



**UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
INSTITUTO OCEANOGRÁFICO DE VENEZUELA
POSTGRADO EN CIENCIAS MARINAS
CUMANÁ - VENEZUELA**



**PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS MARINAS
MENCIÓN BIOLOGÍA MARINA**

**CULTIVO DE *Arthrospira platensis* (DIVISIÓN CIANOFITA) A DIFERENTES
SALINIDADES Y FUENTES DE NITRÓGENO COMO ESTRATEGIA PARA
MODIFICAR SU COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA**

BERENICE DEL VALLE LICET ANDRADEZ

**TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE MAGÍSTER SCIENTIARUM EN CIENCIAS
MARINAS, MENCIÓN BIOLOGÍA MARINA**

Cumaná, noviembre de 2008

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTO.....	ii
LISTA DE TABLA.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE ANEXOS.....	v
RESUMEN.....	viii
INTRODUCCIÓN.....	1
MATERIALES Y MÉTODOS.....	5
Organismos y condiciones de cultivo.....	5
Determinación de los parámetros de crecimiento.....	5
Crecimiento poblacional:.....	5
Evaluación de la Composición Bioquímica.....	6
Proteínas totales.....	6
Carbohidratos totales.....	7
Ácidos grasos.....	8
Pigmentos.....	9
Clorofila a y carotenoides totales.....	9
Ficocianina.....	10
Exopolisacáridos.....	10
Análisis de los resultados.....	10
RESULTADOS.....	11
Crecimiento Poblacional.....	11
Composición Bioquímica.....	12
Proteínas, lípidos y carbohidratos totales.....	12
Ácidos grasos.....	15
Pigmentos.....	16
Clorofila a y Carotenoides totales.....	16
Ficocianina.....	17
Exopolisacáridos.....	19
DISCUSIÓN.....	21
Composición Bioquímica.....	24
Proteínas.....	24
Carbohidratos.....	25
Lípidos.....	27
Ácidos grasos.....	28
Pigmentos.....	29
Exopolisacáridos.....	32
CONCLUSIONES.....	34
BIBLIOGRAFÍA.....	35
ANEXOS.....	45
HOJAS DE METADATOS.....	52

DEDICATORIA

A mi Dios Todopoderoso.

A mi Virgen Del Valle.

A mis padres (Gilberto y Petra) quienes fueron el motivo mas grande de este éxito, gracias por existir.

A mis hermanos y hermanas mil gracias por sus estimulo y ayuda incondicional, los amo.

A mis sobrinos y sobrinas para que este ejemplo sea de estimulo a seguir.

A Pablo y Paola mil gracias por estar dentro de mi corazón y llenarlo de alegría en mis momentos de tristezas.

A mis tías, primos y primas gracias por sentirse orgullosos de mi.

A Natha mi amiga y hermana de sentimiento, mil gracias por las alegrías y tristezas que compartimos, se que nos ayudaron a crecer como personas, gracias por existir.

AGRADECIMIENTO

Al Profesor y amigo Miguel Guevara gracias por permitirme su asesoramiento, estímulo, importantes aportes y sugerencias durante la realización del presente trabajo.

Al Profesor César Lodeiros, por su gran ayuda, constancia y dedicación en la culminación del mismo. Además de permitirme seguir formando parte de su grupo de estudiantes desde el pregrado.

Al Profesor Luís Freites (paito) por su colaboración, sincera y hermosa amistad durante mi permanencia en el Postgrado.

A mis compañeros de estudio y del laboratorio de Acuicultura Extensión Plancton y Moluscos: Emilio, Paulino, Natividad, Eva, Rafa, Sandra, Chemo Carmen, Romel, Wilmen y Richard.

A mis amigas Lolymar, Raraisy, Mirle, Natha y Maria por compartir cada momento de mi vida y estar siempre apoyándome en las buenas y en las malas, mil gracias” manitas”.

A Vanessa por ser siempre mi estímulo y ejemplo a seguir en mis metas alcanzadas, gracias por tu amistad.

A todos mis Profesores de Pre y Postgrado quienes me ayudaron desde el inicio, en mis primeros pasos hasta lo que soy ahora, a todos gracias.

Al consejo de Investigación de la Universidad de Oriente.

Finalmente, a todas aquellas personas que estuvieron pendientes de este triunfo, gracias las llevo en mi corazón.

LISTA DE TABLA

Tabla 1. Perfil de los ácidos grasos de la microalga <i>Arthrospira. platensis</i> cultivada a diferentes salinidades y fuentes de nitrógeno.....	15
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.-Crecimiento de <i>Arthrospira platensis</i> cultivada a diferentes salinidades y fuentes de nitrógeno.....	11
Figura 2.-Crecimiento de <i>Arthrospira platensis</i> cultivada a diferentes salinidades y fuentes de nitrógeno.....	12
Figura 3. Contenido de carbohidratos totales (%) de <i>Arthrospira platensis</i> cultivada a diferentes salinidades y fuentes de nitrógeno.....	13
Figura 4. Contenido de lípidos totales (%) de <i>Arthrospira platensis</i> cultivada a diferentes salinidades y fuentes de nitrógeno.....	14
Figura 5. Contenido de clorofila a ($\mu\text{g/ml}$) de <i>Arthrospira platensis</i> cultivada a diferentes salinidades y fuentes de nitrógeno.....	17
Figura 6. Contenido de carotenoides totales ($\mu\text{g/ml}$) de <i>Arthrospira platensis</i> cultivada a diferentes salinidades y fuentes de nitrógeno.....	18
Figura 7. Contenido de ficocianina ($\mu\text{g/ml}$) de <i>Arthrospira platensis</i> cultivada a diferentes salinidades y fuentes de nitrógeno.....	19
Figura 8. Contenido de Exopolisacaridos (mg/ml) de <i>Arthrospira platensis</i> cultivada a diferentes salinidades y fuentes de nitrógeno.....	20

LISTA DE ANEXOS

1. Análisis de varianza de la masa seca de la cianobacteria <i>Arthrospira platensis</i> a diferentes salinidades durante los días de cultivo.....	50
2. Análisis de rango múltiple (Scheffe $\alpha=0,05$) de la masa seca de la cianobacteria <i>Arthrospira platensis</i> por días.....	50
3. Análisis de rango múltiple (Scheffe $\alpha=0,05$) de la masa seca de la cianobacteria <i>Arthrospira platensis</i> a diferentes fuentes de nitrógeno.....	50
4. Análisis de rango múltiple (Scheffe $\alpha=0,05$) de la masa seca de la cianobacteria <i>Arthrospira platensis</i> a diferentes salinidades.....	50
5. Análisis de Varianza de las proteínas totales (%) de la cianobacteria <i>Arthrospira platensis</i>	51
6. Análisis de rango múltiple (Scheffe $\alpha=0,05$) de las proteínas totales (%) de la cianobacteria <i>Arthrospira platensis</i> a diferentes fuentes de nitrógeno.....	51
7. Análisis de rango múltiple (Scheffe $\alpha=0,05$) de las proteínas totales (%) de la cianobacteria <i>Arthrospira platensis</i> a diferentes salinidades.....	51
8. Análisis de Varianza de los carbohidratos totales (%) de la cianobacteria <i>Arthrospira platensis</i>	52
9. Análisis de rango múltiple (Scheffe $\alpha=0,05$) de los carbohidratos totales (%) de la cianobacteria <i>Arthrospira platensis</i> a diferentes fuentes de nitrógeno.....	52
10. Análisis de rango múltiple (Scheffe $\alpha=0,05$) de los carbohidratos totales (%) de la cianobacteria <i>Arthrospira platensis</i> a diferentes salinidades.....	52
11. Análisis de Varianza de los lípidos totales (%) de la cianobacteria <i>Arthrospira platensis</i>	53
12. Análisis de rango múltiple (Scheffe $\alpha=0,05$) de los lípidos totales (%) de la cianobacteria <i>Arthrospira platensis</i> a diferentes fuentes de nitrógeno.....	53
13. Análisis de rango múltiple (Scheffe $\alpha=0,05$) de los lípidos totales (%) de la cianobacteria <i>Arthrospira platensis</i> a diferentes salinidades.....	53
14. Análisis de varianza de los ácidos grasos saturados de la cianobacteria <i>Arthrospira platensis</i> a diferentes salinidades y fuentes de nitrógeno.....	54
15. Análisis de rango múltiple (Scheffe $\alpha=0,05$) de los ácidos grasos saturados de la cianobacteria <i>Arthrospira platensis</i> a diferentes fuentes de nitrógeno.....	54

16. Análisis de rango múltiple (Scheffe $\alpha=0,05$) de los ácidos grasos saturados de la cianobacteria <i>Arthrospira platensis</i> a diferentes salinidades.....	54
17. Análisis de varianza de los ácidos grasos monoinsaturados de la cianobacteria <i>Arthrospira platensis</i> a diferentes salinidades y fuentes de nitrógeno.....	55
18. Análisis de rango múltiple (Scheffe $\alpha=0,05$) de los ácidos grasos monoinsaturados de la cianobacteria <i>Arthrospira platensis</i> a diferentes fuentes de nitrógeno.....	55
19. Análisis de rango múltiple (Scheffe $\alpha=0,05$) de los ácidos grasos monoinsaturados de la cianobacteria <i>Arthrospira platensis</i> a diferentes salinidades.....	55
20. Análisis de varianza de los ácidos grasos poliinsaturados de la cianobacteria <i>Arthrospira platensis</i> a diferentes salinidades y fuentes de nitrógeno.....	56
21. Análisis de rango múltiple (Scheffe $\alpha=0,05$) de los ácidos grasos poliinsaturados de la cianobacteria <i>Arthrospira platensis</i> a diferentes fuentes de nitrógeno.....	56
22. Análisis de rango múltiple (Scheffe $\alpha=0,05$) de los ácidos grasos poliinsaturados de la cianobacteria <i>Arthrospira platensis</i> a diferentes salinidades.....	56
23. Análisis de varianza de la clorofila <i>a</i> (mg/ml) de la cianobacteria <i>Arthrospira platensis</i> a diferentes salinidades y fuentes de nitrógeno.....	57
24. Análisis de rango múltiple (Scheffe $\alpha=0,05$) de la clorofila <i>a</i> (mg/ml) de la cianobacteria <i>Arthrospira platensis</i> a diferentes fuentes de nitrógeno.....	57
25. Análisis de rango múltiple (Scheffe $\alpha=0,05$) de la clorofila <i>a</i> (mg/ml) de la cianobacteria <i>Arthrospira platensis</i> a diferentes salinidades.....	57
26. Análisis de varianza de los carotenoides totales (mg/ml) de la cianobacteria <i>Arthrospira platensis</i> a diferentes salinidades y fuentes de nitrógeno.....	58
27. Análisis de rango múltiple (Scheffe $\alpha=0,05$) de los carotenoides totales (mg/ml) de la cianobacteria <i>Arthrospira platensis</i> a diferentes fuentes de nitrógeno.....	58
28. Análisis de rango múltiple (Scheffe $\alpha=0,05$) de los carotenoides totales (mg/ml) de la cianobacteria <i>Arthrospira platensis</i> a diferentes salinidades....	58
29. Análisis de Varianza de ficocianina (mg/ml) de la cianobacteria <i>Arthrospira platensis</i>	59

30. Análisis de rango múltiple (Scheffe $\alpha=0,05$) de ficocianina (mg/ml) de la cianobacteria <i>Arthrospira platensis</i> a diferentes fuentes de nitrógeno.....	59
31. Análisis de rango múltiple (Scheffe $\alpha=0,05$) de ficocianina de la cianobacteria <i>Arthrospira platensis</i> a diferentes salinidades.....	59
32. Análisis de varianza del contenido de exopolisacarido de la cianobacteria <i>Arthrospira platensis</i> a diferentes salinidades y fuentes de nitrógeno.....	60
33. Análisis de rango múltiple (Scheffe $\alpha=0,05$) del contenido de exopolisacarido de la cianobacteria <i>Arthrospira platensis</i> a diferentes fuentes de nitrógeno.....	60
34. Análisis de rango múltiple (Scheffe $\alpha=0,05$) del contenido de exopolisacarido de la cianobacteria <i>Arthrospira platensis</i> a diferentes salinidades.....	60

RESUMEN

En la presente investigación se evaluó el efecto de la salinidad y la fuente de nitrógeno sobre el crecimiento y composición bioquímica de la cianobacteria *Arthrospira platensis*. Cultivos discontinuos de dicha cianobacteria se realizaron en 3l de medio Zarrouk, ensayándose dos salinidades (0 y 15 UPS) y dos fuentes de nitrógeno (nitrato de sodio y urea). Los cultivos se mantuvieron a 25°C con una intensidad luminosa de 390 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, fotoperiodo 12: 12 y aireación continua (200 ml/min) durante 20 días. El crecimiento, medido como biomasa seca, fue evaluado cada 48 horas y la composición bioquímica fue analizada al final del ensayo, determinándose para este último parámetro el contenido de pigmentos, proteínas, carbohidratos y lípidos totales, mediante técnicas espectrofotométricas. El perfil de ácidos grasos se determinó a través de cromatografía de gases-espectrometría de masas y el contenido de exopolisacáridos mediante gravimetría. Los resultados obtenidos evidenciaron que la salinidad y la fuente de nitrógeno influyeron sobre el crecimiento y la composición bioquímica de *A. platensis*, observándose que el incremento de la salinidad produjo una disminución significativa en el crecimiento de esta microalga, siendo la biomasa mayor a 0 UPS y en nitrato de sodio ($3,5 \pm 0,17$ mg/ml). Los mayores contenidos de proteínas, carbohidratos, lípidos y pigmentos se obtuvieron en los cultivos suplementados con nitrato de sodio como fuente de nitrógeno, pero en cuanto a la salinidad, se observó que las proteínas, clorofila *a*, carotenoides y ficocianina mostraron sus mayores contenidos a 0 UPS, con valores de $57,5 \pm 4,41$ %; $43,04 \pm 0,34$ $\mu\text{g}/\text{ml}$; $15,1 \pm 0,76$ $\mu\text{g}/\text{ml}$ y $153 \pm 3,8$ $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectivamente. Por el contrario, los carbohidratos y lípidos alcanzaron sus mayores valores ($20,9 \pm 1,35\%$ y $9,5 \pm 0,50$ %, respectivamente) a 15 UPS. Los ácidos grasos mostraron un patrón no definido, debido a que los cultivos realizados a 15 UPS y suplementados con urea produjeron mayores concentraciones de ácidos grasos saturados ($50,04 \pm 2,32\%$) y monoinsaturados ($22,46 \pm 1,82\%$), mientras que los poliinsaturados alcanzaron también sus máximas concentraciones en urea pero a 0 UPS ($44,11 \pm 3,32\%$). El ácido palmítico (16:0) fue el que se acumuló en mayor cantidad, con contenidos que variaron entre 35,38 y 42%, observándose concentraciones equivalentes (42%) en NaNO_3 a 0 y 15 UPS y en urea a 15 UPS. Entre los monoinsaturados, el ácido oleico (18:1n9) presentó la mayor concentración ($13,21 \pm 0,71$ %), lo cual ocurrió en los cultivos tratados con urea a 15 UPS. Con relación a los ácidos grasos poliinsaturados, el ácido gamma linolénico (18:3 n-6) fue el que más se acumuló en *A. platensis*, alcanzando concentraciones equivalentes (22%) en NaNO_3 a 0 y 15 UPS y en urea a 0 UPS. Los exopolisacáridos en esta cianobacteria mostraron diferencias no significativas en cuanto a las fuentes de nitrógeno y salinidades expuestas, llegando a producir contenidos de $21,12 \pm 1,413$ mg/ml. Finalmente, los resultados obtenidos evidenciaron que *A. platensis* muestra variadas respuestas fisiológicas ante los cambios de salinidad y fuentes de nitrógeno, lo cual pudiera ser utilizado como una estrategia para modificar la composición bioquímica de este microorganismo, a fin de obtener productos de importancia biotecnológica y acuícola.

INTRODUCCIÓN

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos oxigénicos con variadas formas y tamaños, capaces de sobrevivir en diferentes hábitas (Rodríguez & Guerrero, 1992) y están presentes en el medio acuático con una gran diversidad de especies, constituyendo el principal alimento primario de la cadena trófica. Son organismos productores que sintetizan nueva materia orgánica a partir de sustratos inorgánicos, lo cual les permite obtener altos rendimientos de biomasa con elevado valor nutritivo (Margaleff, 1977); estas características llevan a considerarlas como fuente excepcional para la alimentación de moluscos, copépodos, peces fitófagos y otros animales acuáticos (Fábregas & Herrero, 1986; Patil *et al.*, 2007).

Una amplia variedad de especies de microalgas se han estudiado con el fin de cultivarlas masivamente para obtener cantidades elevadas de biomasa y productos de interés industrial como carotenoides, ficocianina, ficoeritrina y exopolisacáridos (Rodríguez & Guerrero, 1992; Del Campo *et al.*, 2007). Dentro de las microalgas más estudiadas en biotecnología se encuentran las cianobacterias; microorganismos procariotas con características fisiológicas y morfológicas específicas que les permiten adaptarse a cambios ambientales extremos (Liotenberg *et al.*, 1996; Helbling *et al.*, 2006); en este sentido, el potencial biotecnológico que ofrecen se incrementa en cepas que pueden tolerar condiciones extremas de salinidad y pH, debido a que los cultivos tienden a ser monoalgales por la poca competencia con otros microorganismos (Ben-Amotz & Avron, 1983; Vonshak & Tomaselli, 2002).

