



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE
LA AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

**TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE INGENIERO AGROPECUARIO**

**TEMA: EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE ESPIRULINA
(*Arthrospira platensis*) MEDIANTE ALTERNATIVAS DE
FERTILIZACIÓN ORGÁNICA E INORGÁNICA Y SU
MASIFICACIÓN EN CONDICIONES DE CAMPO EN LA HDA.
EL PRADO**

AUTOR: SANDOVAL SIMBAÑA, DIANA CAROLINA

DIRECTOR: ORTIZ TIRADO, JUAN CRISTÓBAL

SANGOLQUÍ

2017



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “*EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE ESPIRULINA (Arthrospira platensis) MEDIANTE ALTERNATIVAS DE FERTILIZACIÓN ORGÁNICA E INORGÁNICA Y SU MASIFICACIÓN EN CONDICIONES DE CAMPO EN LA HDA. EL PRADO*” realizado por la señorita *DIANA CAROLINA SANDOVAL SIMBAÑA*, ha sido revisado en su totalidad y analizado por el software anti-plagio, el mismo cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, por lo tanto me permito acreditarlo y autorizar a la señorita *DIANA CAROLINA SANDOVAL SIMBAÑA* para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 12 de Septiembre de 2017

Dr. Juan Cristóbal Ortiz Tirado

DIRECTOR



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, *DIANA CAROLINA SANDOVAL SIMBAÑA*, con cédula de identidad N° 1725266363, declaro que este trabajo de titulación "*EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE ESPIRULINA (Arthrospira platensis) MEDIANTE ALTERNATIVAS DE FERTILIZACIÓN ORGÁNICA E INORGÁNICA Y SU MASIFICACIÓN EN CONDICIONES DE CAMPO EN LA HDA. EL PRADO*", ha sido desarrollado considerando los métodos de investigación existentes, así como también se ha respetado los derechos intelectuales de terceros considerándose en las citas bibliográficas.

Consecuentemente declaro que este trabajo es de mi autoría, en virtud de ello me declaro responsable del contenido, veracidad y alcance de la investigación mencionada.

Sangolquí, 12 de Septiembre de 2017

Diana Carolina Sandoval Simbaña

C.C. 1725266363



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

AUTORIZACIÓN

Yo, **DIANA CAROLINA SANDOVAL SIMBAÑA**, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar en la biblioteca virtual de la institución el presente trabajo de titulación “**EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE ESPIRULINA (*Arthrospira platensis*) MEDIANTE ALTERNATIVAS DE FERTILIZACIÓN ORGÁNICA E INORGÁNICA Y SU MASIFICACIÓN EN CONDICIONES DE CAMPO EN LA HDA. EL PRADO**”, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi autoría y responsabilidad.

Sangolquí, 12 de Septiembre de 2017

Diana Carolina Sandoval Simbaña

C.C. 1725266363

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a mis queridos padres
Petrona y Pedro por su esfuerzo
han sido y serán un pilar fundamental en mi vida
al estar siempre conmigo y que con su apoyo,
Consejos y paciencia todos estos años
me han dado todo lo que soy como persona.

Diana Sandoval

AGRADECIMIENTO

A Dios, por ser la luz de mi camino y guiarme en cada paso que he realizado en mi vida.

A mis padres y mi familia, por ser mi apoyo incondicional y mi fortaleza en cada uno de mis sueños y propósitos de vida.

A la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, IASA I, y al personal docente por todos los años de formación académica y valiosos conocimientos.

En especial al mejor Director y tutor Dr. Juan Ortiz por su apoyo incondicional y paciencia absoluta para el desarrollo de esta investigación.

A la Ing. Daysi Muñoz, por cada uno de sus consejos oportunos y ayuda desinteresada.

A mis amigos con quienes he pasado buenos y malos momentos a lo largo de mi carrera profesional Soraya, Alejandro, Luis, Bety y Katalina quienes han estado siempre presentes en mi vida con su alegría inagotable y complicidad.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARÁTULA

CERTIFICADO	ii
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD.....	iii
AUTORIZACIÓN.....	iv
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTO	vi
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vii
ÍNDICE DE TABLA	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xv
RESUMEN.....	xviii
ABSTRACT	xix

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN	1
1.1 Justificación.....	2
1.2 Planteamiento del problema.....	3
1.2.1 Problema	3
1.2.2 Efectos.....	3
1.2.3 Causas	4
1.3 Objetivos	4
1.3.1 Objetivo General	4
1.3.2 Objetivos Específicos.....	4
1.4 Hipótesis.....	4

CAPÍTULO II

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 Cianobacteria.....	5
2.2 Cianobacteria espirulina.....	6
2.2.1 Composición Bioquímica de la Espirulina.....	6
2.2.2 Proteínas y aminoácidos.....	7
2.2.3 Ácidos grasos esenciales	7
2.2.4 Pigmentos.....	8
2.3 Cinética de crecimiento.....	9
2.3.1 Fase de adaptación	9
2.3.2 Fase de crecimiento exponencial	9
2.3.3 Fase de crecimiento lineal.....	9
2.3.4 Fase Estacionaria.....	9
2.3.5 Fase de muerte.....	9
2.4 Parámetros del cultivo microalgal.....	10
2.4.1 Nutrientes	10
2.4.1.1 Fuente de Carbono	11
2.4.1.2 Fuente de Nitrógeno.....	11
2.4.1.3 Fuente de Fósforo.....	11
2.4.2 Luz	12
2.4.3 Temperatura	12
2.4.4 Potencial Hidrógeno (pH)	12
2.4.5 Agitación.....	13
2.4.6 Medio Zarrouk	13
2.5 Cultivo Industrial de espirulina (<i>Arthrospira platensis</i>).....	14
2.6 Sistemas de producción.....	14

2.6.1	Sistemas Abiertos.....	15
2.6.2	Sistemas raceway	15
2.6.3	Sistemas cerrados (Fotobioreactores)	16
2.7	Producción de espirulina en Ecuador.....	16
2.8	Usos comerciales de espirulina (<i>Arthrospira platensis</i>)	17

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA		19
3.1	Ubicación del lugar de la investigación	19
3.1.1	Ubicación política	19
3.1.2	Ubicación geográfica	19
3.1.3	Ubicación ecológica.....	19
3.2	Materiales y Equipos.....	20
3.2.1	Materiales de campo	20
3.2.2	Materiales de laboratorio	20
3.2.3	Equipos.....	20
3.2.4	Reactivos.....	21
3.2.5	Organismos	21
3.3	Métodos.....	21
3.3.1	Primera fase de investigación del crecimiento de <i>Arthrospira platensis</i> , bajo el efecto de medios de cultivo orgánico, inorgánico modificados laboratorio.....	23
3.3.1.1	Selección del medio de cultivo para el cultivo de <i>Arthrospira platensis</i>	23
3.3.1.2	Preparación de los medios de cultivo para <i>Arthrospira platensis</i>	23

3.3.1.3	Crecimiento celular de <i>Arthrospira platensis</i> en condiciones de laboratorio	25
3.3.1.4	Cosecha de la biomasa de <i>Arthrospira platensis</i> para la fase de laboratorio y campo.....	26
3.3.1.5	Análisis proximal de la biomasa de <i>Arthrospira platensis</i> (laboratorio y campo).....	27
3.3.1.6	Análisis microbiológicos de los medios de cultivo de <i>Arthrospira platensis</i> durante la fase de laboratorio y campo	29
3.3.2	Segunda fase de investigación del crecimiento de <i>Arthrospira platensis</i> bajo el efecto del mejor tratamiento obtenido en laboratorio y su adaptación en campo	29
3.3.3	Diseño Experimental (fase de laboratorio y campo).....	30
3.3.3.1	Factores (laboratorio y campo)	30
3.3.3.2	Tratamientos para la fase de laboratorio y campo	30
3.3.3.3	Tipo de Diseño para la fase de laboratorio y campo.....	30
3.3.3.4	Repeticiones	31
3.3.3.5	Características de las unidades experimentales.....	31
3.3.3.6	Croquis experimental para la fase de laboratorio y campo	31
3.3.3.7	Análisis de varianza	32
3.3.3.8	Variables evaluadas.....	33
3.3.3.9	Análisis Estadístico para el proyecto de investigación para fase de campo y laboratorio.....	37
3.3.3.10	Análisis económico para <i>Arthrospira platensis</i> en fase laboratorio y campo	37

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
4.1 Resultados	38
Primera fase de investigación del crecimiento de <i>Arthrospira platensis</i> , bajo el efecto de medios de cultivo orgánico, inorgánico modificados en laboratorio.....	38
4.1.1 Parámetros productivos (Laboratorio)	38
4.1.1.1 Evaluación del crecimiento celular de <i>Arthrospira platensis</i> en laboratorio	38
4.1.1.2 Análisis cinético para el crecimiento de <i>Arthrospira platensis</i> en condiciones de laboratorio	42
4.1.1.3 Producción de biomasa	42
4.1.2 Parámetros ambientales evaluados en la primera fase de investigación (laboratorio).....	43
4.1.2.1 Potencial de hidrógeno (pH) evaluado en condiciones de laboratorio	43
4.1.2.2 Temperatura evaluada para <i>Arthrospira platensis</i> durante la fase de laboratorio	45
4.1.2.3 Salinidad evaluada para <i>Arthrospira platensis</i> durante la fase de	46
4.1.3 Calidad de la biomasa producida de <i>Arthrospira platensis</i> durante la fase de laboratorio	47
4.1.3.1 Análisis proximal de la biomasa seca de <i>Arthrospira platensis</i> Laboratorio).....	47
4.1.3.2 Concentración de clorofila total obtenida para <i>Arthrospira platensis</i> durante la fase de laboratorio	48
4.1.3.3 Análisis microbiológicos de los medios de cultivo de <i>Arthrospira platensis</i> durante la fase de laboratorio	49

Segunda fase de investigación del crecimiento de <i>Arthrospira platensis</i> bajo el efecto del mejor tratamiento obtenido en laboratorio y su en campo	50
4.1.4 Parámetros productivos evaluados durante la fase de campo	50
4.1.4.1 Evaluación del crecimiento celular de <i>Arthrospira platensis</i> en campo	50
4.1.4.2 Análisis cinético para el crecimiento de <i>Arthrospira platensis</i> bajo condiciones de campo	53
4.1.5 Parámetros ambientales evaluados para <i>Arthrospira platensis</i> en la fase de campo	53
4.1.5.1 Potencial de hidrógeno (pH) evaluado en la fase campo	53
4.1.5.2 Temperatura evaluada para <i>Arthrospira platensis</i> durante la fase de campo	56
4.1.5.3 Salinidad evaluada para <i>Arthrospira platensis</i> durante la fase de laboratorio	57
4.1.6 Calidad de la biomasa producida de <i>Arthrospira platensis</i> durante la de campo	57
4.1.6.1 Análisis proximal de <i>Arthrospira platensis</i> (campo)	57
4.1.6.2 Análisis Económico para la producción de <i>Arthrospira platensis</i> durante la fase de campo	63
4.2 Discusión.....	65

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	71
5.1 Conclusiones	71
5.2 Recomendaciones.....	72
5.3 Bibliografía	73

ÍNDICE DE TABLA

Tabla 1	Contenido de aminoácidos por cada 10g de Espirulina	7
Tabla 2	Contenido de Ácidos grasos por cada 10g de espirulina	8
Tabla 3	Composición del Medio Zarrouk para un litro de solución	14
Tabla 4	Medios de cultivo para <i>Arthrospira platensis</i> en condiciones de laboratorio y campo.....	24
Tabla 5	Tratamientos para la fase de laboratorio y campo	30
Tabla 6	Análisis de varianza para un DCA, con tres tratamientos y tres repeticiones (Laboratorio).....	32
Tabla 7	Análisis de varianza para un DCA, con tres tratamientos y tres repeticiones (Campo)	33
Tabla 8	Promedio \pm error estándar de la densidad celular (filamentos mL ⁻¹), de <i>Arthrospira platensis</i> en tres medios de cultivo (Zarrouk, Inorgánico y Orgánico) bajo condiciones de laboratorio	38
Tabla 9	Parámetros cinéticos del crecimiento celular <i>Arthrospira platensis</i> en tres medios de cultivo Zarrouk, Inorgánico y Orgánico en condiciones de laboratorio	42
Tabla 10	Promedio y desviación estandar del crecimiento celular y absorbancia de <i>Arthrospira platensis</i> en condiciones de Laboratorio	43
Tabla 11	Promedio \pm error estándar del pH del medio nutritivo para <i>Arthrospira platensis</i> durante la fase de laboratorio.....	44
Tabla 12	Promedio de la biomasa producida con respecto al pH para <i>Arthrospira platensis</i> en medio de cultivo Zarrouk, Inorgánico y Orgánico en 20 litros.....	45
Tabla 13	Promedio \pm error estándar para la salinidad <i>Arthrospira platensis</i> en condiciones de laboratorio	46
Tabla 14	Promedio \pm error estándar para el porcentaje de proteína, grasa y ceniza de <i>Arthrospira platensis</i> en condiciones de laboratorio.....	47
Tabla 15	Análisis proximal de (<i>Arthrospira platensis</i>) en comparación con productos cárnicos.....	48
Tabla 16	Promedio \pm error estándar del contenido (mg g ⁻¹) de clorofila total en <i>Arthrospira platensis</i> en fase de laboratorio	49

