

## Research Article

# Aplicación de estrategias nutricionales y su efecto en el crecimiento en el cultivo continuo de *Spirulina* (*Arthrospira platensis*)

Elizabet Rojas<sup>1,4</sup>, Marcela Ávila<sup>2</sup> & Gustavo Parada<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Área Desarrollo Acuícola, CORDUNAP, Av. Playa Brava 3256, Iquique, Chile

<sup>2</sup>Instituto de Ciencia y Tecnología, Universidad Arturo Prat, Ejército 443, Puerto Montt, Chile

<sup>3</sup>Consultora Apta-Aqua, La Marina 925, Puerto Varas, Chile

<sup>4</sup>Programa Magíster en Acuicultura, Facultad de Ciencias del Mar  
Universidad Católica del Norte, P.O. Box 117, Coquimbo, Chile

**RESUMEN.** Se realizó un cultivo continuo de *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) durante 78 días en un fotobiorreactor tubular de 300 L de volumen. Durante este periodo se registró el crecimiento en biomasa y la respuesta del cultivo a la estrategia de adición del medio nutritivo. Utilizando como base el medio Zarrouk modificado, se elaboraron tres medios: medio inicial (MI), medio crecimiento (SA1+SA2) y medio mantenimiento (SB1+SB2) para las distintas etapas del cultivo. La entrega de los medios se efectuó paulatinamente y de acuerdo a los requerimientos del crecimiento en biomasa (en peso seco) diario del cultivo. La biomasa inicial del cultivo fue de 2,0 g L<sup>-1</sup>, al día 20 se efectuó la primera cosecha parcial (50%) dando inicio a una nueva etapa del cultivo con una biomasa inicial de 1,7 g L<sup>-1</sup>, 20 días después se realizó una segunda cosecha parcial del cultivo, iniciando una tercera etapa de cultivo con una biomasa de 1,6 g L<sup>-1</sup>. Los resultados obtenidos al cabo de las cosechas fueron, en promedio, de 3,7; 4,1 y 9,7 g L<sup>-1</sup>, respectivamente. El análisis proximal efectuado al final del cultivo continuo indicó un 71,6% de proteína.

**Palabras clave:** *Arthrospira platensis*, *Spirulina*, medio nutritivo, crecimiento, cultivo, Chile.

## Application of nutritional strategies and their effect in continuous culture of *Spirulina* (*Arthrospira platensis*)

**ABSTRACT.** A continuous culture of *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) was performed for 78 in a tubular photobioreactor of 300 L volume. During this period there was growth in biomass and crop response to the strategy of adding the nutrient medium. Using as a basis the modified Zarrouk medium, three nutritive combinations were elaborated: initial medium (MI), growth medium (SA1+SA2) and maintenance medium (SB1+SB2) for different crop stages. The media delivery is affected gradually and in accordance with requirements of growing biomass (dry weight) daily cultivation. The initial crop biomass was 2.0 g L<sup>-1</sup>, on day 20 of culture was made the first partial harvest (50%) starting a new stage of the crop with an initial biomass of 1.7 g L<sup>-1</sup>. 20 days after a second crop was partially culture initiating a third culture step with a biomass of 1.6 g L<sup>-1</sup>. The results obtained after harvest were, on the average, 3.7; 4.1 and 9.7 g L<sup>-1</sup> respectively. The proximal analysis was performed at the end of the continuous cultivation showed a 71.6% of protein content.

**Keywords:** *Arthrospira platensis*, *Spirulina*, nutrient medium, growth, culture, Chile.

---

Corresponding author: Elizabet Rojas (elizabet.rojas@cordunap.cl)

## INTRODUCCIÓN

La especie *Arthrospira platensis*, conocida como *Spirulina*, es una cianobacteria, capaz de convertir la energía del sol en compuestos químicos usando

dióxido de carbono y liberando oxígeno. Por sus características, ha adquirido gran importancia en la industria de alimentos, farmacéutica y cosmética, debido a su alto valor nutricional por su contenido de proteínas, vitaminas, sales minerales y pigmentos

(Bathacharya & Shivaprakash, 2005; Vieira *et al.*, 2003; Torres *et al.*, 2007) y como agente antimicrobiano (Mostafa & Gawish, 2009). Además, es reconocida como la mejor fuente natural de vitamina B<sub>12</sub> (Piñero *et al.*, 2001).

Los primeros registros del uso de la Spirulina como alimento se remontan al siglo XVI cuando los españoles llegaron a América, en ese entonces se conocían como “Tecuítlalt” (Arenas, 2009). Existen numerosos estudios que demuestran las propiedades de esta microalga en la prevención de tipos de cáncer en humanos y animales, mejoramiento del sistema inmune y otras aplicaciones que incluyen el uso de antioxidantes como suplemento alimenticio, que estarían previniendo de enfermedades cardiacas, envejecimiento entre otras (Piñero *et al.*, 2001).

*A. platensis* tiene la capacidad de crecer en condiciones de cultivo autótrofo (Shichi & Ogawa, 1977; Vieira *et al.*, 2003; Bathacharya & Shivaprakash, 2005; Sudhir *et al.*, 2005), mixotrófico y heterótrofo (Márquez *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1999, Vonshak *et al.*, 2000, Lodi *et al.*, 2005; Andrade & Costa, 2007; Dhiab *et al.*, 2010).