El crecimiento de cianobacterias en ambientes acuáticos está controlado por una variedad de factores ambientales y para su cultivo, son necesarias las condiciones adecuadas de nutrientes, temperatura, pH e iluminación (Couteau, 1996). El conocimiento de sus características fisiológicas y bioquímicas en cultivos, en un amplio rango de parámetros, puede ayudar no sólo a determinar su potencial biotecnológico, sino también a determinar e interpretar de manera más eficiente los resultados adquiridos del crecimiento en su ambiente natural. En vista de ello, es importante evaluar el perfil bioquímico y crecimiento de cianobacterias en relación a factores claves como la irradiancia, salinidad y nutrientes, dada las condiciones de algunos casos extremos de estos factores en ambientes tropicales. Así por ejemplo, los organismos

halotolerantes podrían ser utilizados para su cultivo en masas en medios marinos y/o áridos, con gran radiación solar (Ben-Amotz & Avron, 1983; Ben-Amotz, 2004).

El efecto de factores ambientales (temperatura, salinidad, irradiancia y concentración de nitrógeno, entre otros) sobre el crecimiento y composición bioquímica de las microalgas se ha reportado en numerosas investigaciones. Entre éstas cabe destacar Romo (1994), quien logró incrementar la producción de biomasa de *Pseudanabaena galeata* al utilizar bajas intensidades luminosas y optimizó la síntesis de ficocianina y proteínas en una cepa de *Synechococcus* aislada de agua dulce y adaptada posteriormente a salinidades hasta de 23 UPS; Micekiewicz *et al.* (2000) encontraron que la temperatura y la irradiancia influyen en el contenido de ácidos grasos insaturados de *Plectonema boryanun*; Mora *et al.* (2004) publicó que la producción de biomasa de la microalga *Chlorella* sp. es estimulada con agua potable no destilada, a una temperatura entre 25-30°C, intensidad luminosa de 58 $\mu\text{mol quanta/m}^2$ y a pH entre 8,0-9,0. Sin embargo, su crecimiento fue inhibido con la salinidad y es capaz de crecer favorablemente en medios no tamponados.

Loreto *et al.* (2004) reportó el efecto de la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo sobre *Anabaena* sp., observando que en esta especie se estimula el crecimiento y la producción de ficocianina, clorofila *a*, carotenoides y proteínas al incrementar la disponibilidad de este nutriente.

Celekli & Gonul (2007) demostraron en una cepa de *Dunaliella* sp. aislada del lago Tuz (Turquía) que el incremento del pH, intensidad luminosa y salinidad, conjuntamente con la disminución de la concentración de nitrato provocan un aumento del contenido celular de β -caroteno, obteniendo un máximo valor de 0,248 $\mu\text{g/cel}$.

Con relación a la cianobacteria *Arthrospira* (llamada anteriormente *Spirulina*) y objeto de este estudio, cabe mencionar que este microorganismo presenta forma helicoidal, con un tamaño entre 200 y 250 μm y ha sido ampliamente utilizado como alimento en humanos, debido principalmente a su alto grado de digestibilidad (88 - 92%), atribuible a la presencia de mucopolisacáridos en la pared celular (Ramírez & Olvera, 2006).

Las dos especies más estudiadas son *Arthrospira maxima* y *Arthrospira platensis* (Fox, 1999), las cuales se clasifican de la siguiente forma:

Reino	Monera
División	Cyanophyta
Clase	Cyanophyceae
Orden	Oscillatoriales
Familia	Oscillatoriaceae
Género	<i>Arthrospira</i>
Especie	<i>Arthrospira platensis</i> <i>Arthrospira maxima</i>

El uso de *Arthrospira* como alimento de humanos data desde los tiempos precolombinos, donde los aztecas la utilizaron como alimento y actualmente es consumida en forma de pastas y sopas por tribus africanas (Kanembu). Su composición química incluye proteínas (55- 70%), azúcares (15 - 25%), ácidos grasos esenciales (18%), vitaminas, minerales y pigmentos como carotenos, clorofila *a* y ficocianina; este último utilizado en industrias de alimentos y cosméticos. Se le considera un excelente alimento, exento de toxicidad y poseedor de propiedades correctoras de ataques virales, anemia, crecimiento tumoral y malnutrición (Ayala & Bravo 1982; Ramírez & Olvera, 2006).

El crecimiento de *Arthrospira* ocurre entre 25 – 40 °C, siendo el rango de mayor producción a elevadas temperaturas entre 35 – 40 °C y grado de alcalino (pH entre 10 y 11); iluminación de 30 – 50 klux, salinidades de 18–22 UPS y abundante agitación (Zarrouk, 1966; Pedraza, 1989).

Dentro de los trabajos más importantes que se han hecho con esta cianobacteria, pueden mencionarse los relacionados con su utilización como suplemento alimenticio en dietas para humanos y animales (Jeraci & Vansoest, 1986; Belay, 1997; Eliach *et al.*, 2004), adelgazante y reductor del apetito natural (Robert, 1994), acuicultura (Iwata, 1990), biorremediación (Cañizares, 2002), y como indicadoras y/o depuradoras de aguas contaminadas (Laliberté *et al.*, 1996).

Tomando en consideración el alto valor nutricional de *Arthrospira* sp., el cual radica precisamente en la gran variedad de nutrientes y compuestos de gran utilidad que contiene, algunos de los cuales no pueden ser sintetizados por el organismo humano, confiriéndole una gran utilidad relativa a sus propiedades nutricionales, preventivas y curativas, se estimó pertinente investigar sobre la influencia de 2 factores importantes en el desarrollo de la microalgas y de fácil manipulación: la salinidad y la fuente de nitrógeno, los cuales podrían condicionar la composición bioquímica del alga, en virtud de establecer estrategias de cultivo masivo para la obtención de componentes bioquímicos específicos de gran utilidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Organismos y condiciones de cultivo

En esta investigación se utilizó una cepa de *Arthrospira platensis* LEFEVRE 1963/M-132-1 donada por el Instituto de Botánica de la Academia de Ciencias de la República Checa en Trebon, y mantenida en el cepario del Laboratorio de Acuicultura, Extensión Plancton, del Departamento de Biología Pesquera, Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente.

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

Determinación de los parámetros de crecimiento

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

Crecimiento poblacional:

El crecimiento poblacional de *A. platensis* se analizó a través de la determinación de la biomasa seca, para lo cual se tomaron 5 ml de cada uno de los cultivos, se filtraron con filtros GFC (1,2 μm) previamente lavados con agua destilada, secados en la estufa a 100°C por 24 h y pesados en una balanza analítica (Denver TR-204). El proceso de filtración se llevó a cabo, con ayuda de un equipo Millipore. Luego de filtradas, las muestras se lavaron con formiato de amonio 0,9 % para eliminar restos de sal y se colocaron en una estufa (Memmert) a 60°C, hasta obtener pesos constantes. La masa seca se determinó por medio de la siguiente relación:

$$MST = \frac{(f + m) - (psf)}{Vc}$$

Donde:

MST = masa seca total (mg/ ml)

f + m = masa del filtro + microalga (mg)

psf = masa del filtro (mg)

Vc = volumen de cultivo (5 ml)

Evaluación de la Composición Bioquímica

Al final del ensayo se tomaron muestras, por triplicado, de cada uno de los cultivos para la determinación de la masa seca y composición bioquímica de acuerdo a las siguientes metodologías:

Proteínas totales

Se tomaron 5 ml, por triplicado, de cada cultivo y se centrifugaron durante 15 min a 5000 rpm en una centrífuga (DINAC). La determinación se realizó según el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) modificado por Herbert *et al.* (1971). Para estos análisis, el “pellet” de microalgas se hidrolizó con 2 ml de NaOH 1mol/l durante 60 min a una temperatura de 95 a 100°C. Posteriormente, las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente y se clarificaron por centrifugación a 3000 rpm durante 15 min. De acuerdo al método antes mencionado, se transfirió, por triplicado, un volumen de 0,2 ml del sobrenadante a un tubo de ensayo, al cual se le adicionó 0,3 ml de agua destilada. Tanto para la curva patrón de seroalbúmina bovina (BSA) como para el blanco y las muestras de la microalga hidrolizadas se les añadieron 0,4 ml de NaOH 1 mol/l y 2 ml de NaCO₃ al 5% m/v, al cual se le adicionaron previamente una solución de CuSO₄.5H₂O al 0,5% m/v en tartrato de potasio al 1% m/v, en una relación 50:2 v/v. Todas las muestras se dejaron durante 10 min en reposo a temperatura ambiente y luego se les agregaron 0,4 ml de una mezcla 50:50 v/v de reactivo de Fenol Folin Ciocalteau (Sigma) con agua destilada.

Después de agregarle todos los reactivos, las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente durante 30 min, y por último se realizaron las lecturas de las absorbancias en un espectrofotómetro (Spectronic Shimadzu UV-120-01) a una

longitud de onda de 750 nm, utilizando cubetas de 3 ml de capacidad (Standard Ltd.) contra el blanco. Para la cuantificación de las proteínas, se utilizaron como estándar una solución de seroalbúmina bovina (BSA) de 1 mg/ml, a partir del cual se obtuvo la curva patrón. Los valores de absorbancia de BSA fueron utilizados para la elaboración de la curva patrón mediante un ajuste lineal por mínimos cuadrados, y los valores de proteínas en las muestras problemas fueron calculados por interpolación utilizando dicha curva. El contenido de proteínas totales se expresó en porcentaje, con relación a la masa seca y correspondió al promedio de todas las réplicas.

Carbohidratos totales

Se tomaron 5 ml, por triplicado, de cada cultivo y se centrifugó durante 15 min a 5000 rpm en una centrífuga (Dinac). La determinación se realizó según el método fenol sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956). El “pellet” de microalgas, previamente conservado, se resuspendió en 4 ml de NaOH 1mol/l; de esta solución se tomó 1 ml por triplicado, y se colocaron en tubos de ensayo. Paralelamente, se preparó el blanco con 1 ml de NaOH 1mol/l y se distribuyó en tubos 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 y 1 ml de una solución de glucosa anhidra de 1 mg/ml en NaOH 1Equiv/l, para luego enrasar los tubos hasta un volumen de 1 ml con NaOH 1mol/l.

A todos los tubos (muestras y curva patrón) se les añadió 1 ml de fenol al 80% y una vez mezclados se les agregó inmediatamente 5 ml de H₂SO₄ puro, agitándose inmediatamente de nuevo, y se dejó enfriar, para poder realizar las lecturas de absorbancia a 485 nm, en un tiempo no mayor de una hora.

Los valores de absorbancia de la glucosa estándar se utilizaron para la elaboración de la curva patrón mediante un ajuste lineal por mínimos cuadrados, y los valores de carbohidratos en las muestras problemas fueron calculados por interpolación utilizando dicha curva. El contenido de carbohidratos totales se expresó en porcentaje, con relación a la masa seca y correspondió al promedio de todas las réplicas.

Lípidos totales

Se tomaron 5 ml, por triplicado, de cada cultivo y se centrifugó durante 15 min a 5000 rpm en una centrífuga (Dinac). La determinación se realizó según el método basado en la carbonización (Marsh & Weinstein, 1966), mientras que, la extracción se llevó a cabo a través la metodología descrita por Bligh & Dyer (1959), para lo cual se

resuspendió el “pellet” de microalgas en 7,5 ml de $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (1:2 v/v). Seguidamente, se les añadió 1,5 ml de CHCl_3 y 1,5 ml de agua destilada para separar la fase polar de la apolar. Los tubos se agitaron y dejaron en reposo durante 24 h a 4°C . Posteriormente, fueron centrifugados por 10 min a 3000 rpm para facilitar la separación de las fases antes mencionadas. La fase polar se descartó y apolar se colocó en un tubo limpio y se le adicionó 0,5 ml de acetona de alta pureza. El extracto lipídico, de cada tubo, se sometió a desecación mediante la evaporación del CHCl_3 en una estufa a 37°C y luego se resuspendió nuevamente en 1 ml de CHCl_3 , el cual fue repartido por triplicado, en alícuotas de 200 μl de cada uno de estos extractos en tubos con tapa de rosca. Paralelamente, se preparó una solución de tripalmitina en CHCl_3 (0,03–0,27 mg/ml) que fue utilizada como patrón. Las muestras de las microalgas, curva patrón y blanco (CHCl_3) se evaporaron a 37°C , después de ocurrido este proceso, todos los tubos se dejaron enfriar para añadirles seguidamente 2 ml de H_2SO_4 concentrado en cada tubo. Luego, los tubos fueron colocados dentro de la estufa a 200°C durante 15 min, para la carbonización del extracto lipídico. A continuación, los tubos se dejaron a temperatura ambiente durante unos 20 s e inmediatamente se colocaron a 4°C durante 5 min. Seguidamente, se les añadió 3 ml de agua destilada a cada tubo, mezclándose bien para colocarlos nuevamente a 4°C . Una vez fríos, se colocaron a temperatura ambiente durante unos 10 min, hasta que desaparecieron todas las burbujas para leer la absorbancia de las muestras a 375 nm en un espectrofotómetro (Spectronic Shimadzu UV-120-01).

Los valores de absorbancia de tripalmitina sirvieron para la elaboración de la curva patrón mediante un ajuste lineal por mínimos cuadrados, y los valores de lípidos en las muestras problemas fueron calculados por interpolación utilizando dicha curva. El contenido de lípidos totales, se expresó en porcentaje, con relación a la masa seca y correspondió al promedio de todas las réplicas.

Ácidos grasos

Los lípidos obtenidos según metodología de Bligh & Dyer (1959), previamente descrita, se utilizó para la esterificación de los ácidos grasos, siguiendo las recomendaciones dadas en Sato & Murata (1988), para lo cual, los tubos con las muestras se sometieron a metanólisis durante 2 horas y media a 85°C , mediante la adición de 2,5 ml de ácido clorhídrico (5%) en metanol. Los metil-ésteres de ácidos

grasos obtenidos se separaron de la fase polar mediante una doble extracción con hexano grado HPLC (0,75 ml). El volumen final del hexano fue reducido a 100 μ l mediante la evaporación con nitrógeno. El volumen obtenido de cada una de las muestras se analizó en un cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas (GC-MS) Hewlett Packard Series G1800B, adicionado con una columna Omegawax TM 250 de sílica fundida (Supelco) de 30 m x 0,25 mm de diámetro externo x 0,25 de diámetro interno. Los ácidos grasos presentes en las muestras se identificaron mediante la comparación de los espectros de masas con los espectros contenidos en la biblioteca de espectros de masas NIST98, NBS75K y una biblioteca creada con 28 estándares de ácidos grasos metil esterificados (Sigma Chemical Company). Adicionalmente, se confirmó la identificación de los ácidos grasos mediante la comparación de los tiempos de retención de las muestras con los registrados para un patrón comercial de metil-ésteres de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA-3, Sigma).

Pigmentos

Clorofila *a* y carotenoides totales

Muestras (5 ml) de cada uno de los cultivos, por triplicado, se filtró a través de filtros Whatman GFC (0,45 μ m) de 47 mm de diámetro, utilizando un equipo filtración Millipore. Los filtros, con las muestras de microalgas retenidas, se colocaron en tubos de ensayo y se les adicionó 5 ml de acetona 90% en agua destilada; posteriormente, fueron colocados en la oscuridad a 4°C durante 24 h para garantizar una extracción completa de los pigmentos. A continuación se centrifugó a 3500 rpm durante 5 min y se leyó la absorbancia de los extractos a 453, 644, 663 y 750 nm en un espectrofotómetro marca Shimadzu modelo UV-120-01. Las absorbancias obtenidas fueron utilizadas para la cuantificación del contenido de clorofila *a* y carotenoides totales, de acuerdo a la metodología de Wegmann & Metzner (1971) utilizando las siguientes ecuaciones:

$$\text{Clorofila } a \text{ } (\mu\text{g/ml}) = 10,3 E_{663} - 0,918 E_{644}$$

$$\text{Carotenoides totales } (\mu\text{g/ml}) = 4,20 E_{453} - 0,0264 C_{\text{clor } a}$$

Ficocianina

La extracción de la ficocianina se realizó con regulador de fosfatos, al cual se le añadió previamente EDTA y lisozima (Boussiba & Richmond, 1979). Muestras (20 ml) de cada uno de los cultivos, por triplicado, se centrifugó a 4000 rpm durante 15 min. Al centrifugado resultante se le adicionó 20 ml del regulador de fosfato; posteriormente, se incubó a 30°C en baño de María durante 24 h con agitación constante. A continuación, se centrifugó a 4000 rpm durante 40 min para eliminar los restos celulares y recuperar el sobrenadante, al cual se le determinó la absorbancia a 620 y 650 nm en un espectrofotómetro marca Shimadzu modelo UV-120-01, utilizando regulador de fosfatos como blanco. Finalmente, el contenido de ficocianina se cuantificó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Ficocianina (FC, } \mu\text{g/ ml)} = A_{620\text{nm}} - 0,7 A_{650\text{nm}} / 7,38$$

Exopolisacáridos

El contenido de exopolisacáridos se determinó según el método de precipitación en acetona (Vicente *et al.*, 2004). Este método consistió en centrifugar 20 ml de los cultivos a 3500 rpm durante 40 min; posteriormente, el precipitado se descartó y al sobrenadante se le adicionó 40 ml de acetona. La mezcla se dejó reposar durante 48 h a 4°C y a continuación se centrifugó nuevamente para obtener el “pellet” de exopolisacáridos, el cual se colocó en una estufa a 60°C hasta obtener una masa constante. El contenido de exopolisacáridos se expresó en mg/ml y correspondió al promedio de todas las réplicas.

