidez dificulta la penetración de la luz ocasionando una disminución del crecimiento y un consecuente descenso en las productividades.

1.2 Abstract

Spirulina platensis was the first cyanobacteria grown using modern biotechnology. Its high content of proteins, its particular composition in amino acids and essential fatty acids, and its vitamin content, make it a microalgae of interest for human and animal feed. However, its biomass is an interesting source of certain products such as pigments and polysaccharides. Its use has extended from the original application in feed, to the production of chemical products for clinical diagnosis, biological research, cosmetic use and therapeutic application. It has even been considered as a potential raw material for the production of biofuels.

The culture media of microalgae are made up of different substances that serve as nutrients for their growth and development. The nutrients that compose them can be classified, according to their concentration, in macronutrients and micronutrients. Macronutrients participate in the formation of structural molecules, while micronutrients play a specific metabolic role in cellular physiology. Therefore, the composition of the

culture medium in macronutrients, especially phosphorus and nitrogen, influences microalgae growth, affecting growth rate, biomass production and biochemical composition.

*Zarrouk culture medium is the most commonly used for the cultivation of *S. platensis*. Sodium nitrate and potassium acid phosphate are the sources of nitrogen and phosphorus of that culture medium. Production and biochemical composition of the biomass for different concentrations of these sources was studied. It was observed that at low concentrations of sodium nitrate an increase in the specific growth rate was observed, which would allow increasing productivities with a lower cost of cultivation. However, at those concentrations a decrease in proteins and phycoerythrin contents was also observed, since this pigment is used as a reserve against a nitrogen limitation. With regard to potassium hydrogen phosphate, no significant changes were observed in the production and biochemical composition of the biomass, which would be attributed to the ability of *S. platensis* to accumulate phosphorus as polyphosphate granules.*

Given that the cost of nutrients represents 25% of the total cost of production in the cultivation of microalgae, it is convenient to use inexpensive sources of nitrogen and phosphorus, and to achieve adequate productivities. Such is the case of fertilizers (such as urea and superphosphates) which are economically attractive sources of nutrients.

*It was studied the effect of different concentrations of ammonium chloride and urea on the production and biomass composition of *S. platensis*. At low urea concentrations, increases in biomass production, specific growth rate, lipids and carbohydrates content were observed. These results would allow possible improvements in productivities and a decrease in the cost of cultivation. Although ammonium chloride and urea are sources of nitrogen easily assimilable by *S. platensis*, at certain concentrations they are toxic for microalgae due to the ammonia that is generated from them. This inhibitory effect could be verified for both sources.*

The effect of different concentrations of monocalcium phosphate, which is a component of superphosphate fertilizers, was also studied. In the face of this source of phosphorus no significant changes were observed on the biochemical composition of the biomass, so its use is attractive given that it would reduce the cost of cultivation. However, the low solubility of monocalcium phosphate represents a disadvantage for cultivation due to the turbidity generated. This turbidity hinders the penetration of light, causing a decrease in growth and a consequent decrease in productivities.

2. Introducción

2.1. Generalidades de las microalgas

Las microalgas constituyen un amplio y diverso grupo de microorganismos fotosintéticos que pueden crecer de manera autotrófica, heterotrófica o mixotrófica. Este grupo incluye varios cientos de especies, tanto eucariotas como procariontes, siendo algunas fijadoras del nitrógeno atmosférico. Aunque generalmente son microorganismos de vida libre, un cierto número de microalgas viven en asociación simbiótica con una variedad de otros organismos.

Las microalgas se encuentran distribuidas en todo el mundo. Están presentes en todos los cuerpos de agua, como lagos, mares y ríos, pero no están supeditadas solo al agua ya que también se encuentran en la superficie de todo tipo de suelos.

El proceso de fotosíntesis es indispensable para regular el contenido de oxígeno y dióxido de carbono en la atmósfera, por lo tanto, las microalgas colaboran en la reducción de las emisiones de dióxido de carbono al medio, ya que las mismas permiten aliviar el efecto invernadero, las lluvias ácidas y el problema que produce la destrucción de la capa de ozono (Travieso & Benítez Echegoyen, 1998).

En general son altamente eficientes en la fijación de dióxido de carbono y en la utilización de la energía solar para producir biomasa, liberando oxígeno a la atmósfera. Debido a esta capacidad, las microalgas son el producto del más eficiente estado de producción de biomasa en el ciclo de la naturaleza.

Las biomásas microalgales han sido producidas y aplicadas industrialmente en diferentes áreas, tales como la alimentación humana (como suplementos nutricionales) y de animales (alimentos para peces y crustáceos) (Knuckey et al., 2006), los productos nutracéuticos (Shi et al., 2002), la obtención de pigmentos (Del Campo et al., 2007) y el tratamiento de aguas residuales (de la Noüe et al., 1992; Wang & Lan, 2011). Además, se las ha utilizado en la industria de cosméticos y en la agricultura como biofertilizantes (Markou & Georgakakis, 2011).

Asimismo, una aplicación importante del cultivo de microalgas es la producción de biomasa con fines energéticos. Las microalgas producen biomasa que puede ser convertida en energía o utilizada como un portador de energía a través de un número de procesos de conversión energética. Estos procesos incluyen la conversión termoquímica (gasificación, combustión directa y pirólisis), la conversión bioquímica (fermentación anaerobia, digestión anaerobia y producción de hidrógeno fotobiológico) y la esterificación

de los ácidos grasos para la producción de biodiesel (Markou & Georgakakis, 2011). En las últimas tres décadas, la producción de biocombustibles basada en biomasa microalgal se ha establecido como una de las alternativas más prometedoras a los combustibles fósiles (Li et al., 2008) y para la biofijación de dióxido de carbono (Huntley & Redalje, 2007; Wang et al., 2008).

Muchas microalgas poseen un elevado valor nutricional debido al contenido de un amplio rango de nutrientes tales como provitaminas, minerales, proteínas y ácidos grasos poliinsaturados (Colla et al., 2007). Algunas pueden acumular pigmentos como el β -caroteno, la astaxantina y la luteína de aplicación en la alimentación humana y animal (Shi et al., 1999). También pueden contener vitaminas de particular valor comercial tales como la vitamina B12 y la vitamina E de amplio uso como antioxidante, y ficocoloides que se utilizan como espesantes, floculantes y lubricantes. Asimismo algunas microalgas, como las del género *Spirulina*, son capaces de sintetizar sustancias bioactivas susceptibles de ser utilizadas en medicina como terapéuticos (Colla et al., 2007).

Es sabido que la composición de la biomasa microalgal puede ser manipulada mediante las condiciones de cultivo (Markou et al., 2012). Estas condiciones optimizadas para la generación de biomasa son las habitualmente utilizadas en la producción comercial de microalgas. No obstante, elevadas concentraciones de compuestos potencialmente útiles, tales como ácidos grasos poliinsaturados, proteínas y compuestos fenólicos, pueden ser obtenidas manipulando las condiciones de crecimiento. Esto indica que las condiciones de cultivo óptimas para la producción de biomasa pueden diferir de las condiciones que maximizan la formación de productos de interés (Colla et al., 2007). El ajuste de las condiciones de cultivo de *Chlorella vulgaris* permitió aumentar su contenido de lípidos (Lv et al., 2010). La producción de proteínas, lípidos y compuestos fenólicos se pudo incrementar manipulando la temperatura del cultivo de *Spirulina platensis* (Colla et al., 2007). La limitación de fósforo en el medio de cultivo causó un drástico incremento del contenido de carbohidratos de *S. platensis* (Markou et al., 2012). Las concentraciones iniciales de glucosa tuvieron un efecto significativo sobre la producción de luteína en cultivos heterotróficos de *Chlorella protothecoides* (Shi et al., 1999). Un medio de cultivo alcalino, aireado y bajo un flujo intermitente de dióxido de carbono, promovió un aumento en la producción de biomasa y en el contenido de ficocianina de *S. platensis* (Zeng et al., 2012).

2.2. *Spirulina (Arthrospira) platensis*

Arthrospira, generalmente llamada *Spirulina*, fue redescubierta (ya era antes utilizada por los aztecas y los mayas) a mediados de la década de 1960. Un informe del botánico Jean Léonard, el cual era miembro de una expedición franco-belga a África, describió un pastel verde azulado vendido en el mercado de alimentos de Fort Lamy, Chad. Un estudio adicional reveló que esta torta, llamada dihé en el dialecto local, contenía un alga azul-verde identificada como *Spirulina* que era consumida por las tribus que habitaban a las orillas del lago Chad, en el centro del África Occidental (Vonshak, 1997).

S. platensis es una cianobacteria que se caracteriza por poseer sus células agrupadas en tricomas, los cuales se disponen en forma de espiral (Figura 1). Es una microalga ubicua, pero principalmente encontrada en aguas alcalinas, salobres y salinas, en las que frecuentemente se convierte en especie dominante y forma floraciones masivas (Ciferri, 1983). *S. platensis* fue la primer cianobacteria cultivada utilizando la biotecnología moderna. Su uso se ha extendido desde la aplicación original en la alimentación humana y de animales, a la producción de productos químicos para diagnóstico clínico, investigación biológica y de uso cosmético. Los estudios realizados sobre sus efectos terapéuticos y sobre la salud, han promovido la aplicación de este organismo en las industrias farmacéutica y nutracéutica (Hu, 2004). *Spirulina* fue considerada por la NASA como el alimento ideal para los astronautas (Kumari et al., 2015).

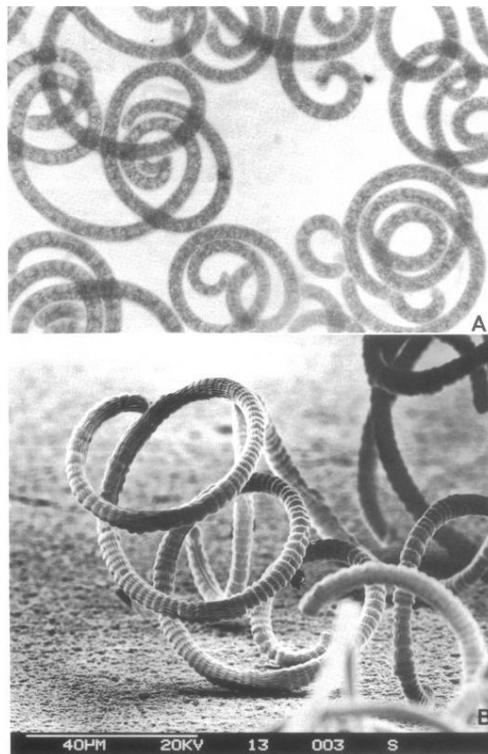


Figura 1– a) Imagen de *S. platensis* tomada con microscopía óptica (400x); b) Imagen de un tricoma de *S. platensis* tomada con microscopía de transmisión electrónica. Fuente: (Ciferri, 1983).

La producción de *S. platensis* ha ido aumentando debido a su elevado contenido de proteínas de alto valor, aminoácidos fundamentales, vitaminas, β -caroteno y otros pigmentos, sustancias minerales, ácidos grasos esenciales y polisacáridos, que encuentran aplicación en varias industrias como las de alimentos saludables y terapéuticos (Bezerra et al., 2012). La producción anual de *Spirulina* se estima en más de 3000 toneladas de biomasa seca, con una principal aplicación en alimentación animal y para alimentos saludables (Xie et al., 2015). La composición bioquímica de la *Spirulina* en polvo (biomasa seca) se detalla en la Tabla 1.

Tabla 1– Composición bioquímica de la biomasa seca de *Spirulina*. Fuente: (Belay, 1997; Cohen, 1997; Ramírez-Moreno & Olvera-Ramírez, 2006; Sánchez et al., 2003).

Composición General	[%]	Acidos Grasos	[g/kg]
Humedad	3 – 7	Ácido mirístico	0,1
Proteínas	55 – 70	Ácido palmítico	19
Lípidos	6 – 8	Ácido palmitoleico	0,5
Carbohidratos	15 – 25	Ácido γ -linolénico	10
Minerales	7 – 13	Ácido linoleico	8
Fibra	8 – 10	Ácido oleico	2
Vitaminas	[mg/kg]	Minerales	[mg/kg]
Provitamina A	1400	Potasio	14000
Tiamina B ₁	35	Sodio	9000
Riboflavina B ₂	40	Fósforo	8000
Niacina B ₃	140	Calcio	7000
Vitamina B ₆	8	Magnesio	4000
Cobalamina B ₁₂	3,2	Hierro	1000
Vitamina E	100	Manganeso	50
Inositol	640	Zinc	30
Vitamina K ₁	22	Cobre	12
Ácido fólico	0,1	Cromo	2,8
Ácido pantoténico	1,0	Aminoácidos	[g/kg]
Biotina	0,05	Alanina	47
Pigmentos	[mg/100g]	Arginina	43
Clorofila <i>a</i>	1000	Ácido aspártico	61
Carotenoides	370	Cisteína	6
<i>β-caroteno</i>	56	Ácido glutámico	91
<i>Equinenona</i>	44	Glicina	32
<i>β-criptoxantina</i>	26	Histidina	10
<i>3'-hidroxiequinenona</i>	33	Isoleucina	35
<i>Zeaxantina</i>	93	Leucina	54
<i>Diatoxantina</i>	19	Lisina	29
<i>Cantaxantina</i>	19	Metionina	14
<i>Mixoxantofila</i>	56	Fenilalanina	28
<i>Oscillaxantina</i>	15	Prolina	27
Ficocianina	14000	Serina	32
Carbohidratos	[g/kg]	Treonina	32
Glicerol	15	Triptofano	9
Glucosa	15	Tirosina	30
Ramnosa	34	Valina	40
Fucosa	6		
Ribosa	16		
Xilosa	9		
Manosa	4		
Galactosa	16		
D-glucosamina	4		

2.3. Bioproductos de interés

El elevado contenido de proteínas, su composición particular en aminoácidos y ácidos grasos esenciales, y su contenido de vitaminas, hacen que *S. platensis* resulte una microalga de interés para la alimentación humana y animal (Vonshak, 1997). No obstante, su biomasa resulta una fuente interesante de determinados productos (Hu, 2004).

S. platensis ha ganado considerable atención en todo el mundo como fuente de productos nutracéuticos (Belay et al., 1993). Entre los nutracéuticos, los pigmentos han atraído el mayor interés comercial.

Existe una tendencia mundial respecto a sustituir los colorantes sintéticos por productos naturales, lo que sugiere la posibilidad de explorar *Spirulina* para este fin, ya es una de las mayores fuentes de clorofila en la naturaleza (Danesi et al., 2002).

Las clorofilas son una familia de pigmentos de color verde que se encuentran en las cianobacterias y en todos aquellos organismos que contienen cloroplastos en sus células. Son sustancias críticas en la fotosíntesis, que consiste en el proceso que permite a los organismos absorber energía a partir de la luz solar y transformarla en compuestos orgánicos y oxígeno.

Hay distintos tipos de clorofila, siendo las principales las clorofilas *a* y *b*. También existen otras moléculas relacionadas que se encuentran en procariontas llamadas bacterioclorofilas. La clorofila *a* y la clorofila *b* son los principales pigmentos fotosintéticos. Las moléculas de clorofila absorben luz a longitudes del rojo y del azul, tal como se muestra en los espectros de absorción en la Figura 2.

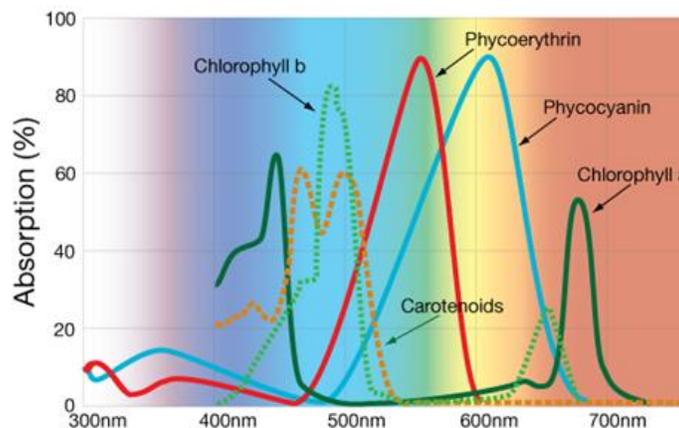


Figura 2– Espectros de absorción de distintos pigmentos asociados a la fotosíntesis.

La molécula de clorofila (Figura 3) tiene una parte que consiste en un anillo de porfirina que contiene magnesio y cuya función es absorber luz, y otra parte que se trata de una cadena hidrofóbica de fitol que mantiene la clorofila integrada a las membranas. Particularmente, *S. platensis* solo posee clorofila *a* (Cohen, 1997).

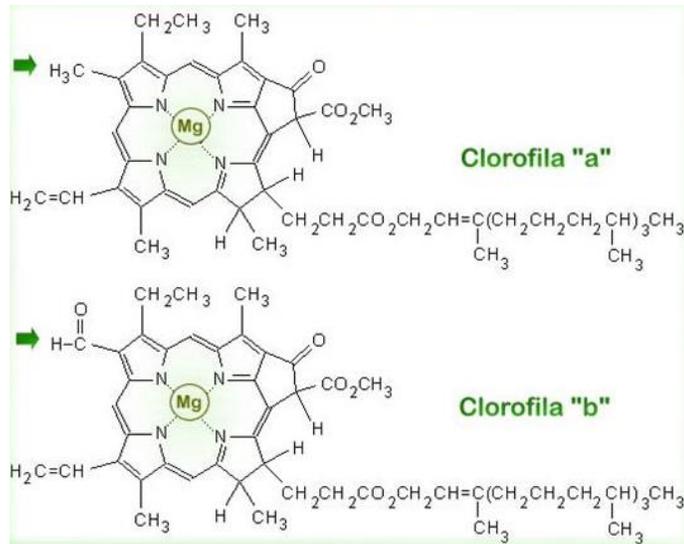


Figura 3– Estructuras de las moléculas de clorofila *a* y de clorofila *b*. Las flechas señalan la diferencia estructural entre ambas moléculas.

La clorofila tiene numerosas aplicaciones en el campo biotecnológico. Se ha demostrado que estimula la recuperación de la función hepática y aumenta la secreción de bilis (Bishop & Zubeck, 2012), tiene efectos antiinflamatorios (Subramoniam et al., 2012), y también se la ha descrito como un agente antitumoral (Vesenick et al., 2012). Las actividades antioxidantes de la clorofila *a* y sus derivados fueron demostradas por Lanfer-Marquez et al. (2005).

Los carotenoides (Figura 5) son los responsables de la gran mayoría de los colores amarillos, anaranjados o rojos presentes en los vegetales. Desde el punto de vista químico, pertenecen a la familia de los terpenos, es decir están formados por unidades de isopreno (Figura 4). De los carotenoides conocidos, solamente alrededor del 10% tienen valor como precursores de la vitamina A. Además del β -caroteno, los más importantes entre ellos son el α -caroteno y la β -criptoxantina. La condición fundamental para que tengan actividad vitamínica es que tengan cerrado y sin oxidar al menos uno de los anillos de los extremos de la estructura. Consecuentemente, varios de los carotenoides más comunes, como el licopeno, zeaxantina y luteína no tienen valor como provitamina A, aunque son muy importantes como pigmentos, y pueden tener

también actividad como antioxidantes. En general las xantofilas producen color amarillo, mientras que los carotenoides son anaranjados o rojizos (Calvo, n.d.).

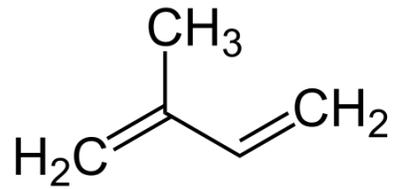


Figura 4– Molécula de isopreno. Los carotenoides están formados por unidades de isopreno.

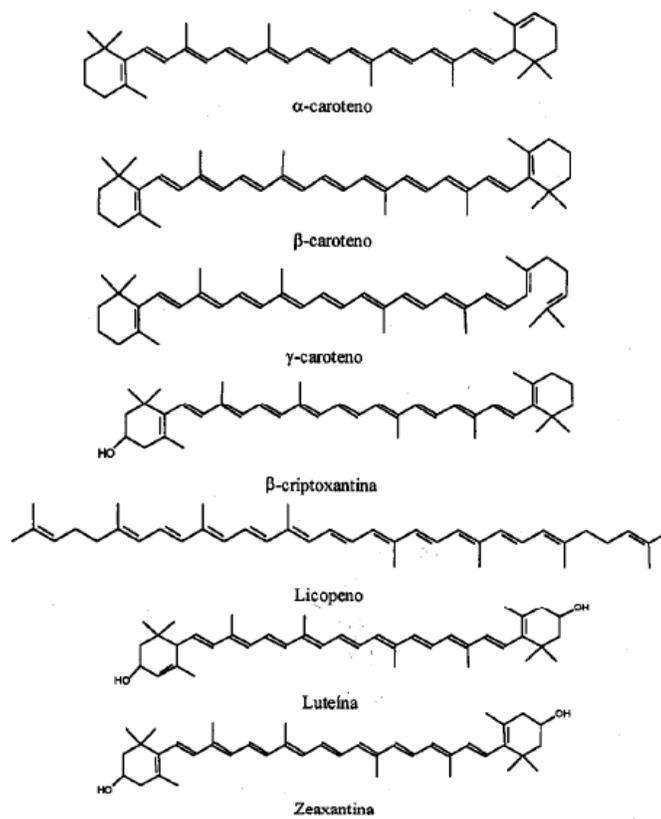


Figura 5– Estructuras de distintos carotenoides.

En las algas y las plantas superiores, los carotenoides desempeñan papeles múltiples y esenciales en la fotosíntesis. Contribuyen a la recolección de luz, mantienen la estructura y la función de los complejos fotosintéticos, eliminan especies de oxígeno reactivas y disipan el exceso de energía (Del Campo et al., 2007).

Sus usos más importantes son como colorantes alimentarios naturales y como aditivo para la alimentación animal (Gouveia & Empis, 2003). Los carotenoides también tienen aplicaciones en cosméticos (Del Campo et al., 2000). La relevancia nutricional y terapéutica de ciertos carotenoides se debe a su capacidad de actuar como provitamina A (Gouveia & Empis, 2003). Los carotenoides tienen propiedades antiinflamatorias intrínsecas debido a su capacidad antioxidante y se atribuye a estas moléculas un efecto preventivo de distintas enfermedades, incluida el cáncer (Del Campo et al., 2000; Gouveia & Empis, 2003).

Los carotenoides presentes en *S. platensis* son β -caroteno, zeaxantina, mixoxantofila, equinenona, 3-hidroxi equinenona, β -criptoxantina, cantaxantina, diatoxantina, oscilaxantina, β -caroteno-5,6-epóxido y otros no identificados (Cohen, 1997).

Las ficobiliproteínas son proteínas conjugadas con grupos prostéticos tetrapirrólicos lineales llamados bilinas, que se encuentran unidos covalentemente a residuos de cisteína específicos de la proteína, formando puentes tioéteres entre dicho aminoácido y la cadena de anillos (Figura 6). Así la formación polipéptido-bilinas forman dímeros, trímeros o hexámeros.

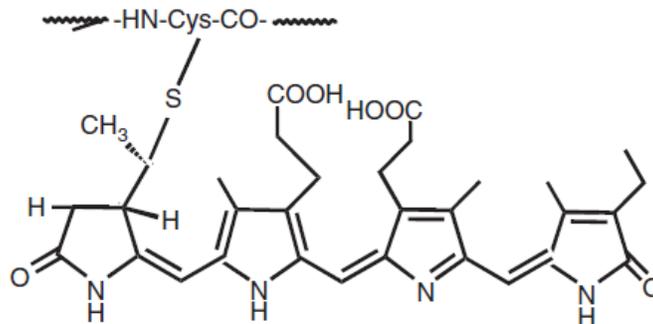


Figura 6– Estructura de una ficobiliproteína.

Existen tres tipos de ficobiliproteínas: las ficocianinas, que son de color azul; las ficoeritrinas, que son de color rojo; y las aloficocianinas, que son de color púrpura. Todas ellas presentan fluorescencia. Son muy

solubles en agua, pudiendo llegar a representar el 60% de las proteínas solubles de una microalga (Gantt, 1981). Presentan diferentes formas denominadas R, B y C, según si su origen microalgal es rodophyta, bangiophyceae y cyanophyta, respectivamente (Bryant et al., 1978; Gantt, 1981). Dada su pigmentación, las ficoeritrinas predominan en las algas rojas y las ficocianinas en las cianobacterias.

Las ficobiliproteínas participan en el proceso de fotosíntesis en forma de agregados multiméricos captadores de luz llamados ficobilisomas. El modelo consiste en un núcleo de aloficocianina presente como trímero. Este núcleo está rodeado por varias estructuras compuestas por hexámeros de subunidades de ficocianina y ficoeritrina. Finalmente, los ficobilisomas están conectados al fotosistema II a través de partículas situadas en el exterior de la membrana tilacoidal dispersa en la célula (Figura 7) (Tomaselli, 1997).

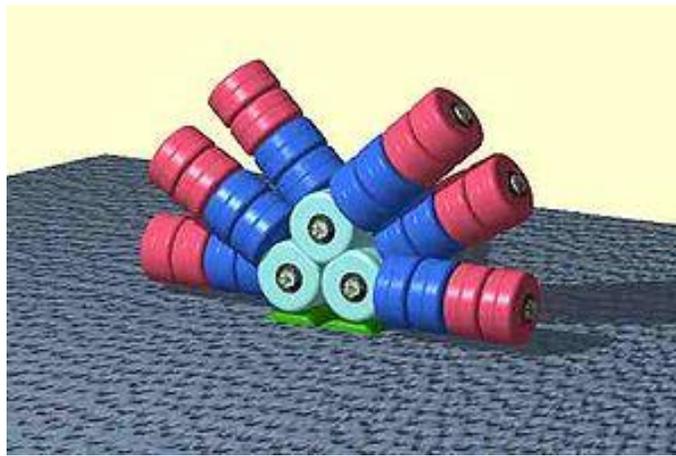


Figura 7- Modelo de un ficobilisoma. Se compone de un núcleo de aloficocianina (verde claro), rodeado de ficocianina (azul) y ficoeritrina (rojo). El ficobilisoma se encuentra unido al fotosistema II (verde oscuro).

Las ficobiliproteínas son utilizadas en diversos campos. Debido a su pigmentación son empleadas como colorantes en la industria alimentaria y en la industria cosmética (Varga Rodríguez et al., 2006). En la actualidad se extrae ficocianina de microalgas para ser usada como aditivo en preparados congelados, bebidas ligeras, productos con leche, caramelos y helados (Ou et al., 2012). Se ha desarrollado también un isómero insoluble de ficocianina para ser empleado en cosméticos, lo que es ventajoso debido a su fácil incorporación a las bases orgánicas y su estabilidad frente a la humedad (Tanabe & Shimamatsu, 1981).

Dada su fluorescencia, las ficobiliproteínas son empleadas como reactivos marcadores en inmunodiagnóstico (Varga Rodríguez et al., 2006).

En diversos estudios se ha demostrado que la ficocianina posee propiedades terapéuticas. Protege ante el daño hepático y el daño renal (Ou et al., 2012). Es estimulante del sistema inmunitario, resultando efectiva en el tratamiento del cáncer cervicouterino (Varga Rodríguez et al., 2006). Es útil en afecciones cardiovasculares debido a su acción hipocolesterolemizante (Guerra et al., 2010). Posee propiedades antiinflamatorias y antiartríticas, por lo que es aplicada en el tratamiento de la arteriosclerosis (Guerra et al., 2010). Es también utilizada en el tratamiento de úlceras y de hemorroides (Sekar et al., 2000).

Las únicas ficobiliproteínas que componen *S. platensis* son la c-ficocianina y la aloficocianina (Brejc et al., 1995; Cohen, 1997), representando la primera un 20% del total del contenido proteico (Cohen, 1997).

Los carbohidratos en las microalgas pueden encontrarse en forma de almidón, glucosa, azúcares y otros polisacáridos. Su digestibilidad es alta, por lo que no existe ninguna limitación para el uso de microalgas secas y enteras en alimentación (Spolaore et al., 2006).

El uso del etanol como combustible o como aditivo al mismo, ha crecido en popularidad debido a las regulaciones gubernamentales, a incentivos económicos basados en preocupaciones ambientales y al deseo de reducir la dependencia del petróleo. Actualmente casi todo el bioetanol se produce a partir de granos o de caña de azúcar. Sin embargo, como este tipo de materia prima es esencialmente alimento, se han evaluado otras tecnologías eficientes y económicamente viables para la producción de etanol (Mussato et al., 2010). En este aspecto el uso de microalgas en la producción de bioetanol ofrece ventajas, dado que la producción de las mismas tiene un impacto ambiental reducido y no hay competencia por el espacio con cultivos alimenticios. Para que una especie de microalga sea conveniente para la producción de etanol debe presentar una elevada productividad de carbohidratos.

Bajo determinadas condiciones de cultivo, como por ejemplo reduciendo la concentración de ciertos nutrientes o aplicando una elevada intensidad de luz, se puede manipular la composición de la biomasa microalgal de manera de incrementar su contenido en carbohidratos, tal como fue observado en *Chlamydomonas reinhardtii*, *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella vulgaris* y *S. platensis* (Markou et al., 2013).

Si bien *S. platensis* es utilizada a nivel mundial para la extracción de biocompuestos de alto valor, esta microalga puede considerarse como una materia prima potencial para la producción de bioetanol (Salla et al., 2016). *S. platensis* posee un contenido de carbohidratos del 15 al 25% PS (Belay, 1997), pero en

determinadas condiciones de cultivo puede incrementarse hasta un 60 a 65% PS (Markou, 2012; Markou et al., 2013).

Al igual que otras cianobacterias, *Spirulina* presenta estructuras superficiales compuestas principalmente de polisacáridos que se van liberando al medio de cultivo a lo largo del crecimiento y lo van tornando más viscoso (Ramírez-Moreno & Olvera-Ramírez, 2006). Estos polisacáridos son solubles y fácilmente recuperables. Se han sugerido aplicaciones de los mismos en biomedicina, en la industria cosmética y en la industria alimenticia, como agentes emulsificantes, espesantes o estabilizantes (Ramírez-Moreno & Olvera-Ramírez, 2006). A partir de *S. platensis* se ha aislado el polisacárido sulfatado llamado Ca-SP, que inhibe la replicación del VIH, del *Herpes simplex*, del citomegalovirus humano, del virus de la influenza A, del virus de las paperas y del virus del sarampión (Hayashi et al., 1996).

El alto contenido de lípidos de algunas especies de microalgas resulta prometedor para la producción de biodiesel, mientras que algunos ácidos grasos de cadena larga tienen aplicaciones nutricionales (Yen et al., 2013). No obstante *S. platensis*, como es característico en las cianobacterias, presenta un bajo contenido de lípidos (Cohen, 1997) por lo que no resulta una microalga atractiva para la producción de biodiesel.