Tabla 17	Análisis de la presencia bacteriana en los medios de cultivo para <i>Arthrospira platensis</i> durante la fase de laboratorio y campo	49
Tabla 18	Promedio \pm error estándar de la densidad celular de <i>Arthrospira platensis</i> en dos medios de cultivo (Zarrouk e Inorgánico) bajo condiciones de campo.	50
Tabla 19	Parámetros cinéticos del crecimiento celular <i>Arthrospira platensis</i> en medio de cultivo Zarrouk e Inorgánico durante la fase de campo.	53
Tabla 20	Promedio \pm error estándar del pH de los medios nutritivos (Zarrouk e Inorgánico) para <i>Arthrospira platensis</i> durante la fase de campo	54
Tabla 21	Promedio de la biomasa producida con respecto al pH para <i>Arthrospira platensis</i> en medio de cultivo Zarrouk e Inorgánico en 2000 litros.....	56
Tabla 22	Promedio \pm error estándar para la salinidad <i>Arthrospira platensis</i> en condiciones de campo	57
Tabla 23	Promedio \pm error estándar para el porcentaje de proteína, grasa y ceniza de <i>Arthrospira platensis</i> en condiciones de campo.	57
Tabla 24	Promedio \pm error estándar del porcentaje de clorofila total en <i>Arthrospira platensis</i> en fase de campo	59
Tabla 25	Rangos evaluados para determinar la presencia bacteriana en la cuenca hídrica del proyecto acuícola en fase de campo.....	61
Tabla 26	Coefficiente de correlación de Pearson para las variables de calidad ambiental y parámetros productivos para <i>Arthrospira platensis</i> en fase de laboratorio y campo	63
Tabla 27	Inversiones de activos fijos para la producción de <i>Arthrospira platensis</i> bajo diferentes medios de cultivos en condiciones de campo.....	63
Tabla 28	Costos operativos de cada tratamiento de una producción de 10m ³ de <i>Arthrospira platensis</i> en campo	64
Tabla 29	Ingresos de cada tratamiento de una producción de 10m ³ de <i>Arthrospira platensis</i> en condiciones de campo	65
Tabla 30	Flujo de caja de cada tratamiento de una producción de 10m ³ de <i>Arthrospira platensis</i> en condiciones de campo	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Cianobacteria <i>Arthrospira platensis</i>	6
Figura 2	Cinética de crecimiento	10
Figura 3	Ubicación del Laboratorio de Acuicultura (IASA I)	19
Figura 4	Metodología del proyecto de investigación Evaluación del crecimiento de <i>Arthrospira platensis</i>	22
Figura 5	Medios de cultivo para <i>Arthrospira platensis</i> a) Zarrouk; b) Orgánico; c) Inorgánico	23
Figura 6	Proceso de la producción de biomasa de <i>Arthrospira platensis</i> para la fase de laboratorio	25
Figura 7	Recolección de la muestra para determinar la densidad celular de <i>Arthrospira platensis</i> por Espectrofotometría UV en fase de laboratorio	26
Figura 8	Cosecha de la biomasa <i>Arthrospira platensis</i> (a y f) Sedimentación; (b, g) centrifugación y filtrado;(c y h) pesado biomasa; (d y j) secado; (e y k) pulverización.....	27
Figura 9	Determinación del porcentaje de proteína para <i>Arthrospira platensis</i> por el método de Kjeldahl a) Digestión; b) Destilación; c) titulación	28
Figura 10	Determinación del porcentaje de grasa en <i>Arthrospira platensis</i> por el método de Soxhlet a) Destilación; b) extracción del solvente; c) Obtención del porcentaje de grasa	28
Figura 11	Determinación del porcentaje de ceniza para <i>Arthrospira platensis</i> a) desecación; b) calcinación; c) obtención del porcentaje de ceniza.....	28
Figura 12	a) Preparación medios de cultivo EMB, PDA y MACConkey b) Dosificación de medios c) Siembra d) Identificación.....	29
Figura 13	Producción de <i>Arthrospira platensis</i> bajo invernadero a) Estructuración del ensayo; b) Preparación medio nutritivo; c) Siembra; d) Masificación e) Control del inóculo.....	30
Figura 14	Croquis del diseño experimental en laboratorio	32
Figura 15	Croquis del diseño experimental en campo bajo invernadero	32

Figura 16	Recolección de muestras para determinar densidad celular de <i>Arthrospira platensis</i> en la placa porta objetos en la fase de laboratorio y campo.....	34
Figura 17	Curva de crecimiento de la cianobacteria <i>Arthrospira platensis</i> en medio Zarrouk, Orgánico e Inorgánico modificado en condiciones de laboratorio.	39
Figura 18	Curva de crecimiento de la cianobacteria <i>Arthrospira platensis</i> en medio Zarrouk, Orgánico e Inorgánico modificado por espectrofotometria UV en condiciones de laboratorio.	39
Figura 19	Curva de crecimiento de la cianobacteria <i>Arthrospira platensis</i> en medio Zarrouk en condiciones de laboratorio.....	40
Figura 20	Curva de crecimiento de la cianobacteria <i>Arthrospira platensis</i> en medio inorgánico modificado (Fertilizante foliar) en condiciones de laboratorio.	41
Figura 21	Curva de crecimiento de la cianobacteria <i>Arthrospira platensis</i> en medio orgánico modificado (Orina de vaca) en condiciones de laboratorio.	41
Figura 22	pH registrado de los medios de cultivo (Zarrouk, Inorgánico y Orgánico) para <i>Arthrospira platensis</i> bajo condiciones de laboratorio	44
Figura 23	Correlación biomasa producida vs pH evaluado para <i>Arthrospira platensis</i> en condiciones de laboratorio	45
Figura 24	Seguimiento de la temperatura de los medios de cultivo Zarrouk, inorgánico y orgánico en laboratorio, durante 45 días.....	46
Figura 25	Análisis proximal de <i>Arthrospira platensis</i> durante la fase de laboratorio	47
Figura 26	Análisis microbiológicos de medios de cultivo Zarrouk, inorgánico y orgánico (Laboratorio y campo).....	50
Figura 27	Curva de crecimiento de la cianobacteria <i>Arthrospira platensis</i> en medio Zarrouk e Inorgánico modificado durante la fase de campo.....	51

Figura 28	Curva de crecimiento de la cianobacteria <i>Arthrospira platensis</i> en medio Zarrouk, Orgánico e Inorgánico modificado por espectrofotometría UV durante la fase de campo.....	51
Figura 29	Curva de crecimiento de la cianobacteria <i>Arthrospira platensis</i> en medio Zarrouk bajo condiciones de campo durante 33 días.....	52
Figura 30	Curva de crecimiento de la cianobacteria <i>Arthrospira platensis</i> en medio inorgánico modificado (Fertilizante foliar), bajo condiciones de campo.	53
Figura 31	pH registrado de los medios de cultivo (Zarrouk e Inorgánico) para <i>Arthrospira platensis</i> bajo condiciones de campo	54
Figura 32	Correlación biomasa producida vs pH evaluado para <i>Arthrospira platensis</i> en condiciones de campo	55
Figura 33	Seguimiento de la temperatura de los medios de cultivo Zarrouk, inorgánico y orgánico en laboratorio, durante 33 días.....	56
Figura 34	Análisis proximal de <i>Arthrospira platensis</i> durante la fase de campo.....	58
Figura 35	Concentración de clorofila total presente en <i>Arthrospira platensis</i> bajo condiciones de laboratorio y campo.....	60
Figura 36	Aplicación de pruebas microbiológicas en los diferentes medios de cultivos de <i>Arthrospira platensis</i> evaluados durante la fase de campo. .	61

RESUMEN

Arthrospira platensis es una cianobacteria verde azulada cultivada en todo el mundo para obtener productos de alto valor comercial debido a que contiene del 40 al 70% de proteína, cuenta con todos los aminoácidos esenciales, minerales, vitaminas (B12), antioxidantes y pigmentos (Ficocianina y Carotenoides). En la actualidad la biomasa es utilizada como aditivo en la alimentación animal con la finalidad de mejorar el sistema inmunológico, debido a su alto contenido de ácido gamma-linoléico y omega-6. El costo de nutrientes (Zarrouk) es considerado como el factor crítico en la producción. Bajo esta condición el objetivo de este estudio es evaluar el crecimiento de espirulina en medios de cultivo orgánico e inorgánico modificado a bajo costo. Se elaboraron tres medios de cultivo: medio Zarrouk (Control; 500 g L⁻¹), medio orgánico (Orina de vaca; 1 mL L⁻¹), medio inorgánico modificado (Fertilizante NPK 12-12-36; 1 g L⁻¹), manteniendo las condiciones de pH (9,3) y de temperatura (18°C). El crecimiento microalgal se evaluó durante 33 días en cultivo. Los resultados demostraron que el medio orgánico puede usarse para el crecimiento de *Arthrospira platensis*, presentando un crecimiento celular máximo en la fase exponencial de 3,81x10⁵ filamentos mL⁻¹, con una velocidad de crecimiento de 9,11 h⁻¹. El medio inorgánico demostró una densidad celular promedio de 3,89 x10⁵ filamentos mL⁻¹ con una velocidad de crecimiento de 8,59 h⁻¹. Por tanto no existen diferencias significativas (p>0,005), con el control (Medio Zarrouk), el cual alcanzó un crecimiento celular de 3,86 x10⁵ filamentos mL⁻¹, con una velocidad de crecimiento de 8,61 h⁻¹.

PALABRAS CLAVE:

- **CIANO BACTERIA**
- *Arthrospira platensis*
- **CRECIMIENTO CELULAR**
- **ESPIRULINA**

ABSTRACT

Arthrospira platensis is a cyanobacterium bluish green cultivated throughout the world to obtain products of high commercial value due to the fact that it contains from 40 to 70% protein, has all the essential amino acids, minerals, vitamins (B12), antioxidants and pigments (phycocyanin and carotenoids). In the present biomass is used as an additive in animal feed, with the aim of improving the immune system, due to its high content of gamma-linoleic acid and omega- 6. The cost of nutrients (Zarrouk) is considered to be the critical factor in production. Under this condition the objective of this study is to evaluate the growth of spiruline in culture media of organic and inorganic modified at low cost. Three culture media: Zarrouk (Control; 500 g L⁻¹), organic (cow urine; 1mL L⁻¹), Medium (modified inorganic fertilizer NPK 12-12-36; 1g L⁻¹), maintaining the pH conditions (9.3) and temperature (18°C). The microalgal growth was evaluated during 33 days in culture. The results showed that the organic medium can be used for the growth of *Arthrospira platensis*, presenting a maximum cell growth in the exponential phase of 3.81x10⁻⁵ filaments mL⁻¹, with a growth rate of 9.11 h⁻¹. The inorganic showed a cell growth average of 3.89 x10⁻⁵ filaments mL⁻¹ with a growth rate of 8.59 h⁻¹. Therefore, no significant differences (p>0.005), with the average Zarrouk (control), which reached a cell density of 3.86 x 10⁻⁵ filaments mL⁻¹, with a growth rate of 8.61 h⁻¹.

