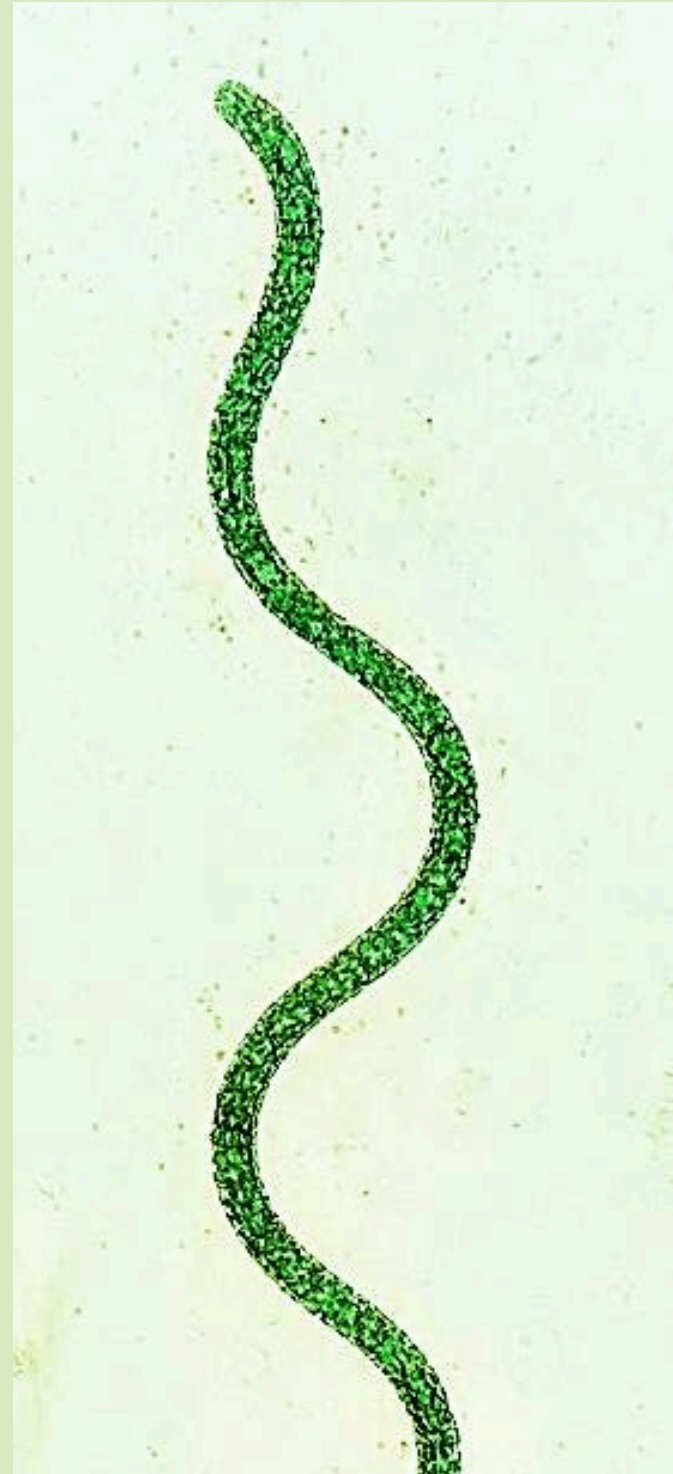


ARTHROSPIRA PLATENSIS

Juan Daniel Hernández Domínguez
Héctor Gaspar Robles
Alejandra González Rodríguez
Guadalupe Galindo Murillo
Edgar David Méndez Pérez.
Dra. Ma. Fabiola León Galván.