Análisis de los resultados

Los resultados del crecimiento y composición bioquímica de la biomasa de *Arthrospira platensis* obtenidos a diferentes salinidades y fuentes de nitrógeno, previo cumplimiento de los supuestos de homogeneidad de varianzas, se analizaron a través de Análisis de variancia de dos factores. La existencia de diferencias significativas se contrastó mediante el método de comparaciones múltiples de Scheffé (Sokal & Rohlf, 1979), empleándose en ambos análisis el paquete estadístico Statgraphics plus 4,1.

RESULTADOS

Crecimiento Poblacional

En la Figura 1 se muestra el crecimiento poblacional, medido como masa seca (mg/ml), de *Arthrospira platensis* cultivada a diferentes salinidades y fuentes de nitrógeno. Se aprecia, que después de la siembra, el crecimiento de esta cianobacteria en todos los tratamientos ensayados se mantuvo sin cambios significativos durante los cuatro primeros días, lo cual es indicativo de una fase de adaptación. A partir de allí, se observó un aumento del crecimiento poblacional, el cual se fue incrementando hasta los días 14 -16, para luego entrar en una fase estacionaria hasta el final del ensayo.

El crecimiento de *Arthrospira platensis* en las diferentes salinidades y fuentes de nitrógeno durante los días de cultivo, mostró diferencias significativas ($P < 0,05$, anexo 1-4) en ambos parámetros, observándose que el nitrato de sodio y la menor salinidad ensayada (0 UPS) fueron los que ocasionaron un mayor crecimiento poblacional, con un valor máximo de $3,5 \pm 0,17$ mg/ml.

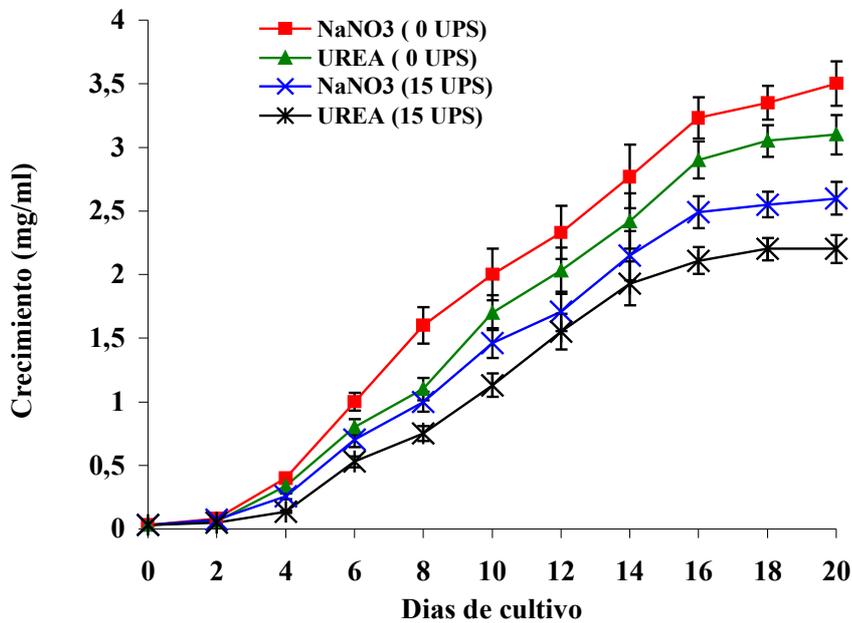


Figura 1.-Crecimiento de *Arthrospira platensis* cultivada a diferentes salinidades y fuentes de nitrógeno.

Composición Bioquímica

Proteínas, lípidos y carbohidratos totales

El suministro de nitrato de sodio como fuente de nitrógeno produjo en *A. platensis* una mayor acumulación de proteínas, carbohidratos y lípidos totales, mientras que la salinidad ocasionó diferentes respuestas en la síntesis de estas macromoléculas, ya que las proteínas alcanzaron sus mayores concentraciones a 0 UPS mientras que los carbohidratos y lípidos se acumularon en mayor cantidad en los cultivos sometidos a 15 UPS (figuras 2, 3 y 4).

En la figura 2 se presenta el contenido de proteínas totales obtenido en *A. platensis*. Esta macromolécula mostró diferencias significativas en las diferentes salinidades y fuentes de nitrógeno ($P < 0,05$, anexos 5-7), alcanzando su máxima concentración ($57,5 \pm 4,41$ %) en NaNO_3 a 0 UPS.

Los contenidos de carbohidratos y lípidos totales se muestran en las figuras 3 y 4, respectivamente. Estas macromoléculas mostraron diferencias significativas en las diferentes salinidades y fuentes de nitrógeno ($P < 0,05$, anexos 8 y 13), alcanzando sus máximas concentraciones (carbohidratos: $20,9 \pm 1,35\%$; lípidos: $9,5 \pm 0,50$ %) en NaNO_3 a 15 UPS.

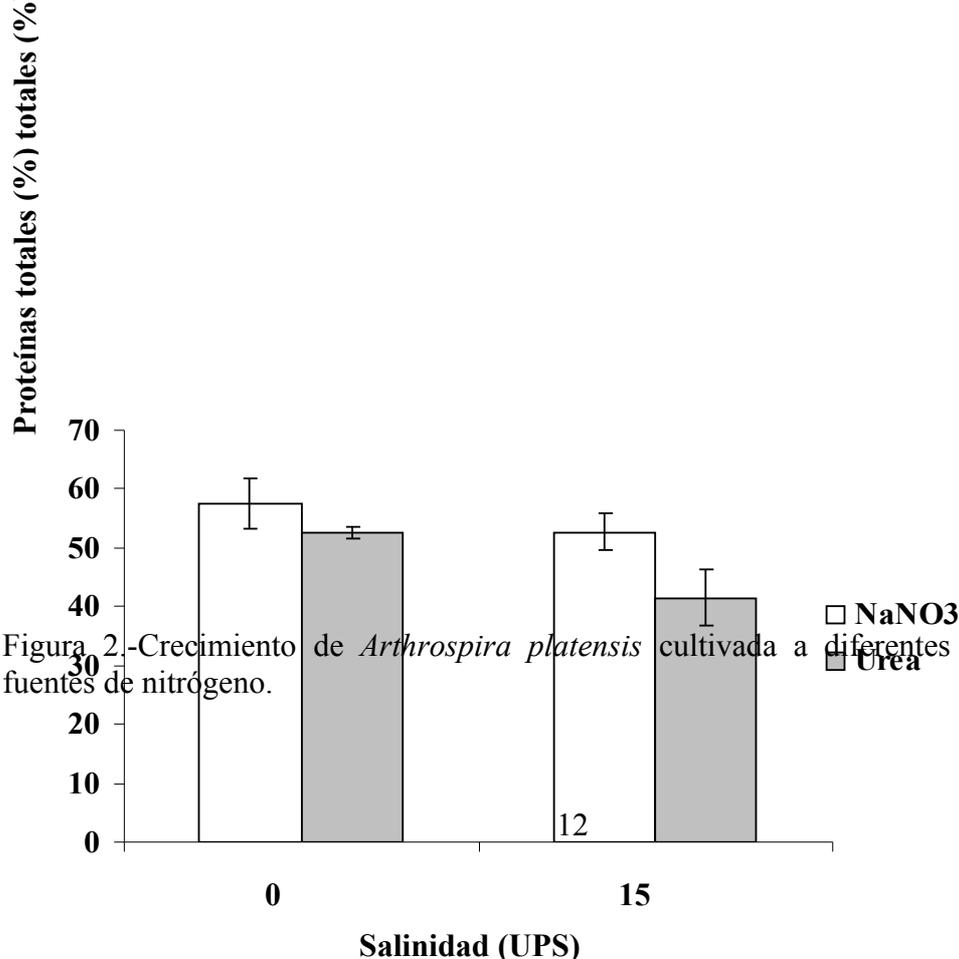


Figura 2.-Crecimiento de *Arthrospira platensis* cultivada a diferentes salinidades y fuentes de nitrógeno.

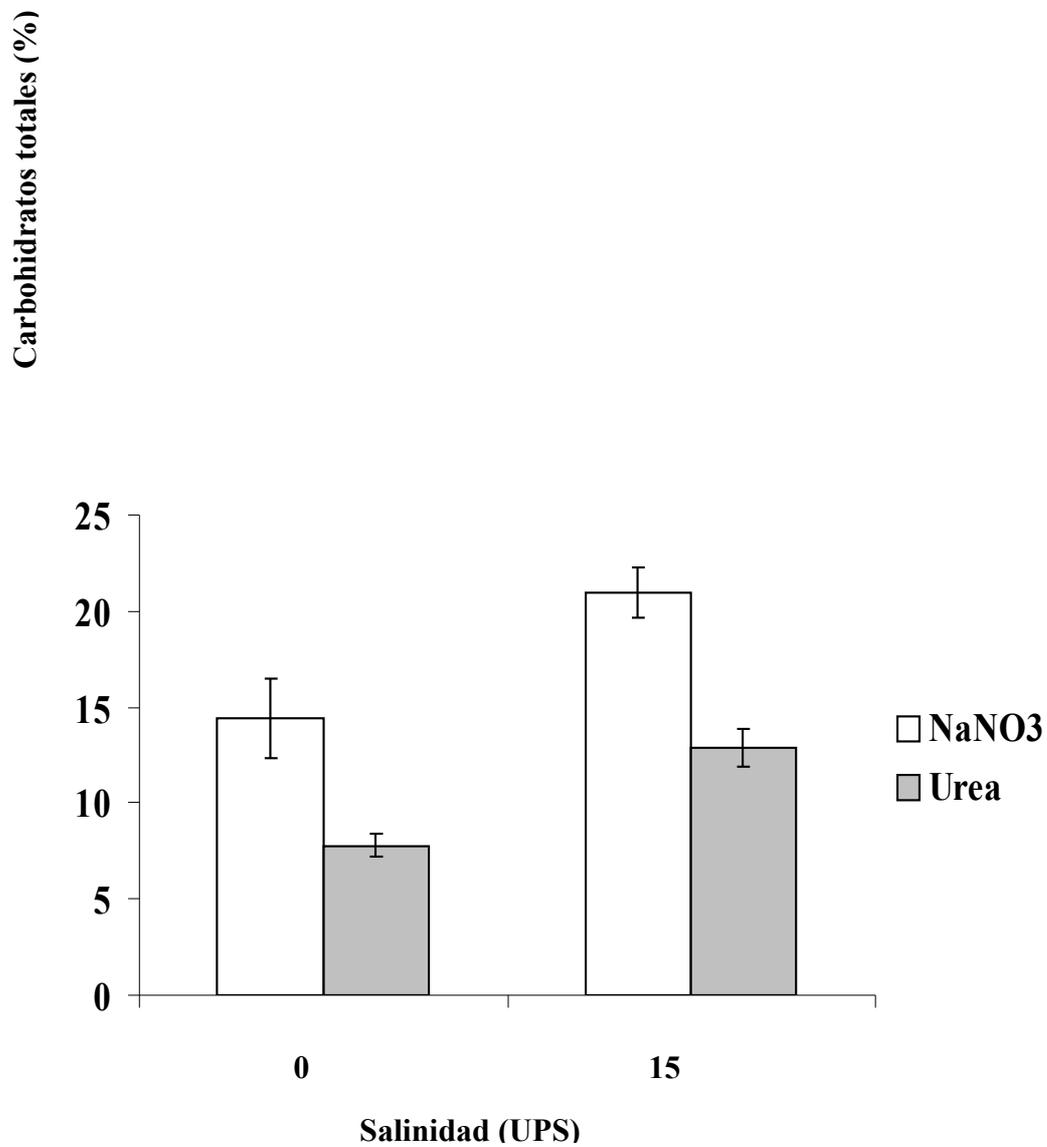


Figura 3. Contenido de carbohidratos totales (%) de *Arthrospira platensis* cultivada a diferentes salinidades y fuentes de nitrógeno.

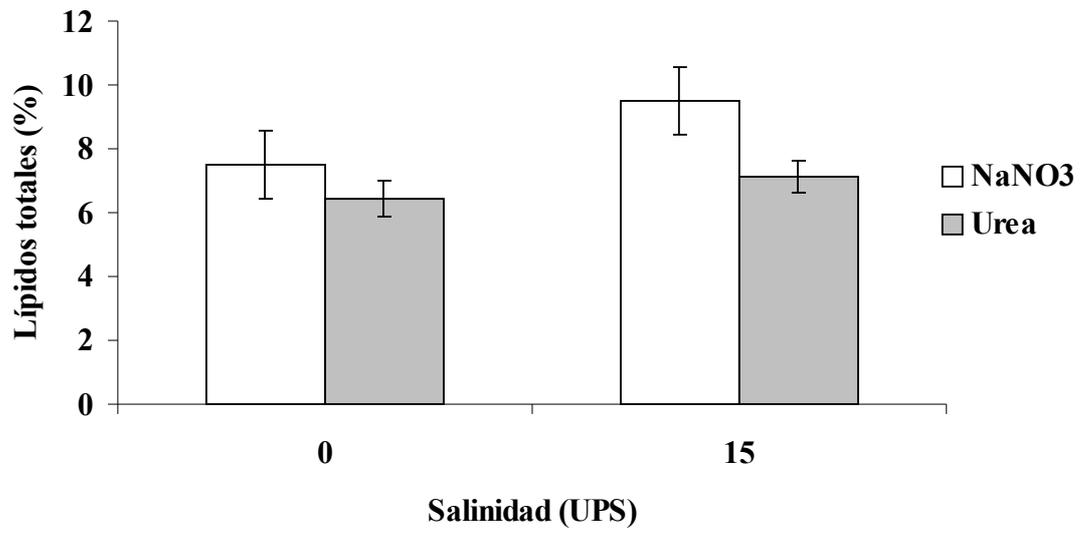


Figura 4. Contenido de lípidos totales (%) de *Arthrospira platensis* cultivada a diferentes salinidades y fuentes de nitrógeno.

Ácidos grasos

Los ácidos grasos determinados en *Arthrospira platensis* en las diferentes salinidades y fuentes de nitrógeno se presentan en la tabla I. Se observa claramente la influencia de la salinidad y de la fuente de nitrógeno sobre la síntesis de estos compuestos (Anexo 14-22), ya que los cultivos realizados a 15 UPS y suplementados con urea produjeron mayores concentraciones de ácidos grasos saturados ($50,04 \pm 2,32$) y monoinsaturados ($22,46 \pm 1,82$). Por su parte, los ácidos grasos poliinsaturados alcanzaron también sus máximas concentraciones en urea pero a 0 UPS ($44,11 \pm 3,32$).

Entre los ácidos grasos saturados, el que mostró mayor concentración fue el ácido palmitito (16:0), con contenidos porcentuales que variaron entre 35,38 y 42,80 %, obteniéndose la mayor concentración en nitrato de sodio a 0 UPS (tabla I). El ácido oleico (18:1n-9) fue el ácido graso monoinsaturado que se acumuló en mayor concentración ($10,20 \pm 0,71$ %), lo cual ocurrió en los cultivos tratados con urea a 15 UPS.

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

Tabla 1. Perfil de los ácidos grasos de la microalga *Arthrospira. platensis* cultivada a diferentes salinidades y fuentes de nitrógeno.

Ácidos grasos	NaNO₃ 0 UPS	NaNO₃ 15 UPS	Urea 0 UPS	Urea 15 UPS
14:0	0,55 ±0,05	0,45±0,04	0,32±0,03	0,73±0,07
15:0	0,12±0,01	0,02±0,00	0,10±0,00	0,32±0,02
16:0	42,80±1,71	40,79±1,63	35,38±1,42	41,81±1,67
17:0	0,17±0,01	0,19±0,01	0,15±0,01	0,58±0,03
18:0	2,43±0,19	3,51±0,28	2,87±0,23	6,61±0,53
Σ Saturados	46,07±1,98	44,96±1,97	38,81±1,69	50,04±2,32
16:1n-9	2,93±0,29	2,96±0,30	3,64±0,36	3,18±0,32
16:1n-7	5,66±0,45	6,82±0,55	8,32±0,67	6,06±0,48
18:1n-9	4,73±0,29	3,84±0,25	5,12±0,30	13,21±0,71
Σ Monoinsaturados	13,32±1,10	13,62±1,12	17,08±1,98	22,46±1,82
18:2n-6	18,41±1,66	19,29±1,74	21,59±1,94	16,97±1,53
18:3n-6	21,23±1,27	22,13±1,99	21,90±1,31	10,32±0,93
20:3n-6	0,64±0,06	0,00±0,00	0,63±0,06	0,00±0,00
Σ Poliinsaturados	40,27±2,99	41,42±3,73	44,11±3,32	27,30±2,46
Σ Totales	100	100	100	100

Pigmentos

Clorofila *a* y Carotenoides totales

El contenido de clorofila *a* por volumen de cultivo se presenta en la figura 5. Este pigmento mostró diferencias significativas ($P < 0,05$) entre las salinidades y las fuentes de nitrógeno estudiadas (Anexos 23-25), observándose que el incremento de la salinidad provocó un descenso de su acumulación. La mayor concentración de clorofila *a* se obtuvo en NaNO₃ a 0 UPS ($43,04 \pm 0,34$ ug/ml), mientras que los menores contenidos se registraron en urea a 15 UPS ($23,3 \pm 1,00$ ug/ml).

