



**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
Y OCEANOGRÁFICAS**



**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE ACLIMATACIÓN DE CEPAS DE
CIANOBACTERIAS DE AGUA DULCE A AGUA DE MAR**

Daniela Paz Belén Chamorro Negrón

Seminario de Título presentado al
DEPARTAMENTO DE OCEANOGRAFÍA
DE LA UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN

Para optar al título de
BIÓLOGA MARINA

Concepción - Chile

2025

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
DEPARTAMENTO DE OCEANOGRAFÍA

Este Seminario de Título ha sido realizado en FICOLAB, Grupo de Investigación Microalgal del Departamento de Botánica de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas de la Universidad de Concepción.

Directora de Tesis

Dra. Patricia Gómez Vergara

Profesora Patrocinante

Dra. Alejandra Llanos

Ha sido aprobada
por la Siguiente
Comisión
Evaluadora

Dr. Pablo Castro

Dr. Enrique Ostria

Jefe de Carrera

Dr. Ariel Valenzuela Saldías

*A mis abuelos, los grandes pilares de este recorrido académico.
Su cariño, valores y perseverancia son el impulso permanente que
inspira mi deseo de comprender y descubrir el mundo.*

Gracias.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer de corazón a la Dra. Patricia Gómez, cuya infinita paciencia y amabilidad hicieron de cada encuentro un espacio inspirador. Sus ánimos y consejos siempre estuvieron orientados a motivarme. Bajo su guía, entendí que, aunque la ciencia exige rigurosidad, también puede abordarse con serenidad. Aprendí a afrontar cada experimento con confianza, convirtiéndolos en desafíos que me emocionaban más con cada resultado. Gracias por tomarse siempre el tiempo de explicar y enseñarme, desde lo más pequeño hasta lo más complejo, haciendo de este proceso una experiencia gratificante en la que mi conocimiento creció gracias a su sabiduría, observaciones y constante apoyo.

También extiendo mi agradecimiento al equipo de FICOLAB por haberme recibido. Sobre todo, a Sandra, a la profesora Ana Silvia y a Edwards: gracias por su dedicación y amabilidad al compartir sus conocimientos y habilidades durante cada práctica de laboratorio. Su apoyo técnico constante fortaleció mi trabajo metodológico y, sobre todo, me hizo sentir cómoda y respaldada en cada etapa.

A mis padres, les debo un profundo agradecimiento por su amor incondicional. Sus consejos, siempre acertados, fueron el cimiento que sostuvo cada uno de mis pasos. Gracias por confiar en mí y por brindarme el respaldo emocional y práctico en los momentos más complejos.

A mi pareja, por ser un respiro durante las largas jornadas de trabajo: gracias por las palabras de aliento, por comprender mis horarios y por celebrar cada pequeño logro como si fuera propio. Tu motivación diaria me llenó de determinación los días de duda y me recordó la razón de mi elección profesional.

Finalmente, a mi grupo de amigos, gracias por compartir desvelos frente al computador, por esas conversaciones sin sentido que ayudaban a despejar la mente con risas y por convertir cada hito alcanzado en una celebración colectiva. Su complicidad y buena onda hicieron de este trayecto académico una experiencia entretenida que pudimos finalizar en conjunto.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	7
ÍNDICE DE TABLAS.....	8
ÍNDICE DE ANEXOS.....	9
RESUMEN.....	10
ABSTRACT.....	11
INTRODUCCIÓN.....	12
HIPÓTESIS.....	21
OBJETIVOS.....	22
Objetivo General.....	22
Objetivos Específicos.....	22
MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
1.- Material biológico.....	23
2.- Condiciones de cultivo.....	23
3.- Aclimatación a la salinidad del agua de mar (35 PSU).....	23
4.- Cultivo de cepas en la salinidad seleccionada.....	24
5.- Análisis de crecimiento.....	25
5.1.- Cuantificación de clorofila <i>a</i> :.....	25
5.3.- Peso seco:.....	27
6.- Cosecha de la biomasa.....	28
7.- Análisis bioquímicos.....	28
7.1.- Análisis de clorofila <i>a</i> y carotenoides:.....	28
7.2.- Análisis de pigmentos ficobilínicos:.....	29
7.3.- Análisis de proteínas:.....	30
7.4.- Análisis de carbohidratos totales:.....	31

7.5.- Análisis de fenoles totales.....	32
8.- Análisis estadístico.....	33
RESULTADOS.....	34
DISCUSIÓN.....	54
CONCLUSIONES	61
REFERENCIAS	63
ANEXO	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Cultivos de <i>Spirulina subsalsa</i> en periodo de aclimatación	35
Figura 2.- Cultivos de <i>Arthrospira maxima</i> en periodo de aclimatación	35
Figura 3.- Cultivos de <i>S. subsalsa</i> con sus réplicas	36
Figura 4.- Cultivos de <i>A. maxima</i> con sus réplicas	37
Figura 5.- Curvas de crecimiento comparadas entre tratamientos por cepa.....	38
Figura 6.- Cosecha de los cultivos Control (Medio Zarrouk) de <i>Arthrospira maxima</i>	41
Figura 7.- Biomasa seca de <i>Spirulina subsalsa</i>	41
Figura 8.- Biomasa seca de <i>Arthrospira maxima</i>	41
Figura 9.- Imágenes de microscopía óptica de la cepa <i>Spirulina subsalsa</i>	43
Figura 10.- Imágenes de microscopía óptica de <i>Arthrospira maxima</i>	43
Figura 11.- Contenido de clorofila <i>a</i> y carotenoides totales por biomasa seca (µg/g) obtenido para cada cepa en los tres tratamientos	45
Figura 12.- Pigmentos ficobilínicos por biomasa seca (µg/g).....	47
Figura 13.- Proteínas totales por biomasa seca (mg/g)	49
Figura 14.- Carbohidratos totales por biomasa seca (mg/g)	51
Figura 15.- Fenoles totales por biomasa seca (mg/g).....	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Parámetros de crecimiento por cepa	39
--	----

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Composición de medio Zarrouk (1966) modificado 76

Anexo 2: Cantidad de Nitrato y Fosfato presentes en el agua de mar utilizada.76

RESUMEN

El cultivo masivo de cianobacterias como *Spirulina* y *Arthrospira* en agua dulce implica un alto consumo hídrico, lo que representa un desafío para la sostenibilidad frente a un recurso limitante como es el agua dulce. Este trabajo tuvo como objetivo evaluar si dos cepas de agua dulce: *Spirulina subsalsa* (CCM-UdeC 050) y *Arthrospira maxima* (CCM-UdeC 040), pueden aclimatarse a crecer en agua de mar sin perjudicar su producción de biomasa y/o su perfil bioquímico.

Ambas cepas se aclimataron gradualmente a concentraciones crecientes de NaCl, una vez determinada la concentración máxima tolerada por cada cepa, se evaluó su cultivo utilizando agua de mar diluida a la respectiva salinidad. Se establecieron cultivos de los distintos tratamientos (Medio Zarrouk, Medio Zarrouk + NaCl y Medio Zarrouk en agua de mar) en volúmenes de 1L y se mantuvieron en condiciones controladas. Se evaluaron parámetros de crecimiento y composición bioquímica (clorofila *a*, carotenoides totales, pigmentos ficobilínicos, proteínas, carbohidratos y fenoles totales) de ambas cepas en los tres tratamientos.

Los resultados mostraron que ambas cepas fueron capaces de aclimatarse hasta 15 PSU, aunque con respuestas fisiológicas contrastantes. *Arthrospira maxima* presentó un mejor rendimiento en agua de mar, manteniendo su producción de biomasa y perfil bioquímico; en cambio, *Spirulina subsalsa* mostró una disminución en su crecimiento y composición bioquímica en agua de mar, pero un mejor desempeño en NaCl.

Este estudio aporta evidencia relevante para el desarrollo de sistemas de cultivo sustentables de cianobacterias de agua dulce en medios salinos, facilitando el uso de agua de mar en la producción de biomasa y compuestos de interés biotecnológico.

ABSTRACT

Large-scale cultivation of cyanobacteria such as *Spirulina* and *Arthrospira* in freshwater requires high water consumption, which represents a challenge for sustainability given the limited resource that is freshwater. The aim of this work was to evaluate whether two freshwater strains: *Spirulina subsalsa* (CCM-UdeC 050) and *Arthrospira maxima* (CCM-UdeC 040), can be acclimated to grow in seawater without compromising their biomass production and/or biochemical profile.

Both strains were gradually acclimated to increasing NaCl concentrations. Once each strain's maximum tolerated concentration was determined, cultures were set up using seawater diluted to the corresponding salinity. Three treatments were established in 1 L volumes under controlled conditions: Zarrouk medium, Zarrouk medium with added NaCl, and Zarrouk medium prepared in seawater. Growth parameters and biochemical composition (chlorophyll a, total carotenoids, phycobilin pigments, proteins, carbohydrates, and total phenols) were assessed for both strains under all treatments.

The results showed that both strains could acclimate up to 15 PSU, albeit with contrasting physiological responses. *Arthrospira maxima* performed better in seawater, maintaining its biomass production and biochemical profile. In contrast, *Spirulina subsalsa* experienced reduced growth and biochemical composition in seawater, although it showed improved performance under NaCl stress.

This study provides important evidence for developing sustainable cultivation systems of freshwater cyanobacteria in saline media, facilitating the use of seawater for biomass production and the recovery of biotechnologically valuable compounds.

INTRODUCCIÓN

Las cianobacterias, comúnmente conocidas como algas verde azules, comprenden un gran grupo de procariontes capaces de realizar fotosíntesis oxigénica. Hasta la fecha, se han descrito aproximadamente 6.000 especies (Algaebase, 2024); las cuales presentan una diversidad morfológica que incluye microorganismos filamentosos (Whitton & Potts, 2012); que destacan por su notable capacidad de adaptación a una amplia gama de ambientes, incluidos aquellos con condiciones extremas (Mata *et al.*, 2010; Lim & Schenk, 2017).

Dentro de las cianobacterias filamentosas se encuentra el género *Arthrospira*, comúnmente conocido como *Spirulina*. En una amplia revisión realizada por Vonshak, (2002); la historia taxonómica de *Spirulina* y *Arthrospira* comenzó con la descripción inicial de *Spirulina* por Turpin en 1829 y de *Arthrospira* por Stizenberger en 1852. Posteriormente, Geitler, (1932) unificó ambos géneros bajo el nombre de *Spirulina* debido a la morfología del tricoma helicoidal similar en ambos, sin embargo, en 1989, se reconoció nuevamente a *Arthrospira* como un género válido, diferenciándolo de *Spirulina* por la presencia de septos en los tricomas de *Arthrospira* y su ausencia en *Spirulina*, observación que había realizado previamente Stizenberger (Vonshak & Tomaselli, 2006). Estudios genéticos como el de Baurain *et al.*, 2002; que analizaron las secuencias de los espaciadores ribosomales internos transcritos (ITS) y de Sinetova *et al.*, 2024; que clasificó a las especies de “*Spirulina*” en tres géneros distintos (*Spirulina*, *Arthrospira* y *Limnospira*), han confirmado la separación sugerida por observaciones morfológicas. De este modo, se estableció la distinción entre ambos géneros, ubicando a *Spirulina* dentro del orden Spirulinales y a *Arthrospira* dentro del orden Oscillatoriales.

Esta diferenciación es crucial para aplicaciones comerciales, ya que cepas del género *Arthrospira* (comúnmente nombradas como “*Spirulina*”), están entre las cianobacterias más cultivadas a nivel mundial gracias a su facilidad de cultivo y

a su uso como alimento o para la producción de nutraceuticos (Mitra & Mishra, 2019). Estas especies producen una serie de metabolitos y enzimas de gran interés como compuestos fotoprotectores, antioxidantes, anticancerígenos, antiinflamatorios, antibacterianos, antivirales y antifúngicos; los cuales corresponden principalmente a ficobiliproteínas, compuestos fenólicos y flavonoides (Sinha & Häder, 2008; Carpine & Sieber, 2021; Furmaniak *et al.*, 2017; Jaki *et al.*, 2000; Vijayakumar & Menakha, 2015). Además, en la biotecnología, *Arthrospira* destaca por sus múltiples aplicaciones en la industria farmacéutica y nutraceutica al ser una fuente rica en proteínas, aminoácidos, vitaminas, minerales y otros compuestos con interesantes propiedades terapéuticas como el pigmento ficocianina (Ramírez-Moreno & Olvera-Ramírez, 2006; Furmaniak *et al.*, 2017).

Spirulina también destaca por su gran potencial biotecnológico, respaldado, por ejemplo, por su elevada capacidad antioxidante y antiinflamatoria, revelada en estudios que han explorado el potencial de cepas de cianobacterias distintas a *Arthrospira* (Gómez *et al.*, 2023).

La ficocianina, una ficobiliproteína distintiva de las cianobacterias, juega un papel crucial en la fotosíntesis y confiere el característico color verde-azulado a estas algas. Este pigmento ha ganado popularidad como colorante natural e ingrediente nutricional, pero su valor más significativo reside en su potencial uso farmacéutico, debido a sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, hepatoprotectoras, inmunomoduladoras y anticancerígenas (Prabakaran *et al.*, 2020; Romay *et al.*, 2003).

Los avances tecnológicos han facilitado el desarrollo de sistemas de cultivo masivo para maximizar la producción de biomasa de cianobacterias y microalgas eucariontes. Entre los métodos implementados se encuentran los sistemas abiertos, que ofrecen una solución económica y escalable, aunque con un control limitado sobre las variables ambientales y una mayor susceptibilidad a la contaminación. Por otro lado, los fotobiorreactores (FBRs) cerrados permiten

mantener condiciones ambientales estables, como la temperatura, el pH y la concentración de nutrientes, lo que requiere una mayor inversión inicial, pero ofrece un control más riguroso (Novoveská *et al.*, 2019).

Un desafío crítico para la expansión y sostenibilidad de los cultivos de especies de agua dulce como *Arthrospira*, tanto en fotobiorreactores (FBRs) como en sistemas abiertos, es la dependencia del agua dulce, debido a que ésta constituye el medio esencial para el crecimiento y desarrollo de muchas microalgas de importancia comercial (Hernández-Pérez & Labbé, 2014). Se estima que para producir un kilogramo de biomasa seca se necesita aproximadamente una tonelada de agua dulce (Liu *et al.*, 2016).

La escasez de agua dulce, exacerbada por la crisis climática, está intensificando la inseguridad hídrica a nivel global, afectando tanto la disponibilidad como la calidad de este recurso vital. Según Naciones Unidas, (2021), el agua es esencial para la vida en la Tierra, pero su disponibilidad se ve amenazada por factores como el crecimiento poblacional, la contaminación y el cambio climático. A nivel nacional, la agricultura es el sector que más agua consume, representando aproximadamente el 73% del uso total del agua dulce (ODEPA, 2022). Esta intensa demanda genera conflictos por el acceso al agua entre agricultores, comunidades locales y empresas, lo que a su vez agrava las tensiones relacionadas con la gestión de este recurso indispensable.

Ante la creciente necesidad de conservar el agua dulce, la investigación científica se ha enfocado en la búsqueda de alternativas sostenibles para el cultivo masivo de cianobacterias dulceacuícolas con relevancia comercial (Oliveira *et al.*, 2022). Se ha explorado una variedad de estrategias innovadoras que buscan reducir la dependencia del agua dulce en la acuicultura de microalgas, abriendo el camino hacia prácticas más eficientes y respetuosas con el medio ambiente. Entre las opciones disponibles está el uso de agua salobre o de mar, lo cual se basa en la selección de especies con alta tolerancia a la salinidad, las cuales podrían tener menor dependencia de los recursos de agua dulce para su producción masiva.

Esta alternativa no se limita únicamente a especies halotolerantes, sino que también aprovecha la notable capacidad de aclimatación de las cianobacterias a distintos entornos.

A pesar de que el cultivo masivo de *Arthrospira* en agua dulce ha sido optimizado para maximizar la producción de biomasa, este género exhibe una notable plasticidad que le permite crecer en diversas condiciones ambientales tales como medios salobres y marinos. Una versatilidad que abre la posibilidad de utilizar como alternativa una transición del cultivo desde agua dulce hasta agua de mar, lo que podría favorecer la costo-efectividad de su producción de biomasa (Zeng & Vonshak, 1998).

La salinidad es un factor ambiental complejo que afecta profundamente el crecimiento y metabolismo de las cianobacterias y microalgas eucariontes, desencadenando respuestas fisiológicas y bioquímicas para mitigar el estrés iónico, osmótico y oxidativo (Ismail *et al.*, 2018). Este estrés puede inhibir la producción de biomasa y alterar la síntesis de proteínas y pigmentos fotosintéticos, además de generar especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden dañar estructuras celulares esenciales (Paliwal *et al.*, 2017; Qiao *et al.*, 2021).

Para contrarrestar estos efectos, las cianobacterias han desarrollado mecanismos de protección al estrés salino. Entre estos se encuentra la regulación del equilibrio iónico intracelular mediante proteínas de transporte activo de membrana, como anti-transportadores Na^+/H^+ . Este mecanismo, también conocido como Salt in/Salt out (SISO), intercambia iones de sodio (Na^+) por iones de hidrógeno (H^+), expulsando el sodio fuera de la célula y manteniendo el equilibrio iónico (Blanco-Rivero *et al.*, 2005; Fukaya *et al.*, 2009; Tsunekawa *et al.*, 2009).

Otra estrategia para enfrentar el estrés salino es la acumulación de solutos compatibles. Estas son moléculas orgánicas que no interfieren con los procesos celulares normales y ayudan a equilibrar la presión osmótica dentro de la célula,

sin afectar negativamente su funcionamiento. En el grupo de las cianobacterias se ha encontrado que cepas con baja tolerancia a la sal generalmente acumulan sacarosa o trehalosa, mientras que las cepas con tolerancia moderada acumulan glucosilglicerol (GG) y las cepas altamente halotolerantes sintetizan glicina betaína (GB) (Hagemann, 2013; Kirsch *et al.*, 2019; Pade *et al.*, 2016).