KEY WORDS:

- **CYANOBACTERIUM**
- *Arthrospira platensis*
- **CELL GROWTH**
- **SPIRULINE**

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La espirulina es una cianobacteria filamentosa, multicelular que puede colonizar ambientes que no son adecuados para otros organismos, además puede formar poblaciones en zonas lacustres tanto continentales y ambientes marinos (Prepelitchi, 2015). La espirulina contiene un alto contenido de proteína hasta un 70%, y ácidos grasos altamente insaturados, aminoácidos esenciales, minerales, vitaminas (especialmente la B12), antioxidantes y pigmentos (ficobiliproteínas y carotenoides) . Por lo tanto la producción comercial de espirulina ha ganado atención en todo el mundo por su uso en suplementos para la alimentación humana, animal y productos farmacéuticos (Espada, 2016).

En acuicultura, esta cianobacteria es utilizada como aditivo para la alimentación animal, con la finalidad de mejorar la respuesta fisiológica a enfermedades, crecimiento, eficiencia alimenticia. Cabe destacar que tiene un alto contenido de ácido gamma – linoléico (GLA), elemento fundamental y precursor de otras moléculas en el sistema inmune del camarón blanco (Margarites, y otros, 2016).

El crecimiento de espirulina depende de muchos factores entre los cuales se encuentran la disponibilidad de nutrientes específicos lo que encarece su cultivo, además de la especificidad del espectro de luz y temperatura. Por consiguiente el costo operativo en la producción de espirulina es elevado, restringiendo su producción a nivel nacional. Bajo esta condición se requiere una producción a bajo costo, a través de alternativas al medio comercial nutritivo “Zarrouk”, que es considerado como un medio estándar de alto valor económico. Para este propósito la industria busca medios nutritivos alternativos entre los cuales se encuentra el uso de agua de mar y aguas residuales (Materassi, Tredici , & Waldemaro, 1984). Bajo esta condición se ha demostrado que no existen cambios en el crecimiento y composición química de la biomasa principal.

Existen varios estudios que recomiendan la utilización de orina de humanos como base del medio de cultivo, dado que la misma contiene nutrientes necesarios como nitrógeno, sulfatos y minerales traza que hacen posible la producción de

biomasa. Los resultados que se obtuvieron en el estudio de (Feng & Zu-Cheng, 2006) fueron satisfactorios debido a que *Arthrospira platensis* creció exitosamente con una producción base de 0,26 g de biomasa L⁻¹, llegando a una producción máxima de 2,40 g L⁻¹. Por lo que es posible utilizar este método para regenerar la materia, nutrientes y al mismo tiempo asimilar CO₂.

En el estudio de (Mezzomo, Saggiorato, Siebert, Oliveira, & Lago, 2010), no se obtuvieron resultados positivos al utilizar aguas residuales como medio de cultivo alcanzando una producción máxima de 0,54 g L⁻¹, mientras que la eliminación de materia orgánica fue de 26,5 y 30% con una eliminación máxima de fósforo de 41,6%. Esto demuestra que al utilizar cianobacterias en tratamiento de aguas residuales se reduce el impacto ambiental. La biomasa solo puede utilizarse para producción de pigmentos en menor grado.

1.1 Justificación

Actualmente las cianobacterias son utilizadas en dietas humanas como una fuente alimenticia de alto valor nutricional (Piña, y otros, 2007). En otras industrias puede ser utilizado como alimento para animales, biocolorantes y en la producción de biocombustibles por la capacidad de fijar CO₂.

La espirulina es conocida hoy como el alimento del futuro, que contiene tres veces más proteína que la carne de ganado vacuno y cuenta con todos los aminoácidos esenciales y no esenciales en perfecto equilibrio. Una ventaja comparativa con otras cianobacterias y microalgas es que puede desarrollarse en un medio alcalino lo que hace difícil que se contamine con otros microorganismos. Puede ser fácilmente cultivada en biorreactores abiertos (Mezzomo, Saggiorato, Siebert, Oliveira, & Lago, 2010).

La espirulina es un suplemento alimenticio con gran potencial para combatir la desnutrición. Varias organizaciones líderes como la FAO, ha elogiado esta cianobacteria por el beneficio que aporta a la salud. Entre ellas está el fortalecimiento del sistema inmunológico, con sus propiedades antibióticas y antidiabéticas debido a la presencia del ácido gamma linoléico y omega-6. En el estudio de (Udayasree, Manjula, & Sowjanya, 2013), se demuestra que la suplementación de 10 g al día de espirulina trae una recuperación rápida sobre la desnutrición y mejora el transporte

de hemoglobina dado que contribuye con hierro y vitamina B₁₂, pero este alimento no es fácilmente accesible por su elevado costo y fuerte olor.

Una limitante del cultivo a escala industrial son los costos de los componentes del medio de cultivo, ya que el medio “Zarrouk”, es considerado como medio estándar. El medio estándar requiere nutrientes de cierto valor analítico lo cual provoca que el costo de producción de espirulina sea elevado y por ende el precio de comercialización no sea accesible para algunos grupos de la población.

Se han realizado varios estudios (Piñero, Bermejo, & Villar del Fresno, 2001) en donde se demuestran los efectos terapéuticos de esta cianobacteria en el tratamiento de algunas enfermedades como hipertensión, cáncer, diabetes y desnutrición. Es cotizada tanto en el mercado nacional e internacional por los beneficios que otorga hacia la salud, pero debido al costo de producción y mantenimiento que requiere, el precio comercial se eleva significativamente lo cual se le atribuye a la gran cantidad de minerales de alto grado analítico que este necesita durante su fase de desarrollo (Spolaore, Cassan, Duran, & Isambert, 2006).

Con estos antecedentes el presente estudio pretende buscar medios nutritivos más baratos que cuenten con todos los requerimientos nutricionales de la espirulina y de esta forma la producción comercial de microalgas pueda desarrollarse en un sistema de cultivo económicamente viable.

1.2 Planteamiento del problema

1.2.1 Problema

Baja productividad de *Arthrospira platensis* en el Ecuador, dado por el desconocimiento de técnicas de masificación industrial a costos razonables. Esto genera un alto costo de producción por la utilización de soluciones de grado analítico y con protocolos establecidos comercialmente, así como el valor hora-hombre en la preparación de medios nutritivos.

1.2.2 Efectos

La baja producción de espirulina incurre a la monopolización del mercado por una sola empresa productora a nivel nacional y la producción se ve limitada a un punto artesanal y de laboratorio.

1.2.3 Causas

Las causas que establecen el problema en una producción de espirulina están determinadas por el desconocimiento de técnicas de masificación, disponibilidad de soluciones a bajo costo por la limitada producción de cepas puras de *Arthrospira platensis* y su alto valor de mantenimiento a largo plazo en un medio de cultivo específico.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Evaluar el crecimiento de espirulina (*Arthrospira platensis*) mediante alternativas de fertilización orgánica e inorgánica y su masificación en condiciones de campo en la Hda. El Prado.

1.3.2 Objetivos Específicos

Evaluar el crecimiento celular de *Arthrospira platensis*, bajo el efecto de medios de cultivo orgánico e inorgánico modificados en laboratorio.

Evaluar el crecimiento celular de *Arthrospira platensis* bajo el efecto del mejor medio de cultivo obtenido en laboratorio y su adaptación en campo (2940 ms.n.m) bajo condiciones de invernadero hasta alcanzar un volumen de 2000 litros.

1.4 Hipótesis

Ho: “La masificación de *Arthrospira platensis* a 2490 m.s.n.m., con el uso de medios orgánicos e inorgánicos modificados en el IASA I, no genera un crecimiento celular semejante al medio de cultivo comercial “Zarrouk” modificado (Aiba & Ogawa, 1997)”.

Hi: “La masificación de *Arthrospira platensis* a 2490 m.s.n.m., con el uso de medios orgánicos e inorgánicos modificados en el IASA I, mejora el crecimiento celular en comparación al medio de cultivo comercial “Zarrouk” modificado (Aiba & Ogawa, 1997)”.

CAPÍTULO II

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cianobacteria

Las cianobacterias son organismos sin membrana nuclear y mitocondrias; difieren de otros organismos procariotas por la composición de sus ácidos grasos no saturados con dos o más enlaces dobles (Hernández & Labbé, 2014).

Son organismos foto sintetizadores y heterótrofos que comparten con otras bacterias la capacidad de usar N_2 atmosférico como fuente de nitrógeno y reducirlo a amonio ($NH_3 + H$), para que todas las células puedan aprovechar esta fuente (Infante, Angulo, Flores, Barrlos, & Zapata, 2012).

Las cianobacterias crecen en ambientes lénticos (lagos y lagunas), suelos húmedos, troncos muertos, cortezas de árboles, aguas salobres y aguas termales. Su pared celular es semejante a las bacterias Gram negativas, no contiene celulosa pero son resistentes debido a la presencia de polisacáridos unidos a poli péptidos (Mahavir, Kiranjot, Tulika, & Sanpreet, 2014).

Por su parte (Ortiz, Cortés, Castillo, Padilla, & Otero, 2011), afirman que las microalgas y cianobacterias son organismos foto autótrofos y se desarrollan a partir de materia inorgánica. Sin embargo algunas especies son capaces de crecer utilizando materia orgánica como fuente de energía y carbono. Por lo tanto la producción de microalgas pueden dividirse en:

Autótrofa: las microalgas obtienen energía de la luz solar y sintetizan sustancias para su metabolismo a partir de sustancias inorgánicas (agua, dióxido de carbono y sales minerales), de manera que su nutrición no depende de otros factores.

Heterótrofa: la principal fuente de energía son los compuestos orgánicos proporcionados por el carbono. Los organismos pueden desarrollarse bajo ausencia de luz.

Mixotrófica: organismos son capaces de crecer bajo procesos tanto autótrofos como heterótrofos, de manera que la fuente de energía es tanto luz como materia orgánica. El carbono lo obtienen de compuestos orgánicos y de CO_2 .

2.2 Cianobacteria espirulina

La espirulina es un cianobacteria filamentosa, que forma tricomas cilíndricos multicelulares, con 1 a 12 μm de diámetro, que se disponen de forma espiralada (Huarachi, Yapó, Dueñas, Soto, & González, Producción de *Spirulina platensis* (Cyanophyta) en fotobioreactor tubular cónico bajo condiciones de laboratorio, 2013). Habita en diversos medios, como tierra, arena, pantanos, lagos alcalinos y salobres. A través de la fotosíntesis convierte los nutrientes en materia y libera oxígeno celular. Los nutrientes que necesita son agua y una fuente de carbono, nitrógeno, fósforo, potasio, hierro y algunos oligoelementos (Hernández & Labbé, 2014).



Figura 1 Cianobacteria *Arthrospira platensis*

Fuente: (Saitama, 2010)

Desde 1981 la espirulina fue legalmente aceptada por la FDA (Food Drug Administration), como fuente de proteínas, vitaminas, y minerales. Puede ser comercializado legalmente como alimento o suplemento ya que se encuentra calificado como libre de contaminantes.

La espirulina posee entre el 64 a 70% de proteína. La misma que contiene todos los aminoácidos esenciales (isoleucina, leucina, lisina, metionina, treonina, triptófano y valina), que representan el 47% del peso seco de la biomasa (Huarachi, Yapó, Dueñas, Soto, & González, 2013).

2.2.1 Composición Bioquímica de la Espirulina

Entre los constituyentes de esta cianobacteria se destacan proteínas de alta calidad, ácidos grasos poliinsaturados y pigmentos antioxidantes.

2.2.2 Proteínas y aminoácidos

La espirulina tiene un alto contenido de proteínas y se considera una de las fuentes más ricas en provitamina A (Beta-caroteno) y hierro absorbible (Infante, Angulo, Flores, Barrlos, & Zapata, 2012). La espirulina representa el 60 – 70% de proteína en su composición, si se compara con otras fuentes de proteína. Tiene niveles más altos que la carne de pescado (15-20%), huevos (12%), cereales (8-14%) y leche entera (3%). En cuanto a los aminoácidos es limitante en cisteína y metionina. La digestibilidad es aproximadamente del 85 – 95%, debido a su pared celular compuesta de mucopolisacáridos suaves lo que la hace de fácil digestión.

