

Evaluación de medios de cultivo para producción de *Arthrospira Platensis*

Alan Eduardo Navarrete-Domínguez, Lisset Soledad Tafoya-López,
Juan Carlos Rodríguez-Sierra

Instituto Politécnico Nacional,
UPIIG,
México

jurodriguez@ipn.mx

Resumen. Se ha definido a *Arthrospira platensis* como una cianobacteria filamentosa que forma tricomas cilíndricos multicelulares y forma de espiral. Se han realizado muchos estudios que se centran en el potencial que posee esta cianobacteria en diferentes campos. En este estudio se realizaron experimentos para la comparación de diferentes medios de cultivo a nivel laboratorio en tres niveles de iluminación: 24.06, 16.04 y 8.02 $\mu\text{mol/s}\cdot\text{m}^2$. El muestreo se realizó cada 24 horas, la cual fue visualizada en cámara de Neubauer, además se observó la profundidad con disco Secchi para establecer la concentración. Los datos se analizaron para obtener parámetros cinéticos. Se observó que el medio de cultivo M.E.M tuvo la mejor adaptación de *A. platensis* con valores de hasta 1.2g/L.

Palabras clave: Cianobacteria, medio de cultivo, Spirulina, *Arthrospira*.

Evaluation of Culture Media for Production from *Arthrospira Platensis*

Abstract. *Arthrospira platensis* has been defined as a filamentous cyanobacterium that forms multicellular cylindrical trichomes and a spiral shape. Many studies have been carried out that focus on the potential that this cyanobacterium has in different fields. In this study, experiments were carried out to compare different culture media at the laboratory level at three lighting levels: 24.06, 16.04 and 8.02 $\mu\text{mol/s}\cdot\text{m}^2$. Sampling was carried out every 24 hours, which was visualized in a Neubauer chamber, and the depth was also observed with a Secchi disk to establish the concentration. The data were analyzed to obtain kinetic parameters. It was observed that the M.E.M culture medium had the best adaptation of *A. platensis* with values of up to 1.2g/L.

Keywords: Cyanobacteria, culture medium, spirulina, *Arthrospira*.

1. Introducción

1.1. Cianobacterias

Las cianobacterias, también llamadas cianofitas o algas verdeazuladas, son una de las formas de vida más antiguas que existen en el planeta. Son microorganismos autótrofos, utilizan la energía de la luz solar y CO_2 de la atmósfera, para sintetizar compuestos

orgánicos. El término “*Spirulina*” o “*Espirulina*” ha sido ampliamente utilizado para referirse indistintamente a dos géneros, *Arthrospira* y *Spirulina*, así como a dos especies: *A. platensis* y *A. máxima*. Estas últimas son las que tienen mayor importancia económica, ya que son cultivadas para elaborar una gran cantidad de productos a las que se les atribuye propiedades alimenticias y de salud [1].

Algunos usos y aplicaciones de *A. platensis* son: tratamiento de aguas residuales, biomitigación de CO₂, cosmética y nutracéutica, etc. El objetivo de la investigación es la comparativa de medios de cultivo para determinar el medio más viable para producir *A. platensis*. El ciclo de vida de *A. platensis* se resume en: a) Fragmentación de los tricomas, b) ampliación de los hormogonios celulares, c) proceso de maduración y d) elongación de tricomas. Los tricomas maduros se dividen en filamentos de pequeño tamaño a través de la formación previa de células especializadas, llamados necridios [2].

1.2. Medios de cultivo para crecimiento

El medio de cultivo provee de nutrientes necesarios para el desarrollo de la cianobacteria. El primer medio sintético formulado es conocido como medio Zarrouk, siendo el más común para investigaciones a nivel laboratorio [3]. El medio UTEX, procede a ser un medio comúnmente usado [4]. Medio *Spirulina* Modificado (M.E.M) este medio fue ligeramente modificado de *Spirulina platensis* Medium de Ogawa & Terui (1970).