Los carotenoides totales por volumen de cultivo (figura 6) mostraron una tendencia similar a la observada en la síntesis de clorofila *a*. Estos pigmentos mostraron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre las salinidades y las fuentes de nitrógeno estudiadas (Anexo 26-28) alcanzando sus máximas concentraciones en nitrato de sodio a 0 UPS ($15,1 \pm 0,76$ ug/ml). Los menores contenidos se observaron en urea a 15 UPS ($3,6 \pm 0,66$ ug/ml).

Ficocianina

Las concentraciones del pigmento ficocianina (ug/ml) se presentan en la figura 7 mostrando diferencias significativas ($P < 0,05$) tanto en las salinidades como en las fuentes de nitrógeno (Anexo 29-31), observándose sus mayores concentraciones promedio en el nutriente NaNO_3 a 0 UPS ($153 \pm 3,8$ ug/ml) y las menores en urea a 15 UPS ($54 \pm 9,1$ ug/ml). Es evidente que este pigmento al igual que la clorofila *a* y los carotenoides totales disminuyeron sus concentraciones al aumentar la salinidad de los cultivos.

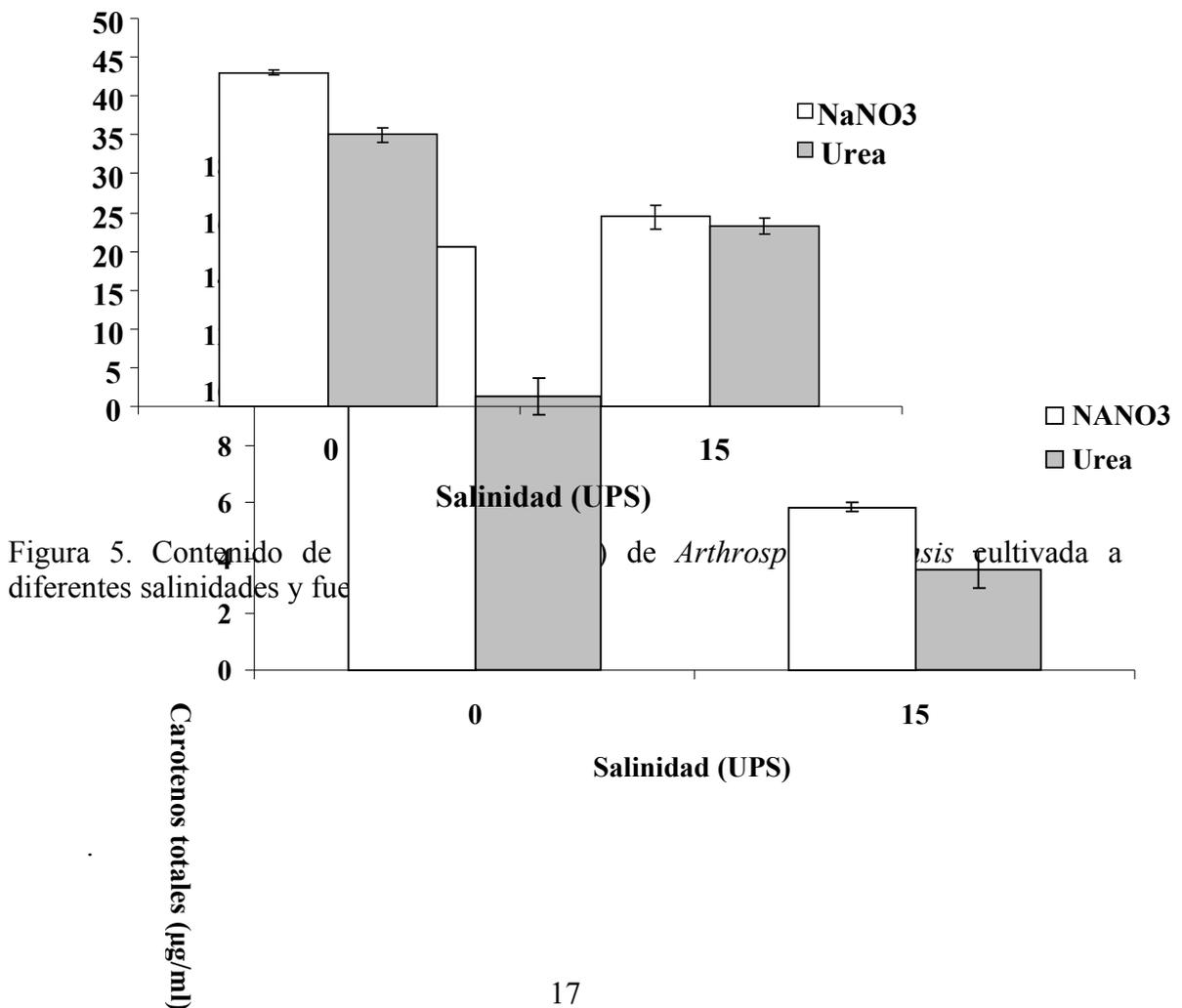


Figura 5. Contenido de carotenos totales de *Arthrospira platensis* cultivada a diferentes salinidades y fuentes de nitrógeno.

**Clor
ofila
a
($\mu\text{g}/\text{ml}$)**

Figura 6. Contenido de carotenoides totales ($\mu\text{g}/\text{ml}$) de *Arthospira platensis* cultivada a diferentes salinidades y fuentes de nitrógeno

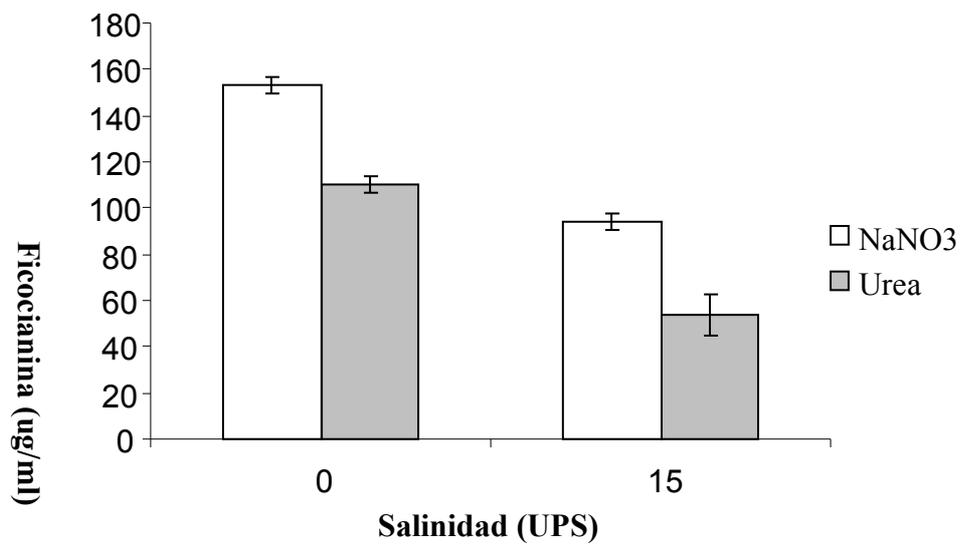


Figura 7. Contenido de ficocianina ($\mu\text{g/ml}$) de *Arthrospira platensis* cultivada a diferentes salinidades y fuentes de nitrógeno.

Exopolisacáridos

La cianobacteria *Arthrospira platensis* mostró una producción de exopolisacáridos estadísticamente igual ($P > 0,05$) cuando fue cultivada en las diferentes salinidades y fuentes de nitrógeno (Anexo 32-34) tal como se aprecia en la figura 8. Los cambios de salinidad y de las fuentes de nitrógeno en los cultivos no lograron variar la producción de estos exocompuestos, observándose un contenido promedio de $21,1 \pm 1,41 \text{ mg/ml}$

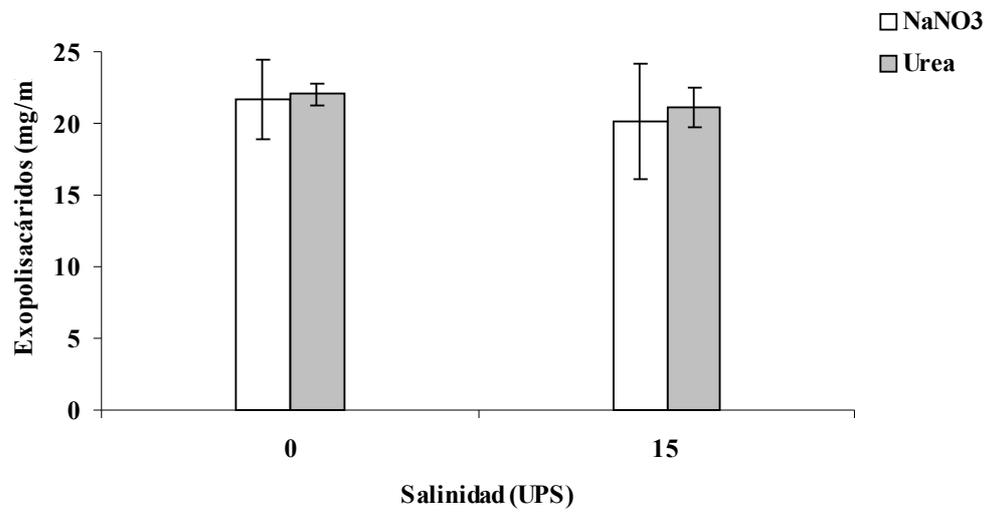


Figura 8. Contenido de Exopolisacáridos (mg/ml) de *Arthospira platensis* cultivada a diferentes salinidades y fuentes de nitrógeno.

DISCUSIÓN

En la presente investigación se demostró que la salinidad y la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo influyeron sobre el crecimiento y la composición bioquímica de la cianobacteria *Arthrospira platensis*. El mayor crecimiento de esta microalga ($3,5 \pm 0,17$ mg/ ml) se evidenció cuando los cultivos fueron sometidos a la menor salinidad (0UPS) con nitrato de sodio como fuente de nitrógeno.

El incremento de la salinidad en los cultivos de *Arthrospira platensis* no ocasionó una mayor producción de biomasa. Este comportamiento fue también evidenciado en *Arthrospira platensis* por Kebede (1997) y en *Arthrospira máxima* por Lámela & Márquez-Rocha (2000), quienes observaron que el crecimiento poblacional de estas dos microalgas disminuyó a medida que se aumentó la salinidad en los cultivos, llegando a ser mayor en los tratamientos sometidos a 0 UPS.

El mayor contenido de biomasa de *A. platensis* obtenido en esta investigación es superior a los determinados por Oliveira *et al* (1999), 2,4 mg/ml, en *Arthrospira platensis* y *A. máxima*. Esta diferencia puede estar soportada en las temperaturas y la cantidad de luz que recibieron los cultivos, debido a que los anteriores autores utilizaron 30 °C con luz continua, y en este trabajo se utilizó 25°C con fotoperiodo 12:12.

En otras investigaciones se han referido contenidos de biomasa superiores a los logrados en esta investigación. Así se tiene que Volkmann *et al.* (2008) al cultivar *A. platensis* con agua desalinizada (0UPS) obtuvieron una producción de biomasa de 4,95 mg/ml. Esta diferencia puede deberse a que los anteriores autores utilizaron diferentes condiciones de cultivo, entre éstas la irradianza ($140 \mu\text{mol/ m}^2/\text{s}$), la cual fue menor que la implementada en esta investigación ($390 \mu\text{mol/ m}^2/\text{s}$).

La disminución del crecimiento de *Arthrospira platensis* frente a estrés salino puede deberse a que la energía destinada para la división celular es desviada hacia la síntesis de solutos compatibles, que le permitan sobrevivir ante este estrés, tal como ha sido descrito por Oren (1999), quien refirió que el costo de producir solutos osmóticos orgánicos (glicerol) en organismos sometidos a condiciones salinas es enorme (aproximadamente 30 mmol de ATP por cada 0,2 gramos de biomasa seca).

Dado que la cantidad de energía necesaria para la producción de solutos osmóticos quizás exceda grandemente los requerimientos energéticos para la biosíntesis de proteínas, ácidos nucleicos, paredes celulares y otros compuestos, la energía disponible para el crecimiento se ve disminuida cuando se incrementa la salinidad del cultivo.

En microalgas eucarióticas, también se ha observado una correlación inversa entre el crecimiento y el incremento de la salinidad de los cultivos. Al respecto, Borowitzka & Borowitzka (1988); Ben-Amotz & Avron (1989); Aguilar (1995) y Guevara *et al.* (2005), observaron una disminución en las densidades celulares de *Dunaliella salina* cuando se aumenta la salinidad del medio de cultivo. Este estrés de salinidad influencia la capacidad de *D. salina* para adquirir las fuentes de carbono necesarias para su crecimiento y productividad (Serpa & Calderón, 2005).

Por otra parte, las cianobacterias responden de diferentes formas frente a cambios de salinidad; además las respuestas de estos microorganismos van a depender de la interacción de otros factores como por ejemplo la irradiancia, concentración de nutrientes, temperatura, aireación, entre otros (Jonte *et al.*, 2003).

La cianobacteria *Arthrospira platensis* creció en las dos salinidades ensayadas, resultando el mayor crecimiento celular a la salinidad más baja, lo cual pudiera coadyuvar con la plasticidad fisiológica que tiene esta microalga para colonizar hábitats estuarinos y dulceacuícolas. Esta adaptación de crecer a varios rangos de salinidad ha sido observada en otras cianobacterias como: *Synechocystis minúscula*, la cual mostró crecimiento desde 0 hasta 35 UPS, con un máximo entre 0 y 15 UPS (Jonte *et al.*, 2003) y *Limnothrix* sp., quien creció en salinidades de 15 -35 UPS (Lemus, 2007). Igualmente en *Arthrospira máxima* se ha evidenciado crecimiento entre 0 - 35 UPS, con un máximo a la salinidad de 0 UPS (Lámela & Márquez-Rocha, 2000).

La respuesta de *Arthrospira platensis* a la salinidad en términos del grado de limitación del crecimiento y su adaptación a diferentes niveles salinos varía ampliamente de acuerdo a la cepa estudiada. Una disminución de la tasa de crecimiento, debido al estrés salino, también ha sido demostrada en otras cianobacterias tales como *Anacystis* (Vonshak & Richmond, 1981) y *Nostoc* (Blumwald & Tel-Or, 1982).

Las investigaciones relacionadas con el cultivo de *Arthrospira platensis* a salinidades medias (15 -25 UPS) y altas (> 35 UPS) se deben al interés creciente que existe por optimizar la producción de biomasa en zonas costeras, donde el agua dulce es escasa; lo cual brindaría la oportunidad de establecer cultivos masivos de esta cianobacteria en estas áreas, usando agua de mar. Al respecto, Lámela & Márquez (2000) lograron producir 1,2 mg/ml de biomasa de *Arthrospira maxima* al utilizar agua de mar con una salinidad de 35 UPS.

En esta investigación también quedó evidenciado la influencia de la fuente de nitrógeno sobre el crecimiento de *Arthrospira platensis*, observándose el mayor crecimiento en nitrato de sodio en comparación con los de urea.

El nitrógeno es el elemento que después del carbono contribuye con la producción de biomasa y composición bioquímica de las células microalgales. Varios resultados muestran que se produce gran variabilidad tanto en el crecimiento como en la composición bioquímica, debido a las variaciones en la concentración de nitrógeno. Así mismo, las fuentes nitrogenadas varían en cuanto a la influencia que pueden ejercer sobre la fisiología microalgal (Boussiba & Richmond, 1980; Cohen, 1986).

Los resultados obtenidos en esta investigación son similares a los reportados por Vieira *et al.* (2001), quienes al cultivar *Arthrospira platensis* en diferentes fuentes de nitrógeno obtuvieron los mayores contenido de biomasa (1,992 mg/ml) en los cultivos suplementados con nitrato de sodio.