Tabla 1
Contenido de aminoácidos por cada 10g de
Arthrospira platensis

Aminoácidos esenciales		Aminoácidos no esenciales	
Fenilalanina	280 mg	Alanina	470 mg
Histidina	100 mg	Arginina	430 mg
Isolucina	350 mg	Acido aspártico	610 mg
Leucina	540 mg	Cisteína	600 mg
Lisina	290 mg	Acido glutámico	910 mg
Metionina	140 mg	Glicina	320 mg
Treonina	320 mg	Prolina	270 mg
Triptófano	90 mg	Serina	320 mg
Valina	400 mg	Tirosina	300 mg

Fuente: (Chen & Zhang, 1997)

2.2.3 Ácidos grasos esenciales

Presenta ácidos grasos poliinsaturados lo que indica que esta cianobacteria es una fuente de ácidos gamma- linoléicos (GLA), que es aproximadamente el 20-25% de lípidos presentes en esta cianobacteria. Los ácidos grasos esenciales no son sintetizados en el cuerpo humano por la ausencia de desaturasas, que son responsables de la formación de dobles enlaces. Los ácidos grasos reconocidos por la OMS/FAO son los ácidos α - linoléico, γ - linoléico y araquidónico. Las principales fuentes de ácidos grasos insaturados son aceites vegetales, entre los cuales se encuentra el maíz, soja, girasol y aceite de pescado (Sánchez, Bu, León, & Pérez, 2002).

Estos ácidos son considerados esenciales debido a que son los precursores de las prostaglandinas PGE1, que está implicado en la regulación de la presión arterial, síntesis de colesterol y crecimiento celular.

Tabla 2
Contenido de Ácidos grasos por cada 10g de espirulina

Ácidos grasos	
Grasa saturadas	100 mg
Grasas insaturadas	210 mg
Ácido linoléico	120 mg
Ácido linoléico γ	80 mg
Ácido oléico	11 mg

Fuente: (Centeno, 2013)

2.2.4 Pigmentos

Entre los pigmentos que componen la espirulina se encuentra la presencia de carotenoides, ficocianina y clorofila.

- a) Carotenoides: son foto receptores liposolubles que se encuentran como β -caroteno, xantófilas, luteína y zeaxantina. Las concentraciones que pueden alcanzar en las microalgas pueden ser 10 veces más altas que las que se encuentran en las zanahorias (Infante, Angulo, Flores, Barrlos, & Zapata, 2012).
- b) Ficocianina: es el principal pigmento de las microalgas, llegando al 20% en peso seco. La ficocianina se presenta como un estimulante para el sistema inmunológico, mediante el aumento de glóbulos blancos, cuya función es mantener la salud de los órganos del cuerpo (Centeno, 2013).
- c) Clorofila: se puede encontrar en pequeñas cantidades 1,1% como clorofila-a, mientras que la clorofila b se encuentra en 2%. Las clorofilas son precursoras de la fotosíntesis, proceso que permite absorber energía a partir de la luz solar. En células aclimatadas a una baja exposición a la luz, la concentración de clorofila se incrementa para poder obtener la energía luminosa para la fotosíntesis. Por otro lado una alta exposición, decrece la concentración celular de clorofila- a e incrementa la concentración de carotenoides, provocando de esta manera una

baja densidad celular en medios de cultivos (Mahavir, Kiranjot, Tulika, & Sanpreet, 2014).

2.3 Cinética de crecimiento

El crecimiento de la espirulina en un cultivo por lotes, bajo condiciones pre establecidas presenta las siguientes fases:

2.3.1 Fase de adaptación

Fase inicial de crecimiento lento o nulo que tiene lugar mientras los organismos se acostumbran al nuevo entorno, depende de las condiciones del inóculo. En esta etapa no se encuentran en condiciones metabólicas adecuadas por lo cual presentan una fase de retardo del crecimiento (Centeno, 2013).

2.3.2 Fase de crecimiento exponencial

Durante esta fase las microalgas y cianobacterias comienzan a multiplicarse a una velocidad específica con respecto al tiempo. En esta fase comienza la división celular dando lugar a nuevas células capaces de dividirse de forma exponencial (Mahavir, Kiranjot, Tulika, & Sanpreet, 2014).

2.3.3 Fase de crecimiento lineal

Esta fase tiene lugar cuando se da una disminución de nutrientes, cambios de pH y alteración de otros factores como consecuencia del incremento de la población. En esta fase existe una disminución en la tasa de división (Arredondo & Voltolina, 2014).

2.3.4 Fase Estacionaria

Durante esta fase el crecimiento celular disminuye por la limitación de nutrientes en el medio de cultivo, el número de células se mantienen constantes durante un periodo de tiempo. En este periodo se cosecha el cultivo, para no producir el efecto de auto sombreado por la baja penetración de luz causada por la alta concentración celular (Arredondo & Voltolina, 2014).

2.3.5 Fase de muerte

(Oliveira, Oliveira, Rocha, & Oliveira, 2012), deduce que en esta fase comienza la muerte celular a un ritmo significativo, causado por la deficiencia de nutrientes en

el medio de cultivo lo que ocasiona que la tasa de mortalidad sea superior a la de natalidad, y por ende se registra una baja concentración de materia seca por litro.

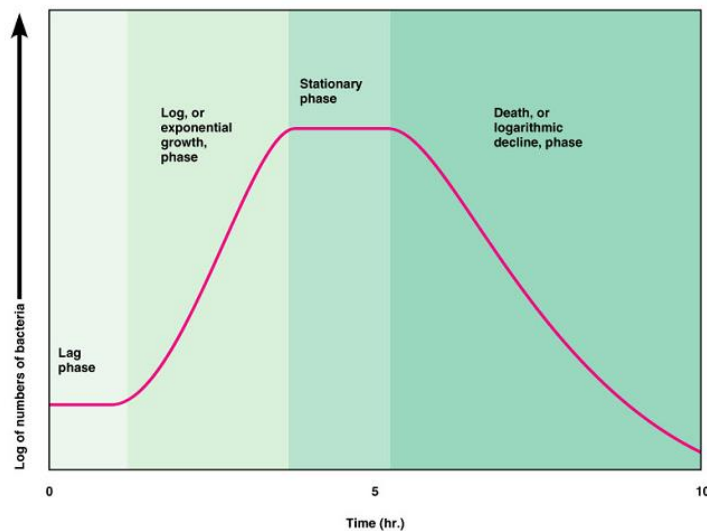


Figura 2 Cinética de crecimiento
Fuente: (Arredondo & Voltolina, 2014)

2.4 Parámetros del cultivo microalgal

Las condiciones de cultivo deben asemejarse al ambiente natural de la microalga y/o cianobacteria el mismo que debe contener elementos constituyentes como son Nitrógeno, fósforo, hierro y algunos elementos traza. Los parámetros que permiten el crecimiento de las microalgas se detallan a continuación:

2.4.1 Nutrientes

Los nutrientes son compuestos químicos formados por moléculas unidas fuertemente entre sí, necesarios para el metabolismo de organismo, los nutrientes básicos son oxígeno, agua y nutrientes minerales (nitrógeno, carbono, magnesio, hierro y zinc), necesarios para las microalgas, y que a través de la fotosíntesis incorporan la materia viva (Materassi, Tredici, & Waldemaro, Spirulina culture in sea-warter, 1984).

En la actualidad el uso de extractos hidrolizados como glucosa, urea y melaza, se manejan con el fin de minimizar costos de producción de la biomasa de espirulina y Chlorella. Dado a que estos extractos sustituyen nutrientes como carbono, nitrógeno, hierro, sodio y magnesio (Meixner, Fritz, & Daffert, 2016).

2.4.1.1 Fuente de Carbono

El CO₂ es la fuente de carbono para el crecimiento de microalgas foto autótrofas, que puede estar presente en el medio como una sal derivada, tal como el bicarbonato de sodio, pero su reducción e incorporación a la biomasa en el ciclo de Calvin siempre se produce teniendo como sustrato al CO₂ molecular (Arredondo & Voltolina, 2014).

El ciclo de Calvin o fase de fijación de CO₂, durante esta fase el dióxido de carbono entra en los cloroplastos a través de los estomas, posterior al estroma en donde se sintetizan azúcares. Las reacciones del ciclo de Calvin se organizan en tres etapas: fijación, reducción y generación. En el estroma se encuentra la enzima RuBisCO catalizadora de la enzima RuBP reacción que produce un azúcar de tres carbonos. La energía almacenada en el ATP y NADPH convierte los compuestos de tres carbonos en 3-PGA, que contribuyen a la formación de glucosa (Naranjo, 2015).

2.4.1.2 Fuente de Nitrógeno

El nitrógeno es necesario para la formación de ácidos nucleicos y proteínas, sin embargo la deficiencia desfavorece la producción y acumulación de lípidos. Las fuentes más comunes de nitrógeno son nitrato, nitrito, urea y amoníaco (Aiba & Ogawa, 1997).

La espirulina no fija nitrógeno atmosférico, siendo necesario suplementar este nutriente en el medio de cultivo. Existe una gran variedad de productos orgánicos e inorgánicos que se pueden utilizar como fuente de nitrógeno, debido a la gran capacidad que tiene para utilizar los nitratos, nitritos o el amoníaco. La deficiencia de nitrógeno durante el crecimiento puede provocar una disminución en la producción de clorofila y ficocianina afectando la composición de los ácidos grasos. Si el nitrógenos se encuentra en baja concentración en el medio de cultivo, provoca la acumulación de lípidos y polisacáridos en la célula (Guarienti, 2012).

2.4.1.3 Fuente de Fósforo

El fósforo es un nutriente esencial para el crecimiento de microalgas que participa en la transferencia de energía intracelular, síntesis de ácidos nucleicos y reacciones de división celular. El fósforo orgánico se encuentra en sistemas naturales en mayor cantidad que el fosfato inorgánico, el mismo que es utilizado por

microalgas durante las diferentes fases de crecimiento algal. (Oliveira, Oliveira , Rocha, & Oliveira, 2012).

2.4.2 Luz

La intensidad de luz y la longitud de onda de la fuente de luz influyen directamente en el crecimiento de microalgas (Arredondo & Voltolina, 2014). Los cloroplastos son los responsables de la fotosíntesis que pueden ser destruidas irreversiblemente a altas intensidades de luz ultravioleta durante periodos de tiempo prolongados. Se recomienda mantener un foto periodo con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad para promover el proceso fotosintético en las microalgas (Oliveira, y otros, 2015).

2.4.3 Temperatura

Uno de los efectos más importantes de la temperatura sobre el metabolismo celular es la influencia sobre la respiración, también conocida como la fase oscura de la fotosíntesis, en donde la tasa de respiración aumenta exponencialmente con la temperatura. Mantener una temperatura alta durante la fase oscura causa un aumento en la tasa de respiración y por lo tanto la pérdida de biomasa (Ortiz, Cortés, Castillo, Padilla, & Otero, 2011).

Al igual que todos los microorganismos, la tasa de crecimiento de espirulina es fuertemente influenciada por la temperatura. El rango óptimo está entre 15° , pero logra mantenerse en temperaturas mínimas desde 12°, hasta una temperatura máxima de 24°, ya que a temperaturas superiores reduce su crecimiento (Piñero, Bermejo, & Villar del Fresno, 2001).

2.4.4 Potencial Hidrógeno (pH)

Es uno de los factores más importantes en el cultivo de microalgas y cianobacterias. Espirulina presenta una dependencia respecto al pH del medio de cultivo dado a que su tasa fotosintética aumenta con pH del medio de 8 hasta 10. Por lo tanto, un descenso de pH es letal (Prepelitchi, Pujadas, & Wisnivesky, 2015).

El estudio de (Ortiz, Cortés, Castillo, Padilla, & Otero, 2011), estableció que *Arthrospira platensis* obtuvo una densidad celular de $5,8 \times 10^4$ filamentos mL⁻¹, con un pH alcalino de 9.3. Caso contrario si el pH se encuentra por encima de 10.3, el

carbono se encuentra presente como carbonato y por lo tanto su crecimiento se reduce hasta llegar a concentraciones de $3,8 \times 10^4$ filamentos mL^{-1} .

El pH tiene influencia directa en la disponibilidad de nitrógeno, dado que un pH por encima de 9 libera nitrógeno en forma de amoníaco, que puede ser absorbido por la pared celular (Oliveira, y otros, 2015).