A nivel estructural, la aclimatación a la salinidad incluye modificaciones en la composición de membranas celulares y en la acumulación de compuestos antioxidantes que protegen la integridad celular. Este mecanismo implica el incremento de lípidos y ácidos grasos insaturados para mantener la fluidez y funcionalidad de las membranas bajo condiciones adversas (Verma *et al.*, 2019). Paralelamente, los pigmentos como los carotenoides y los compuestos fenólicos desempeñan un papel crucial en la mitigación del estrés oxidativo. Los carotenoides no sólo estabilizan las membranas celulares, sino que también neutralizan las especies reactivas de oxígeno (ROS), previniendo el daño oxidativo (Qiao *et al.*, 2021; Singh *et al.*, 2022). Del mismo modo, la síntesis de compuestos fenólicos se intensifica en respuesta al estrés oxidativo, contribuyendo significativamente a la actividad antioxidante de las células (Ijaz & Hasnain, 2016).

La acumulación de carotenoides refuerza la capacidad de las cianobacterias y microalgas para mitigar la acción de los ROS y, en conjunto con los fenoles, establece una defensa sinérgica que preserva tanto la estructura celular como la estabilidad de las funciones celulares (Safafar *et al.*, 2015).

Adicionalmente, los sistemas de señalización de dos componentes y las proteínas inducidas por la sal, como las proteínas de choque térmico y las enzimas antioxidantes, son esenciales para responder a este tipo de estrés (Shoumskaya *et al.*, 2005; Swapnil & Rai, 2018; Bernal & Anil, 2018). Estos mecanismos aseguran la sobrevivencia de la célula y el funcionamiento adecuado en ambientes salinos.

Todas estas respuestas de las cianobacterias no sólo son cruciales para la supervivencia y proliferación en entornos de alta salinidad, sino que también ofrecen un potencial biotecnológico considerable para la producción sostenible de biomasa en condiciones de mayor salinidad a la del hábitat de origen de determinada cepa (Ramírez-Moreno & Olvera-Ramírez, 2006).

La bibliografía disponible presenta una diversidad de resultados, algunos contradictorios, sobre los efectos de la salinidad en cianobacterias de agua dulce de importancia comercial. Algunos estudios indican, por ejemplo, que el cultivo en agua de mar podría incrementar la producción de biomasa y optimizar la composición bioquímica (Rosales *et al.*, 2005; Dhiab *et al.*, 2007); sin embargo, otros reportes sugieren que la alta salinidad puede afectar negativamente (Blumwald & Tel-Or, 1982; Tredici *et al.*, 1986); o no tener ningún efecto (Jonte *et al.*, 2003; Materassi *et al.*, 1984; Almahrouqi *et al.*, 2012; Ravelonandro *et al.*, 2011) en estos parámetros.

Varios estudios en cianobacterias han evaluado el impacto de la salinidad en el crecimiento. La literatura especializada reporta consistentemente una disminución en el crecimiento a medida que aumenta la salinidad, documentando este patrón en géneros como *Spirulina* y *Arthrospira* (Faucher *et al.*, 1979; Blumwald & Tel-Or, 1982; Lamela & Márquez-Rocha, 2000; Almahrouqi *et al.*, 2012). Estudios como el de Ravelonandro *et al.*, 2011, determinaron que la tasa de crecimiento máxima (μ_{max}) de *Arthrospira (Spirulina) platensis* variaba de $0,242d^{-1}$ a $0,182d^{-1}$ utilizando 13 g/L y 35 g/L de NaCl. Sin embargo, Leema *et al.*, 2010, reportaron que una cepa previamente aclimatada de *Arthrospira platensis*, cultivada en un medio preparado con dos partes de agua de mar y una de agua dulce alcanzó una producción de biomasa similar (g/L) a la de sus controles en agua dulce.

Además, algunos estudios han mostrado el efecto contrario, es decir, un incremento en el crecimiento al incrementar la salinidad en *Arthrospira* (Dhiab *et al.*, 2007). Romero Maza *et al.*, 2018, mostraron un aumento en la biomasa en

una cepa de *Spirulina subsalsa* al 9‰ de salinidad, pero cabe resaltar que ocurrió junto a un incremento en la disponibilidad de nitrato en el medio. Russo *et al.*, 2024; encontraron que el cultivo mixotrófico de *Arthrospira platensis* con un 2% de aguas residuales de cervecería en agua de mar resultó en un aumento significativo en la producción de biomasa, alcanzando un máximo de 3,7 g/L.

Estos resultados, aparentemente contradictorios, se han atribuido a diferencias en factores genéticos y ambientales, sugiriendo que distintas especies y cepas pueden adoptar estrategias variadas frente al estrés salino.

Respecto al contenido de proteínas y pigmentos ficobilínicos en cianobacterias sometidas a estrés salino, la literatura también muestra resultados contradictorios, mientras que, para el contenido de carbohidratos, existe un consenso más o menos general en relación con su incremento bajo estas condiciones. Así, por ejemplo, investigaciones realizadas por Tredici *et al.*, 1986; Vonshak *et al.*, 1996; Lamela & Márquez-Rocha, 2000, y Romero Maza *et al.*, 2018, han demostrado que la salinidad induce una disminución en la síntesis de proteínas y ficocianina en especies como *Arthrospira maxima* y *Arthrospira platensis*, mientras que el contenido de carbohidratos experimenta un aumento significativo. Por otro lado, Rosales *et al.*, 2005, reportaron un incremento tanto en proteínas como en carbohidratos en una cepa de *Synechococcus* al 100‰ de salinidad; mientras que Fuenmayor *et al.*, 2009, observaron un aumento en la producción de proteínas y ficocianina en *Oscillatoria* sp. a 35 PSU y a 70 PSU, respectivamente; sin embargo, este estudio señala que dichos parámetros son influenciados por la concentración de nutrientes en el medio, indicando que no se puede establecer un patrón claro de respuesta frente al incremento de la salinidad cuando hay suficiencia de nutrientes.

Para *Arthrospira platensis*, Russo *et al.*, 2024 reportaron un aumento en el contenido de proteínas, alcanzando hasta un 60% de peso seco, esto en un cultivo mixotrófico basado en 2% de aguas residuales de cervecería en agua de mar. Además, se observó un incremento en el contenido de ficocianina,

obteniendo 3,28 mg/L en el control y 7,70 mg/L en el medio con agua de mar, así también un aumento en el contenido de carbohidratos. Si bien estos resultados son interesantes son difíciles de comparar con otros estudios ya que se trata de cultivos en condición mixotrófica.

Leema *et al.*, 2010, reportaron que la ficocianina en un medio de cultivo compuesto por dos partes de agua dulce y una parte de agua de mar obtuvo un valor cercano al control ($39,64 \pm 2,00$ vs $48,44 \pm 1,94$) en *Arthrospira platensis*. En el mismo estudio, se registró un descenso en el contenido de proteínas, pero un aumento en la cantidad de carbohidratos. Además, Yu *et al.*, 2025, reportaron un aumento de proteínas en la misma especie a 30 g/L de NaCl, mientras que Sharma, 2014, documentó un incremento en el contenido de ficobiliproteínas en un medio con 0,4M de NaCl agregados.

Todos los estudios mencionados reportan resultados interesantes pero difíciles de comparar debido a diferencias en las cepas y en las metodologías utilizadas en los experimentos. Además, estudios como los de Vonshak *et al.*, 1996 Zeng & Vonshak, 1998; Dhiab *et al.*, 2007; Leema *et al.*, 2010; Yilmaz, 2010 y Russo *et al.*, 2024; destacan la importancia de someter previamente a las cepas a un proceso de aclimatación lento y prolongado para permitir que las cepas ajusten sus mecanismos fisiológicos y bioquímicos para tolerar mejor el estrés salino, asegurando así una evaluación más precisa de la potencialidad de las cepas para aclimatarse a estas condiciones.

El estudio realizado por Gómez *et al.*, 2023, exploró las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias de los extractos acuosos de diferentes cianobacterias, incluyendo entre ellas a especies diferentes a *Arthrospira*. De este grupo se destacaron dos cepas por sus sobresalientes atributos de crecimiento y sus capacidades antioxidantes y antiinflamatorias: CCM-UdeC 040 (*Arthrospira maxima*) y CCM-UdeC 050 (*Spirulina subsalsa*). Estudios más recientes del mismo grupo de investigación han demostrado también una potente actividad antiagregación plaquetaria en los extractos de estas dos cepas (datos

no publicados). Dado su demostrado potencial biotecnológico y considerando que estas cepas provienen de ambientes dulceacuícolas, es interesante evaluar la viabilidad de su cultivo en agua de mar, con miras a un futuro escalamiento comercial.

Considerando que existen investigaciones que demuestran que cepas de cianobacterias de agua dulce se aclimataron exitosamente a salinidades mayores, sin presentar cambios significativos en su crecimiento y/o composición bioquímica (Materassi *et al.*, 1984; Jonte *et al.*, 2003; Almahrouqi *et al.*, 2012; Ravelonandro *et al.*, 2011); es posible plantear como hipótesis:

HIPÓTESIS

- Las dos cepas de cianobacterias de agua dulce seleccionadas en este estudio: CCM-UdeC 040 (*Arthrospira maxima*) y CCM-UdeC 050 (*Spirulina subsalsa*), son capaces de crecer en condiciones de agua de mar, sin exhibir alteraciones significativas en sus parámetros de crecimiento ni en su composición bioquímica.

OBJETIVOS

Objetivo General

- Evaluar si las dos cepas de cianobacterias de agua dulce seleccionadas en este estudio: CCM-UdeC 040 (*Arthrospira maxima*) y CCM-UdeC 050 (*Spirulina subsalsa*), son capaces de crecer en condiciones de agua de mar, sin que se afecten negativamente sus parámetros de crecimiento ni su composición bioquímica.

Objetivos Específicos

- Determinar si las cepas de cianobacterias seleccionadas son capaces de aclimatarse a la salinidad del agua de mar.
- Determinar si las cepas seleccionadas cambian sus parámetros de crecimiento en alta salinidad.
- Determinar si las cepas seleccionadas cambian significativamente su contenido de pigmentos (clorofila *a*, carotenoides totales, pigmentos ficobilínicos), proteínas, carbohidratos y/o fenoles totales al crecer en alta salinidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Material biológico

En este estudio se incluyeron cianobacterias pertenecientes a las especies *Arthrospira maxima* y *Spirulina subsalsa*. Las cepas están depositadas en la Colección de Cultivo de Microalgas (CCM-UdeC) del Departamento de Botánica de la Universidad de Concepción con los códigos: CCM-UdeC 040 (*Arthrospira maxima*) y CCM-UdeC 050 (*Spirulina subsalsa*).

2.- Condiciones de cultivo

Se empleó el medio de cultivo Zarrouk (Zarrouk, 1966) modificado (Anexo 1) para aclimatar las cepas a las condiciones iniciales durante dos semanas. La formulación de este medio incluye agua destilada en su preparación. Los cultivos fueron mantenidos en matraces de 250mL a una temperatura de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, densidad de flujo de fotones de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperiodo 16:8 (L:O) y aireación constante con aire filtrado a $0,22 \mu\text{m}$. A partir de estos cultivos las cepas se fueron aclimatando gradualmente a mayor salinidad hasta llegar a 35 PSU (salinidad promedio del agua de mar).

3.- Aclimatación a la salinidad del agua de mar (35 PSU)

Con el objetivo de realizar una aclimatación gradual de las cepas de agua dulce a la salinidad del agua de mar, se preparó el medio de cultivo Zarrouk, en el cual la base de agua destilada fue reemplazada por: agua destilada con 15 g/L de NaCl (cultivo a 15 PSU), agua destilada con 25 g/L de NaCl (cultivo a 25 PSU) y agua destilada con 35 g/L de NaCl (cultivo a 35 PSU).

Se realizaron tres ciclos de aclimatación (15, 25 y 35 PSU), donde el primer ciclo consistió en tomar un inóculo correspondiente al 10% del volumen del cultivo inicial y cultivarlo en medio Zarrouk a 15 PSU, manteniendo los cultivos en las

mismas condiciones de luz y temperatura que los cultivos iniciales. Pasados siete días fue realizado un segundo repique de los cultivos a la misma salinidad (15 PSU). Una vez que estos cultivos alcanzaron una densidad adecuada, se avanzó a la siguiente salinidad (25 PSU) utilizando los cultivos a 15 PSU como inóculo. Transcurridos 7 días se realizó un segundo repique a 25 PSU y, una vez alcanzada una densidad adecuada, se procedió a utilizar estos cultivos para aplicar el mismo esquema de aclimatación a 35 PSU.

Una vez finalizado el periodo de aclimatación, se utilizó el cultivo de mayor salinidad al cual las cepas mostraron un crecimiento adecuado, iniciando un set de cultivos en agua de mar a esta misma salinidad.

Se tomó una muestra de agua de mar y se midieron sus parámetros de pH (8,05) y salinidad (34 PSU) antes de utilizarla. Luego, se filtró el agua de mar mediante un filtro de 0,45 μm y se repitieron las mediciones para confirmar que el proceso no alteró sus características; donde se registró un pH de 8,08 y una salinidad de 34,5 PSU. Con estos valores se calculó la cantidad de agua destilada necesaria para diluir el agua de mar hasta alcanzar la máxima salinidad tolerada por los cultivos. La mezcla resultante se utilizó para preparar medio Zarrouk, sustituyendo la base de agua destilada por el agua de mar diluida a la salinidad seleccionada.

A lo largo de este proceso, se realizó un monitoreo constante del crecimiento y estado general de los cultivos mediante observación de su color, aspecto y observación microscópica de los tricomas.

4.- Cultivo de cepas en la salinidad seleccionada.

Una vez determinada la mayor salinidad a la que fueron capaces de aclimatarse las cepas, se procedió a compararlas en salinidad normal versus agua de mar a la salinidad seleccionada. Para ello se preparó medio Zarrouk reemplazando el agua destilada por agua de mar en su formulación. El agua de mar utilizada fue extraída en Caleta Lengua, Región del Biobío, Chile (36°46'01"S 73°10'17"O), previamente a su uso fue filtrada (poro 0,45 μm) y esterilizada, además, se le

realizó un análisis para determinar su concentración de nitrato y fosfato (Anexo 2).

Para cada cepa se iniciaron cultivos con cuatro réplicas en salinidad Control (Medio Zarrouk en agua destilada), cuatro réplicas en alta salinidad utilizando NaCl (Medio Zarrouk a X PSU en agua destilada) y cuatro réplicas en Agua de Mar (Medio Zarrouk en Agua de Mar a X PSU).

Los cultivos fueron iniciados con una densidad celular aproximada de 1000 μg de clorofila *a*/L, en un volumen de 900mL y mantenidos a $20 \pm 2^\circ\text{C}$, densidad de flujo de fotones de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperiodo 16:8 (L:O) y aireación constante con aire filtrado a 0,22 μm .

El crecimiento se monitoreó cada dos días mediante cuantificación de clorofila *a* por volumen de cultivo (López-Rodríguez *et al.*, 2021). Los cultivos finalizaron una vez se alcanzó la fase estacionaria donde se cosechó todo el volumen de cultivo por centrifugación, para luego secarla mediante liofilización, tal como se explica en el punto 6.

5.- Análisis de crecimiento

5.1.- Cuantificación de clorofila a:

El crecimiento de los cultivos se determinó mediante cuantificación de clorofila *a* por espectrofotometría. Este método consiste en extraer los pigmentos de la muestra con acetona y posteriormente medir la densidad óptica (absorbancia) del extracto. Para ello, se filtraron 5 mL de cultivo utilizando filtros de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0,45 μm . Los pigmentos se extrajeron agregando 1 mL de acetona al 90% en un tubo del Homogenizador FastPrep, mezclando mediante vórtex y añadiendo una esfera de cerámica para homogenización. Las muestras fueron procesadas en un homogeneizador automático FastPrep en tres ciclos de 20 segundos cada uno.

Tras la homogenización, las muestras se centrifugaron a 10000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante obtenido se colectó en un matraz aforado de 5 mL, mientras que el pellet fue sometido a una nueva extracción con 1 mL adicional

de acetona, repitiendo el proceso hasta que el solvente de extracción fuera incoloro. El volumen final del extracto se aforó a 5 mL con acetona, las muestras se leyeron a 750 nm, 663 nm y 644 nm en el espectrofotómetro, utilizando acetona al 90% como blanco.

Las lecturas fueron corregidas por turbidez de la siguiente manera:

$$A^{\circ}_{663} = A_{750} - A_{663}$$

$$A^{\circ}_{644} = A_{750} - A_{644}$$

Para calcular la concentración de clorofila *a* se utilizaron las ecuaciones de Wegmann & Metzner (1971):

$$\text{Concentración relativa clorofila } a = 10,3 \times A^{\circ}_{663} - 0,918 \times A^{\circ}_{644}$$

Finalmente se calculó la concentración de clorofila *a* por volumen de cultivo, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración Clorofila } a \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{L}} \right) = \frac{\text{Concentración relativa} \times v}{V \times z}$$

Donde:

v = Volumen del extracto (mL)

V = Volumen de cultivo filtrado (L)

z = Longitud de la cubeta (cm)

Los datos para la cuantificación de clorofila *a* se recolectaron cada dos días de las 4 réplicas de cada tratamiento y el promedio de los datos de las réplicas se utilizó para la construcción de una curva de crecimiento por cada tratamiento.