Es producida a nivel masivo en países como Estados Unidos, India, Tailandia, China, Cuba, México, Chile y Sud África. La producción a escala comercial depende de muchos factores, entre ellos la disponibilidad de nutrientes, temperatura e iluminación. Otro aspecto importante, en el escalamiento del cultivo, ha sido la transición desde el laboratorio al cultivo a gran escala (Grobbelaar, 2009). Estos factores claramente influyen la producción de biomasa de Spirulina y su composición bioquímica. Se han descrito varios tipos y formas de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas (Tredici *et al.*, 1991; Tredici & Materassi, 1992; Lee, 2001), sin embargo existen numerosas dificultades relacionadas con la productividad en sistemas cerrados. Entre ellos los costos, sistemas de iluminación, transferencia de biomasa y tipos de nutrientes (Ogbonna & Tanaka, 2000). El cultivo comercial e industrial de esta microalga ha estado exclusivamente basado en el sistema de cultivo autotrófico, donde se requiere adicionar nutrientes que son necesarios para los procesos metabólicos en la producción de biomasa. Uno de los nutrientes principales es la incorporación de carbono, el cual tiene gran influencia en la definición de los costos de producción de un cultivo masivo. El presente estudio entrega antecedentes sobre el efecto de la composición de medios de cultivo en la producción de biomasa de *A. platensis* en un sistema de cultivo cerrado, en fotobiorreactor, en el norte de Chile.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Preparación del inóculo

Se cultivó inicialmente en dos estanques de 200 L de capacidad (160 L de volumen útil), Spirulina (*A. platensis*) (cepa MS 222 Prof. Claudio Brieba, Univ. Arturo Prat) proveniente de cultivos intermedios. Los cultivos intermedios se iniciaron en botellones de policarbonato de 20 L de capacidad, los cuales se mantuvieron en un recinto cerrado con temperaturas que fluctuaron entre 21 y 35°C, cada estanque de 200 L se inoculó con un botellón de 20 L. Los estanques de 200 L se mantuvieron en las condiciones antes señaladas por un periodo de 10 días, luego de este periodo, el cultivo fue cosechado utilizando para ello una manguera instalada desde la base del estanque que evacuaba directamente a dos tamices de 32 y 64 µm respectivamente. La microalga cosechada se lavó con abundante agua dulce, para eliminar las sales. La biomasa obtenida antes de ser depositada en baldes de 20 L fue tratada con una solución de 1 L de agua dulce con 10 g de sal, para evitar ruptura de las células por el lavado. La Spirulina cosechada se conservó en baldes de 20 L, para la inoculación del fotobiorreactor.

### Preparación de medio nutritivo para fotobiorreactor

La metodología en la preparación de los medios nutritivos fue desarrollada como parte del proyecto FONDEF D04I1258. En este contexto, la formulación de los medios de cultivo se hizo en forma especial por uno de los autores del trabajo, Dr. Parada, para la especie y para el sistema de cultivo empleado (cerrado continuo y fotobiorreactor), considerando para ello resultados obtenidos previamente con *A. platensis*. En la preparación de las soluciones se utilizó como base el medio Zarrouk modificado para cultivos masivos (Zarrouk, 1996). La preparación del medio nutritivo para el cultivo inicial en fotobiorreactor se basó en el medio MI (Tabla 1), los nutrientes fueron pesados en una balanza digital de ± 0,001 g de precisión. Para ello se disolvieron los nutrientes en seis baldes de 20 L con agua dulce: NaHCO<sub>3</sub>, NaCl, KNO<sub>3</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Fosfato diamónico ó DAP), EDTA Fe, y MgSO<sub>4</sub>. La solución de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> se preparó en 5 L de agua destilada: 500 g de molidos previamente en un procesador, se agregaron en un matraz de 5.000 mL, luego se adicionó 4.750 mL de agua destilada mezclando por 15 min en un agitador magnético (Fisatom), luego se adicionaron 250 mL de HCl (32%), para enrasar a 5 L, se mezclaron los componentes por 15 min más. El EDTA-Fe, también para 5 L de agua destilada, se preparó de la siguiente manera: 63 g de EDTA en un matraz de 5.000 mL de

**Tabla 1.** Medio inicial (MI) para cultivo continuo en fotobiorreactor.

**Table 1.** Initial medium (MI) for continuous culture in photobioreactor.

Nutrientes/solución	MI (g L <sup>-1</sup> )
NaHCO <sub>3</sub>	8,4
NaCl	5
KNO <sub>3</sub>	0,8
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (mL L <sup>-1</sup> )	0,35
EDTA Fe (mL L <sup>-1</sup> )	0,16
MgSO <sub>4</sub>	0,02

agua destilada, dejando mezclar por 15 min. Luego se agregaron 50 g de FeSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O y adicionaron 1.000 mL de agua destilada para llegar a 5 L. Se agitó la solución por 15 min. Para ambas soluciones se terminó la preparación filtrándola con papel filtro en un embudo, trasvasiéndola a un botellón de 5 L. Las soluciones preparadas fueron refrigeradas para su uso en las preparaciones de los medios.

Los medios para crecimiento (SA1+SA2) y mantenimiento (SB1+SB2), fueron preparados de la misma manera que el medio MI, pero utilizando los nutrientes y cantidades indicadas para la preparación de los respectivos medios (Tabla 2).

### Densidad de cultivo

Para evaluar el crecimiento de cada etapa se tomó diariamente (a las 18:00 h) una muestra de 100 mL del cultivo y se dividió en tres tubos. Las muestras fueron filtradas, utilizando una bomba de vacío (Today's Instruments), filtros de fibra de vidrio (Whatman) de 0,47 µm de diámetro y kitasato de 500 mL. Las muestras filtradas fueron lavadas con una solución de agua acidificada a pH 5 (ácido muriático), luego

fueron puestas en una estufa (Binder) a 57°C por 6 h, al día siguiente los filtros fueron depositados en un desecador (Nalgene) por 1 h, posteriormente eran pesados en una balanza analítica (A&D Company) de ± 0,0001 g de precisión, para calcular la biomasa del cultivo y determinar así el volumen de nutrientes a entregar en la siguiente etapa.

