

Crecimiento y pigmentos de *Spirulina subsalsa* cultivada a diferentes salinidades y concentraciones de nitrógeno

Growth and pigments of *Spirulina subsalsa* grown at different salinities and nitrogen concentrations

Lolymer Romero Maza

Licenciada en Química y Magister Scientiarum en Ciencias Marinas de la Universidad de Oriente
Universidad Politécnica Territorial del Oeste de Sucre, Venezuela
<https://orcid.org/0000-0003-1072-6596>
lolyrome@gmail.com

Miguel Guevara*

Licenciado en Biología y Magister en Ciencias Marinas de la Universidad de Oriente
Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción
Instituto Superior de Formación Docente Salomé Ureña, República Dominicana
<https://orcid.org/0000-0002-1830-3822>
miguevara2003@gmail.com

José Félix Bernal

Licenciado en Biología y Magister en Ciencias Marinas de la Universidad de Oriente
Departamento de Biología de la Universidad de Oriente, Venezuela
<https://orcid.org/0000-0003-2445-6638>
josefelix.bernal@gmail.com

Fecha de recepción: 17 de octubre de 2018

Fecha de aceptación: 13 de noviembre de 2018

Sugerencia de citación: Romero Maza, L., Guevara, M. y Bernal, J.F. (2018). Crecimiento y pigmentos de *Spirulina subsalsa* cultivada a diferentes salinidades y concentraciones de nitrógeno.

Mutis 8(2), en prensa, doi:

<http://dx.doi.org/10.21789/22561498.1402>

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue evaluar el crecimiento y el contenido de pigmentos de un nuevo aislado de *Spirulina subsalsa* cultivada en agua mar a diferentes salinidades y concentraciones de nitrógeno. La nueva cepa de *S. subsalsa* se aisló a partir de muestras de agua procedentes del embalse de Clavellino, estado Sucre, Venezuela, y fue identificada haciendo uso de la clave taxonómica propuesta por Aguiar (2013). El medio de cultivo ensayado fue el f/2, modificando las concentraciones de nitrato (14,5; 29 y 58 mmol/L) y cloruro de sodio (0, 9 y 18 ‰ por adición de agua de mar). Los cultivos se realizaron por triplicado, de forma discontinua, bajo condiciones de medio ambiente controlado (T: 30±1 °C; iluminación: 3.000 lux; agitación manual, fotoperiodo 12:12), durante 21 días. Los resultados obtenidos evidenciaron que la salinidad de 9 ‰ y la concentración de nitrato de 14 mmol/L fueron los parámetros que propiciaron los mayores contenidos de biomasa; mientras que la clorofila *a* y la ficocianina mostraron mayores valores en la misma concentración de nitrógeno, pero a 0 ‰. Estos hallazgos indican que la salinidad y la concentración de nitrógeno afectan el crecimiento y los pigmentos del nuevo aislado de *S. subsalsa* y además

* Autor de correspondencia

sugieren que esta cepa posee potencial para su aprovechamiento biotecnológico con miras a obtener metabolitos valiosos en las industrias alimenticias y farmacológicas.

Palabras clave: cianobacteria, agua de mar, biotecnología

ABSTRACT

The aim of this research was to evaluate the growth and content of pigments of a new isolate of *Spirulina subsalsa* grown in seawater at different salinities and nitrogen concentrations. The new *S. subsalsa* strain was isolated from water samples from the Clavellino reservoir, Sucre state, Venezuela, and was identified using the taxonomic key proposed by Aguiar (2013). The culture medium tested was f / 2 Guillard, modifying the concentrations of nitrate (14.5; 29, 59 mmol/L) and sodium chloride (0, 9 and 18 ‰ by the addition of seawater). The cultures were carried out in triplicate, discontinuously, under conditions of controlled environment (T: 30±1 °C, illumination: 3,000 lux, manual agitation, photoperiod 12:12), for 21 days. The results obtained showed that the salinity of 9 ‰ and the nitrate concentration of 14 mmol/L were the parameters that propitiated the highest biomass; while chlorophyll *a* and phycocyanin showed higher values at the same nitrogen concentration at 0 ‰. These findings indicate that salinity and nitrogen concentration affect the growth and pigments of the new isolate of *S. subsalsa* and suggest that this strain has potential for its biotechnological exploitation in order to obtain valuable metabolites for food and pharmacological industries.

Key words: Cyanobacteria, sea water, biotechnology

INTRODUCCIÓN

Las cianobacterias, comúnmente denominadas algas verde azules, comprenden un grupo grande y heterogéneo de procariontes fotoautotróficos (Van-Den-Hoek, Mann & Jahns, 1995) con muchas aplicaciones biotecnológicas (Encarnação, Pais, Campos & Burrows, 2015; Sommella *et al.*, 2018). Dentro de este grupo se encuentra *Spirulina*, la cual muchas veces es confundida con *Arthrospira*, aunque en la actualidad está totalmente esclarecido que corresponden dos géneros totalmente distintos (Ali & Saleh, 2012). Algunas de sus características, tales como forma, tamaño de los filamentos, forma de sus tricomas y espiras, presencia o no de vesículas de gas y caliptras, entre otras, son utilizadas para la clasificación de las cianobacterias; sin embargo, estos atributos pueden variar considerablemente a causa de los cambios morfológicos inducidos por las condiciones de cultivo y la plasticidad fenotípica de las cianobacterias, lo cual puede conducir a errores en la identificación taxonómica de las cepas (Lyra *et al.*, 2001; Valerio *et al.*, 2009).

Los miembros del género *Spirulina* crecen en medios alcalinos y poseen filamentos espiralados o helicoidales. Estos son ampliamente utilizados como fuente de proteínas, vitaminas y minerales y como medicamentos contra el cáncer (Fedorov *et al.*, 2013; Ouhitit *et al.*, 2014), la hiperlipidemia (Deng & Chow, 2010), el daño renal y hepático (Gallardo-Casas *et al.*, 2011; Rodríguez *et al.*, 2012), la diabetes (Layam & Kasi, 2006) y diferentes enfermedades neurodegenerativas (Salvador, Uranga & Giusto, 2011).