2.4.5 Agitación

Los cultivos de espirulina se recomienda mantenerlos con aireación constante y presencia de luz para favorecer el crecimiento microalgal (Rojas, Ávila, & Parada, 2012). Se debe mantener una agitación constante mediante motores de aireación que proporcionen 2.25 LO₂/min para evitar la formación de grupos de células y asegurar que la incidencia de luz sea suficiente. La agitación excesiva puede conducir a la rotura de los tricomas, con una reducción de su tamaño lo que dificultara su cosecha por filtración (Quintero, Arredondo, Flores, Maldonado, & Carballo, 2016).

2.4.6 Medio Zarrouk

Se han desarrollado diferentes medios para el cultivo de microalgas que van desde fórmulas para enriquecer el agua de mar natural, hasta el uso de medios artificiales con resultados constantes. Las principales fórmulas utilizadas para el cultivo de *Arthrospira platensis* medio Zarrouk modificado (Aiba & Ogawa, 1997) como también se encuentran los medios propuestos por Raouf (RM6) y DIC (Dainippon Ink & Chemicals Inc., Japan). Siendo el medio Zarrouk el más utilizado a nivel internacional, dado que *Arthrospira platensis* presenta mayor crecimiento celular llegando a 220 mil filamentos en fase estacionaria, manteniéndose bajo condiciones controladas de laboratorio.

Es el primer medio sintético formulado para el cultivo de *Arthrospira platensis* el cuál es usado como medio estándar. Fue definido por primera vez en 1966, y trabajos anteriores muestran que algunos componentes de este medio pueden ser diluidos ya que la concentración de algunos nutrientes son altos.

Con este medio se ha demostrado, que es posible obtener una concentración de biomasa en cultivos mixotróficos que van en un orden de 0,5 a 1,5 g L^{-1} , bajo

condiciones controladas de laboratorio (Chen & Zhang, 1997) (Mutileno, Correa, Vieira, & Hemkemeier, 2005).

Tabla 3
Composición del Medio Zarrouk para un litro de solución

Sustancia	Concentración
NaHCO ₃	13.61 g L ⁻¹
Na ₂ CO ₃	1.03 g L ⁻¹
K ₂ HPO ₄	0.50 g L ⁻¹
NANO ₃	2.50 g L ⁻¹
KSO ₄	1.00 g L ⁻¹
NaCl	0.20 g L ⁻¹
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.04 g L ⁻¹
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,01 g L ⁻¹
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0.05 g L ⁻¹
H ₃ BO ₃	2.86 g L ⁻¹
MnCl ₂ . 4H ₂ O	1.18 g L ⁻¹
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.22 g L ⁻¹
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0.39 g L ⁻¹
CUSO ₄ .5H ₂ O	0.079 g L ⁻¹
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0.049 g L ⁻¹
VOSO ₄ .5H ₂ O	0.0496 g L ⁻¹
K ₂ Cr ₂ (SO ₄). 2H ₂ O	0.096 g L ⁻¹
NiSO ₄ . 7H ₂ O	0.0478 g L ⁻¹
Na ₂ WO ₄ . 2H ₂ O	0.0179 g L ⁻¹
TiOSO ₄	0.033 g L ⁻¹
Co(NO ₃) ₂ .6HO	0.044 g L ⁻¹

Fuente: (Aiba & Ogawa, 1997)

2.5 Cultivo Industrial de espirulina (*Arthrospira platensis*)

Para lograr un cultivo masivo de cianobacterias o microalgas en crecimiento activo es necesario tomar consideración los siguientes parámetros:

- Inóculo viable de tamaño mínimo.
- Suministro de nutrientes y micro elementos.
- Condiciones físico- químicas adecuadas (temperatura, pH, salinidad)
- Luz como fuente de energía

2.6 Sistemas de producción

La producción de microalgas presenta muchas similitudes con la agricultura intensiva. La obtención de biomasa a gran escala hoy en día se puede obtener con la

utilización de microalgas foto autótrofa convirtiéndose en un sistema económicamente viable. Los sistemas de cultivo, se clasifican según su configuración y tipo de funcionamiento. Hay una gran variedad de sistemas que se emplea para el cultivo de microalgas, dependiendo de su aplicación. Los principales sistemas de producción de microalgas son: sistemas abiertos y cerrados (Margarites, y otros, 2016).

2.6.1 Sistemas Abiertos

Los sistemas abiertos se llevan utilizando desde los años 50 y son uno de los más comunes en la producción de microalgas.

Estos sistemas se pueden clasificar en aguas superficiales naturales, como estanques, lagunas y lagos, y en estanques artificiales, ya que para la producción de microalgas es necesario principalmente una fuente agua, luz y CO₂. Los sistemas abiertos no necesitan grandes inversiones ni mantenimiento y son de fácil escalado, pero su control es más complicado por lo que estos sistemas tienen una baja productividad y eficiencia, además son susceptibles a contaminaciones por otras algas o bacteria, aunque suponga un menor costo (Cornet, Dussap, & Dubertret, 1992).

Actualmente, el 95% de la producción de microalgas se basa en sistemas abiertos (raceways o estanques abiertos circulares). Estos sistemas presentan una baja tasa de fijación de CO₂, estimándose que entre el 20-50% del gas inyectado es efectivamente fijado por microalgas (Algaefix, 2016).

En general, para el cultivo en sistemas abiertos se busca cepas de microalgas que puedan crecer bajo condiciones en la que otros organismos les resultaría difícil desarrollarse como pH altos o bajos, temperaturas específicas y requerimientos específicos.

2.6.2 Sistemas raceway

Son dispositivos más sofisticados en el sentido de que proveen agitación y mezcla. También pueden suministrar CO₂ al cultivo de forma relativamente eficiente y con pocas pérdidas, lo que permite realizar un adecuado control de pH (Margarites, y otros, 2016). El sistema de impulsión que utiliza es de rueda de paletas o "paddle

wheel” y consigue mantener el cultivo en suspensión y constante homogenización (Spolaore, Cassan, Duran, & Isambert, 2006).

Las limitaciones de los sistemas abiertos dificultan el mantenimiento en el tiempo de cultivos monoalgales, por lo que su utilización a gran escala se ha limitado a ciertas estirpes de crecimiento vigoroso en medios selectivos y resistentes a condiciones de intemperie (Fedekar, El-Bahad, & Hoda, 2012).

2.6.3 Sistemas cerrados (Fotobioreactores)

Un fotobioreactor es un sistema cerrado forzado al máximo para la obtención de un mayor crecimiento de la microalga que se quiere cultiva. Estos sistemas de fotobioreactores se caracterizan por el control y regulación de la mayoría de parámetros de crecimiento (Temperatura, CO₂, pH). La luz no incide directamente en las células (Tuanted, y otros, 2014). En estos fotobioreactores cerrados el intercambio de gases entre el cultivo y la atmosfera está limitada, suele producirse una acumulación de oxígeno.

Los fotobioreactores cerrados se pueden clasificar según su diseño y su modo de operación y se clasifican en:

- Planos tubulares
- Horizontales, verticales, inclinados o espirales.
- Serpentes
- Reactores de una fase.
- Reactores de dos fases.

2.7 Producción de espirulina en Ecuador

La producción industrial en Ecuador está muy poco desarrollada debido a que se limita a una producción artesanal dado que la mayor cantidad de producto que llega al país es por medio de importaciones. La producción en Ecuador se encuentra monopolizada por una empresa dedicada a la producción de biomasa seca, cosecha y procesamiento de espirulina a través de la aplicación de buenas prácticas de manufactura (El Agro, 2016).

Entre los productos que se encuentran en stock en el país se encuentran suplementos alimenticios micros pulverizados, comprimidos de 100 cápsulas de

gelatina que contienen 400 mg de espirulina y espirulina en polvo en paquetes de 300 g, que son los productos más cotizados del mercado.

2.8 Usos comerciales de espirulina (*Arthrospira platensis*)

Las cianobacterias por ser organismos fotosintéticos con alto valor nutricional se caracterizan por un rápido crecimiento, que hace que estos organismos sean utilizados en un sin número de fines tales como: suplemento alimenticio tanto para animales como para humanos, en la investigación de (Henrikson, 2009), establece que la spirulina tiene influencia directa sobre los neurotransmisores de cerebro, particularmente los que controlan los cambios de carácter y apetito. Esto se debe a la alta concentración de fenil-alanina. En la actualidad se utilizan en las siguientes aplicaciones:

a) Industria farmacéutica

La espirulina se cultiva en algunos países como alimento para el consumo humano. Sin embargo, en los últimos años se le ha atribuido diversas propiedades farmacológicas que han comprobado su efectividad en tratamientos de alergias, anemia, cáncer, enfermedades virales y cardio vasculares. Esto se debe a las sustancias que contiene y que actúan como principio activo tales como el ácido graso poliinsaturado omega-3, omega-6, beta-caroteno, tocoferol, ficocianina, compuestos fenólicos y un complejo aislado Ca- Spirulan (Ca-SP) (Chamorro, Salazar, Gómez, Pereira dos Santos, & Castillo, 2002).

b) Nutrición Humana

La espirulina ha sido utilizada como alimento por numerosas culturas como los aztecas y mayas. La espirulina no es un medicamento para combatir una dolencia específica, sino es un suplemento alimenticio natural y concentrado que ayuda a combatir deficiencias nutricionales (Espada, 2016). Esta cianobacteria contiene una amplia gama de nutrientes, vitaminas, minerales, antioxidantes, proteínas y pigmentos (Meixner, Fritz, & Daffert, 2016).

Se fabrican como suplementos nutritivos y colorantes naturales de alimentos, donde dominan el mercado los géneros *Chlorella*, espirulina y *Dunaliella*.

c) Nutrición animal

El uso actual de espirulina sobre la nutrición animal está restringida por el costo relativamente alto de la materia prima, sus propiedades nutricionales y porcentaje de fibra, proteína, vitaminas y lípidos son superiores en comparación a otras materias primas tales como la harina de soya (Spolaore, Cassan, Duran, & Isambert, 2006). En este punto se incluyen la alimentación de mascotas, animales de granja y como uso más importante, en acuicultura donde se emplea en el crecimiento de moluscos y peces, así como el colorante de la carne del salmón en las piscifactorías (Centeno, 2013).

Por su parte (Rincón, Velásquez, Dávila, & Semprum, 2012) afirma que la inclusión de espirulina fresca en larvas de *Oreochromis niloticus*, tiene un efecto positivo debido a que las larvas podían asimilar y utilizar eficientemente la cianobacteria mejorando así la eficiencia alimenticia y ganancia de peso lo cual fue probado hasta un nivel de ingesta de 2,6% del alimento total consumido, desde su alimentación exógena sin embargo se mostró que la aceptabilidad fue baja en los primeros días de suplementación.

d) Biofertilizantes

La utilización de la biomasa de espirulina es utilizada como abono natural que mejora la calidad de las plantas sin dañarlas y la resistencia a hongos. Los Biofertilizantes a base de espirulina (45% N, 10% P, 60% K), son indicados para cultivos intensivos, la cuál al entrar en contacto se calienta y se rompe la pared celular y libera aminoácidos tales como lisina, metionina y triptófano que hace que los biofertilizantes sean considerados un complemento biológico excelente. (Cornet, Dussap, & Dubertret, 1992).

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

3.1 Ubicación del lugar de la investigación

3.1.1 Ubicación política

El presente estudio constó de dos fases las cuales se realizaron en el laboratorio de Acuicultura y Recursos Acuáticos y en el proyecto de producción Paylones perteneciente a la Carrera de Ingeniería Agropecuaria IASA I, de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, parroquia San Fernando, Cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha.



Figura 3 Ubicación del Laboratorio de Acuicultura (IASA I)

Fuente: Google maps, 2017

3.1.2 Ubicación geográfica

El laboratorio de Acuicultura y Recursos Acuáticos se encuentra en las coordenadas geográficas: Longitud 78°24'44''O, latitud 0°23'20''S.

El proyecto Piscícola Pailones- IASA I se encuentra en las coordenadas longitud 78°24'44''O, latitud 0°23'20''S y altitud de 2940 m.s.n.m.

3.1.3 Ubicación ecológica

La Hacienda el Prado se encuentra en la zona de vida Bosque Húmedo Montano, tiene una temperatura promedio anual de 13,89°C, una precipitación de 1285

mm/año, y humedad relativa promedio de 69,03% (Estación de Meteorología e Hidrología – Hacienda El Prado., 2016).