La *Arthrospira* puede vivir en una amplia gama de composiciones de agua, el medio de cultivo Urea, es de los medios más usados para el cultivo de *A. platensis* a gran escala [5]. Se puede observar en la tabla 1 la comparación de los medios de cultivo. La producción del medio de cultivo tiene que ser realizada con agua destilada y previamente esterilizado antes de realizar el inoculo.

2. Metodología y experimentación

Se realizó inoculo al 30% (v/v) de *A. platensis* en fase de crecimiento exponencial en cuatro medios de cultivo: Zarrouk, UTEX, M.E.M y Urea (ver tabla 1). La cepa utilizada fue la CIB 83 de la colección de microalgas del centro de investigaciones biológicas del noroeste, S.C. El volumen de cada medio de cultivo inoculado se dividió en 6 frascos de vidrio de boca ancha cubiertos tela filtrante con tamaño de poro de 80 micrómetros para permitir el intercambio gaseoso, cada frasco tiene una capacidad de 413 mL y fue utilizado un volumen de 216 mL.

Los frascos por duplicado fueron colocados en diferentes intensidades lumínicas: 24.06 $\mu\text{mol/s}\cdot\text{m}^2$, 16.04 $\mu\text{mol/s}\cdot\text{m}^2$ y 8.02 $\mu\text{mol/s}\cdot\text{m}^2$. Las lámparas led usadas fueron las JLT8-183 de 18W con una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (PPFD) de 28 $\mu\text{mol/s}\cdot\text{m}^2$. Los frascos tuvieron una agitación manual tres veces por día, la experimentación se llevó a cabo a 25°C con un fotoperiodo de 12h luz y 12h oscuridad.

Tabla 1. Comparación de componentes en medios de cultivo.

Medios de cultivo utilizados							
Zarrouk		Utex		M.E.M		Urea	
Sustancia	Concentración (g/l)	Sustancia	Concentración (g/l)	Sustancia	Concentración (g/l)	Sustancia	Concentración (g/l)
NaHCO ₃	13.61	NaHCO ₃	13.61	NaHCO ₃	13.61	Carbonato de sodio	5
Na ₂ CO ₃	1.03	Na ₂ CO ₃	4.03	Na ₂ CO ₃	4.03	Cloruro de sodio crudo	5
K ₂ HPO ₄	0.5	K ₂ HPO ₄	0.5	K ₂ HPO ₄	0.5	Nitrato de potasio	2
NaNO ₃	2.5	NaNO ₃	2.5	NaNO ₃	2.5	Bicarbonato de sodio	1
K ₂ SO ₄	1	K ₂ SO ₄	1	K ₂ SO ₄	1	Sulfato de potasio, cristalizado	1
NaCl	0.2	NaCl	1	NaCl	1	Urea	0.02
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.04	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2	Sulfato monoamónico cristalizado	0.1
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.01	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.04	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.04	Sulfato de magnesio, cristalizado	0.2
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.05	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	0.375	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01	Oxido de calcio	0.02
H ₃ BO ₃	2.86	FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.0485	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	0.08	Sulfato de hierro	0.005
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.81	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.0205				

El conteo celular se realizó en cámara de Neubauer, se utilizó los cuadros grandes para la cuantificación y se utilizó la ecuación 1 para el cálculo de densidad celular:

$$Concentraciom = \frac{\text{número de células} \times 10,000}{\text{número de cuadros} \times \text{dilución}} [=] \frac{cel}{ml} \quad (1)$$

Para la medición de la concentración se utilizó un disco Secchi. El disco de Secchi tiene escala de profundidad en milímetros y se utilizó la relación concentración (peso seco) vs profundidad de acuerdo con lo reportado por González [6].

3. Resultados y discusión

3.1. Conteo celular en cámara de Neubauer

Se realizó un promedio aritmético de las células en forma de tricomas que se presentaron durante la fase exponencial en los días 5 a 8 para las diferentes muestras y se multiplicaron por el volumen líquido del reactor para determinar la cantidad de organismos presentes en el medio de cultivo.