Otros metabolitos sintetizados por *Spirulina* son los pigmentos (Khazi, Demirel & Dalay, 2018; Murugan & Rajesh, 2014), los cuales, al igual que el resto de la composición química, están influenciados por los parámetros físico-químicos que interactúan en cultivos, a saber: temperatura (Lee, Chen & Peng, 2012; Pandey & Tiwari, 2010; Uslu, Isik, Koc & Goksan, 2011), aireación (Ravelonandro *et al.*, 2011), concentración de dióxido de carbono (Soletto *et al.*, 2008), fuentes de carbono (Soundarapandian & Vasanthi, 2010), intensidad de luz (Lee *et al.*, 2012; Pandey & Tiwari, 2010; Ravelonandro *et al.*, 2011), pH (Pandey & Tiwari, 2010) y concentraciones de nutrientes como nitrógeno (Colla, Furlong & Vieira, 2007a; Colla, Reinehr, Carolina & Jorge, 2007b; Uslu *et al.*, 2011) o fósforo (Markou, 2012; Markou, Chatzipavlidis & Georgakakis, 2012; Ravelonandro *et al.*, 2011; Uslu *et al.*, 2011; Yuan, Kumar, Sahu & Ergas, 2011).

Los principales pigmentos presentes en *Spirulina* incluyen carotenoides, xantofilas, clorofila y ficobiliproteínas (Saini, Pabbi & Shukla, 2018). Tanto la clorofila *a* como la ficocianina son ampliamente utilizadas en las industrias alimentarias, cosméticas y farmacéuticas. Su consumo ha aportado muchos beneficios a la salud como un agente nutracéutico con propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antimutagénicas y antimicrobianas (Da Silva-Ferreira & Sant'Anna, 2017; Marín-Prida *et al.*, 2015).

Los cultivos de *Spirulina* suelen realizarse en agua dulce y con medios de cultivo costosos, debido a la inclusión de un gran número de sales de grado analítico. Entre estos medios destacan el Zarrouk (Zarrouk 1966), *Spirulina* (Aiba & Ogawa, 1977), BG-11 (Rippka, 1988) y algunos medios modificados (Amala & Ramanathan, 2013; Kumari, Kumar, Pathak & Guria, 2014a; Kumari, Sharma, Pathak & Guria, 2014b). Esta situación ha propiciado la búsqueda de fuentes alternativas de medios de cultivos que incluyan el uso de agua marina con el fin de posibilitar la obtención de altos rendimientos de biomasa a bajo costo.

La evaluación de nuevos aislados de *S. subsalsa* con miras a su manejo biotecnológico para la producción de metabolitos industriales es de suma importancia, dado que se ha demostrado que las respuestas de las cianobacterias y las microalgas, en general, a los cambios de los factores abióticos varían notablemente de una especie a otra, entre cepas de una misma especie e incluso entre clones originados de un mismo cultivo unialgal (Gómez & González, 2005). Al respecto, ha sido documentado que el análisis de miles de especies de microalgas han mostrado diferencias significativas en el contenido de lípidos entre diferentes cepas, que van desde 1% hasta aproximadamente 85 % de la masa seca de las células (Chisti, 2007; Li *et al.*, 2008). En el caso de *Arthrospira* y *Spirulina*, Cohen, Vonshak & Richmond (1987) evidenciaron variabilidad en los contenidos de metabolitos de 18 cepas de estas cianobacterias, especialmente en los ácidos grasos poliinsaturados. Las disimilitudes observadas entre las cepas pueden ser resultado de diferencias morfológicas y fisiológicas, atribuibles a variaciones genéticas intraespecíficas, tal como han señalado Whyte (1987), Gómez & González (2005) y Guevara *et al.* (2016).

Tomando en consideración los planteamientos antes señalados, relacionados con la importancia económica de *Spirulina* y las diferencias que poseen las diferentes cepas, la presente investigación planteó la evaluación del crecimiento y el contenido de pigmentos de una nueva cepa de *Spirulina subsalsa*, cultivada en agua mar a diferentes salinidades y concentraciones de nitrógeno, lo cual vendría a ser un reporte novedoso para la biotecnología de cianobacterias procedentes de represas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento e identificación de la cianobacteria *Spirulina subsalsa*

Las muestras de agua fueron tomadas superficialmente (0-5 m de profundidad) con colectores plásticos estériles de 350 mL de capacidad, entre 0-5 m de distancia de la orilla del embalse de Clavellino, estado Sucre, Venezuela (coordenadas: entre 10° 19' hasta 10° 23' Lat. N y entre 63° 35' hasta 63° 40' Long. O), y posteriormente llevadas al Laboratorio de Biotecnología de Microalgas del Departamento de Biología Pesquera del Instituto Oceanográfico de Venezuela, en la Universidad de Oriente.

En el laboratorio, las muestras de agua del embalse fueron diluidas en agua destilada previamente esterilizada (120 °C, 15 PSI, 15 min). Posteriormente, las muestras fueron inoculadas con la ayuda de un asa de siembra en placas de Petri contentivas de 15 mL de medio sólido *Spirulina* (Aiba & Ogawa, 1977) e incubadas a temperatura de 25±1 °C, iluminación de 39 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ y fotoperiodo 12:12, hasta la aparición de las colonias verdeazuladas. Estas últimas fueron tomadas con asa de siembra y resuspendidas en medio *Spirulina* líquido para su purificación. Una vez obtenidas, las colonias puras de la cianobacteria se colocaron en tubos de vidrios estériles con tapas de baquelitas de 15 mL de capacidad, contentivos de 10 mL de medio líquido *Spirulina* y se mantuvieron en cámara de cultivo a las condiciones ambientales antes mencionadas.

Al evidenciar crecimiento, se procedió a la verificación de la pureza de la cepa mediante observaciones en el microscopio a 40X y al resguardo de la misma para su posterior identificación, la cual se realizó en el Laboratorio de Taxonomía de Fitoplancton del Departamento de Biología de la Universidad de Oriente, Venezuela, utilizando criterios

morfológicos y siguiendo las claves taxonómicas propuesta por Aguiar (2013). La cepa aislada fue incorporada al Banco de Germoplasma de Algas del Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente, con el código BGAUDO 161.