5.4.- Tasa de Crecimiento:

La tasa de crecimiento se calculó desde las curvas de crecimiento identificando la fase de crecimiento exponencial y utilizando la siguiente fórmula (Guillard, 1973):

$$K = \left(\frac{3,322}{t_2 - t_1} \right) \times \text{Log} \frac{N_2}{N_1}$$

Donde:

t1 = 3

t2 = 6 para *Spirulina*, 9 para *Arthrospira*

N1 = Densidad celular obtenida en t1

N2 = Densidad celular obtenida en t2

5.3.- Peso seco:

Para determinar el rendimiento de los cultivos expresado como peso seco, se secaron filtros de nitrocelulosa (poro 0,45 µm) por 24 horas a 80°C, se enfriaron en un desecador y se pesaron hasta peso constante. El último día de cultivo se filtró 10mL de cultivo por réplica en cada filtro seco y pesado y se lavó la biomasa filtrada con 10 mL de formiato de amonio a 0,5 M para eliminar las sales, posteriormente se dejó secar los filtros con biomasa en la estufa a 80°C por 48 horas y se volvieron a pesar. La diferencia del peso del filtro con y sin biomasa, dividido por el volumen de cultivo filtrado, corresponde al peso seco de la biomasa microalgal por volumen de cultivo (mg/L).

$$\frac{\text{Gramos de biomasa}}{\text{Litro de cultivo}} = \frac{P_2 - P_1}{V} \times \frac{1000}{1}$$

Donde:

P1= Peso del filtro seco sin biomasa

P2= Peso del filtro seco con biomasa

V= Volumen de cultivo filtrado (mL).

6.- Cosecha de la biomasa.

Al alcanzar la fase estacionaria los cultivos se cosecharon mediante centrifugación a 5000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente la biomasa fue lavada con formiato de amonio (0,5 M) y se conservó a -20°C hasta la liofilización, la cual fue realizada a -50°C y 100 millitorr durante 48 horas. La biomasa resultante se almacenó a -20°C hasta su uso.

7.- Análisis bioquímicos de las biomosas.

Con el objeto de corregir los datos de los análisis bioquímicos se determinó la humedad de las biomosas liofilizadas. Para ello se pesó 25 mg de biomasa en sobres de papel aluminio previamente secos y pesados. Los sobres junto a la biomasa fueron secados en la estufa a 80°C durante 48 horas y se pesaron nuevamente. El porcentaje de humedad se determinó utilizando la siguiente expresión:

$$\% \text{ de humedad} = \frac{(PS1 - PS2) - (PS3 - PS2)}{PS1 - PS2} \times 100$$

Donde:

PS1= Peso del sobre seco con la biomasa liofilizada sin secar

PS2= Peso del sobre seco

PS3= Peso del sobre seco con la biomasa liofilizada seca.

7.1.- Análisis de clorofila a y carotenoides:

La determinación de la concentración de clorofila a y carotenoides totales se realizó de acuerdo con el protocolo descrito por Strickland & Parsons, 1968. Se pesaron 0,25 mg de biomasa liofilizada en tubos de extracción FastPrep y se

extrajeron con 1 mL de acetona al 90% agregando una esfera de cerámica de homogenización, se procesó en el homogeneizador automático FastPrep por 20 seg. 3 veces. La muestra se centrifugó a 10000 rpm por 5 min, el sobrenadante se recolectó en un matraz aforado de 10 mL, y se vuelve a extraer con 1 ml más de solvente, aplicando vórtex, 3 ciclos de homogenización FastPrep y centrifugación al pellet hasta que el solvente de extracción sea incoloro. El extracto se aforó a 10 mL con acetona al 90% y se leyó su absorbancia (A) a 750 nm, 663 nm, 644 nm y 453 nm en el espectrofotómetro, utilizando acetona al 90% como blanco. Las lecturas fueron corregidas por turbidez restándole a cada absorbancia la absorbancia a 750 nm) y para calcular la concentración de los pigmentos se utilizaron las ecuaciones de Wegmann & Metzner, (1971):

$$\text{Concentración relativa (Cr) clorofila } a = 10,3 \times A^{663} - 0,918 \times A^{644}$$

$$\text{Concentración relativa carotenoides} = 4,2 \times A^{453} - 0,0264 \times Cr \text{ clor } a$$

Finalmente se calculó la concentración de los pigmentos en microgramos por gramos de biomasa seca utilizada para el análisis.

$$\text{Concentración de clorofila } a = \frac{Cr \text{ clorofila } a \times v}{\text{Gramos de Biomasa}}$$

$$\text{Concentración de carotenoides} = \frac{Cr \text{ carotenoides} \times v}{\text{Gramos de Biomasa}}$$

Donde:

v = Volumen del extracto

7.2.- Análisis de pigmentos ficobilínicos:

El método de Bennett & Bogobad (1973) fue utilizado para la extracción de los pigmentos ficobilínicos. Se pesaron 0,25 mg de biomasa liofilizada en tubos de FastPrep y se extrajeron con 1 mL de tampón fosfato 100 mM, agregando una esfera de cerámica de homogenización, se procesó en el homogeneizador

automático FastPrep en tres ciclos de 20 segundos. Luego, la muestra se congeló por 8 minutos a -80 °C, se dejó descongelar a temperatura ambiente, se agitó en vórtex y centrifugó a 10000 rpm durante 5 min. El sobrenadante obtenido se recolectó en un matraz aforado de 10 mL, repitiendo la extracción con 1 mL adicional de tampón fosfato 100mM, sometiendo el pellet restante a tres ciclos de homogenización, congelación, agitación y centrifugación, hasta que el sobrenadante fuera incoloro. El extracto se aforó a 10 mL con tampón fosfato 100mM y se leyó su absorbancia a 750 nm (turbidez), 650 nm (aloficocianina), 620 nm (ficocianina) y 565 nm (ficoeritrina) en el espectrofotómetro, utilizando como blanco tampón fosfato 100 mM. Las lecturas fueron corregidas por turbidez, restándole a cada absorbancia la absorbancia a 750 nm) y las concentraciones de estos pigmentos son calculados en base a las ecuaciones de Bermejo *et al.*, 2002:

$$\text{Concentración Ficocianina PC } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) = \frac{A^{620} - 0,7 \times A^{650}}{7,38}$$

$$\text{Concentración Aloficocianina APC } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) = \frac{A^{650} - 0,19 \times A^{620}}{5,65}$$

$$\text{Concentración Ficoeritrina PE } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) = \frac{A^{565} - 2,8 \times PC - 1,34 \times APC}{12,7}$$

7.3.- Análisis de proteínas:

La concentración de proteínas en la biomasa liofilizada fue determinada mediante el método de Lowry *et al.*, (1951). Inicialmente, se construyó una curva de calibración utilizando una solución estándar de BSA (seroalbúmina bovina), preparada con 300 µg de BSA en NaOH 0,1 M a diferentes concentraciones donde la absorbancia de la reacción fue medida a 750 nm en un

espectrofotómetro. Los datos obtenidos fueron graficados y utilizados para establecer la ecuación de la recta.

Para las muestras, se pesaron 25 mg de biomasa liofilizada en tubos de vidrio a los que se añadieron 5 mL de NaOH 0,1 M y se agitaron en vortex. Los tubos se colocaron en una gradilla metálica en baño termostático a 100 °C durante una hora y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Una vez enfriados, se mezclaron nuevamente en vortex y se tomó 1 mL de muestra para transferirla a tubos Eppendorf de 2 mL, estos son centrifugados a 7.000 rpm por 15 minutos. El sobrenadante se depositó en nuevos tubos Eppendorf y se repartió en alícuotas de 250 µL distribuidas por triplicado en tubos de vidrio. A estos se les añadió 750 µL de NaOH 0,1 M y 1 mL de solución C (compuesta por Na₂CO₃ al 2% en NaOH 0,1 M, CuSO₄ × 5 H₂O al 0,5% en agua destilada y tartrato de sodio y potasio al 1% en agua destilada), se agitaron en vortex y se dejaron reposar por 10 minutos. Finalmente, se añadieron 100 µL de reactivo Folin-Ciocalteu diluido al 50% en agua destilada, se mezclaron nuevamente y se dejaron reposar en oscuridad durante 30 minutos. La absorbancia del color azul formado fue medida espectrofotométricamente a 750 nm y comparada con la curva de BSA para calcular la concentración de proteínas por gramo de biomasa seca.

7.4.- Análisis de carbohidratos totales:

La cantidad de carbohidratos totales se determinó mediante el método de Yemm & Willis, 1954. Este consiste en la construcción de una curva de calibrado a partir de una solución stock de glucosa 200 mg/L en agua destilada a diferentes concentraciones donde la absorbancia de la reacción fue medida a 750 nm por medio de un espectrofotómetro. Los datos obtenidos fueron graficados y utilizados para establecer la ecuación de la recta.

Para las muestras inicialmente se pesaron aproximadamente 25 mg de biomasa liofilizada y se le agregó 1 mL de agua destilada, se dejó reposar la muestra durante una hora para asegurar su hidratación. A continuación, se incorporaron dos esferas de cerámica de homogenización y se procesó en el homogeneizador

automático FastPrep en ocho ciclos de 20 segundos. Luego, la muestra se agitó en vórtex y se centrifugó a 10000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se depositó en nuevos tubos Eppendorf y se repartió en alícuotas de entre 5, 10 y 25 μL distribuidas por triplicado en tubos de vidrio dependiendo del tratamiento. A estos se les añadieron 500 μL de reactivo antrona- H_2SO_4 (preparado con 0,200 g de antrona en 100 mL de H_2SO_4), se agitaron en vortex y se incubaron durante 10 minutos a 100°C en placa calefactora. Finalmente, se dejaron enfriar los tubos a temperatura ambiente y se leyeron las absorbancias a 625 nm en espectrofotómetro.

Los resultados fueron comparados con la curva de calibrado preparada anteriormente para calcular la cantidad de carbohidratos totales por gramo de biomasa seca. Estos valores también fueron corregidos por su factor de dilución correspondiente en caso de que la alícuota tomada de la muestra haya sido inferior a la establecida por el protocolo, siendo esta de 250 μL originalmente.

7.5.- *Análisis de fenoles totales*

La determinación de fenoles totales se realizó utilizando el método descrito por Gómez *et al.*, 2023. Este consiste en la construcción de una curva de calibrado a partir de una solución stock de ácido gálico 2500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a diferentes concentraciones donde la absorbancia fue medida a 750 nm por medio de un espectrofotómetro. Los datos obtenidos fueron graficados y utilizados para establecer la ecuación de la recta.

Para las muestras, se pesaron aproximadamente 25 mg de biomasa liofilizada y se añadió 1 mL de metanol 80% v/v, luego se incorporó una esfera de cerámica de homogenización y se procesó en el homogeneizador automático FastPrep en ocho ciclos de 20 segundos, posteriormente se centrifugó la muestra a 10.000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se depositó en nuevos tubos Eppendorf y se repartió en alícuotas de entre 50, 75 y 100 μL distribuidas por triplicado en tubos de vidrio dependiendo del tratamiento. A estos se añadieron 1,8 mL de agua destilada y 125 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu y se incubaron durante

tres minutos a temperatura ambiente, luego se añadieron 375 μL de Na_2CO_3 20% p/v y 225 μL de agua destilada. Finalmente, los tubos se incubaron durante dos horas en oscuridad a temperatura ambiente y se leyeron las absorbancias a 760 nm en espectrofotómetro.

Los resultados fueron comparados con la curva de calibrado preparada anteriormente para calcular la cantidad de fenoles totales (expresados como equivalentes de ácido gálico) por gramo de biomasa seca. Estos valores también fueron corregidos por su factor de concentración correspondiente en caso de que la alícuota tomada de la muestra haya sido mayor a la establecida por el protocolo, siendo esta de 25 μL originalmente.

8.- Análisis estadístico.

Se utilizó un Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía para identificar diferencias significativas en el crecimiento y la composición bioquímica entre los tratamientos de salinidad para cada cepa, considerando diferencias como significativas a una probabilidad de 5% ($p < 0,05$). A las diferencias estadísticamente significativas se les realizó un test de Tukey como prueba a posteriori. Los análisis fueron realizados utilizando el software SigmaPlot 14.5.

RESULTADOS

Aclimatación de cepas a la salinidad del agua de mar.

Durante el proceso de aclimatación de las cepas desde agua dulce a salinidades más cercanas al agua de mar, se observó que ambas cepas lograron aclimatarse adecuadamente a una salinidad de 15 PSU. A esta salinidad, los cultivos de *Spirulina subsalsa* alcanzaron una densidad adecuada después de aproximadamente 30 días, manteniendo un color verde intenso según la evaluación macroscópica (Fig. 1). Por otro lado, *Arthrospira maxima* alcanzó una densidad y color óptimos pasados aproximadamente 60 días (Fig. 2), demostrando que esta cepa requiere un tiempo más extenso para ajustar su metabolismo a cambios en la salinidad del medio.

Ninguna de las dos cepas fue capaz de prosperar a 25 PSU. A esta salinidad las cepas perdieron su color característico y presentaron un crecimiento insuficiente (Fig. 1; Fig. 2). Debido a esto, se decidió mantener los cultivos de ambas cepas a una salinidad de 15 PSU para el resto de esta investigación.

La concentración de clorofila *a* alcanzada por *Spirulina* durante la aclimatación fue de **56340 µg/L de cultivo** en el tratamiento de agua dulce y **37445 µg/L** en el cultivo a 15 PSU. En *Arthrospira*, la concentración de clorofila *a* alcanzó los **19885 µg/L** para el cultivo en agua dulce y **5938 µg/L** para el cultivo a 15PSU. Debido a la baja concentración de clorofila *a* en el cultivo salino de *Arthrospira*, los experimentos con esta cepa se realizaron en un volumen menor.

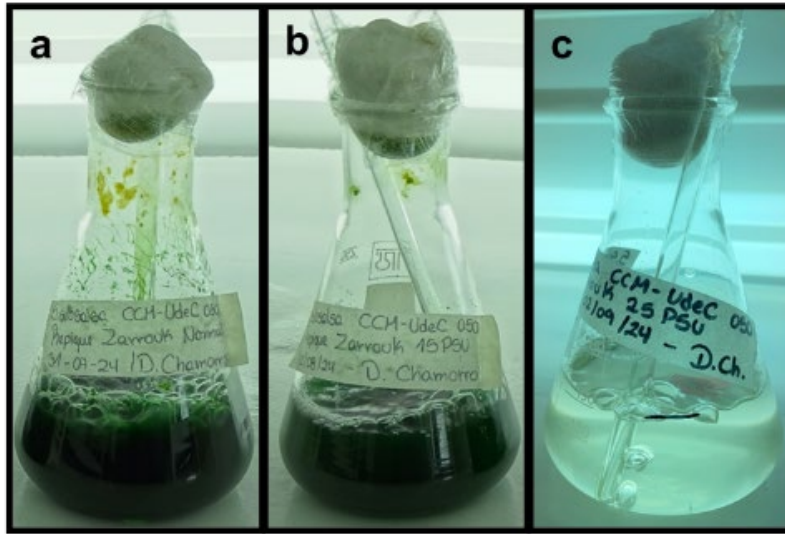


Figura 1.- Cultivos de *Spirulina subsalsa* en periodo de aclimatación. Matraces de 250mL. a) Cultivo en Medio Zarrouk normal. b) Cultivo aclimatado en Medio Zarrouk a 15 PSU. c) Cultivo en Medio Zarrouk a 25 PSU.

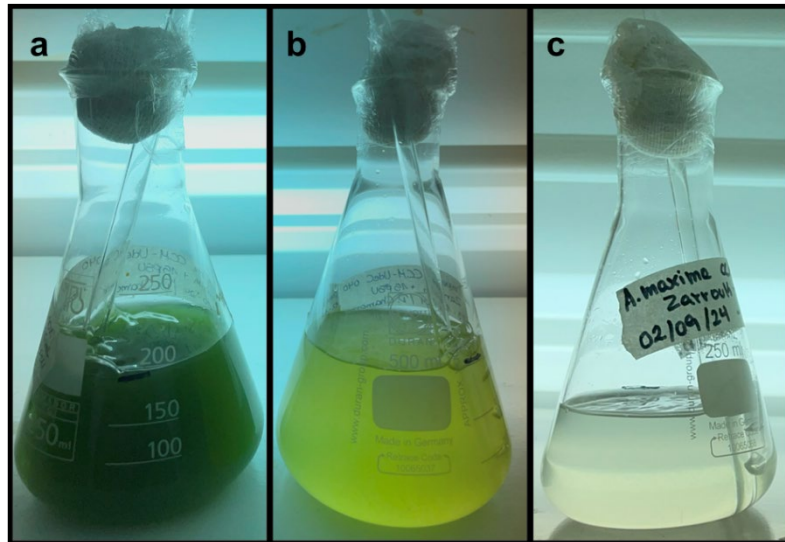


Figura 2.- Cultivos de *Arthrospira maxima* en periodo de aclimatación. a) Cultivo en medio Zarrouk normal. b) Cultivo en medio Zarrouk a 15 PSU escalado a 500mL. c) Cultivo en medio Zarrouk a 25 PSU.

Cultivo de cepas en agua de mar a la salinidad seleccionada.

A partir de los cultivos aclimatados de ambas cepas se iniciaron cultivos utilizando el medio Zarrouk en tres condiciones: Medio Zarrouk Normal (Control), Medio Zarrouk a 15 PSU en agua destilada (NaCl), Medio Zarrouk a 15 PSU en Agua de Mar. Se establecieron 4 réplicas de cada tratamiento por cepa.

La cepa de *S. subsalsa* se mantuvo bajo una irradiancia de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, en matraces de 1000 mL con un volumen de cultivo de 900 mL y el cultivo se inició con un inóculo equivalente a 1000 μg de clorofila *a*/L de cultivo (Fig. 3). Por otro lado, la cepa de *A. maxima* se cultivó a una irradiancia de $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, en un volumen de 600 mL, utilizando un inóculo inicial de 500 μg de clorofila *a*/L Fig. 4).