En la figura 1 se puede observar que el M.E.M a $8.02 \mu\text{mol/s} \cdot \text{m}^2$ fue el que mayor concentración celular obtuvo una cantidad celular máxima de 4.34×10^7 células en forma de tricomas, mientras que la menor concentración celular se obtuvo del medio Zarrouk a 24.06 y $8.02 \mu\text{mol/s} \cdot \text{m}^2$.

Arora [7] realizaron una comparativa del crecimiento de *A. platensis* en el medio Zarrouk y un medio modificado, encontraron que las mejores tasas de crecimiento se mostraron en intensidades de luz entre 35 y $57 \mu\text{mol/s} \cdot \text{m}^2$. sin embargo, no se encuentran estas condiciones en nuestra experimentación, aquí se espera que si se aumenta la intensidad lumínica se deberá de identificar crecimiento en este medio.

Por otro lado, el medio Zarrouk lo utilizaron como un medio estándar de comparación y realizaron sus cultivos en estanque abierto y en reactor cerrado, donde concluyen que el máximo crecimiento obtenido fue en el reactor cerrado con medios modificados [7]. Este comportamiento se puede observar en la figura 2, donde el M.E.M fue el medio de cultivo que obtuvo mayor crecimiento en comparación del Zarrouk.

En la figura 2 también se puede observar que *A. platensis* es capaz de adaptarse a diversos medios de cultivos en un tiempo promedio de cinco días. Se observa, que la mejor adaptación fue para el medio M.E.M con concentraciones finales de $(1.2, 1.2$ y $1)$

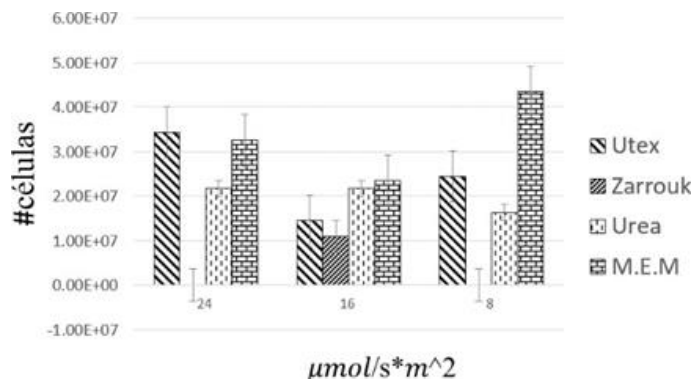


Fig. 1. Conteo celular promedio de *A. platensis*. a diferentes intensidades lumínicas en fase exponencial.

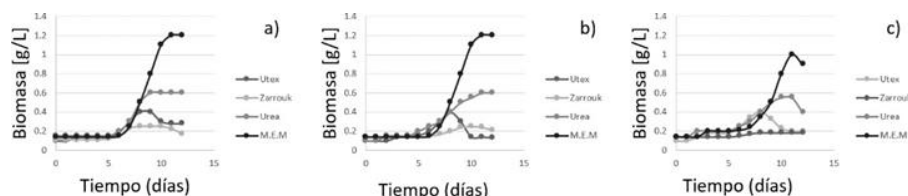


Fig. 2. Crecimiento celular de *A. platensis* a) 24.06 $\mu\text{mol/s}\cdot\text{m}^2$, b) 16.04 $\mu\text{mol/s}\cdot\text{m}^2$ y c) 8.02 $\mu\text{mol/s}\cdot\text{m}^2$.

Tabla 2. Parámetros cinéticos a diferentes intensidades lumínicas y medios de cultivo.

Iluminación $\mu\text{mol/s}\cdot\text{m}^2$	Utex			Zarrouk		
	Velocidad específica de crecimiento (μ) (d^{-1})	Tiempo de duplicación (d)	Productividad ($\text{g/L}\cdot\text{d}$)	Velocidad específica de crecimiento (μ) (d^{-1})	Tiempo de duplicación (d)	Productividad ($\text{g/L}\cdot\text{d}$)
24.06	0.3606	1.9222	0.1543	0.2629	2.6365	0.0720
16.04	0.2132	3.2512	0.0185	0.1307	5.3033	0.0509
8.02	0.1786	3.8810	0.0354	0.0697	9.9447	0.0231
Iluminación $\mu\text{mol/s}\cdot\text{m}^2$	Urea			M.E.M		
	Velocidad específica de crecimiento (μ) (d^{-1})	Tiempo de duplicación (d)	Productividad ($\text{g/L}\cdot\text{d}$)	Velocidad específica de crecimiento (μ) (d^{-1})	Tiempo de duplicación (d)	Productividad ($\text{g/L}\cdot\text{d}$)
24.06	0.3689	1.8790	0.2315	0.4578	1.5141	0.4461
16.04	0.2214	3.1307	0.2104	0.4578	1.5141	0.4461
8.02	0.2393	2.8966	0.1898	0.2942	2.3560	0.3620