Crecimiento y contenido de pigmentos de la cepa *S. subsalsa* a diferentes salinidades y concentraciones de nitrógeno

Los cultivos de la cepa de *S. subsalsa* se realizaron en agua de mar previamente tratada, según la metodología de Faucher, Coupal & Leduy (1979), la cual consistió en ajustar el pH del agua de mar (37 ‰) a 9,2 por adición de hidróxido de sodio. Posteriormente, se adicionó 19,2 g/L de bicarbonato de sodio, se dejó reposar por 2 h, a 35 °C, se filtró a través filtros Whatman GF/C y se ajustó el pH a 8,5 con ácido clorhídrico 5 eq/L, para finalmente repetir el filtrado. Las salinidades evaluadas (9 y 18 ‰) se obtuvieron mediante diluciones, con agua destilada, del agua de mar tratada. Los cultivos a 0 ‰ fueron realizados con agua destilada. Como medio de cultivo se utilizó el f/2 Guillard (Guillard, 1975), ajustándose a tres concentraciones de nitrógeno (14,5, 29 y 58 mmol/L) y adicionando 8 g/L de bicarbonato de sodio. La selección de las concentraciones de nitrógeno se basó en las usadas por el medio Zarrouk (Zarrouk, 1966), el cual es el más utilizado en el cultivo de *Spirulina* y tiene una concentración de nitrógeno de 29 mmol/L. Usando esta concentración como referencia, se decidió evaluar la influencia de mayores (2X) y menores (X/2) concentraciones de nitrógeno en el crecimiento y acumulación de pigmentos en *S. subsalsa*.

Los cultivos se realizaron de forma discontinua, por triplicado, bajo condiciones de medio ambiente controlado (T: 30±1 °C; iluminación: 3.000 lux; agitación manual, fotoperiodo 12:12), durante 21 días. Se usaron tubos de ensayo, con tapa de algodón, contentivos de 10 mL del medio de cultivo y dispuestos sobre bandejas de madera, con una inclinación de 25°. La densidad poblacional inicial fue de 0,5±0,025 mg/L, y desde el inicio del ensayo y cada 48 h se tomaron muestras de cada uno de los tratamientos para determinar el pH y el crecimiento poblacional según criterio de Pelizer & Oliveira (2014).

La cuantificación de ficocianina se realizó de acuerdo con lo propuesto por Boussiba & Richmond (1979) y Bennett & Bogorad (1973). Por su parte, la clorofila *a* se determinó siguiendo los criterios de Jeffrey & Humphrey (1975).

Análisis de resultados

Previo cumplimiento de los supuestos de homogeneidad de las varianzas y normalidad, los datos de los valores de biomasa y pigmentos de *S. subsalsa*, obtenidos en los diferentes tratamientos, fueron contrastados mediante un análisis de varianza de dos factores (salinidad y concentración de nitrógeno) y su posterior análisis fue realizado a través de pruebas de rango múltiples, siguiendo las recomendaciones de Sokal & Rohlf (1995).

RESULTADOS

Identificación de la cianobacteria *S. subsalsa*

La cianobacteria aislada del embalse de Clavellino es filamentosa, cilíndrica-helicoidal con extremos ligeramente redondeados, con tricomas aislados, de contenido celular verde-

azulado pálido y homogéneo. Sus espiras son estrechas, yuxtapuestas, densas y regulares. Los filamentos poseen un diámetro entre 1-2.3 μm , con distancia y altura entre las espiras entre 1-2 μm y 2-3.3 μm , respectivamente. No se observaron vesículas de gas ni caliptra en las terminaciones de las células (figura 1). Estas características, junto con lo expuesto por Aguiar (2013) y Luo & Jiang (2015), permiten concluir que la cianobacteria aislada es *Spirulina subsalsa*.

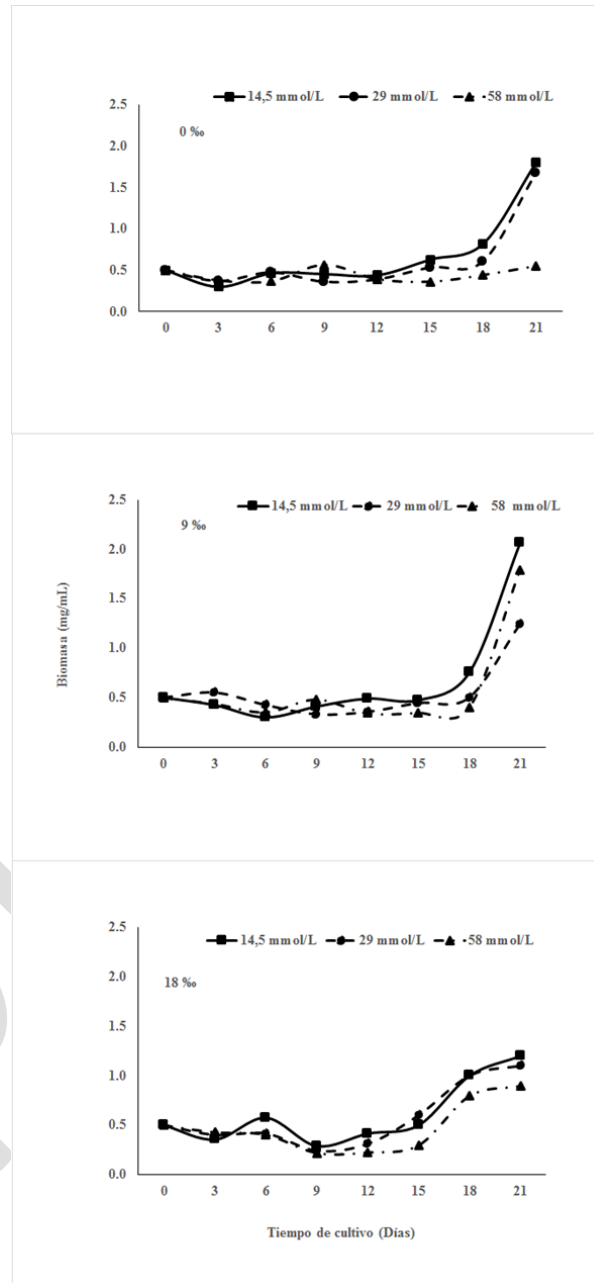
Figura 1. Micrografías de *Spirulina subsalsa* aislada del Embalse de Clavellino, estado Sucre, Venezuela



Crecimiento y contenido de pigmentos de la cepa *S. subsalsa* a diferentes salinidades y concentraciones de nitrógeno

El crecimiento de la cepa de *S. subsalsa* se muestra en la figura 2, en la que se observa que hasta el día 15, en todas las salinidades y concentraciones de nitrógeno evaluadas, esta cepa mostró un crecimiento similar, con contenidos de biomasa entre 0,3–0,6 mg/mL. A partir de allí, se incrementó la producción de biomasa, presentando al final del ensayo diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos, siendo los cultivos a 9 ‰ y 14 mmol/L de N los que produjeron mayor biomasa (2,07 mg/mL).