3.2 Materiales y Equipos

Los materiales, equipos, reactivos y organismos empleados en el presente proyecto de investigación fueron:

3.2.1 Materiales de campo

- 4 Tanques de 2m³ de capacidad.
- Manguera difusora.
- Tubería PVC ¾”.
- Filtro de agua.
- Tubos falcón 15 ml.
- 4 Kg de Fertilizante foliar 12-12-36.
- 92 Kg de Medio Zarrouk.

3.2.2 Materiales de laboratorio

- 10 tubos Falcón de 50 ml.
- 15 tubos de ensayo de 10 ml.
- 12 porta y cubre objetos.
- 9 cajas Petri de plástico.
- 9 matraces Erlenmeyer de 1 litro de capacidad.
- 9 recipientes plásticos transparentes de 8 litros de capacidad
- 9 recipientes plásticos transparentes de 20 litros de capacidad.
- 20 metros de manguera para aireación.
- 9 piedras difusoras.
- 5 Kg de medio Zarrouk.
- 1 Kg de Fertilizante foliar 12-12-36.

3.2.3 Equipos

- Microscopio óptico OLYMPUS.
- Cámara de siembra.
- Centrifuga MX 8624.
- Estufa Ecocell.

- Plancha de calentamiento.
- Cifón y sistema para procedimiento Soxhlet.
- Digestor con extractor de vapores Kjeldahl (MICROMAX RF).
- Destilador Kjeldahl (MICROMAX RF).
- Mufla.
- Espectrofotómetro UV (GENESYS™ 10S).
- pH- metro HANNA.
- Balanza analítica (M-220D).
- Termómetro láser.
- 9 motores doble salida para acuario.
- Espectrofotómetro de Absorción atómica.

3.2.4 Reactivos

- 100 ml de Ácido sulfúrico.
- 5 tabletas catalizadores Kjeldahl.
- 100 ml de Ácido bórico al 4%.
- 300 ml de Hidróxido de sodio.
- 1000 ml de acetona.
- 400 ml Ácido clorhídrico.
- Metanol 99%

3.2.5 Organismos

- Cepa purificada de la microalga *Arthrospira platensis*, que fueron adquiridas del laboratorio de Acuicultura y Recursos acuáticos de la Carrera de Ingeniería Agropecuaria- IASA.

3.3 Métodos

El proyecto de investigación se realizó en dos fases bien definidas, la primera fase contempló la producción y análisis nutricional de la biomasa de *Arthrospira platensis*, que permaneció bajo condiciones controladas de laboratorio. La segunda fase consistió en la masificación del ensayo y mejor tratamiento obtenido en laboratorio este permaneció bajo invernadero.

La metodología del presente proyecto y cada uno de los procesos correspondientes a cada fase de investigación se muestran de forma sintetizada en la figura 4.

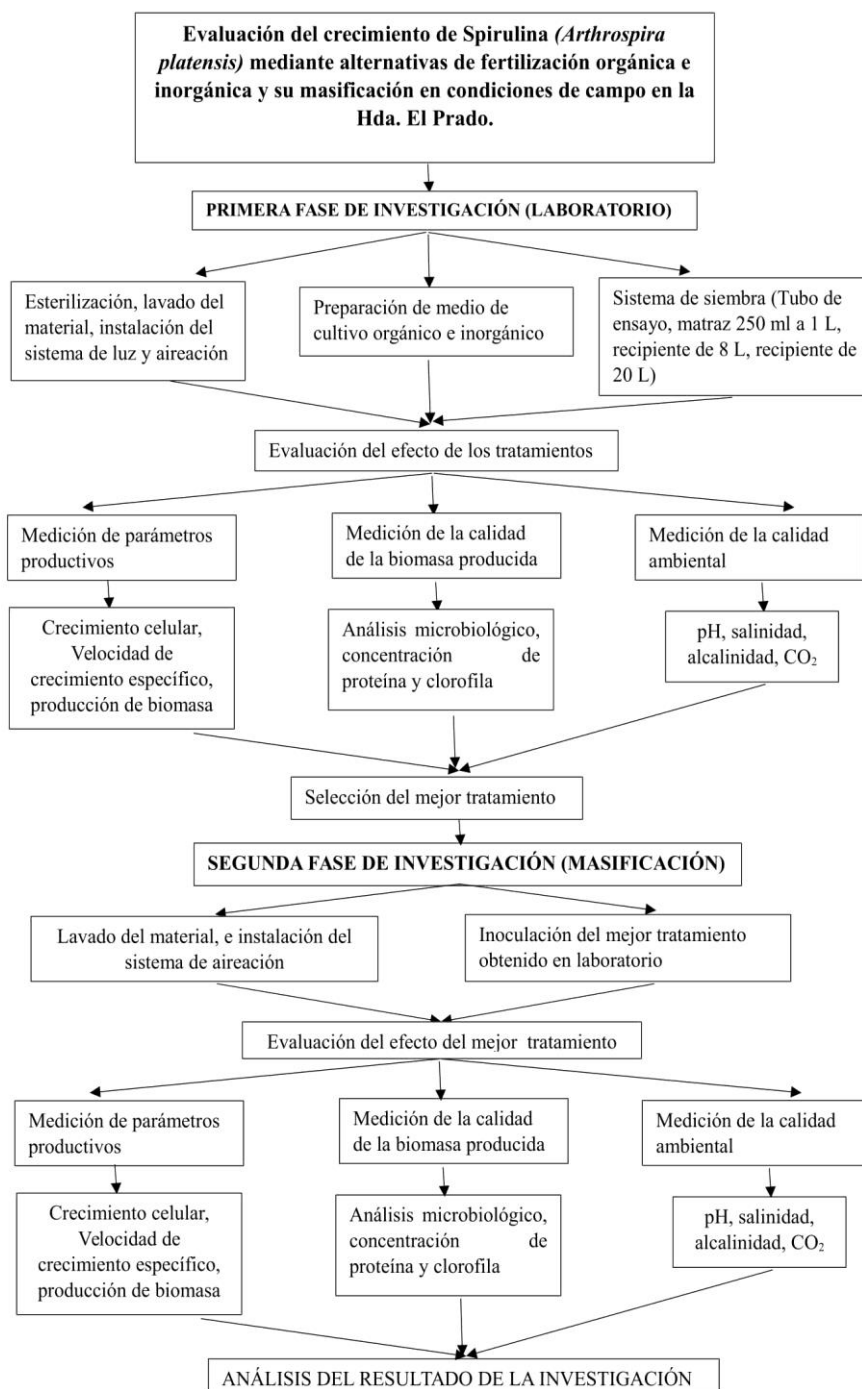


Figura 4 Metodología del proyecto de investigación Evaluación del crecimiento de *Arthrospira platensis*

3.3.1 Primera fase de investigación del crecimiento de *Arthrospira platensis*, bajo el efecto de medios de cultivo orgánico, inorgánico modificados en laboratorio

En esta fase se seleccionó y estableció el medio de cultivo en donde se realizó un mantenimiento de la cepa de *Arthrospira platensis* y cosecha de biomasa microalgal.

3.3.1.1 Selección del medio de cultivo para el cultivo de *Arthrospira platensis*

Se desarrollaron tres medios de cultivo para la cianobacteria espirulina, para lo cual se tomó en cuenta el medio de cultivo Zarrouk modificado y todos los macro y micro elementos necesarios para su desarrollo, así como las condiciones de cultivo a un pH de 9,3 y temperatura de 18°C.



Figura 5 Medios de cultivo para *Arthrospira platensis* a) Zarrouk; b) Orgánico; c) Inorgánico

3.3.1.2 Preparación de los medios de cultivo para *Arthrospira platensis*

Se prepararon tres medios de cultivo Zarrouk, orgánico e inorgánico como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 4
Medios de cultivo para *Arthrospira platensis* en condiciones de laboratorio y campo

Medios nutritivos					
Zarrouk		Inorgánico		Orgánico	
Componente	Concentración	Componente	Concentración	Componente	Concentración
	g L ⁻¹		g L ⁻¹		g L ⁻¹
NaHCO ₃	13.61		13,61		13,61
Na ₂ CO ₃	1.03		4		
K ₂ HPO ₄	0.50		0,5		
NANO ₃	2.50	Fuente Nitrógeno Fertilizante foliar 12-12-36		Fuente Nitrógeno Orina de ganado vacuno	
KSO ₄	1		1		1
NaCl	0.20				
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.04				
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,01				
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0.05				
Na ₂ EDTA. 2H ₂ O	1.18				
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.22				
Micronutrientes Solución de vitaminas	1 mL				
Temperatura	18°C- 30°C		18°C- 30°C		18°C- 30°C
pH	9,3		9,3		9,3

Cuantificación de la biomasa de *Arthrospira platensis* en condiciones de Laboratorio

Para iniciar con el proceso de masificación de la biomasa a nivel de laboratorio, se tomó 1 ml de la cepa de *Arthrospira platensis* y se colocó en tubos de ensayo con 10 ml de los medios nutritivos, los cuales consistieron, el primer medio a base del medio Zarrouk modificado, el segundo estuvo formulado con un fertilizante foliar compuesto por 12% N, 12 % P y 36 %K en una dosificación de 1 g L⁻¹ y por último el medio nutritivo a base de orina de ganado vacuno anteriormente procesada.

Los tubos se cubrieron con tapones estériles y fueron expuestos a iluminación artificial con el fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad con una irradiación de 78,8 μmol m⁻² s⁻¹.

Una semana después se procedió a colocar el contenido en matraces Erlenmeyer autoclavados con 200 ml de medio nutritivo, con tapones de gasa estéril para facilitar

el intercambio gaseoso. Se implementó aireación permanente con un motor de 2 W a temperatura ambiente (18°C), cada 3 días se adicionó 200 ml de medio para enriquecer la cepa hasta que alcanzar 1 litro de solución.

Una vez que alcanzó este volumen se procedió a cuantificar el crecimiento celular mediante espectrofotometría UV de la biomasa a través del peso seco. Cuando el cultivo microalgal en los frascos Erlenmeyer de 1 litro alcanzaron una concentración celular deseada se procedió a depositar su contenido en tanques estériles de plástico de 8 litros de capacidad, con sistemas de aireación e iluminación. Una vez que en el tanque de 8 litros alcanzó la concentración celular propuesta se transfirió el contenido a tanques estériles de 20 litros de capacidad. Para determinar el volumen de inóculo de microalgas y medio nutritivo se empleó la fórmula universal $C_1V_1=C_2V_2$, y periódicamente se añadió medio nutritivo nuevo.



Figura 6 Proceso de la producción de biomasa de *Arthrospira platensis* para la fase de laboratorio

Concluido el proceso de crecimiento de *Arthrospira platensis* en condiciones de laboratorio se procedió a elegir el mejor tratamiento, el mismo que se utilizó como inóculo para los nuevos contenedores teniendo en cuenta que este cumpla con todas las variables a evaluar.

3.3.1.3 Crecimiento celular de *Arthrospira platensis* en condiciones de laboratorio

El crecimiento celular se lo realizó cada tres días durante 33 días, para determinar la densidad óptica se utilizó un espectrofotómetro UV (GENESYS™ 10S), para lo cual se agitó el cultivo en fase de crecimiento y se tomó en un tubo de ensayo 1 ml de inóculo y se colocó en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 670 nm. Previamente el equipo debe estar calibrado con un blanco del medio de cultivo Zarrouk, inorgánico y orgánico y se procedió a la lectura (Mahavir, Kiranjot, Tulika, & Sanpreet, 2014).



Figura 7 Recolección de la muestra para determinar la densidad celular de *Arthrospira platensis* por Espectrofotometría UV en fase de laboratorio

Para la evaluación del crecimiento se realizó un conteo celular de cada ensayo cada tres días mediante la utilización del microscopio. Para disminuir el error se realizó diluciones con agua destilada en una porción 1:10.

Para determinar la densidad celular se utilizó la siguiente fórmula:

$$DC_{\text{inoculo}} = \frac{N \times 10^3}{10} \times FD$$

DC_{inoculo} : Densidad celular del inóculo (filamentos mL^{-1})

N: Promedio de células presentes. De acuerdo al promedio de filamentos contados.

10^3 : Factor de conversión de 10 μL a 1 ml.