La mitad de los lípidos contenidos en *Spirulina* son ácidos grasos, de los cuales el ácido γ -linolénico se encuentra en alta concentración en comparación a otras fuentes (Cohen, 1997). Se trata de un ácido graso poliinsaturado esencial al que se le han atribuido propiedades medicinales. Fue empleado para el tratamiento del eczema atópico y para aliviar los síntomas del síndrome premenstrual. Ha tenido efectos positivos en el tratamiento de enfermedades cardíacas, en el mal de Parkinson y en la esclerosis múltiple (Cohen, 1997).

2.4. Medios de cultivo

Las microalgas para su crecimiento requieren un balance adecuado de distintos factores como son temperatura, luz (intensidad y fotoperiodo), medio de cultivo, pH, concentración inicial de biomasa, salinidad y agitación (Sigeo, 2005).

El medio de cultivo está conformado por distintas sustancias que servirán de nutrientes para el crecimiento y desarrollo de las microalgas. Los nutrientes necesarios se pueden clasificar en dos grupos según la concentración en la que se encuentren en un medio de cultivo: el grupo de los macronutrientes que se

hallan en el orden de los g/L y el grupo de los micronutrientes que se encuentran en el orden de los mg o µg/L. Los macronutrientes participan en la formación de las moléculas estructurales y son carbono, nitrógeno, oxígeno, hidrógeno, fósforo, calcio, magnesio, azufre, sodio y potasio. Los micronutrientes cumplen un papel metabólico específico en la fisiología celular y son manganeso, hierro, cobre, molibdeno y cobalto, entre otros. Por otra parte, es frecuente en algunos casos la inclusión de algunas vitaminas y antibióticos dentro de la formulación de ciertos medios de cultivo.

La composición del medio de cultivo en macronutrientes, en especial en fósforo y en nitrógeno, influye en el crecimiento de las microalgas, afectando a la velocidad de crecimiento, a la producción de biomasa y a su composición bioquímica (Grobbelaar, 2004).

2.4.1 Nitrógeno como nutriente

Luego del carbono, el nitrógeno es el nutriente más importante para la producción microalgal, constituyendo del 1 a más del 10 % PS de la biomasa (Grobbelaar, 2004). El nitrógeno constituye moléculas esenciales como los ácidos nucleicos (ADN y ARN), los aminoácidos, las proteínas, y pigmentos como la clorofila y la ficocianina.

Las fuentes inorgánicas de nitrógeno que pueden utilizar las microalgas son nitrato, nitrito, amonio y nitrógeno atmosférico (microalgas diazótrofes) (Markou et al., 2014a). La fuente orgánica de nitrógeno más común es la urea (Perez-García et al., 2011) pudiendo también utilizar algunos aminoácidos (Grobbelaar, 2004).

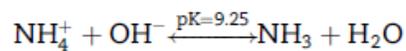
La vía más importante para la asimilación del nitrógeno es mediante el sistema enzimático de la glutamina sintetasa, en la que el amonio reacciona con el glutamato para formar el aminoácido glutamina a expensas del consumo de ATP.

El nitrato es la fuente de nitrógeno más comúnmente empleada, incorporada en forma de nitrato de sodio y en menor medida en forma de nitrato de potasio (Grobbelaar, 2004). El nitrato es incorporado mediante un transporte activo con un consecuente consumo energético (Markou et al., 2014a). Esta fuente de nitrógeno parece no tener efectos tóxicos sobre las células, habiéndose reportado el crecimiento de microalgas hasta un contenido de nitrato 100 mM (Jeanfils et al., 1993).

El nitrito es frecuentemente encontrado en el medio ambiente dado que es un intermediario en el proceso de nitrificación (Markou et al., 2014a). Es incorporado mediante un transporte activo, aunque se ha reportado en microalgas su incorporación por difusión (Fuggi, 1993). También es un intermediario intracelular en la asimilación del nitrato. El nitrito se forma a partir del nitrato mediante la enzima nitrato reductasa, para luego ser reducido a amonio por acción de la nitrito reductasa (Cornet et al., 1998; Fuggi, 1993; Perez-García et al., 2011). Bajo determinadas condiciones de cultivo, el nitrito puede resultar tóxico para las microalgas (Fuggi, 1993).

El amonio es la fuente de nitrógeno preferida por las microalgas, dado que su asimilación requiere menos energía respecto a otras fuentes de nitrógeno (Perez-García et al., 2011). Las sales de amonio son económicas, por lo que su empleo en el cultivo de microalgas presenta un atractivo económico (Converti et al., 2006; Sassano et al., 2007). Por otra parte, el amonio es frecuentemente encontrado en las aguas residuales (Converti et al., 2006).

Cuando el amonio se disuelve en un medio básico, reacciona formando amoníaco y agua. Por tratarse de una reacción de equilibrio, se forma un buffer amonio/amoníaco.



El equilibrio entre el amonio y el amoníaco es afectado por el pH. A valores de pH mayores a 9,25 (pK del amonio a 25°C) la especie predominante es el amoníaco, mientras que a valores menores predomina el amonio (Figura 8). La temperatura también afecta al equilibrio entre ambas especies, dado que al ser endotérmico, el pK disminuye con el incremento de la temperatura haciendo que el amonio sea la especie predominante (Figura 8) (Markou et al., 2014a).

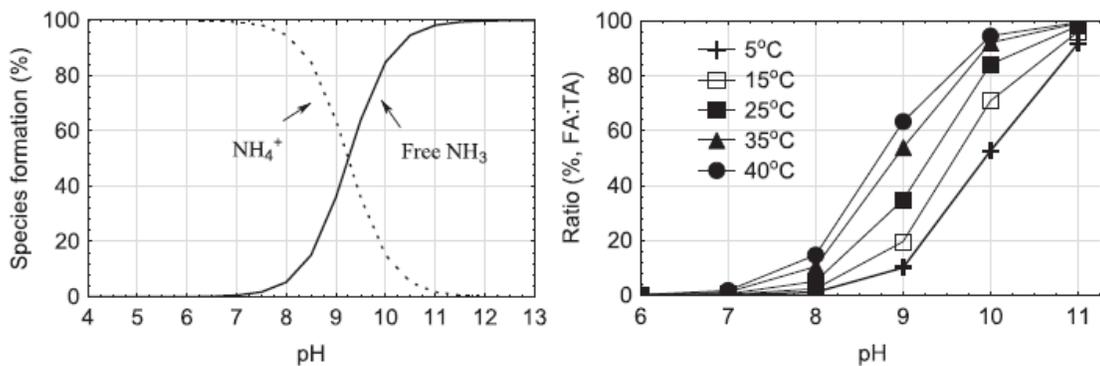


Figura 8– Efecto del pH y de la temperatura en la concentración de las especies del equilibrio amonio/amoníaco (FA: concentración de amoníaco; TA: concentración de amoníaco + amonio). Fuente: (Markou et al., 2014a).

Un problema en el uso del amonio como fuente de nitrógeno es la potencial toxicidad del amoníaco que se genera en el equilibrio. El amoníaco inhibe la fotosíntesis, dado que se produce un desacoplamiento en el transporte de electrones del fotosistema II por afectar al gradiente de protones necesarios para la fosforilación (Azov & Goldman, 1982). El amonio es incorporado por las microalgas mediante un transporte activo, por lo que su concentración intracelular puede ser regulada, mientras que la incorporación del amoníaco ocurre por difusión, habiendo poco control en su concentración intracelular (Drath et al., 2008).

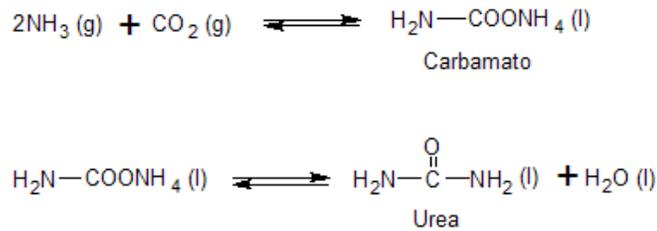
Al emplear amonio como fuente de nitrógeno, el pH del medio de cultivo y la temperatura de incubación influyen en la toxicidad debida al amoníaco en equilibrio (ver Figura 8). El efecto perjudicial del amoníaco sobre las microalgas se da en concentraciones que van de 0,5 a 2,0 mM (Azov & Goldman, 1982). No obstante, *S. platensis* posee tolerancia a mayores concentraciones de amoníaco, por presentar una menor diferencia de pH intermembranas respecto a otras microalgas. Esta menor diferencia ocasiona menos acumulación de amonio intracelular (Belkin & Boussiba, 1991).

Otro problema al utilizar el amonio como sustrato es su pérdida debido a la desorción del amoníaco en equilibrio, generando una menor disponibilidad de nitrógeno en el medio de cultivo (Grobbelaar, 2004; Markou et al., 2014b). Este fenómeno de desorción se incrementa con el pH y la temperatura.

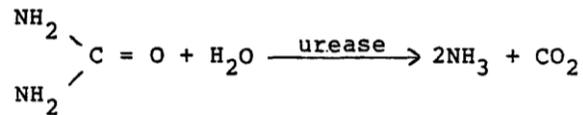
Se han utilizado varias estrategias para evitar el efecto tóxico del amoníaco al emplear amonio como sustrato en el cultivo microalgal. Una de ellas es ajustar el pH del medio de cultivo por debajo del pK para minimizar la formación de amoníaco en equilibrio (Azov & Goldman, 1982). Otra estrategia utilizada al emplear aguas residuales como fuente de nutrientes, es su dilución, con lo que se logra disminuir la concentración del amoníaco formado (Olguín et al., 2003). Otra opción es operar el sistema de cultivo en modo fed-batch, en la que la incorporación gradual del amonio permite mantener limitada la concentración de amoníaco (Rodrigues et al., 2010).

La urea es la fuente orgánica de nitrógeno más utilizada en el cultivo de las microalgas (Markou et al., 2014a). La urea es empleada como fertilizante en agricultura, considerándose uno de los más concentrados en nitrógeno (46,6 %). Su empleo en el cultivo microalgal presenta por su parte un gran atractivo económico (Converti et al., 2006; Sassano et al., 2007).

A nivel industrial la urea se produce a partir del amoníaco y del dióxido de carbono mediante dos reacciones en serie. En la primera reacción se forma el intermediario carbamato de amonio, el cual se descompone en la segunda reacción para formar la urea y agua.



La urea es incorporada por las microalgas mediante un transporte activo para luego ser metabolizada intracelularmente (Flores & Herrero, 2005), en donde generalmente la enzima ureasa convierte a la urea en amoníaco y dióxido de carbono (Flores & Herrero, 2005; Perez-Garcia et al., 2011).



La formación amoníaco a partir de la urea hace que esta fuente de nitrógeno resulte tóxica para las microalgas. Al haber un paso de hidrólisis enzimática previo a la formación de amoníaco, la urea resulta tener un efecto inhibitorio menos marcado respecto al amonio, tolerándose así una mayor concentración de urea en el medio de cultivo (Converti et al., 2006).

Si bien en general las microalgas presentan un orden preferencial en la asimilación de las fuentes de nitrógeno según amonio > nitrito > nitrato > urea (Markou et al., 2014a), la urea presenta una influencia positiva en el crecimiento de *S. platensis* respecto al nitrato (Danesi et al., 2002).

Las microalgas por lo general tienen una capacidad limitada para producir reservas de nitrógeno (Hu, 2004). Ante una limitación de este nutriente, la característica más llamativa es la degradación específica de ficobiliproteínas (Collier & Grossman, 1992). Frente a esta condición, *S. platensis* en particular utiliza la c-ficocianina como fuente de nitrógeno, por lo que este pigmento es también considerado como una reserva (Allen & Smith, 1969; Boussiba & Richmond, 1980). Hasta que el contenido de nitrógeno no se encuentre por debajo de un valor umbral, la fotosíntesis continúa aunque a un ritmo menor, reduciéndose así la tasa de crecimiento. El carbono fijado en la fotosíntesis se desvía de la ruta destinada a la síntesis de proteínas hacia aquellas destinadas a la síntesis de lípidos y de carbohidratos (Hu, 2004). De este modo, ante una

limitación de nitrógeno se observa una disminución en el contenido de proteínas y un incremento en los contenidos de lípidos y de carbohidratos. En una etapa posterior, la falta de nitrógeno genera una pérdida de clorofilas y un incremento en el contenido de carotenoides (Hu, 2004; Peter et al., 2010).

2.4.2 Fósforo como nutriente

El fósforo es uno de los nutrientes principales y suele ser un factor de crecimiento limitante en el cultivo microalgal, dada su baja disponibilidad al precipitar fácilmente en presencia de otros iones. Su contenido en la biomasa algal es inferior al 1 % PS (Grobbelaar, 2004), siendo constituyente de diversas moléculas de importancia metabólica como los ácidos nucleicos (ADN y ARN), los fosfolípidos presentes en las membranas y el ATP (Geider & La Roche, 2002).

En el medio ambiente y en las aguas residuales se lo encuentra como ortofosfato, polifosfato, pirofosfato, metafosfato y sus correspondientes ésteres orgánicos, siendo poco frecuentes las formas reducidas del fósforo (Cembella et al., 1982).

Al igual que para el amonio, las especies en las cuales se encuentran los fosfatos depende del pH y de la temperatura (Markou & Georgakakis, 2011). Se producen reacciones de equilibrio entre especies y, según sea el caso, tienen la capacidad de formar soluciones buffer. En la Figura 9 se ilustra el efecto del pH entre las distintas especies del ortofosfato.

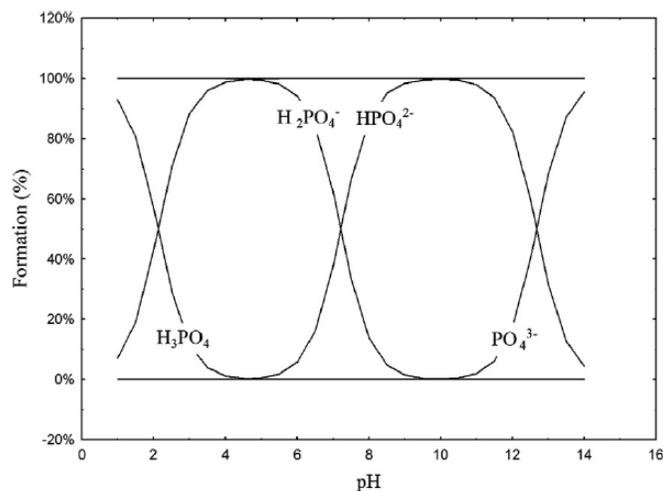


Figura 9– Efecto del pH en la concentración de las especies en equilibrio de ortofosfato. Fuente: (Markou & Georgakakis, 2011).

A diferencia del carbono y del nitrógeno, el fósforo proviene de rocas fósiles de fosfato (ortofosfato de calcio; apatita) que consiste en una reserva no renovable (Markou et al., 2014a), considerándose por lo tanto que esta reserva se agotará en el futuro (Elser, 2012). Existen diversos fertilizantes con fósforo que pueden ser utilizados para el cultivo de microalgas, como los fosfatos o superfosfatos de amonio, potasio o sodio. Todos ellos se producen a partir de las rocas fósiles de fosfato (Figura 10) (Markou et al., 2014a). El empleo de fertilizantes como fuente de nutrientes permitiría reducir el costo en el cultivo de las microalgas (Kumari et al., 2015; Raouf et al., 2006).

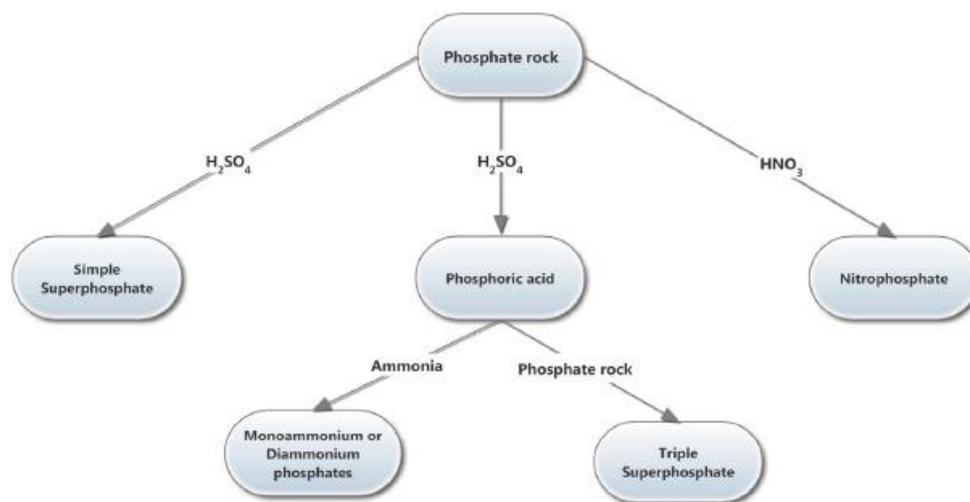


Figura 10– Producción de fertilizantes que aportan fósforo. Fuente: (Markou et al., 2014a).

El fosfato monocálcico compone los fertilizantes superfosfato. El superfosfato triple (TSP) se produce mediante el tratamiento de las rocas fósiles de fosfato con ácido ortofosfórico, resultando el fosfato monocálcico monohidratado como único producto. El superfosfato simple (SSP) se produce tratando estas rocas con ácido sulfúrico, resultando una mezcla de fosfato monocálcico y sulfato de calcio.

El fósforo inorgánico es incorporado por las células mediante un transporte activo (Markou et al, 2014a). Es utilizado en la forma de ortofosfato, siendo convertido previamente por un sistema enzimático de fosfatasas en el caso de encontrarse en otra forma inorgánica (Lin, 1977). La producción de estas enzimas puede verse estimulada frente a una limitación de fósforo (Dyhrman & Ruttenberg, 2006).

Las microalgas pueden acumular fósforo intracelular en forma de gránulos de polifosfato a modo de reserva, la que puede ser utilizada frente a un agotamiento de la fuente de fósforo en el medio de cultivo

(Markou et al, 2014a). *S. platensis* contiene aproximadamente 6 mg/g PS de fósforo intracelular (Figura 11), pudiendo variar entre 2 y 8 mg/g PS de acuerdo a la disponibilidad de esta fuente (Markou, 2012).

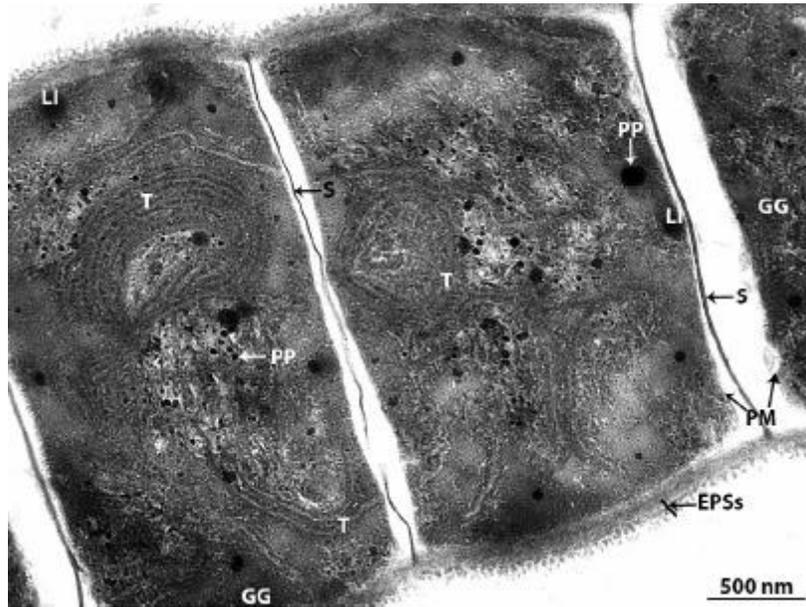


Figura 11– Imagen de *S. platensis* tomada con microscopía de transmisión electrónica, en la que se pueden apreciar los gránulos de polifosfato (PP). Fuente: (Deschoenmaeker et al., 2016).

Frente a una limitación de nutrientes, las microalgas tienden a variar su composición bioquímica, acumulando lípidos o carbohidratos, o variando su composición en proteínas y pigmentos (Hu, 2004). Por otra parte, la limitación de nutrientes afecta de modo variable al crecimiento microalgal, dependiendo de la especie y del nutriente limitante (Adams et al., 2013).

Las microalgas pueden regular el consumo de nutrientes de acuerdo a su disponibilidad en el entorno. Como estrategia pueden acumular grandes cantidades de éstos frente a una limitación en el entorno. No obstante, una limitación nutricional puede afectar a la velocidad de crecimiento (Markou et al., 2014a). Esta condición es denominada *luxury uptake*, en la que el crecimiento celular puede ser descrito por el modelo de Droop (Droop, 1968). Este modelo ha sido testado para distintas especies y frente a diversas fuentes de nutrientes (nitrógeno, fósforo, silicio, hierro) (Droop, 1983). La Ecuación 1 describe al modelo de Droop, en donde μ es la velocidad específica de crecimiento, μ_{max} es la velocidad de crecimiento específica máxima para las condiciones de cultivo, k_q es la concentración intracelular mínima del nutriente limitante (*quota* de

subsistencia) y Q es la concentración intracelular del nutriente limitante que posee la microalga (*quota*). La *quota* de subsistencia corresponde a la concentración celular por debajo de la cual no hay crecimiento.

$$\mu = \mu_{max} \cdot \left(1 - \frac{k_q}{Q}\right) \quad \text{Ecuación 1}$$

k_q es dependiente de la microalga y del nutriente limitante, mientras que Q depende de las condiciones de cultivo y de la concentración externa del nutriente en el medio. Cuando no hay una gran limitación nutricional (concentración externa del nutriente relativamente alta) el valor de Q es grande, lo que ocasiona que el valor de la μ se acerque al de la μ_{max} . A medida que aumenta la limitación (descenso de la concentración externa del nutriente), el valor de μ comienza a disminuir debido a que el valor de Q también disminuye. A una muy baja concentración externa del nutriente el valor de Q alcanza al de k_q , por lo que la μ pasa a valer cero y la microalga deja de crecer.

La variable Q_{max} se define como la concentración intracelular máxima del nutriente que la microalga puede acumular (*quota* máxima). Cuanto mayor es la relación k_q/Q_{max} , ya sea debido a que la *quota* de subsistencia (k_q) es alta y/o que la *quota* máxima (Q_{max}) es baja, la microalga tiene una mayor capacidad de adaptación frente a una deficiencia nutricional. Lo opuesto ocurre cuando el cociente k_q/Q_{max} es bajo (Grobbelaar, 2004). La Figura 12 ilustra lo anteriormente descrito.

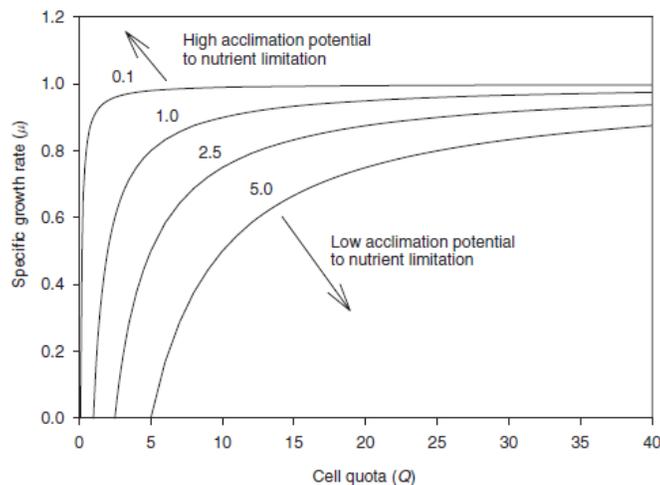


Figura 12– Velocidad específica de crecimiento (μ) versus *quota* (Q), según el modelo de Droop. Las curvas corresponden a distintos valores de *quota* de subsistencia (k_q). Se supone un valor de $\mu_{max} = 1$ a modo de ejemplo. Fuente: (Grobbelaar, 2004).

Ante una limitación de fósforo, las cianobacterias tienden a incrementar su composición en carbohidratos a la vez que disminuye su contenido de proteínas y de clorofila *a* (Healey, 1982). La falta de fósforo conlleva un menor contenido de ATP, que se traduce en una disminución de la tasa de crecimiento. Esto implica que el metabolismo fotosintético se reduce, disminuyendo así el contenido de clorofila *a* (Healey, 1982). Con la finalidad de incrementar las reservas energéticas y optimizar la baja disponibilidad de ATP, las cianobacterias tienden a incrementar su contenido en lípidos y en carbohidratos, a expensas de una disminución en la concentración de proteínas (Markou, 2012). Una limitación de fósforo disminuye levemente al contenido de ficobiliproteínas. Si bien se detiene su síntesis no son degradadas, por lo que la disminución en su contenido se debe a la división celular que continúa ocurriendo (Collier & Grossman, 1992). En diferentes microalgas se ha observado un incremento en el contenido de carotenoides frente una limitación de fósforo (Hu, 2004).

2.5. Fuentes alternativas de nitrógeno y fósforo

En el cultivo de microalgas, el costo de los nutrientes representa un 25% del costo total de producción, particularmente en fuentes de nitrógeno y de fósforo (Belay, 1997; Kumari et al., 2015; Mashor et al., 2015; Mashor et al., 2016). Esto motiva la búsqueda de fuentes alternativas de nutrientes que permitan optimizar el cultivo, disminuyendo el costo de producción y/o incrementando la productividad.

El cultivo heterotrófico y el mixotrófico presentan ciertas ventajas respecto al autotrófico, dado que permiten conseguir mayores tasas de crecimiento y concentraciones finales de biomasa más elevadas. No obstante, estos mecanismos de nutrición requieren el empleo de sustratos orgánicos que son más costosos e incrementan la probabilidad de contaminación con otros organismos heterótrofos (Markou et al., 2014a).

La producción a gran escala de los fertilizantes para uso agrícola permite que puedan ser adquiridos a bajo costo. Por este motivo resultan fuentes de nutrientes económicamente atractivas (Kumari et al., 2015; Raouf et al., 2006).

Las aguas residuales son una buena fuente de nutrientes específicos y su empleo permite reducir el costo de cultivo respecto al empleo de fertilizantes (Markou et al., 2014a). Las aguas de origen agroindustrial son particularmente ricas en nitrógeno y fósforo inorgánicos (Makou & Georgakakis, 2011). El cultivo microalgal usando aguas residual presenta la ventaja adicional de que a medida que la biomasa crece el agua residual es tratada (Makou & Georgakakis, 2011). La desventaja principal en el uso de estas aguas es la limitación de

aplicaciones de la biomasa producida, dado que se produciría una biomasa posiblemente contaminada con agentes tóxicos presentes en el agua residual (Markou et al., 2014a). Otra desventaja es la presencia habitual de sólidos en suspensión o de sustancias disueltas coloreadas, que generan un efecto negativo en el crecimiento debido a una menor penetración de la luz (Depraetere et al., 2013).

El reciclado de nutrientes es otra opción para disminuir el costo de cultivo (Markou et al., 2014a). Una forma de reciclar consiste en reutilizar el medio de cultivo luego de la cosecha de la biomasa. Las desventajas de esta opción son que en el medio de cultivo a reciclar podría presentar compuestos auto-inhibitorios secretados por la microalga y/o que podrían estar presentes bacterias indeseables que se hayan desarrollado (González-López et al., 2013). Estas condiciones podrían corregirse con un pre-tratamiento, pero con un consecuente incremento del costo. Otra forma de reciclar, consiste en aprovechar la mineralización de la biomasa que ocurre como consecuencia de la aplicación de diferentes tecnologías para la obtención de biocombustibles, como son la digestión anaeróbica o la licuefacción hidrotérmica de la biomasa (Markou et al., 2014a). De este modo, los nutrientes contenidos en la biomasa mineralizada pueden ser reutilizados.

3. Objetivos

Desde la perspectiva biotecnológica se podría optimizar la productividad de biomasa y de distintos productos de interés, conociendo la influencia que poseen las fuentes de fósforo y de nitrógeno en el crecimiento y en la composición microalgal. Se podrían disminuir los costos de producción minimizando la cantidad requerida de estos nutrientes o mediante el empleo de sustratos más económicos, a la vez que se mitiga el impacto ambiental en el caso del uso de aguas residuales. Por otra parte, para una misma microalga se podría orientar la producción al incremento de la biomasa o de distintos productos, variando la formulación del medio de cultivo en lo que respecta al fósforo y al nitrógeno.

El objetivo general del presente trabajo de tesis es determinar la influencia de la variación de las fuentes de fósforo y de nitrógeno sobre la productividad de biomasa y de distintos componentes de interés biotecnológico en la microalga *Arthrospira (Spirulina) platensis* LMPA55. A partir de este objetivo general se formulan los siguientes objetivos específicos:

- a) Evaluar el efecto de diferentes fuentes de fósforo a distintas concentraciones en el crecimiento y en la composición de la microalga.
- b) Evaluar el efecto de diferentes fuentes de nitrógeno a distintas concentraciones en el crecimiento y en la composición de la microalga.

4. Metodología

4.1. Cepa empleada

Todo los experimentos fueron realizados con la cepa *Spirulina (Arthrospira) platensis* LMPA55, la cual fue adquirida del cepario de microalgas del Laboratorio de Microalgas de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad de San Juan Bosco, sede Trelew (Chubut, Argentina).

El mencionado cepario de microalgas se encuentra adherido (por Resolución MinCyT N° 008/11) al Sistema Nacional de Datos Biológicos (creado por Resolución MinCyT N° 245/09), que funciona bajo la órbita de la Subsecretaría de Coordinación Institucional dependiente de la Secretaría de Articulación Científica Tecnológica del Ministerio de Ciencia Tecnología e Innovación Productiva de la República Argentina (Listado de centros adheridos, 2012).

4.2. Mantenimiento de la cepa

El mantenimiento de la cepa fue realizado mediante subcultivos sucesivos aplicando la técnica de transferencia seriada. Con esta metodología se produce un crecimiento progresivo de la microalga sin detención del metabolismo. Esta forma de conservación fue seleccionada por su sencillez, su bajo costo, el escaso requisito de equipamiento y por ser el aplicado en el cepario de origen para la microalga en estudio. El procedimiento consistió en el pasaje seriado quincenal de 1 mL de suspensión de la microalga (tomado con pipeta automática [Socorex, modelo Acura manual 825.1000]) en 50 mL de medio de cultivo fresco, contenido en un Erlenmeyer de 250 mL provisto de un tapón de algodón para evitar contaminaciones del ambiente pero permitir el intercambio de gases con el mismo. Esta transferencia se realizó en un flujo laminar (Microfilter, modelo FHP1e), cuya superficie de trabajo fue previamente sanitizada por exposición a la luz UV durante 20 minutos y posterior limpieza con una solución de etanol 70°. Todos los materiales empleados (Erlenmeyers con tapón, pipeta automática, puntas para pipeta automática, medio de cultivo) fueron esterilizados en autoclave (Autoclave tipo Chamberland, VZ, modelo 100) a 121°C durante 20 minutos.