Figura 2. Crecimiento de *S. subsalsa aislada* del Embalse de Clavellino, estado Sucre, cultivada en agua mar a diferentes salinidades (0, 9 y 18 ‰) y concentraciones de nitrógeno (14,5, 29 y 58 mmol/L)



Los contenidos de clorofila *a* (figura 3) y ficocianina (figura 4) presentaron diferencias significativas entre las salinidades ($p < 0,05$) y las concentraciones de nitrógeno ($p < 0,05$) evaluadas. Ambos pigmentos disminuyeron sus contenidos al incrementar tanto la salinidad

como la concentración de nitrógeno. La interacción entre estos factores fue significativa ($p < 0,05$) lo que sugiere que la acumulación de ambos tipos de pigmentos está influenciada simultáneamente por la salinidad y el aporte de nitrógeno. Los mayores valores de clorofila a ($6,9 \mu\text{g/mL}$) y ficocianina ($4,9 \mu\text{g/mL}$) se obtuvieron en los cultivos expuestos a una salinidad de 0 y a una concentración de 14 mmol/L de N.

Figura 3. Contenidos de clorofila a ($\mu\text{g/mL}$) de *S. subsalsa* cultivada en agua mar a diferentes salinidades y concentraciones de nitrógeno (mmol/L)

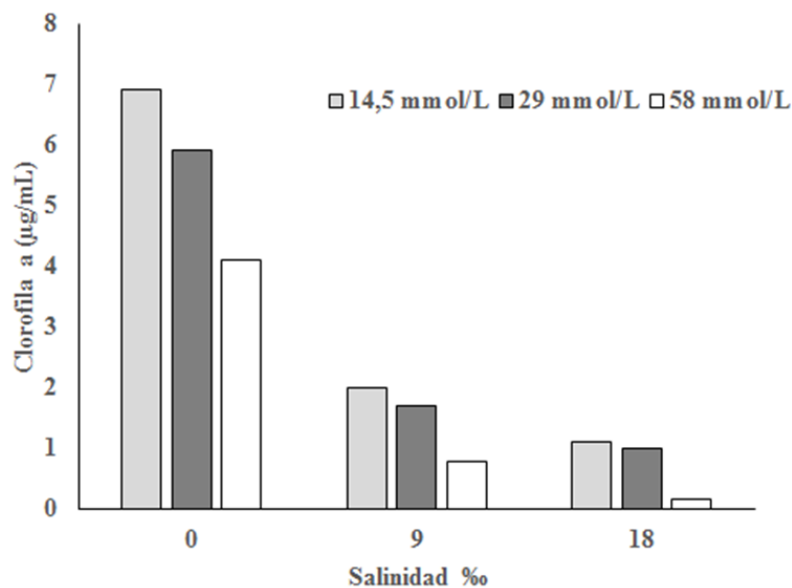
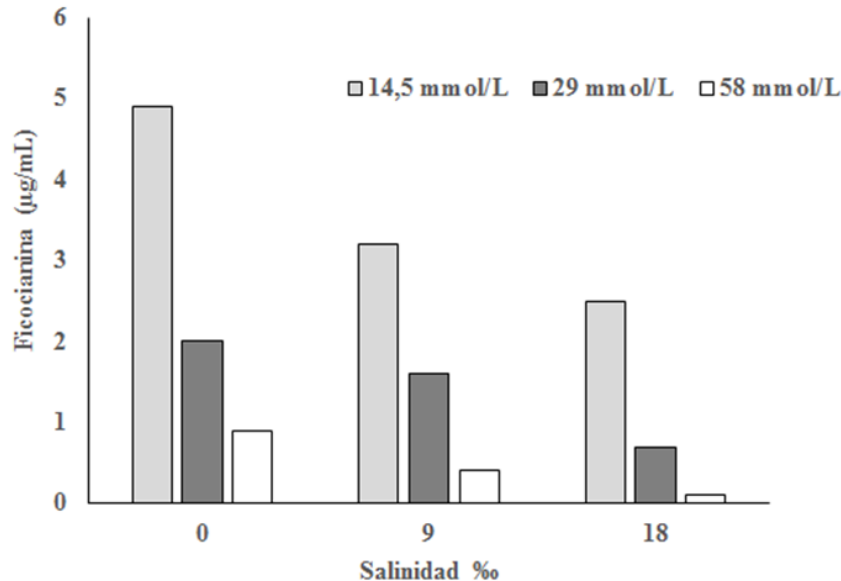


Figura 4. Contenidos de ficocianina ($\mu\text{g/mL}$) de *S. subsalsa* cultivada en agua mar a diferentes salinidades y concentraciones de nitrógeno (mmol/L)



DISCUSIÓN

A pesar de que el uso de los caracteres morfológicos permitieron la identificación de la cianobacteria como *Spirulina subsalsa*, hay que tener en consideración que la taxonomía de cianobacterias filamentosas es ambigua, debido a que las principales características que diferencian las especies (cantidad de espirales, por ejemplo) pueden variar en función de la plasticidad fenotípica y las condiciones ambientales o de cultivo, particularmente temperatura, concentración de nitrógeno y salinidad (Eykelenburg, 1979; Lewin, 1980; Lyra *et al.*, 2001; Valerio *et al.*, 2009). Estudios moleculares posteriores, como el 16S rRNA, permitirían esclarecer las dudas existentes en cuanto a la correcta identificación de la cepa analizada.