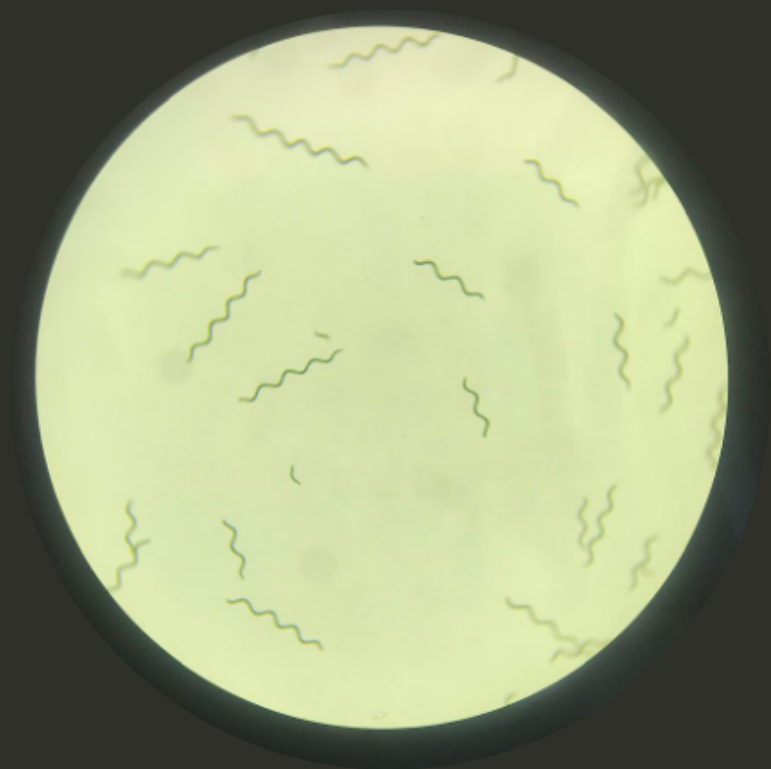


**MANUAL PARA SU CULTIVO Y
PRODUCCIÓN DE UN
BIORREACTOR**

ÍNDICE

1

- 01 *ARTHROSPIRA PLATENSIS*
- 02 CONDICIONES DE CRECIMIENTO
- 03 MÉTODO DE CULTIVO *IN VITRO*
- 04 CONDICIONES DE CRECIMIENTO
- 05 CONSIDERACIONES Y OBSERVACIONES
- 06 BIBLIOGRAFIA



ARTHROSPIRA PLATENSIS



DIRIGIDO A INVESTIGADORES Y PROFESIONALES DEL ÁMBITO BIOTECNOLÓGICO Y ALIMENTARIO, EL MANUAL ABORDA LA SELECCIÓN DE CEPAS, DISEÑO Y OPERACIÓN DEL BIORREACTOR, CONDICIONES ÓPTIMAS DE CULTIVO, Y TÉCNICAS DE COSECHA Y PROCESAMIENTO. CON UN ENFOQUE PRÁCTICO Y BASADO EN LA EXPERIENCIA SE BUSCA ESTANDARIZAR Y OPTIMIZAR EL PROCESO DE PRODUCCIÓN, FACILITANDO LA IMPLEMENTACIÓN DE LAS MEJORES PRÁCTICAS Y TECNOLOGÍAS DISPONIBLES.

ARTHROSPIRA PLATENSIS

Pertenece al reino Bacteria, filo Cyanobacteria, clase Cyanophyceae, orden Oscillatoriales, familia Microcoleaceae y genero Arthrospira.

Se caracteriza por su forma filamentosa helicoidal, con tricomas que pueden medir varios micrómetros de largo. Este organismo fototrófico es capaz de realizar fotosíntesis oxigénica similar a las plantas.

La morfología helicoidal de *A. platensis* no solo es uno de los aspectos más llamativos de este microorganismo, si no que esta estructura está conformada por células individuales que se dividen por fisión binaria. Estas células son cilíndricas y dispuestas en una estructura multicelular tricomática sin envoltura mucilagínosa.

Su color verde-azul se debe a la presencia de pigmentos como la clorofila *a* y la ficocianina y, en menor medida, carotenoides.

En cuanto a su composición nutricional, podemos destacar el alto contenido de proteínas (entre el 60 y 70% de su peso seco), que incluyen todos los aminoácidos esenciales. Las vitaminas, como las vitaminas del grupo B, especialmente la B12, vitamina E y Betacaroteno.

Incluso los minerales como Hierro, Calcio y Magnesio cumplen un rol importante dentro de las aplicaciones de *A. platensis*. Y finalmente los ácidos Grasos, como el ácido linoleico y el ácido gamma-linoleico.

CONDICIONES DE CRECIMIENTO



Arthrospira platensis se ha aislado de distintos ambientes naturales que comparten características, como la salinidad, el pH y la temperatura.

Naturalmente, *A. platensis* se ha obtenido de lagos salinos al redor del mundo, específicamente los que se encuentran cerca de los trópicos, como el Lago Natron en Tanzania, el lago Chenghai en China, el Lago de Texcoco y el Lago de Xochimilco en México, todos con la característica de la alta salinidad o pH alcalino.