El uso de urea y amonio con fuentes alternativas de nitrógeno ha sido sugerido por numerosos investigadores, como una manera de disminuir los costos de producción de biomasa de *Arthrospira* (Boussiba 1989); sin embargo, estos compuestos ocasionan, en la mayoría de los casos, bajos rendimientos de biomasa. Por ejemplo, Vieira *et al.* (2001) y Sassamo *et al.* (2004) al utilizar urea como fuente de nitrógeno en el cultivo de *A. platensis*, obtuvieron una máxima concentración de biomasa de 0,910; 1,6 y 0,75 mg/ml, respectivamente. De igual forma, Pedroza *et al.* (2008) en cultivos de *A. platensis* con amonio obtuvieron contenidos de biomasa de 0,001833 mg/ml, respectivamente. Los resultados anteriormente descritos son inferiores a los obtenidos en la presente investigación (entre 2 – 3 mg/ml con urea y 3,5 mg/ml con NaNO₃).

La utilización de urea y amonio en los cultivos microalgales tiene la desventaja de que estos compuestos en altas concentraciones se tornan tóxicos. Al respecto, Sassamo *et al.* (2004) recomienda 275 mg/l de urea como una concentración óptima para la producción de biomasa de *Arthrospira*; mientras que Richmond (1988) señala que concentraciones de amonio superiores a 100 mg/l producen efectos negativos en los cultivos de esta cianobacteria. Los efectos adversos de amonio y urea en los cultivos de *Arthrospira* y otras microalgas se debe que estos compuestos producen un descenso del pH del medio, el cual llega a alcanzar valores por debajo de 7, lo cual es perjudicial para *Arthrospira*, ya que su nivel de pH óptimo está entre 9-11 (Fidalgo, 1995).

Composición Bioquímica

Se ha demostrado que la calidad de toda microalga depende de su composición bioquímica, específicamente en cuanto al contenido de proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos grasos. Esta composición bioquímica obedece, en gran parte, a las condiciones de cultivo (temperatura, salinidad, iluminación, nutrientes, agitación entre otros), por lo que la modificación de los parámetros ambientales es una estrategia utilizada para promover la producción de un determinado metabolito (Becker, 1994).

Proteínas

La cianobacteria *Arthrospira platensis* mostró en este trabajo mayores contenidos de proteínas (57,5%) a la menor salinidad (0 UPS) en nitrato de sodio como fuente de nitrógeno.

Resultados similares a los mostrados en la presente investigación fueron señalados por Olguín *et al.* (2001) y Rafiquil *et al.* (2005), quienes obtuvieron en *Arthrospira platensis* un 58 - 62% de proteínas en cultivos realizados en salinidades bajas (0 UPS) y nitrato como fuente de nitrógeno.

El incremento de la salinidad en los cultivos de *Arthrospira* ha mostrado tener efectos negativos en la síntesis proteica, tal como lo demostró Tredici *et al.* (1986) en *Spirulina maxima*, quienes observaron que el contenido de proteínas disminuyó desde 60% hasta 48% (con nitrato) y desde 65% hasta 60% (con urea), al incrementar la salinidad desde 0 hasta 35 UPS.

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

La reducción de la síntesis de proteínas al incrementar la salinidad en los cultivos de *Arthrospira* puede deberse a que estos microorganismos desvían la energía destinada para síntesis proteica hacia la producción de carbohidratos, lípidos y algunos aminoácidos (prolina) que funcionarían como solutos compatibles para evitar la deshidratación celular (Vásquez & Arredondo, 1991; Mussagy, 2005).

En otras cianobacterias también se ha evidenciado que el estrés salino provoca un descenso en la acumulación de proteínas. De Philippis *et al.* (1993) determinaron en *Cyanothece* una baja producción de proteínas al incrementar la salinidad de los cultivos desde 29 UPS hasta 117 UPS.

Este patrón de disminución en la acumulación de proteínas al incrementar la salinidad en las microalgas no es universal, ya que se ha observado que las respuestas fisiológicas de cada especie y cepa de microalga es particular; así se tiene por ejemplo que el aumento de la salinidad desde 0 hasta 100 UPS en cultivos de la cianobacteria *Synechococcus* sp. ocasionó una mayor acumulación de proteínas desde 1,25 hasta 2 fg/cel (Rosales *et al.*, 2005). Resultados similares de la relación directa entre salinidad y contenido proteico obtuvieron Berland *et al.* (1989) con *Aphanothece* sp.

El uso de fuentes nitrogenadas diferentes al nitrato, como lo son urea y amonio, dentro del rango de concentraciones no tóxicas, ha permitido obtener biomasa de *Arthrospira* con altos contenidos de proteínas, Tredici *et al.* (1986) obtuvieron contenidos proteicos que variaron desde 35 -61% con nitrato, y desde 52 – 65 con urea. Otros autores como Rijn & Shilo (1986) reportaron en *Spirulina* sp. un 62,4% de proteínas cuando fue expuesta a 0 UPS con amonio como fuente de nitrógeno.

Carbohidratos

Los carbohidratos totales en las cianobacterias presentan un comportamiento variable y va a depender no solo de la especie en particular, sino también de la

interacción de los factores físico-químicos establecidos en los cultivos, ya que son los componentes energéticos que los organismos, en general, utilizan más fácil y rápidamente para su metabolismo.

En esta investigación, los carbohidratos presentaron los mayores valores (20,9 %) a la mayor salinidad (15 UPS) y en nitrato de sodio. Esto permite inferir que esta cianobacteria a altas salinidades produce cambios fisiológicos en las células microalgales estimulados por los problemas de hidratación lo que conduce a un engrosamiento de las paredes celulares como mecanismo de adaptación al estrés salino, ya que los carbohidratos funcionan como productos de reserva constituyendo una valiosa fuente energética tanto para las microalgas como para sus consumidores (Brown *et al.*, 1997). También es posible que esta cepa de *A. platensis* estimule la síntesis de carbohidratos relacionadas con la osmorregulación a altas salinidades. De igual forma, se ha registrado la excreción de polisacáridos bajo condiciones desfavorables de nutrientes y bajo altas condiciones de salinidad e iluminación (Brüll *et al.*, 2000).

En otras investigaciones se ha observado que al aumentar la salinidad a mayores niveles, puede inducirse una mayor producción de carbohidratos, tal como lo menciona Tadros (1988), quien obtuvo en *Spirulina platensis* un incremento en el contenido de carbohidratos desde 23% hasta 32% al aumentar la salinidad de los cultivos desde 5 hasta 29 UPS. De igual forma, Olguín *et al.* (2001) con *Spirulina sp.*, demostraron las mayores concentraciones de esta macromolécula (28,41%) cuando los cultivos fueron expuestos a salinidades de 20 UPS.

Los contenidos de carbohidratos obtenidos en la presente investigación a 15 UPS son superiores a los reportados por otros autores a 0 UPS. Así por ejemplo, Oliveira *et al.* (1999) publican concentraciones de carbohidratos en *A. maxima* y *A. platensis*, cultivada a 25°C y 0 UPS, de 12 y 13%, respectivamente. Morist *et al.* (2001) determinaron en *Spirulina platensis*, cultivada a 36 °C y 0 UPS, un 12% de carbohidratos. Estos hallazgos confirman la hipótesis de que el aumento de la salinidad promueve en *Arthrospira* una mayor acumulación de esta macromolécula.

El uso de amonio y urea como fuentes de nitrógeno en los cultivos de diversas microalgas también ha promovido un incremento en la producción de carbohidratos. Así por ejemplo, Rijn & Shilo (1986) en cultivos mixtos de *Spirulina sp.* y *Oscillatoria sp.*

determinaron contenidos de 18% de carbohidratos al utilizar amonio. Fidalgo (1995) logró en *Tetraselmis suecica* valores máximos de carbohidratos 17, 61 pg/cel en los cultivos suplementados con urea y en *Chaetoceros calcitrans*, 28% con amonio como fuente nitrogenada.

Lípidos

El contenido de lípidos, al igual que los carbohidratos, mostró sus mayores contenidos (9,5%) a la mayor salinidad (15 UPS) y en nitrato de sodio como fuente de nitrógeno.

Resultados similares a los determinados en esta investigación fueron publicados por Tadros (1988) quienes observaron en *Spirulina platensis* un aumento en el contenido de lípidos desde 8% hasta 10% al variar la salinidad desde 5 hasta 29 UPS. Olguín *et al.* (2001) con *Spirulina* sp. Obtuvieron las mayores concentraciones lipídicas (28,6%) a la mayor salinidad ensayada (20 UPS). El incremento en la acumulación de lípidos al aumentar la salinidad ha sido reportado en numerosas microalgas, lo cual se ha discutido como un mecanismo de osmoprotección (Vásquez & Arredondo, , 1991).

En otros estudios se observa que las mayores concentraciones de lípidos se alcanzaron cuando *Arthrospira* es cultivada a bajas salinidades (entre 0 – 1 UPS). Al respecto, Tornabene *et al.* (1985) señalan concentraciones de lípidos totales de 16,8% en *Arthrospira platensis* al ser cultivada a 0 UPS, contenidos que son superiores a los obtenidos en la presente investigación. Este mayor contenido de lípidos demostrado por estos autores puede estar inducido por las diferencias en los factores ambientales utilizados, los cuales incluyen mayor temperatura (30°C) y menor intensidad luminosa (15µmol/ m²/ s).

Al comparar los contenidos de lípidos de *Arthrospira*, de acuerdo a la fuente nitrogenada utilizada, se encuentra que tanto nitrato como urea o amonio producen cantidades importantes de esta macromolécula (entre 7 – 30%), las cuales varían de acuerdo con la interacción de los diversos factores ambientales involucrados (temperatura, salinidad, nutrientes, irradiancia, entre otros). Así por ejemplo, Danesi *et al.* (2002) al cultivar *Spirulina platensis* con diferentes fuentes nitrogenadas a 0 UPS, encontraron que la urea propició la mayor acumulación de este metabolito (20,7%).

Al analizar los resultados de la presente investigación, se puede deducir que el tipo de fuente nitrogenada usada no representó una limitante para obtener altos contenido de lípidos (> 7%).

Ácidos grasos

La composición de los ácidos grasos de una especie microalgal determina su calidad nutricional, debido a que éstos compuestos han mostrado tener efectos benéficos en los organismos que lo consumen, tales como la fortificación del sistema inmune; de allí la importancia de su estudio para ser incluidos tanto en nutrición humana como en acuicultura (Brown *et al.*, 1989).

La síntesis de estos compuestos estuvo influenciada por la salinidad y la fuente nitrógeno utilizada. Los cultivos suplementados con urea produjeron mayores concentraciones de ácidos grasos saturados ($50,04 \pm 2,32\%$), monoinsaturados ($22,46 \pm 1,82\%$) y poliinsaturados ($44,11 \pm 3,32\%$). A excepción del contenido de ácidos grasos poliinsaturados, la salinidad de 15 UPS promovió, de forma general, el incremento en la acumulación de los ácidos grasos.

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

Es importante referir que tanto urea (0 UPS) como nitrato (0 y 15 UPS) promovieron una acumulación significativa del ácido gammalinolénico (18:3 n-6), el cual alcanzó concentraciones de hasta 22%, con respecto al total de los ácidos grasos analizados. Resultados similares del contenido de este ácido graso fueron obtenidos por Cohen *et al.* (1993) y Colla *et al.* (2004) en *Spirulina platensis*, quienes reportan concentraciones de 19 -21%, al utilizar nitrato como fuente nitrogenada.

La importancia de la presencia del ácido gammalinolénico en *Arthrospira* radica en el hecho de que al usar la biomasa de este microorganismo, como alimento en

humanos, se estaría fortaleciendo la salud, dado a que este compuesto es precursor de algunas prostaglandinas y reduce en cierta medida la cantidad de colesterol en sangre (Sánchez *et al.*, 2003), por lo que representa una alternativa en el manejo de enfermedades cardiovasculares y en el control del peso. Por otra parte, se ha demostrado que estimula el sistema inmune (Wu & Meydani, 1996) y atenúa los síntomas de la enfermedad de Parkinson y la esclerosis múltiple (Cohen, 1997).

Pigmentos

La producción de clorofila *a*, carotenoides totales y ficocianina en *A. platensis* mostró la tendencia de disminuir al aumentar la salinidad, siendo nitrato de sodio la fuente de nitrógeno que propició su mayor acumulación.

El mayor contenido de clorofila *a* (43,04 $\mu\text{g/ml}$ = 1,22 %, anexo 35) en esta cianobacteria ocurrió a la salinidad de 0 UPS y en nitrato de sodio como fuente de nitrógeno, lo cual se asemeja a los resultados (1,18%) obtenidos por Torzillo *et al.* (1984) con *A. maxima* bajo condiciones similares de cultivo.

Este pigmento muestra mucha variabilidad de acuerdo con las condiciones de cultivo. Así se tiene que Olaizola & Duerr (1990) y Cohen *et al.* (1993) reportaron en *Spirulina platensis* contenidos de clorofila *a* de 2,3 y 1,44 %, respectivamente. Por su parte, Lámela & Márquez-Rocha (2000) señalan para *Arthrospira máxima* un 0,61%, de este pigmento. Las discrepancias entre estos resultados con los obtenidos en la presente investigación puede deberse a las temperatura e irradiancia usadas, ya que los anteriores autores sometieron a la cianobacteria a 23°C y 230 $\mu\text{mol/ m}^2/\text{s}$ y en este trabajo se aplicaron 25°C y 390 $\mu\text{mol/ m}^2/\text{s}$.

El uso de urea como fuente nitrogenada ha mostrado ser una alternativa para la producción de biomasa de *Arthrospira* con altos contenidos de clorofila *a*. Al respecto, Danesi *et al.* (2002) cultivaron *Spirulina platensis* en medio Zarrouk (0 UPS) con urea como fuente de nitrógeno, logrando concentraciones de 7,56 % de clorofila *a*, cifras éstas que son superiores a las obtenidas con nitrato de sodio en este trabajo. Por el contrario, los cultivos de *Arthrospira* suplementados con amonio muestran bajas concentraciones de este pigmento, tal como ha sido referido por Rijn & Shilo (1986),

quienes reportaron en *Spirulina sp.* un 0,80% de clorofila *a* al utilizar amonio como fuente de nitrógeno.

De forma similar a los resultados obtenidos en la presente investigación, se ha observado en otros reportes que el incremento de la salinidad trae consigo una disminución del contenido de clorofila *a* en *Arthrospira*. Lu *et al.* (1999) observaron que el contenido de clorofila *a* de *Spirulina platensis* disminuyó un 20% al incrementar la salinidad hasta 44 UPS. Lámela & Márquez-Rocha (2000) demostraron un descenso en la producción de clorofila *a* de *Arthrospira maxima* desde 6,1 mg/g hasta 2,35 mg/g al incrementar la salinidad desde 0 hasta 35 UPS.

El efecto que tiene el estrés salino sobre la disminución del contenido de clorofila *a* se ha relacionado con el incremento que éste ocasiona en el gradiente de pH a través de la membrana tilacoidal, lo cual causa reducción en la tasa de fotosíntesis (Gilmour *et al.*, 1985). Este comportamiento también ha sido observado en *Dunaliella tertiolecta* por Ben-Amotz & Avron (1983b) y en *Botryococcus braunii* por Ranga *et al.* (2007), quienes señalaron que las altas salinidades promueven en las microalgas, en general, una disminución del contenido de clorofila *a*.

Los carotenoides totales mostraron un comportamiento similar al de la clorofila *a*, es decir, las máximas concentraciones (15,1 µg/ml = 0,40 %, anexo 35) se reportaron a la menor salinidad (0 UPS) y con nitrato de sodio.

El incremento de la salinidad en microalgas eucarióticas halotolerantes tipo *Dunaliella salina* provoca una mayor acumulación de carotenoides totales (Guevara *et al.*, 2005); sin embargo, en *Arthrospira* se ha visto que este patrón es inverso. Al respecto Kebede (1997) determinó que el incremento de la salinidad desde 20 hasta 80 UPS provocó un descenso en la acumulación de carotenoides de *Spirulina platensis*. De igual forma, Lámela & Márquez-Rocha (2000) observaron que los carotenoides totales disminuyeron desde 0,22% hasta 0,18% cuando la salinidad varió desde 0 hasta 35 UPS, usando nitrato de sodio como fuente de nitrógeno.

La ficocianina fue la fracción mayoritaria de los pigmentos en todos los tratamientos ensayados. Los mayores contenidos de este pigmento, al igual que el de clorofila *a* y carotenoides se evidenciaron a la menor salinidad y en nitrato de sodio (153 µg/ml = 4,37 % anexo 35).

En *Spirulina platensis* se han determinado altos contenidos de ficocianina en diferentes condiciones de cultivo. Al respecto, Cohen *et al.* (1993) y Olvera *et al.* (2000) obtuvieron un 24% y 7%, respectivamente, de este pigmento en medio Zarrouk a 0 UPS y Zhang *et al.* (1998) determinaron concentraciones de 795 µg/ml. Estos contenidos son superiores a los encontrados en la presente investigación, lo cual pudiera ser atribuido a las diferencias en las temperaturas e intensidades luminosas ensayadas, debido a que los anteriores autores utilizaron 30 °C y 80 µmoles/m²/s. La baja intensidad luminosa promueve la mayor acumulación de ficocianina, ya que estos pigmentos funcionan como pigmentos accesorios para captar con mayor eficiencia las bajas intensidades luminosas y transferir esta energía a la clorofila *a* (Tomaselli *et al.*, 1997).