La presencia de esta cianobacteria en el embalse mencionado fue referida por Bernal (2002). El embalse muestreado presenta rangos de temperatura entre 28 y 31 °C y valores de pH entre 7,2 y 8,7, siendo más alcalino (cerca de pH 9) en las horas de la tarde (García, 2009; Merayo & González, 2010), lo cual favorece el crecimiento del microorganismo en este tipo de ecosistema, según Whitton (2012). Otros ecosistemas venezolanos donde se ha evidenciado la presencia de *S. subsalsa* y de otros miembros del género *Spirulina* incluyen al Lago de Maracaibo (Rodríguez, 2002), los embalses Pao-Cachinche (límites entre los estados Carabobo y Cojedes), la Mariposa (Distrito capital), la Pereza y Quebrada Seca (estado Miranda), el Lagartijo (estado Miranda) y el Archipiélago de Los Roques (González *et al.*, 2003; Petrash *et al.*, 2012); sin embargo, no existen reportes sobre su cultivo en el país.

Algunos autores han trabajado en el cultivo de *Spirulina* variando las condiciones de cultivo, con la finalidad de encontrar las condiciones óptimas que permitan maximizar la producción de biomasa o algún metabolito en particular (Markou *et al.*, 2012; Markou, 2012); tal es el caso de Sallal, Al-Hassan & Nimer, (1990), quienes estudiaron la actividad de la glicolato

deshidrogenasa presente en *S. subsalsa*, la cual está asociada a las membranas tilacoides y es la responsable de su capacidad para crecer a rangos variados de salinidad, reportando que dicha microalga puede crecer de forma óptima a concentraciones de NaCl de 0-9 g/L.

Los contenidos de biomasa en varias especies de *Spirulina* son variables. Así, por ejemplo, El-Khair, El-Sayed & El-Sheekh (2018), quienes ensayaron varios sistemas de cultivo en fotobioreactores para el cultivo de *Spirulina platensis* en medio Zarrouk, lograron alcanzar niveles de biomasa de 1,4 g/L; Khazi *et al.* (2018) realizaron varios ensayos con *S. platensis* a fin de evaluar, entre otros parámetros, la biomasa producida por dicha cianobacteria en función de la variabilidad de temperatura, irradiación de luz y agitación, encontrando que 33 °C, 44 $\mu\text{mol photons/m}^2\text{s}$ y 2,5 L/min de agitación fueron las condiciones que propiciaron el mayor crecimiento, logrando obtener 2,42 g/L; resultados muy similares a los de esta investigación. No obstante, Torres *et al.* (2018) obtuvieron solo 0,9 g/L de biomasa para esta misma especie, cuando los cultivos fueron realizados en fotobioreactores utilizando KNO_3 y urea como fuentes de nitrógeno y una salinidad de 5 ‰. Todos los autores antes mencionados coinciden en que las variables de cultivos, principalmente la concentración de nitrógeno y la salinidad, son determinantes para incrementar la productividad de *Spirulina*.

Con respecto a los contenidos de pigmentos, Dineshkumar, Umamageswari, Jayasingam & Sampathkumar (2015) encontraron valores de clorofila *a* de 12,6 $\mu\text{g/mL}$ para cultivos de *Spirulina platensis* en medio Zarrouk (29 mmol/L de N y salinidad de 1 ‰) con adición de sustrato orgánico (melaza). Por su parte, Çelekli & Yavuzatmaca (2009) evaluaron diferentes concentraciones de nitrato y NaCl en la producción de *Spirulina platensis*, obteniendo la más alta producción de clorofila (29,92 mg/L) a concentraciones de 29,4 mmol/L de NaNO_3 y 1,5 ‰ de salinidad, respectivamente.

La salinidad es un parámetro de cultivo que afecta la fisiología de *Spirulina* (Sreevani, Bhanumathi, Mohammad & Murthy, 2011; Sharma, Kumar, Irfan & Dut, 2014), ejerciendo su efecto en el crecimiento, la síntesis de clorofila *a*, la ficocianina y los carotenoides (Lamela & Márquez, 2000; Murugan & Rajesh, 2014; Sharma *et al.*, 2014); sin embargo, muchos aspectos fisiológicos, relacionados con la aclimatación, la tolerancia al estrés, la producción de macromoléculas y el crecimiento en medios salinos permanecen sin esclarecer.

Entre los estudios relacionados con el efecto salino en *Spirulina* se incluye el trabajo de Sharma *et al.* (2014), quienes reportaron mejoras en la producción de ficocianina, aloficocianina y ficoeritrina en *Spirulina platensis* cultivada en medio Zarrouk modificado, utilizando 0,4 mol/L de NaCl. Por su parte, Murugan & Rajesh (2014) cultivaron dos especies de *Spirulina* en agua de mar por 15 días a 27 °C e irradiancia de 1,7 klux, obteniendo una producción de biomasa y ficocianina en los cultivos con agua de mar comparables a la encontrada en los cultivos controles (medio Zarrouk), llegando a concluir que el agua de mar representa una alternativa para el cultivo de esta cianobacteria.

Conclusiones similares fueron obtenidas por Abd-El-Baky, El-Baz & El-Baroty (2003), quienes estudiaron la influencia de la deficiencia de nitrógeno y el estrés salino en el contenido de pigmentos en *S. platensis* y *S. maxima*, hallando que el estrés salino de 0,2 mol/L (11,6 ‰) aumenta el contenido de β -caroteno, astaxantina, luteína, zeaxantina y criptoxantina, siendo *S. máxima* la que acumuló mayor contenido de criptoxantina y zeaxantina. Otros autores, como Lamela & Márquez (2000), también han reportado valores

de clorofila *a* entre 2,08-2,78 mg/g y carotenoides totales entre 1,56-1,85 mg/g en *A. máxima*, cultivada en agua de mar y medio convencional Zarrouk.

Por otra parte, la concentración de nutrientes es determinante en el crecimiento de las cianobacterias, llegando a comprobarse que las sales de nitrato garantizan los rendimientos más altos de biomasa (Faintuch, 1989), lo cual justifica el uso de medios de cultivo utilizando NaNO₃ o KNO₃, como los sugeridos por Zarrouk (1966) y Schlösser (1982). En tal sentido, Marrez *et al.* (2013) realizaron un estudio de evaluación del efecto de varios medios de cultivo sobre la biomasa y el contenido de pigmentos de *Spirulina platensis*, encontrando que es en el medio Zarrouk, cuya concentración de NO₃⁻ es igual a 29 mmol/L, donde se obtiene la mayor cantidad de biomasa (4,87 g/L).