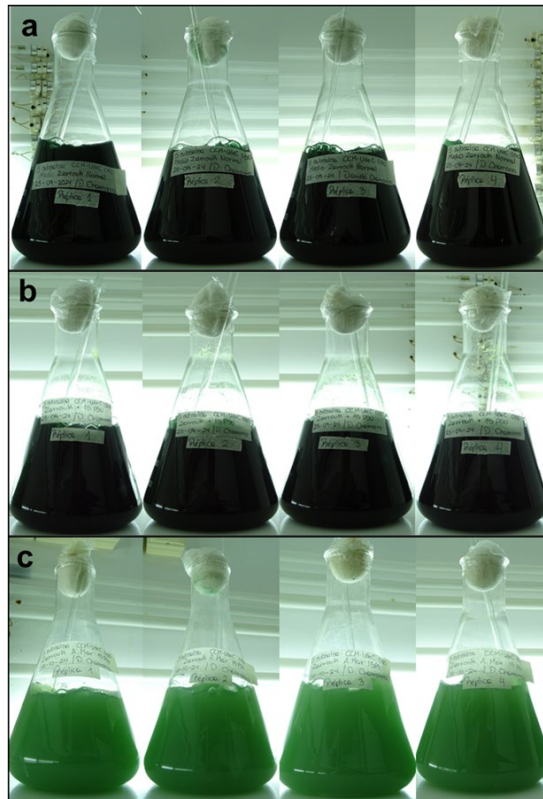


Figura 3.- Cultivos de *S. subsalsa* con sus réplicas: A.- Medio Zarrouk (Control), B.- Medio Zarrouk con 15 PSU con agua destilada, C.- Medio Zarrouk con 15 PSU con Agua de Mar.

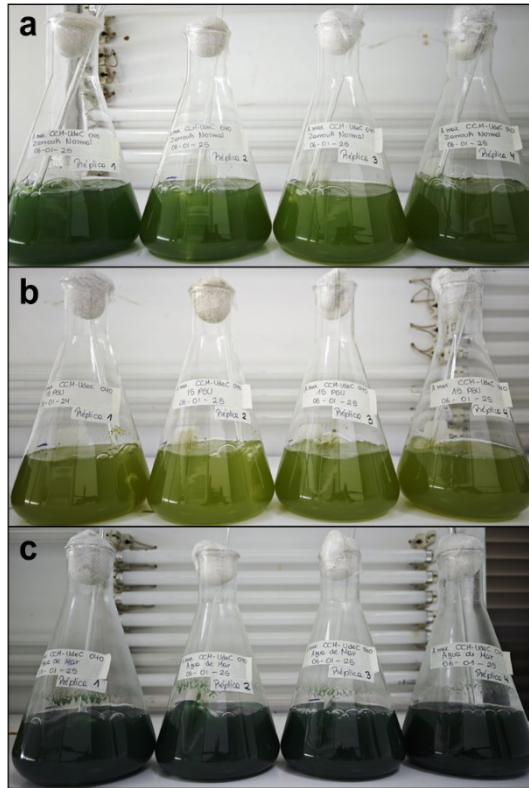


Figura 4.- Cultivos de *A. maxima* con sus réplicas: A.- Medio Zarrouk (Control), B.- Medio Zarrouk con 15 PSU con agua destilada, C.- Medio Zarrouk con 15 PSU con Agua de Mar.

Análisis de crecimiento.

La cuantificación de clorofila *a* cada dos días permitió construir una curva de crecimiento para cada tratamiento (Fig. 3). Los cultivos se monitorearon por 21 días (tiempo requerido por la cepa de *Spirulina* para alcanzar la fase estacionaria de crecimiento).

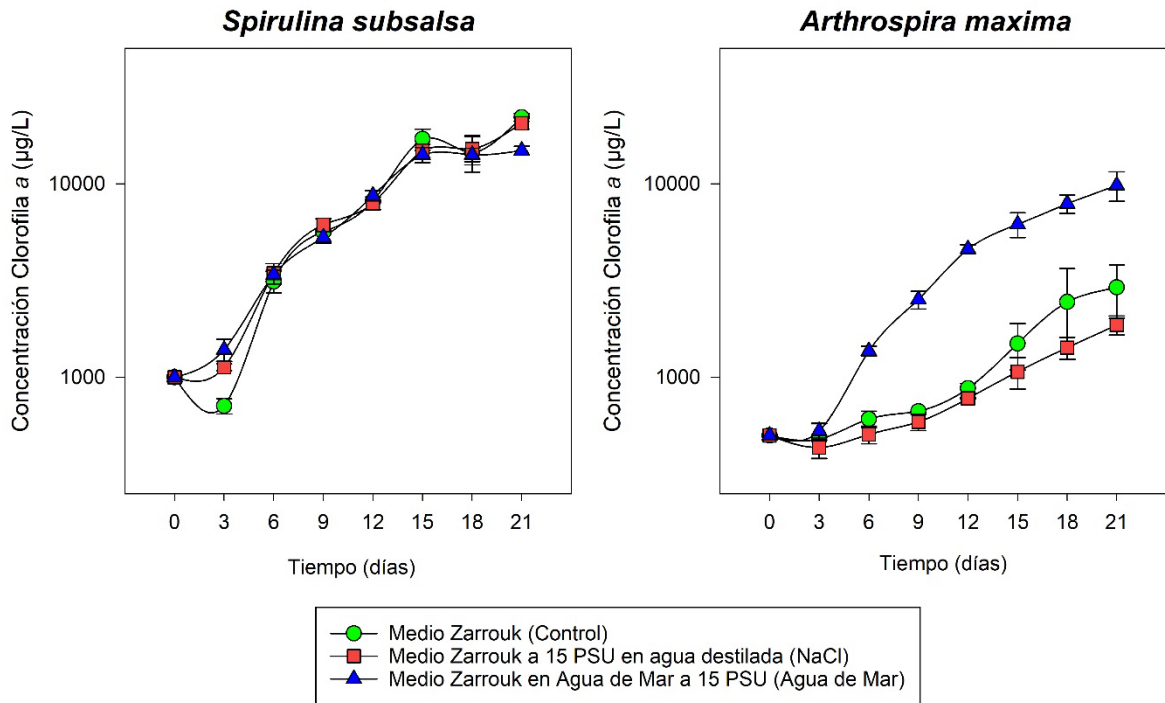


Figura 5.- Curvas de crecimiento comparadas entre tratamientos por cepa CCM-UdeC 050 (*Spirulina subsalsa*) y CCM-UdeC 040, (*Arthrospira maxima*). Los valores por día representan el promedio de las concentraciones de clorofila *a* de las 4 réplicas y las barras de error representan la desviación estándar entre réplicas.

Tabla 1.- Parámetros de crecimiento en los distintos tratamientos por cepa. Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos de una misma cepa.

Cepa	Medio	Tasa de crecimiento (divisiones/día)	Densidad celular (ug clorofila a/L)	Peso Seco (g/L)
CCM-UdeC 050 (<i>Spirulina subsalsa</i>)	Zarrouk Normal	0,71 ± 0,08 ^a	21996 ± 1008 ^a	1,18 ± 0,05 ^a
	Zarrouk a 15 PSU (NaCl)	0,54 ± 0,05 ^b	20502 ± 1345 ^a	1,13 ± 0,02 ^a
	Zarrouk en Agua de Mar a 15PSU	0,43 ± 0,07 ^b	14832 ± 773 ^b	1,89 ± 0,21 ^b
CCM-UdeC 040 (<i>Arthrospira maxima</i>)	Zarrouk Normal	0,08 ± 0,05 ^a	2910 ± 899 ^a	0,43 ± 0,07 ^a
	Zarrouk 15 PSU (NaCl)	0,07 ± 0,03 ^a	1861 ± 208 ^a	0,46 ± 0,02 ^a
	Zarrouk en Agua de Mar a 15 PSU	0,38 ± 0,04 ^b	9807 ± 1708 ^b	1,77 ± 0,06 ^b

En la cepa de *Spirulina*, la densidad celular (μg de clorofila *a*/L) entre los cultivos Control y el suplementado con NaCl no presentaron diferencias significativas entre sí, mostrando valores similares, por otro lado, el cultivo en Agua de Mar obtuvo un valor significativamente inferior respecto a los medios anteriores. Esto muestra que la salinidad del agua de mar tuvo un impacto negativo en el crecimiento de *Spirulina* (Tabla 1).

A diferencia de *Spirulina*, la cepa de *Arthrospira* mostró valores de crecimiento inferiores en los cultivos Control y NaCl en comparación con los cultivos en Agua de Mar. La densidad celular máxima (μg de clorofila *a*/L) de los cultivos en Control y NaCl presentaron diferencias estadísticas significativas en comparación al cultivo en Agua de Mar, el cual presentó un valor superior a los otros dos tratamientos. Estos resultados indican que la salinidad del agua de mar tuvo un

impacto positivo en el crecimiento de *Arthrospira*, a pesar de que no alcanzó la fase estacionaria (Tabla 1).

En cuanto a la tasa de crecimiento (divisiones/día) para *S. subsalsa*, esta alcanzó su mayor tasa de crecimiento en el tratamiento Control, mostrando una disminución en medio Zarrouk a 15 PSU (NaCl) y Agua de Mar a 15 PSU, con diferencias estadísticamente significativas entre el medio Control vs NaCl y Agua de Mar. Por su parte, la tasa de crecimiento de la cepa *A. maxima* fue significativamente mayor en agua de mar en comparación al medio Zarrouk en agua dulce y el cultivo a 15 PSU (Tabla 1).

Respecto al peso seco (gramos de biomasa/L de cultivo) en *Spirulina*, el análisis estadístico mostró que hubo diferencias significativas entre los cultivos en medio Control y los cultivados en Agua de Mar; sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los cultivos en el Control y aquellos en NaCl. En el caso de *Arthrospira*, el peso seco fue significativamente mayor en el cultivo en agua de mar, en comparación con los medios Control y NaCl. Esto indica que la salinidad del Agua de Mar tiene un impacto positivo en la producción de biomasa de esta cepa, a diferencia de la salinidad inducida por NaCl en el medio Zarrouk a 15 PSU en agua dulce (Tabla 1).

A los 21 días de cultivo, éstos fueron cosechados por centrifugación y la biomasa recuperada fue liofilizada y molida en mortero de porcelana. Las Figuras 6, 7 y 8 muestran esta etapa y el aspecto de la biomasa procesada en cada caso.

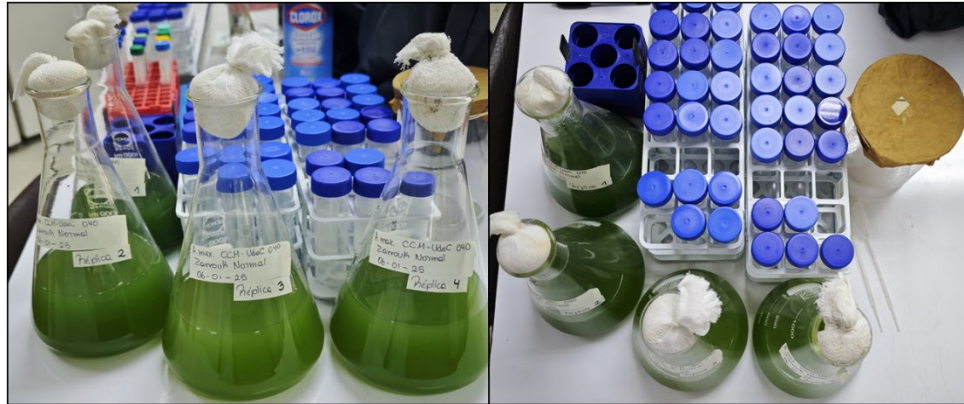


Figura 6.- Cosecha de los cultivos Control (Medio Zarrouk) de *Arthrospira maxima*.

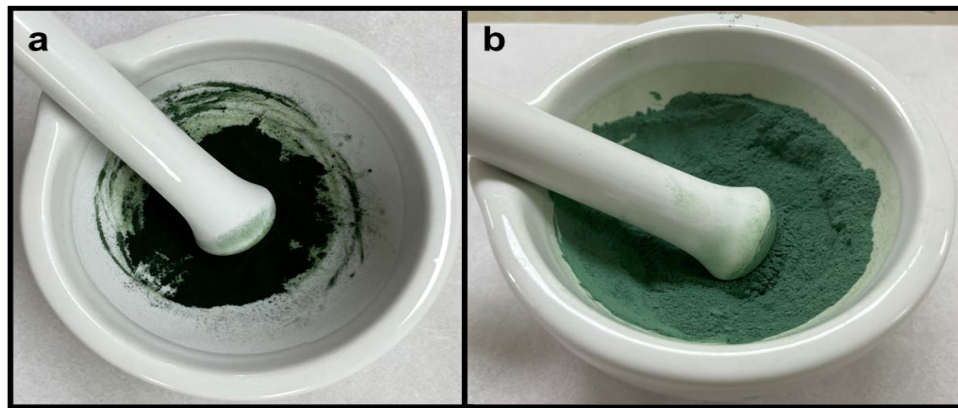


Figura 7.- Biomasa seca de *Spirulina subsalsa* obtenida en A.- Medio Zarrouk (Control) y B.- Medio Zarrouk a 15 PSU en Agua de Mar.

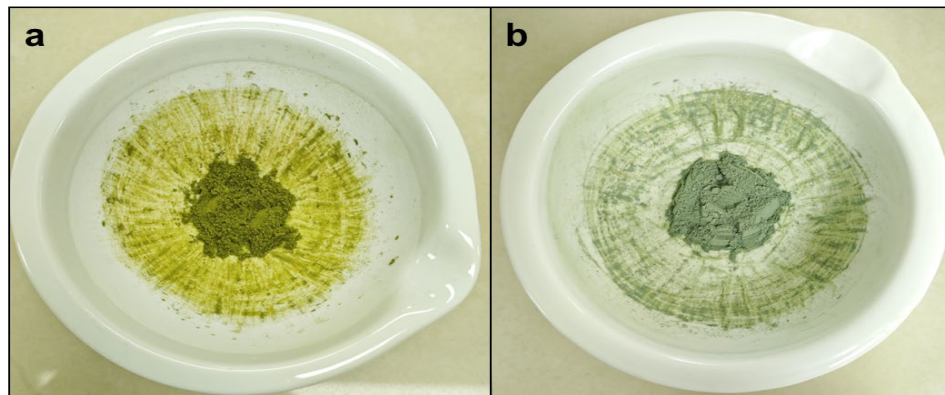


Figura 8.- Biomasa seca de *Arthrospira maxima* obtenida en A.- Medio Zarrouk (Control) y B.- Medio Zarrouk a 15 PSU en Agua de Mar.

Se realizó una evaluación microscópica de las cepas en sus diferentes condiciones de cultivo buscando observar posibles cambios morfológicos provocados por la salinidad. En la cepa CCM-UdeC 050 (*Spirulina subsalsa*), la observación al microscopio óptico evidenció una morfología característica de la especie. Los tricomas se organizan en una estructura helicoidal compacta en la cual las células cilíndricas se disponen de forma continua en espiral, la densidad del enrollamiento hace que los septos no sean discernibles y la fragmentación del filamento ocurre de manera intercelular, sin la presencia de una célula terminal definida. No se observaron cambios entre los tres tratamientos, lo que sugiere una notable estabilidad morfológica de esta cepa frente a condiciones de estrés salino (Fig. 9)

En el caso de la cepa CCM-UdeC 040 (*Arthrospira maxima*), los tricomas filamentosos se organizan en una hélice abierta que facilita la visualización de los septos, los cuales culminan en la formación de una célula necridial terminal que implica la fragmentación intracelular del tricoma. Bajo el microscopio se observa una marcada variabilidad en el tamaño de los filamentos dentro del mismo tratamiento. Además, en el medio con NaCl, los septos se distinguen con mayor claridad, lo que sugiere que la salinidad inducida por el NaCl influye en la morfología de esta cepa y podría favorecer una estrategia adaptativa para enfrentar el estrés salino (Fig. 10).

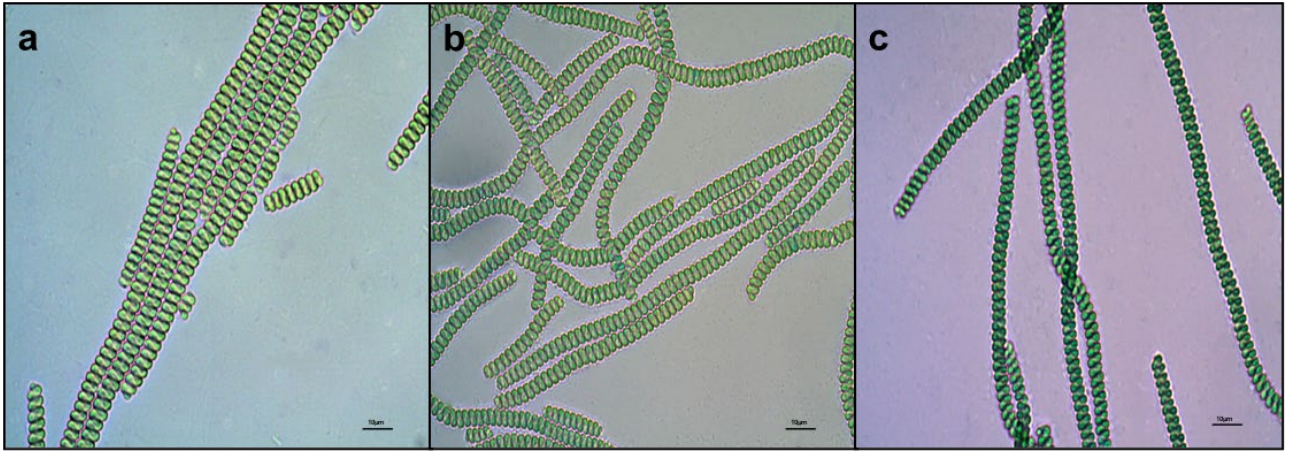


Figura 9.- Imágenes de microscopía óptica de la cepa *Spirulina subsalsa*: A.- Medio Zarrouk (Control), B.- Medio Zarrouk a 15 PSU en agua destilada (NaCl), C.- Medio Zarrouk a 15 PSU en Agua de Mar. Barras de 10 µm.