Las condiciones óptimas de crecimiento de *A. platensis* son:

Temperatura: Entre 30–35 °C

pH: Alcalino, preferentemente de 8.5–10

Luz: Intensidad Luminosa de 100 a 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

CICLO DE CRECIMIENTO

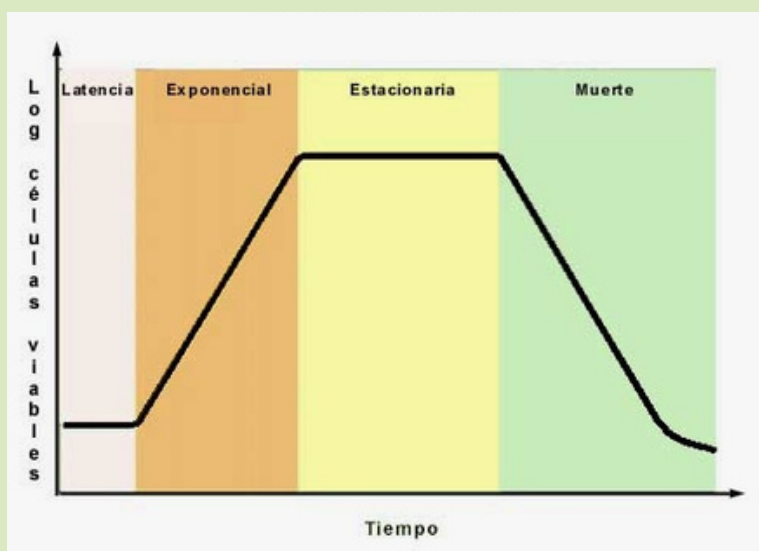
El ciclo de crecimiento de la espirulina puede dividirse en varias fases:

1. Fase de Latencia: Poco crecimiento mientras las células se adaptan al medio de cultivo.

2. Fase Exponencial: Rápido aumento en la biomasa. Es la fase más productiva.

3. Fase Estacionaria: El crecimiento se estabiliza a medida que los nutrientes se agotan o las condiciones se vuelven menos favorables.

4. Fase de Declive o Muerte: La biomasa comienza a disminuir debido a la falta de nutrientes y acumulación de desechos.



METODO DE CULTIVO IN VITRO

Para el crecimiento *in vitro* un componente fundamental es el medio de cultivo, el cual se encarga de suministrar todas las sales necesarias para el delicado desarrollo de las microalgas.



1

MEDIO ZARROUK

El primer medio de cultivo sintético, fue creado en 1966 por Zarrouk, siendo este el primer medio para el cultivo de *Spirulina*, en la actualidad este sigue siendo usado como un medio de cultivo estándar

El medio Zarrouk es una formulación específica diseñada para el cultivo de *A. platensis*. Es conocido por ser uno de los medios más eficaces para maximizar la producción de biomasa de espirulina.

2

MEDIO UTEX

El medio UTEX (University of Texas Algal Culture Collection) es una formulación estándar utilizada para el cultivo de una amplia variedad de algas. Sus componentes suelen incluir una mezcla de nutrientes que favorecen el crecimiento de diferentes especies de microalgas.

El medio UTEX se puede ajustar según las necesidades específicas de la microalga que se esté cultivando.

3

MEDIO M.E.M. (MODIFIED ERDSCHREIBER MEDIUM)

El medio M.E.M. es una versión modificada del medio Erdschreiber, diseñado para el cultivo de algas y cianobacterias, ofreciendo un ambiente nutritivo y balanceado.

Este medio modificado tiene un perfil de nutrientes similar al UTEX, adecuado para una variedad de algas y cianobacterias, proporcionando un balance de macronutrientes y micronutrientes.

ZARROUK (1 L)

COMPONENTE	FORMULA	CANTIDAD (g)
Bicarbonato de Sodio	NaHCO3	16.8
Fosfato Dipotasico	K2HPO4	0.5
Sulfato de Magnesio	MgSO4·7H2O	0.2
Sulfato Ferroso	FeSO4·7H2O	0.01
Sulfato Dipotasio	K2SO4	1.0
EDTA (Ácido Etilendiaminotetracético)	C10H16N2O8	0.08
Nitrato de Sodio	NaNO3	2.5
Cloruro de Sodio	NaCl	1.0
Cloruro de Calcio	CaCl·2H2O	0.04
Micronutrientes	Trazas	1 mL