En el desarrollo de este estudio se encontró que la mayor cantidad de biomasa (2,07 mg/ml) se obtuvo a 14 mmol/L de nitrato y 9 ‰, la cual es la mitad de la concentración de nitrógeno normalmente recomendada para el cultivo de especies del género *Spirulina*. A pesar de que muchas investigaciones refieren que el uso de grandes cantidades de nitrógeno en los medios de cultivo garantizan mayores producciones de biomasa, también se han obtenido altas producciones de biomasa en bajas concentraciones de este macronutriente, tal como lo refirieron Sassano *et al.* (2007) y Tambiev, Vasilieva & Lukyanov (2011), quienes indicaron que contenidos de 11,7 mmol/L (1g/L) de nitrógeno (menores a los usados en esta investigación) pueden ocasionar mayores crecimientos de esta cianobacteria, comportamiento que puede ser atribuido a las diferencias fisiológicas y de adaptación que puede presentar una cepa en particular. Además de esta evidencia, Fábregas *et al.* (1984) indicaron que la interacción salinidad-concentración de nitrógeno afecta la producción de biomasa de las microalgas. La disminución de las concentraciones de nitrógeno en los cultivos de microalgas es prioritario, puesto que lleva implícito una reducción de los costos de producción de la biomasa microalgal, dado que este representa uno de los macronutrientes más costosos.

Es de resaltar que, durante el desarrollo del ensayo, el pH de los cultivos varió entre 9,40-10,90, lo cual favoreció el crecimiento de *S. subsalsa*, dado que esta cianobacteria presenta óptimos crecimientos en cultivos con pH entre 9-11, tal como señalaron Rincón *et al.* (2013) y Soundarandian & Vasanthi (2010).

CONCLUSIONES

La salinidad y la concentración de nitrógeno tienen efectos diferentes en el crecimiento y el contenido de clorofila *a* y la ficocianina del nuevo aislado de *Spirulina subsalsa*, siendo 9 ‰ y 14 mmol/L de N, la salinidad y concentración de nitrógeno, respectivamente, los que produjeron los mayores contenidos de biomasa; mientras que los pigmentos clorofila *a* y ficocianina alcanzaron sus mayores contenidos a 0 ‰ y 14 mmol/L de N. Por ende, esta cepa puede ser considerada como un microorganismo promisorio para las industrias biotecnológicas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo brindado por el Grupo de Investigaciones en Microalgas y por el Postgrado en Ciencias Marinas del Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente, Venezuela.

pre-print

REFERENCIAS

- Abd-El-Baky, H., El-Baz, F., & El-Baroty, G. (2003). *Spirulina* species as a source of carotenoids and a-tocopherol and its anticarcinoma factors. *Biotechnology*, 2(3), 222-240.
- Aguiar, T. (2013). *Cianobactérias marinhas bentônicas filamentosas do litoral do Estado da Bahia, Brasil*. Tesis de Maestría, Universidad de Estadual de Feira de Santana, Brasil.
- Aiba, S., & Ogawa, T. (1977). Assessment of growth yield of a blue-green alga: *Spirulina platensis*, in axenic and continuous culture. *Journal of General Microbiology*, 102, 179-182.
- Ali, S., & Saleh, A. (2012). *Spirulina* – An overview. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(3), 9-15.
- Amala, K., & Ramanathan, N. (2013). Comparative studies on production of *Spirulina platensis* on the standard and newly formulated alternative medium. *Science Park*, 1(1), 1-10.
- Bennett, A., & Bogorad, L. (1973). Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *The Journal of Cell Biology*, 58(2), 419-435.
- Bernal, J. (2002). *Taxonomía de microalgas en las riberas del Embalse Clavellinos, Municipio Ribero, estado Sucre, Venezuela*. Tesis de Licenciatura. Departamento de Biología, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.
- Boussiba, S., & Richmond, A. (1979). Isolation and characterization of phycocyanins from the blue alga *Spirulina platensis*. *Archives of Microbiology*, 120(2), 155-159.
- Çelekli, A., & Yavuzatmaca, M. (2009). Predictive modeling of biomass production by *Spirulina platensis* as function of nitrate and NaCl concentrations. *Bioresource Technology*, 100, 1847-1851.
- Chisti, Y. (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25, 294-306.
- Cohen, Z., Vonshak, A., & Richmond, A. (1987). Fatty acid composition of *Spirulina* strains grown under various environmental conditions. *Phytochemistry*, 26, 2255-2258.
- Colla, L., Furlong, E., & Vieira, J. (2007a). Antioxidant properties of *Spirulina (Arthrospira) platensis* cultivated under different temperatures and nitrogen regimes. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50(1), 161-167.
- Colla, L., Reinehr, C., Carolina, R., & Jorge, A. (2007b). Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. *Bioresource. Technology*, 98(7), 1489-1493.
- Da Silva-Ferreira, V., & Sant'Anna, C. (2017). Impact of culture conditions on the chlorophyll content of microalgae for biotechnological applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(1), 20.