### Adición de medios nutritivos

La adición de nutrientes se realizó durante la mañana desde las 9:30 hasta 12:30 h, después del registro de variables físicas y químicas. Este procedimiento se consideró para que el cultivo tuviese la temperatura adecuada e iluminación suficiente para la incorporación de los nutrientes. El inicio de la adición de los medios SA1 y SA2 se basó en la gráfica elaborada para el cultivo continuo de Spirulina (Fig. 1). Los medios SA1 y SA2 fueron agregados de forma proporcional al crecimiento diario en biomasa registrado. El medio para mantenimiento se comenzó a utilizar después de efectuar la segunda cosecha parcial, en el día 66 de cultivo continuo (día 24, cultivo 3). Se comenzó aplicando una dosis baja de nutrientes, terminando con una entrega diaria de 25 L por medio (SB1+SB2). La adición de los medios se efectuó mediante el uso de dos bombas dosificadoras (Blackstone), una para cada medio, permitiendo dosificar la entrega de nutrientes por un tiempo de no más de 3,75 h, tiempo necesario para que todo el medio entregado se diluyera dentro del sistema.

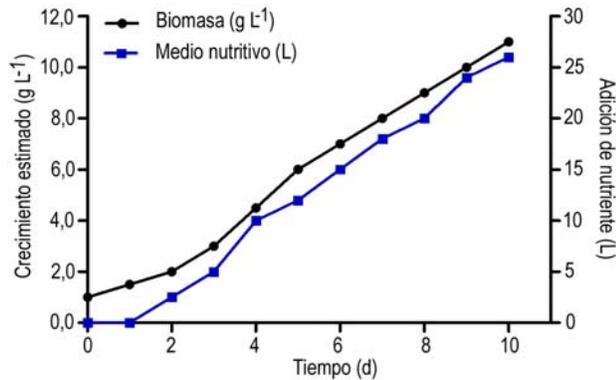
### Registro de variables

Adicionalmente se registraron las variables físicas y químicas de los cultivos, tomando tres registros diarios: 09:00; 13:00 y 18:00 h. Las variables consideradas en las mediciones fueron: temperatura del cultivo, irradiación, pH y salinidad. La medición de variables fue considerada desde los días post-inóculo de cada batch (C1, C2 y C3).

**Tabla 2.** Medios nutritivos para cultivo continuo en fotobiorreactor.

**Table 2.** Nutrient medium for continuous culture in photobioreactor.

Nutrientes/Solución	Medio crecimiento (g L <sup>-1</sup> )		Medio mantenimiento (g L <sup>-1</sup> ) para 25 L de medio	
	SA1	SA2	SB1	SB2
NaHCO <sub>3</sub>	16,8		420	
NaCl		10		250
KNO <sub>3</sub>		73,6		400
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (mL L <sup>-1</sup> )	32,2		175	
EDTA Fe (mL L <sup>-1</sup> )		14,7		80
MgSO <sub>4</sub>		1,84		10



**Figura 1.** Plan de adición de nutrientes SA1+SA2, estimando el crecimiento del cultivo hasta alcanzar 10 g L<sup>-1</sup> de biomasa.

**Figure 1.** Scheme of nutrient addition SA1+SA2, estimating crop growth up to 10 g L<sup>-1</sup> of biomass.

### Inicio del cultivo

La preparación del fotobiorreactor, antes del inóculo (cultivo C1), se inició llenando desde el desgasificador de gases (reservorio) con 140 L de agua dulce y adicionando 120 L del medio nutritivo MI. Las soluciones de nutrientes se adicionaron a través del reservorio, estos fueron mezclados al interior del fotobiorreactor mediante una bomba centrífuga. Posteriormente se procedió a inocular el fotobiorreactor con 40 L de *Spirulina* concentrada, completando el volumen del estanque reservorio (desgasificador), se completó así el volumen total del sistema en 300 L. Luego de la primera cosecha parcial (50%), se agregó nuevamente medio MI (disuelto en 150 L de agua dulce), comenzando en el día 21 con el segundo batch (C2) del cultivo continuo. El tercer batch (C3) se inició de la misma manera que C2. La inoculación se efectuó entre las 17:30 y 18:00 h, para evitar foto-exposición del cultivo. Una hora y media después de inoculado el fotobiorreactor, se procedió a tomar una muestra, para determinar la concentración inicial del cultivo. Este último procedimiento se repitió cada vez que se cosechó para dar inicio un nuevo batch.

### Cosechas parciales

Antes de iniciar la entrega de nutrientes al sistema de cultivo, se cosechó una parte del volumen de cultivo, que correspondía al mismo volumen de nutrientes que se adicionaba al fotobiorreactor. El volumen cosechado fue llevado al laboratorio, donde se concentraba tamizando la *Spirulina* recolectada en tamices de 32 y 64  $\mu\text{m}$ , luego se lavó con solución salina, el concentrado se depositó en recipientes de 1 L. Terminado este proceso, se ingresó el concentrado

nuevamente al reservorio del cultivo. Una vez cosechada la biomasa del batch 3 (C3), la microalga seca se envió a un laboratorio especializado (Escuela de Acuicultura, Universidad Católica de Temuco) para su análisis proximal.