Lámela & Márquez-Rocha (2000) determinaron en *Arthrospira máxima* contenidos de ficocianina (4,5%) similares a los encontrados en la presente investigación al utilizar medios de cultivos a 0 UPS y suplementados con nitrato de sodio. Estos mismos autores al incrementar la salinidad hasta 35 UPS, observaron que la concentración de ficocianina en *A. maxima* disminuyó hasta 1,5%.

La disminución del contenido de ficocianina al incrementar la salinidad en los medios de cultivo puede deberse a la pérdida de energía respiratoria y excretoria para contrarrestar el estrés iónico y osmótico como fue referido por Kebede (1997).

Los escasos reportes de cultivos de *Arthrospira* con amonio señalan que la concentración de ficocianina es inferior a la obtenida en cultivos fertilizados con nitrato. Así se tiene que Rijn & Shilo (1986) en cultivos de *Spirulina* sp. determinaron contenidos de 1,90% de ficocianina al utilizar amonio como fuente nitrogenada. Lo anterior puede deberse a la disminución que experimenta el pH (Ullrich *et al.*, 1984), lo

cual es perjudicial para *Arthrospira*, ya que sus niveles óptimos están entre 9 -11 (Pedraza, 1989).

El estudio de la ficocianina tiene mucha importancia, debido a que este compuesto tienen extensa aplicación en las industrias alimenticias, farmacológicas y biomédicas como nutrientes para humanos y animales, cosméticos y marcadores fluorescentes, entre otros (Belay *et al.*, 1993; Borowitzka, 1994), por lo que su cotización es elevada, llegándose a encontrar que sus precios varían desde 174 - 328 USD/ por cada ampolla de 250 μ l, dependiendo de su calidad y pureza (Invitrogen, 2005).

Exopolisacáridos

Los contenidos de exopolisacáridos fueron similares en todas las condiciones de cultivos ensayadas, alcanzando una concentración promedio de $21,12 \pm 1,413$ mg/ml. Resultados similares a los obtenidos en la presente investigación han sido publicados por Fresnedo & Serra (1992) y De Philippis *et al.* (2001) con las cianobacterias *Cyanothece* sp. y *Phormidium laminosum*, donde se evidenció que la producción de exopolisacáridos es más activa a elevadas intensidades luminosas, como la aplicada en la presente investigación. Lo anterior puede deberse a que estos exocompuestos funcionan como barrera física entre el microorganismo y su ambiente inmediato (De Philippis & Vincenzini, 1998).

El estudio de los exopolisacáridos de *Arthrospira* ha venido tomando auge durante los últimos años, dado que estos compuestos poseen una marcada actividad biológica. Al respecto, Seyoum *et al.* (1998) citado en <http://www.blubio.de/spirulina-studien-2004.pdf> observaron que extractos acuosos de *Arthrospira platensis* inhibieron la replicación del VIH-1 en líneas de células T humanas. La caracterización química de estos extractos reveló la presencia de polisacáridos y taninos, los cuales tienen interés clínico, debido a la significativa actividad antirretroviral que poseen.

Más recientemente, Pugh *et al.* (2001) aisló de *Arthrospira platensis* un nuevo polisacárido de estructura compleja y alta masa molecular, llamado “immulina”, el cual presenta actividad immunoestimuladora.

Finalmente, es importante expresar que *Arthrospira platensis*, cultivada con nitrato o urea como fuente de nitrógeno, representa una fuente de alimento alternativa para humanos y animales, así como también materia prima para las industrias farmacéuticas y biomédicas, debido a los altos contenidos de proteínas, ácidos grasos y ficocianina que posee. Estudios adicionales que incluyan variaciones en la concentraciones de nutrientes, intensidades luminosas y temperatura deben ser ejecutados a fin de evaluar su interacción con la salinidad para optimizar el cultivo de este microorganismo en agua de mar.

CONCLUSIONES

La cianobacteria *Arthrospira platensis* mostró crecimiento en todas las salinidades y fuentes de nitrógeno ensayadas, obteniéndose el mayor crecimiento a 0 UPS y en nitrato de sodio.

El incremento de la salinidad disminuyó la producción de proteínas totales y pigmentos y aumentó la acumulación de carbohidratos y lípidos en *Arthrospira platensis*.

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

La salinidad de 15 UPS promovió, de forma general, el incremento en la acumulación de los ácidos grasos en *Arthrospira platensis*.

Las máximas concentraciones de los ácidos los grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados se obtuvieron en los cultivos de *Arthrospira platensis* suplementados con urea.

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

La producción de exopolisacáridos en *Arthrospira platensis* fue similar en las salinidades y fuentes de nitrógeno utilizadas.

Arthrospira platensis, cultivada con nitrato o urea como fuente de nitrógeno, representa una fuente de alimento alternativa para humanos y animales, así como también materia prima para las industrias farmacéuticas y biomédicas, debido a los altos contenidos de proteínas, ácidos grasos y ficocianina que posee.

BIBLIOGRAFÍA

- Abalde, J., Cid, J., Fidalgo, J., Torres, E. & Herrero, C. 1995. Microalgas: Cultivo y Aplicaciones. *Monografía N° 26*. Universidad de la coruña, España. 210 pp.
- Aguilar, C. 1995. 1995. Crecimiento y ciclo de vida del alga *Dunaliella salina* Teodoresco (Chlorophyta, Volvocales) de las salinas de los Chimus (Ancash) y las salinas de Chilca (Lima). Tesis para obtener el título de Licenciado en Biología. Universidad Ricardo Palma. Lima-Perú. 97 pp.
- Apte, S & Bhagwat, A. 1989. Salinity-stress- induced proteins in two nitrogen-fixing *Anabaena* strains differentially tolerant to salt. *Journal of Bacteriology*. 171: 909-915.
- Ayala, F. & Bravo, R. 1982. An improved cheap culture medium for the blue-green microalgae *Spirulina*. *European Journal Applied Microbiology and Biotechnology*. 15: 198-199.
- Becker, E. 1994. Microalgae: *Biotechnology and Microbiology*. Cambridge University Press, Londres. 293 pp.
- Belay, A. 1997. Mass culture of *Spirulina* outdoors. The Earthrise Farms experience. In: Vonshak, A. (Ed). *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, cell-biology and biotechnology*. Taylor and Francis Publisher. London. 131-158 pp.
- Belay, A., Ota, Y., Miyakawa, K & Shimamatsu, H. 1993. Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*. *Journal of Applied Phycology*. 2: 230-235.
- Ben-Amotz, A. 2004. Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products—major industrial species. *Dunaliella*. In: Richmond A (Ed). *Handbook of microalgal culture, Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Science, Oxford, UK. 273–280 pp.
- Ben-Amotz, A. & Avron, M. 1983a. Accumulation of metabolites by halotolerant algae and its industrial potencial. *Annu Review. Microbiology*. 37: 95- 119.
- Ben-Amotz, A. & Avron, M. 1983b. On the factors with determine massive β -carotene accumulation in the halotolerant alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiology*. 72: 593-597.
- Ben-Amotz, A., Shaish, A. & Avron, M. 1989. Mode of action of the massively accumulated β -carotene of *Dunaliella bardawil* in protecting the alga against damage of excess irradiation. *Plant Physiology*. 91: 1040-1043.
- Berland, B., Le Campion, T. & Campos, H. 1989. Interaction de la salinité et de la température sur la morphologie, la croissance et la composition cellulaire d'une Cyanobactérie halotolerante (*Aphanothece* sp.). *Botánica Marina*. 132; 317-329.
- Berman, I., Lundgren, P. & Falkowski, P. 2003. Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria. *Research in Microbiology*. 154: 1- 2.

- Bligh, E. & Dyer, W. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemical and Physiology*. 37: 911- 917.
- Blumwald, E. & Tel-Or, E. 1982. Osmoregulation and cell composition in salt-adaptation of *Nostoc muscorum*. *Archives of Microbiology*. 132: 168-172.
- Blumwald, E. & Tel-Or, E. 1984. Salt adaptation of the cyanobacterium *Synechococcus* 6311 growing in a continuous culture (Turbidostat). *Plant Physiology*. 74: 183-185.
- Borowitzka, M. & Borowitzka, L. 1988. *Dunaliella*. In: *Micro-algal Biotechnology*. Borowitzka, M. & Borowitzka, L. (Eds.). Cambridge University Press. Cambridge. England. 27-58 pp.
- Borowitzka, M. 1994. Products from algae. In: *Algal Biotechnology in Asia-Pacific Region*. Phang, S., Lee, Y., Borowitzka, M. & Whitton, B.(Eds.). Kuala Lumpur. 5-15pp.
- Borowitzka, M., Borowitzka, L. & Kessly, D. 1990. Effects of salinity increase on carotenoid accumulation in the green alga *Dunaliella salina*. *Journal of Applied Phycology*. 2: 111-119.
- Boussiba, S & Richmond. 1980. C- phycocyanin as a storage protein in the blue-green alga *Spirulina platensis*. *Archives of Microbiology*.125:143-147.
- Boussiba, S. & Richmond, A. 1979. Isolation and characterization of phycocyanins from the blue-green alga *Spirulina platensis*. *Archives of Microbiology*.120: 155-159.
- Boussiba, S. 1989. Ammonia uptake in the alkalophilic cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Plant and Cell Physiology*. 30: 303-308.
- Brown, M., Jeffrey, S. Volkman, J. & Dunstan, G. 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*. 151. 315-331.
- Brown, M., Jeffrey, S. & Garland, C. 1989. Nutritional aspects of microalgae used in mariculture: a literature review. *CSIRO Marine Reports*, n° 205.
- Brüll, L., Huang, Z., Thomas-Oates, J., Pulsen, B., Cohen, E & Michaelsen, T. 2000. Studies of polysaccharides from three edible species of *Nostoc* (Cyanobacteria) with different colony morphologies: Structural characterization and effect on the complement system of polysaccharides from *Nostoc commune*. *Journal of Phycology*. 36: 871-881.
- Cañizares, R. 2002. Biotecnología microalgal. *Avances y Perspectivas*, 21: 301-306.
- Celekli, A & Gönül, D. 2006. Effect of pH, light intensity, salt and nitrogen concentrations on growth and *b*-carotene accumulation by a new isolate of *Dunaliella* sp. *World Journal. of Microbiology & Biotechnology*. 22: 183–189.

- Chini, Z., Tomasello, V. & Tredici, M. 1996. Outdoor cultivation of *Spirulina platensis* during autumn and winter in temperate climates. *Journal of Applied Phycology*. 8: 293-301.
- Cohen, Z. 1986. *Products from microalgae*. In Handbook of Microalgal Mass Culture. Richmond (Ed.), CRC Press, Boca Raton, 421-454 pp.
- Cohen, Z. 1997. The chemicals of *Spirulina*. En *Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology*. Taylor & Francis (Eds.). Londres. 175-203 pp.
- Cohen, Z., Reungiftchachawali, M., Siangdung, W & Tanticharoen, M. 1993. Production and partial purification of α - linolenic acid and some pigments from *Spirulina platensis*. *Journal of Applied Phycology*. 5: 109-115.
- Coll, M. 1983. *Acuicultura Marina Animal*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid – España, 670 pp.
- Colla, L., Bertolin, T & Vieira, J. 2004. Fatty acids profile of *Spirulina platensis* grown under different temperatures and nitrogen concentrations. *Zetsnschrift fur naturforschung*. 59c: 55-59.
- Couteau, P. 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture. (FAO fisheries technical paper 361) FAO, Rome.
- Cowan, A., Rose, P. & Horne, L. 1992. *Dunaliella salina*: a model system for studying the response of plant cell to stress. *Journal of Experimental Botany*. 43: 1535-1547.
- Danesi, E., Rangel, C., Carvalho, J & 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: 261-269.
- De Philippis, R. & Vincenzini, M. 1998. Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. *FEMS Microbiology Reviews*. 22: 151-175.
- De philippis, R., Margheir, M., Pelosi, E. & Ventura, S. 1993. Exopolysaccharide production by a unicellular cyanobacterium isolated from a hypersaline habitat. *Journa of Applied Phycology*. 5: 387-394.
- De Philippis, R., Sili, C., Paperi, R & Vicenzini, M. 2001. Exopolysaccharide-producing Cyanobacteria and their possible exploitation: A review. *Journal of Applied Phycology*. 13: 293-299.
- Del Campo, J., García, M. & Guerrero, M. 2007. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 74:1163-1174.

- Dubois, M., Gilles, K., Halmilton, J., Rebers, P. & Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 2: 350-356.
- Eliach, J., Bourges, G., Duré, L., Medina, M. & Lara, M. 2004. Incidencia de la agitación en el crecimiento microalgal en biorreactores. Reporte Técnico. Secretaría de Ciencia y Técnica. Facultad de Ciencias Exactas, Ingeniería y Agricultura. Universidad Nacional de Rosario, Argentina. 1-15 pp.
- Fábregas, J. & Herrero, C. 1986. Marine microalgae as a potential source of minerals in fish diets. *Aquaculture*. 51: 237-243.
- Fábregas, J., Abalde, J., Cabezas, B & Herrero, C. 1989. Changes in protein, carbohydrates and gross energy in the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Burtcher) by nitrogen concentrations as nitrate and urea. *Aquaculture Engineering*. 8: 223-239.
- Fidalgo, J. 1995. Variabilidad bioquímica de microalgas marinas en cultivo en función de la fuente de nitrógeno. Tesis de Doctorado. Universidad de Coruña. España. 46pp.
- Fox, R. D. 1999 "Spiruline, Technique pratique et promesse", *Edisud*, Aix en Provence. Sin paginación.
- Fresnedo, O. & Serra, J. 1992. Effect of nitrogen starvation on the biochemistry of *Phormidium laminosum* (Cyanophyceae). *Journal of Phycology*. 28: 786-793.
- Gilmour, D., Hipkins, M. & Boney, A. 1982. The effect of salt stress on the primary processes of photosynthesis in *Dunaliella tertiolecta*. *Plant Science Letters*. 26: 325-330.
- Gilmour, D., Hipkins, M. & Boney, A. 1984a. The effect of osmotic and ionic stress in the primary processes of photosynthesis in *Dunaliella tertiolecta*. *Journal of Experimental Botany*. 35: 18-27.
- Gilmour, D., Hipkins, M. & Boney, A. 1984b. The effect of decreasing the external salinity on the primary processes of photosynthesis in *Dunaliella tertiolecta*. *Journal of Experimental Botany*. 35: 28-35.
- Gilmour, D., Hipkins, M., Webber, A., Baker, N. & Boney, A. 1985. The effect of ionic stress on photosynthesis in *Dunaliella tertiolecta*. *Planta*. 163: 250-256.
- Guevara, M., Lodeiros, C., Gómez, O., Lemus, N., Nuñez, P., Romero, L., Vásquez, A & Rosales, N. 2005. Carotenogénesis de cinco cepas del alga *Dunaliella* sp. (Chlorophyceae) aisladas de lagunas hipersalinas de Venezuela. *Revista Biological Tropical*. 53 (3&5): 331-337.
- Helbling, E., Gao, K., Ai, H., Ma, Z. & Villafañe, V. 2006. Differential responses of *Nostoc sphaeroides* and *Arthrospira platensis* to solar ultraviolet radiation exposure. *Journal of Applied Phycology*. 18:57-66.

- Herbert, D., Phipps, P. & Stranse, R. 1971. Chemical analysis in microbial cells. En: Methods in Microbiology. Norris, J. & Ribbons, D. (Eds). *Academic Press*. 5: 209-344.
- Invitrogen, 2005. <http://probes.invitrogen.com/handbook/sections/0604.html>.
- Iwata, K. 1990. Effects of *Spirulina platensis* on plasma lipoprotein lipase activity in fructose-induced hyperlipidemic rats. Laboratory of Nutrition college, Toshima-ku, Japan. Tokyo. *Journal of nutritional science and vitaminology*. 170: 165-171.
- Jeraci, J. & Vansoest, P. 1986. Handbook of Dietary Fiber in Human Nutrition. Spiller, G. (Ed), CRC Press, Boca Raton, 299–303 pp.
- Jonte, L., Rosales, N., Briceño, B. & Morales, E. 2003. La salinidad y la irradiancia modulan el crecimiento de la cianobacteria *Synechocystis minuscula* en cultivos discontinuos. *Multiciencias*. 3: 1-13.
- Kaplan, D., Cohen, Z. & Abeliovich, A. 1986. Optimal growth conditions for *Isochrysis galbana*. *Biomass*. 9: 37-48.
- Kebede, E. 1997. Response of *Spirulina platensis* (*Arthrospira fusiformis*) from lake Chitu, Ethiopia, to salinity stress from sodium salts. *Journal of Applied Phycology*. 9: 551-558.
- Laliberté, G., Lessard, P., De la Noue, J. & Sylvestre, S. 1996. Effect of phosphorus addition on nutrient removal from wastewater with the cyanobacterium *Phormidium bohneri*. *Bioresource Technology*. 59: 227- 233.
- Lámela, T & Márquez-Rocha, F. 2000. Phycocyanin production in sea water culture of *Arthrospira maxima*. *Ciencias Marinas*. 26 (4): 607-619.
- Lemus, N. 2007. Caracterización bioquímica, bioactividad y parámetros de crecimiento de las cianobacterias *Limnothrix* sp. y *Phormidium* sp. en función de la salinidad y concentración de nitrato. Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar el título de Magíster Scientiarum en Ciencias Marinas. Mención Biología Marina. 82 pp.
- Liotenberg, S., Campbell, R., Rippka, R., Houmard, J. & Tandeau de Marsac, N. 1996. Effect of the nitrogen source on phycobiliprotein synthesis and cell reserves in a chromatically adapting filamentous cyanobacterium. *Microbiology*. 142: 611-622.
- Loeblich, L. 1982. Photosynthesis and pigments influenced by light intensity and salinity in the halophile *Dunaliella salina* (Chlorophyla). *Journal of Marine Biology*. 62: 493-508.
- Loreto, C., Rosales, N., Bermúdez, J. & Morales, E. 2003. Pigment and protein production of the Cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120 in relation to nitrogen concentration and irradiance. *Gayana Botanica*. 60(2): 83-89.