Estos cultivos stock fueron mantenidos a $26 \pm 2^\circ\text{C}$ en una incubadora frío/calor (Ingelab, modelo I-291P), provista de dos lámparas fluorescentes compactas de 4100 K de tonalidad (OSRAM, DULUX L 36w/21-840) que proporcionaban al cultivo una intensidad lumínica de $34 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, equivalente 2,8 klux (McCree, 1981).

El fotoperiodo fue de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, el que se logró mediante el empleo de un temporizador analógico (Diletta) al que se conectaron las lámparas.

Los pasajes seriados fueron realizados por duplicado. Luego del repique, los cultivos de origen eran mantenidos (se mantenían tres generaciones) de modo de evitar una potencial pérdida de la cepa por eventuales contaminaciones.

4.3. Medio de cultivo

El medio de cultivo aporta los nutrientes (macronutrientes y micronutrientes) necesarios para los distintos procesos anabólicos y catabólicos. El medio de cultivo utilizado, tanto para el mantenimiento de la cepa como para la realización de los ensayos, corresponde a la formulación de Zarrouk (Zarrouk, 1966). Este medio de cultivo se elaboró a partir de la mezcla de dos soluciones (A y B). Según la masa, las drogas (de pureza grado analítico) fueron pesadas en una balanza granataria (Ohaus, modelo Navigator XL) o en una balanza analítica (Shimadzu, modelo AUX120). Las drogas que según la formulación corresponden a una concentración mayor a 1 g/L fueron adicionadas a la solución A o B por pesada directa, es decir que luego de la pesada, la droga fue previamente disuelta en un pequeño volumen de agua destilada, el que fue incorporado a la solución en su totalidad. Las drogas que según la formulación corresponden a una concentración menor 1 g/L fueron previamente disueltas en un volumen definido de agua destilada (generando así una solución concentrada), para ser luego adicionado a la solución A o B un volumen definido de esta solución concentrada de la droga. La incorporación de cada una de estas drogas fue realizando en un matraz en el cual fueron mezcladas y llevado finalmente a volumen con agua destilada. Las soluciones (A y B) así preparadas fueron esterilizadas en autoclave (Autoclave tipo Chamberland, VZ, modelo 100) a 121°C durante 20 minutos. Las soluciones ya estériles fueron conservadas en oscuridad y a temperatura ambiente. El medio Zarrouk se preparó al momento del uso, mezclando cantidades iguales de las soluciones A y B según el volumen final de medio de cultivo necesario. El pH de cada preparación fue controlado mediante pHmetro (Adwa, modelo AD 1030), lográndose valores de 8,5 a 9,0 en todos los casos. En la Tabla 2 se detalla la composición de cada una de las soluciones A y B. En la Tabla 3 se describe la composición final del medio de cultivo Zarrouk.

Tabla 2– Composición de las solución A y B para la preparación del medio de cultivo Zarrouk.

Solución A		
Componente	Concentración [g/L]	Observaciones
NaHCO ₃	33,6	
K ₂ HPO ₄	1,0	(fuente de fósforo)
Solución B		
Componente	Concentración [g/L]	Observaciones
K ₂ SO ₄	2,0	
NaCl	2,0	
NaNO ₃	5,0	(fuente de nitrógeno)
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,40	equivale a 20 mL de una solución concentrada de 2,0 g/100mL
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,08	equivale a 2,0 mL de una solución concentrada de 4,0 g/100mL
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,02	
EDTANa ₂ ·2H ₂ O	0,16	equivale a 2,0 mL de una solución concentrada mezcla de FeSO ₄ ·7H ₂ O 1,0 g/100mL y EDTANa ₂ ·2H ₂ O 8,0 g/100 mL
H ₃ BO ₃	5,8×10 ⁻³	equivale a 2,0 mL de una solución concentrada de 0,29 g/100mL
MnCl ₂ ·4H ₂ O	3,6×10 ⁻³	equivale a 1,0 mL de una solución concentrada de 0,36 g/100mL
ZnSO ₄	2,4×10 ⁻⁴	equivale a 0,2 mL de una solución concentrada de 0,12 g/100mL
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	4,2×10 ⁻⁵	equivale a 0,2 mL de una solución concentrada de 0,021 g/100mL
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1,6×10 ⁻⁴	equivale a 0,8 mL de una solución concentrada de 0,020 g/100mL

Tabla 3– Composición final del medio de cultivo Zarrouk.

Componente	Concentración [g/L]	Concentración [mM]
NaHCO ₃	16,8	200
K ₂ HPO ₄	0,5	2,9
K ₂ SO ₄	1,0	5,7
NaCl	1,0	17,1
NaNO ₃	2,5	29,4
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,20	0,81
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,04	0,27
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01	3,6×10 ⁻²
EDTANa ₂ ·2H ₂ O	0,08	0,21
H ₃ BO ₃	2,9×10 ⁻³	4,6×10 ⁻²
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1,8×10 ⁻³	9,1×10 ⁻³
ZnSO ₄	1,2×10 ⁻⁴	7,7×10 ⁻⁴
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	2,1×10 ⁻⁵	8,6×10 ⁻⁵
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,8×10 ⁻⁵	3,2×10 ⁻⁴

4.4. Condiciones estándar de cultivo

Los diferentes ensayos requieren condiciones reguladas de temperatura, iluminación, fotoperiodo y agitación. Estas condiciones debieron ser mantenidas y controladas durante el tiempo de incubación que se necesitó para el experimento, que aproximadamente fueron unos 20 días. Los ensayos también requerían un espacio suficiente para que todas las variantes se puedan ensayar simultáneamente, de modo que reciban exactamente las mismas condiciones de cultivo.

Los ensayos se realizaron en una cámara de cultivo, que consiste en un espacio cerrado, aislado y reducido, lo que resulta adecuado para conservar la higiene y mantener la temperatura en un rango adecuado. La cámara se encuentra provista de un equipo acondicionador de aire (Electra, modelo Geo Plus Smart Ready 3400W F/C) con opción de frío o calor, que permite fijar la temperatura de incubación en el valor deseado. Dispone también de extractor de aire (Martin & Martin, modelo EAP 30), con opción de marcha reversa, que genera convección dentro de la cámara. El controlador que posee el acondicionador de aire, la convección que genera el extractor, las pequeñas dimensiones de la cámara y su aislamiento, permitieron que la temperatura fijada oscilara en un rango de $\pm 2^{\circ}\text{C}$. La cámara posee un registrador tiempo-temperatura (KI&BNT, modelo RC-1+) que permite monitorear la variación de la temperatura durante una hora a lo largo

de todo el experimento, y posee también un indicador de temperatura-humedad (Digital Thermo) para observar ambos valores en el momento.

Dentro de la cámara de cultivo existe una plataforma de trabajo (Figura 13), que consiste en seis superficies de 2700 cm² cada una (útil para 27 Erlenmeyers de 250 mL). Cada superficie se encuentra provista de cuatro lámparas fluorescentes tipo tubo de 6500 K de tonalidad (OSRAM, modelo L18-765), pudiendo cada lámpara ser accionada individualmente para lograr distintas intensidades lumínicas.

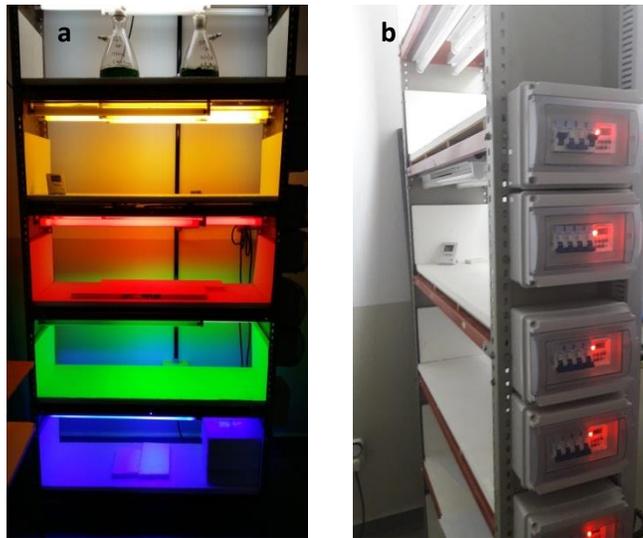


Figura 13– Plataforma de trabajo: a) superficies expuestas a lámparas de diferentes colores para un ensayo de estudio del efecto de la longitud en el crecimiento microalgal; b) paneles para accionamiento de lámparas y programación del fotoperiodo.

Se fijaron las condiciones de cultivo (temperatura, intensidad de luz y fotoperiodo) descritas en 4.11 mediante la programación de los distintos equipos que conforman la cámara de cultivo y la plataforma de trabajo. Luego de la estabilización de estas condiciones, los Erlenmeyers empleados en los experimentos se ubicaron sobre las superficies de la plataforma de trabajo. Las condiciones de cultivo (temperatura y humedad) fueron monitoreadas a lo largo de cada uno de los ensayos.

4.5. Determinación de la biomasa

Para poder calcular los diferentes parámetros de crecimiento celular, es necesario disponer de una metodología que permita cuantificar periódicamente la biomasa existente. El método más comúnmente empleado para la cuantificación rápida y directa de *S. platensis*, es la medición de la densidad óptica (DO) por espectrofotometría. Este dato de DO posteriormente fue transformado en un valor de peso seco (PS) de biomasa microalgal expresado en g/L. Para ello fue necesaria la construcción de una curva de calibración que correlacionara ambas variables. Las ventajas de esta metodología son la rapidez con la que se obtiene el resultado, el empleo de una pequeña cantidad de muestra y su uso extendido para *Spirulina*.

A partir de un barrido espectral de una suspensión de *S. platensis* (Figura 14) y teniendo en cuenta lo recomendado por Griffiths et al. (2011) en cuanto a evitar la influencia de los pigmentos en la medición, se consideró que la mejor longitud de onda para la medición de la DO era 560 nm.

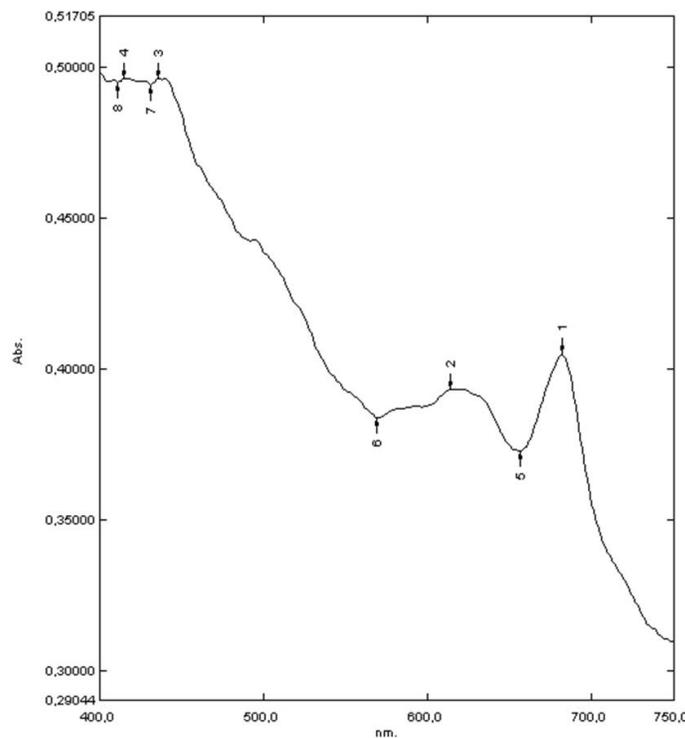


Figura 14– Barrido espectral de una suspensión de *S. platensis*.

Para construir la curva de correlación DO vs. PS se partió de un cultivo de 15 días de *S. platensis* en medio de cultivo Zarrouk. A partir del mismo se realizaron distintas diluciones con solución fisiológica de modo de

obtener valores de absorbancia aproximados de 0,2; 0,4; 0,8 y 1,2. Las diluciones se realizaron empleando pipetas y llevando a volumen en matraz de 500 mL. Para cada dilución se midió la absorbancia con espectrofotómetro (Shimadzu, modelo UV-1700). Una vez realizadas estas mediciones se filtraron con vacío (bomba de vacío Arcano, modelo XZ-1B; papel de filtro Quanta, modelo JP41) 100 mL de cada una de las diluciones por triplicado. Los residuos fueron lavados con 3 alícuotas de 75 mL agua destilada cada una y luego secados en estufa (ORL) a 90°C hasta peso constante (balanza analítica Shimadzu, modelo AUX120). Luego de verificar la validez estadística de los valores obtenidos para las réplicas mediante un test de Grubbs, se obtuvo la correlación entre la biomasa (expresada como g PS/L) de *S. platensis* y la DO medida a 560 nm (Figura 15).

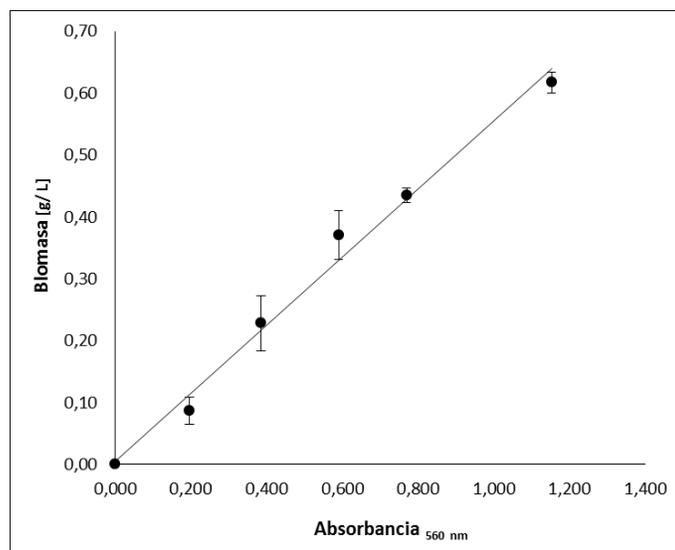


Figura 15– Curva de correlación entre biomasa de *S. platensis*. [mg/mL] y DO.

Se observó una correlación lineal entre los datos, con un coeficiente de determinación R^2 de 0,9886. Se realizó el ajuste lineal de los datos por el método de cuadrados mínimos, hallándose la correlación descrita en la Ecuación 2.

$$Biomasa (g PS/L) = 0,5504 \cdot abs_{560 nm} + 0,0056 \quad \text{Ecuación 2}$$

4.6. Estimación de parámetros cinéticos de crecimiento

A partir del conocimiento de la cinética de un organismo se pueden realizar estimaciones de interés económico como lo es la productividad celular y de productos de interés, la cantidad de sustratos a suministrar, y la manera en que diferentes sustancias y condiciones de cultivo influyen sobre la misma. Los parámetros comúnmente utilizados para caracterizar la cinética de crecimiento son: la velocidad específica de crecimiento (μ), el tiempo de duplicación (T_d) y el índice de crecimiento (IC). Otro parámetro de interés económico es la concentración de biomasa final, que precisamente indica la concentración de biomasa alcanzada al finalizar el cultivo.

μ mide la capacidad de generación de biomasa que tiene la unidad de biomasa, es decir, la biomasa que es capaz de generar cada unidad de biomasa por unidad de tiempo. El valor de μ varía a lo largo del crecimiento, siendo máximo en la fase exponencial. T_d mide el tiempo que tarda una población celular en duplicar su número durante el crecimiento exponencial. Como T_d se calcula a partir de μ , en sentido riguroso mide el tiempo que tarda la biomasa en duplicar su masa. IC expresa la cantidad de veces que la biomasa inicial (inóculo) se ha duplicado a lo largo de un período de cultivo.

Para el cálculo de los parámetros cinéticos fue necesario conocer la concentración de la biomasa a lo largo de su crecimiento. La determinación de biomasa se realizó según 4.5.

Para todos los ensayos se tomaron muestras cada 1 ó 2 días, sobre las cuales se determinó la concentración de la biomasa. Se graficó el logaritmo natural de la concentración de biomasa vs el tiempo. Teniendo en cuenta el crecimiento celular típico de un sistema batch (Figura 16), se identificó a la parte lineal de la curva como la fase exponencial. La linealidad fue confirmada mediante el cálculo de coeficiente de determinación R^2 para los puntos seleccionados. El valor de μ corresponde a la pendiente de la fase exponencial y su unidad es $día^{-1}$.



Figura 16– Curva típica de crecimiento celular en sistema batch.
 Fuente: Carrol K., Morse S., Mietzner T., Miller S. *Microbiología Médica*, 27e: www.accesmedicina.com

El Td se calculó a partir de μ según la Ecuación 3. Su unidad es *día*.

$$Td = \frac{\ln 2}{\mu} \quad \text{Ecuación 3}$$

El IC se calculó según la Ecuación 4. Es un parámetro adimensional.

$$IC = \frac{\text{concentración de biomasa final} - \text{concentración de biomasa inicial}}{\text{concentración de biomasa inicial}} \quad \text{Ecuación 4}$$

La biomasa final corresponde a la concentración de biomasa hallada el último día de cultivo, medida según 4.5. El valor de biomasa final, también fue necesario para los cálculos de composición bioquímica descriptos a continuación.

4.7. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó según el método de Lowry (Lowry et al., 1951), empleando seroalbúmina bovina (BSA) como patrón. El método consta de dos etapas (Figura 17). En la primer etapa, el ion Cu^{2+} forma un compuesto de coordinación coloreado con las proteínas en un medio alcalino, en el que

los átomos donadores son los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos. Esta primera reacción conlleva una desnaturalización proteica en la que quedan expuestos los grupos fenólicos de los residuos de tirosina y triptófano. Estos residuos están presentes en la mayoría de las proteínas. El ion Cu^{2+} y el hidróxido de sodio, necesario para proporcionar el medio alcalino, forman parte del reactivo de Lowry junto al tartrato de sodio y potasio, cuya función es la de evitar la precipitación del cobre. En la segunda etapa, los grupos fenólicos expuestos reducen el ácido fosfomolibdotúngstico amarillo (principal componente del reactivo de Folin-Ciocalteu), formándose un compuesto reducido de color azul (Figura 18).

La intensidad del color es proporcional a la concentración de proteínas, y a la cantidad de residuos de tirosina y triptófano presentes en las proteínas. La composición aminoacídica en tirosina y triptófano de la BSA es similar a la de *S. platensis*. BSA contiene 5,0 g/100g de tirosina y 0,6 g/100 de triptófano (Stein & Moore, 1949), mientras que *S. platensis* presenta en promedio 5,4 g/100g de tirosina y 0,4 g/100 de triptófano (Volkman et al., 2008). Al presentar similar composición en ambos aminoácidos, la intensidad de color se deberá principalmente a la concentración de proteínas.

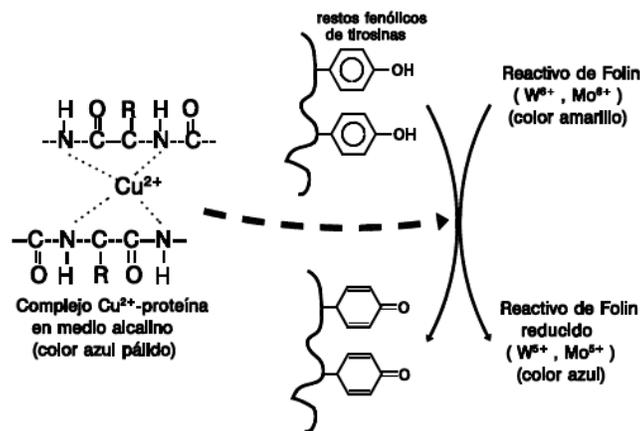


Figura 17– Esquema de la reacción de Lowry.

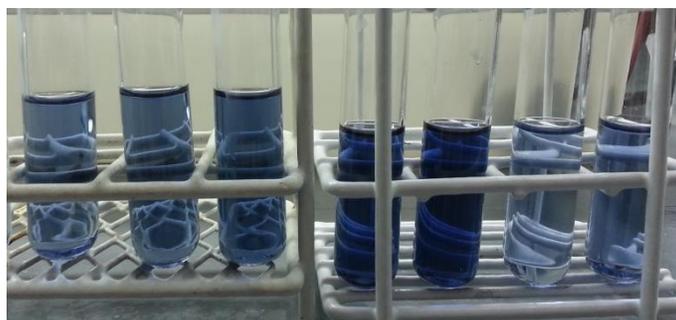


Figura 18– Coloración azul obtenida en la cuantificación de proteínas por el método de Lowry.

El reactivo de Lowry se formó a partir de la mezcla de tres soluciones: carbonato de sodio 2 % en NaOH 0,1 M (A), sulfato cúprico 1 % (B); tartrato de sodio y potasio 2 % (C). En el momento de uso se mezclaron en la siguiente proporción: 50 ml de la solución A; 0,5 ml de la solución B y 0,5 ml de la solución C. El reactivo de Folin-Ciocalteu comercial fue diluido a la mitad con agua destilada al momento de su uso. El volumen preparado de ambos reactivos dependió de la cantidad utilizada en cada grupo de mediciones.

La medición comenzó con la preparación de un concentrado celular (pellet) de cada cultivo. Para ello se tomaron 3 mL del cultivo (micropipeta Socorex, modelo Acura manual 825.1000) y se centrifugaron a 15000 rpm durante 5 minutos (microcentrífuga Dragon Lab, modelo D2012). Para el lavado del pellet se retiró el sobrenadante, se adicionó 3 mL de agua destilada y se resuspendió con agitador (Velp Scientifica, modelo CLASSIC Vortex). Se centrifugó nuevamente a 15000 rpm durante 5 minutos.

Al pellet se le adicionó NaOH 1M hasta un volumen final de 2 mL. Se procedió a la lisis celular calentando en baño termostático (Viking, modelo Masson) a una temperatura entre 95 y 100°C durante 1 hora. Una vez fría, la suspensión se centrifugó a 15000 rpm durante 15 minutos.

Se tomaron 0,3 mL del sobrenadante resultante de la lisis celular y se le adicionaron 0,7 mL de agua destilada (volumen final de 1 mL).

Por otro lado se preparó una curva de calibración, preparando diluciones de una solución patrón de BSA 1 mg/mL con agua destilada. La preparación de la curva se describe en la **¡Error! La autoreferencia al marcador no es válida..**

Tabla 4– Preparación de la curva de calibración de BSA para la cuantificación de proteínas según el método de Lowry.

Punto de la curva	Blanco	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Patrón BSA [mL]	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,6	0,8
Agua destilada [mL]	1,0	0,9	0,8	0,7	0,6	0,4	0,2
Concentración de BSA lograda [mg/mL]	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,6	0,8

Tanto a las muestras como a los tubos de la curva de calibración se le adicionaron 5 mL del reactivo de Lowry y se dejaron reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se agregó luego 0,5 mL del reactivo diluido de Folin-Ciocalteu y se dejó reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia a 750 nm con cubeta de 10 mm de paso óptico. Se empleó un espectrofotómetro (Shimadzu, modelo UV-1700) de doble haz, usando agua destilada como referencia. En la Tabla 5 se resume el procedimiento descripto.

Tabla 5– Procedimiento de cuantificación de proteínas según Lowry. “T” corresponde a puntos de la curva de calibración. “M” representa a las muestras de cultivo.

Punto de la curva / Muestra	Blanco	T1	T2	T3	T4	T5	T6	M1	M2
Volumen de T/M [mL]	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Reactivo de Lowry [mL]	5	5	5	5	5	5	5	5	5
<i>Reposo durante 15 minutos a temperatura ambiente</i>									
Reactivo de Folin-Ciocalteu [mL]	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
<i>Reposo durante 30 minutos a temperatura ambiente</i>									
<i>Lectura a 750 nm</i>									

Se determinó la curva de calibración de absorbancia vs proteínas [mg/ml] (concentración de BSA de cada dilución) mediante un ajuste lineal de los datos por el método de cuadrados mínimos. El contenido de proteínas de cada una de las muestras se determinó por interpolación de la absorbancia medida sobre la curva de calibración.

El contenido de proteínas de cada cultivo se calculó en % PS (gramos de proteínas por cada 100 gramos de peso de seco de biomasa). Para ello fue necesario referir el contenido de proteínas obtenido de la interpolación respecto a la concentración de biomasa (en PS) de la cual se partió (ver biomasa final en 4.6), teniendo en cuenta la dilución realizada antes de la reacción.

4.8. Cuantificación de lípidos

La cuantificación de lípidos se realizó según el método de la sulfo-fosfo-vainillina (SPV). La medición se realizó en forma directa sobre la suspensión microalgal, según el procedimiento descrito por Mishra et al. (2014). Se usó aceite de canola como patrón, al igual que en el procedimiento citado. El método consta de dos etapas (Figura 19). En la primera etapa, el ácido sulfúrico concentrado reacciona con los lípidos insaturados formando iones carbonio altamente reactivos. El reactivo SPV consiste en la mezcla de vainillina y ácido fosfórico concentrado, en la que se forma un fosfoéster que al estabilizarse por resonancia incrementa la reactividad del grupo carbonilo de la vainillina. En la segunda etapa, los iones carbonio reaccionan con el grupo carbonilo de la SPV formando un compuesto de color rosado (Figura 20).

El aceite de canola presenta un índice de yodo cercano a 105 g/100g (Albuquerque et al., 2009) mientras que *S. platensis* posee un valor cercano a 80 g/100g (Sarpal et al., 2016). Esto permitiría suponer que el empleo del aceite de canola como patrón, subdimensionaría el contenido lipídico de *S. platensis* al presentar una menor cantidad de insaturaciones por unidad de masa respecto al aceite. No obstante, se ha demostrado que esto no es así debido a que se forma un solo ion carbonio por molécula independientemente de la cantidad de insaturaciones y debido a que existe impedimento estérico en la reacción de SPV con múltiples sitios en una misma molécula (Knight et al., 1972). Por lo mencionado, la intensidad de color se deberá principalmente a la concentración de lípidos, guardando una relación de proporcionalidad.

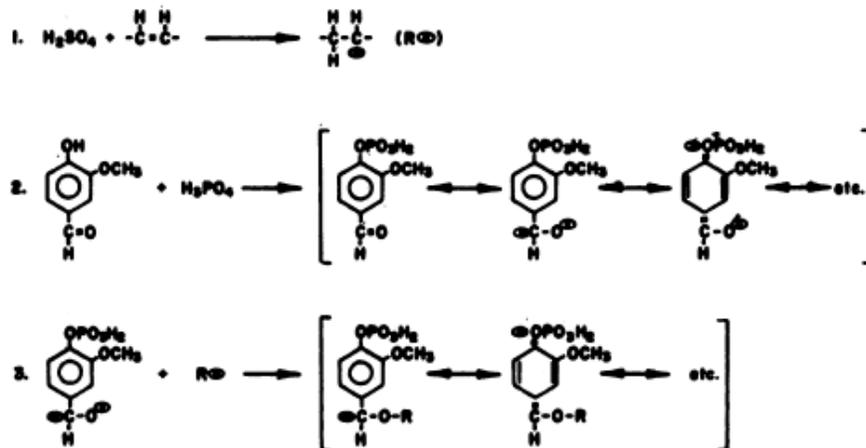


Figura 19– Reacciones ocurridas en la cuantificación de lípidos por el método de la SPV. 1) reacción del ácido sulfúrico con un enlace insaturado; 2) reacción de la vainillina con el ácido ortofosfórico; 3) reacción del producto formado en 1) con el formado en 2).

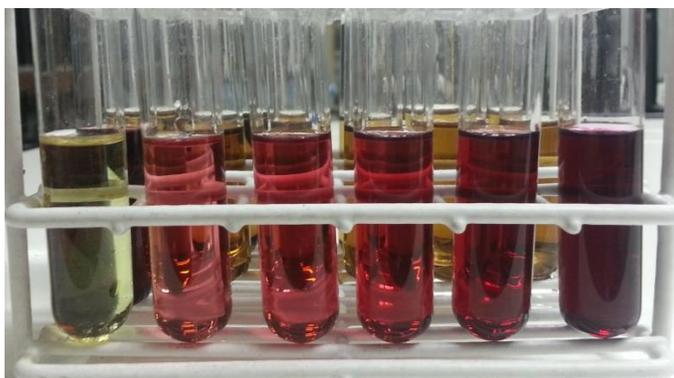


Figura 20– Coloración rosa obtenida en la cuantificación de lípidos por el método de la SPV.

La SPV se formó a partir de la mezcla de tres componentes: una solución de 6 g de vainillina en 100 mL de etanol absoluto (A); agua destilada (B); ácido ortofosfórico concentrado (85%) (C). En el momento de uso se mezclaron en la siguiente proporción: 5 ml de la solución A; 4,5 ml de B y 200 ml de C. El volumen preparado dependió de la cantidad utilizada en cada grupo de mediciones.

Se centrifugó 1 ml de suspensión de microalga durante 15 minutos a 15000 rpm (microcentrífuga Dragon Lab, modelo D2012). Se retiraron 0,85 ml del sobrenadante con micropipeta (Socorex, modelo Acura manual 825.1000), quedando un concentrado celular en un volumen de 0,15 mL.

Por otro lado se preparó una curva de calibración a partir de un patrón que contenía 20 mg de aceite de canola virgen (Krol) disueltos en 50 mL de cloroformo. Se midieron diferentes volúmenes de la solución patrón, a los que luego se evaporó el solvente empleando una bañó termostático (Viking, modelo Masson) a 100°C. Una vez finalizada la evaporación, se adicionó 0,15 mL de agua destilada a cada tubo que corresponde a la curva. Los volúmenes medidos del patrón y la masa de aceite depositada se describen en la Tabla 6.

Tabla 6– Preparación de la curva de calibración de aceite de canola para la cuantificación de lípidos según el método de la PSV.

Punto de la curva	Blanco	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Patrón canola [mL]	0	0,05	0,10	0,20	0,40	0,80	1,0
Masa de canola luego de evaporar [mg]	0	0,13	0,25	0,50	1,0	2,0	2,5

Tanto a las muestras como a los tubos de la curva de calibración se le adicionaron 2 ml de ácido sulfúrico concentrado (98%). La mezcla se calentó en baño termostático a una temperatura de 100°C durante 10 minutos. Una vez finalizado el calentamiento se enfrió rápidamente en baño de hielo durando 5 minutos. Se agregaron luego 5 mL de SPV y se incubó durante 15 minutos a 37°C en estufa (ORL). Se midió la absorbancia a 530 nm con cubeta de 10 mm de paso óptico. Se empleó un espectrofotómetro (Shimadzu, modelo UV-1700) de doble haz, usando agua destilada como referencia. En la Tabla 7 se resume el procedimiento descripto.