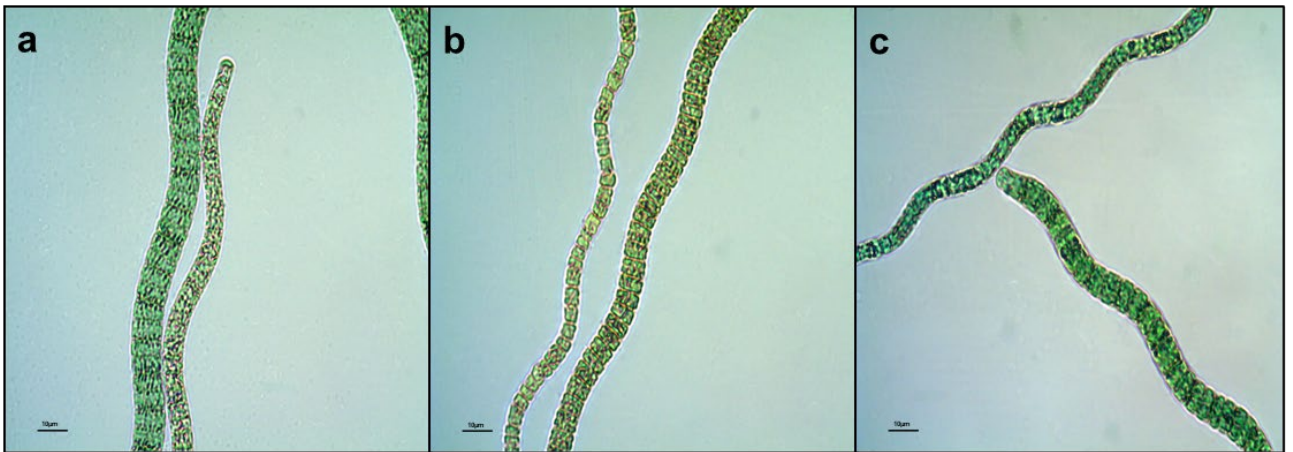


Figura 10.- Imágenes de microscopía óptica de *Arthrospira maxima*: A.- Medio Zarrouk (Control), B.- Medio Zarrouk a 15 PSU en agua destilada (NaCl), C.- Medio Zarrouk a 15 PSU en Agua de Mar. Barras de 10 µm.

Análisis bioquímico.

Análisis de Clorofila a y Carotenoides:

En *Spirulina subsalsa*, la concentración de clorofila a por gramo de biomasa seca no mostró diferencias significativas entre los tratamientos Control y NaCl, registrando en ambos casos valores significativamente superiores a los observados en Agua de Mar. De manera similar, los niveles de carotenoides siguieron la misma tendencia: sin diferencias entre Control y NaCl, pero con concentraciones significativamente menores en Agua de Mar (Fig. 11 A). Al evaluar estos pigmentos en función del volumen de cultivo, se confirmó una marcada reducción en Agua de Mar, mientras que Control y NaCl no difirieron entre sí (Fig. 11 C).

Por su parte, en *Arthrospira maxima*, la concentración de clorofila a por gramo de biomasa seca fue significativamente menor en el tratamiento con NaCl en comparación con Control y Agua de Mar, entre los cuales no se observaron diferencias significativas (Fig. 11 B). En el caso de los carotenoides, se detectaron diferencias significativas entre los tres tratamientos, evidenciando una disminución progresiva desde Control hacia NaCl y finalmente Agua de Mar. Al analizar los pigmentos por volumen de cultivo, se observó un patrón inverso: el tratamiento con Agua de Mar mostró las concentraciones más elevadas tanto de clorofila a como de carotenoides, superando a Control y NaCl, que no presentaron diferencias significativas entre sí (Fig. 11 D).

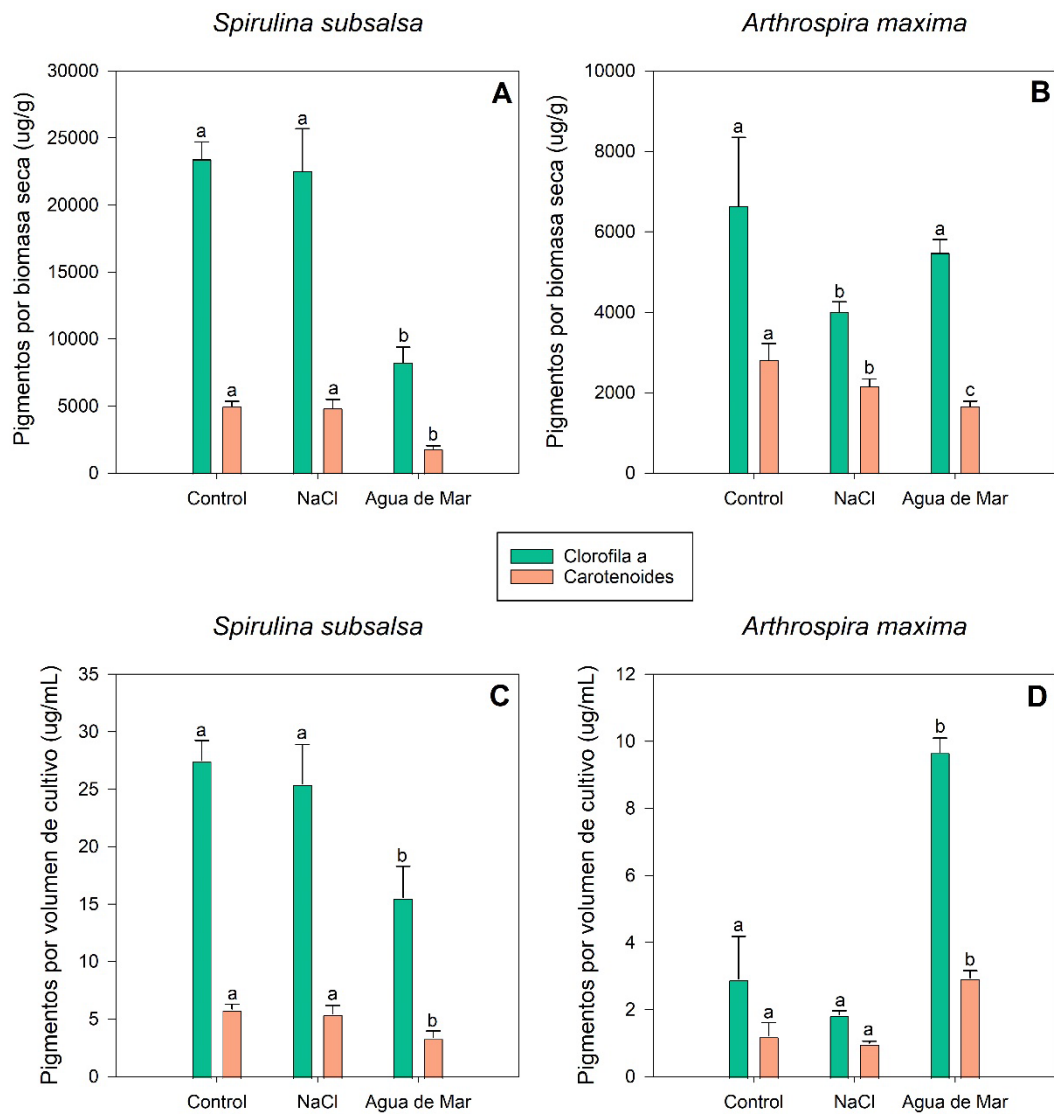


Figura 11.- Contenido de clorofila a y carotenoides totales por biomasa seca (figuras A y B) y por volumen de cultivo (figuras C y D) obtenido para cada cepa en los tres tratamientos. Donde Control es Medio Zarrouk, NaCl es Medio Zarrouk a 15 PSU en agua destilada y Agua de Mar corresponde a Medio Zarrouk a 15 PSU en Agua de Mar. Las barras representan el promedio de la concentración de pigmentos entre réplicas de un mismo tratamiento y las barras de error representan la desviación estándar entre réplicas. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas del mismo pigmento entre tratamientos de una misma cepa.

Análisis de Pigmentos Ficobilínicos:

La concentración de pigmentos ficobilínicos por gramo de biomasa seca en *Spirulina subsalsa* mostró un patrón consistente para los tres pigmentos analizados: ficocianina, aloficocianina y ficoeritrina. Los tratamientos Control y NaCl no presentaron diferencias significativas entre sí, mientras que el tratamiento con Agua de Mar registró concentraciones significativamente menores (Fig. 12 A). Al analizar estos pigmentos en función del volumen de cultivo, se repitió el mismo comportamiento: los valores obtenidos en Control y NaCl fueron estadísticamente equivalentes, mientras que en Agua de Mar se observaron concentraciones significativamente reducidas (Fig. 12 C).

Por su parte, en *Arthrospira maxima*, la concentración de pigmentos ficobilínicos por gramo de biomasa seca también mostró una tendencia en el cual los tratamientos Control y Agua de Mar no presentaron diferencias significativas entre sí para ficocianina y aloficocianina, mientras que el tratamiento con NaCl registró valores significativamente menores. En el caso de la ficoeritrina, se observó una diferencia significativa entre Control y NaCl; sin embargo, el tratamiento con Agua de Mar no difirió estadísticamente de ninguno de los dos, presentando un valor intermedio (Fig. 12 B). Al evaluar estos pigmentos en función del volumen de cultivo, se evidenció un patrón inverso: el tratamiento con Agua de Mar presentó concentraciones significativamente superiores para los tres pigmentos en comparación con el Control y NaCl, los cuales no mostraron diferencias significativas entre sí (Fig. 12 D).

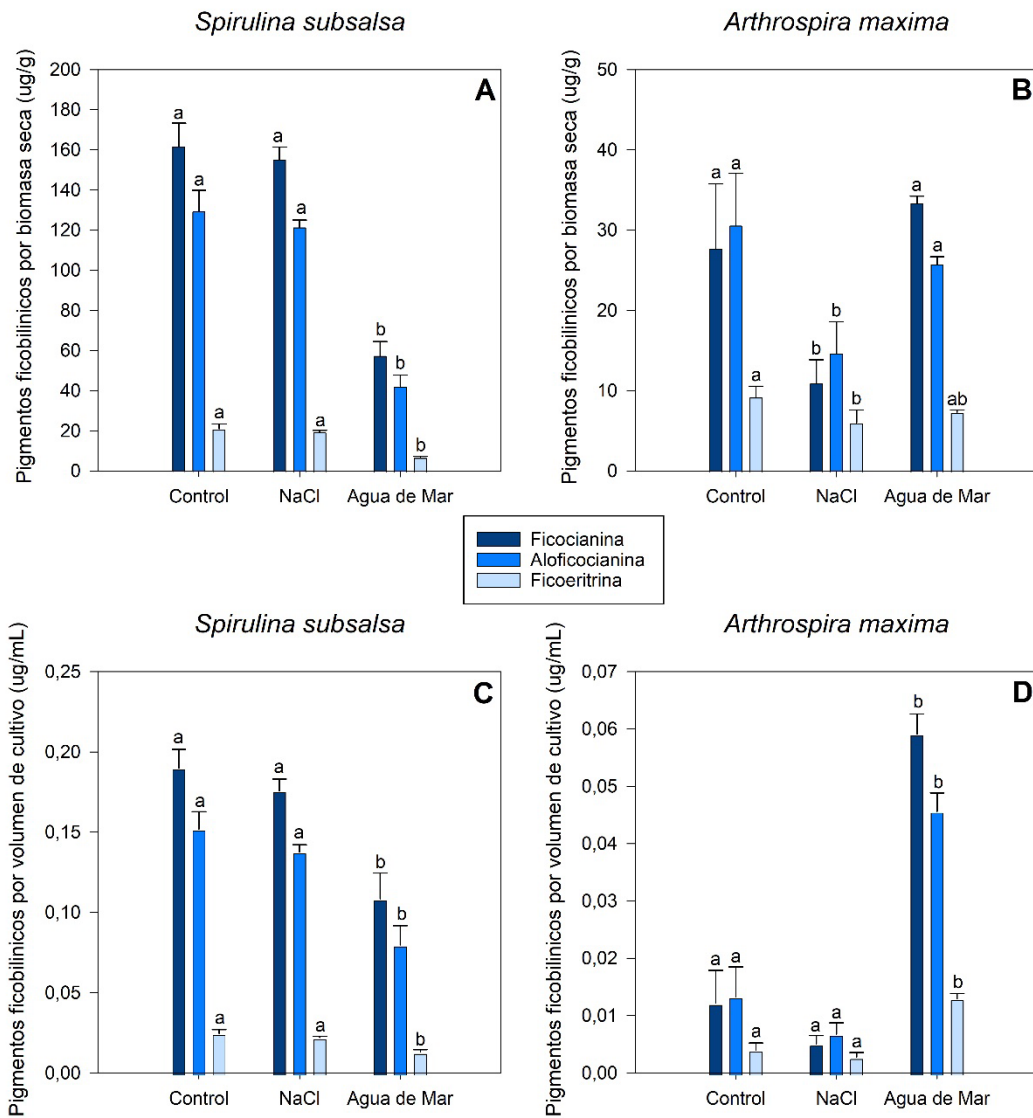


Figura 12.- Pigmentos ficobilínicos por biomasa seca (figuras A y B) y por volumen de cultivo (figuras C y D) obtenido para cada cepa en los tres tratamientos. Donde Control es Medio Zarrouk, NaCl es Medio Zarrouk a 15 PSU en agua destilada y Agua de Mar corresponde a Medio Zarrouk a 15 PSU en Agua de Mar. Las barras representan el promedio de la concentración de pigmentos entre réplicas de un mismo tratamiento y las barras de error representan la desviación estándar entre réplicas. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas del mismo pigmento entre tratamientos de una misma cepa.

Análisis de proteínas:

En *Spirulina*, la concentración de proteínas por gramo de biomasa seca no presentó diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos Control y NaCl, cuyos valores se mantuvieron en un rango cercano al 25–26 % del peso seco, mientras que el tratamiento con Agua de Mar mostró un valor considerablemente menor, en torno al 8 % (Fig. 13 A). Al analizar las proteínas en función del volumen de cultivo, se observó el mismo patrón: los tratamientos Control y NaCl no difirieron entre sí, y el tratamiento con Agua de Mar presentó una reducción significativa (Fig. 13 C).

En el caso de la cepa de *Arthrospira*, el contenido de proteínas por gramo de biomasa seca fue significativamente mayor en el medio Control, con un valor cercano al 12 % del peso seco, mientras que los tratamientos con NaCl y Agua de Mar presentaron concentraciones significativamente menores, ambas en torno al 8 % (Fig. 13 B). Al analizar este parámetro en función del volumen de cultivo, se observó un comportamiento inverso: el tratamiento con Agua de Mar presentó valores significativamente superiores a los tratamientos Control y NaCl, los cuales no difirieron entre sí (Fig. 13 D).

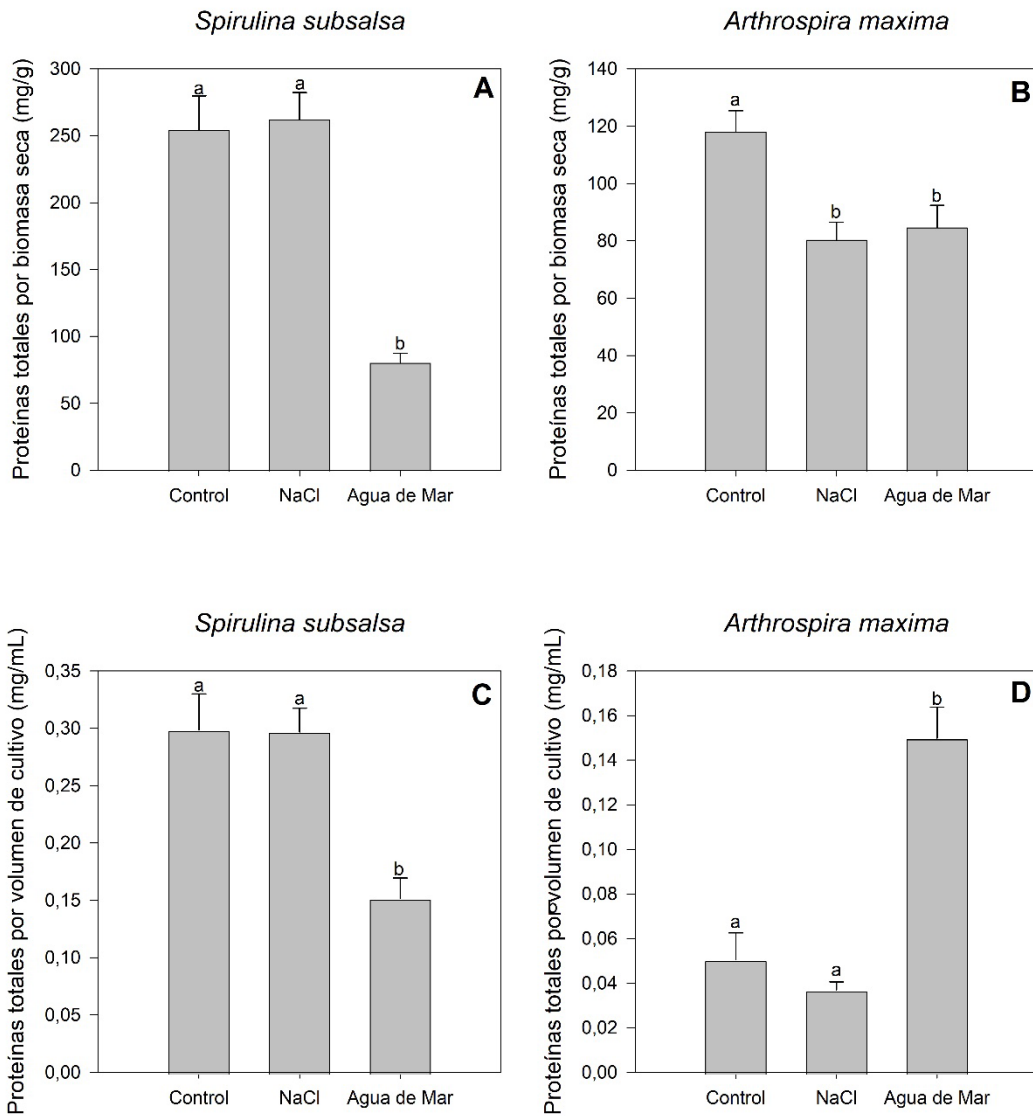


Figura 13.- Proteínas totales por biomasa seca (figuras A y B) y por volumen de cultivo (figuras C y D) obtenido para cada cepa en los tres tratamientos. Donde Control es Medio Zarrouk, NaCl es Medio Zarrouk a 15 PSU en agua destilada y Agua de Mar corresponde a Medio Zarrouk a 15 PSU en Agua de Mar. Las barras representan el promedio de la cantidad de proteínas entre réplicas de un mismo tratamiento y las barras de error representan la desviación estándar entre réplicas. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos de una misma cepa.