g/L de biomasa seca, seguido del medio Urea, Utex y finalmente Zarrouk. Se observó que el medio de cultivo Zarrouk mostró coloración marrón, lo cual puede ser un efecto de atenuación.

Los parámetros cinéticos característicos en el crecimiento de *A. platensis* están dados por la velocidad específica de crecimiento, el tiempo de duplicación y la productividad volumétrica, como se observa en la tabla 2.

El aumento de la producción de la biomasa es proporcional a la intensidad de la luz para *A. platensis* [8]. Sin embargo, no todas las cepas de *Arthrospira* responden de la misma manera, ya que hay más variables de las que depende un óptimo crecimiento de la cepa. Por otro lado, la absorción de la iluminación decrece con el aumento de la

densidad celular durante el cultivo. Un estudio realizado por Álvarez [9] a un intervalo de 8.4 a 30 $\mu\text{mol/s}\cdot\text{m}^2$ se obtuvo un intervalo de biomasa de entre 1.10 a 2.07 g/L, siendo que durante el estudio realizado se encontraron valores de 0.4 a 1.2 g/L.

4. Conclusiones

Es posible cultivar *A. platensis* a bajos niveles de iluminación proveniente de LED's, observando que el medio de cultivo M.E.M tuvo la mejor adaptación de *A. platensis* en intervalos de 24 y 16 $\mu\text{mol/s}\cdot\text{m}^2$. Un siguiente paso para este estudio es el escalado de los medios de con mayor crecimiento para observar el comportamiento de *A. platensis* en condiciones fuera del laboratorio y determinar la viabilidad del medio de cultivo.

Referencias

1. López-Cortes, A., Maya-Delgado, L. Y., Troyo-Dieguez, E., Landa-Hernández, L.: Cianobacterias criptobiotivas: una alternativa de agricultura orgánica, México (2001)
2. Sanchez, M., Bernal-Castillo, J., Rozo, C., Rodríguez, I.: Spirulina (Arthrospira): an edible microorganism: a review. *Universitas Scientiarum*, vol. 8, no. 1, pp. 7–24 (2003)
3. Rodríguez, A., Triana, F.: Evaluación del pH en el cultivo de Spirulina spp (Arthrospira) bajo condiciones de laboratorio. Trabajo de grado para optar a micro biólogo industrial, Pontificia Universidad Javeriana Facultad de ciencias, p. 37 (2006)
4. Utex Spirulina médium. www.utex.org (2006)
5. Jourdan, J.: Grow your own Spirulina. Geneva, Switzerland, pp. 4–6 (2001)
6. Soni, R. A., Sudhakar, K., Rana, R. S.: Comparative study on the growth performance of Spirulina platensis on modifying culture media. *Energy Reports*, vol. 5, pp. 327–336 (2019) doi: 10.1016/j.egy.2019.02.009
7. Ravelonandro, P. H., Ratianarivo, D. H., Joannis- Cassan, C., Isambert, A., Raherimandimby, M.: Influence of light quality and intensity in the cultivation of Spirulina platensis from Toliara (Madagascar) in a closed system. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, vol. 83, no. 6, pp. 842–848 (2008) doi: 10.1002/jctb.1878
8. Álvarez, P.: Influencia de la luz sobre la producción y la composición de la biomasa microalgal de Spirulina platensis LMPA55. Escuela de Posgrado-Facultad Regional Buenos Aires (2018)