- Deng, R., & Chow, T. (2010). Hypolipidemic, antioxidant and anti-inflammatory activities of microalgae *Spirulina*. *Cardiovascular Therapeutics*, 28(4), 33-45.
- Dineshkumar, R., Umamageswari, P., Jayasingam, P., & Sampathkumar, P. (2015). Enhance the growth of *Spirulina platensis* using molasses as organic additives. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 4(6), 1057-1066.
- El-Khair, A., El-Sayed, B., & El-Sheekh, M. (2018). Outdoor Cultivation of *Spirulina platensis* for Mass Production. *Notulae Scientia Biologicae*, 10(1), 38-44.
- Encarnação, T., Pais, A., Campos, M., & Burrows, H. (2015). Cyanobacteria and microalgae: a renewable source of bioactive compounds and other chemicals. *Science Progress*, 98, 145-168.
- Eykelenburg, C. (1979). The ultrastructure of *Spirulina platensis* in relation to temperature and light intensity. *Antonie van Leeuwenhoek*, 45, 369-390.
- Fábregas, J., Abalde, J., Herrero, C., Cabezas, B., & Veiga, M. (1984). Growth of marine microalgae *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentration. *Aquaculture*, 51, 237-243.
- Faintuch, B. (1989). *Análise comparativa da produção de biomassa a partir de três cianobactérias empregando distintas fontes nitrogenadas*. Master Thesis, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil.
- Faucher, O., Coupal, B., & Leduy, A. (1979). Utilization of seawater and urea as a culture medium for *Spirulina maxima*. *Canadian Journal of Microbiology*, 25, 752.
- Fedorov, S., Svetlana, P., Ermakova, T., Zvyagintseva, N., & Stonik, V. (2013). Anticancer and cancer preventive properties of marine polysaccharides: some results and prospects. *Marine Drugs*, 11, 4876-4901.
- Gallardo-Casas, C., Cano-Europa, E., Lopez-Galindo, G., Blas-Valdivia, V., Olvera-Ramírez, R., Franco-Colín, M., & Ortiz-Butrón, R. (2011). Las ficobiliproteínas de *Spirulina maxima* y *Pseudanabaena tenuis* protegen contra el daño hepático y el estrés oxidativo ocasionado por el Hg²⁺. *Revista Mexicana Ciencias Farmacéuticas*, 41(2), 30-35.
- García, E. (2009). *Variación temporal de la concentración de microcistinas y su relación con algunos parámetros ambientales en aguas del embalse Clavellino, estado Sucre*. Trabajo de Grado. Licenciatura en Química. Universidad de Oriente, Venezuela.
- González, E., Ortaz, M., Peñaherrera, C., Montes, E., Matos, M., & Mendoza, J. (2003). Fitoplancton de cinco embalses de Venezuela con diferentes estados tróficos. *Limnetica*, 22(1-2), 15-35.
- Gómez, P., & González, M. (2005). The effect of temperature and irradiance on the growth and carotenogenic capacity of seven strains of *Dunaliella salina* (Chlorophyta) cultivated under laboratory conditions. *Biological Research*, 38(2-3), 151-162.

- Guevara, M., Arredondo-Vega, B., Palacios, Y., Saéz, K., & Gómez, P. (2016). Comparison of growth and biochemical parameters of two strains of *Rhodomonas salina* (Cryptophyceae) cultivated under different combinations of irradiance, temperature, and nutrients. *Journal of Applied Phycology*, 28(5), 2651-2660.
- Guillard, R. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. En Smith, W. L., & Chanle, M. H. (Eds.). *Culture of Marine Invertebrate Animals* (pp. 26-60). New York, USA: Editorial Plenum Press.
- Jeffrey, S., & Humphrey, G. (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*, 167(2), 191-194.
- Khazi, M., Demirel, Z., & Dalay, M. (2018). Enhancement of biomass and phycocyanin content of *Spirulina platensis*. *Frontiers in Bioscience*, 10, 276-286.
- Kumari, A., Kumar, A., Pathak, A., & Guria, C. (2014a). Carbon dioxide assisted *Spirulina platensis* cultivation using NPK-10:26:26 complex fertilizer in sintered disk chromatographic glass bubble column. *Journal of CO₂ utilization*, 8, 49-59.
- Kumari, A., Sharma, V., Pathak, A., & Guria, C. (2014b). Cultivation of *Spirulina platensis* using NPK-10:26:26 complex fertilizer and simulated flue gas in sintered disk chromatographic glass bubble column. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2, 1859-1869.
- Lamela, T., & Márquez-Rocha, F. (2000). Phycocyanin production in seawater culture of *Arthrospira maxima*. *Ciencias Marinas*, 26(4), 607-619.
- Layam, A., & Kasi, C. (2006). Antidiabetic property of Spirulina. *Diabetologia Croatica*, 35(2), 29-33.
- Lee, M., Chen, Y., & Peng, T. (2012). Two-stage culture method for optimized polysaccharide production in *Spirulina platensis*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(7), 1562-1569.
- Lewin, R. (1980). Uncoiled variants of *Spirulina platensis* (Cyanophyceae: Oscillatoriaceae). *Archive Hydrobiology Supplement*, 60, 48-52.
- Li, Y., Horsman, M., Wu, N., Lan, C., & Dubois, N. (2008). Biofuels from microalgae. *Biotechnology Progress*, 24(4), 815-820.
- Luo, J., & Jiang, L. (2015). Production of aquatic feed grade algal powder from turtle breeding wastewater using a locally isolated *Spirulina* sp. JXSC-S1. *African Journal of Microbiology Research*, 9(51), 2404-2409.
- Lyra, C., Suomalainen, S., Gugger, M., Vezie, C., Sundman, P., Paulin, L., & Sivonen, K. (2001). Molecular characterization of planktic cyanobacteria of *Anabaena*,

Aphanizomenon, *Microcystis* and *Planktothrix* genera. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 513-526.

- Marín-Prida, J., Llópiz-Arzuaga, A., Pavón, N., Pentón-Rol, G., & Pardo, G. (2015). Aplicaciones de la C-ficocianina: métodos de obtención y propiedades farmacológicas. *Revista de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias*, 1(1), 29-43.
- 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., Chatzipavlidis, I., & Georgakakis, D. (2012). Carbohydrates production and bio-flocculation characteristics in cultures of *Arthrospira (Spirulina) platensis*: Improvements through phosphorus limitation process. *Bioenergy Research*, 5, 915-925.
- Marrez, D., Naguib, M., Sultan, Y., Daw, Z., & Higazy, A. (2013). Impact of culturing media on biomass production and pigments content of *Spirulina platensis*. *International Journal of Advanced Research*, 1(10), 951-961.
- Merayo, S., & González, E. (2010) Variaciones de abundancia y biomasa del zooplancton en un embalse tropical oligo-mesotrófico del norte de Venezuela. *Revista de Biología Tropical*, 58(2), 603-619.
- Murugan, T., & Rajesh, R. (2014). Cultivation of two species of *Spirulina (Spirulina platensis* and *Spirulina platensis* var *lonar*) on sea water medium and extraction of C-phycocyanin. *European Journal of Experimental Biology*, 4(2), 93-97.
- Ouhtit, A., Ismail, M., Othman, A., Fernando, A., Abdraboh, M., El-Kott, A., Azab, Y., Abdeen, S., Gaur, R., Gupta, I., Shanmuganathan, S., Al-Farsi, Y., Al-Riyami, H. & Raj, M. ... & . (2014). Chemoprevention of rat mammary carcinogenesis by *Spirulina*. *The American Journal of Pathology*, 184(1), 296-303.
- Pandey, J., & Tiwari, A. (2010). Optimization of biomass production of *Spirulina maxima*. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 1(2), 20-32.
- Pelizer, L., & Oliveira, I. (2014). A method to estimate the biomass of *Spirulina platensis* cultivated on a solid medium. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(3), 933-936.
- Petrash, D., Gingras, M., Lalonde, S., Orange, F., Pecoits, E., & Konhauser, K. (2012). Dynamic controls on accretion and lithification of modern gypsum-dominated thrombolites, Los Roques, Venezuela. *Sedimentary Geology*, 245-246, 29-47.
- Ravelonandro, P., Ratianarivo, D., Joannis-Cassan, C., Isambert, A., & Raherimandimby, M. (2011). Improvement of the growth of *Arthrospira (Spirulina) platensis* from Toliara (Madagascar): Effect of agitation, salinity and CO₂ addition. *Food and Bioprocess Processing*, 89(3), 209-216.