Análisis de Carbohidratos:

El contenido de carbohidratos en *Spirulina* por gramo de biomasa seca presentó diferencias significativas entre los tres tratamientos, con una disminución progresiva desde el Control hacia NaCl y finalmente Agua de Mar (Fig. 14, A). En contraste, el contenido de carbohidratos expresado por volumen de cultivo, en el tratamiento Control mostró valores significativamente mayores a los tratamientos con NaCl y Agua de Mar que no presentaron diferencias entre sí (Fig. 14 C).

Respecto al contenido de carbohidratos por gramo de biomasa seca en *Arthrospira*, el tratamiento con NaCl mostró un contenido significativamente superior en comparación con el Control y el medio con Agua de Mar, cuyos valores no tuvieron diferencias significativas (Fig. 14 B). Al expresar el contenido de este metabolito por volumen de cultivo se observaron diferencias significativas entre los tres tratamientos, con una tendencia creciente desde el Control hacia Agua de Mar y alcanzando su valor máximo en NaCl (Fig. 14 D).

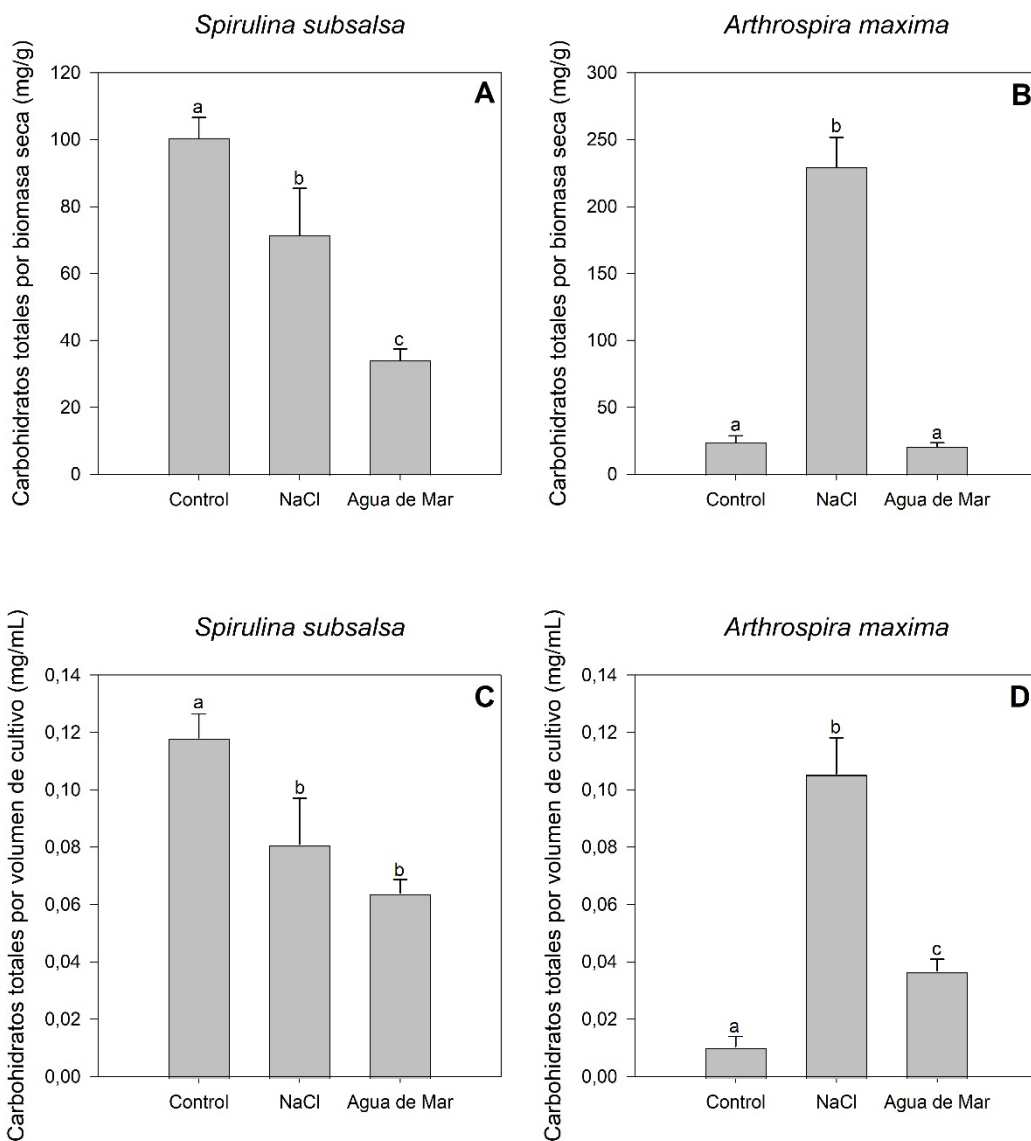


Figura 14.- Carbohidratos totales biomasa seca (figuras A y B) y por volumen de cultivo (figuras C y D) obtenido para cada cepa en los tres tratamientos. Donde Control es Medio Zarrouk, NaCl es Medio Zarrouk a 15 PSU en agua destilada y Agua de Mar corresponde a Medio Zarrouk a 15 PSU en Agua de Mar. Las barras representan el promedio de la cantidad de carbohidratos entre réplicas de un mismo tratamiento y las barras de error representan la desviación estándar entre réplicas. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos de una misma cepa.

Análisis de fenoles totales:

La concentración de compuestos fenólicos por gramo de biomasa seca para *Spirulina* mostró diferencias significativas entre los tres tratamientos, obteniendo la mayor concentración con NaCl, disminuyendo hacia el Control y llegando a su valor más bajo en Agua de Mar (Fig. 15 A). Al evaluar estos compuestos por volumen de cultivo, se observó que NaCl mantuvo un rendimiento significativamente superior, mientras que Control y Agua de Mar resultaron estadísticamente equivalentes (Fig. 15 C).

En *Arthrospira* se registró la mayor concentración de fenoles totales por gramo de biomasa seca y presentó diferencias significativas entre los tres tratamientos, alcanzando el valor más alto en Control, seguido de NaCl y el más bajo en Agua de Mar (Fig. 15 B). Al expresar estos compuestos por volumen de cultivo, se observó que la tendencia cambió: Control y Agua de Mar no difirieron estadísticamente entre sí, mientras que NaCl registró un rendimiento significativamente menor (Fig. 15 D).

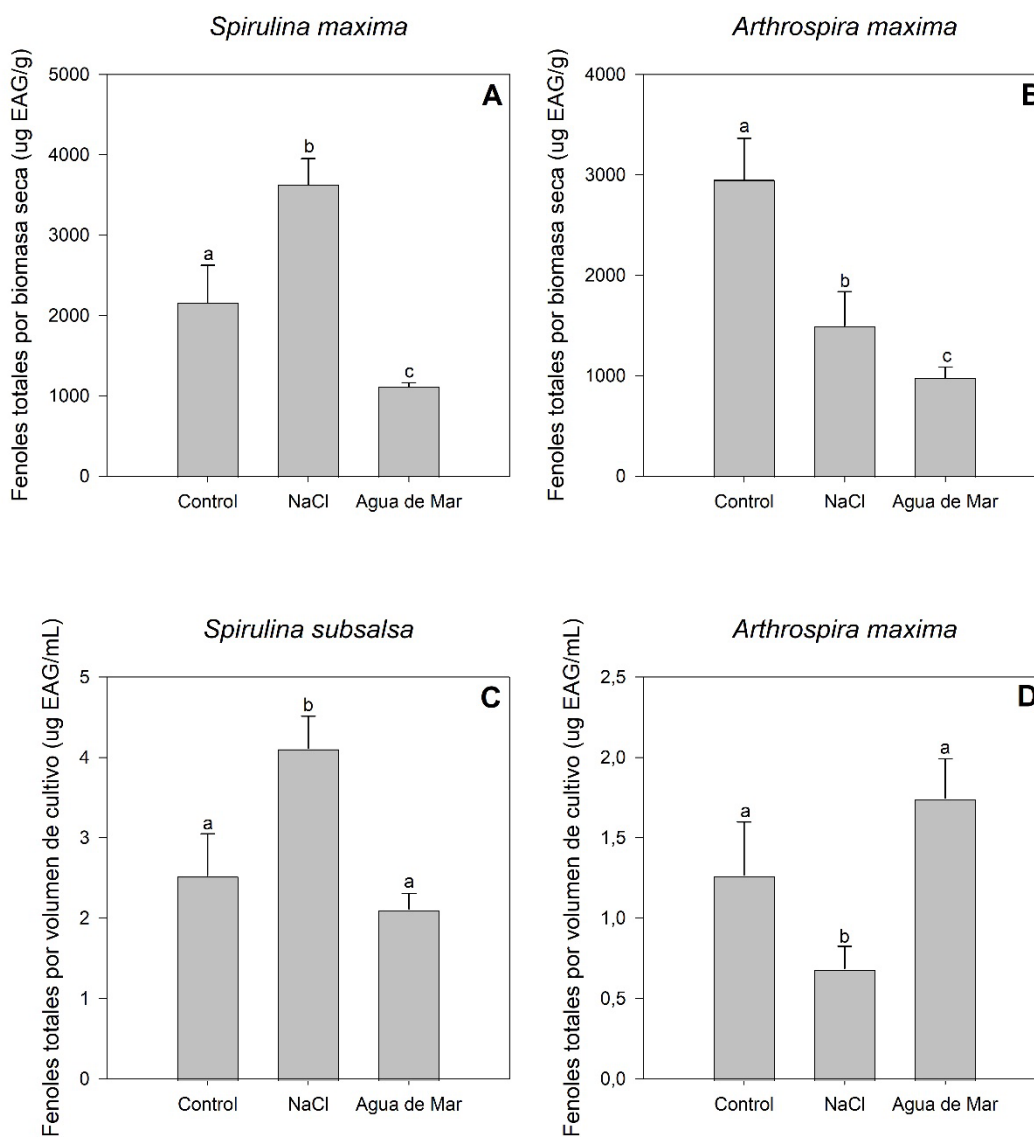


Figura 15.- Fenoles totales por biomasa seca biomasa seca (figuras A y B) y por volumen de cultivo (figuras C y D) obtenido para cada cepa en los tres tratamientos. Donde Control es Medio Zarrouk, NaCl es Medio Zarrouk a 15 PSU en agua destilada y Agua de Mar corresponde a Medio Zarrouk a 15 PSU en Agua de Mar. Las barras representan el promedio de la cantidad de fenoles totales entre réplicas de un mismo tratamiento y las barras de error representan la desviación estándar entre réplicas. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos de una misma cepa.

DISCUSIÓN

La aclimatación es un periodo crítico que permite ajustar la fisiología y metabolismo de las cianobacterias para tolerar gradualmente el aumento de la concentración de sales, minimizando el choque osmótico y iónico (Sinha, 2003). Este ajuste se refleja en resultados como una mayor eficiencia fotosintética, estabilidad de pigmentos y un incremento en el rendimiento y la calidad de la biomasa (Vonshak *et al.*, 1996; Russo *et al.*, 2024). Además, la literatura señala que las cianobacterias pueden requerir periodos prolongados para lograr aclimatarse a condiciones de estrés salino (Zeng & Vonshak, 1998; Leema *et al.*, 2010; Dhiab *et al.*, 2007).

Los géneros *Spirulina* y *Arthrospira* han sido ampliamente investigados debido a su relevancia comercial y potencial biotecnológico atribuidos tanto a sus propiedades nutricionales como a los metabolitos que producen (Furmaniak *et al.*, 2017; Mitra & Mishra, 2019). La identificación taxonómica precisa de las cepas utilizadas en este estudio es fundamental para interpretar sus respuestas al estrés salino. Sin embargo, es importante destacar que la morfología de las especies puede verse afectada por su plasticidad fenotípica y las condiciones ambientales (Van Eykelenburg, 1979; Valério *et al.*, 2009). En este contexto, los estudios de Barriga *et al.*, 2006 y López-Rodríguez *et al.*, 2023, son fundamentales, ya que confirman que las cepas utilizadas en este trabajo pertenecen a los géneros *Spirulina* y *Arthrospira* ("sensu stricto"), por lo tanto, las diferencias en las respuestas al estrés salino observadas se pueden asociar a los respectivos géneros y no a probables errores o inexactitudes en la identificación taxonómica de las cepas.

Parámetros de crecimiento.

Spirulina subsalsa

Históricamente muchos estudios han empleado el término “*Spirulina platensis*” para referirse a especies que hoy se reclasifican como *Arthrospira platensis* (Scheldeman *et al.*, 1999). Aunque se ha determinado que *Spirulina subsalsa* es una microalga con interés biotecnológico (Gómez *et al.*, 2023) no existe información sobre su cultivo en medios de agua dulce y salinos. Hasta la fecha, el único trabajo que incluye a *S. subsalsa* es el de Gómez *et al.*, 2023, quienes reportaron un rendimiento en biomasa seca de 0,21 g/L y la acumulación de metabolitos de interés comercial.

El análisis de los parámetros de crecimiento mostró que la tasa de crecimiento de *S. subsalsa* disminuye notablemente bajo estrés salino (Tabla 1). Esta disminución ha sido reportada constantemente en la literatura (Vonshak *et al.*, 1988; Kebede, 1997; Rosales *et al.*, 2005). Es probable que esta reducción se deba a que el estrés salino activa mecanismos de protección osmótica y antioxidante por sobre el impulso a la división celular (Sinha, 2003). Por otro lado, al evaluar el crecimiento en peso seco, el cultivo en Agua de Mar aumentó significativamente su valor frente al Control y al medio con NaCl, que no difirieron entre sí (Tabla 1). No obstante, parte de este incremento puede explicarse por la acumulación de iones inorgánicos (cenizas) en la biomasa, lo que podría sobreestimar el peso total (Villaró *et al.*, 2023).

La acumulación de metabolitos en *S. subsalsa* sigue la misma tendencia al ser expresados por biomasa seca o por volumen de cultivo entre el Control y NaCl, disminuyendo en Agua de Mar (Figs. 11, 12, 13, 14 y 15). Esta estabilidad en los rendimientos sugiere que *S. subsalsa* pudo activar con éxito sus mecanismos de aclimatación al NaCl de modo que los niveles de metabolitos se mantuvieron estables. Sin embargo, al pasar a agua de mar, la mezcla iónica compleja de este medio (ej. concentración de iones secundarios como Mg^{2+} , Ca^{2+} y SO_4^{2-}) puede haber superado la capacidad de esos mecanismos protectores, provocando un

estrés osmótico y oxidativo más severo que reduciría la eficacia de la fotosíntesis y la síntesis de metabolitos (Latifi *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2022).

Arthrospira maxima

En condiciones de agua dulce, la cepa de *A. maxima* incluida en este estudio ha registrado una tasa de crecimiento de 0,119 div/día y un peso seco de 1,56 g/L (López-Rodríguez *et al.*, 2023). Nuestros cultivos en agua dulce mostraron rendimientos inferiores (Tabla 1), probablemente como consecuencia de un estrés por dilución: la inoculación inicial de un cultivo a baja densidad celular retrasa el inicio del crecimiento y por ende los parámetros tasa de crecimiento y densidad celular máxima.

La semejanza entre la tasa de crecimiento en Control y el tratamiento con NaCl (Tabla 1) sugiere un nivel tolerancia de *A. maxima* al NaCl puro respaldado por la activación de mecanismos de acumulación de osmoprotectores. Estudios en cepas afines han demostrado que concentraciones moderadas de sal inducen la acumulación de solutos compatibles (trehalosa, glicina betaína) y la estabilización de la membrana, manteniendo prácticamente inalterada la división celular siempre que no haya limitación de micronutrientes (Leema *et al.*, 2010; Markou *et al.*, 2023). Este ajuste osmorregulador desvía energía hacia la síntesis de protectores internos sin comprometer la proliferación, lo que explica la similitud en la tasa de crecimiento en ambos tratamientos (Tabla 1).