- Loreto, C.; Mora, R.; Marco, E. & Morales, E. 2004. Influencia del nitrato sobre la producción de biomasa, pigmentos y proteínas de la cianobacteria *Anabaena* sp. PCC 7120. *Ciencias*, 12 (2): 137-143.
- Lowry, O., Rosebrough, H., Farr, A. & Randall, R. 1951. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *Journal Biological Chemical*. 193: 265-275.
- Lu, C. & Vonshak, A. 1999. Photoinhibition in outdoor *Spirulina platensis* cultures assessed by polyphasic Chlorophyll fluorescence transients. *Journal of Applied Phycology*. 11: 355-359.
- Margaleff, R. 1977. Ecología. Editorial Omega. España. 392-400 pp.
- Marsh, J. & Weinstein, D. 1966. Simple charring method for determination of lipids. *Journal Lipids Research*. 7: 574-592.
- Miećkiewicz, E., Ivanov, A., Williams, J., Khan, M., Falk, S. & Huner, N. 2000. Photosynthetic acclimation of the filamentous cyanobacterium, *Plectonema boryanum* UTEX 485, to temperature and light. *Plant and Cell Physiology*. 41: 767-775.
- Mora, R., Ortíz, N., Clemente, Y., Bermúdez, J., Avendaño, D. & Morales, E. 2002. Efecto del nitrato, irradiancia y salinidad sobre la producción de clorofila *a* de microalgas cultivadas y aisladas en la región Nooriental de Venezuela. *Oceánides*. 17: 73-83.
- Mora, R.; Moronta, R.; Ortega, J. & Morales, E. 2004. Crecimiento y producción de pigmentos de la microalga nativa *Chlorella* sp. *Ciencias*. 12 (2): 137-143.
- Morist, A., Montesinos, J., Cusidò, J. & Gòdia, f. 2001. Recovery and treatment of *Spirulina platensis* cells cultured in a continuous photobioreactor to be used as food. *Process Biochemical*. 37, 535–547.
-  Morris, I. 1981. Photosynthesis products, physiological state, and phytoplankton growth. In Platt T (ed), *Physiological Bases of Phytoplankton Ecology*. *Can. Bull. Fish. Aquat. Sci.* 210: 83- 102.
- Mühling, M., Belay, A & Whitton, B. 2005. Variation in fatty acid composition of *Arthrospira (Spirulina)* strains. *Journal of Applied Phycology*. 17:137-147.
- Mussagy, A. 2005. The effect of salinity on growth rate and osmolyte concentration of *Arthrospira* (Cyanophyceae) isolated from wastewater treatment ponds in Maputo, Mozambique. *Journal of Tropical Microbiology. & Biotechnology*. 1 (1): 43-51.
- Olaizola, M. & Duerr, E. 1990. Effects of light intensity and quality on the growth rate and photosynthetic pigment content of *Spirulina platensis*. *Journal of Applied Phycology*. 2: 97-104.

- Olguín, E., Galicia, S., Angulo, O & Hernandez, 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: 19-24.
- Oliveira, C. & Vieira, J. 2006. Repeated batch cultivation of the microalga *Spirulina platensis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 22: 937-943.
- Oliveira, M., Monteiro, M., Robbs, P & Leite, S.1999. Growth and chemical composition of *Spirulina maxima* and *Spirulina platensis* biomass at different temperatures. *Aquaculture International*.7: 261-275.
- Olvera-Ramírez, R., Cañizares-Villanueva, O & Ríos-Leal, E. 2000. Selección de cepas de microalgas y cianobacterias con potencial para la producción de pigmentos naturales. *Anuario de la .Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. México*. 46 (1): 77-82.
- Oren, A. 1999. Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 63: 334-348.
- Patil, V., Källqvist, T., Olsen, E., Vogt, G. & Gislerod, H. 2007. Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed. *Aquaculture International*. 15:1-9.
- Pedraza, G. 1989. Cultivo de *Spirulina maxima* para suplementación proteica. *Living Resource for Rural Development*. 1(1): 1-6.
- Pedrosa, R., Chuei, M., Converti, A., Sato, S & Monteiro, J. 2008. Influence of ammonium chloride feeding time and light intensity on the cultivation of *Spirulina* (*Arthrospira platensis*). *Biotechnology & Bioengineering*. 10(2):297-305.
- Pugh, N., Ross, S., Elsohly, H., Elsohly, M & Pasco, D. 2001. Isolation of three weight polysaccharide preparation with potent immunostimulatory activity from *Spirulina platensis*. *Aphanizomenon flos- aquae* and *Chlorella pyrenoidosa*. *Planta Medica*. 67: 737-742.
- Rafiquil, I., Jalal, K & Alam, M. 2005. Environmental factors for optimization of *Spirulina* biomass in laboratory culture. *Biotechnology*. 4(1): 19-22.
- Ramirez-Moreno, L & Olvera-Ramirez, R. 2006. Uso tradicional y actual de *Spirulina* sp. (*Arthrospira* sp.). *Interciencia*. 31(9): 657-663.
- Ranga, A., Dayananda, C., Sarada, R., Shamala, T., Ravishankar, G. 2007. Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents. *Bioresource and Technology*. 98: 560-564.
- Richmond, A. 1988. *Spirulina*. In: Micro-algal Biotechnology. M.A. Borowitzka and L.J. Borowitzka (Eds). Cambridge University Press, Cambridge. 85-121 pp.

- Rijn, J. & Shilo, M. 1986. Nitrogen limitation in natural populations of cyanobacteria (*Spirulina* and *Oscillatoria* spp) and its effect on macromolecular synthesis. *Applied and Environmental Microbiology*. 52 (2): 340-344.
- Robert. H. 1994. Microalga *Spirulina*. Superalimento del futuro. Barcelona. (Ed). Urano. pp 49.
- Romo, S. 1994. Growth parameters of *Pseudanabaena galeata* Böcher in culture under different light and temperature conditions. *Algological Studies.*, 7: 239-248.
- Rosales, N., Ortega, J., Mora, R. & Morales, E. 2005. Influence of salinity on the growth and biochemical composition of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. *Ciencias Marinas*. 31(2): 349-355.
- Sánchez, M., Bernal, J., Roza, C & Rodriguez, I. 2003. *Spirulina* (*Athrospira*): an edible microorganism. A review. www.javeriana.edu.co/universitas_scientiarum/vol18n1/J_bernalhtm.
- Sassano, C., Carvalho, J., Gioielli, L., Sato, S., Torre, P & Converti, A. 2004. Kinetics and bioenergetics of *Spirulina platensis* cultivation by fed-batch addition of urea as nitrogen source. *Applied Biochemical and Biotechnology*. 112: 143-150.
- Sato, N. & Murata, N. 1988. Membranes Lipids. *Methods Enzimologic.*, 167: 251-259.
- Seyoum, A., Belay, A., Baba, T & Ruprecht, R. 1998. Inhibition of HIV-1 replication by an aqueous extract of *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*). Citado en <http://www.blubio.de/spirulina-studien-2004.pdf>. Sábado, 19 de enero de 2008. 1:05 p.m.
- Sivonen, K. 1990. Effects of light, temperature, nitrate, orthophosphate, and bacteria on growth of and hepatoxin production by *Oscillatoria agardhii* strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 56: 2658-2666.
- Sokal, J. & Rohlf, F. 1979. *Biometría. Principios y Métodos Estadísticos en la Investigación Biológica*. Blume, Madrid, 832 pp.
- Soletto, D., Binaghi, L., Lodi, A., Carvalho, J. & Converti, A. 2005. Batch and fed-batch cultivations of *Spirulina platensis* using ammonium sulphate and urea as nitrogen sources. *Aquaculture*. 243: 217-224.
- Tadros, M. 1988. Characterization of *Spirulina* biomass for cells diet potential. Tesis de Grado. Universidad de Alabama. USA. 53 pp.
- Tandeau de Marsac, N. & Houmard, J. 1993. Adaptation of Cyanobacteria to environmental stimuli: new steps toward molecular mechanisms. *FEMS Microbiology Review*. 104: 119- 190.

- Tedesco, M. & Duerr, E. 1989. Light, temperature and nitrogen starvation effects on the total lipid and fatty acid content and composition of *Spirulina platensis* UTEX 1928. *Journal of Applied Phycology*. 1: 201-209.
- Tomaselli, L. 1997. Morphology, ultrastructure and taxonomy of *Arthrospira* (*Spirulina*) *maxima* and *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*. En *Spirulina platensis* (*Arthrospira*): physiology, cell-biology and biotechnology. Taylor & Francis. Londres, 5pp.
- Tornabene, T., Bourne, T., Raziuddin, S. & Bem-Amotz, A. 1995. Lipid and lipopolysaccharide constituents of cyanobacterium *Spirulina platensis* (Cyanophyceae, Nostocales). *Marine Ecology Progress Series*. 22: 121-125.
- Torzillo, A., Accolla, G & Tomaselli, L. 1996. Light and oxygen stress in *Spirulina platensis* (cyanobacterium) grown outdoors in tubular reactors. *Physiology Plantarum*. 97: 175-179.
- Torzillo, G., Giovanetti, L., Bocci, F & Materassi, R. 1984. Effect of oxygen concentration on the protein content of *Spirulina* biomass. *Biotechnology and Bioenergy*. 26: 1134-1140.
- Tredecchi, M., Papuzzo, T. & Tomaselli, L. 1986. Outdoor mass culture of *Spirulina maxima* in sea-water. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 24: 47-50.
- Tredici, M. & Chini, G. 1997. Cultivation of *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* in Flat Plate Reactors. In: *Spirulina platensis* (*Arthrospira*) Physiology Cell-biology and Biotechnology. Avigad Vonshak (Ed.) Taylor and Francis Publishers. 117-130 pp.
- Turpin, D. 1991. Effects of inorganic N availability on algal photosynthesis and carbon metabolism. *Journal of Phycology*. 27: 14-20.
- Ullrich, W., Larsson, M., Larsson, C., Lesch, S & Novacky, A. 1984. Ammonium uptake in *Lemna gibba* G1, related membrane potential changes and inhibition of anion uptake. *Physiology Plantarum*. 61: 369-376.
- Vázquez, R. & Arredondo-Vega, B. 1991. Haloadaptation of the green alga *Botryococcus braunii* ('A' Race). *Phytochemistry*. 30 (9): 2919-2925.
- Vieira C., Linde, G., Pires A., Martinez, M. & Trapp, K. 2000. Modelling of growth conditions for Cyanobacterium *Spirulina platensis* in microcosms. *Journal. Microbiology and Biotechnology*. 16: 15-18.
- Vieira, J., Cozza, K., Oliveira, L. & Magagnin, G. 2001. Different nitrogen sources and growth responses of *Spirulina platensis* in microenvironments. *World journal of Microbiology and Biotechnology*. 17: 439-442.
- Volkman, H., Imianovsky, U., Oliveira, J & Sant, E. 2008. Cultivation of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* in desalinator wastewater and salinated synthetic medium:

- protein content and amino-acid profile. *Brazilian Journal of Microbiology*.39:1-4.
- Volkman, H; Imianovsky, U; Furlong, E; Barcelos, O & Sant, E. 2007. influence of desalinator wastewater for the cultivation of *Arthrospira platensis*. Fatty acids profile. *Grasas y Aceites*. 58(4): 396-401.
- Vonshak, A. & Richmond, A. 1981. Photosynthetic and respiratory activity in *Anacystis nidulans* adapted to osmotic stress. *Plant Physiology*. 68: 504-510.
- Vonshak, A. & Richmond, A. 1998. Mass production of the blue-green algae *Spirulina*: an overview. *Biomass*. 15: 233-247.
- Vonshak, A. & Tomaselli, L. 2002. *Arthrospira (Spirulina)*: Systematics and ecophysiology. In: *The Ecology of Cyanobacteria*. Whitton, A., Potts, M., (Eds).. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. 505-522 pp.
- Wegmann, K. & Metzner, H. 1971. Synchronization of *Dunaliella salina* cultures. *Archiv. Fur Mikrobiologie*. 78: 360- 367.
- Wu, D. & Meydani, N. 1996. Gamma-Linolenic acid and immune function. In: *Gamma-Linolenic acid: Metabolism and its roles in nutrition and medicine*. Huang, S. and Mills, D. (Eds). AOCS Press, Champaign. 106–117 pp.
- Zarrouk, C. 1966. Contribution l'étude d' ue cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima* (Setch et Gardner) Geitler. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, Universidad de París. 41 pp.
- Zhang, X. 1998. Large scale cultivation of *Spirulina* in China: today and tomorrow. *Biosystem Studies*. 1(1): 66-73.

ANEXOS

Anexo 1. Análisis de varianza de la masa seca de la cianobacteria *Arthrospira platensis* a diferentes salinidades durante los días de cultivo.

Anexo 2. Análisis de rango múltiple (Scheffe $\alpha=0,05$) de la masa seca de la cianobacteria *Arthrospira platensis* durante los diferentes días.

Días	Densidad Celular (Promedio)	Grupos Homogéneos
2	0,0616667	X
4	0,275833	X
6	0,753333	X
8	1,10917	X
10	1,57083	X
12	1,90167	X
14	2,31417	X
16	2,67417	X
18	2,77917	XX
20	2,845	X

Anexo 3. Análisis de rango múltiple (Scheffe $\alpha=0,05$) de la masa seca de la cianobacteria *Arthrospira platensis* a diferentes fuentes de nitrógeno.

Fuentes de nitrógeno	Densidad celular (Promedio)	Grupos homogéneos
Urea	1,49917	X
Nitrato	1,75783	X

Anexo 4. Análisis de rango múltiple (Scheffe $\alpha=0,05$) de la masa seca de la cianobacteria *Arthrospira platensis* a diferentes salinidades.

Salinidad	Densidad celular (Promedio)	Grupos homogéneos
15	1,3735	X
0	1,8835	X

Anexo 5. Análisis de varianza del contenido de proteínas totales (%) de la cianobacteria *Arthrospira platensis*.

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Error	Radio F	Valor P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Nutrientes	256,282	1	256,282	19,29	0,0000
B: Salinidad	259,624	1	259,624	19,55	0,0000

INTERACCIONES					
AB	40,6685	1	40,6685	3,06	0,1057
RESIDUAL	159,388	12	13,2823		
TOTAL (Corregido)	715,962	15			

Anexo 6. Análisis de rango múltiple (Scheffe $\alpha=0,05$) de las proteínas totales (%) de la cianobacteria *Arthrospira platensis* a diferentes fuentes de nitrógeno.

Fuentes de nitrógeno	Proteínas totales (Promedio)	Grupos homogéneos
Urea	47,0944	X
Nitrato	55,0988	X

Anexo 7. Análisis de rango múltiple (Scheffe $\alpha=0,05$) de las proteínas totales (%) de la cianobacteria *Arthrospira platensis* a diferentes salinidades.

Salinidad	Proteínas totales (Promedio)	Grupos homogéneos
15	47,0683	X
0	55,1248	X

Anexo 8. Análisis de Varianza del contenido de carbohidratos totales (%) de la cianobacteria *Arthrospira platensis*.

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Error	Radio F	Valor P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Nutrientes	214,971	1	214,971	114,74	0,0000
B: Salinidad	136,254	1	136,254	72,72	0,0000
INTERACCIONES					
AB	2,09242	1	2,09242	1,12	0,3114
RESIDUAL	22,4829	12	1,87358		
TOTAL (Corregido)	375,8	15			

Anexo 9. Análisis de rango múltiple (Scheffe $\alpha=0,05$) de las carbohidratos totales (%) de la cianobacteria *Arthrospira platensis* a diferentes fuentes de nitrógeno.

Fuentes de nitrógeno	Carbohidratos totales (Promedio)	Grupos homogéneos
Urea	10,3625	X
Nitrato	17,6934	X

Anexo 10. Análisis de rango múltiple (Scheffe $\alpha=0,05$) de las carbohidratos totales (%) de la cianobacteria *Arthrospira platensis* a diferentes salinidades.

Salinidad	Carbohidratos totales (Promedio)	Grupos homogéneos
15	11,1098	X

0	16,9462	X
---	---------	---

Anexo 11. Análisis de Varianza del contenido de lípidos totales (%) de la cianobacteria *Arthrospira platensis*.