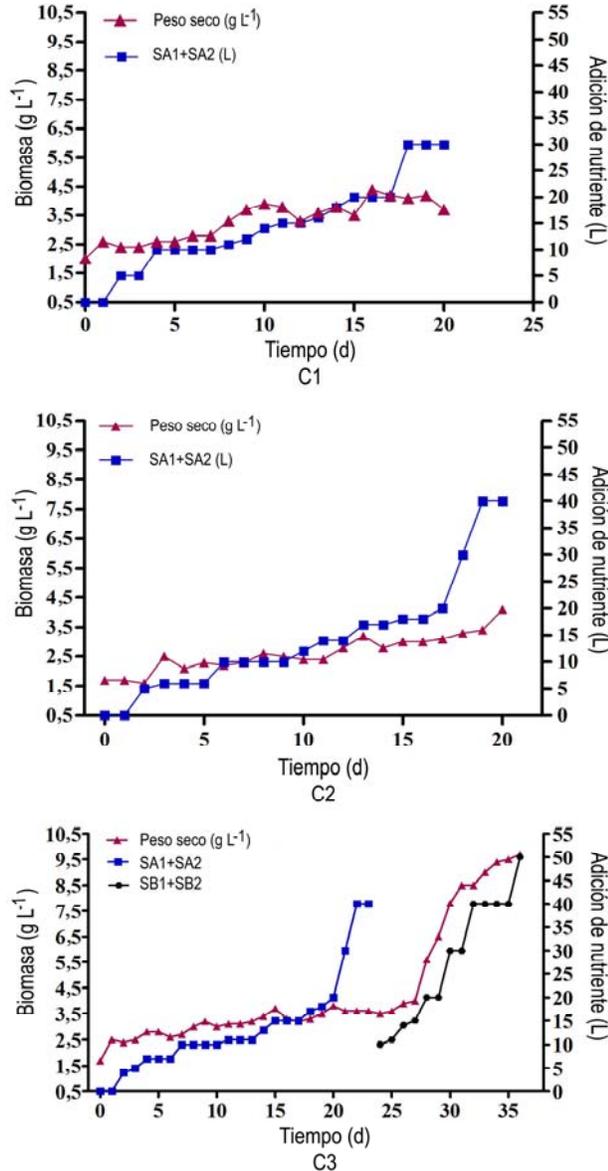
### Análisis estadístico

Los valores fueron presentados en medias  $\pm$  error estándar. Las diferencias estadísticas fueron evaluadas utilizando ANOVA de una vía. Diferencias significativas ( $P < 0,01$ ) entre los diferentes batch y medios fueron evaluados con el test de Bonferroni.

## RESULTADOS

Se observó un consumo rápido del medio MI, adicionado al inicio del cultivo, evidenciándose por la disminución de la biomasa en el día 2 de cultivo, en todos los batch. Los resultados muestran que el primer batch (C1) tuvo una concentración inicial de peso seco promedio de  $2 \pm 0,02$  g L<sup>-1</sup> (día 0). Entre los días 4 y 10 de cultivo se registró un incremento en biomasa, de  $2,6 \pm 0,03$  a  $3,9 \pm 0,04$  g L<sup>-1</sup> respectivamente. La máxima biomasa obtenida fue de  $4,4 \pm 0,04$  g L<sup>-1</sup> de peso seco en el día 16 de cultivo, sin embargo avanzado el cultivo, se obtuvo una baja en la biomasa de  $3,7 \pm 0,03$  g L<sup>-1</sup>, en el día 20 (Fig. 2). En el segundo batch (C2), se registró una biomasa promedio de  $4,1 \pm 0,09$  g L<sup>-1</sup> (Fig. 2). En este caso, el cultivo mostró un crecimiento más lento respecto a C1. El tercer batch (C3), se inició con una biomasa promedio de  $1,7 \pm 0,21$  g L<sup>-1</sup>. Durante los primeros 20 días de cultivo se observó un crecimiento lento, con una baja considerable en el día 16, respecto del día anterior (de  $3,7 \pm 0,09$  a  $3,3 \pm 0,04$  g L<sup>-1</sup> de peso seco promedio, respectivamente). En este batch se obtuvo, al día 20 de cultivo, una biomasa promedio de  $3,8 \pm 0,01$  g L<sup>-1</sup> (día 62 de cultivo continuo). En el batch C3, se comenzó a agregar, en el día 24 de cultivo, el medio de mantenimiento (SB1+SB2), pudiéndose observar un incremento en la biomasa, la que se mantuvo hasta el día 78 de cultivo continuo registrando una densidad promedio final de  $9,7 \pm 0,13$  g L<sup>-1</sup> (Fig. 2), logrando un incremento de 5,9 g L<sup>-1</sup> respecto del día 20 del tercer batch.

El registro de variables abióticas se observa en las figuras 3 y 4. Durante los batch C1, C2 y C3, se registró una temperatura promedio de  $25,7 \pm 4,7^\circ\text{C}$ ;  $27,5 \pm 3,7^\circ\text{C}$  y  $28,7 \pm 6,5^\circ\text{C}$ , respectivamente. El pH promedio para C1, C2 y C3 fue de 9; 9,67 y 9,48  $\pm$  0,29, 0,36 y 0,58, respectivamente. La salinidad promedio de C1 fue de  $15,23 \pm 3,79$  psu, fue de C2  $17,10 \pm 2,86$  psu y en C3 fue de  $17,87 \pm 1,9$  psu (Fig. 4). En el caso de este experimento la concentración



**Figura 2.** Comportamiento de C1, C2 y C3, en crecimiento ( $\text{g L}^{-1}$ ) y su respuesta a la adición de nutrientes.