En contraste, los cultivos en Agua de Mar evidenciaron un aumento en la tasa de crecimiento de casi 5 veces respecto al Control (Tabla 1), superando incluso el valor de $0,119 \pm 0,01$ div/día documentado por López-Rodríguez *et al.*, 2023. Este efecto se atribuye a la disponibilidad de oligoelementos (Fe, Mn, Zn, Mo) en el agua de mar que actúan como cofactores en enzimas fotosintéticas y antioxidantes (Tsunekawa *et al.*, 2009). Markou *et al.*, 2023 y Russo *et al.* 2024, también registraron mejoras significativas de la tasa de crecimiento en una cepa de *A. platensis* aclimatada a medios marinos, lo que refuerza el potencial de usar

agua de mar para incrementar la productividad de *A. maxima* al mitigar el estrés iónico y suministrar micronutrientes esenciales.

El peso seco en Agua de Mar aumentó hasta cuatro veces respecto al tratamiento Control en *A. maxima* (Tabla 1), lo que indica que una mayor velocidad de multiplicación celular se traduce en una concentración de biomasa más alta al final de la fase exponencial en esta cepa. Russo *et al.*, 2024, reportaron un valor de 3,7 g/L en cultivos mixotróficos con agua de mar, consolidando la idea de que la combinación de micronutrientes y la reducción del estrés osmótico optimiza la producción de biomasa.

Aunque los contenidos de pigmentos, proteínas y fenoles por gramo de biomasa seca no difirieron o disminuyeron entre el Control y el tratamiento con Agua de Mar en *A. maxima*, el rendimiento volumétrico en Agua de Mar supera con creces tanto al Control como a NaCl en la producción total de pigmentos (clorofila *a*, carotenoides y ficobilínicos), de proteínas y de fenoles por mililitro de cultivo (Figs. 11, 12, 13 y 15). Esto indica que, pese a un contenido celular ligeramente menor de ciertos compuestos, la mayor densidad celular y producción de biomasa en Agua de Mar compensa ampliamente esa merma específica, resultando en un rendimiento global superior.

Por último, cabe señalar que ninguno de los tratamientos alcanzó la fase de crecimiento estacionaria, por lo que los valores máximos de densidad celular y peso seco podrían estar subestimados. De este modo, los parámetros de crecimiento descritos reflejan únicamente el desempeño observado con el diseño experimental descrito de esta cepa.

Composición bioquímica

Spirulina subsalsa

Bajo tratamiento con NaCl, la concentración de clorofila *a* y carotenoides se mantuvo cercana a los valores del Control (Fig. 11 A), lo cual concuerda con lo

descrito por Vonshak *et al.*, 1988, quienes señalaron que *A. platensis* fue capaz de conservar su actividad fotosintética tras un choque osmótico inducido por NaCl. De igual manera, los pigmentos ficobilínicos (ficocianina, aloficocianina y ficoeritrina) permanecieron estables en los distintos tratamientos (Fig. 12 A), lo que sugiere la conservación de los complejos encargados de la captación de luz en condiciones de salinidad moderada (Sharma *et al.*, 2014). Este patrón de estabilidad se extendió al contenido de proteínas (Fig. 13 A), demostrando que la cianobacteria es capaz de mantener íntegra su maquinaria de síntesis de proteínas (incluidas las ficobiliproteínas) frente a un estrés osmótico inducido únicamente por NaCl (Blumwald & Tel-Or, 1982).

Por otro lado, los niveles de fenoles totales aumentaron de forma significativa en el tratamiento NaCl (Fig. 15 A), lo que no solo refleja una respuesta antioxidante generalizada, sino también la activación específica de rutas destinadas a contrarrestar el exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS) potencialmente inducidas por estrés (Singh *et al.*, 2014). De manera inesperada, se observó que el tratamiento con NaCl inducía una reducción considerable en el contenido de carbohidratos totales en comparación con el Control (Fig. 14 A), un patrón no documentado en cianobacterias dada la tendencia general del estrés salino a favorecer su acumulación (Leema *et al.*, 2010; Ravelonandro *et al.*, 2011). Sin embargo, estudios en microalgas verdes del género *Dunaliella* han reportado un agotamiento de los polisacáridos de reserva bajo alta salinidad, atribuible a la reorientación del flujo metabólico hacia la síntesis de osmoprotectores de bajo peso molecular (Sinha, 2003; Khatoon *et al.*, 2017), lo cual podría estar ocurriendo en este caso.

En contraste a lo anterior, en esta cepa, el tratamiento con Agua de Mar provocó una reducción generalizada en los metabolitos evaluados. Esta respuesta más severa parece originarse en un estrés osmótico multifactorial, intensificado por la presencia de iones secundarios en el agua de mar como Ca^{2+} , Mg^{2+} y SO_4^{2-} que pueden afectar la integridad de las membranas fotosintéticas (Yang *et al.*, 2020). A diferencia del NaCl puro, la complejidad de la matriz iónica

del agua de mar podría superar la capacidad de respuesta de los sistemas osmoprotectores y antioxidantes de *S. subsalsa*, lo que explicaría su mayor vulnerabilidad frente a este tratamiento.

Arthrospira maxima

Al someter la cepa de *A. maxima* al tratamiento con NaCl se observó una notable disminución en la concentración de clorofila *a* (Fig. 11 B), lo que indica que el choque osmótico compromete la integridad de la maquinaria fotosintética (Zhang *et al.*, 2010). De igual forma, la reducción en el contenido de carotenoides (Fig. 11 B) concuerda con estudios previos que muestran que el estrés iónico induce la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), promoviendo la degradación de estos compuestos esenciales para la fotoprotección (Latifi *et al.*, 2009). Este patrón se replica en la disminución de los pigmentos ficobilínicos (ficocianina, aloficocianina y ficoeritrina) que se vieron afectados bajo el tratamiento NaCl (Fig. 12 B), sugiriendo que el choque osmótico prolongado puede desestabilizar los complejos formadores de ficobilisomas (Sinha, 2003).

Paralelamente, el contenido de proteínas (Fig. 13 B) mostró una caída significativa que es coherente con la necesidad de redirigir energía hacia las bombas de expulsión de Na⁺ y los sistemas de reparación celular (Hong *et al.*, 2023). En contraste, se observó un marcado incremento en la acumulación de carbohidratos totales (Fig. 14 B), lo que refuerza la hipótesis de que el estrés osmótico activa rutas metabólicas orientadas a la síntesis de polisacáridos de reserva para equilibrar el potencial celular y preservar su viabilidad (Markou *et al.*, 2023).

En el cultivo en Agua de Mar de *A. maxima*, la concentración de clorofila *a* no varió significativamente respecto al Control (Fig. 11 B); sin embargo, se observó una leve disminución en el contenido de carotenoides (Fig. 11 B), un resultado que ha sido reportado por Markou *et al.*, 2023. De igual forma que la clorofila *a*, los pigmentos ficobilínicos se mantuvieron estables en Agua de Mar

(Fig. 12 B), estos efectos han sido reportados por Hong *et al.*, 2023, quienes evaluaron una cepa de *A. platensis* previamente aclimatada, lo que sugiere que la complejidad de la matriz iónica no compromete la síntesis de pigmentos en esta cepa.

Por su parte, el contenido de proteínas también presentó una disminución significativa en el tratamiento con Agua de Mar (Fig. 13 B), lo cual es congruente con el mayor gasto energético requerido para la expulsión de Na⁺ y reparación celular. En contraste, la cantidad de carbohidratos se mantuvo en niveles semejantes al Control (Fig. 14 B), tal como lo documentaron Materassi *et al.*, 1984 y Villaró *et al.*, 2023, lo que indica que el medio marino permite mantener reservas de polisacáridos sin tener que recurrir a vías adicionales de osmoprotección.

Finalmente, los fenoles totales mostraron una caída importante (Fig. 15 B), esto junto a la reducción de carotenoides implica un posible refuerzo de la defensa antioxidante, la cual consume estos compuestos con el fin de neutralizar la elevada generación de ROS en condiciones de estrés. Este hecho concuerda con la disminución de estos compuestos observada en el tratamiento con NaCl y replicando la reducción documentada en *A. platensis* bajo altas salinidades (Uzlasir *et al.*, 2023).

Este perfil de conservación de pigmentos y polisacáridos, caída moderada de proteínas y consumo de metabolitos antioxidantes, sugiere que la matriz iónica equilibrada y el aporte de oligoelementos (Fe, Mn, Zn, Mo) en el agua de mar estabilizan la homeostasis iónica y nutricional en esta cepa, reduciendo las posibilidades de un choque osmótico brusco y permitiendo una activación gradual de bombas iónicas y síntesis de osmoprotectores y antioxidantes (Tsunekawa *et al.*, 2009; Sadvakasova *et al.*, 2022).

CONCLUSIONES

1.- Ambas cepas demostraron ser capaces de crecer en agua de mar (diluida a 15 PSU). *Arthrospira maxima* (CCM-UdeC 040) logró mantener su crecimiento e incluso mejoró algunos parámetros bioquímicos, lo que confirma su potencial para ser cultivada exitosamente en medios salinos, preparados a base de agua de mar. En cambio, *Spirulina subsalsa* (CCM-UdeC 050) mostró una disminución en la mayoría de sus parámetros, tanto de crecimiento como bioquímicos, al ser cultivada a salinidades mayores a la del agua dulce.

2.- Ninguna de las dos cepas logró completar su aclimatación a la salinidad del agua de mar (35 PSU). Sin embargo, ambas cepas fueron capaces de tolerar salinidades de hasta 15 PSU, lo que sugiere un potencial de aclimatación que podría ser optimizado con un protocolo de aclimatación más lento y gradual.

3.- Ambas cepas mostraron cambios en sus parámetros de crecimiento al ser expuestas a condiciones de alta salinidad. *Arthrospira maxima* (CCM-UdeC 040) evidenció un aumento significativo de la biomasa seca bajo NaCl y mantuvo un buen rendimiento en Agua de Mar, lo que sugiere una respuesta positiva al estrés salino. En contraste, *Spirulina subsalsa* (CCM-UdeC 050) presentó una disminución en su crecimiento con el aumento de la salinidad, especialmente tras el cambio a Agua de Mar. Por tanto, se confirma que ambas cepas modifican su comportamiento de crecimiento frente a condiciones salinas, aunque con respuestas opuestas.

4.- Ambas cepas mostraron modificaciones significativas en al menos algunos de los parámetros bioquímicos evaluados al crecer en condiciones salinas. *Spirulina subsalsa* (CCM-UdeC 050) experimentó una disminución de sus pigmentos (clorofila *a*, carotenoides y ficobiliproteínas), proteínas y carbohidratos, aunque aumentó su contenido de fenoles totales bajo NaCl, lo que sugiere una estrategia antioxidante compensatoria. En cambio, *Arthrospira maxima* (CCM-UdeC 040) mantuvo relativamente estable la clorofila *a* y logró recuperar su contenido de

pigmentos ficobilínicos en Agua de ar; también aumentó sus carbohidratos bajo NaCl, aunque disminuyeron los fenoles totales con la salinidad. Esto confirma que ambas cepas responden al estrés salino activando distintas estrategias de ajuste metabólico según sus atributos de tolerancia.

REFERENCIAS

- Algaebase. (2024). *Cyanobacteria*. Cyanobacteria.
<https://www.algaebase.org/browse/taxonomy/#4305>
- Almahrouqi, H. A., Naqqiuddin, M. A., Achankunju, J., Omar, H., & Ismail, A. (2012). Different salinity effects on the mass cultivation of *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) under sheltered outdoor conditions in Oman and Malaysia. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 28(1).
- Barriga, A., Gomez, P. I., Gonzalez, M. A., & Montoya, R. (2006). Analyses of ribosomal sequences and biotechnological potential as sources of C-phycoerythrin in one Chilean strain of *Spirulina* and two foreign strains of *Arthrospira* (Cyanophyceae). *Cryptogamie, Algologie*, 27(2).
- Baurain, D., Renquin, L., Grubisic, S., Scheldeman, P., Belay, A., & Wilmotte, A. (2002). Remarkable conservation of internally transcribed spacer sequences of *Arthrospira* ("Spirulina") (Cyanophyceae, Cyanobacteria) strains from four continents and of recent and 30-year-old dried samples from Africa. *Journal of Phycology*, 38(2). <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2002.01010.x>
- Bemal, S., & Anil, A. C. (2018). Effects of salinity on cellular growth and exopolysaccharide production of freshwater *Synechococcus* strain CCAP1405. *Journal of Plankton Research*, 40(1), 46–58.
<https://doi.org/10.1093/plankt/fbx064>
- Bennett, A., & Bogobad, L. (1973). Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green algae. *Journal of Cell Biology*, 58(2).
<https://doi.org/10.1083/jcb.58.2.419>
- Bermejo, R. R., Álvarez-Pez, J. M., Fernández, F. G. A., & Grima, E. M. (2002). Recovery of pure b-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium*

cruentum. *Journal of Biotechnology*, 93(1). [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00385-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00385-6)

Blanco-Rivero, A., Leganés, F., Fernández-Valiente, E., Calle, P., & Fernández-Piñas, F. (2005). *mrpA*, a gene with roles in resistance to Na⁺ and adaptation to alkaline pH in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120. *Microbiology*, 151(5). <https://doi.org/10.1099/mic.0.27848-0>

Blumwald, E., & Tel-Or, E. (1982). Osmoregulation and cell composition in salt-adaptation of *Nostoc muscorum*. *Archives of Microbiology*, 132(2), 168–172. <https://doi.org/10.1007/BF00508725>

Carpine, R., & Sieber, S. (2021). Antibacterial and antiviral metabolites from cyanobacteria: Their application and their impact on human health. *Current Research in Biotechnology*, 3, 65–81. <https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2021.03.001>

Dhiab, R. Ben, Ouada, H. Ben, Boussetta, H., Franck, F., Elabed, A., & Brouers, M. (2007). Growth, fluorescence, photosynthetic O₂ production and pigment content of salt adapted cultures of *Arthrospira (Spirulina) platensis*. *Journal of Applied Phycology*, 19(4), 293–301. <https://doi.org/10.1007/s10811-006-9113-z>

Faucher, O., Coupal, B., & Leduy, A. (1979). Utilization of seawater-urea as a culture medium for *Spirulina maxima*. *Canadian Journal of Microbiology*, 25(6), 752–759. <https://doi.org/10.1139/m79-109>

Fuenmayor, G., Jonte, L., Rosales, L. N., & Morales, E. (2009). Efecto de la salinidad y concentración de nutrientes sobre el crecimiento y composición bioquímica de la cianobacteria autóctona *Oscillatoria* sp. *CIENCIA*, 17, 50–57. <https://www.researchgate.net/publication/216459834>

Fukaya, F., Promden, W., Hibino, T., Tanaka, Y., Nakamura, T., & Takabe, T. (2009). An Mrp-like cluster in the halotolerant cyanobacterium *Aphanothece*

halophytica functions as a Na⁺/H⁺ antiporter. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(20). <https://doi.org/10.1128/AEM.01387-09>

Furmaniak, M. A., Misztak, A. E., Franczuk, M. D., Wilmotte, A., Waleron, M., & Waleron, K. F. (2017). Edible cyanobacterial genus *Arthrospira*: Actual state of the art in cultivation methods, genetics, and application in medicine. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 8, Issue DEC). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02541>

Geitler, L. (1932). Cyanophyceae. In *Rabenhorst's Kryptogamen-Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz* (Issue 3278, p. 1356). Akademische Verlagsgesellschaft. <https://doi.org/10.1038/130292a0>

Gómez, P. I., Mayorga, J., Flaig, D., Castro-Varela, P., Jaupi, A., Ulloa, P. A., Soto-Bartierra, J., Henríquez, V., & Rojas, V. (2023). Looking beyond *Arthrospira*: Comparison of antioxidant and anti-inflammatory properties of ten cyanobacteria strains. *Algal Research*, 74. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103182>

Guillard, R. (1973). Culture Methods and Growth Measurements In *Handbook of Phycological Methods*. (E. Gannt, Ed.; pp. 289–311). Cambridge University Press.