FD: Factor de dilución

3.3.1.4 Cosecha de la biomasa de *Arthrospira platensis* para la fase de laboratorio y campo

Al alcanzar la densidad celular máxima en el cultivo de *Arthrospira platensis* el cual no debe ingresar aun a fase estacionaria, se procedió a cosechar la biomasa y se recolectó el contenido de los tanques de 20 litros que fueron mantenidos en oscuridad durante 3 días para permitir su precipitación y preservación.

El precipitado se recolectó en tubos Falcón de 50 ml, se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos y el residuo se secó en una estufa a 36 °C durante 24 horas. La biomasa seca se almacenó en recipientes herméticos bajo refrigeración a 4 °C.

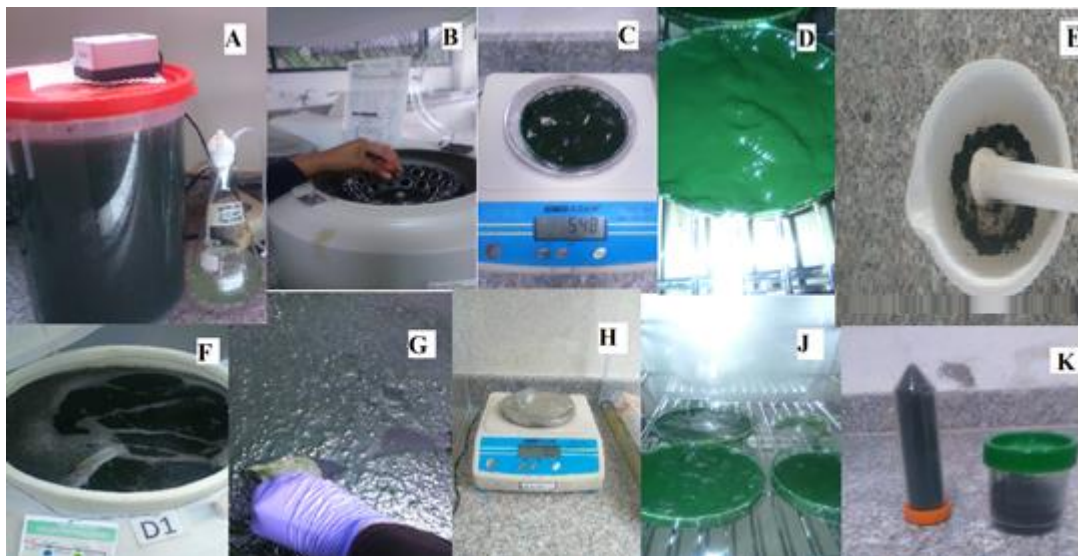


Figura 8 Cosecha de la biomasa *Arthrospira platensis* (a y f) Sedimentación; (b, g) centrifugación y filtrado;(c y h) pesado biomasa; (d y j) secado; (e y k) pulverización

3.3.1.5 Análisis proximal de la biomasa de *Arthrospira platensis* (laboratorio y campo)

El análisis del contenido nutricional de *Arthrospira platensis* se realizaron por triplicado las siguientes pruebas bromatológicas: Destilador Kjeldahl (MICROMAX RF) para determinar el contenido proteico, Soxhlet para precisar el contenido de grasa y calcinación de muestras para obtener el porcentaje de humedad y cenizas. Los protocolos de cada ensayo se realizaron en base a las normas técnicas ecuatorianas para la determinación del contenido nutricional de alimentos (INEN, 1981).



Figura 9 Determinación del porcentaje de proteína para *Arthrospira platensis* por el método de Kjeldahl a) Digestión; b) Destilación; c) titulación

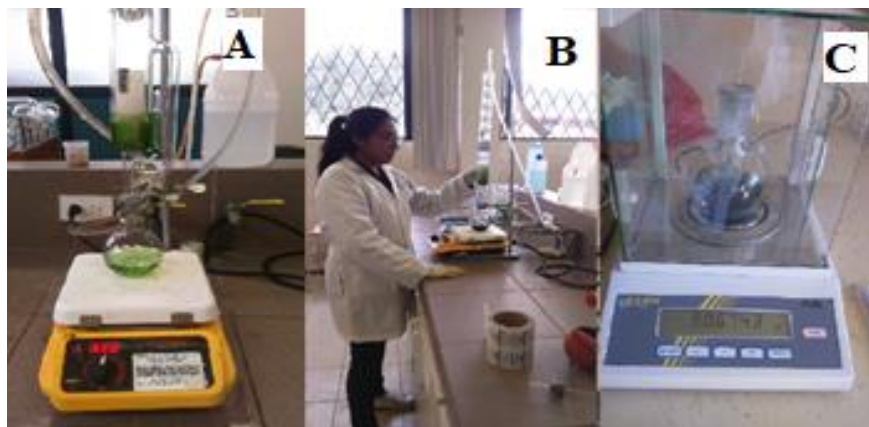


Figura 10 Determinación del porcentaje de grasa en *Arthrospira platensis* por el método de Soxhlet a) Destilación; b) extracción del solvente; c) Obtención del porcentaje de grasa

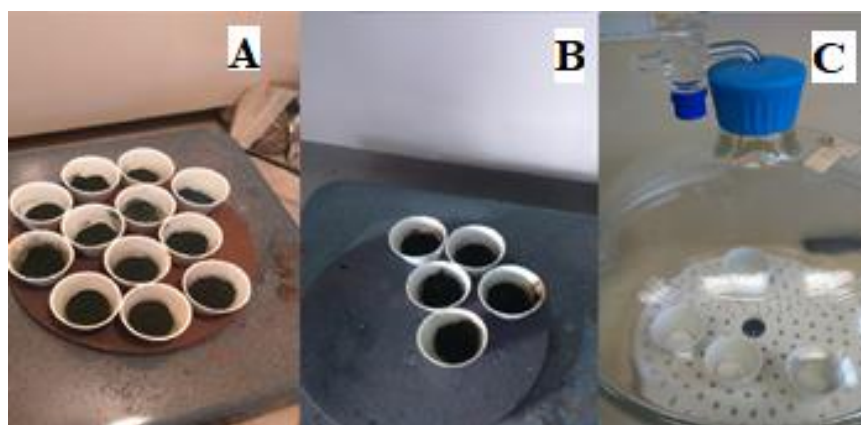


Figura 11 Determinación del porcentaje de ceniza para *Arthrospira platensis* a) desecación; b) calcinación; c) obtención del porcentaje de ceniza

3.3.1.6 Análisis microbiológicos de los medios de cultivo de *Arthrospira platensis* durante la fase de laboratorio y campo

Se realizó un análisis microbiológico para determinar la presencia bacteriana en la biomasa producida mediante un aislamiento en placas de agar por la técnica de rayado en estrías. Finalmente se realizó la verificación de la presencia de bacterias u otros organismos por medio del programa ABIS online.

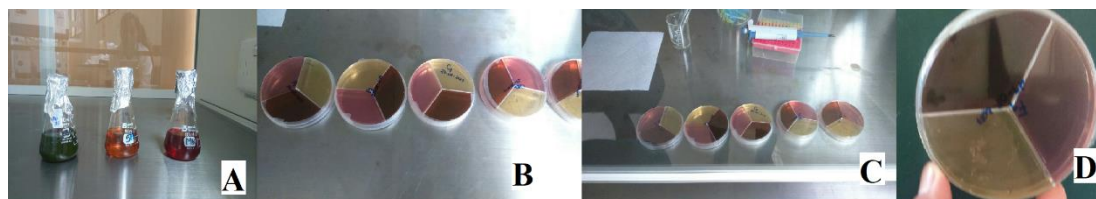


Figura 12 a) Preparación medios de cultivo EMB, PDA y MACConkey b) Dosificación de medios c) Siembra d) Identificación

3.3.2 Segunda fase de investigación del crecimiento de *Arthrospira platensis* bajo el efecto del mejor tratamiento obtenido en laboratorio y su adaptación en campo

Esta fase contempló la instalación del ensayo en el Proyecto Piscícola de Paylones para su masificación, en donde se colocó el contenido en 2 tanques de 2 m³ de capacidad, para lo cuál primero se realizó la conexión del sistema de aireación a cada uno de los tanques. Una vez culminado este proceso se procedió a esterilizar los tanques con alcohol y se los lavó hasta desprender todos los residuos de alcohol y detergente. También es necesario lavar el equipo de aireación. Posterior a esto se filtró el agua y se llenó los tanques con agua hasta un volumen de 500 litros y se potabilizó para lo cual se colocó 15 ml de cloro por 500 litros de agua.

Finalmente se colocó el inóculo hasta una densidad de 2×10^5 filamentos mL⁻¹, en donde se conservó hasta alcanzar una densidad de 6×10^5 filamentos mL⁻¹ y se procedió a escalar el cultivo hasta 1 m³ y finalmente tras alcanzar 2 m³ con una densidad celular de $7,5 \times 10^5$ filamentos mL⁻¹ posteriormente se realizó la cosecha.

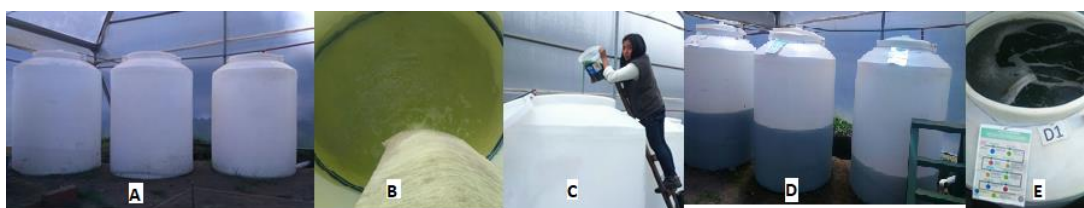


Figura 13 Producción de *Arthrospira platensis* bajo invernadero a) Estructuración del ensayo; b) Preparación medio nutritivo; c) Siembra; d) Masificación e) Control del inóculo

3.3.3 Diseño Experimental (fase de laboratorio y campo)

El presente proyecto de investigación consistió de dos fases (laboratorio y campo) en donde se utilizó un Diseño completamente al azar y cada uno de sus elementos, se detallan a continuación.

3.3.3.1 Factores (laboratorio y campo)

El factor de estudio que se evaluó en la presente investigación y bajo condiciones locales, fue el medio de cultivo modificado, caracterizado de la siguiente manera: Control (medio Zarrouk); Orgánico modificado (Orina de ganado vacuno); Inorgánico modificado (Kristalón).

3.3.3.2 Tratamientos para la fase de laboratorio y campo

Se prepararon los medios en base al medio Zarrouk y a los requerimientos nutricionales de *Arthrospira platensis*, se establecieron 3 tratamientos: T1 Control medio Zarrouk, T2 medio orgánico, T3 medio inorgánico modificado (Tabla 4).

Tabla 5
Tratamientos para evaluar el crecimiento de *Arthrospira platensis* durante la fase de laboratorio y campo

Tratamiento	Descripción
T1	Testigo medio Zarrouk modificado
T2	Medio nutritivo orgánico modificado a base de orina de vacuno
T3	Medio nutritivo modificado a base de fertilizantes foliares inorgánicos modificados (Kristalón y Bicarbonato de sodio).

3.3.3.3 Tipo de Diseño para la fase de laboratorio y campo

Por la estructura de la investigación, se aplicó un Diseño Completamente al azar (DCA) con 3 repeticiones.

Modelo matemático:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}, \text{ en donde:}$$

μ = media poblacional,

T_i = efecto del i -ésimo tratamiento,

e_{ij} = error experimental

3.3.3.4 Repeticiones

Fase de investigación (laboratorio y campo)

Se consideró tres repeticiones por cada tratamiento tanto para la fase 1 y 2, para el diseño experimental sea representativo para el análisis estadístico.

3.3.3.5 Características de las unidades experimentales

Primera fase de investigación (laboratorio)

Para la fase de laboratorio las unidades experimentales se consideraron envases de plástico de 20 L de capacidad con medio de cultivo e inóculo microalgal, y permaneció a una temperatura ambiente de $17 \pm 5^\circ\text{C}$ con una irradiación ($78.8 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y aireación permanente.

Segunda fase de investigación (campo)

En la fase de campo las unidades experimentales fueron tanques de 2 m^3 de capacidad, con sistema de aireación permanente a $19 \pm 5^\circ\text{C}$.