INSTRUCTIVO Y CONSIDERACIONES

1. Inicamos con el pesaje y mezcla de todos los componentes. Previamente preparamos 700 mL de agua purificada o destilada en un Frasco Schott 1L donde se diluyen solo el bicarbonato de sodio, sulfatos y fosfatos (Así evitaremos la precipitación de las sales), a esta solución se le denominará Solución A.
2. Enviaremos esta solución (Solución A) a esterilizar en autoclave por 15 min a 121 °C con presión de 1 bar. Una vez terminado el proceso de esterilización se deja enfriar a temperatura ambiente.
3. Posteriormente, harémos la solución B en un matraz estéril de 500 mL, ésta consiste en una solución de sales (Nitrato de Sodio, Cloruros de Calcio y Sodio y EDTA) que se pesarán y diluirán en 300 mL de agua purificada o destilada y se agrega 1 mL/L de Micronutrientes especiales para *Arthrospira platensis*.
4. El método de esterilización será por luz UV y se dejará en campana de flujo laminar con Luz UV sin aireación de campana por 20 min. Ambas soluciones se esterilizarán por este método por lo que pueden mezclarse antes o despues de pasar por luz UV.
5. Para su almacenamiento, puede mantenerse apto para su uso según las condiciones de esterilidad que se tomen.

UTEX (1 L)

COMPONENTE	FORMULA	CANTIDAD (g)
Bicarbonato de Sodio	NaHCO ₃	2.0
Fosfato Dipotasico	K ₂ HPO ₄	1.25
Sulfato de Magnesio	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.75
Sulfato Ferroso	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01
Sulfato Dipotasico	K ₂ SO ₄	1.0
EDTA (Ácido Etilendiaminotetracético)	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈	0.08
Nitrato de Sodio	NaNO ₃	1.5
Ácido Bórico	H ₃ BO ₃	0.01

INSTRUCTIVO Y CONSIDERACIONES

1. En un frasco Schott de 1 L, se añade aproximadamente 800 mL de agua purificada o desionizada. Se agrega el Bicarbonato hasta disolver por completo y se agregan cada uno de los componentes que se enlistan en la tabla superior. Puede usarse un agitador magnético o una varilla de vidrio para agitar manualmente.
2. Ajustaremos el pH de la solución, pues el medio UTEX generalmente debe tener un pH de 7.0 y 8.0. Usando Ácido Clorhídrico (HCl) o Hidróxido de Sodio (NaOH) según sea necesario.
3. Una vez disueltos los compuestos y ajustado el pH, se completa el volumen hasta 1L con agua destilada o purificada.
4. El medio debe ser esterilizado para evitar contaminación. Esto se puede hacer llevándolo a autoclave a 121 °C durante 15- 20 min a 1 bar de presión. Alternativamente, si se utilizan componentes sensibles al calor, se puede esterilizar por filtración utilizando filtros de 0.22 µm.
5. Una vez esterilizado, se deja enfriar a temperatura ambiente y se almacena en frascos estériles. El medio puede almacenarse en refrigeración o a temperatura ambiente, dependiendo de la duración de almacenamiento y los componentes específicos.

M.E.M. (MODIFIED ERDSCHREIBER MEDIUM) (1 L)

COMPONENTE	FORMULA	CANTIDAD (g)
Bicarbonato de Sodio	NaHCO_3	2.0
Fosfato Dipotasico	K_2HPO_4	0.5
Sulfato de Magnesio	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2
Sulfato Ferroso	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.01
Cloruro de Calcio	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.02
EDTA (Ácido Etilendiaminotetracético)	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$	0.08
Nitrato de Sodio	NaNO_3	2.5
Ácido Bórico	H_3BO_3	0.01
Cloruro de Sodio	NaCl	1.0
Micronutrientes	Trazas	1 mL

INSTRUCTIVO Y CONSIDERACIONES

1. En un frasco Schott de 1 L, se añade aproximadamente 800 mL de agua purificada o desionizada. Se agrega el Bicarbonato hasta disolver por completo y se agregan cada uno de los componentes que se enlistan en la tabla superior. Puede usarse un agitador magnético o una varilla de vidrio para agitar manualmente.

2. Ajustaremos el pH de la solución, pues el medio M.E.M. generalmente debe tener un pH de 7.0 y 8.0. Usando Ácido Clorhídrico (HCl) o Hidroxido de Sodio (NaOH) según sea necesario.