Tabla 7– Procedimiento de cuantificación de lípidos según el método de la PSV. “T” corresponde a puntos de la curva de calibración. “M” representa a las muestras de cultivo.

Punto de la curva / Muestra	Blanco	T1	T2	T3	T4	T5	T6	M1	M2
Volumen de T/M [mL]	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
Ácido sulfúrico concentrado[mL]	2	2	2	2	2	2	2	2	2
<i>Digestión durante 10 minutos a 100°C</i>									
<i>Enfriamiento en baño de hielo durante 5 minutos</i>									
Reactivo SPV[mL]	5	5	5	5	5	5	5	5	5
<i>Incubación durante 15 minutos a 37°C</i>									
<i>Lectura a 530 nm</i>									

Se determinó la curva de calibración de absorbancia vs lípidos [mg/ml] (masa de canola de cada punto) mediante un ajuste lineal de los datos por el método de cuadrados mínimos. El contenido de lípidos de cada una de las muestras se determinó por interpolación de la absorbancia medida sobre la curva de calibración.

El contenido de lípidos de cada cultivo se calculó en % PS (gramos de lípidos por cada 100 gramos de peso de seco de biomasa). Para ello fue necesario referir el contenido de lípidos obtenido de la interpolación respecto a la concentración de biomasa (en PS) de la cual se partió (ver biomasa final en 4.6).

4.9. Cuantificación de carbohidratos

La cuantificación de carbohidratos se realizó según el método de Dubois (Dubois et al., 1956), empleando glucosa como patrón. El método consta de dos reacciones (Figura 21). En una de las reacciones, el ácido sulfúrico concentrado produce la hidrólisis de los carbohidratos en monosacáridos, con posterior deshidratación y formación de furfural a partir de las pentosas e hidroximetilfurfural a partir de las hexosas.

En la siguiente reacción, estos furanos condensan con el fenol formando compuestos de coloración marrón (Figura 22). La intensidad del color es proporcional a la concentración de carbohidratos.

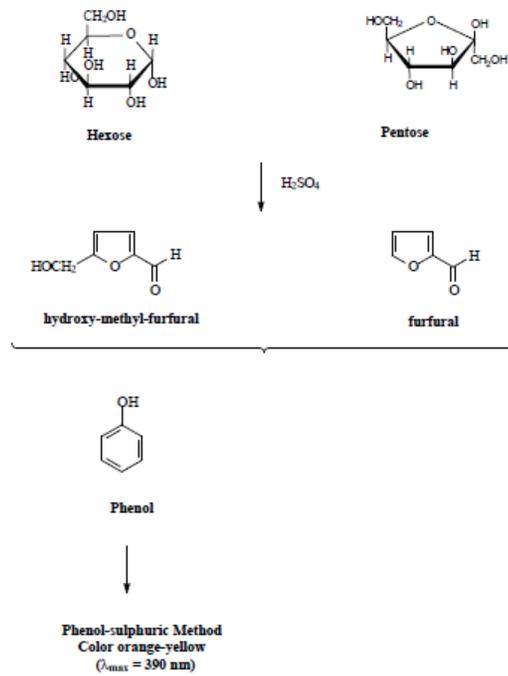


Figura 21– Esquema de la reacción de Dubois.



Figura 22– Coloración marrón obtenida en la cuantificación de carbohidratos por el método de Dubois.

La medición comenzó con la preparación de un pellet de cada cultivo. Para ello se tomaron 3 mL del cultivo (micropipeta Socorex, modelo Acura manual 825.1000) y se centrifugaron a 15000 rpm durante 5 minutos (microcentrífuga Dragon Lab, modelo D2012). Para el lavado del pellet se retiró el sobrenadante, se adicionó 3 mL de agua destilada y se resuspendió con agitador (Velp Scientifica, modelo CLASSIC Vortex). Se centrifugó nuevamente a 15000 rpm durante 5 minutos.

Al pellet se le adicionó NaOH 1M hasta un volumen final de 2 mL y se agitó enérgicamente. La suspensión se centrifugó a 15000 rpm durante 15 minutos. Finalmente, se reservó 1 mL del sobrenadante para comenzar con la reacción.

Por otro lado se preparó una curva de calibración, preparando diluciones de una solución patrón de glucosa 1 mg/mL con NaOH 1M. La preparación de la curva se describe en la Tabla 8.

Tabla 8– Preparación de la curva de calibración de glucosa para la cuantificación de carbohidratos según el método de Dubois.

Punto de la curva	Blanco	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Patrón glucosa [mL]	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
Diluyente NaOH 1M[mL]	1,0	0,9	0,8	0,6	0,4	0,2	0
<i>Concentración de glucosa lograda [mg/mL]</i>	<i>0</i>	<i>0,1</i>	<i>0,2</i>	<i>0,4</i>	<i>0,6</i>	<i>0,8</i>	<i>1,0</i>

Tanto a las muestras como a los tubos de la curva de calibración se le adicionaron 1 mL de una solución acuosa de fenol 80 % y se agitó enérgicamente empleando agitador. Se agregaron 5 mL de ácido sulfúrico concentrado (98%). Para generar un incremento brusco de temperatura, se adicionó de modo de que impacte sobre la superficie. Se homogeneizó con agitador, se dejó reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente, seguidos de otros 10 minutos en incubadora a 25°C (Ingelab, modelo I-291P). Se midió la absorbancia a 490 nm con cubeta de 10 mm de paso óptico. Se empleó un espectrofotómetro (Shimadzu, modelo UV-1700) de doble haz, usando agua destilada como referencia. En la Tabla 9 se resume el procedimiento descripto.

Tabla 9- Procedimiento de cuantificación de carbohidratos según Dubois. “T” corresponde a puntos de la curva de calibración. “M” representa a las muestras de cultivo.

Punto de la curva / Muestra	Blanco	T1	T2	T3	T4	T5	T6	M1	M2
Volumen de T/M [mL]	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Reactivo de fenol 80 %[mL]	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Agitación enérgica</i>									
Ácido sulfúrico concentrado[mL]	5	5	5	5	5	5	5	5	5
<i>Reposo durante 10 minutos a temperatura ambiente</i>									
<i>Incubación durante 10 minutos a 25°C</i>									
<i>Lectura a 490 nm</i>									

Se determinó la curva de calibración de absorbancia vs carbohidratos [mg/ml] (concentración de glucosa de cada dilución) mediante un ajuste lineal de los datos por el método de cuadrados mínimos. El contenido de carbohidratos de cada una de las muestras se determinó por interpolación de la absorbancia medida sobre la curva de calibración.

El contenido de carbohidratos de cada cultivo se calculó en % PS (gramos de carbohidratos por cada 100 gramos de peso de seco de biomasa). Para ello fue necesario referir el contenido de carbohidratos obtenido de la interpolación respecto a la concentración de biomasa (en PS) de la cual se partió (ver biomasa final en 4.6).

4.10. Cuantificación de pigmentos

La única clorofila que posee *S. platensis* es la clorofila *a* (Cohen, 1997). Los carotenoides presentes son β -caroteno, zeaxantina, mixoxantofila, equinenona, 3-hidroxi equinenona, β -criptoxantina, cantaxantina, diatoxantina, oscilaxantina, β -caroteno-5,6-epóxido y otros no identificados (Cohen, 1997). Las únicas ficobiliproteínas que la componen son la c-ficocianina y la aloficocianina (Brejč et al., 1995; Cohen, 1997), representando la primera un 20% del total del total del contenido proteico (Cohen, 1997).

Los métodos para la cuantificación de pigmentos presentan tres pasos. En el primero se realiza la extracción de los pigmentos con solventes adecuados, a la vez que se promueve la ruptura celular. En el segundo paso se clarifica el extracto, separando los productos de la lisis celular que podrían interferir en la medición. El

último paso consiste en barrido espectral del extracto. A partir de los valores de absorbancia a determinadas longitudes de onda, se calcula la concentración de pigmentos mediante el empleo de correlaciones empíricas.

En todos los casos se comenzó con la preparación de un pellet de cada cultivo. Para ello se tomaron 3 mL del cultivo (micropipeta Socorex, modelo Acura manual 825.1000) y se centrifugaron a 15000 rpm durante 5 minutos (microcentrífuga Dragon Lab, modelo D2012). Para el lavado del pellet se retiró el sobrenadante, se adicionó 3 mL de agua destilada y se resuspendió con agitador (Velp Scientifica, modelo CLASSIC Vortex). Se centrifugó nuevamente a 15000 rpm durante 5 minutos.

4.10.1. Clorofila y carotenoides

La cuantificación de clorofila *a* y carotenoides se realizó según el método descrito por Wegmann & Metzner (1971). Al pellet lavado se le adicionó 3 mL de acetona 90% como solvente de extracción. Para promover la ruptura celular las suspensiones fueron sonicadas durante 3 minutos (sonicador Qsonica, modelo Q55) a una frecuencia de 20 kHz y una amplitud de onda de 60 μm . El sonicado se realizó en baño de hielo para contrarrestar el incremento de la temperatura. Las suspensiones se almacenaron en oscuridad a 4°C durante 24 horas con la finalidad de maximizar la extracción y minimizar la evaporación del solvente. Las suspensiones fueron luego centrifugadas durante 5 minutos a 10000 rpm. Al sobrenadante (Figura 23) se le realizó un barrido espectral de 400 a 700 nm empleando cubeta de 10 mm. Se empleó un espectrofotómetro (Shimadzu, modelo UV-1700) de doble haz, usando acetona 90% como referencia.

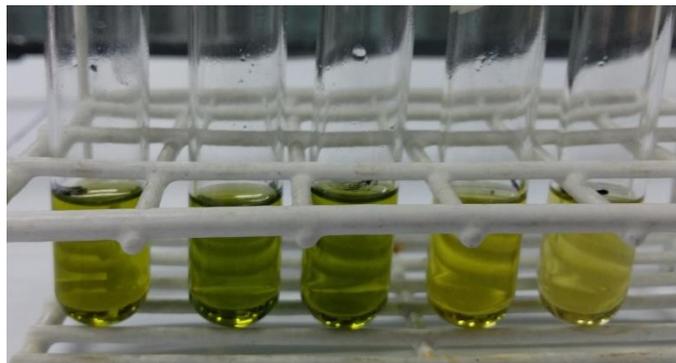


Figura 23– Extracto clarificado para la cuantificación de clorofila *a* y carotenoides según el método de Wegman & Metzner.

Con los valores de absorbancia a las longitudes de onda 453; 644 y 663 nm se calculó la concentración de clorofila *a* mediante la Ecuación 5 y la concentración de carotenoides mediante la Ecuación 6.

$$\text{Clorofila } a \text{ (}\mu\text{g/ml)} = 10,3 \cdot \text{abs}_{663 \text{ nm}} - 0,918 \cdot \text{abs}_{644 \text{ nm}} \quad \text{Ecuación 5}$$

$$\text{Carotenoides (}\mu\text{g/ml)} = 4,20 \cdot \text{abs}_{453 \text{ nm}} - 0,0264 \cdot [\text{Clorofila } a \text{ (}\mu\text{g/ml)}] \quad \text{Ecuación 6}$$

Los contenidos de clorofila *a* y carotenoides de cada cultivo, se calcularon en % PS (gramos de pigmento por cada 100 gramos de peso de seco de biomasa). Para ello fue necesario referir el contenido de los pigmentos obtenidos respecto a la concentración de biomasa (en PS) de la cual se partió (ver biomasa final en 4.6), teniendo en cuenta las diluciones realizadas para la extracción.

4.10.2. Ficocianina

La cuantificación de ficocianina se realizó según el método descrito por De Marsac y Houmard (1988).

El solvente de extracción consistió en una solución buffer ácido acético/acetato 10 mM de pH 5,5. Esta solución se preparó a partir de la mezcla de dos componentes: ácido acético 1M (A); acetato de sodio anhidro (B). En el momento de uso se preparó del siguiente modo: 0,36 g de A y 0,6 mL de B se llevaron a un volumen de 500 mL con agua destilada empleando matraz; luego se ajustó el pH empleando HCl 0,1 M y NaOH 0,1 M hasta una valor de 5,5 (pHmetro Adwa, modelo AD 1030).

Al pellet lavado se le adicionó 3 mL del buffer como solvente de extracción. Para promover la ruptura celular las suspensiones fueron sonicadas durante 3 minutos (sonicador Qsonica, modelo Q55) a una frecuencia de 20 kHz y una amplitud de onda de 60 μm . El sonicado se realizó en baño de hielo para contrarrestar el incremento de la temperatura. Luego se les adicionó 1 mL de una solución de sulfato de estreptomina 1 % para su clarificación, y se almacenaron a 4°C durante 30 minutos con la finalidad de maximizar la extracción y la pureza. Las suspensiones fueron luego centrifugadas durante 10 minutos a 10000 rpm. Al sobrenadante (Figura 24) se le realizó un barrido espectral de 270 a 700 nm empleando cubeta de 10 mm. Se empleó un espectrofotómetro (Shimadzu, modelo UV-1700) de doble haz, usando la solución buffer como referencia.

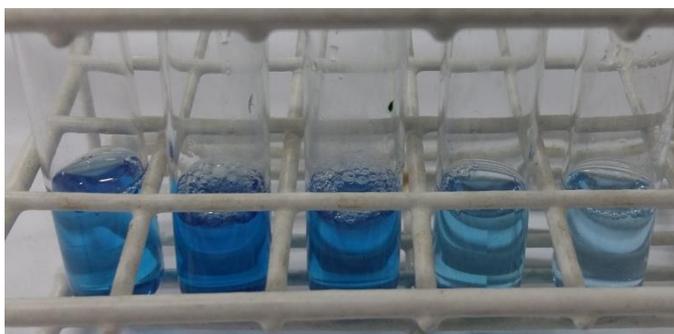


Figura 24– Extracto clarificado para la cuantificación de ficocianina según el método de De Marsac y Houmard.

Empleando la ecuación de Bennet & Bogoard (1973) y los coeficiente de extinción de Bryant et al. (1979), se calculó la concentración de ficocianina a partir de los valores de absorbancia a las longitudes de onda 620 y 663 nm mediante la Ecuación 7.

$$\text{Ficocianina (mg/ml)} = \frac{abs_{620\text{ nm}} - 0,7 \cdot abs_{650\text{ nm}}}{7,38} \quad \text{Ecuación 7}$$

El contenido de ficocianina se calculó en % PS (gramos de ficocianina por cada 100 gramos de peso de seco de biomasa). Para ello fue necesario referir el contenido de ficocianina obtenido respecto a la concentración de biomasa (en PS) de la cual se partió (ver biomasa final en 4.6), teniendo en cuenta las diluciones realizadas para la extracción.

4.11. Diseños experimentales

Se realizaron experimentos con la finalidad de evaluar el impacto de distintas fuentes de nitrógeno y de fósforo a diferentes concentraciones, sobre la producción de la biomasa, su composición bioquímica y su constitución en pigmentos. Para evaluar la producción microalgal se determinó la concentración final de biomasa, μ , el tiempo de duplicación y el índice de crecimiento según lo descrito en el ítem 4.6 (Estimación de parámetros cinéticos de crecimiento). Para caracterizar la composición bioquímica de la biomasa se determinó el contenido de proteínas según el ítem 4.7 (Cuantificación de proteínas), el contenido de lípidos según el ítem 4.8 (Cuantificación de lípidos) y el contenido de carbohidratos según el ítem 4.9

(Cuantificación de carbohidratos). Los pigmentos cuantificados en la biomasa fueron clorofila *a*, carotenoides y ficocianina según el ítem 4.10 (Cuantificación de pigmentos).

Los ensayos fueron realizados tomando como base nutricional la establecida en el medio de cultivo Zarrouk, descrita en el ítem 4.3 (Medio de cultivo). En cada experimento se incorporó la fuente de nitrógeno o de fósforo, según correspondía, a diferentes concentraciones, manteniendo invariantes los demás componentes según la formulación de Zarrouk en cuanto a naturaleza y concentración. Por ejemplo, al estudiar el impacto del cloruro de amonio como fuente de nitrógeno, la composición restante del medio de cultivo se mantuvo tal cual según la formulación de Zarrouk (incluyendo a la fuente de fósforo), salvo en lo que respecta a la fuente de nitrógeno, que a su vez se estudió a distintas concentraciones.

Las distintas concentraciones a las que se estudiaron las fuentes de fósforo y de nitrógeno fueron: a la concentración establecida en la formulación de Zarrouk, dos concentraciones por debajo (disminuciones del 50% y del 75% respecto a esta concentración de referencia) y dos concentraciones por encima (incrementos del 50% y del 75% respecto a la concentración de referencia).

El medio de cultivo Zarrouk contiene en su formulación original nitrato de sodio como fuente de nitrógeno y fosfato ácido de potasio como fuente de fósforo. Cuando estas fuentes fueron reemplazadas, las nuevas especies se adicionaron en una cantidad tal que la concentración en el elemento nitrógeno o fósforo se mantuviera según la formulación original.

Cada experimento fue realizado en la plataforma de trabajo descrita en 4.4 (Condiciones estándar de cultivo), la que permite homogeneizar las condiciones de cultivo a lo largo de toda la experiencia. Para todos los casos las condiciones de cultivo logradas fueron las mismas. El fotoperiodo programado fue de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Se encendieron dos lámparas de cada uno de los estantes, logrando una intensidad lumínica de $34 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (2,8 klux) para el cultivo. Para la cámara de cultivo se fijó a una temperatura de 30°C, la cual fue controlada mediante un registrador, resultando un rango de temperatura de incubación de $30 \pm 2^\circ\text{C}$. Los cultivos fueron estáticos, con homogeneización manual diaria. Para todas las condiciones se partió de una misma concentración de inóculo cuyo valor aproximado fue de 0,033 mg PS/mL (equivalente a una densidad óptica de 0,050).

Para lograr la homogeneidad en la concentración inicial de inóculo y en las concentraciones de los distintos componentes del medio de cultivo (salvo el de la fuente a variar) de cada ensayo, se inoculó un único homogenato de medio de cultivo el que posteriormente fue fraccionado. Sobre cada fracción se adicionaron

diferentes volúmenes de una solución concentrada de la fuente en estudio, a fin de lograr las distintas concentraciones. La concentración de esta solución fue calculada de manera de que su adición no genere variaciones significativas en las concentraciones del inóculo inicial y de los distintos componentes del medio de cultivo. Estas fracciones ya adicionadas y listas para ser cultivadas, fueron divididas en Erlenmeyers de 500 mL de modo de obtener tres fracciones de 100 mL. De este modo se logran triplicados homogéneos para cada condición, con un volumen de cultivo de 100 mL para cada réplica. De esto modo se disponía de cada condición por triplicado. Todos los Erlenmeyers empleados para la incubación, presentaban un tapón de algodón para evitar contaminaciones del ambiente pero permitir el intercambio de gases con el mismo.

Los parámetros de crecimiento se evaluaron a partir de las curvas de crecimiento obtenidas para las distintas condiciones ensayadas, cuya construcción se realizó a partir de muestreos diarios sobre los que se midió la densidad óptica. Las composiciones bioquímica y en pigmentos se determinaron una vez finalizado el crecimiento.

4.11.1. Influencia del nitrato de sodio

Según la formulación original del medio de cultivo Zarrouk (ver 4.3), el nitrato de sodio es incorporado como única fuente de nitrógeno a una concentración de 2,5 g/L. Esta concentración fue considerada como la condición control del experimento. Las distintas concentraciones de nitrato de sodio empleadas en este ensayo se pueden apreciar en la Tabla 10.

Tabla 10- Concentraciones de nitrato de sodio para el estudio de su influencia en el crecimiento y la composición de *S. platensis*.

Condición	NaNO ₃ [g/L]	Variación respecto al control
N1	0,63	-75%
N2	1,25	-50%
NC	2,50	0%
N3	3,75	+50%
N4	4,38	+75%

Para lograr las distintas concentraciones, se preparó una solución concentrada de nitrato de sodio 12,5 g/100mL. Esta solución fue esterilizada en autoclave (Autoclave tipo Chamberland, VZ, modelo 100) a 121°C durante 20 minutos.

Se preparó 1,8 L de medio de cultivo Zarrouk (sin fuente de nitrógeno) según lo descrito en 4.3. La totalidad del volumen fue inoculado con un cultivo concentrado de *S. platensis* en Zarrouk con 15 días de incubación. La concentración lograda luego de la inoculación fue 0,027 mg PS/mL (densidad óptica de 0,039).

El medio de cultivo inoculado fue fraccionado con probeta y adicionado con distintos volúmenes de la solución concentrada y estéril de nitrato de sodio, empleando pipetas automáticas (Socorex, modelo Acura manual 825.1000 y DragonLab, modelo U5000). En la Tabla 11 se detallan los volúmenes utilizados para la preparación de las distintas condiciones de cultivo.

Tabla 11- Preparación de las condiciones de cultivo para el estudio de la influencia del nitrato de sodio en el crecimiento y la composición de *S. platensis*.

Condición	NaNO ₃ [g/L]	Volumen de Zarrouk [mL]	Volumen de NaNO ₃ conc. [mL]
N1	0,63	300	1,5
N2	1,25	300	3
NC	2,50	300	6
N3	3,75	300	9
N4	4,38	300	10,5

Las fracciones inoculadas y ya con distinta concentración de fuente de nitrógeno fueron divididas con probeta en volúmenes de 100 mL e incorporadas a Erlenmeyers de 500 mL con tapón de algodón. De este modo se disponía de cada condición por triplicado.

Los Erlenmeyers fueron dispuestos en dos estantes de la plataforma de trabajo y se fijaron las condiciones de incubación descritas en 4.11 (Diseños experimental).

El cultivo se realizó durante 21 días. Se siguió el crecimiento midiendo, aproximadamente día por medio, la densidad óptica a 560 nm. Finalizada la incubación se cuantificaron proteínas, lípidos, carbohidratos, ficocianina, clorofila *a* y carotenoides. Las condiciones de cultivo se resumen en la Tabla 12.

Tabla 12- Condiciones de cultivo para el estudio de la influencia del nitrato de sodio en el crecimiento y la composición de *S. platensis*.

Parámetro	Detalle
Concentración inicial	0,027 mg PS/mL
Temperatura	30 ± 2°C
Iluminación	34 μE.m ⁻² .s ⁻¹
Fotoperiodo	12 h / 12 h
Tiempo de cultivo	21 días

4.11.2. Influencia del cloruro de amonio

A fin de estudiar la influencia del cloruro de amonio, éste fue incorporado como única fuente de nitrógeno, en reemplazo del nitrato de sodio que es la fuente original del medio de cultivo Zarrouk (ver 4.3). No obstante, para la condición control se incorporó nitrato de sodio como única fuente de nitrógeno a una concentración de 2,5 g/L (concentración correspondiente a la formulación original del medio Zarrouk). Asimismo, es importante mencionar que la condición de concentración intermedia de cloruro de amonio, tiene una concentración de nitrógeno equivalente a la condición de control con nitrato de sodio. Las distintas concentraciones de cloruro de amonio (y de nitrato de sodio) empleadas en este ensayo se pueden apreciar en la Tabla 13.

Tabla 13- Concentraciones de cloruro de amonio (y condición control en presencia de nitrato de sodio) para el estudio de su influencia en el crecimiento y la composición de *S. platensis*.

Condición	NH ₄ Cl [g/L]	NaNO ₃ [g/L]	Variación respecto al control
A1	0,40	-	-75%
A2	0,79	-	-50%
AC	1,57	-	0%
A3	2,36	-	+50%
A4	2,76	-	+75%
NC	-	2,50	0% (control)

Para lograr las distintas concentraciones, se preparó una solución concentrada de cloruro de amonio 7,9 g/100 mL, y se empleó la solución concentrada y estéril de nitrato de sodio 12,5 g/100 mL preparada

anteriormente (para el experimento con las distintas concentración de nitrato de sodio). Si bien una solución de cloruro de amonio es ácida, no se aplicó esterilización por calor húmedo para evitar el stripping del amonio que ocurre a pH alcalino. La solución de cloruro de amonio fue esterilizada por filtración empleando un filtro estéril de 0,2 μm de acetato de celulosa para usar con jeringa (Sartorius, modelo Minisart NML).

Se preparó 2,0 L de medio de cultivo Zarrouk (sin fuente de nitrógeno) según lo descrito en 4.3. La totalidad del volumen fue inoculado con un cultivo concentrado de *S. platensis* en Zarrouk con 15 días de incubación. La concentración lograda luego de la inoculación fue 0,034 mg PS/mL (densidad óptica de 0,052).

El medio de cultivo inoculado fue fraccionado con probeta y adicionado con distintos volúmenes de las soluciones concentradas y estériles de cloruro de amonio y de nitrato de sodio, empleando pipetas automáticas (Socorex, modelo Acura manual 825.1000 y DragonLab, modelo U5000). En la Tabla 14 se detallan los volúmenes utilizados para la preparación de las distintas condiciones de cultivo.

Tabla 14- Preparación de las condiciones de cultivo para el estudio de la influencia del cloruro de amonio en el crecimiento y la composición de *S. platensis*.

Condición	NH ₄ Cl [g/L]	NaNO ₃ [g/L]	Volumen de Zarrouk [mL]	Volumen de NH ₄ Cl conc. [mL]	Volumen de NaNO ₃ conc. [mL]
A1	0,40	-	300	1,5	-
A2	0,79	-	300	3	-
AC	1,58	-	300	6	-
A3	2,37	-	300	9	-
A4	2,77	-	300	10,5	-
NC	-	2,50	300	-	6

Las fracciones inoculadas y ya con distinta concentración de fuente de nitrógeno fueron divididas con probeta en volúmenes de 100 mL e incorporadas a Erlenmeyers de 500 mL con tapón de algodón. De este modo se disponía de cada condición por triplicado.

Los Erlenmeyers fueron dispuestos en dos estantes de la plataforma de trabajo y se fijaron las condiciones de incubación descriptas en 4.11 (Diseños experimental).

El cultivo se realizó durante 21 días. Se siguió el crecimiento midiendo, aproximadamente día por medio, la densidad óptica a 560 nm. Finalizada la incubación se cuantificaron proteínas, lípidos, carbohidratos, ficocianina, clorofila *a* y carotenoides. Las condiciones de cultivo se resumen en la Tabla 15.

Tabla 15- Condiciones de cultivo para el estudio de la influencia del cloruro de amonio en el crecimiento y la composición de *S. platensis*.

Parámetro	Detalle
Concentración inicial	0,034 mg PS/mL
Temperatura	30 ± 2°C
Iluminación	34 μE.m ⁻² .s ⁻¹
Fotoperiodo	12 h / 12 h
Tiempo de cultivo	21 días

4.11.3. Influencia de la urea

Para estudiar la influencia de la urea, ésta fue incorporada como única fuente de nitrógeno, en reemplazo del nitrato de sodio que es la fuente original del medio de cultivo Zarrouk (ver 4.3). No obstante, para la condición control se incorporó nitrato de sodio como única fuente de nitrógeno a una concentración de 2,5 g/L (concentración correspondiente a la formulación original del medio Zarrouk). La condición de concentración intermedia de urea, tiene una concentración de nitrógeno equivalente a la condición de control con nitrato de sodio. Las distintas concentraciones de urea (y de nitrato de sodio) empleadas en este ensayo se pueden apreciar en la Tabla 16.

Tabla 16- Concentraciones de urea (y condición control en presencia de nitrato de sodio) para el estudio de su influencia en el crecimiento y la composición de *S. platensis*.

Condición	Urea [g/L]	NaNO ₃ [g/L]	Variación respecto al control
U1	0,22	-	-75%
U2	0,44	-	-50%
UC	0,88	-	0%
U3	1,32	-	+50%
U4	1,55	-	+75%
NC	-	2,50	0% (control)

Para lograr las distintas concentraciones, se preparó una solución concentrada de urea 4,4 g/100 mL, y se empleó la solución concentrada y estéril de nitrato de sodio 12,5 g/100 mL preparada anteriormente (para el experimento con las distintas concentraciones de nitrato de sodio). La solución de urea fue esterilizada en autoclave (Autoclave tipo Chamberland, VZ, modelo 100) a 121°C durante 20 minutos.

Se preparó 2,0 L de medio de cultivo Zarrouk (sin fuente de nitrógeno) según lo descrito en 4.3. La totalidad del volumen fue inoculado con un cultivo concentrado de *S. platensis* en Zarrouk con 15 días de incubación. La concentración lograda luego de la inoculación fue 0,029 mg PS/mL (densidad óptica de 0,043).

El medio de cultivo inoculado fue fraccionado con probeta y adicionado con distintos volúmenes de las soluciones concentradas y estériles de urea y de nitrato de sodio, empleando pipetas automáticas (Socorex, modelo Acura manual 825.1000y DragonLab, modelo U5000). En la Tabla 17 se detallan los volúmenes para la preparación de las distintas condiciones de cultivo.

Tabla 17- Preparación de las condiciones de cultivo para el estudio de la influencia de la urea en el crecimiento y la composición de *S. platensis*.

Condición	Urea [g/L]	NaNO ₃ [g/L]	Volumen de Zarrouk [mL]	Volumen de Urea conc. [mL]	Volumen de NaNO ₃ conc. [mL]
U1	0,22	-	300	1,5	-
U2	0,44	-	300	3	-
UC	0,88	-	300	6	-
U3	1,32	-	300	9	-
U4	1,55	-	300	10,5	-
NC	-	2,50	300	-	6

Las fracciones inoculadas y ya con distinta concentración de fuente de nitrógeno fueron divididas con probeta en volúmenes de 100 mL e incorporadas a Erlenmeyers de 500 mL con tapón de algodón. De esto modo se disponía de cada condición por triplicado.

Los Erlenmeyers fueron dispuestos en dos estantes de la plataforma de trabajo y se fijaron las condiciones de incubación descriptas en 4.11 (Diseños experimental).

El cultivo se realizó durante 21 días. Se siguió el crecimiento midiendo, aproximadamente día por medio, la densidad óptica a 560 nm. Finalizada la incubación se cuantificaron proteínas, lípidos, carbohidratos, ficocianina, clorofila *a* y carotenoides. Las condiciones de cultivo se resumen en la Tabla 18.

Tabla 18- Condiciones de cultivo para el estudio de la influencia de la urea en el crecimiento y la composición de *S. platensis*.

Parámetro	Detalle
Concentración inicial	0,029 mg PS/mL
Temperatura	30 ± 2°C
Iluminación	34 μE.m ⁻² .s ⁻¹
Fotoperiodo	12 h / 12 h
Tiempo de cultivo	21 días

4.11.4. Influencia del fosfato ácido de potasio

Según la formulación original del medio de cultivo Zarrouk (ver 4.3), el fosfato ácido de potasio es incorporado como única fuente de fósforo a una concentración de 0,5 g/L. Esta concentración fue considerada como la condición control del experimento. Las distintas concentraciones de fosfato ácido de potasio empleadas en este ensayo se pueden apreciar en la Tabla 19.