Hagemann, M. (2013). Genomics of Salt Acclimation: Synthesis of Compatible Solutes among Cyanobacteria. In *Advances in Botanical Research* (Vol. 65, pp. 27–55). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394313-2.00002-0>

Hernández-Pérez, A., & Labbé, J. I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. En *Revista de Biología Marina y Oceanografía* (Vol. 49, Issue 2). <https://doi.org/10.4067/S0718-19572014000200001>

Hong, D. D., Hien, H. T. M., Thom, L. T., Ha, N. C., Huy, L. A., Thu, N. T. H., Cuong, N., Tang, D. Y. Y., & Show, P. L. (2023). Transcriptome Analysis of *Spirulina platensis* sp. at Different Salinity and Nutrient Compositions for

- Sustainable Cultivation in Vietnam. *Sustainability (Switzerland)*, 15(15), 11906. <https://doi.org/10.3390/SU151511906/S1>
- Ijaz, S., & Hasnain, S. (2016). Antioxidant potential of indigenous cyanobacterial strains in relation with their phenolic and flavonoid contents. *Natural Product Research*, 30(11). <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1053088>
- Ismail, M. M. S., Piercey-Normore, M. D., & Rampitsch, C. (2018). Proteomic analyses of the cyanobacterium *Arthrospira (Spirulina) platensis* under iron and salinity stress. *Environmental and Experimental Botany*, 147, 63–74. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.11.013>
- Jaki, B., Heilmann, J., & Sticher, O. (2000). New Antibacterial Metabolites from the Cyanobacterium *Nostoc commune*. *Journal of Natural Products*, 63(9), 1283–1285. <https://doi.org/10.1021/np000033s>
- Jonte, L., Rosales, N., Briceño, B., & Morales, E. (2003). La salinidad y la irradiación modulan el crecimiento de la cianobacteria *Synechocystis minuscula* en cultivos discontinuos. *Multiciencias*, 3(1). <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=90430102>
- K. Y. Lim, D., & M. Schenk, P. (2017). Microalgae selection and improvement as oil crops: GM vs non-GM strain engineering. *AIMS Bioengineering*, 4(1), 151–161. <https://doi.org/10.3934/bioeng.2017.1.151>
- Kebede, E. (1997). Response of *Spirulina platensis* (= *Arthrospira fusiformis*) from Lake Chitu, Ethiopia, to salinity stress from sodium salts. *Journal of Applied Phycology*, 9(6). <https://doi.org/10.1023/A:1007949021786>
- Khatoon, H., Haris, N., Banerjee, S., Rahman, N. A., Begum, H., Mian, S., Abol-Munafi, A. B., & Endut, A. (2017). Effects of different salinities on the growth and proximate composition of *Dunaliella* sp. isolated from South China Sea at different growth phases. *Process Safety and Environmental Protection*, 112, 280–287. <https://doi.org/10.1016/J.PSEP.2017.04.010>

- Kirsch, F., Klähn, S., & Hagemann, M. (2019). Salt-Regulated Accumulation of the Compatible Solutes Sucrose and Glucosylglycerol in Cyanobacteria and Its Biotechnological Potential. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 10). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02139>
- Lamela, T., & Márquez-Rocha, F. (2000). Phycocyanin production in seawater culture of *Arthrospira maxima*. *Ciencias Marinas*, 26(4), 607–619. <https://doi.org/10.7773/cm.v26i4.619>
- Latifi, A., Ruiz, M., & Zhang, C. C. (2009). Oxidative stress in cyanobacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(2), 258–278. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6976.2008.00134.X>
- Leema, M. J. T., Kirubakaran, R., Vinithkumar, N. V., Dheenan, P. S., & Karthikayulu, S. (2010). High value pigment production from *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultured in seawater. *Bioresource Technology*, 101(23), 9221–9227. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.120>
- Liu, C., Li, L.-J., Wu, C.-Y., Guo, K.-N., & Li, J.-H. (2016). Growth and antioxidant production of *Spirulina* in different NaCl concentrations. *Biotechnology Letters*, 38(7), 1089–1096. <https://doi.org/10.1007/s10529-016-2087-2>
- López-Rodríguez, A., Mayorga, J., Flaig, D., Fuentes, G., Cotabarren, J., Obregón, W. D., & Gómez, P. I. (2021). Comparison of two strains of the edible cyanobacteria *Arthrospira*: Biochemical characterization and antioxidant properties. *Food Bioscience*, 42. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101144>
- López-Rodríguez, A., Mayorga, J., Flaig, D., Fuentes, G., Hernández, V., & Gómez, P. I. (2023). Genetic characterization and assessment of the biotechnological potential of strains belonging to the genus *Arthrospira/Limnospira* (Cyanophyceae) deposited in different culture collections. *Algal Research*, 73, 103164. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2023.103164>

- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1). [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)52451-6)
- Markou, G., Kougia, E., Arapoglou, D., Chentir, I., Andreou, V., & Tzovenis, I. (2023). Production of *Arthrospira platensis*: Effects on Growth and Biochemical Composition of Long-Term Acclimatization at Different Salinities. *Bioengineering*, 10(2), 233. <https://doi.org/10.3390/bioengineering10020233>
- Mata, T. M., Martins, A. A., & Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 14, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>
- Materassi, R., Tredici, M., & Balloni, W. (1984). *Spirulina* culture in sea-water. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 19(6), 384–386. <https://doi.org/10.1007/BF00454374>
- Mitra, M., & Mishra, S. (2019). Multiproduct biorefinery from *Arthrospira* spp. towards zero waste: Current status and future trends. In *Bioresource Technology* (Vol. 291). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121928>
- Naciones Unidas. (2021). Informe Mundial de las Naciones Unidas sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos 2021: El valor del agua. In *Unesco*. <https://unesdoc.unesco.org/ark:/48223/pf0000378890>
- Novoveská, L., Ross, M. E., Stanley, M. S., Pradelles, R., Wasiolek, V., & Sassi, J. F. (2019). Microalgal carotenoids: A review of production, current markets, regulations, and future direction. In *Marine Drugs* (Vol. 17, Issue 11). <https://doi.org/10.3390/md17110640>
- ODEPA. (2022, May 2). *Agua*. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias. <https://www.odepa.gob.cl/sustentabilidad/agricultura-sustentable/agua>

- Oliveira, C. Y. B., Jacob, A., Nader, C., Oliveira, C. D. L., Matos, Â. P., Araújo, E. S., Shabnam, N., Ashok, B., & Gálvez, A. O. (2022). An overview on microalgae as renewable resources for meeting sustainable development goals. *Journal of Environmental Management*, 320, 115897. <https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2022.115897>
- Pade, N., Michalik, D., Ruth, W., Belkin, N., Hess, W. R., Berman-Frank, I., & Hagemann, M. (2016). Trimethylated homoserine functions as the major compatible solute in the globally significant oceanic cyanobacterium *Trichodesmium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(46). <https://doi.org/10.1073/pnas.1611666113>
- Paliwal, C., Mitra, M., Bhayani, K., Bharadwaj, S. V. V., Ghosh, T., Dubey, S., & Mishra, S. (2017). Abiotic stresses as tools for metabolites in microalgae. *Bioresource Technology*, 244, 1216–1226. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2017.05.058>
- Prabakaran, G., Sampathkumar, P., Kavisri, M., & Moovendhan, M. (2020). Extraction and characterization of phycocyanin from *Spirulina platensis* and evaluation of its anticancer, antidiabetic and anti-inflammatory effect. *International Journal of Biological Macromolecules*, 153, 256–263. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.009>
- Qiao, T., Zhao, Y., Zhong, D., & Yu, X. (2021). Hydrogen peroxide and salinity stress act synergistically to enhance lipids production in microalga by regulating reactive oxygen species and calcium. *Algal Research*, 53, 102017. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102017>
- Ramírez-Moreno, L., & Olvera-Ramírez, R. (2006). Uso tradicional y actual de *Spirulina* sp. (*Arthrospira* sp.). *Interciencia*, 31(9).
- Ravelonandro, P. H., Ratianarivo, D. H., Joannis-Cassan, C., Isambert, A., & Raherimandimby, M. (2011). Improvement of the growth of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* from Toliara (Madagascar): Effect of agitation, salinity

- and CO₂ addition. *Food and Bioproducts Processing*, 89(3), 209–216.
<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2010.04.009>
- Romay, Ch., Gonzalez, R., Ledon, N., Ramirez, D., & Rimbau, V. (2003). C-Phycocyanin: A Biliprotein with Antioxidant, Anti-Inflammatory and Neuroprotective Effects. *Current Protein & Peptide Science*, 4(3), 207–216.
<https://doi.org/10.2174/1389203033487216>
- Romero Maza, L., Guevara, M., & Bernal, J. F. (2018). Crecimiento y pigmentos de *Spirulina subsalsa* cultivada a diferentes salinidades y concentraciones de nitrógeno. *Revista Mutis*, 8(2), 25–36.
<https://doi.org/10.21789/22561498.1402>
- Rosales, N., Ortega, J., Mora, R., & Morales, E. (2005). Influencia de la salinidad sobre crecimiento y composición bioquímica de la cianobacteria *Synechococcus* sp. *Ciencias Marinas*, 31(2), 349–355.
<https://doi.org/10.7773/cm.v31i2.59>
- Russo, N. P., Ballotta, M., Usai, L., Torre, S., Giordano, M., Fais, G., Casula, M., Dessì, D., Nieri, P., Damergi, E., Lutz, G. A., & Concas, A. (2024). Mixotrophic Cultivation of *Arthrospira platensis* (*Spirulina*) under Salt Stress: Effect on Biomass Composition, FAME Profile and Phycocyanin Content. *Marine Drugs*, 22(9), 381. <https://doi.org/10.3390/md22090381>
- Sadvakasova, A. K., Kossalbayev, B. D., Token, A. I., Bauenova, M. O., Wang, J., Zayadan, B. K., Balouch, H., Alwasel, S., Leong, Y. K., Chang, J. S., & Allakhverdiev, S. I. (2022). Influence of Mo and Fe on Photosynthetic and Nitrogenase Activities of Nitrogen-Fixing Cyanobacteria under Nitrogen Starvation. *Cells* 2022, Vol. 11, Page 904, 11(5), 904.
<https://doi.org/10.3390/CELLS11050904>
- Safafar, H., Wagenen, J. Van, Møller, P., & Jacobsen, C. (2015). Carotenoids, phenolic compounds and tocopherols contribute to the antioxidative

properties of some microalgae species grown on industrial wastewater. *Marine Drugs*, 13(12). <https://doi.org/10.3390/md13127069>

Scheldeman, P., Baurain, D., Bouhy, R., Scott, M., Mühling, M., Whitton, B. A., Belay, A., & Wilmotte, A. (1999). *Arthrospira* ("Spirulina") strains from four continents are resolved into only two clusters, based on amplified ribosomal DNA restriction analysis of the internally transcribed spacer. *FEMS Microbiology Letters*, 172(2), 213–222. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(99\)00017-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(99)00017-8)

Sharma, G. (2014). Effect of Carbon Content, Salinity and pH on *Spirulina platensis* for Phycocyanin, Allophycocyanin and Phycoerythrin Accumulation. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 06(04). <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000144>

Shoumskaya, M. A., Paithoonrangsarid, K., Kanesaki, Y., Los, D. A., Zinchenko, V. V., Tanticharoen, M., Suzuki, I., & Murata, N. (2005). Identical Hik-Rre systems are involved in perception and transduction of salt signals and hyperosmotic signals but regulate the expression of individual genes to different extents in *Synechocystis*. *Journal of Biological Chemistry*, 280(22). <https://doi.org/10.1074/jbc.M412174200>

Sinetova, M. A., Kupriyanova, E. V., & Los, D. A. (2024). *Spirulina/Arthrospira/Limnospira*—Three Names of the Single Organism. *Foods*, 13(17), 2762. <https://doi.org/10.3390/foods13172762>

Singh, D. P., Prabha, R., Meena, K. K., Sharma, L., & Sharma, A. K. (2014). Induced Accumulation of Polyphenolics and Flavonoids in Cyanobacteria under Salt Stress Protects Organisms through Enhanced Antioxidant Activity. *American Journal of Plant Sciences*, 05(05), 726–735. <https://doi.org/10.4236/AJPS.2014.55087>

Singh, R. P., Yadav, P., Kujur, R., Pandey, K. D., & Gupta, R. K. (2022). Cyanobacteria and salinity stress tolerance. In *Cyanobacterial Lifestyle and*

- its Applications in Biotechnology* (pp. 253–280). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90634-0.00003-2>
- Sinha, R. P. (2003). Stress Responses in Cyanobacteria. *Modern Trends in Applied Aquatic Ecology*, 201–218. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0221-0_9
- Sinha, R. P., & Häder, D. P. (2008). UV-protectants in cyanobacteria. In *Plant Science* (Vol. 174, Issue 3). <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2007.12.004>
- Strickland, J., & Parsons, T. (1968). A practical handbook of seawater analysis, 1972. *Fisheries Research Board of Canada, Ottawa*, 167.
- Swapnil, P., & Rai, A. K. (2018). Physiological responses to salt stress of salt-adapted and directly salt (NaCl and NaCl+Na₂SO₄ mixture)-stressed cyanobacterium *Anabaena fertilissima*. *Protoplasma*, 255(3). <https://doi.org/10.1007/s00709-018-1205-5>
- Tredici, Mario R., Papuzzo, T., & Tomaselli, L. (1986). Outdoor mass culture of *Spirulina maxima* in sea-water. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 24(1), 47–50. <https://doi.org/10.1007/BF00266284>
- Tsunekawa, K., Shijuku, T., Hayashimoto, M., Kojima, Y., Onai, K., Morishita, M., Ishiura, M., Kuroda, T., Nakamura, T., Kobayashi, H., Sato, M., Toyooka, K., Matsuoka, K., Omata, T., & Uozumi, N. (2009). Identification and characterization of the Na⁺/H⁺ antiporter NhaS3 from the thylakoid membrane of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Journal of Biological Chemistry*, 284(24). <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.001875>
- Uzlasir, T., Selli, S., & Kelebek, H. (2023). Effect of Salt Stress on the Phenolic Compounds, Antioxidant Capacity, Microbial Load, and In Vitro Bioaccessibility of Two Microalgae Species (*Phaeodactylum tricornutum* and *Spirulina platensis*). *Foods*, 12(17). <https://doi.org/10.3390/FOODS12173185>,

- Valério, E., Chambel, L., Paulino, S., Faria, N., Pereira, P., & Tenreiro, R. (2009). Molecular identification, typing and traceability of cyanobacteria from freshwater reservoirs. *Microbiology*, *155*(2), 642–656. <https://doi.org/10.1099/MIC.0.022848-0>,
- Van Eykelenburg, C. (1979). The ultrastructure of *Spirulina platensis* in relation to temperature and light intensity. *Antonie van Leeuwenhoek*, *45*(3), 369–390. <https://doi.org/10.1007/BF00443277/METRICS>
- Verma, E., Singh, S., Niveshika, & Mishra, A. K. (2019). Salinity-induced oxidative stress-mediated change in fatty acids composition of cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7942. *International Journal of Environmental Science and Technology*, *16*(2), 875–886. <https://doi.org/10.1007/s13762-018-1720-0>
- Vijayakumar, S., & Menakha, M. (2015). Pharmaceutical applications of cyanobacteria—A review. *Journal of Acute Medicine*, *5*(1), 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.jacme.2015.02.004>
- Villaró, S., García-Vaquero, M., Morán, L., Álvarez, C., Cabral, E. M., & Lafarga, T. (2023). Effect of seawater on the biomass composition of *Spirulina* produced at a pilot-scale. *New Biotechnology*, *78*, 173–179. <https://doi.org/10.1016/J.NBT.2023.11.002>
- Vonshak, A. (2002). *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, cell-biology and biotechnology*. Editorial Taylor & Francis. <https://www.bashanfoundation.org/contributions/Vonshak-A/1997-.Vonshak-S.pdf>
- Vonshak, A., Guy, R., & Guy, M. (1988). The response of the filamentous cyanobacterium *Spirulina platensis* to salt stress. *Archives of Microbiology*, *150*(5), 417–420. <https://doi.org/10.1007/BF00422279>
- Vonshak, A., Kancharaksa, N., Bunnag, B., & Tanticharoen, M. (1996). Role of light and photosynthesis on the acclimation process of the cyanobacterium

- Spirulina platensis* to salinity stress. *Journal of Applied Phycology*, 8(2), 119–124. <https://doi.org/10.1007/BF02186314>
- Vonshak, A., & Tomaselli, L. (2006). *Arthrospira (Spirulina): Systematics and Ecophysiology*. In *The Ecology of Cyanobacteria*. https://doi.org/10.1007/0-306-46855-7_18
- Wegmann, K., & Metzner, H. (1971). Synchronization of *Dunaliella* cultures. *Archiv Für Mikrobiologie*, 78(4). <https://doi.org/10.1007/BF00412276>
- Whitton, B. A. (2012). Ecology of Cyanobacteria II. In B. A. Whitton (Ed.), *Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time* (Vol. 9789400738553). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-3855-3>
- Yang, W., Wang, F., Liu, L. N., & Sui, N. (2020). Responses of Membranes and the Photosynthetic Apparatus to Salt Stress in Cyanobacteria. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 11). <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00713>
- Yemm, E. W., & Willis, A. J. (1954). The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *The Biochemical Journal*, 57(3). <https://doi.org/10.1042/bj0570508>
- Yılmaz, H. K. (2010). The effects of different salinity rates on fat and fatty acid composition of *Spirulina platensis*. *Journal of Fisheries Sciences.Com*. <https://doi.org/10.3153/jfscom.2010030>
- Yu, C., Zheng, J., Zhang, Y., Hu, Y., Luo, W., Zhang, J., Yu, J., Liu, J., Nixon, P. J., Zhou, W., & Shao, S. (2025). Towards sustainable *Spirulina* farming: Enhancing productivity and biosafety with a salinity-biostimulants strategy. *Bioresource Technology*, 419, 132043. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2025.132043>
- Zarrouk, C. (1966). *Contribution a l'étude d'une Cyanophyce. Influence de Divers' Facteurs Physiques et Chimiques Sur La Croissance et La*

Photosynthese de Spirulina maxima (Setch et Gardner) Geitler. [University of Paris]. <https://www.scienceopen.com/document?vid=aaef3fb0-8dd2-4e9f-9b1a-815bf6944e0c>

Zeng, M.-T., & Vonshak, A. (1998). Adaptation of *Spirulina platensis* to salinity-stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 120(1), 113–118. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(98\)10018-1](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(98)10018-1)

Zhang, T., Gong, H., Wen, X., & Lu, C. (2010). Salt stress induces a decrease in excitation energy transfer from phycobilisomes to photosystem II but an increase to photosystem I in the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Journal of Plant Physiology*, 167(12), 951–958. <https://doi.org/10.1016/J.JPLPH.2009.12.020>

ANEXO

Anexo 1: Composición de medio Zarrouk (1966) modificado.

Macronutrientes	Concentración g/L	Micronutrientes	Concentración 1mL/L
NaNO ₃	2,5 g	H ₃ BO ₃	2,86 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g	MnCl ₂ x 4 H ₂ O	1,81 g
K ₂ SO ₄	1 g	ZnSO ₄ x 7H ₂ O	0,22 g
NaCl	1 g	CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,08 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,2 g		
CaCl ₂	0,04 g		
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,01 g		
EDTA	0,08 g		

Anexo 2: Cantidad de Nitrato y Fosfato presentes en el agua de mar utilizada.

Muestra	Réplica	Nitrato (mg/L)	Fosfato (mg/L)
Agua de mar	1	3,1	1,9
	2	2,8	1,7
	3	3,0	2,0
Promedio ± desviación estándar		2,96 ± 0,15	1,86 ± 0,15