**Figure 2.** Growth behavior of C1, C2 y C3, ( $\text{g L}^{-1}$ ) and its response to the addition of nutrients.

salina no superó los 20 psu, ya que en experiencias previas a este experimento se apreció un descenso de biomasa cuando la salinidad sobrepasó los 21 psu. Por lo tanto, cuando la concentración salina subió hasta 20 psu, se suspendió la adición de NaCl en los medios SA1+SA2 y SB1+SB2, para evitar la disminución en biomasa de los cultivos por estrés salino, por lo que el cultivo se mantuvo en 0,34 M de NaCl.

Por otra parte, en los batch C1 y C2, se observó una disminución considerable de biomasa, cuando la temperatura y la irradiación fueron bajas (9:00 h), por

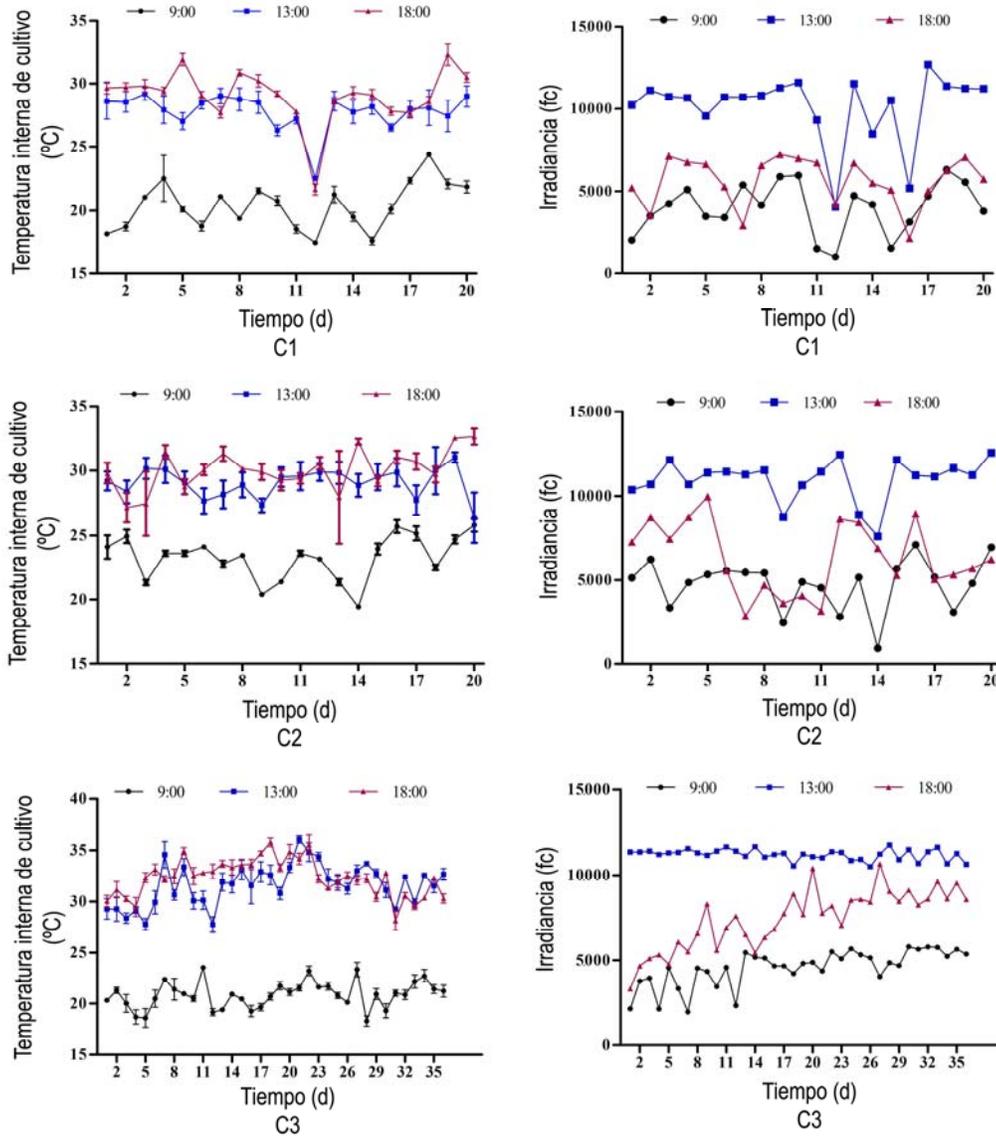
ejemplo, al comparar los gráficos de crecimiento en biomasa y de temperatura de cultivo (día 12 de cultivo), se registró una biomasa de  $3,3 \text{ g L}^{-1}$ . El mismo comportamiento se observó el día 16, cuando la biomasa registrada fue  $3,5 \text{ g L}^{-1}$ , la irradiación para esos días fue de 1.017 y 1.544 fc a las 9:00 h (Fig. 4); estos resultados muestran que la irradiación y temperatura afectan el incremento de biomasa del cultivo aun cuando se esté adicionando medio de cultivo. En los días posteriores, los resultados obtenidos mostraron lento incremento en la concentración de biomasa. En C3 también hubo un pausado crecimiento de biomasa, con el medio SA1+SA2, sin observarse grandes variaciones respecto a los batch anteriores (C1 y C2). Sin embargo, al utilizar el medio SB1+SB2, se obtuvo un incremento en la biomasa, y el cultivo aparentemente no se vio afectado por las variaciones bajas de temperatura; cabe notar que la irradiación en este periodo presentó escasas fluctuaciones. La irradiación promedio que se registró durante C1 fue de  $6.582 \pm 3.123 \text{ fc}$  (mín. 1.017 y máx. 12.670 fc), C2 registró una irradiación promedio de  $7.340 \pm 3.123 \text{ fc}$  (en donde la mínima y máxima fue de 929 y 12.534 fc, respectivamente). Para C3 se registró en promedio una irradiación de  $7.736 \pm 2.980 \text{ fc}$  (mín. 1.952 fc y máx. 11.770 fc).