Tabla 19- Concentraciones de fosfato ácido de potasio para el estudio de su influencia en el crecimiento y la composición de *S. platensis*.

Condición	K ₂ HPO ₄ [g/L]	Variación respecto al control
F1	0,13	-75%
F2	0,25	-50%
FC	0,50	0%
F3	0,75	+50%
F4	0,88	+75%

Para lograr las distintas concentraciones, se preparó una solución concentrada de fosfato ácido de potasio 2,5 g/100 mL. Esta solución fue esterilizada en autoclave (Autoclave tipo Chamberland, VZ, modelo 100) a 121°C durante 20 minutos.

Se preparó 1,8 L de medio de cultivo Zarrouk (sin fuente de fósforo) según lo descrito en 4.3. La totalidad del volumen fue inoculado con un cultivo concentrado de *S. platensis* en Zarrouk con 15 días de incubación. La concentración lograda luego de la inoculación fue 0,048 mg PS/mL (densidad óptica de 0,078).

El medio de cultivo inoculado fue fraccionado con probeta y adicionado con distintos volúmenes de la solución concentrada y estéril de fosfato ácido de potasio, empleando pipetas automáticas (Socorex, modelo Acura manual 825.1000y DragonLab, modelo U5000).. En la Tabla 20 se detallan los volúmenes utilizados para la preparación de las distintas condiciones de cultivo.

Tabla 20- Preparación de las condiciones de cultivo para el estudio de la influencia del fosfato ácido de potasio en el crecimiento y la composición de *S. platensis*.

Condición	K ₂ HPO ₄ [g/L]	Volumen de Zarrouk [mL]	Volumen de K ₂ HPO ₄ conc. [mL]
F1	0,13	300	1,5
F2	0,25	300	3
FC	0,50	300	6
F3	0,75	300	9
F4	0,88	300	10,5

Las fracciones inoculadas y ya con distinta concentración de fuente de fósforo fueron divididas con probeta en volúmenes de 100 mL e incorporadas a Erlenmeyers de 500 mL con tapón de algodón. De este modo se disponía de cada condición por triplicado.

Los Erlenmeyers fueron dispuestos en dos estantes de la plataforma de trabajo y se fijaron las condiciones de incubación descriptas en 4.11 (Diseños experimental).

El cultivo se realizó durante 21 días. Se siguió el crecimiento midiendo, aproximadamente día por medio, la densidad óptica a 560 nm. Finalizada la incubación se cuantificaron proteínas, lípidos, carbohidratos, ficocianina, clorofila *a* y carotenoides. Las condiciones de cultivo se resumen en la Tabla 21.

Tabla 21- Condiciones de cultivo para el estudio de la influencia del fosfato ácido de potasio en el crecimiento y la composición de *S. platensis*.

Parámetro	Detalle
Concentración inicial	0,048 mg PS/mL
Temperatura	30 ± 2°C
Iluminación	34 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$
Fotoperiodo	12 h / 12 h
Tiempo de cultivo	21 días

4.11.5. Influencia del fosfato monocálcico

El fosfato monocálcico monohidratado (fosfato diácido de calcio monohidratado) es moderadamente soluble en agua (Perry, 2011). Teniendo en cuenta el pH elevado del medio de cultivo Zarrouk (8,5 a 9,0) debido a la concentración de carbonato ácido de sodio, y que los valores a 25°C de pK_{a2} y pK_{a3} del ácido fosfórico son 7,2 y 12,4 respectivamente, la mayor parte del fosfato monocálcico se convertirá en fosfato dicálcico (fosfato ácido de potasio) luego de su incorporación al medio de cultivo. El fosfato dicálcico es menos soluble que el fosfato monocálcico (Perry, 2011), por lo que habrá una menor biodisponibilidad de la fuente de fósforo para el cultivo de *S. platensis*. Por este motivo es que se consideró necesario estudiar el impacto de esta baja solubilidad. Se planteó entonces un ensayo preliminar para esta evaluación, para luego diseñar y realizar el experimento final.

En el ensayo preliminar, se evaluaron distintas formas de incorporación del fosfato monocálcico al medio de cultivo, con la finalidad de observar cómo influyen en el crecimiento de la cepa de *S. platensis*. La forma de incorporación que permitiera el mejor crecimiento, sería la que se aplicaría en el ensayo final.

En el ensayo final se estudió la influencia del fosfato monocálcico a distintas concentraciones, incorporándolo de la forma definida a partir de los resultados del ensayo preliminar.

4.11.5.1. Incorporación del fosfato monocálcico al medio de cultivo (ensayo preliminar)

Se determinó experimentalmente que para preparar una solución de fosfato monocálcico monohidratado 1 g/100 mL y lograr su disolución total, era necesaria la incorporación de 8 g de EDTA disódico dihidratado

(etilendiaminotetraacetato diácido de sodio dihidratado) como complejante del calcio, para la disolución total del fosfato. Asimismo, es importante mencionar que al reemplazar el fosfato ácido de potasio (fuente de nitrógeno de la formulación de Zarrouk) en su totalidad por el fosfato monocálcico, se incorpora menos potasio al medio de cultivo.

Para este ensayo se emplearon tres soluciones: una de fosfato monocálcico monohidratado 0,9 g/100mL con adición de EDTA disódico dihidratado a una concentración de 8,0 g/100 mL, otra de cloruro de potasio 2,1 g/100 mL y finalmente la solución estéril de fosfato ácido de potasio 2,5 g/100 mL preparada para el experimento con las distintas concentraciones de fosfato ácido de potasio. También se preparó una suspensión de fosfato monocálcico monohidratado 1,8 g/100 mL. Las nuevas soluciones y la suspensión fueron esterilizadas en autoclave (Autoclave tipo Chamberland, VZ, modelo 100) a 121°C durante 20 minutos.

Se preparó 0,5 L de medio de cultivo Zarrouk (sin fuente de fósforo) según lo descrito en 4.3. El medio fue fraccionado, agregando con probeta volúmenes de 50 mL a seis distintos Erlenmeyers de 250 mL con tapón de algodón.

Por otra parte, se incubó un cultivo de *S. platensis* en Zarrouk durante 15 días con la finalidad de ser utilizado como inóculo.

A los Erlenmeyers con medio de cultivo Zarrouk (sin fuente de fósforo) se incorporaron las distintas soluciones (y la suspensión) y distintos volúmenes de inóculo, según lo descrito en la Tabla 22. Su incorporación se realizó empleando pipeta automática (Socorex, modelo Acura manual 825.1000).

Tabla 22- Preparación de las condiciones de cultivo para el ensayo preliminar sobre la incorporación del fosfato monocálcico al medio de cultivo.

Condición	Ca(H ₂ PO ₄) ₂ + EDTA-Na ₂ [mL]	Ca(H ₂ PO ₄) ₂ [mL]	K ₂ HPO ₄ [mL]	KCl [mL]	Inóculo [mL]	Características
1	2	-	-	-	1	Con fosfato monocálcico disuelto
2	2	-	-	-	5	Con fosfato monocálcico disuelto y alta conc. de inóculo
3	2	-	-	1	5	Con fosfato monocálcico disuelto, suplemento de K y alta conc. de inóculo
4	-	1	-	-	1	Con fosfato monocálcico sólido
5	-	1	-	1	1	Con fosfato monocálcico sólido y suplemento de K
6	-	-	1	-	1	Condición control

Cabe destacar que todas las condiciones antes descritas poseen la misma concentración en fósforo. Las que fueron adicionadas con cloruro de potasio presentan la misma concentración en potasio respecto a la formulación de Zarrouk.

Los Erlenmeyers fueron dispuestos en un estante de la plataforma de trabajo y se fijaron las condiciones de incubación descritas en 4.11 (Diseños experimental).

El cultivo se realizó durante 10 días. Por tratarse de un ensayo preliminar, el seguimiento del crecimiento se realizó de forma cualitativa mediante inspección visual. Las condiciones de cultivo se resumen en la Tabla 23.

Tabla 23- Condiciones de cultivo para el ensayo preliminar sobre la incorporación del fosfato monocálcico al medio de cultivo.

Parámetro	Detalle
Concentración inicial	(según condición)
Temperatura	30 ± 2°C
Iluminación	34 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$
Fotoperiodo	12 h / 12 h
Tiempo de cultivo	10 días

4.11.5.2. Ensayo de influencia del fosfato monocálcico (ensayo final)

A partir de los resultados obtenidos en el ensayo preliminar (4.11.5.1), se determinó que el mejor modo de incorporar el mencionado fosfato es de forma sólida, que no es necesaria la suplementación con potasio y que se pueden inocular los cultivos a la concentración de densidad óptica de 0,050.

El fosfato monocálcico fue incorporado como única fuente de fósforo, en reemplazo del fosfato ácido de potasio que es la fuente original del medio de cultivo Zarrouk (ver 4.3). No obstante, para la condición control se adicionó fosfato ácido de potasio como única fuente de fósforo a una concentración de 0,5 g/L (concentración correspondiente a la formulación original del medio Zarrouk). La condición de concentración intermedia de fosfato monocálcico, tiene una concentración de fósforo equivalente a la condición control con fosfato ácido de potasio (es importante recordar que cada celda unitaria de fosfato monocálcico aporta dos átomos de fósforo). Las distintas concentraciones de fosfato monocálcico (y de fosfato ácido de potasio) empleadas en este ensayo se pueden apreciar en la Tabla 24.

Tabla 24- Concentraciones de fosfato monocalcico (y condición control en presencia de fosfato ácido de potasio) para el estudio de su influencia en el crecimiento y la composición de *S. platensis*.

Condición	Ca(H ₂ PO ₄) ₂ [g/L]	K ₂ HPO ₄ [g/L]	Variación respecto al control
P1	0,09	-	-75%
P2	0,18	-	-50%
PC	0,36	-	0%
P3	0,54	-	+50%
P4	0,63	-	+75%
FC	-	0,50	0% (control)

Para lograr las distintas concentraciones, se empleó la suspensión estéril de fosfato monocalcico monohidratado 1,8 g/100 mL preparada para el ensayo preliminar, y se utilizó la solución concentrada y estéril de fosfato ácido de potasio 2,5 g/100 mL preparada para el experimento con las distintas concentración de fosfato ácido de sodio.

Se preparó 2,0 L de medio de cultivo Zarrouk (sin fuente de fósforo) según lo descrito en 4.3. La totalidad del volumen fue inoculado con un cultivo concentrado de *S. platensis* en Zarrouk con 15 días de incubación. La concentración lograda luego de la inoculación fue 0,049 mg PS/mL (densidad óptica de 0,078).

El medio de cultivo inoculado fue fraccionado con probeta y adicionado con distintos volúmenes de las soluciones concentradas y estériles de fosfato monocalcico y de fosfato ácido de potasio, empleando pipeta automática (Socorex, modelo Acura manual 825.1000). En la Tabla 25 se detallan los volúmenes utilizados para la preparación de las distintas condiciones de cultivo.

Tabla 25- Preparación de las condiciones de cultivo para el estudio de la influencia del fosfato monocalcico en el crecimiento y la composición de *S. platensis*.

Condición	Ca(H ₂ PO ₄) ₂ [g/L]	K ₂ HPO ₄ [g/L]	Volumen de Zarrouk [mL]	Volumen de Ca(H ₂ PO ₄) ₂ [mL]	Volumen de K ₂ HPO ₄ conc. [mL]
P1	0,09	-	300	1,5	-
P2	0,18	-	300	3	-
PC	0,36	-	300	6	-
P3	0,54	-	300	9	-
P4	0,63	-	300	10,5	-
FC	-	0,50	300	-	6

Las fracciones inoculadas y ya con distinta concentración de fuente de fósforo fueron divididas con probeta en volúmenes de 100 mL e incorporadas a Erlenmeyers de 500 mL con tapón de algodón. De esto modo se disponía de cada condición por triplicado.

Los Erlenmeyers fueron dispuestos en dos estantes de la plataforma de trabajo y se fijaron las condiciones de incubación descritas en 4.11 (Diseños experimental).

El cultivo se realizó durante 16 días. Se siguió el crecimiento midiendo, aproximadamente día por medio, la densidad óptica a 560 nm. Los valores de densidad óptica medidos para las condiciones P1 a P6 fueron corregidos por la turbidez que generaba el fosfato monocalcico insoluble. Como valor de corrección se tomó a la densidad óptica de cada condición y de cada réplica medida al inicio del ensayo, estimando de este modo que el valor de absorbancia en ese momento se debía exclusivamente a la turbidez ocasionada por el fosfato monocalcico insoluble, siendo despreciable lo aportado por la microalga. Estos valores de corrección se emplearon para todas las mediciones obtenidas a lo largo del crecimiento, considerando que la cantidad de fosfato insoluble permanecía prácticamente constante.

Finalizada la incubación se cuantificaron proteínas, lípidos, carbohidratos, ficocianina, clorofila α y carotenoides. Las condiciones de cultivo se resumen en la Tabla 26.

Tabla 26- Condiciones de cultivo para el ensayo final sobre la influencia del fosfato monocálcico en el crecimiento y la composición de *S. platensis*.

Parámetro	Detalle
Concentración inicial	0,049 mg PS/mL
Temperatura	30 ± 2°C
Iluminación	34 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$
Fotoperiodo	12 h / 12 h
Tiempo de cultivo	16 días

4.12. Tratamiento de datos y análisis estadístico

Todos los ensayos fueron realizados por triplicado. Los valores informados corresponden al promedio de las réplicas. Los intervalos de confianza (y las barras de error de los gráficos) consisten en el promedio más/menos el desvío estándar muestral.

Los cálculos necesarios para el tratamiento de los datos y la construcción de los gráficos, fueron realizados con Microsoft Office Excel Professional Plus 2010 (versión 14.0.4760.1000). Las curvas de regresión corresponden a un ajuste por el método de cuadrados mínimos.

La existencia de diferencias significativas entre las distintas condiciones de cada experimento se determinó a partir de un análisis de la varianza (ANOVA). Posteriormente se realizó el test de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras y establecer así grupos homogéneos. Para ambos procedimientos el nivel de confianza aplicado fue del 95,0%. Este análisis fue realizado con el programa estadístico STATGRAPHICS Centurion XV (versión 15.2.06).

5. Resultados

5.1. Influencia del nitrato de sodio

En la Figura 25 se puede apreciar el crecimiento de *S. platensis* para las distintas concentraciones de nitrato de sodio evaluadas, graficando la concentración de biomasa en g PS/L versus el tiempo en días. Se observó crecimiento microalgal en todas las condiciones ensayadas. Hasta el día 8 se puede distinguir un crecimiento de tipo exponencial, según el mayor valor obtenido para el coeficiente de determinación R^2 .

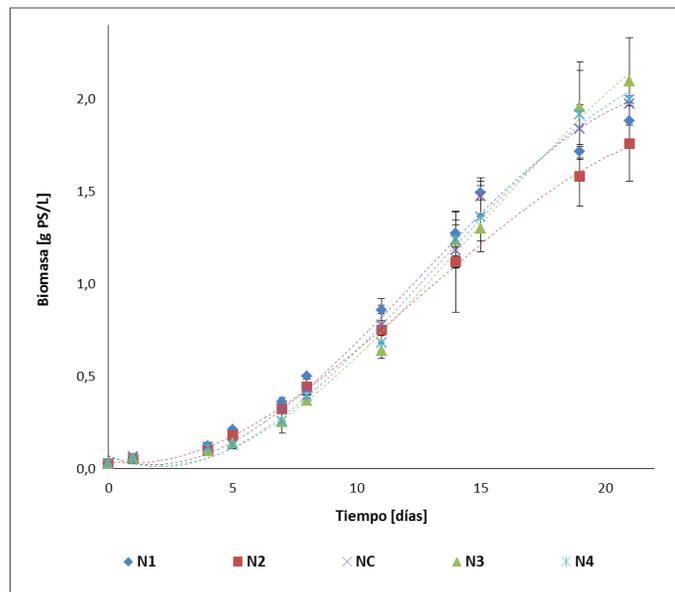


Figura 25- Curvas de crecimiento de *S. platensis* bajo distintas concentraciones de nitrato de sodio. N1= 0,63 g/L; N2= 1,25 g/L; NC= 2,50 g/L; N4= 4,38 g/L.

A los 21 días de cultivo, si bien las diferencias no son significativas, se observó una leve disminución de la producción de biomasa final en las condiciones de baja concentración de nitrógeno respecto del control (NC), del 6% y del 2%, para N1 y N2, respectivamente. Un aumento en la concentración de nitrógeno (N3 y N4) no produjo incrementos en la producción de biomasa. Se observó un aumento de μ del 19% para N1 y del 16% para N2 respecto de NC, mientras que para N3 y N4 no hubo diferencias significativas respecto del control. En la Tabla 27 se detallan los parámetros cinéticos de crecimiento para las distintas condiciones.

Tabla 27- Parámetros de crecimiento de *S. platensis* para las distintas concentraciones de nitrato de sodio. Los valores se encuentran expresados como el promedio \pm DS (n=3). Dentro de una misma columna, letras diferentes representan agrupamientos con diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%, según un test ANOVA seguido de una prueba HSD de Tukey. N1= 0,63 g/L; N2= 1,25 g/L; NC= 2,50 g/L; N4= 4,38 g/L.

Condición	Biomasa final [g PS/L]	μ [día ⁻¹]	Tiempo de duplicación [día]	Índice de crecimiento
N1	1,88 \pm 0,01 ^a	0,328 \pm 0,001 ^a	2,12 \pm 0,01 ^a	67,8 \pm 0,1 ^a
N2	1,87 \pm 0,03 ^a	0,320 \pm 0,005 ^a	2,16 \pm 0,04 ^a	67,6 \pm 1,0 ^a
NC	2,00 \pm 0,09 ^{a,b}	0,276 \pm 0,018 ^b	2,52 \pm 0,16 ^b	72,2 \pm 3,4 ^{a,b}
N3	2,10 \pm 0,02 ^b	0,260 \pm 0,004 ^b	2,67 \pm 0,04 ^b	75,7 \pm 0,6 ^b
N4	1,99 \pm 0,02 ^{a,b}	0,271 \pm 0,002 ^b	2,56 \pm 0,02 ^b	72,0 \pm 0,7 ^{a,b}

En lo que respecta a la composición bioquímica, se observó una disminución del 47% en el contenido de proteínas de la condición N1 respecto a NC, mientras que a elevadas concentraciones de nitrógeno el contenido de proteínas se incrementó en un 22% y en un 20% para N3 y N4, respectivamente (Figura 26). El contenido de lípidos (Figura 27), aumentó a bajas concentraciones de nitrógeno, observándose un incremento significativo de 156% para N1 y del 61 % para N2. No se observaron diferencias en el contenido de lípidos a elevadas concentraciones de nitrógeno (N3 y N4) respecto a NC. Si bien no hay diferencias significativas en el contenido de carbohidratos (Figura 28), se observó una disminución del 12% para N1 respecto al control.

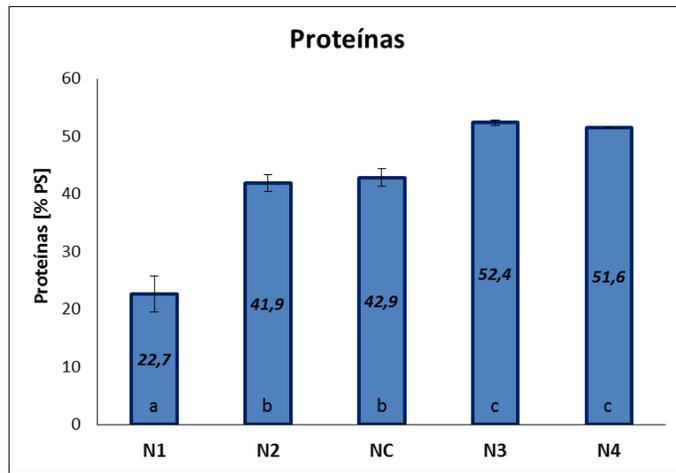


Figura 26- Contenido de proteínas de *S. platensis* para las distintas concentraciones de nitrato de sodio. El valor numérico dentro de cada barra corresponde al valor promedio (n=3) de la condición ensayada. Las letras dentro de las barras indican agrupamientos con diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%, según un test ANOVA seguido de una prueba HSD de Tukey. N1= 0,63 g/L; N2= 1,25 g/L; NC= 2,50 g/L; N4= 4,38 g/L.

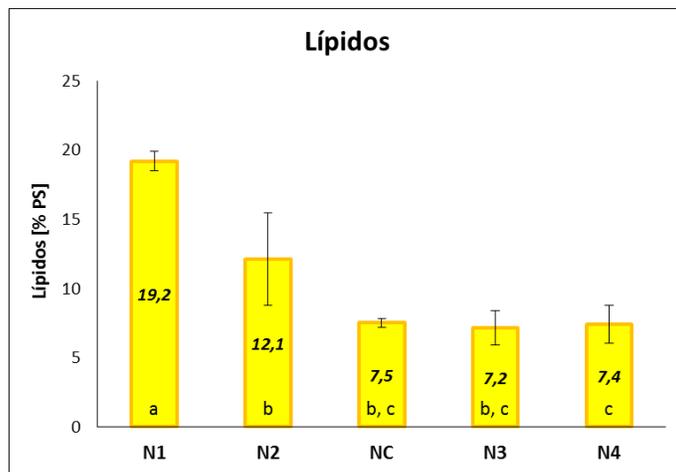


Figura 27- Contenido de lípidos de *S. platensis* para las distintas concentraciones de nitrato de sodio. El valor numérico dentro de cada barra corresponde al valor promedio (n=3) de la condición ensayada. Las letras dentro de las barras indican agrupamientos con diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%, según un test ANOVA seguido de una prueba HSD de Tukey. N1= 0,63 g/L; N2= 1,25 g/L; NC= 2,50 g/L; N4= 4,38 g/L.

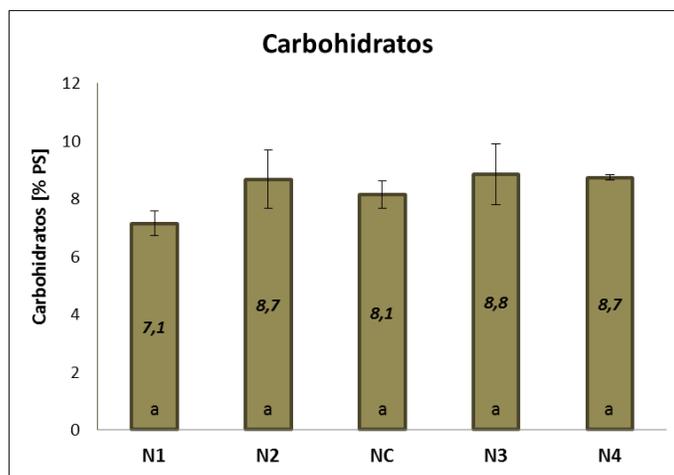


Figura 28– Contenido de carbohidratos de *S. platensis* para las distintas concentraciones de nitrato de sodio. El valor numérico dentro de cada barra corresponde al valor promedio (n=3) de la condición ensayada. Las letras dentro de las barras indican agrupamientos con diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%, según un test ANOVA seguido de una prueba HSD de Tukey. N1= 0,63 g/L; N2= 1,25 g/L; NC= 2,50 g/L; N4= 4,38 g/L.

En cuanto a los pigmentos, los valores más altos de ficocianina (Figura 29) se obtuvieron en las condiciones N3 y N4, los cuales representan un incremento del 16 % y 26 % respectivamente y en relación a NC. Para N1 y N2 se observó un marcado descenso de la concentración de ficocianina (58% y 28%, respectivamente) con respecto al control. Si bien las diferencias no son significativas, el contenido de clorofila α tiende a disminuir levemente a medida que disminuye la concentración de nitrógeno (Figura 30). En la Figura 31 se aprecia que no hubo cambios significativos en el contenido de carotenoides, excepto para la condición N2, donde se observó un incremento del 25% respecto al control.

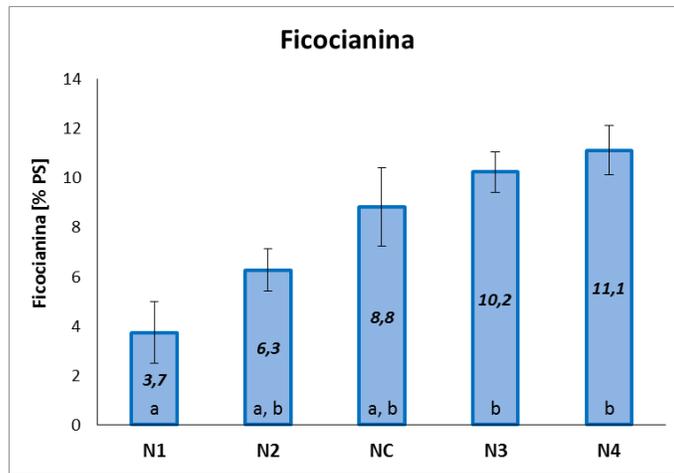


Figura 29– Contenido de ficocianina de *S. platensis* para las distintas concentraciones de nitrato de sodio. El valor numérico dentro de cada barra corresponde al valor promedio (n=3) de la condición ensayada. Las letras dentro de las barras indican agrupamientos con diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%, según un test ANOVA seguido de una prueba HSD de Tukey. N1= 0,63 g/L; N2= 1,25 g/L; NC= 2,50 g/L; N4= 4,38 g/L.

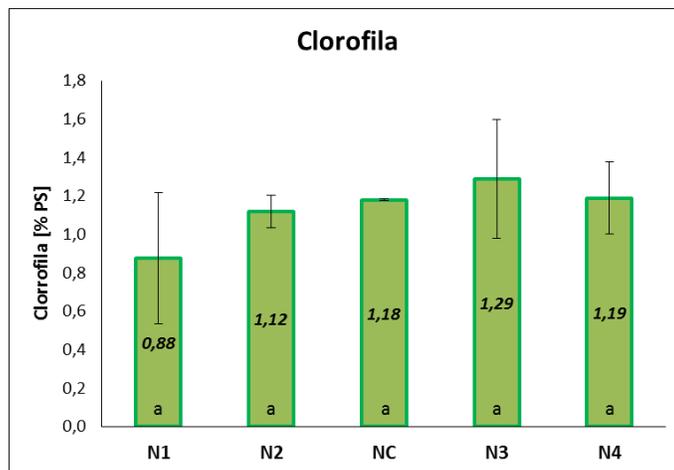


Figura 30– Contenido de clorofila *a* de *S. platensis* para las distintas concentraciones de nitrato de sodio. El valor numérico dentro de cada barra corresponde al valor promedio (n=3) de la condición ensayada. Las letras dentro de las barras indican agrupamientos con diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%, según un test ANOVA seguido de una prueba HSD de Tukey. N1= 0,63 g/L; N2= 1,25 g/L; NC= 2,50 g/L; N4= 4,38 g/L.

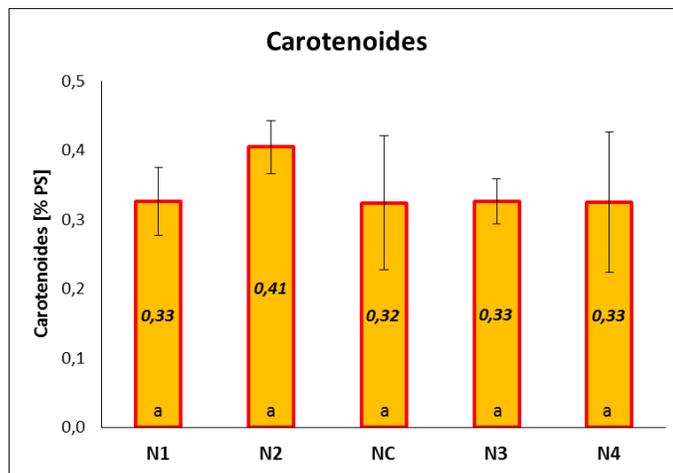


Figura 31- Contenido de carotenoides de *S. platensis* para las distintas concentraciones de nitrato de sodio. El valor numérico dentro de cada barra corresponde al valor promedio (n=3) de la condición ensayada. Las letras dentro de las barras indican agrupamientos con diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%, según un test ANOVA seguido de una prueba HSD de Tukey. N1= 0,63 g/L; N2= 1,25 g/L; NC= 2,50 g/L; N4= 4,38 g/L.

5.2. Influencia del cloruro de amonio

Cuando se reemplazó la fuente de nitrógeno presente en el medio de cultivo Zarrouk por cloruro de amonio se pudo observar que no hubo crecimiento microalgal bajo ninguna de las concentraciones de cloruro de amonio ensayadas, a excepción del control cultivado en presencia de nitrato de sodio. La densidad óptica se mantuvo prácticamente sin variaciones durante 5 días y a partir de allí comenzó a disminuir. Esto fue consistente con lo observado: los cultivos mantuvieron durante 5 días su coloración verde inicial luego de la inoculación, mientras que a partir de allí comenzaron a decolorarse. A los 10 días de incubación los cultivos se encontraron totalmente sin color (Figura 32). Luego de una observación microscópica se observó que las microalgas presentaban un notable cambio morfológico, perdiendo su aspecto espiralado típico de las microalgas del género *Spirulina* y con células decoloradas de bordes refringentes (Figura 33).



Figura 32- Cultivo de *S. platensis* (n=3) luego de 10 días de incubación con NH_4Cl para la condición A1.



Figura 33– Imágenes microscópicas (100x) de *S. platensis* luego de 10 días de incubación: a) condición NC; b) condición A1.

Con la premisa de que el amonio puede ser tóxico para especies del género *Spirulina* se realizó un ensayo donde se evaluaron distintas fuentes de nitrógeno. Uno con nitrato de sodio a la concentración NC, otro con cloruro de amonio a la concentración AC, y otro con una mezcla de nitrato de sodio y de cloruro de amonio. Esta última condición contiene la mitad de concentración de cada fuente de nitrógeno respecto a los dos anteriores (es decir que resulta en concentraciones N2 y A2). Cabe destacar que de este modo, todos los cultivos contienen la misma concentración en nitrógeno. Se emplearon Erlenmeyers de 250 mL y un volumen de cultivo de 50 mL que se incorporó mediante probeta. El volumen de inóculo empleado fue aproximadamente 5 veces mayor (10% del volumen de cultivo) que el empleado en ensayos anteriores. Las condiciones de cultivo restantes fueron las mismas que para el ensayo originalmente planteado. Por tratarse de un ensayo de prueba, el seguimiento del crecimiento se realizó mediante inspección visual.