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Error	Radio F	Valor P
EFECTOS PRINCIPALES					
A: Nutrientes	11,9654	1	11,9654	16,35	0,0000
B: Salinidad	7,17263	1	7,17263	9,80	0,0000
INTERACCIONES					
AB	1,70274	1	1,70274	2,33	0,1531
RESIDUAL	8,78233	12	0,731861		
TOTAL (Corregido)	29,6231	15			

Anexo 12. Análisis de rango múltiple (Scheffe $\alpha=0,05$) de las lípidos totales (%) de la cianobacteria *Arthrospira platensis* a diferentes fuentes de nitrógeno.

Fuentes de nitrógeno	Lípidos totales (Promedio)	Grupos homogéneos
Urea	6,78399	X
Nitrato	8,51355	X

Anexo 13. Análisis de rango múltiple (Scheffe $\alpha=0,05$) de las lípidos totales (%) de la cianobacteria *Arthrospira platensis* a diferentes salinidades.

Salinidad	Lípidos totales (Promedio)	Grupos homogéneos
0	8,31831	X
15	6,97922	X

Anexo 14. Análisis de varianza de los ácidos grasos saturados de la cianobacteria *Arthrospira platensis* a diferentes salinidades y fuentes de nitrógeno.

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Error	Radio F	Valor P
EFECTOS PRINCIPALES					
A: Nutrientes	3,59432	1	3,59432	0,22	0,6494
B: Salinidad	76,6907	1	76,6907	4,72	0,0579
RESIDUAL	146,308	9	16,2564		
TOTAL (Corregido)	226,593	11			

Anexo 15. Análisis de rango múltiple (Scheffe $\alpha=0,05$) de los ácidos grasos saturados de la cianobacteria *Arthrospira platensis* a diferentes fuentes de nitrógeno.

Fuentes de nitrógeno	Ác.G.Satur. (Promedio)	Grupos homogéneos
Nitrato	45,5165	X
Urea	44,4219	X

Anexo 16. Análisis de rango múltiple (Scheffe $\alpha=0,05$) de los ácidos grasos saturados de la cianobacteria *Arthrospira platensis* a diferentes salinidades.

Salinidad	ÁCG.Satur. (Promedio)	Grupos homogéneos
15	47,4972	X
0	42,4412	X

Anexo 17. Análisis de varianza de los ácidos grasos monoinsaturados de la cianobacteria *Arthrospira platensis* a diferentes salinidades y fuentes de nitrógeno.

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Error	Radi F	Valor P
EFECTOS PRINCIPALES					
A: Nutrientes	118,929	1	66,8338	27,63	0,0005
B: Salinidad	24,1278	1	24,1278	5,61	0,0421
RESIDUAL	38,7334	9	4,30371		
TOTAL (Corregido)	181,79	11			

Anexo 18. Análisis de rango múltiple (Scheffe $\alpha=0,05$) de los ácidos grasos monoinsaturados de la cianobacteria *Arthrospira platensis* a diferentes fuentes de nitrógeno.

Fuentes de nitrógeno	Ác.G.mono. (Promedio)	Grupos homogéneos
Nitrato	19,7662	X
Urea	13,4699	X

Anexo 19. Análisis de rango múltiple (Scheffe $\alpha=0,05$) de los ácidos grasos monoinsaturados de la cianobacteria *Arthrospira platensis* a diferentes salinidades.

Salinidad	ÁCG.Mono. (Promedio)	Grupos homogéneos
0	15,2001	X
15	18,036	X

Anexo 20. Análisis de varianza de los ácidos grasos poliinsaturados de la cianobacteria *Arthrospira platensis* a diferentes salinidades y fuentes de nitrógenos.

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Error	Radio F	Valor P
--------	-------------------	----	-------	---------	---------

EFFECTOS
PRINCIPALES

A: Nitrato	1,27946E20	1	1,27946E20	1,00	0,3434
B: Salinidad	1,27946E20	1	1,27946E20	1,00	0,3434
RESIDUAL	38,7334	9	4,30371		
TOTAL	181,79	11			

(Corregido)

Anexo 21. Análisis de rango múltiple (Scheffe $\alpha=0,05$) de los ácidos grasos poliinsaturados de la cianobacteria *Arthrospira platensis* a diferentes fuentes de nitrógeno.

Fuentes de nitrógeno	Ác.G.Poliins. (Promedio)	Grupos homogéneos
Nitrato	6,53059E9	X
Urea	35,7047	X

Anexo 22. Análisis de rango múltiple (Scheffe $\alpha=0,05$) de los ácidos grasos poliinsaturados de la cianobacteria *Arthrospira platensis* a diferentes salinidades.

Salinidad	ÁCG.Poliin. (Promedio)	Grupos homogéneos
0	42,1945	X
15	6,53059E9	X

Anexo 23. Análisis de varianza de la clorofila *a* (mg/ml) de la cianobacteria *Arthrospira platensis* a diferentes salinidades y fuentes de nitrógeno.

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Error	Radio F	Valor P
A:Nitrato	83,6708	1	83,6708	74,75	0,0000
B: Salinidad	920,423	1	920,423	822,26	0,0000
INTERACCIONES					
AB	48,5053	1	48,5053	43,33	0,0000
RESIDUAL	13,4326	12	1,11938		
TOTAL (Corregido)	1066,03	15			

Anexo 24. Análisis de rango múltiple (Scheffe $\alpha=0,05$) de la clorofila *a* (mg/ml) de la cianobacteria *Arthrospira platensis* a diferentes fuentes de nitrógeno.

Fuentes de nitrógeno	Clorofila <i>a</i> (Promedio)	Grupos homogéneos
Urea	29,1457	X
Nitrógeno	33,7193	X

Anexo 25. Análisis de rango múltiple (Scheffe $\alpha=0,05$) de la clorofila *a* (mg/ml) de la cianobacteria *Arthrospira platensis* a diferentes salinidades.

Salinidad	Clorofila <i>a</i> (Promedio)	Grupos homogéneos
15	23,8479	X
0	39,0171	X

Anexo 26. Análisis de varianza de los carotenoides totales (mg/ml) de la cianobacteria *Arthrospira platensis* a diferentes salinidades y fuentes de nitrógeno.

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Error	Radio F	Valor P
A:Nitrato	57,1121	1	57,1121	154,88	0,0000
B:Salinidad	238,284	1	238,284	646,20	0,0000
INTERACCIONES					
AB	9,65716	1	9,65716	26,19	0,0003
RESIDUAL	4,42497	12	0,36874		
TOTAL (Corregido)	309,478	15			

Anexo 27. Análisis de rango múltiple (Scheffe $\alpha=0,05$) de la carotenoides totales (mg/ml) de la cianobacteria *Arthrospira platensis* a diferentes fuentes de nitrógeno.

Fuentes de nitrógeno	Carotenoides totales (Promedio)	Grupos homogéneos
Urea	6,68961	X
Nitrógeno	10,4682	X

Anexo 28. Análisis de rango múltiple (Scheffe $\alpha=0,05$) de la carotenoides totales (mg/ml) de la cianobacteria *Arthrospira platensis* a diferentes salinidades.

Salinidad	Carotenoides totales (Promedio)	Grupos homogéneos
15	4,71981	X
0	12,438	X

Anexo 29. Análisis de Varianza del contenido de ficocianina (mg/ml) de la cianobacteria *Arthrospira platensis*.

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Error	Radio F	Valor P
A: Nitrato	6889,61	1	6889,61	220,53	0,0000
B: Salinidad	13133,2	1	13133,2	420,38	0,0000
INTERACCIONES					
AB	4,26608	1	4,26608	0,14	0,7182
RESIDUAL	374,899	12	31,2416		
TOTAL (Corregido)	20402,0	15			

Anexo 30. Análisis de rango múltiple (Scheffe $\alpha=0,05$) de la ficocianina (mg/ml) de la cianobacteria *Arthrospira platensis* a diferentes fuentes de nitrógeno.

Fuentes de nitrógeno	Ficocianina (Promedio)	Grupos homogéneos
Urea	82,4244	X
Nitrato	123,926	X

Anexo 31. Análisis de rango múltiple (Scheffe $\alpha=0,05$) de la ficocianina (mg/ml) de la cianobacteria *Arthrospira platensis* a diferentes salinidades.

Salinidad	ficocianina (Promedio)	Grupos homogéneos
15	74,5253	X

0	131,825	X
---	---------	---

Anexo 32. Análisis de varianza del contenido de exopolisacáridos (mg/ml) de la cianobacteria *Arthrospira platensis* a diferentes salinidades y fuentes de nitrógeno.

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Error	Radio F	Valor P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Nitrato	1,80231	1	1,80231	0,29	0,5991
B: Salinidad	6,18766	1	6,18766	1,00	0,3362
INTERACCIONES					
AB	0,3969	1	0,3969	0,06	0,8117
RESIDUAL	80,2767	12	6,68972		
TOTAL (Corregido)	88,6635	15			

Anexo 33. Análisis de rango múltiple (Scheffe $\alpha=0,05$) de exopolisacáridos (mg/ml) de la cianobacteria *Arthrospira platensis* a diferentes fuentes de nitrógeno

Fuentes de nitrógeno	Exopolisacáridos (Promedio)	Grupos homogéneos
Nitrato	20,9081	X
Urea	21,5794	X

Anexo 34. Análisis de rango múltiple (Scheffe $\alpha=0,05$) de exopolisacáridos (mg/ml) de la cianobacteria *Arthrospira platensis* a diferentes salinidades.

Salinidad	Exopolisacáridos (Promedio)	Grupos homogéneos
0	21,8656	X
15	20,6219	X

Anexo 35. Concentración (en $\mu\text{g/ml}$ y %) de clorofila *a*, carotenoides totales y ficocianina de *Arthrospira platensis* cultivada con diferentes fuentes de nitrógeno a dos salinidades.

Unidad / Fuente de nitrógeno	Clorofila <i>a</i>		Carotenoides totales		Ficocianina		
	0 UPS	15 UPS	0 UPS	15 UPS	0 UPS	15 UPS	
$\mu\text{g/ml}$	NaNO ₃	43,04	24,39	15,10	5,83	153	94,00
	Urea	34,98	23,3	9,77	3,6	110	54,00
%	NaNO ₃	1,22	0,93	0,40	0,20	4,37	3,61
	Urea	1,11	1,05	0,30	0,16	3,54	2,45

HOJAS DE METADATOS

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/6

Título	Cultivo de <i>Arthrospira platensis</i> (División Cianofita) a diferentes salinidades y fuentes de Nitrógeno como estrategia para modificar su composición Bioquímica
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Licet A., Berenice del V.	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Palabras o frases claves:

<i>Arthrospira platensis</i> , Nitrógeno, Cianofita, salinidades, Bioquímica

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/6

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Magíster Scientiarum en Ciencias Marinas	Mención Biología Marina

Resumen (abstract):

En la presente investigación se evaluó el efecto de la salinidad y la fuente de nitrógeno sobre el crecimiento y composición bioquímica de la cianobacteria *Arthrospira platensis*. Cultivos discontinuos de dicha cianobacteria se realizaron en 3l de medio Zarrouk, ensayándose dos salinidades (0 y 15 UPS) y dos fuentes de nitrógeno (nitrato de sodio y urea). Los cultivos se mantuvieron a 25°C con una intensidad luminosa de 390 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, fotoperiodo 12: 12 y aireación continua (200 ml/min) durante 20 días. El crecimiento, medido como biomasa seca, fue evaluado cada 48 horas y la composición bioquímica fue analizada al final del ensayo, determinándose para este último parámetro el contenido de pigmentos, proteínas, carbohidratos y lípidos totales, mediante técnicas espectrofotométricas. El perfil de ácidos grasos se determinó a través de cromatografía de gases-espectrometría de masas y el contenido de exopolisacáridos mediante gravimetría. Los resultados obtenidos evidenciaron que la salinidad y la fuente de nitrógeno influyeron sobre el crecimiento y la composición bioquímica de *A. platensis*, observándose que el incremento de la salinidad produjo una disminución significativa en el crecimiento de esta microalga, siendo la biomasa mayor a 0 UPS y en nitrato de sodio ($3,5 \pm 0,17 \text{ mg/ml}$). Los mayores contenidos de proteínas, carbohidratos, lípidos y pigmentos se obtuvieron en los cultivos suplementados con nitrato de sodio como fuente de nitrógeno, pero en cuanto a la salinidad, se observó que las proteínas, clorofila *a*, carotenoides y ficocianina mostraron sus mayores contenidos a 0 UPS, con valores de $57,5 \pm 4,41 \%$; $43,04 \pm 0,34 \text{ ug/ml}$; $15,1 \pm 0,76 \text{ ug/ml}$ y $153 \pm 3,8 \text{ ug/ml}$, respectivamente. Por el contrario, los carbohidratos y lípidos alcanzaron sus mayores valores ($20,9 \pm 1,35\%$ y $9,5 \pm 0,50 \%$, respectivamente) a 15 UPS. Los ácidos grasos mostraron un patrón no definido, debido a que los cultivos realizados a 15 UPS y suplementados con urea produjeron mayores concentraciones de ácidos grasos saturados ($50,04 \pm 2,32\%$) y monoinsaturados ($22,46 \pm 1,82\%$), mientras que los poliinsaturados alcanzaron también sus máximas concentraciones en urea pero a 0 UPS ($44,11 \pm 3,32\%$). El ácido palmítico (16:0) fue el que se acumuló en mayor cantidad, con contenidos que variaron entre 35,38 y 42%, observándose concentraciones equivalentes (42%) en NaNO_3 a 0 y 15 UPS y en urea a 15 UPS. Entre los monoinsaturados, el ácido oleico (18:1n9) presentó la mayor concentración ($13,21 \pm 0,71 \%$), lo cual ocurrió en los cultivos tratados con urea a 15 UPS. Con relación a los ácidos grasos poliinsaturados, el ácido gamma linolénico (18:3 n-6) fue el que más se acumuló en *A. platensis*, alcanzando concentraciones equivalentes (22%) en NaNO_3 a 0 y 15 UPS y en urea a 0 UPS. Los exopolisacáridos en esta cianobacteria mostraron diferencias no significativas en cuanto a las fuentes de nitrógeno y salinidades expuestas, llegando a producir contenidos de $21,12 \pm 1,413 \text{ mg/ml}$. Finalmente, los resultados obtenidos evidenciaron que *A. platensis* muestra variadas respuestas fisiológicas ante los cambios de salinidad y fuentes de nitrógeno, lo cual pudiera ser utilizado como una estrategia para modificar la composición bioquímica de este microorganismo, a fin de obtener productos de importancia biotecnológica y acuícola.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/6

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Prof. Miguel Guevara	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input checked="" type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año Mes día

2008	11	
------	----	--

Lenguaje: SPA _____

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/6

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
P.G- licetb.doc	Application/word

Alcance:

Espacial: _____ (Opcional)

Temporal: _____ (Opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo: Magíster Scientiarum en Educación Mención Biología Marina

Nivel Asociado con el Trabajo: Magister Scientiarum

Área de Estudio: Biología Marina

Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado: Universidad de Oriente

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/6



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
CONSEJO UNIVERSITARIO
RECTORADO

CU N° 0975

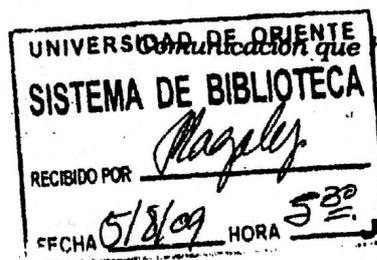
Cumaná, 04 AGO 2009

Ciudadano
Prof. JESÚS MARTÍNEZ YÉPEZ
Vicerrector Académico
Universidad de Oriente
Su Despacho

Estimado Profesor Martínez:

Cumplo en notificarle que el Consejo Universitario, en Reunión Ordinaria celebrada en Centro de Convenciones de Cantaura, los días 28 y 29 de julio de 2009, conoció el punto de agenda **"SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN PARA PUBLICAR TODA LA PRODUCCIÓN INTELECTUAL DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UDO, SEGÚN VRAC N° 696/2009"**.

Leído el oficio SIBI – 139/2009 de fecha 09-07-2009, suscrita por el Dr. Abul K. Bashirullah, Director de Bibliotecas, este Cuerpo Colegiado decidió, por unanimidad, autorizar la publicación de toda la producción intelectual de la Universidad de Oriente en el Repositorio en cuestión.



Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

JUAN A. BOLAÑOS CUMBELE
Secretario



C.C: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación de Teleinformática, Coordinación General de Postgrado.

JABC/YGC/maruja

Apartado Correos 094 / Telfs: 4008042 - 4008044 / 8008045 Telefax: 4008043 / Cumaná - Venezuela

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso- 6/6

Artículo 41 del REGLAMENTO DE TRABAJO DE PREGRADO (vigente a partir del II Semestre 2009, según comunicación CU-034-2009) : “los Trabajos de Grado son de la exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente, y sólo podrán ser utilizados para otros fines con el consentimiento del Consejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Consejo Universitario para su autorización”.

Licet A., Berenice del V.

Autor

Prof. Miguel Guevara

Asesor