Estadísticamente no se encontraron diferencias significativas en el crecimiento de biomasa entre C1, C2 y C3 al utilizar el medio SA1+SA2. Sin embargo se determinaron diferencias significativas al comparar los medios SA1+SA2 y SB1+SB2 ( $P < 0,01$ ) y su influencia en el cultivo, siendo el medio SB1+SB2 el que mostró un mejor resultado para el aumento de biomasa.

Los análisis proximales realizados con muestras provenientes del batch C3, mostraron porcentaje de proteína de 71,6% en base seca.

## DISCUSIÓN

Se reporta una alternativa de medios nutritivos, en cuanto a composición y estrategia de adición, para el cultivo continuo manejado por batch de *Arthrospira platensis*, conocida como Spirulina, con los cuales se puede obtener una mayor biomasa, si se compara con los cultivos discontinuos. Otros autores han demostrado, que es posible también obtener una mayor concentración de biomasa (mayor tasa de crecimiento en fotobiorreactor) en cultivos mixotróficos manejados por batch, logrando obtener concentraciones superiores (de hasta 5 veces más) a los obtenidos en cultivos discontinuos, que se encuentran en un orden de 0,5 a  $1,5 \text{ g L}^{-1}$  (Chen



**Figura 3.** Temperatura promedio de cultivo e irradiancia, registrada para todo el cultivo continuo C1, C2 y C3.

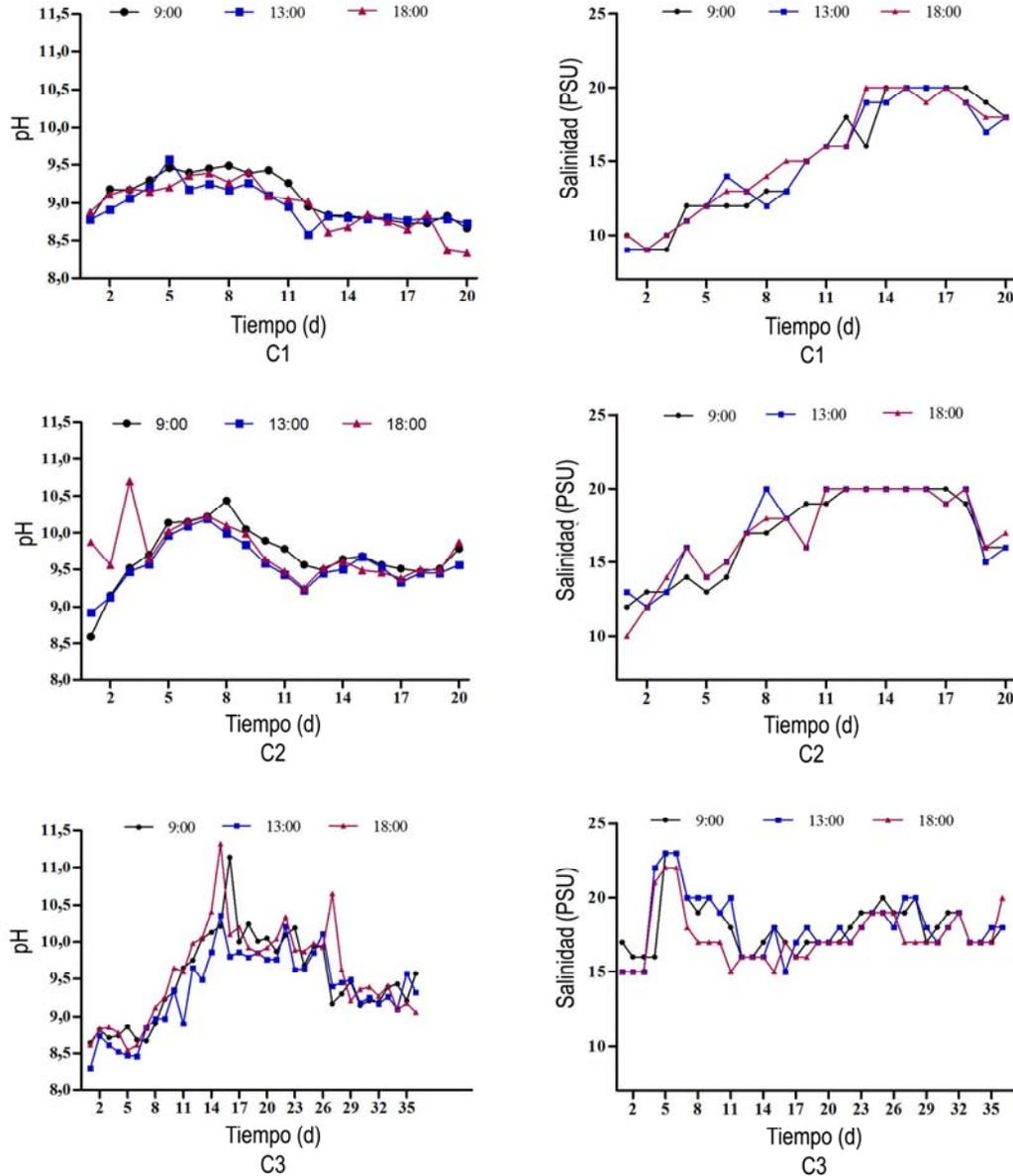
**Figure 3.** Average temperature and irradiance, registered for all continuous culture C1, C2 and C3.