Luego de 10 días de incubación se observó crecimiento en la condición NC. Para AC y N2+A2 no hubo desarrollo, conservándose la coloración verde inicial luego de la inoculación (Figura 34).

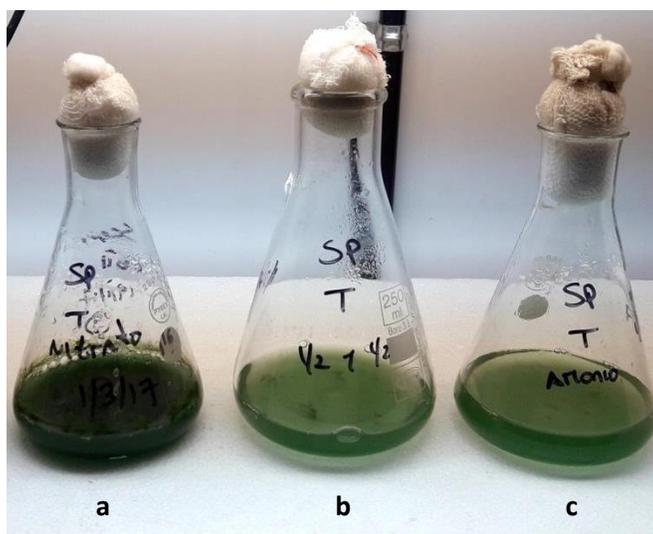


Figura 34– Crecimiento de *S. platensis* observado en el ensayo de prueba, luego de 10 días de incubación en presencia de a) solo nitrato de sodio a concentración NC; b) mezcla de nitrato de sodio y cloruro de amonio a concentraciones N2 y A2; c) solo cloruro de amonio a concentración AC.

A partir de los resultados hallados en la sección 5.1 (influencia del nitrato de sodio) se conoce que esta cepa de *S. platensis* es capaz de crecer en nitrato de sodio a concentraciones NC y N2, entre otras. Teniendo en cuenta lo antes expuesto, y que además en las condiciones en la que hubo presencia de cloruro de amonio (N2+A2 y AC) no hubo desarrollo, se estima que la ausencia de crecimiento observada en el experimento inicial se debe a la toxicidad del cloruro de amonio para esta cepa de *S. platensis* en las condiciones estudiadas.

5.3. Influencia de la urea

En la Figura 35 se puede apreciar el crecimiento de *S. platensis* para las distintas concentraciones de urea evaluadas, graficando la concentración de biomasa en g PS/L versus el tiempo en días. Como control se utilizó un cultivo en presencia de nitrato de sodio. Se pudo observar crecimiento hasta el día 8 para todas las condiciones ensayadas. Solo en las concentraciones más bajas de urea (U1 y U2) y en la condición control (NC) se registró crecimiento hasta el día 21 (Figura 36).

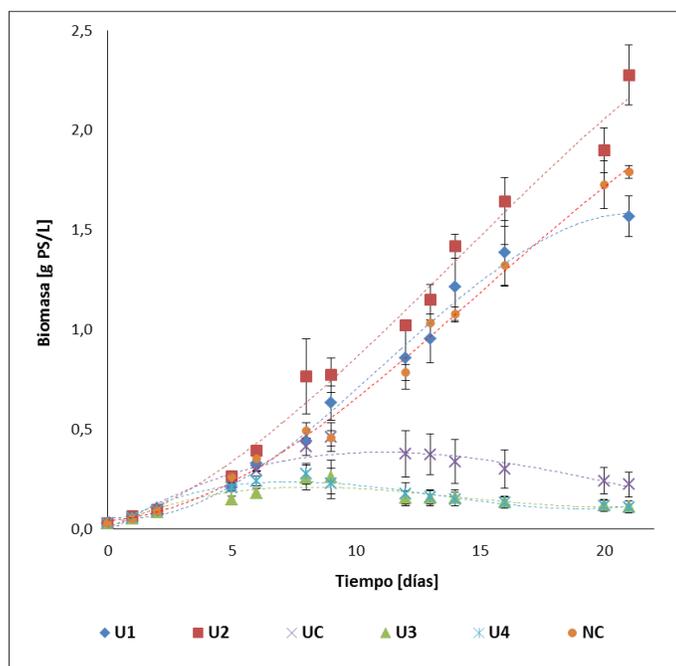


Figura 35- Curvas de crecimiento de *S. platensis* bajo distintas concentraciones de urea (U1, U2, UC, U3 y U4), y condición control en presencia de nitrato de sodio (NC). U1= 0,22 g/L; U2= 0,44 g/L; U3= 1,32 g/L; U4= 1,55 g/L; NC= 2,50 g/L.

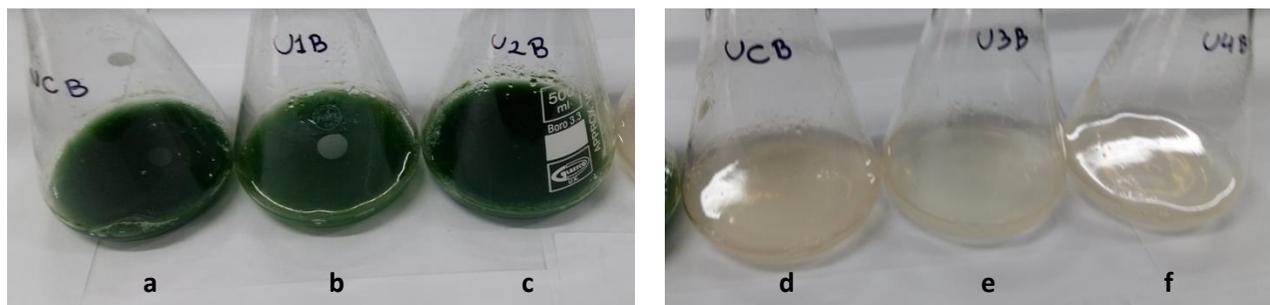


Figura 36- Crecimiento de *S. platensis* observado en una de las réplicas del ensayo sobre la influencia de la urea, luego de 21 días de incubación: a) condición NC (control); b) condición U1; c) condición U2; d) condición UC; e) condición U3; f) condición U4. U1= 0,22 g/L; U2= 0,44 g/L; U3= 1,32 g/L; U4= 1,55 g/L; NC= 2,50 g/L (U: urea; N; nitrato de sodio).

A los 21 días de cultivo se observó un incremento significativo del 27% en la producción de biomasa para la condición U2, respecto al control (NC). Solo hubo crecimiento hasta el día 8 para las condiciones de elevada concentración de urea UC, U3 y U4. Se observó un incremento de μ del 26% para U2 respecto de NC,

mientras que para U3 y U4 se apreció una disminución del 23% y del 18%, respectivamente, respecto del control. En la Tabla 28 se muestran los parámetros cinéticos de crecimiento para las distintas condiciones.

Tabla 28- Parámetros de crecimiento de *S. platensis* para las distintas concentraciones de urea (y condición control en presencia de nitrato de sodio). Los valores se encuentran expresados como el promedio \pm DS (n=3). Dentro de la misma columna, letras diferentes representan agrupamientos con diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%, según un test ANOVA seguido de una prueba HSD de Tukey. U1= 0,22 g/L; U2= 0,44 g/L; U3= 1,32 g/L; U4= 1,55 g/L; NC= 2,50 g/L (U: urea; N; nitrato de sodio).

Condición	Biomasa final [g PS/L]	μ [día ⁻¹]	Tiempo de duplicación [día]	Índice de crecimiento
U1	1,57 \pm 0,10 ^a	0,278 \pm 0,027 ^{a,b}	2,51 \pm 0,24 ^{a,b}	52,3 \pm 3,5 ^a
U2	2,28 \pm 0,15 ^b	0,351 \pm 0,021 ^a	1,98 \pm 0,12 ^a	76,5 \pm 5,1 ^b
UC	-	0,284 \pm 0,015 ^{a,b}	2,44 \pm 0,13 ^{a,b}	-
U3	-	0,213 \pm 0,053 ^b	3,42 \pm 0,95 ^b	-
U4	-	0,229 \pm 0,018 ^b	3,04 \pm 0,24 ^{a,b}	-
NC	1,79 \pm 0,03 ^a	0,278 \pm 0,010 ^{a,b}	2,49 \pm 0,09 ^{a,b}	60,4 \pm 1,1 ^a

En lo que respecta a la composición bioquímica, no hubo diferencias significativas en el contenido de proteínas para los condiciones U1 y U2 (las únicas que presentaron crecimiento hasta el día 21) respecto a NC (Figura 37). Se apreciaron diferencias significativas en el contenido de lípidos (Figura 38), observándose un incremento del 196% para U1 y del 98% para U2, respecto al control. En relación al contenido de carbohidratos (Figura 39) también se observó un incremento significativo del 71% para la condición U1 respecto a NC.

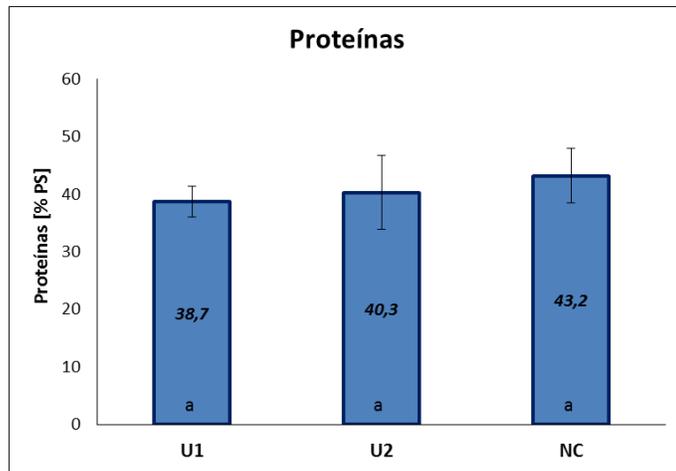


Figura 37- Contenido de proteínas de *S. platensis* para las distintas concentraciones de urea (y control en presencia de nitrato de sodio). El valor numérico dentro de cada barra corresponde al valor promedio (n=3) de la condición ensayada. Las letras dentro de las barras indican agrupamientos con diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%, según un test ANOVA seguido de una prueba HSD de Tukey. U1= 0,22 g/L; U2= 0,44; NC= 2,50 g/L (U: urea; N; nitrato de sodio).

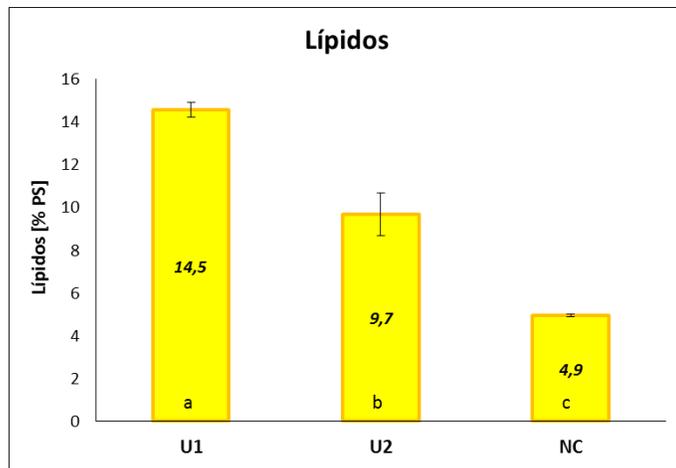


Figura 38- Contenido de lípidos de *S. platensis* para las distintas concentraciones de urea (y control en presencia de nitrato de sodio). El valor numérico dentro de cada barra corresponde al valor promedio (n=3) de la condición ensayada. Las letras dentro de las barras indican agrupamientos con diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%, según un test ANOVA seguido de una prueba HSD de Tukey. U1= 0,22 g/L; U2= 0,44; NC= 2,50 g/L (U: urea; N; nitrato de sodio).

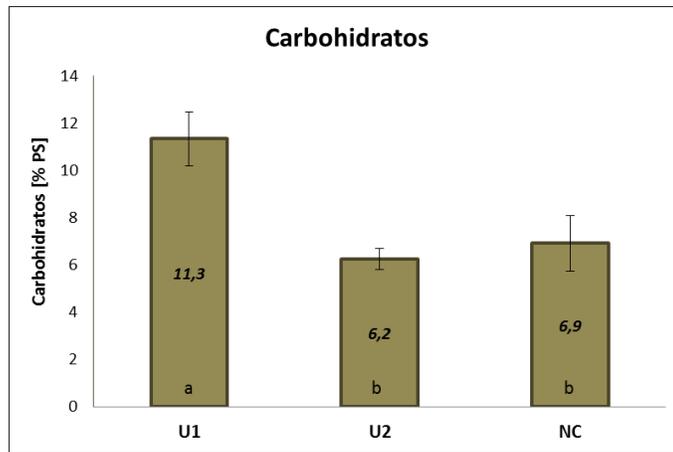


Figura 39- Contenido de carbohidratos de *S. platensis* para las distintas concentraciones de urea (y control en presencia de nitrato de sodio). El valor numérico dentro de cada barra corresponde al valor promedio (n=3) de la condición ensayada. Las letras dentro de las barras indican agrupamientos con diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%, según un test ANOVA seguido de una prueba HSD de Tukey. U1= 0,22 g/L; U2= 0,44; NC= 2,50 g/L (U: urea; N; nitrato de sodio).

En lo que respecta al contenido de pigmentos, no se observaron diferencias significativas en el contenido de ficocianina (Figura 40), clorofila *a* (Figura 41) y carotenoides (Figura 42) para las condiciones U1 y U2 (las cuales presentaron crecimiento hasta el día 21), respecto a la condición control (NC).

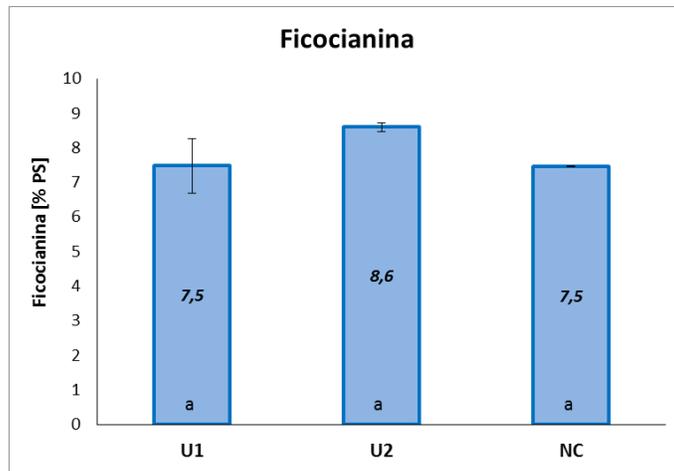


Figura 40- Contenido de ficocianina de *S. platensis* para las distintas concentraciones de urea (y control en presencia de nitrato de sodio). El valor numérico dentro de cada barra corresponde al valor promedio (n=3) de la condición ensayada. Las letras dentro de las barras indican agrupamientos con diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%, según un test ANOVA seguido de una prueba HSD de Tukey. U1= 0,22 g/L; U2= 0,44; NC= 2,50 g/L (U: urea; N; nitrato de sodio).

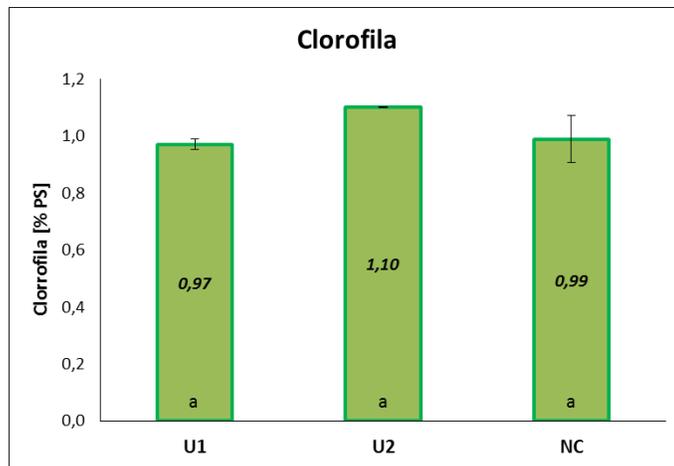


Figura 41- Contenido de clorofila *a* de *S. platensis* para las distintas concentraciones de urea (y control en presencia de nitrato de sodio). El valor numérico dentro de cada barra corresponde al valor promedio (n=3) de la condición ensayada. Las letras dentro de las barras indican agrupamientos con diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%, según un test ANOVA seguido de una prueba HSD de Tukey. U1= 0,22 g/L; U2= 0,44; NC= 2,50 g/L (U: urea; N; nitrato de sodio).

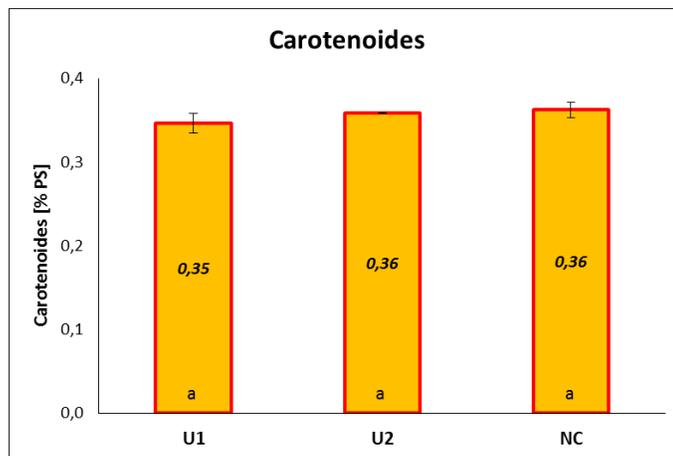


Figura 42- Contenido de carotenoides de *S. platensis* para las distintas concentraciones de urea (y control en presencia de nitrato de sodio). El valor numérico dentro de cada barra corresponde al valor promedio (n=3) de la condición ensayada. Las letras dentro de las barras indican agrupamientos con diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%, según un test ANOVA seguido de una prueba HSD de Tukey. U1= 0,22 g/L; U2= 0,44; NC= 2,50 g/L (U: urea; N; nitrato de sodio).

5.4. Influencia del fosfato ácido de potasio

En la Figura 43 se puede apreciar el crecimiento de *S. platensis* para las distintas concentraciones de fosfato ácido de potasio ensayadas, graficando la concentración de biomasa en g PS/L versus el tiempo en días. Se observó crecimiento para todas las condiciones ensayadas. Hasta el día 8 se distinguió un crecimiento exponencial, según el mayor valor obtenido para el coeficiente de determinación R^2 .

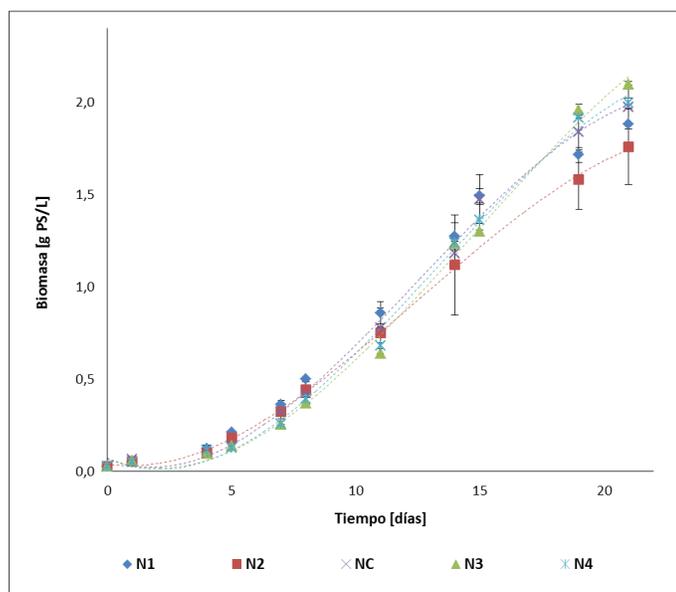


Figura 43- Curvas de crecimiento de *S. platensis* bajo distintas concentraciones de fosfato ácido de potasio. F1= 0,13 g/L; F2= 0,25 g/L; FC= 0,50 g/L; F3= 0,75 g/L; F4= 0,88 g/L.

A los 21 días de cultivo no se observaron diferencias significativas en la producción final de biomasa. Tampoco se registraron diferencias en el valor de μ para las condiciones ensayadas. En la Tabla 29 se muestran los parámetros cinéticos de crecimiento para las distintas condiciones.

Tabla 29- Parámetros de crecimiento de *S. platensis* para las distintas concentraciones de fosfato ácido de potasio. Los valores se encuentran expresados como el promedio \pm DS (n=3). Dentro de la misma columna, letras diferentes representan agrupamientos con diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%, según un test ANOVA seguido de una prueba HSD de Tukey. F1= 0,13 g/L; F2= 0,25 g/L; FC= 0,50 g/L; F3= 0,75 g/L; F4= 0,88 g/L.

Condición	Biomasa final [g PS/L]	μ [día ⁻¹]	Tiempo de duplicación [día]	Índice de crecimiento
F1	1,30 \pm 0,11 ^a	0,143 \pm 0,012 ^a	4,88 \pm 0,43 ^a	26,0 \pm 2,2 ^a
F2	1,29 \pm 0,03 ^a	0,142 \pm 0,015 ^a	4,94 \pm 0,53 ^a	25,7 \pm 0,6 ^a
FC	1,30 \pm 0,05 ^a	0,151 \pm 0,017 ^a	4,64 \pm 0,52 ^a	25,9 \pm 1,0 ^a
F3	1,28 \pm 0,03 ^a	0,144 \pm 0,010 ^a	4,82 \pm 0,33 ^a	25,6 \pm 0,5 ^a
F4	1,28 \pm 0,11 ^a	0,140 \pm 0,005 ^a	4,95 \pm 0,18 ^a	25,6 \pm 2,2 ^a

En relación a la composición bioquímica, no hubo diferencias significativas en el contenido de proteínas respecto al control (FC) (Figura 44). Tampoco se observaron diferencias significativas en el contenido de lípidos entre las distintas condiciones (Figura 45). En cuanto al contenido de carbohidratos (Figura 46), si bien las diferencias no son significativas para el resto de las condiciones ensayadas, sí se observó un incremento del 30% en la condición de más baja concentración de fosfato ácido de potasio (F1) respecto al control.

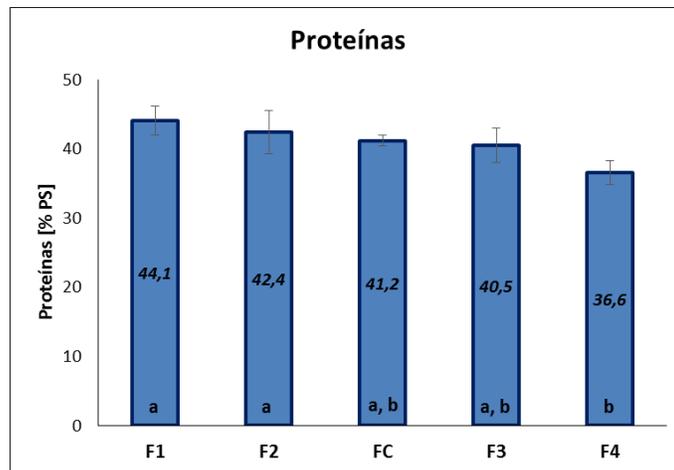


Figura 44- Contenido de proteínas de *S. platensis* para las distintas concentraciones de fosfato ácido de potasio. El valor numérico dentro de cada barra corresponde al valor promedio (n=3) de la condición ensayada. Las letras dentro de las barras indican agrupamientos con diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%, según un test ANOVA seguido de una prueba HSD de Tukey. F1= 0,13 g/L; F2= 0,25 g/L; FC= 0,50 g/L; F3= 0,75 g/L; F4= 0,88 g/L.

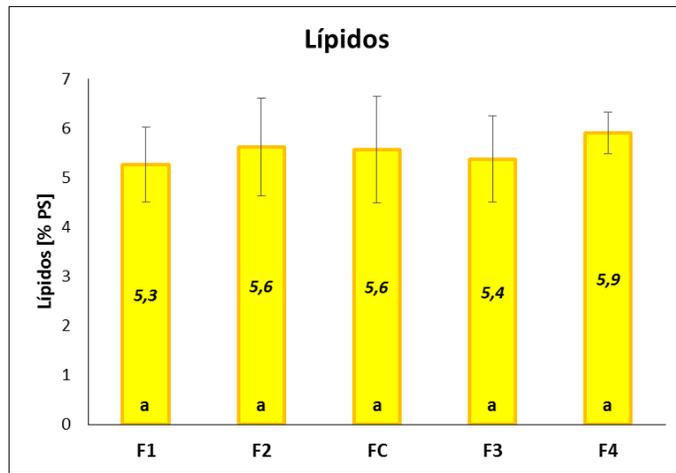


Figura 45- Contenido de lípidos de *S. platensis* para las distintas concentraciones de fosfato ácido de potasio. El valor numérico dentro de cada barra corresponde al valor promedio (n=3) de la condición ensayada. Las letras dentro de las barras indican agrupamientos con diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%, según un test ANOVA seguido de una prueba HSD de Tukey. F1= 0,13 g/L; F2= 0,25 g/L; FC= 0,50 g/L; F3= 0,75 g/L; F4= 0,88 g/L.

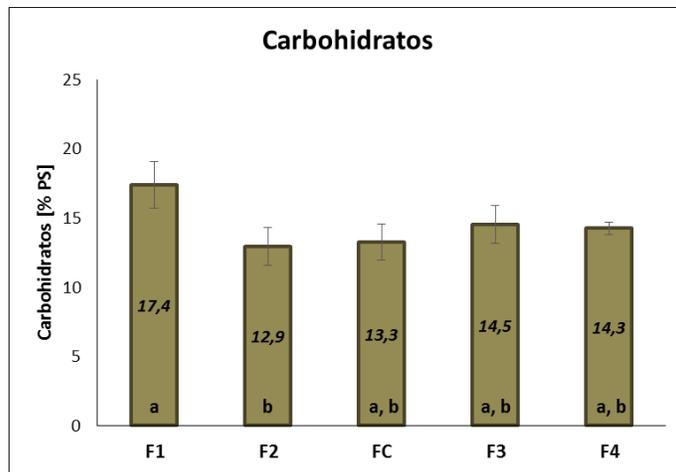


Figura 46- Contenido de carbohidratos de *S. platensis* para las distintas concentraciones de fosfato ácido de potasio. El valor numérico dentro de cada barra corresponde al valor promedio (n=3) de la condición ensayada. Las letras dentro de las barras indican agrupamientos con diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%, según un test ANOVA seguido de una prueba HSD de Tukey. F1= 0,13 g/L; F2= 0,25 g/L; FC= 0,50 g/L; F3= 0,75 g/L; F4= 0,88 g/L.

En referencia al contenido de los pigmentos, no se observaron diferencias significativas entre las distintas condiciones estudiadas, tanto para el contenido de ficocianina (Figura 47), como para el contenido de clorofila *a* (Figura 48) y carotenoides (Figura 49).

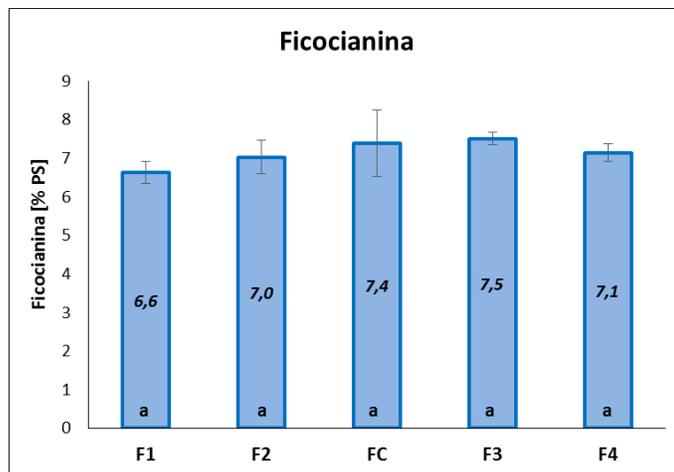


Figura 47– Contenido de ficocianina de *S. platensis* para las distintas concentraciones de fosfato ácido de potasio. El valor numérico dentro de cada barra corresponde al valor promedio (n=3) de la condición ensayada. Las letras dentro de las barras indican agrupamientos con diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%, según un test ANOVA seguido de una prueba HSD de Tukey. F1= 0,13 g/L; F2= 0,25 g/L; FC= 0,50 g/L; F3= 0,75 g/L; F4= 0,88 g/L.

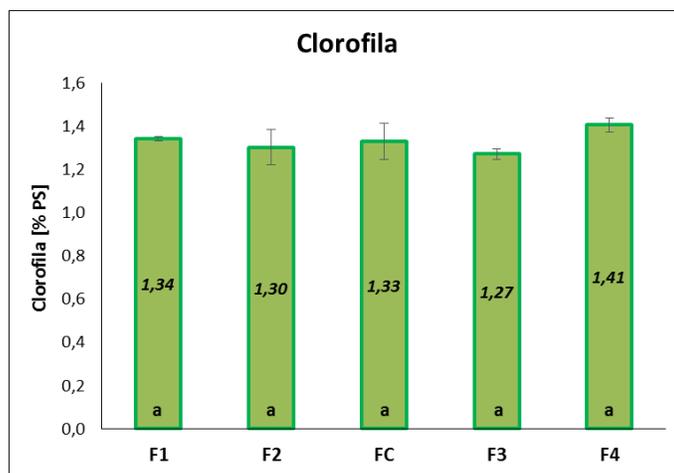


Figura 48– Contenido de clorofila *a* de *S. platensis* para las distintas concentraciones de fosfato ácido de potasio. El valor numérico dentro de cada barra corresponde al valor promedio (n=3) de la condición ensayada. Las letras dentro de las barras indican agrupamientos con diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%, según un test ANOVA seguido de una prueba HSD de Tukey. F1= 0,13 g/L; F2= 0,25 g/L; FC= 0,50 g/L; F3= 0,75 g/L; F4= 0,88 g/L.

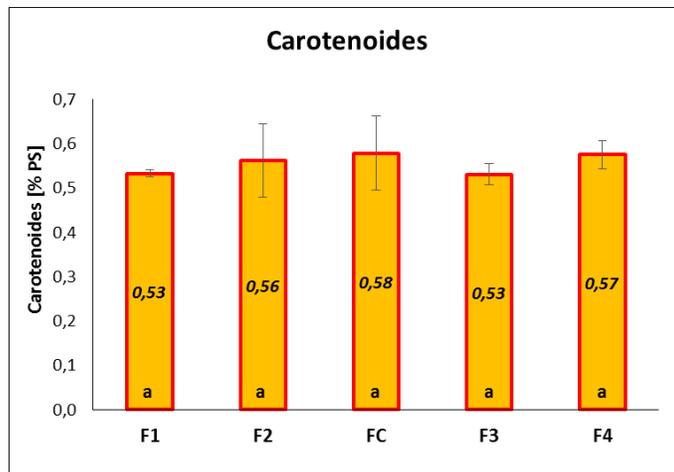


Figura 49- Contenido de carotenoides de *S. platensis* para las distintas concentraciones de fosfato ácido de potasio. El valor numérico dentro de cada barra corresponde al valor promedio (n=3) de la condición ensayada. Las letras dentro de las barras indican agrupamientos con diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%, según un test ANOVA seguido de una prueba HSD de Tukey. F1= 0,13 g/L; F2= 0,25 g/L; FC= 0,50 g/L; F3= 0,75 g/L; F4= 0,88 g/L.