3. Una vez disueltos los compuestos y ajustado el pH, se completa el volumen hasta 1L con agua destilada o purificada

4. El medio debe ser esterilizado para evitar contaminación. Esto se puede hacer llevandolo a autoclave a 121 °C durante 15- 20 min a 1 bar de presión. Alternativamente, si se utilizan componentes sensibles al calor, se puede esterilizar por filtración utilizando filtros de 0.22 µm.

5. Una vez esterilizado, se deja enfriar a temperatura ambiente y se almacena en frascos estériles. El medio puede almacenarse en refrigeración o a temperatura ambiente, dependiendo de la duración de almacenamiento y los componentes específicos.

MICRONUTRIENTES PARA ZARROUK (10 mL)

COMPONENTE	FORMULA	CANTIDAD (g)
Ácido Bórico	H ₃ BO ₃	0.0286
Cloruro de Manganeso	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.0181
Sulfato de Zinc	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.00222
Molibdato de Sodio	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.0039
Sulfato de Cobre	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.00079
Nitrato de Cobalto	Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0.00049

MICRONUTRIENTES PARA M.E.M. (10 mL)

COMPONENTE	FORMULA	CANTIDAD (g)
Molibdato de Sodio	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.01
Sulfato de Zinc	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.05
Sulfato de Cobre	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.005
Cloruro de Manganeso	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.1
Cloruro de Cobalto	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.005

La formulación de los micronutrientes fue diseñada para preparar 10 mL de Solución total y que las cantidades de componentes sean mayores, así se minimizan los errores al pesar.

La cantidad necesaria de micronutrientes es de 1 mL por litro de medio, según sea el requerimiento.

Nota: Al finalizar de diluir los componentes en agua destilada o purificada, se llevan a esterilizar en luz UV por 20 min o se pasa por filtros de 0.22 µm.

CONDICIONES DE CRECIMIENTO

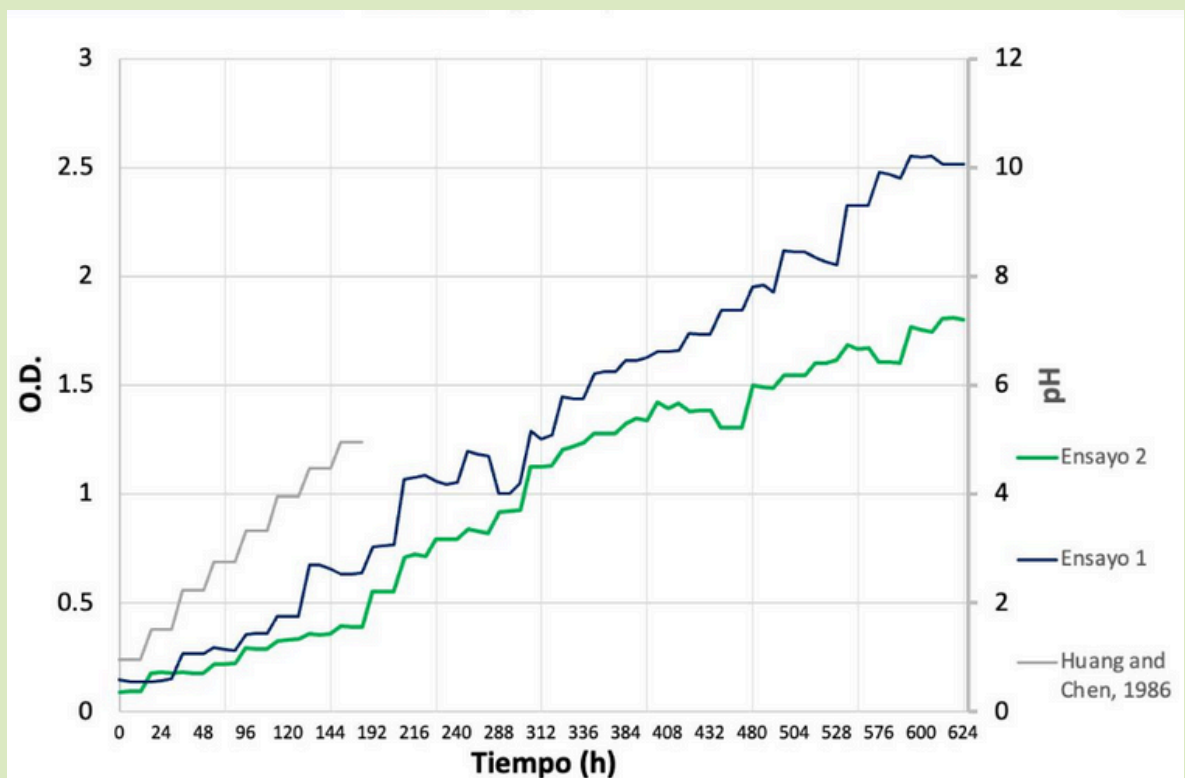
VARIACIONES EN LAS CONDICIONES DE CRECIMIENTO

La bibliografía nos dice que, *Arthrospira platensis* depende de gran manera de la luz bajo la que se desarrolla, así como los nutrientes y el medio en el que esté.