- Rincón, D., Semprun, A., Dávila, M., Velásquez, H., Morales, E., & Hernández, J. (2013). Producción de harina de *Spirulina maxima* para ser empleada como ingrediente en la elaboración de dietas para peces. *Zootecnia Tropical*, 31(3), 187-191.
- Rippka, R. (1988). Isolation and purification of cyanobacteria. *Methods Enzymology*, 167, 3-27.
- Rodríguez, G. (2001). The Maracaibo System, Venezuela. En Seeliger, U. & Kjerfve, B. (Eds.). *Coastal Marine Ecosystems of Latin America*. Berlin: Springer.
- Rodríguez, R., Ortiz, R., Blas, V., Hernández A., & Cano, E. (2012). Phycobiliproteins or C-phycoyanin of *Arthrospira (Spirulina) maxima* protect against HgCl₂-caused oxidative stress and renal damage. *Food Chemistry*, 135, 2359-2365.
- Saini, D., Pabbi, S., & Shukla, P. (2018). Cyanobacterial pigments: Perspectives and biotechnological approaches. *Food and Chemical Toxicology*, 120, 616-624.
- Sallal, A., Al-Hassan, R., & Nimer, N. (1990). Effect of salinity on photosynthesis and glycolate dehydrogenase of *Spirulina subsalsa* and *Sinechocystis* sp. *British Phycological Society*, 25, 201-203.
- Salvador, G., Uranga, R., & Giusto, N. (2011). Iron and mechanisms of neurotoxicity. *International Journal of Alzheimer's disease*, 2011, 1-9.
- Sassano, C., Gioielli, L., Almeida, K., Sato, S., Perego, P., Converti, A., & Carvalho, J. (2007). Cultivation of *Spirulina platensis* by continuous process using ammonium chloride as nitrogen source. *Biomass and Bioenergy*, 31, 593-598.
- Schlösser, U. (1982). Sammlung von Algenkulturen. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 95, 181-276.
- Sharma, G., Kumar, M., Irfan, M., & Dut, N. (2014). Effect of carbon content, salinity and pH on *Spirulina platensis* for phycocyanin, allophycocyanin and phycoerythrin accumulation. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, 6(4), 202-206.
- Sokal, R. R., & Rohlf, F. J. (1995). *Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research* (3rd Edition). New York: W. H. Freeman and Co.
- Soletto, D., Binaghi, L., Ferrari, L., Lodi, A., Carvalho, J., Zilli, M., & Converti, A. (2008). Effects of carbon dioxide feeding rate and light intensity on the fed-batch pulse-feeding cultivation of *Spirulina platensis* in helical photobioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 39(2), 369-375.
- Sommella, E., Conte, G., Salviati, E., Pepe, G., Bertamino, A., Ostacolo, C., Sansone, F., Prete, F., Aquino, R. & ... & Campiglia, P. (2018). Fast profiling of natural pigments in different *Spirulina Arthrospira platensis* dietary supplements by DI-FT-ICR and evaluation of their antioxidant potential by pre-column DPPH-UHPLC assay. *Molecules*, 23(5), 1152.

- Soundarapandian, P. & Vasanthi, B. (2010). Effects of chemical parameters on *Spirulina platensis* biomass production: optimized method for phycocyanin extraction. *International Journal of Zoological Research*, 6(4), 293-303.
- Sreevani, P., Bhanumathi, G., Mohammad, S., & Murthy, S. (2011). Effect of high salt stress on photosynthetic electron transport activities in the cyanobacterium, *Spirulina platensis*. *The Bioscan*, 6(2), 311-313.
- Tambiev, A., Vasilieva, S., & Lukyanov, A. (2011). Manifestation of salt tolerance of *Spirulina platensis* and *Spirulina maxima* cyanobacteria of the genus *Arthrospira* (*Spirulina*). *Moscow University Biological Sciences Bulletin*, 66(4), 133-137.
- Torres, L., Lopez, Y., Gomez, Y., Bautista, E., & Corzo, L. (2018). Production and broad characterization of a *Spirulina platensis* dry powder grown in bubbled columns. *Journal of Advances in Microbiology*, 9(3), 1-16.
- Uslu, L., Isik, O., Koc, K., & Goksan, T. (2011). The effects of nitrogen deficiencies on the lipid and protein contents of *Spirulina platensis*. *African Journal of Biotechnology*, 10, 386-389.
- Valerio, E., Chambel, L., Paulino, S., Faria, N., Pereira P., & Tenreiro, R. (2009). Molecular identification, typing and traceability of cyanobacteria from freshwater reservoirs. *Microbiology*, 155, 642-656.
- Van-Den-Hoek, C., Mann, D., & Jahns, H. (1995). *Algae. An introduction to Phycology*. Cambridge, U. K.: Cambridge University Press.
- Whitton, B., & Potts, M. (2012). Introduction on the cyanobacteria. En Whitton, B. (Ed.). *Ecology of cyanobacteria II: Their diversity in space and time*. (pp. 1-13). Reino Unido: Springer.
- Whyte, J. (1987). Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture*, 60, 231-241.
- Yuan, X., Kumar, A., Sahu, A., & Ergas, S. (2011). Impact of ammonia concentration on *Spirulina platensis* growth in an air lift photobioreactor. *Bioresource Technology*, 102(3), 3234-3239.
- 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*. Trab. Doct. Universidad de París, Paris, Francia.