5.5. Influencia del fosfato monocalcico

5.5.1. Incorporación del fosfato monocalcico al medio de cultivo

Previo a la realización del ensayo para el estudio de la influencia del fosfato monocalcico se llevó a cabo un ensayo preliminar donde se evaluó la forma de incorporar esta nueva fuente de fósforo al medio de cultivo.

Tras 10 días de incubación, en ninguna de las condiciones que presentaban fosfato monocalcico disuelto (debido a la incorporación de EDTA disódico, condiciones 1, 2 y 3) hubo crecimiento de *S. platensis* (Figura 50); se observó incluso un deterioro celular de lo inoculado. Por el contrario, se observó desarrollo microalgal en todas las condiciones en las que se incorporó el fosfato monocalcico en forma sólida (condiciones 4 y 5); incluso el desarrollo fue similar al observado en la condición control (condición 6 con fosfato ácido de potasio). Asimismo, no se observaron diferencias en el crecimiento en las condiciones a las que se les adicionó potasio en forma de cloruro de potasio (condiciones 3 y 5) y en las que no se les incorporó (condiciones 2 y 4); esto es, si comparamos cualitativamente el desarrollo entre las condiciones 2 y 3 (con fosfato monocalcico disuelto), y entre las condiciones 4 y 5 (con fosfato monocalcico sólido).

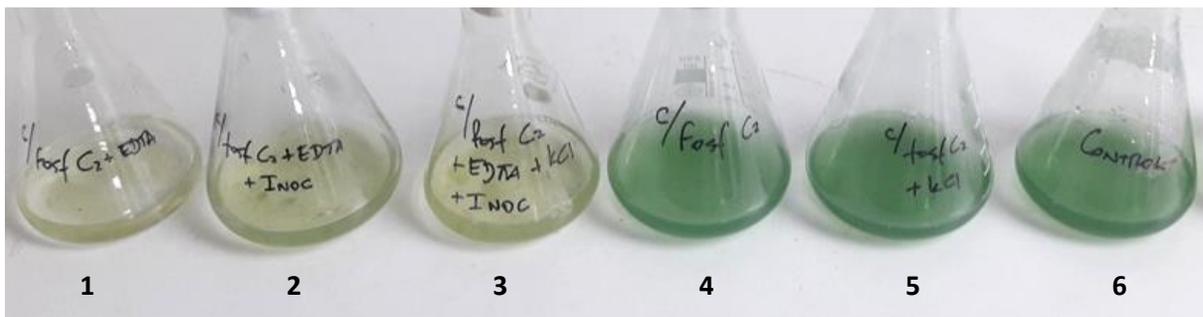


Figura 50 - Crecimiento de *S. platensis* observado en el ensayo preliminar de incorporación del fosfato monocalcico al medio de cultivo, luego de 10 días de incubación. Los números representan cada una de las condiciones descritas en la Tabla 22.

A partir de estos resultados se pudo determinar que la adición de EDTA disódico para la disolución del fosfato monocalcico no permite el crecimiento de *S. platensis*, debido quizás a la elevada salinidad que generaría tal adición. Cabe recordar que con esta modalidad de preparación se están incorporando 8 g de EDTA disódico por cada 1 g de fosfato monocalcico que se agrega al medio de cultivo. De esta manera, el EDTA disódico agregado incrementa en un 13% el contenido (en masa) de las sales totales de la formulación.

Los resultados hallados también permitieron establecer que la adición de fosfato monocálcico en forma sólida permite un adecuado desarrollo de *S. platensis*.

Por otra parte, se vio que no es necesaria la incorporación de potasio al reemplazar las fuentes de fósforo (fosfato ácido de potasio por fosfato monocálcico). Esto podría deberse a que el aporte de potasio provendría del sulfato de potasio, presente también en el medio de cultivo Zarrouk incluso a una mayor concentración que el fosfato ácido de potasio (Markou et al., 2012).

En base a los resultados obtenidos, se concluye que el mejor modo de incorporar el fosfato monocálcico al medio de cultivo es en forma sólida, y que, por otra parte, no es necesario el agregado de cloruro de potasio para satisfacer aportes de potasio.

5.5.2. Ensayo de influencia del fosfato monocálcico

De acuerdo a los resultados obtenidos en el estudio de la incorporación del fosfato monocálcico al medio de cultivo, se diseñó la experiencia para evaluar la influencia del mismo sobre el crecimiento de *S. platensis*.

En la Figura 51 se puede apreciar el crecimiento de *S. platensis* para las distintas concentraciones de fosfato monocálcico, graficando la concentración de biomasa en g PS/L versus el tiempo en días. Como control se utilizó fosfato ácido de potasio en el medio de cultivo. Se pudo observar crecimiento microalgal en todas las condiciones ensayadas. Hasta el día 8 se distinguió un crecimiento exponencial, según el mayor valor obtenido para el coeficiente de determinación R^2 .

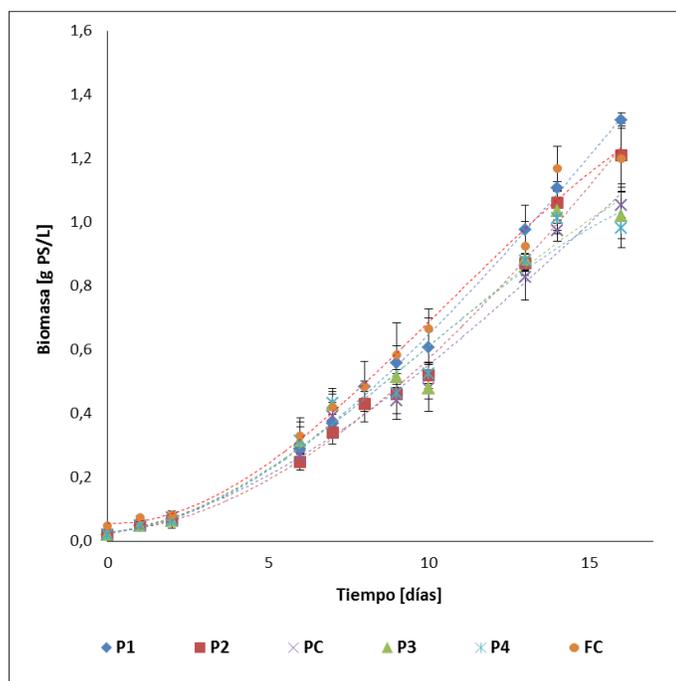


Figura 51- Curvas de crecimiento de *S. platensis* bajo distintas concentraciones de fosfato monocálcico (y condición control en presencia de fosfato ácido de potasio). P1= 0,09 g/L; P2= 0,18 g/L; PC= 0,36 g/L; P3= 0,54 g/L; P4= 0,63 g/L; FC= 0,50 g/L (P: fosfato monocálcico; F: fosfato ácido de potasio).

A los 16 días de cultivo no se observaron diferencias significativas en la producción final de biomasa respecto al control (FC). No obstante, se observó que a medida que disminuye la concentración de fosfato monocálcico se incrementa la producción de biomasa, encontrándose diferencias significativas de producción a bajas concentraciones de fosfato monocálcico (P1 y P2) respecto a la concentración intermedia (PC), la cual posee la misma concentración de fósforo que FC, resultando en incrementos del 26% y del 14% respectivamente. No se observaron diferencias significativas en la μ entre las distintas condiciones ensayadas. En la Tabla 30 se detallan los parámetros cinéticos de crecimiento para las distintas condiciones.

Tabla 30- Parámetros de crecimiento de *S. platensis* para las distintas concentraciones de fosfato monocalcico (y condición control en presencia de fosfato ácido de potasio). Los valores se encuentran expresados como el promedio \pm DS (n=3). Dentro de la misma columna, letras diferentes representan agrupamientos con diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%, según un test ANOVA seguido de una prueba HSD de Tukey. P1= 0,09 g/L; P2= 0,18 g/L; PC= 0,36 g/L; P3= 0,54 g/L; P4= 0,63 g/L; FC= 0,50 g/L (P: fosfato monocalcico; F: fosfato ácido de potasio).

Condición	Biomasa final [g PS/L]	μ [día ⁻¹]	Tiempo de duplicación [día]	Índice de crecimiento
P1	1,32 \pm 0,02 ^a	0,309 \pm 0,031 ^a	2,26 \pm 0,23 ^a	26,2 \pm 0,5 ^a
P2	1,21 \pm 0,10 ^{a,b}	0,303 \pm 0,034 ^a	2,30 \pm 0,26 ^a	23,9 \pm 2,1 ^{a,b}
PC	1,06 \pm 0,04 ^b	0,293 \pm 0,024 ^a	2,99 \pm 0,87 ^a	20,7 \pm 0,8 ^b
P3	1,02 \pm 0,10 ^b	0,312 \pm 0,030 ^a	2,24 \pm 0,21 ^a	20,0 \pm 2,1 ^b
P4	0,98 \pm 0,03 ^b	0,303 \pm 0,040 ^a	2,31 \pm 0,30 ^a	19,2 \pm 0,7 ^b
FC	1,20 \pm 0,10 ^{a,b}	0,291 \pm 0,028 ^a	2,40 \pm 0,24 ^a	23,7 \pm 2,1 ^{a,b}

En lo que respecta a la composición bioquímica, no se registraron diferencias significativas entre las distintas condiciones evaluadas, tanto en el contenido de proteínas (Figura 52), como en el contenido de lípidos (Figura 53) y en el contenido de carbohidratos (Figura 54).

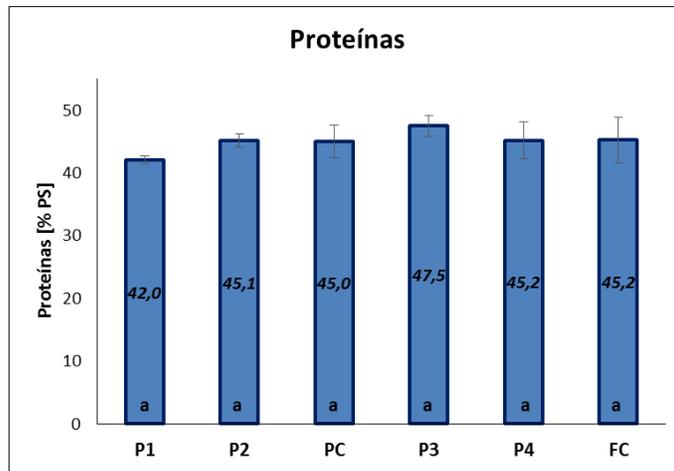


Figura 52- Contenido de proteínas de *S. platensis* para las distintas concentraciones de fosfato monocalcico (y control en presencia de fosfato ácido de potasio). El valor numérico dentro de cada barra corresponde al valor promedio (n=3) de la condición ensayada. Las letras dentro de las barras indican agrupamientos con diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%, según un test ANOVA seguido de una prueba HSD de Tukey. P1= 0,09 g/L; P2= 0,18 g/L; PC= 0,36 g/L; P3= 0,54 g/L; P4= 0,63 g/L; FC= 0,50 g/L (P: fosfato monocalcico; F: fosfato ácido de potasio).

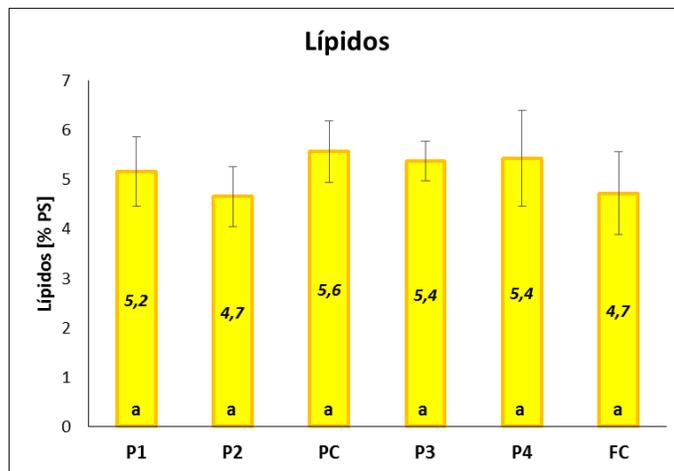


Figura 53- Contenido de lípidos de *S. platensis* para las distintas concentraciones de fosfato monocalcico (y control en presencia de fosfato ácido de potasio). El valor numérico dentro de cada barra corresponde al valor promedio (n=3) de la condición ensayada. Las letras dentro de las barras indican agrupamientos con diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%, según un test ANOVA seguido de una prueba HSD de Tukey. P1= 0,09 g/L; P2= 0,18 g/L; PC= 0,36 g/L; P3= 0,54 g/L; P4= 0,63 g/L; FC= 0,50 g/L (P: fosfato monocalcico; F: fosfato ácido de potasio).

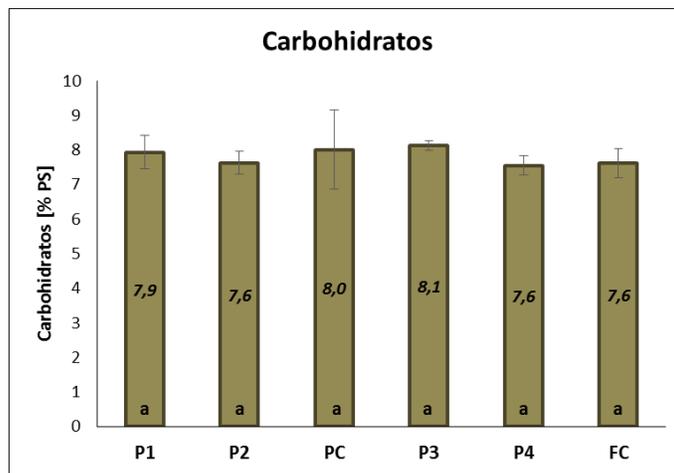


Figura 54– Contenido de carbohidratos de *S. platensis* para las distintas concentraciones de fosfato monocálcico (y control en presencia de fosfato ácido de potasio). El valor numérico dentro de cada barra corresponde al valor promedio (n=3) de la condición ensayada. Las letras dentro de las barras indican agrupamientos con diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%, según un test ANOVA seguido de una prueba HSD de Tukey. P1= 0,09 g/L; P2= 0,18 g/L; PC= 0,36 g/L; P3= 0,54 g/L; P4= 0,63 g/L; FC= 0,50 g/L (P: fosfato monocálcico; F: fosfato ácido de potasio).

Respecto al contenido de pigmentos, no se observaron diferencias significativas en el contenido de ficocianina (Figura 55) y en el contenido de carotenoides (Figura 57) entre las distintas condiciones ensayadas. Tampoco hubo diferencias significativas en el contenido de clorofila *a* (Figura 56), sin embargo se observó un incremento de la misma bajo concentraciones de fosfato monocálcico bajas (P1 y P2) respecto a la concentración intermedia PC (del 26% y del 25%, respectivamente) y también respecto a FC.

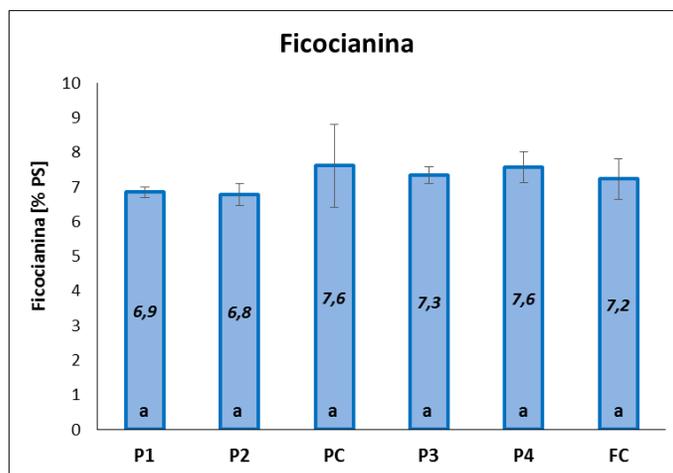


Figura 55– Contenido de ficocianina de *S. platensis* para las distintas concentraciones de monocalcico (y control en presencia de fosfato ácido de potasio). El valor numérico dentro de cada barra corresponde al valor promedio (n=3) de la condición ensayada. Las letras dentro de las barras indican agrupamientos con diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%, según un test ANOVA seguido de una prueba HSD de Tukey. P1= 0,09 g/L; P2= 0,18 g/L; PC= 0,36 g/L; P3= 0,54 g/L; P4= 0,63 g/L; FC= 0,50 g/L (P: fosfato monocalcico; F: fosfato ácido de potasio).

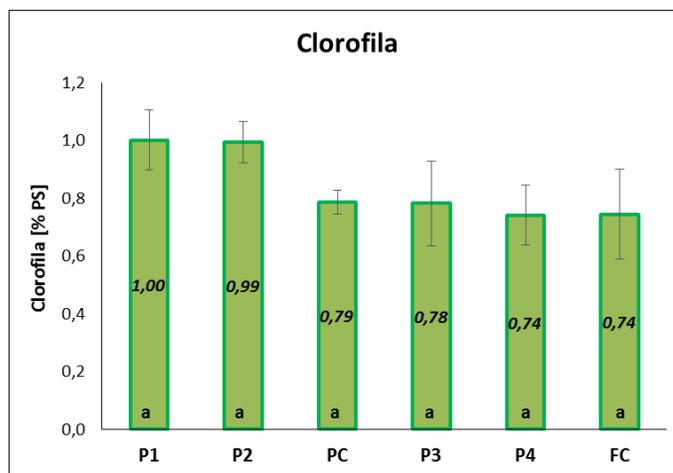


Figura 56– Contenido de clorofila *a* de *S. platensis* para las distintas concentraciones de fosfato monocalcico (y control en presencia de fosfato ácido de potasio). El valor numérico dentro de cada barra corresponde al valor promedio (n=3) de la condición ensayada. Las letras dentro de las barras indican agrupamientos con diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%, según un test ANOVA seguido de una prueba HSD de Tukey. P1= 0,09 g/L; P2= 0,18 g/L; PC= 0,36 g/L; P3= 0,54 g/L; P4= 0,63 g/L; FC= 0,50 g/L (P: fosfato monocalcico; F: fosfato ácido de potasio).

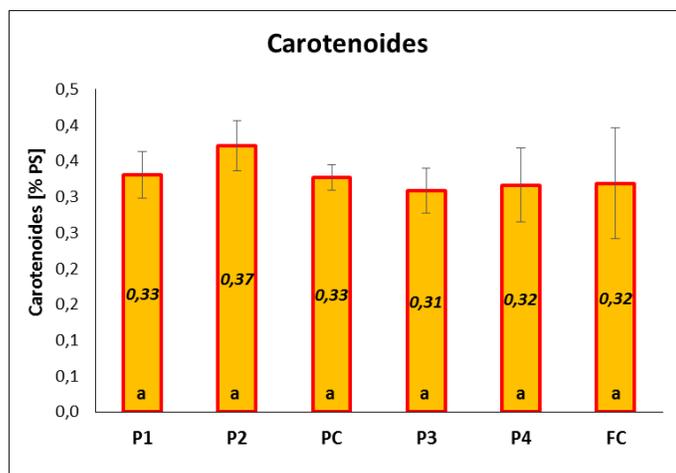


Figura 57- Contenido de carotenoides de *S. platensis* para las distintas concentraciones de fosfato monocálcico (y control en presencia de fosfato ácido de potasio). El valor numérico dentro de cada barra corresponde al valor promedio (n=3) de la condición ensayada. Las letras dentro de las barras indican agrupamientos con diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%, según un test ANOVA seguido de una prueba HSD de Tukey. P1= 0,09 g/L; P2= 0,18 g/L; PC= 0,36 g/L; P3= 0,54 g/L; P4= 0,63 g/L; FC= 0,50 g/L (P: fosfato monocálcico; F: fosfato ácido de potasio).

6. Discusión

6.1. Influencia del nitrato de sodio, del cloruro de amonio y de la urea

El nitrato de sodio es la fuente de nitrógeno más comúnmente utilizado en la formulación de los medios de cultivo. No obstante, su costo es elevado en relación a otras fuentes. En relación a esta fuente de nitrógeno se observó que la producción de biomasa no varió con una disminución en la concentración de nitrato de sodio (Tabla 27 y Figura 25). Este efecto ha sido previamente descrito por otros autores trabajando con otras cepas de *S. platensis* (Boussiba & Richmond, 1980; Çelekli & Yavuzatmaca, 2009; Colla et al., 2007; De Carvalho et al., 2014; Peter et al., 2010). Lo mismo fue observado por Olgún et al. (2001) al cultivar *S. platensis* en un medio de cultivo conformado por agua de mar suplementada con porcinaza. Por otra parte, lo hallado difiere de lo observado por Canto de Loura et al. (1987) al cultivar las cianobacterias *Pseudanabaena* sp. y *Oscillatoria splendida*, quienes encontraron que a una concentración nula de nitrógeno se incrementó la producción de biomasa, atribuyéndolo a la acumulación de polifosfatos y de glucógeno intracelulares. También difiere de lo encontrado por Coboz Ruiz et al. (2016), que determinaron que para las microalgas *Ankistrodesmus* sp., *Ankistrodesmus nannoselene*, *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp. y *Scenedesmus quadricauda*, se obtiene mayor producción de biomasa y tasa de crecimiento a mayor disponibilidad de nitrógeno.

Tampoco se encontró variación de algunos compuestos como clorofila *a* (Figura 30), carotenoides (Figura 31) y carbohidratos (Figura 28) para las distintas concentraciones de nitrato de sodio evaluadas sobre *S. platensis*, lo cual es consistente con lo hallado por otros autores bajo condiciones similares de cultivo (Boussiba & Richmond, 1980; Peter et al., 2010). Si a esta característica se pone en consideración que a bajas concentraciones se observó un incremento en la μ , el empleo de bajas concentraciones de nitrato de sodio no solo representa una disminución en el costo, sino también un incremento en la productividad de los compuestos antes mencionados.

Lo hallado en cuanto a los contenidos de clorofila *a* y de carotenoides difiere de lo observado por El-Baky et al. (2008), quienes encontraron una disminución para clorofila *a* y un incremento para carotenoides al disminuir la concentración de nitrato de sodio. Los autores atribuyeron la disminución en clorofila *a* a la menor disponibilidad de nitrógeno, teniendo en cuenta que este elemento forma parte de la molécula de este pigmento. También indicaron que la síntesis de carotenoides continúa normalmente al no requerirse nitrógeno, pero que al haber menor división celular (menor μ) ocurre la acumulación de este pigmento. Para las cianobacterias *Pseudanabaena* sp y *Oscillatoria splendida*, Canto de Loura et al. (1987) observaron que a concentración nula de nitrógeno, se incrementó el contenido de carotenoides y la concentración de

clorofila *a* se mantuvo sin cambios. Allen & Smith (1969) encontraron que en el cultivo de la cianobacteria *Anacystis nidulans*, a concentración nula de nitrógeno hubo una disminución de clorofila *a* mientras que el contenido de carotenoides se incrementó.

Con relación a la μ , se han reportado diversos efectos utilizando esta fuente de nitrógeno sobre algunas especies del género *Spirulina*. El-Baky et al. (2008) observaron que al disminuir la concentración de nitrato de sodio se produjo una disminución de la μ en cultivos de *S. maxima*. Colla et al. (2007) no observaron cambios en la μ a distintas temperaturas, utilizando distintas concentraciones de nitrato de sodio en cultivos de *S. platensis*. Particularmente, nuestra cepa de estudio, y en contraste con lo reportado por estos autores, registró un incremento de la μ en presencia de bajas concentraciones de nitrato de sodio.

Ante la limitación de nitrato de sodio, *S. platensis* utilizaría c-ficocianina como reserva (Allen & Smith, 1969; Boussiba & Richmond, 1980; De Carvalho et al. 2014; El-Baky, 2003; Peter et al., 2010), con la consecuente disminución en el contenido de este pigmento (Figura 29) y en el de proteínas (Figura 26). Este fenómeno ya ha sido descrito para varias cepas de *S. platensis* y *S. maxima* (Allen & Smith, 1969; Boussiba & Richmond, 1980; De Carvalho et al. 2014; El-Baky, 2003; El-Baky et al., 2008; Olguín et al. 2001; Peter et al., 2010). Al disponerse de una reserva de nitrógeno, se encuentra posibilitado el crecimiento de la microalga sin cambios apreciables en la producción de biomasa. Como respuesta a la disminución en el contenido proteico, *S. platensis* acumularía lípidos como reserva energética (Figura 27), lo cual estaría en concordancia con lo reportado por Olguín et al., 2001. Por otro lado, no se produjeron cambios en la síntesis de aquellos compuestos que no requieren nitrógeno, como los carotenoides y los carbohidratos.

El cloruro de amonio y la urea son fuentes de nitrógeno más fácilmente asimilables que el nitrato de sodio (Converti et al., 2006; Markou et al., 2014a) por requerirse menos energía para su incorporación (Perez-García et al., 2011). Por este motivo su empleo genera una mayor producción de biomasa y una más elevada μ , tal como se observó al cultivar *S. platensis* en presencia de urea (Tabla 28 y Figura 35). Varios autores han reportado este efecto sobre distintas cepas de *S. platensis* en presencia esta fuente de nitrógeno (Converti et al., 2006; De Oliveira Rangel-Yagui et al., 2004; Fagiri et al., 2013; Mashor et al., 2015; Soletto et al., 2005). Si para lo antes mencionado tenemos en cuenta que estas fuentes de nitrógeno son más económicas (Converti et al., 2006; Sassano et al., 2007), su uso no solo genera un menor costo de cultivo sino también incrementos de productividad respecto al uso del nitrato de sodio. La urea es empleada como fertilizante en agricultura por lo que su disponibilidad y su costo representan un atractivo económico como fuente de nitrógeno. Kumari et al. (2015), Mashor et al. (2016) y Pai et al. (2008)

cultivaron *S. platensis* satisfactoriamente empleando medios de cultivo económicos elaborados con urea, fertilizantes del tipo superfosfato y otros compuestos de baja pureza.

No obstante, el amoníaco que se genera a partir del cloruro de amonio y de la urea, resulta tóxico para *S. platensis*, por lo que su crecimiento no sería factible a partir de determinadas concentraciones. Se ha reportado que el efecto inhibitorio del cloruro de amonio comienza a apreciarse a concentraciones que van de 1,6 mM a 2,0 mM (Converti et al., 2006; Cruz-Martínez et al., 2015; Sassano et al., 2007; Soletto et al., 2005). Esto es consistente con lo observado (Figura 32, Figura 33 y Figura 34), ya que no hubo crecimiento para ninguna de las condiciones, siendo de 3,7 mM (0,22 g/L) la mínima concentración de cloruro de amonio empleada. Dado que la formación del amoníaco tóxico a partir de la urea se produce por acción de la enzima ureasa (Flores & Herrero, 2005; Perez-Garcia et al., 2011), *S. platensis* tolera mayor concentración de urea que de cloruro de amonio (Converti et al., 2006). El efecto inhibitorio de la urea se observó a partir de una concentración 14,7 mM (0,88 g/L) (Figura 35 y Tabla 28), habiendo reportes diversos en cuanto a la concentración inhibitoria mínima. Soletto et al. (2005) observaron un efecto inhibitorio a partir de una concentración 1,7 mM, mientras que Kumari et al. (2015) reportaron una concentración de 1,5 g/L (25 mM) como la mínima inhibitoria. El efecto inhibitorio se acrecienta con el incremento del pH en el medio de cultivo (Markou et al., 2014a). Una forma de aprovechar las ventajas de estas fuentes de nitrógeno y evitar el efecto inhibitorio, es incorporarlas en biorreactores operando en modo fed-batch (Cruz-Martínez et al., 2015; Sassano et al., 2007).

A concentraciones de urea inferiores a la inhibitoria, se observaron incrementos en la producción de biomasa y en la μ al aumentar la concentración de urea (Figura 35 y Tabla 28), hecho que está en relación con lo reportado por otros autores (Converti et al., 2006; De Oliveira Rangel-Yagui et al., 2004; Soletto et al., 2005). Por otro lado, si bien las distintas concentraciones de urea ensayadas no generaron cambios en los contenidos de proteínas (Figura 37), de ficocianina (Figura 40), de clorofila *a* (Figura 41) y de carotenoides (Figura 42), las bajas concentraciones de urea condujeron a una acumulación de lípidos (Figura 38) y de carbohidratos (Figura 39). Ambas observaciones deben ser tenidas en cuenta al momento de diseñar procesos que tengan como objeto maximizar la productividad de la biomasa o de un compuesto de interés.

6.2. Influencia del fosfato ácido de potasio y del fosfato monocálcico

Al emplear distintas concentraciones de fosfato ácido de potasio como fuente de fósforo en cultivos de *S. platensis*, no se observaron variaciones en la producción de biomasa ni en la μ (Figura 43 y Tabla 29), lo cual

ha sido descrito también por De Carvalho et al. (2014) y Markou et al. (2012). Tampoco se modificaron los contenidos de proteínas (Figura 44) y de lípidos (Figura 45), como lo ha reportado Markou et al. (2012). Del mismo modo, no se registraron cambios en los contenidos de pigmentos como ficocianina (Figura 47), clorofila *a* (Figura 48) y carotenoides (Figura 49), lo que está en relación con lo reportado por Çelekli et al., (2009) y Markou et al. (2012). En cuanto a los carbohidratos, se encontró un leve incremento en su contenido a baja concentración de fósforo (Figura 46). Según Markou (2012), el carbohidrato de reserva mayoritario en las cianobacterias es el glucógeno. La enzima ADP-glucosa-pirofosforilasa, que controla la síntesis del glucógeno, es activada por el 3-fosfoglicerato (intermediario en la fijación de dióxido de carbono en el ciclo de Calvin) e inhibida por el fósforo inorgánico. Por lo tanto, una baja concentración intracelular de fósforo debida a una limitación de esta fuente, generaría una estimulación en la generación de glucógeno y un consecuente incremento en la concentración de carbohidratos en *S. platensis*.