Según se desee, *A. platensis* desarrollará cualidades específicas con las variaciones de luz, como la producción de proteínas, ácidos grasos o pigmentos como la clorofila, sin embargo, ésta puede afectar colateralmente factores de crecimiento.

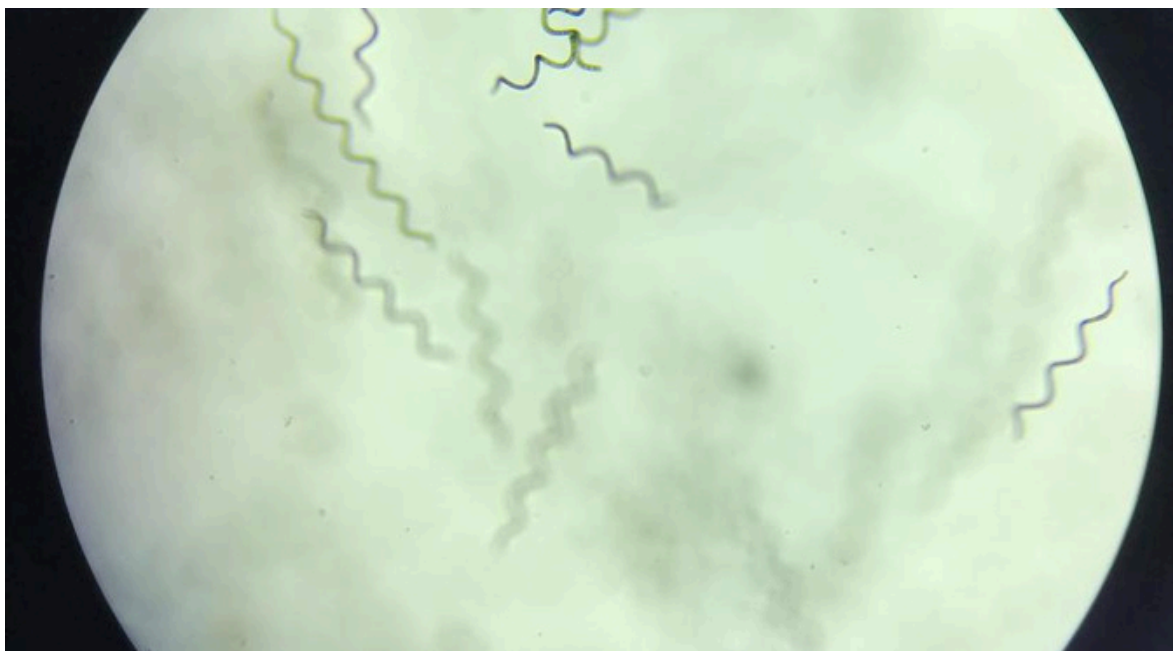
Para el correcto cálculo de la velocidad de crecimiento de *Arthrospira platensis* se debe tomar la Absorbancia en un Espectrofotómetro de Luz UV visible usando como cero medio Zarrouk.

CINÉTICA DE CRECIMIENTO



CONSIDERACIONES Y OBSERVACIONES

¿QUÉ PODEMOS HACER PARA
MEJORAR ESTE PROCESO?



ACCIONES QUE HAY QUE EVITAR

Arthrospira platensis al igual que otras cianobacterias, es muy fácil de contaminar, por lo que los cultivos de espirulina deben ser monitoreados constantemente y deben ser manipulados correctamente, cuidando medidas de higiene y esterilidad.

El medio donde se desarrolle *A. platensis* favorecerá al crecimiento de otros microorganismos. En el caso del medio Zarrouk, a pesar de ser un medio altamente alcalino, tiene la capacidad de albergar otras algas, bacterias, protozoarios y cianobacterias que toleren condiciones alcalinas ricas en nutrientes, así como las bacterias alcalófilas y protozoarios que pudieran desarrollarse en este medio.