& Zhang, 1997; Chojnacka & Noworyta, 2004; Muliterno *et al.*, 2005).

Algunos autores (Chen & Zhang, 1997; Andrade & Costa, 2007) han encontrado que en los primeros días de cultivo de *A. platensis*, se presenta una fase heterotrófica dominante, que a medida en que los nutrientes (en este caso, glucosa como fuente de carbono) son consumidos, disminuye, dominando la fase fotoautótrofa en una segunda etapa. No obstante Dhiab *et al.*, (2010) han demostrado que los nutrientes (glucosa) en el medio son consumidos los tres primeros días, considerándose esta fase como autótrofa, caracterizada por una alta tasa de fotosíntesis neta, la cual se ve reducida al disminuir

las fuentes orgánicas de carbono. En este estudio el consumo de nutrientes al inicio del cultivo fue muy rápido, evidenciándose la falta de nutrientes a partir del día 3 de cultivo.

Respecto a la utilización de componentes como fuentes de carbono, se ha estudiado el  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , en contraste con  $\text{NaHCO}_3$  y  $\text{CaCO}_3$ . Los resultados obtenidos reflejaron un mayor crecimiento en los cultivos donde se utilizó  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  como fuente de carbono, reemplazante del  $\text{NaHCO}_3$ , y el menor crecimiento se determinó con el uso de  $\text{CaCO}_3$ , encontrando además que *A. platensis*, no presenta crecimiento ante una fuente única de carbono orgánico (Masih *et al.*, 2011). Estos resultados pueden



**Figura 4.** pH y salinidad registrado para los tres batch de cultivo continuo.

**Figure 4.** pH and salinity recorded for the three batch continuous culture.

considerarse para utilizar  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , como fuente de carbono en los medios propuestos, ya que este factor (baja concentración de la fuente de carbono) puede haber influenciado de manera negativa en el crecimiento de los cultivos, dado que se observó un mayor incremento en la biomasa cuando aumentó la concentración de  $\text{NaHCO}_3$  en el medio SB1+ SB2 ( $P < 0,01$ ).

El incremento salino durante el desarrollo del cultivo inhibe la productividad. Vonshak *et al.* (1996) demostraron que se produce una respuesta por parte del alga a un stress salino, las células se adaptan cambiando su composición bioquímica y reduciendo

las proteínas y el contenido de clorofila. Estudios han demostrado que el estrés salino (0,8 M de NaCl) en *A. platensis*, inhibe la actividad del PSII (fotosistema II) de electrones estimulando la actividad del transporte de la PSI (fotosistema I), donde la actividad del PSII de células enteras se redujo hasta 60% durante las primeras 9 h del tratamiento, manteniéndose en ese nivel durante por lo menos 15 h. El estrés salino causó una pérdida del 40% en la eficiencia máxima del PSII y 54% de pérdida con la variable luminosidad (Sudhir *et al.*, 2005).

En relación a las variables abióticas como luz y temperatura Yang *et al.* (2000) encontraron que la

producción de ATP en la primera fase de cultivos mixotróficos, está dada principalmente por la luz. Por otra parte, Chojnacka & Noworyta (2004) encontraron que *Spirulina*, es capaz de crecer en condiciones de luz (fotoautotróficamente), en base a fuentes de carbono (glucosa) orgánico (heterotróficamente) y mixotróficamente (luz y glucosa). Dhiab *et al.* (2010) observaron que *A. platensis* crece en presencia de sustrato orgánico, independientemente de la intensidad de luz y concentración de glucosa, demostrando dos fases diferentes en las tasas instantáneas de crecimiento relativo, en la fotosíntesis neta y tasa de respiración oscura, tanto en cultivos autotróficos como en mixotróficos, caracterizándose por una preponderancia de la actividad fotosintética (aumento en el pH). Los autores sugieren que la actividad metabólica estaría basado fotoheterotróficamente, por la disminución del pH debido a la liberación de dióxido de carbono. En el presente estudio se observó que la productividad de la cepa MS22 de *A. platensis* fue afectada por cambios en la intensidad luminosa y por la temperatura con adición de nutrientes en cultivos autotróficos. No se probó la adición de sustrato orgánico, en sistema cerrado continuo.

En el presente trabajo, de los medios utilizados, el que dio mejor resultado fue el medio SB1+SB2 ( $P < 0,01$ ), el cual debe ser evaluado más detalladamente, como un medio para el crecimiento del cultivo, ya que en este estudio se consideró como medio de mantenimiento.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el financiamiento de esta investigación como parte del proyecto FONDEF D04I1258. Al Prof. Juan Pablo Díaz se le agradece la ayuda en el montaje y puesta en marcha del fotobiorreactor y al Prof. Claudio Brieba (Q.E.P.D.) que facilitó la cepa utilizada en este trabajo.