El fosfato monocálcico es el componente principal de los fertilizantes SSP y TSP empleados en agricultura. Esto representa un atractivo económico en relación al uso de fosfato ácido de potasio. No obstante, la escasa solubilidad del fosfato monocálcico representa una desventaja para el cultivo. El aumento de la turbidez del medio de cultivo dificulta la penetración de la luz debido a la reflexión y al sombreado por parte de las partículas insolubles, ocasionando una disminución del crecimiento debido a la menor disponibilidad de luz para las células (Markou et al, 2012; Rodrigues et al., 2010). Esta turbidez podría explicar lo observado en lo que respecta a la producción de biomasa al variar la concentración del fosfato monocálcico en los cultivos de *S. platensis* (Figura 51 y Tabla 30), y estaría de acuerdo con lo descrito por Çelekli et al., (2009). Madkour et al. (2012), Mashor et al. (2016), Pai et al. (2008) y Raof et al. (2006), cultivaron *S. platensis* empleando medios de cultivo económicos conteniendo estos fertilizantes, distintas fuentes de fósforo y otros compuestos de baja pureza. En comparación al uso del fosfato ácido de potasio, las respuestas halladas por estos autores en cuanto a la producción de biomasa y la μ fueron variadas.

Al igual que para el fosfato ácido de potasio, para las distintas concentraciones de fosfato monocálcico no se observaron diferencias en los contenidos de proteínas (Figura 52), de lípidos (Figura 53), de ficocianina (Figura 55) y de carotenoides (Figura 57) de *S. platensis*. Por el contrario, no se observó acumulación de carbohidratos (Figura 54) y se encontró un leve incremento en el contenido de clorofila *a* a bajas concentraciones de fosfato monocálcico (Figura 56). Esto último puede atribuirse a una respuesta metabólica para mejorar la eficiencia fotosintética (Markou et al, 2012; Rodrigues et al., 2010), debido al sombreado que genera la mayor cantidad de biomasa a menores concentraciones de la fuente de fósforo.

Las escasas o nulas variaciones en el crecimiento, la composición bioquímica y el contenido de pigmentos, observadas a distintas concentraciones tanto de fosfato ácido de potasio como de fosfato monocálcico, podría deberse a la capacidad que posee *S. platensis* de acumular fósforo intracelular en forma de polifosfatos (Deschoenmaecker et al., 2016; Markou, 2012; Markou et al., 2014a). Esto último representa una ventaja económica, dado que permitiría iguales productividades a un menor costo de cultivo debido a una disminución en la incorporación de fósforo en el medio.

En lo que refiere a la fuente de fósforo, *S. platensis* tiene un bajo cociente k_q/Q_{max} (ver 2.4.2), pudiendo fácilmente mantener su crecimiento al adaptarse a las bajas concentraciones de la fuente de fósforo en el medio de cultivo (Grobbelaar, 2004). Debido a esta reserva, dispone de fósforo a pesar de la limitación externa de este nutriente. De esta manera puede satisfacer las necesidades de fósforo de los procesos metabólicos que lo requieren, sin grandes variaciones en su tasa crecimiento y en su composición (Markou et al, 2014a). Para observar cambios en la producción de biomasa y en la composición bioquímica, *S. platensis* debería cultivarse en condiciones que generen el agotamiento de esta reserva de fósforo de modo de provocar cambios en el metabolismo celular. Un ejemplo de esta condición sería el cultivo a una concentración externa inferior a 10 mg/L de fósforo (Markou, 2012). Este valor resulta la mitad de la menor concentración de fósforo ensayada en el presente trabajo. El incremento en el contenido de carbohidratos observado en los cultivos de *S. platensis* a la menor concentración de fosfato ácido de potasio, podría atribuirse a que la fuente de fósforo comenzó a agotarse.

Por otra parte, al no registrarse cambios en el crecimiento ni en la composición bioquímica de *S. platensis* a elevadas concentraciones de fosfato ácido de potasio y de fosfato monocálcico, se demuestra que estas fuentes de fósforo no resultan tóxicas para esta microalga en las condiciones estudiadas.

7. Conclusiones

De acuerdo a todo lo expuesto anteriormente se pudieron elaborar las siguientes conclusiones:

- Tanto la naturaleza como la concentración de las fuentes de nitrógeno y de fósforo, influyen en el crecimiento y la composición de *S. platensis*. Por lo tanto, la manipulación de estas fuentes permitiría mejorar productividades y modificar el objeto de producción.
- La manipulación de la fuente de nitrógeno genera cambios más significativos en comparación a la manipulación de la fuente de fósforo.
- El empleo de fertilizantes como la urea y los superfosfatos (fosfato monocálcico) sería factible para el cultivo de *S. platensis*, resultando una alternativa de impacto económico.
- El uso de superfosfatos (fosfato monocálcico) en el medio de cultivo, si bien reduce los costos de producción, genera turbidez dificultando la penetración de la luz y una consecuente disminución de las productividades.
- El crecimiento de *S. platensis* sería viable en un amplio rango de concentraciones de las fuentes de nitrógeno y de fósforo, dado que puede utilizar a la ficocianina como reserva de nitrógeno y a su capacidad de acumular fósforo en forma de gránulos de polifosfato.
- El uso de cloruro de amonio o de urea como fuente de nitrógeno mejorarían las productividades respecto al empleo de nitrato de sodio, dado que su facilidad de asimilación permiten un mayor crecimiento de *S. platensis*.
- Un incremento en la concentración de urea permitiría un mejor crecimiento y una posible mejora en la productividad de *S. platensis*. Sin embargo, una elevada concentración de urea resultaría tóxica para esta microalga debido al amoníaco generado por la misma. Ambas cualidades sugieren la necesidad de realizar otros estudios con el objeto de conocer la concentración inhibitoria mínima y la concentración óptima de este sustrato en cultivos de *S. platensis*.
- Al igual que la urea, el cloruro de amonio resultaría tóxico para *S. platensis* a partir de determinada concentración. A diferencia de la urea, en donde la formación de amoníaco es mediada por enzimas, la concentración inhibitoria del cloruro de amonio sería mucho menor. Esto ocasiona que el uso de cloruro

de amonio en cultivos de *S. platensis*, se encuentre prácticamente limitado a fotobiorreactores operando en modo fed-batch, lo cual incrementaría los costos de operación.

8. Bibliografia

- Adams, C., Godfrey, V., Wahlen, B., Seefeldt, L., & Bugbee, B. (2013). Understanding precision nitrogen stress to optimize the growth and lipid content tradeoff in oleaginous green microalgae. *Bioresource Technology*, *131*, 188-194.
- Albuquerque, M. C. G., Machado, Y. L., Torres, A. E. B., Azevedo, D. C. S., Cavalcante, C. L., Firmiano, L. R., & Parente, E. J. S. (2009). Properties of biodiesel oils formulated using different biomass sources and their blends. *Renewable Energy*, *34*(3), 857-859.
- Allen, M. M., & Smith, A. J. (1969). Nitrogen chlorosis in blue-green algae. *Archives of Microbiology*, *69*(2), 114-120.
- Azov, Y., & Goldman, J. C. (1982). Free ammonia inhibition of algal photosynthesis in intensive cultures. *Applied and environmental microbiology*, *43*(4), 735-739.
- Belay, A. (1997). Mass culture of *Spirulina* outdoors—the Earthrise Farms experience. En: Vonshak, A. (Ed.), *Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology*. CRC Press, 131-158.
- Belay, A., Ota, Y., Miyakawa, K., & Shimamatsu, H. (1993). Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*. *Journal of applied Phycology*, *5*(2), 235-241.
- Belkin, S., & Boussiba, S. (1991). High internal pH conveys ammonia resistance in *Spirulina platensis*. *Bioresource technology*, *38*(2-3), 167-169.
- Bennett, A., & Bogorad, L. (1973). Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *The Journal of cell biology*, *58*(2), 419-435.
- Bezerra, R. P., Matsudo, M. C., Sato, S., Perego, P., Converti, A., & de Carvalho, J. C. M. (2012). Effects of photobioreactor configuration, nitrogen source and light intensity on the fed-batch cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis*. Bioenergetic aspects. *Biomass and bioenergy*, *37*, 309-317.
- Bishop, W. M., & Zubeck, H. M. (2012). Evaluation of microalgae for use as nutraceuticals and nutritional supplements. *Nutrition & Food Sciences*, *2*(5).

Boussiba, S., & Richmond, A. E. (1980). C-phycoyanin as a storage protein in the blue-green alga *Spirulina platensis*. *Archives of Microbiology*, *125*(1), 143-147.

Brejc, K., Ficner, R., Huber, R., & Steinbacher, S. (1995). Isolation, crystallization, crystal structure analysis and refinement of allophycoyanin from the cyanobacterium *Spirulina platensis* at 2.3 Å resolution. *Journal of molecular biology*, *249*(2), 424-440.

Bryant, D. A., Guglielmi, G., de Marsac, N. T., Castets, A. M., & Cohen-Bazire, G. (1979). The structure of cyanobacterial phycobilisomes: a model. *Archives of Microbiology*, *123*(2), 113-127.

Bryant, D. A., Hixson, C. S., & Glazer, A. N. (1978). Structural studies on phycobiliproteins III. Comparison of bilin-containing peptides from the beta subunits of C-phycoyanin, R-phycoyanin, and phycoerythrocyanin. *Journal of Biological Chemistry*, *253*(1), 220-225.

Calvo, M. (n.d.). Carotenoides. *Bioquímica de los Alimentos*. Obtenido el 27 de diciembre de 2017 de Universidad de Zaragoza: <http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/pigmentos/carotenoides.html>

Canto de Loura, I., Dubacq, J. P., & Thomas, J. C. (1987). The effects of nitrogen deficiency on pigments and lipids of cyanobacteria. *Plant physiology*, *83*(4), 838-843.

Çelekli, A., & Yavuzatmaca, M. (2009). Predictive modeling of biomass production by *Spirulina platensis* as function of nitrate and NaCl concentrations. *Bioresource technology*, *100*(5), 1847-1851.

Çelekli, A., Yavuzatmaca, M., & Bozkurt, H. (2009). Modeling of biomass production by *Spirulina platensis* as function of phosphate concentrations and pH regimes. *Bioresource technology*, *100*(14), 3625-3629.

Cembella, A. D., Antia, N. J., & Harrison, P. J. (1982). The utilization of inorganic and organic phosphorous compounds as nutrients by eukaryotic microalgae: A multidisciplinary perspective: Part I. *CRC Critical Reviews in Microbiology*, *10*(4), 317-391.

Ciferri, O. (1983). *Spirulina*, the edible microorganism. *Microbiological reviews*, *47*(4), 551.

Cobos Ruiz, M., Paredes Rodríguez, J. D., & Castro Gómez, J. C. (2016). Inducción de la producción de lípidos totales en microalgas sometidas a estrés nutritivo. *Acta Biológica Colombiana*, *21*(1), 17-26.

Cohen, Z. (1997). The Chemicals of *Spirulina*. En: Vonshak, A. (Ed.), *Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology*. CRC Press, 175-204.

Colla, L. M., Reinehr, C. O., Reichert, C., & Costa, J. A. V. (2007). Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. *Bioresource technology*, 98(7), 1489-1493.

Collier, J. L., & Grossman, A. R. (1992). Chlorosis induced by nutrient deprivation in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942: not all bleaching is the same. *Journal of bacteriology*, 174(14), 4718-4726.

Converti, A., Scapazzoni, S., Lodi, A., & Carvalho, J. C. M. (2006). Ammonium and urea removal by *Spirulina platensis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33(1), 8-16.

Cornet, J. F., Dussap, C. G., & Gros, J. B. (1998). Kinetics and energetics of photosynthetic micro-organisms in photobioreactors. En: Scheper T. (Ed.), *Bioprocess and algae reactor technology, apoptosis*. Springer Berlin Heidelberg, 153-224.

Cruz-Martínez, C., Jesus, C. K. C., Matsudo, M. C., Danesi, E. D. G., Sato, S., & Carvalho, J. C. M. (2015). Growth and composition of *Arthrospira (Spirulina) platensis* in a tubular photobioreactor using ammonium nitrate as the nitrogen source in a fed-batch process. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 32(2), 347-356.

Danesi, E. D. G., Rangel-Yagui, C. D. O., De Carvalho, J. C. M., & Sato, S. (2002). An investigation of effect of replacing nitrate by urea in the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. *Biomass and Bioenergy*, 23(4), 261-269.

De Carvalho, L. F., De Oliveira, M. S., Alberto, J., & Costa, V. (2014). Evaluation of the Influence of Nitrogen and Phosphorus Nutrients in the Culture and Production of biosurfactants by Microalga *Spirulina*. *Journal of Engineering Research and Applications*, 4(6), 90-98.

de la Noüe, J., Laliberté, G., & Proulx, D. (1992). Algae and waste water. *Journal of applied phycology*, 4(3), 247-254.

De Marsac, N. T., & Houmard, J. (1988). Complementary chromatic adaptation: Physiological conditions and action spectra. *Methods in enzymology*, 167, 318-328.

De Oliveira Rangel-Yagui, C., Danesi, E. D. G., de Carvalho, J. C. M., & Sato, S. (2004). Chlorophyll production from *Spirulina platensis*: cultivation with urea addition by fed-batch process. *Bioresource technology*, *92*(2), 133-141.

Del Campo, J. A., García-González, M., & Guerrero, M. G. (2007). Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Applied microbiology and biotechnology*, *74*(6), 1163-1174.

Del Campo, J. A., Moreno, J., Rodríguez, H., Vargas, M. A., Rivas, J., & Guerrero, M. G. (2000). Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis* sp. (Chlorophyta). *Journal of Biotechnology*, *76*(1), 51-59.

Depraetere, O., Foubert, I., & Muylaert, K. (2013). Decolorisation of piggery wastewater to stimulate the production of *Arthrospira platensis*. *Bioresource technology*, *148*, 366-372.

Deschoenmaeker, F., Facchini, R., Pino, J. C. C., Bayon-Vicente, G., Sachdeva, N., Flammang, P., & Wattiez, R. (2016). Nitrogen depletion in *Arthrospira* sp. PCC 8005, an ultrastructural point of view. *Journal of structural biology*, *196*(3), 385-393.

Drath, M., Kloft, N., Batschauer, A., Marin, K., Novak, J., & Forchhammer, K. (2008). Ammonia triggers photodamage of photosystem II in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Plant physiology*, *147*(1), 206-215.

Droop, M. R. (1968). Vitamin B12 and marine ecology. IV. The kinetics of uptake, growth and inhibition in *Monochrysis lutheri*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, *48*(3), 689-733.

Droop, M. R. (1983). 25 years of algal growth kinetics a personal view. *Botanica marina*, *26*(3), 99-112.

DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, *28*(3), 350-356.

Dyrman, S. T., & Ruttenberg, K. C. (2006). Presence and regulation of alkaline phosphatase activity in eukaryotic phytoplankton from the coastal ocean: Implications for dissolved organic phosphorus remineralization. *Limnology and Oceanography*, *51*(3), 1381-1390.

- El-Baky, H. H. A. (2003). Over Production of Phycocyanin Pigment in Blue Green Alga *Spirulina* sp. and It's Inhibitory Effect on Growth of Ehrlich Ascites Carcinoma Cells. *J. Med. Sci*, 3(4), 314-324.
- El-Baky, H. H. A., El Baz, F. K., & El-Baroty, G. S. (2008). Characterization of nutraceutical compounds in blue green alga *Spirulina maxima*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2(10), 292-300.
- Elser, J. J. (2012). Phosphorus: a limiting nutrient for humanity?. *Current opinion in biotechnology*, 23(6), 833-838.
- Fagiri, Y. M. A., Salleh, A., & El-Nagerabi, S. A. (2013). Influence of chemical and environmental factors on the growth performance of *Spirulina platensis* strain SZ100. *J. Algal Biomass Utln*, 4(2), 7-15.
- Flores, E., & Herrero, A. (2005). Nitrogen assimilation and nitrogen control in cyanobacteria. *Biochemical Society Transactions*, 33(1), 164-167
- Fuggi, A. (1993). Uptake and assimilation of nitrite in the acidophilic red alga *Cyanidium caldarium* Geitler. *New phytologist*, 125(2), 351-360.
- Gantt, E. (1981). Phycobilisomes. *Annual Review of Plant Physiology*, 32(1), 327-347.
- Geider, R. J., & La Roche, J. (2002). Redfield revisited: variability of C [ratio] N [ratio] P in marine microalgae and its biochemical basis. *European Journal of Phycology*, 37(1), 1-17.
- González-López, C. V., Cerón-García, M. C., Fernández-Sevilla, J. M., González-Céspedes, A. M., Camacho-Rodríguez, J., & Molina-Grima, E. (2013). Medium recycling for *Nannochloropsis gaditana* cultures for aquaculture. *Bioresource technology*, 129, 430-438.
- Gouveia, L., & Empis, J. (2003). Relative stabilities of microalgal carotenoids in microalgal extracts, biomass and fish feed: effect of storage conditions. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 4(2), 227-233.
- Griffiths, M. J., Garcin, C., van Hille, R. P., & Harrison, S. T. (2011). Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. *Journal of microbiological methods*, 85(2), 119-123.
- Grobbelaar, J. U. (2004). Algal nutrition, mineral nutrition. En: Richmond, A. (Ed.), *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. John Wiley & Sons, 97-115.

Guerra, B. O., Hernández, M. I., Siciliano, L. G., & Cevallos, G. C. (2010). Efecto de la *Spirulina maxima* y la ficocianina en la hipercolesterolemia producida por tiloxapol en ratón. *Trabajo presentado en el VI Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica*, Acapulco, México.

Hayashi, T., Hayashi, K., Maeda, M., & Kojima, I. (1996). Calcium spirulan, an inhibitor of enveloped virus replication, from a blue-green alga *Spirulina platensis*. *Journal of natural products*, 59(1), 83-87.

Healey, F. P. (1982). Phosphate. En: Carr, N., & Whitton, B. (Eds.), *The biology of cyanobacteria*, 19, 105-124.

Hu, Q. (2004). Environmental effects on cell composition. En: Vonshak, A. (Ed.), *Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology*. CRC Press, 83-95.

Huntley, M. E., & Redalje, D. G. (2007). CO₂ mitigation and renewable oil from photosynthetic microbes: a new appraisal. *Mitigation and adaptation strategies for global change*, 12(4), 573-608.

Jeanfils, J., Canisius, M. F., & Burlion, N. (1993). Effect of high nitrate concentrations on growth and nitrate uptake by free-living and immobilized *Chlorella vulgaris* cells. *Journal of applied phycology*, 5(3), 369-374.

Knight, J. A., Anderson, S., & Rawle, J. M. (1972). Chemical basis of the sulfo-phospho-vanillin reaction for estimating total serum lipids. *Clinical chemistry*, 18(3), 199-202.

Knuckey, R. M., Brown, M. R., Robert, R., & Frampton, D. M. (2006). Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds. *Aquacultural Engineering*, 35(3), 300-313.

Kumari, A., Pathak, A. K., & Guria, C. (2015). Cost-Effective Cultivation of *Spirulina platensis* Using NPK Fertilizer. *Agricultural Research*, 4(3), 261-271.

Lanfer-Marquez, U. M., Barros, R. M., & Sinnecker, P. (2005). Antioxidant activity of chlorophylls and their derivatives. *Food Research International*, 38(8), 885-891.

Li, Y., Horsman, M., Wang, B., Wu, N., & Lan, C. Q. (2008). Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Applied microbiology and biotechnology*, 81(4), 629-636.

Lin, C. K. (1977). Accumulation of water soluble phosphorus and hydrolysis of polyphosphates by *Cladophora glomerata* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology*, 13(1), 46-51.

Listado de centros adheridos (2012). Obtenido el 17 de diciembre de 2017, de Ministerio de Ciencia Tecnología e Innovación Productiva de la República Argentina, Sistema Nacional de Datos Biológicos: <http://www.sndb.mincyt.gob.ar/pdfs/Adheridos-SNDB.pdf>

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, 193(1), 265-275.

Lv, J. M., Cheng, L. H., Xu, X. H., Zhang, L., & Chen, H. L. (2010). Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions. *Bioresource technology*, 101(17), 6797-6804.

Madkour, F. F., Kamil, A. E. W., & Nasr, H. S. (2012). Production and nutritive value of *Spirulina platensis* in reduced cost media. *The egyptian journal of aquatic research*, 38(1), 51-57.

Markou, G. (2012). Alteration of the biomass composition of *Arthrospira (Spirulina) platensis* under various amounts of limited phosphorus. *Bioresource technology*, 116, 533-535.

Markou, G., & Georgakakis, D. (2011). Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: a review. *Applied Energy*, 88(10), 3389-3401.

Markou, G., Angelidaki, I., Nerantzis, E., & Georgakakis, D. (2013). Bioethanol production by carbohydrate-enriched biomass of *Arthrospira (Spirulina) platensis*. *Energies*, 6(8), 3937-3950.

Markou, G., Chatzipavlidis, I., & Georgakakis, D. (2012). Effects of phosphorus concentration and light intensity on the biomass composition of *Arthrospira (Spirulina) platensis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(8), 2661-2670.

Markou, G., Vandamme, D., & Muylaert, K. (2014a). Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients. *Water research*, 65, 186-202.

Markou, G., Vandamme, D., & Muylaert, K. (2014b). Using natural zeolite for ammonia sorption from wastewater and as nitrogen releaser for the cultivation of *Arthrospira platensis*. *Bioresource technology*, 155, 373-378.

Mashor, N., Yazam, M. S. M., Naqqiuddin, M. A., Omar, H., & Ismail, A. (2015). Cultivation of *A. platensis* Based on The Optimum Concentrations of Urea and Triple Super Phosphate, Ammonium Sulfate and Phosphoric Acid, Ammonium Nitrate and Triple Super Phosphate. *Seminar Ekologi Malaysia*. Putrajaya.

Mashor, N., Yazam, M. S. M., Naqqiuddin, M. A., Omar, H., & Ismail, A. (2016). Different Nitrogen Sources Effects on the Growth and Productivity of *Spirulina* Grown In Outdoor Conditions. *Acta Biologica Malaysiana*, 5(1), 16-26.

McCree, K. J. (1981). Photosynthetically active radiation. *Physiological Plant Ecology I*, 41-55.

Mishra, S. K., Suh, W. I., Farooq, W., Moon, M., Shrivastav, A., Park, M. S., & Yang, J. W. (2014). Rapid quantification of microalgal lipids in aqueous medium by a simple colorimetric method. *Bioresource technology*, 155, 330-333.

Mussatto, S. I., Dragone, G., Guimarães, P. M., Silva, J. P. A., Carneiro, L. M., Roberto, I. C., Vicente, A., Domingues, L., & Teixeira, J. A. (2010). Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. *Biotechnology advances*, 28(6), 817-830.

Olguín, E. J., Galicia, S., Angulo-Guerrero, O., & Hernández, E. (2001). The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina* sp. (*Arthrospira*) grown on digested pig waste. *Bioresource technology*, 77(1), 19-24.

Olguín, E. J., Galicia, S., Mercado, G., & Pérez, T. (2003). Annual productivity of *Spirulina* (*Arthrospira*) and nutrient removal in a pig wastewater recycling process under tropical conditions. *Journal of Applied Phycology*, 15(2-3), 249-257.

Ou, Y., Lin, L., Pan, Q., Yang, X., & Cheng, X. (2012). Preventive effect of phycocyanin from *Spirulina platensis* on alloxan-injured mice. *Environmental toxicology and pharmacology*, 34(3), 721-726.

Pai, P. R., Manasa, A., Kalaivani, T., Ajeesh, C. M., Rajasekaran, C., & Prasad, B. N. (2008). Simplified cost effective media variants for the rapid culture of *Spirulina platensis*. *Recent Advances in Biotechnology*, Excel India Publishers, New Delhi, 1-129.

Perez-Garcia, O., Escalante, F. M., de-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water research*, 45(1), 11-36.

Perry, D. (2011). *Handbook of Inorganic Compounds* (2nd Ed.). CRC Press

Peter, P., Sarma, A. P., Hasan, M. A., & Murthy, S. D. S. (2010). Studies on the impact of nitrogen starvation on the photosynthetic pigments through spectral properties of the cyanobacterium, *Spirulina platensis*: identification of target phycobiliprotein under nitrogen chlorosis. *Bot Res Int*, 3(1), 30-34.

Ramírez-Moreno, L., & Olvera-Ramírez, R. (2006). Uso tradicional y actual de *Spirulina* sp. (*Arthrospira* sp.). *Interciencia*, 31(9).

Raof, B., Kaushik, B. D., & Prasanna, R. (2006). Formulation of a low-cost medium for mass production of *Spirulina*. *Biomass and Bioenergy*, 30(6), 537-542.

Rodrigues, M. S., Ferreira, L. S., Converti, A., Sato, S., & Carvalho, J. C. M. (2010). Fed-batch cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis*: potassium nitrate and ammonium chloride as simultaneous nitrogen sources. *Bioresource technology*, 101(12), 4491-4498.

Salla, A. C. V., Margarites, A. C., Seibel, F. I., Holz, L. C., Brião, V. B., Bertolin, T. E., Colla, L. M., & Costa, J. A. V. (2016). Increase in the carbohydrate content of the microalgae *Spirulina* in culture by nutrient starvation and the addition of residues of whey protein concentrate. *Bioresource technology*, 209, 133-141.

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

Sarpal, A. S., Costa, I. C. R., Teixeira, C. M. L. L., Filocomo, D., & Candido, R. (2016). Investigation of Biodiesel Potential of Biomasses of Microalgae *Chlorella*, *Spirulina* and *Tetraselmis* by NMR and GC-MS Techniques. *J Biotechnol Biomater*, 6(220), 2.

Sassano, C. E. N., Gioielli, L. A., Almeida, K. A., Sato, S., Perego, P., Converti, A., & Carvalho, J. C. M. (2007). Cultivation of *Spirulina platensis* by continuous process using ammonium chloride as nitrogen source. *Biomass and Bioenergy*, 31(8), 593-598.

Sekar, S., Priya, S. L., & Roy, W. P. (2000). Optimization of mass cultivation media for the production of biomass and natural colourants from two marine cyanobacteria by a mathematical design of experiments. *J Plant Biotechnol*, 2(3), 157-163.

Shi, X. M., Jiang, Y., & Chen, F. (2002). High-Yield Production of Lutein by the Green Microalga *Chlorella protothecoides* Heterotrophic Fed-Batch Culture. *Biotechnology progress*, 18(4), 723-727.

Shi, X. M., Liu, H. J., Zhang, X. W., & Chen, F. (1999). Production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* at various glucose concentrations in heterotrophic cultures. *Process biochemistry*, 34(4), 341-347.

Sigeo, D. (2005). *Freshwater microbiology: biodiversity and dynamic interactions of microorganisms in the aquatic environment*. John Wiley & Sons.

Soletto, D., Binaghi, L., Lodi, A., Carvalho, J. C. M., & Converti, A. (2005). Batch and fed-batch cultivations of *Spirulina platensis* using ammonium sulphate and urea as nitrogen sources. *Aquaculture*, 243(1), 217-224.

Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of bioscience and bioengineering*, 101(2), 87-96.

Stein, W. H., & Moore, S. (1949). Amino acid composition of β -lactoglobulin and bovine serum albumin. *Journal of Biological Chemistry*, 178, 79-91.

Subramoniam, A., Asha, V. V., Nair, S. A., Sasidharan, S. P., Sureshkumar, P. K., Rajendran, K. N., Karunakaran, D., & Ramalingam, K. (2012). Chlorophyll revisited: anti-inflammatory activities of chlorophyll a and inhibition of expression of TNF- α gene by the same. *Inflammation*, 35(3), 959-966.

Tanabe, Y., & Shimamatsu, S. (1981). Cosmetic containing hard-soluble phycocyanin. *JP Patent*, 63911, 30.

Tomaselli, L. (1997). Morphology, ultrastructure and taxonomy of *Arthrospira (Spirulina) maxima* and *Arthrospira (Spirulina) platensis*. En: Vonshak, A. (Ed.), *Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology*. CRC Press, 1-16.

Travieso, L., Benítez Echegoyen, F. (1998). Cultivo de *Arthrospira sp.*: del laboratorio a planta piloto. *Curso: Tecnología y aprovechamiento del cultivo heterotrófico de microalgas*. Centro de Investigaciones Pesqueras. La Habana, Cuba.

Vargas Rodríguez, A. L., Ramón Gallegos, E., Vega Barrita, M. L., Cruz Orea, A., & Olvera Ramírez, R. (2006). Efecto in vitro de las ficobiliproteínas en el tratamiento del Carcinoma Cervicouterino. *Revista del Centro de Investigación. Universidad La Salle*, 7(25).

Vesenick, D. C., De Paula, N. A., Niwa, A. M., & Mantovani, M. S. (2012). Evaluation of the effects of chlorophyllin on apoptosis induction, inhibition of cellular proliferation and mRNA expression of CASP8, CASP9, APC and β -catenin. *Curr Res J Biol Sci*, 4(3), 315-22.

Volkman, H., Imianovsky, U., Oliveira, J. L., & Sant'Anna, E. S. (2008). Cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* in desalinator wastewater and salinated synthetic medium: protein content and amino-acid profile. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(1), 98-101.

Vonshak, A. (1997). Use of *Spirulina* Biomass. En: Vonshak, A. (Ed.), *Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology*. CRC Press, 131-158.

Wang, B., & Lan, C. Q. (2011). Biomass production and nitrogen and phosphorus removal by the green alga *Neochloris oleoabundans* in simulated wastewater and secondary municipal wastewater effluent. *Bioresource Technology*, 102(10), 5639-5644.

Wang, B., Li, Y., Wu, N., & Lan, C. Q. (2008). CO₂ bio-mitigation using microalgae. *Applied microbiology and biotechnology*, 79(5), 707-718.

Wegmann, K., & Metzner, H. (1971). Synchronization of *Dunaliella* cultures. *Archives of Microbiology*, 78(4), 360-367.

Xie, Y., Jin, Y., Zeng, X., Chen, J., Lu, Y., & Jing, K. (2015). Fed-batch strategy for enhancing cell growth and C-phycocyanin production of *Arthrospira (Spirulina) platensis* under phototrophic cultivation. *Bioresource technology*, 180, 281-287.

Yen, H. W., Hu, I. C., Chen, C. Y., Ho, S. H., Lee, D. J., & Chang, J. S. (2013). Microalgae-based biorefinery—from biofuels to natural products. *Bioresource technology*, 135, 166-174.

Zarrouk, C. (1966). *Contribution à l'étude d'une Cyanophycée, influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de "Spirulina maxima" (Setch et Gardner) Geitler* (Doctoral dissertation).

Zeng, X., Danquah, M. K., Zhang, S., Zhang, X., Wu, M., Chen, X. D., Ng, I. S., Jing, K., & Lu, Y. (2012). Autotrophic cultivation of *Spirulina platensis* for CO₂ fixation and phycocyanin production. *Chemical Engineering Journal*, 183, 192-197.