PROTOZOARIOS Y BACTERIAS QUE PUEDEN VIVIR EN EL MEDIO ZARROUK

PROTOZOARIOS:

- **Amoebas de Vida Libre:** Algunas amebas, como *Acantamoeba spp.* y *Naegleria fowleri*, pueden tolerar un amplio rango de pH, incluyendo condiciones alcalinas.
- **Euglena:** Algunas especies de *Euglena*, que son protozoarios flagelados, pueden adaptarse a diferentes condiciones ambientales, incluyendo medios alcalinos y ricos en nutrientes.
- **Ciliados:** Algunos ciliados, como *Tetrahymena*, tienen una notable capacidad de adaptación a diferentes ambientes y podrían sobrevivir en condiciones alcalinas.

¿CÓMO COMBATIR OTROS MICROORGANISMOS?

BACTERIAS:

- ***Bacillus spp.***: Es un género de bacterias Gram-positivas, aerobias o facultativamente anaerobias, con capacidad de formar esporas. Muchas de estas especies pueden tolerar condiciones alcalinas, como ***Bacillus subtilis*** o ***Bacillus cereus***.
- ***Pseudomonas spp.***: Es un género de bacterias Gram-negativas aerobias con gran versatilidad metabólica, por lo que la proliferación en medios alcalinos no es sorpresa. *Pseudomonas* que pueden crecer en medios alcalinos son ***Pseudomonas aeruginosa*** y ***Pseudomonas fluorescens***.
- ***Anabaena spp.***: Son cianobacterias filamentosas, conocida por su capacidad de fijar nitrógeno. Pueden desarrollarse junto a *Arthrospira platensis* o generar competencia por el medio. Algunas son ***Anabaena variabilis*** y ***Anabaena flos-aquae***.
- ***Nostoc spp.***: Es otro género de cianobacterias filamentosas, también conocidas por su capacidad de fijar nitrógeno. Similar a *Anabaena*, *Nostoc* puede crecer en medios alcalinos y realizar fotosíntesis. Algunos ejemplos son: ***Nostoc commune*** y ***Nostoc muscorum***.

Combatir una infección bacteriana en un cultivo de *Arthrospira platensis* puede ser desafiante debido a la necesidad de eliminar los organismos no deseados sin afectar el crecimiento de *Spirulina*. Algunas estrategias son:

ESTRATEGIAS NO QUIMICAS:

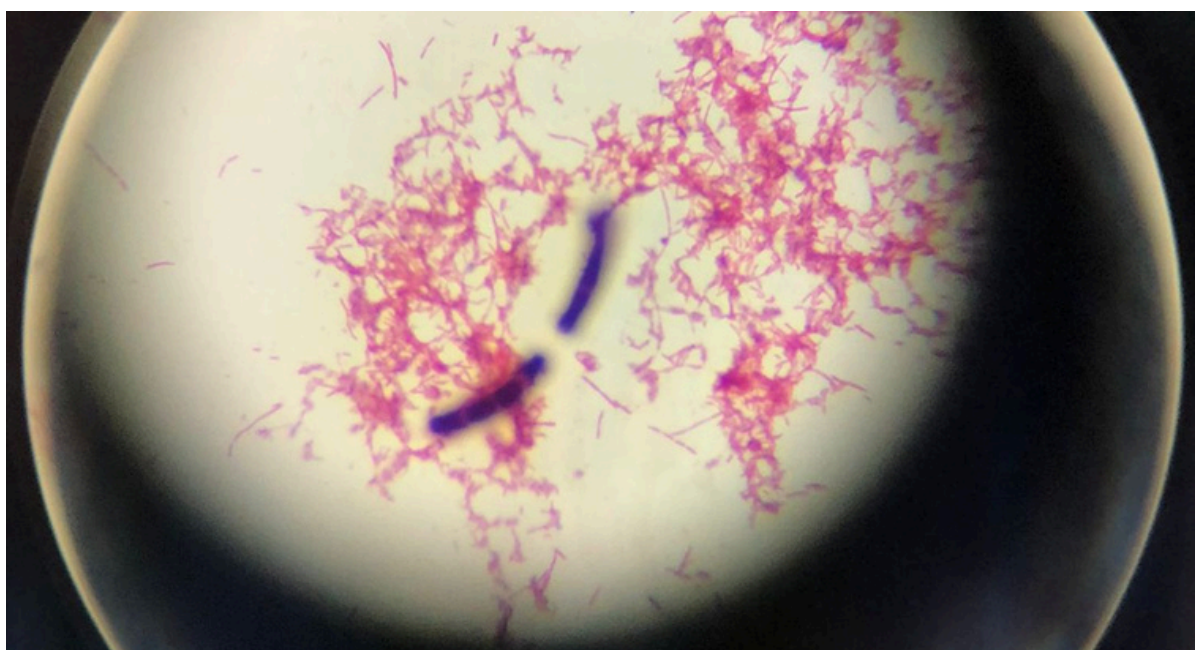
1. **Ajuste de pH**: *A. platensis* prospera en condiciones altamente alcalinas, por lo que ajustar el pH entre 10 y 11 puede inhibir el crecimiento de muchas bacterias y protozoarios.
2. **Filtración**: Utilizar métodos de filtración para eliminar organismos no deseados del medio sin dañar las células de *Spirulina*.