### REFERENCIAS

- Andrade, M. & J. Costa. 2007. Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. *Aquaculture*, 264: 130-134.
- Arenas, P.M. 2009. Etnofitología aplicada: estudio de casos en relación a la salud y la alimentación en ambientes rurales y urbanos. *Red Iberoamericana de saberes y prácticas locales sobre el entorno vegetal*, 192 pp.
- Bhattacharya, S. & M. Shivaprakash. 2005. Evaluation of three *Spirulina* species grown under similar conditions for their growth and biochemicals. *J. Sci. Food Agricult.*, 85: 333-336.
- Chen, F., Y. Zhang & S. Guo. 1996. Growth and phycocyanin formation of *Spirulina platensis* in photoheterotrophic culture. *Biotechnol. Lett.*, 18: 603-608.
- Chen, F. & Y. Zhang. 1997. High cell density mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucose for phycocyanin production using a fed-batch system. *Enz. Microb. Technol.*, 20(3): 221-224.
- Chojnacka, K. & A. Noworyta. 2004. Evaluation of *Spirulina* sp. growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. *Enz. Microb. Technol.*, 34(5): 461-465.
- Dhiab, B., G. Nejeih, T. Lamia, Y. Ali, C. Rafika, G. Khemissa, A. Jihene, O. Hela & B. Ouada. 2010. Modeling growth and photosynthetic response in *Arthrospira platensis* as function of light intensity and glucose concentration using factorial design. *J. Appl. Phycol.*, 22: 745-752.
- Grobbelaar, J. 2009. From laboratory to commercial production: a case study of a *Spirulina* (*Arthrospira*) facility in Musina, South Africa. *J. Appl. Phycol.*, 21: 523-527.
- Lee, Y.K. 2001. Microalgal mass culture systems and methods: their limitation and potential. *J. Appl. Phycol.*, 13: 307-315.
- Lodi, A., L. Binaghi, D. De Faveri, J. Carvalho, A. Converti & M. Del Borghi. 2005. Fed-batch mixotrophic cultivation of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* (Cyanophyceae) with carbon source pulse feeding. *Ann. Microbiol.*, 55(3): 181-185.
- Marquez, F., K. Sasaki, T. Kakizono, N. Nishio & S. Nagai. 1993. Growth characteristics of *Spirulina platensis* in mixotrophic and heterotrophic conditions. *J. Ferment. Bioeng.*, 76: 408-410.
- Masih, S., M.Y. Sofi & S.G. Singh. 2011. Growth performance of *Spirulina platensis* under mixotrophic culture. *Res. J. Agricult. Sci.*, 2(1): 119-121.
- Mostafa, S.S.M. & F.A. Gawish. 2009. Towards to control *Biomphalaria alexandrina* snails and the free living larval stages of *Schistosoma mansoni* using the microalga *Spirulina platensis*. *Austr. J. Bas. Appl. Sci.*, 3(4): 4112-4119.
- Muliterno, A., P. Correa, C. Vieira, M. Hemkemeier, T.E. Bertolin & L. Colla. 2005. Cultivo mixotrófico da microalga *Spirulina platensis* embatelada alimentada. *Ciênc. Agrotec.*, Lavras, 29(6): 1132-1138.
- Ogbonna, J. & H. Tanaka. 2000. Light requirement and photosynthetic cell cultivation- Development of processes for efficient light utilization in photobioreactors. *J. Appl. Phycol.*, 12(3-5): 207-218.
- Piñero, J., P. Bermejo, A.M. Villar del Fresno. 2001. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. *Farmaco*, 56(5-7): 497-500.

- Sudhir, P.R., D. Pogoryelov, L. Kovács, G. Garab & S. Murthy. 2005. The effects of salts stress on photosynthetic electron transport and thylakoid membrane proteins in the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *J. Biochem. Molec. Biol.*, 38(4): 481-485.
- Shichi, A. & T. Ogawa. 1977. Assessment of growth of a blue-green alga, *Spirulina platensis*, in axenic and continuous culture. *J. Gen. Microbiol.*, 102: 179-182.
- Torres, R., L. Sena & J. Zegarra. 2007. Estudio preliminar de la dinámica poblacional y producción de biomasa de *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* en medios con diferentes concentraciones de iones. XVII Congreso Venezolano de Botánica, Maracaibo, pp. 672-675.
- Tredici, M.R., P. Carlozzi, G. Chini-Zittelli & R. Materassi. 1991. A vertical alveolar panel (VAP) for outdoor mass cultivation of microalgae and cyanobacteria. *Biores. Technol.*, 38: 153-160.
- Tredici, M.R. & R. Materassi. 1992. From open ponds to vertical alveolar panels: the Italian experience in the development of reactors for the mass cultivation of phototrophic microorganisms. *J. Appl. Phycol.*, 4: 221-231.
- Vieira, J., L. Colla & P. Duarte. 2003. Improving *Spirulina platensis* biomass yield using a fed-batch process. *Biores. Technol.*, 92(5): 237-241.
- Vonshak, A., N. Kancharaska, B. Bunnag & M. Tanticharoen. 1996. Role of light and photosynthesis on the acclimation process of the cyanobacterium *Spirulina platensis* to salinity stress. *J. Appl. Phycol.*, 2: 119-124.
- Vonshak, A., S. Cheung & F. Chen. 2000. Mixotrophic growth modifies the response of *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* (Cyanobacteria) cells to light. *J. Phycol.*, 36: 675-679.
- Yang, C, Q. Hua & K. Shimizu. 2000. Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions. *Biochem. Eng. J.*, 6: 87-102.
- Zarrouk, C. 1966. Contribution to the study of a Cyanophyceae influence of various physical and chemical factors on growth and phototynthesis *Spirulina maxima*. Setch. and Gardner, Geithner (Ph.D. Thesis), University of Paris, Paris, 74 pp.
- Zhang, X., Y. Zhang & F. Chen. 1999. Application of mathematical models to the determination optimal glucose concentration and light intensity for mixotrophic culture of *Spirulina platensis*. *Process. Biochem.*, 34: 477-481.

Received: 23 February 2011; Accepted: 11 July 2012