ANTIBIÓTICOS:

El uso de antibióticos debe ser muy cuidadoso debido a los riesgos de afectar a *A. platensis* y de desarrollar resistencia en las bacterias. No existe un antibiótico capaz de eliminar tanto bacterias como protozoarios sin afectar potencialmente a *A. platensis*.

Algunos antibióticos pueden ser **considerados bajo estricta supervisión y después de pruebas preliminares**:

1. **Penicilina y Estreptomicina**: Estas combinaciones de antibióticos se utilizan comúnmente para eliminar bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. *A. platensis* generalmente es resistente a la penicilina pero puede ser afectada por la estreptomicina.
2. **Ciprofloxacina**: Es un antibiótico de amplio espectro que puede ser efectivo contra bacterias Gram-negativas y algunos protozoarios, sin embargo, también puede afectar a *A. platensis*.



BIBLIOGRAFIA

Cultivo de *Arthrospira platensis*

- J. Masojídek; G. Torzillo (2008). Mass cultivation of Freshwater . Enciclopedia of Ecology. Elsevier. pp. 226-235.

Evaluación de Medios de Cultivo

- Alan Eduardo Navarrete-Dominguez, Lisset Soledad Tafoya-López, Juan Carlos Rodriguez Sierra. (2024). Evaluación de medios de cultivo para producción de *Arthrospira platensis*. Research in Computing Science, 153 (2), 23-27. <https://doi.org/ISSN1870-4069>

Monitoreo de crecimiento de *Arthrospira platensis*

- Aung, U. S. T. (2020) Study on the effect for the growth rate of *Spirulina*, *Arthrospira platensis* in natural seawater. IOP conference Series: Earth and Environmental Science.

Control de infecciones en cultivos de microalgas

- Vonshak, A. (1997). *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, Cell-Biology and Biotechnology*. CRC Press.

Efecto de los antibióticos en microalgas

- Richmond, A. (Ed.). (2004). *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Wiley-Blackwell.

Tolerancia de *Arthrospira platensis* a diferentes antibióticos

- Qureshi, M., & Abidi, S. H. (1996). "Antibiotic susceptibility of *Spirulina platensis*." *Biotechnology Letters*, 18(11), 1287-1290.

Métodos de control de contaminantes en cultivos de microalgas

- Becker, E. W. (2013). *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. Cambridge University Press.

Efectos de antibióticos específicos en cultivos de *Spirulina*

- Zavrel, T., Faizi, M., Loureiro, C., Poschmann, G., Stühler, K., & Sinetova, M. (2019). "Quantitative insights into the cyanobacterial cell culture machinery under environmentally relevant conditions." *Journal of Proteomics*, 198, 1-12.

Diseño de Biorreactor

- Huarachi-Olivera, Ronald, Yapó-Pari, Úrsulo, Dueñas-Gonza, Alex, Condori-Huamanga, José, Pacheco-Salazar, D.G., & Soto-Flores, Joe. (2015). Cultivo de *Arthrospira platensis* (*Spirulina*) en fotobiorreactor tubular doblemente curvado a condiciones ambientales en el sur del Perú. Revista Colombiana de Biotecnología, 17 (1), 141-148. Epub July 14, 2012. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v17n1.50679>

CONTÁCTANOS

Est. Lic. Q.F.B. Juan Daniel Hernandez Dominguez
Correo: danielhdzcontacto@gmail.com

Dra. Ma. Fabiola León Galvan
Correo: fabiola@ugto.mx