3.3.3.6 Croquis experimental para la fase de laboratorio y campo

A continuación se presenta para la primera fase el croquis experimental del Diseño completamente al Azar con 9 unidades experimentales colocadas sobre una superficie plana.

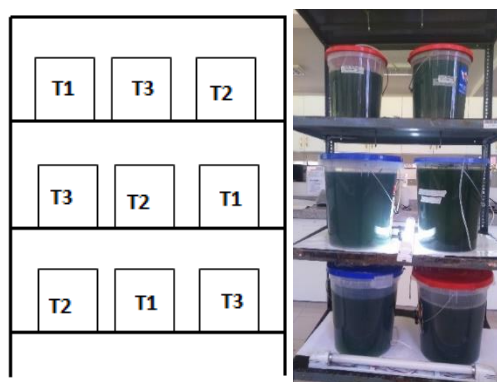


Figura 14 Croquis del diseño experimental en laboratorio

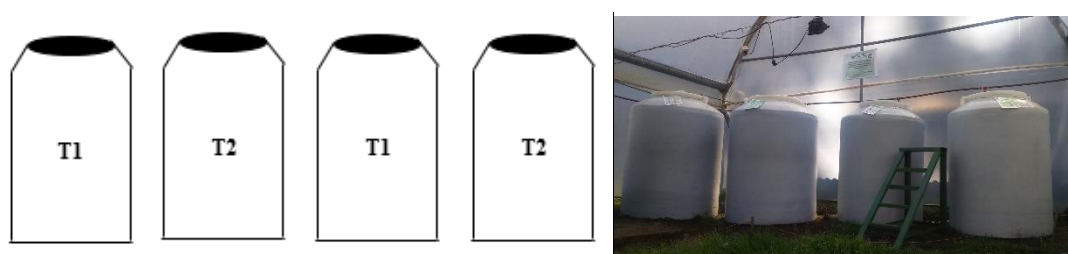


Figura 15 Croquis del diseño experimental en campo bajo invernadero

3.3.3.7 Análisis de varianza

Fase 1. Primera fase de investigación del crecimiento de *Arthrospira platensis*, bajo el efecto de medios de cultivo orgánico, inorgánico modificados en laboratorio

Tabla 6
Análisis de varianza para un DCA, con tres tratamientos y tres repeticiones (Laboratorio)

Fuentes de variación	Grados de Libertad	
Total	n-1	9
Tratamientos	t-1	2
Error	(n-1)-(t-1)	7

Segunda fase de investigación del crecimiento de *Arthrospira platensis* bajo el efecto del mejor tratamiento obtenido en laboratorio y su adaptación en campo

Tabla 7
Análisis de varianza para un DCA, con tres
tratamientos y tres repeticiones (Campo)

Fuentes de variación	Grados de Libertad	
Total	n-1	3
Tratamientos	t-1	1
Error	(n-1)-(t-1)	2

3.3.3.8 Variables evaluadas

Calidad Ambiental del medio de cultivo para *Arthrospira platensis* durante la fase laboratorio y campo

- Temperatura

El valor de temperatura se estableció cada tres días, por medio de un termómetro láser digital marca HANNA. Para este procedimiento se retiró las cubiertas manteniendo la asepsia de cada ensayo y se procedió a dar lectura. Para la fase de campo se dió lectura de la temperatura cada tres días tomando datos a las 7:30 am, 12:00 pm y 3:00 pm.

- Potencial de Hidrógeno (pH)

El valor del pH se determinó cada 3 días, por medio de un medidor de pH digital marca HANNA, con previa calibración con soluciones buffer a pH 4 y 7. Para este procedimiento se tomó una muestra de 6 ml del inóculo en tubos de ensayo estériles para evitar que se contamine por exceso en la manipulación y posteriormente se procedió a realizar la lectura.

- Salinidad del medio de cultivo

Se determinó cada 4 días, con la utilización de un refractómetro marca EXTECH, calibrada anteriormente. Se colocó una gota de medio en todo el prisma de medición y se orientó bajo una fuente de luz y finalmente se tomó lectura.

Parámetros productivos de *Arthrospira platensis* en la fase de laboratorio y campo:

- Crecimiento celular de *Arthrospira platensis* en fase de laboratorio y campo

Para la evaluación de crecimiento, se realizó un conteo de filamentos, recolectando muestras cada tres días, se homogenizó, y con una micro pipeta se depositó 10 μl en el cubre objetos previamente modificado. Se procedió al conteo por triplicado de cada repetición. Para disminuir el error de la técnica se realizó diluciones con agua destilada (1:10), realizando conteos menores a 200 filamentos por 10 μl , y disminuir el error estadístico.

Para determinar la densidad celular se utilizó la siguiente fórmula:

$$DC_{\text{inoculo}} = \frac{N \times 10^3}{10} \times \text{FD}$$

DC_{inoculo} : Densidad celular del inóculo (filamentos mL^{-1})

N: Promedio de células presentes. De acuerdo al promedio de filamentos contados.

10^3 : Factor de conversión de 10 μL a 1 mL .

FD: Factor de dilución



Figura 16 Recolección de muestras para determinar densidad celular de *Arthrospira platensis* en la placa porta objetos en la fase de laboratorio y campo

Para determinar crecimiento celular se procedió a recolectar muestras cada tres días. La concentración se calculó por relación predefinida (curva estándar) de biomasa (g L^{-1}), obtenido mediante la absorbancia del medio de cultivo a 670 nm (Oliveira, 2016).

- Velocidad de crecimiento específico de *Arthrospira platensis* durante la fase de laboratorio y campo

La velocidad de crecimiento (μ) fue modelada utilizando la siguiente fórmula:

$$\mu = \frac{\ln x_1 - \ln x_0}{t_1 - t_0}$$

μ = velocidad de crecimiento (filamentos hora⁻¹)

t_1, t_0 = Tiempo final e inicial

X_1, X_0 = Densidad celular final e inicial en fase logarítmica

- Tiempo de duplicación de *Arthrospira platensis* durante la fase de laboratorio y campo

El tiempo de duplicación T_d fue determinado siguiendo la fórmula:

$$T_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

T_d = Tiempo de duplicación

\ln = logaritmo natural

μ = velocidad de crecimiento (filamentos hora⁻¹)

- Producción de biomasa

Para estimar la producción (g L⁻¹) de la biomasa, se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos 1L de solución, con la biomasa obtenida se tomó tanto el peso húmedo y seco después de ser colocada en la estufa, este proceso se lo realizó cada tres días. (Oliveira, Oliveira , Rocha, & Oliveira, 2012).

- Análisis microbiológico de la biomasa producida de *Arthrospira platensis* en la fase de campo y laboratorio

Para realizar el análisis de medio de cultivo y determinar la presencia bacteriana, se tomaron muestras de los 3 medios: control (Zarrouk), inorgánico (fertilizante), orgánico (orina de vaca). Las muestras fueron recolectadas en tubos eppendorf estériles y etiquetados. Se realizó la siembra por el método de estriado y se selló con parafilm. Por último se incubo por 24 horas a 36°C. Para la identificación de las colonias se realizó pruebas bioquímicas además de pruebas de catalasa, oxidasa y tinción Gram.

Análisis bromatológicos para *Arthrospira platensis* durante la fase de laboratorio y campo

- Determinación de Proteína para *Arthrospira platensis* en fase de laboratorio y campo

Para evaluar la concentración de N se aplicó la metodología de Kjeldahl en los Laboratorios IASA I. Para obtener el porcentaje de nitrógeno se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Nitrogéno} = \frac{(0,014 * VT * N)}{PM} * 100$$

Dónde:

VT: Volumen del ácido clorhídrico utilizado en la titulación.

N: Normalidad del ácido clorhídrico.

PM: Peso de la muestra

Este resultado será multiplicado por la constante 6,25 para obtener el porcentaje de proteína (INEN, 1981).

- Determinación de grasa para *Arthrospira platensis* en fase de laboratorio y campo

Para determinar el porcentaje de grasa se utilizó el método de Soxhlet. Se tomó el peso inicial del balón vacío de 500 ml con 7 esferas vidrio. Se colocó 3 g de biomasa de espirulina, agregando 120 mL de alcohol etílico (96%), hasta que se produzcan 4 sifonadas. Finalmente se destiló el contenido del balón y se recuperó el solvente dejando reposar por 24 horas.

- Determinación de Ceniza para *Arthrospira platensis* en fase de laboratorio y campo

El porcentaje de ceniza se determinó por el método de calcinación. Se tomó el peso inicial de las capsulas de porcelana con tres gramos de muestra y se las calentó en la cámara de extracción de gases durante 30 minutos. Concluido el proceso se colocó las muestras en la mufla por 3 horas.

- Determinación de clorofila para *Arthrospira platensis* en fase de laboratorio y campo

Se tomó la muestra de Biomasa de *Arthrospira platensis*, se pesó 0,005 g de muestra, se colocó en tubos de ensayo, se añadió 5 ml de metanol 99% , se agitó la muestra, se cubrió con papel aluminio, y se dejó macerar por 24 horas. De la solución obtenida se tomó la muestra para lectura a 645,665 y 480 nm en el espectrofotómetro (Centeno, 2013).

Para cuantificación se aplicó las siguientes ecuaciones:

$$\text{Clorofila } \alpha \text{ (mg/g)} = \frac{13,14 * A_{665} * \text{Vol Extracto}}{\text{Volumen de la Muestra}}$$

$$\text{Clorofila } \beta \text{ (mg/g)} = 39,04 * A_{652} - 15,28 * A_{665}$$

3.3.3.9 Análisis Estadístico para el proyecto de investigación para fase de campo y laboratorio

Para analizar los datos que se obtuvieron en el ensayo, se utilizó el programa estadístico InfoStat. Por tratarse de un Diseño Completamente al azar, con tres tratamientos y tres repeticiones, el esquema que se aplicó fue el siguiente tanto para la primera y segunda fase.

Se realizó un análisis de normalidad y homogeneidad de varianza cumpliendo los supuestos de ANOVA. Verificando los supuestos, se realizó un análisis de varianza para la determinación de tratamientos significativamente diferentes aplicando el test de comparación múltiple de LSD Fisher a un nivel de confianza de 95%, para identificar el mejor tratamiento.

3.3.3.10 Análisis económico para *Arthrospira platensis* en fase laboratorio y campo

Se realizó el análisis beneficio/costo por unidad de área al relacionar la producción con los costos del proyecto. Se realizó un análisis financiero para la producción de biomasa de *Arthrospira platensis*. Se determinó los costos operativos, ingresos, flujo de caja para estimar el beneficio neto.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados

Primera fase de investigación del crecimiento de *Arthrospira platensis*, bajo el efecto de medios de cultivo orgánico, inorgánico modificados en laboratorio

4.1.1 Parámetros productivos (Laboratorio)

4.1.1.2 Evaluación del crecimiento celular de *Arthrospira platensis* en laboratorio

Considerando que los supuestos de normalidad y homocedasticidad, no se cumplieron se ajustó el modelo con la ayuda de modelos lineales generales y mixtos en el cual se evidenció con un 95% de confianza que no se presentaron diferencias significativas en la densidad celular final ($p=0,6640$). Los promedios indican que la densidad celular del Control y medio inorgánico modificado, presentaron un promedio que no difiere el uno del otro con valores de $3,86 \times 10^5$ y $3,87 \times 10^5$ filamentos mL^{-1} respectivamente, mientras que el medio orgánico presentó una densidad celular menor en comparación a los dos medios nutritivos antes mencionados mostrando un promedio de $3,81 \times 10^5$ filamentos mL^{-1} . A través de una prueba múltiple de rangos LSD Fisher, se encontró que el tratamiento con fertilizantes inorgánicos es igual al Control (Zarrouk) y superior al medio orgánico (Tabla 8).

Tabla 8

Promedio \pm error estándar de la densidad celular (filamentos mL^{-1}), de *Arthrospira platensis* en tres medios de cultivo (Zarrouk, Inorgánico y Orgánico) bajo condiciones de laboratorio.

Tratamiento	Media \pm DE (filamentos ⁻¹ mL)
M. Zarrouk	386068,75 \pm 3241,74
M. Orgánico	3817191,27 \pm 3241,74
M. Inorgánico	389014,58 \pm 3241,74
p-valor	0,6640

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes (LSD Fisher $p>0,005$)

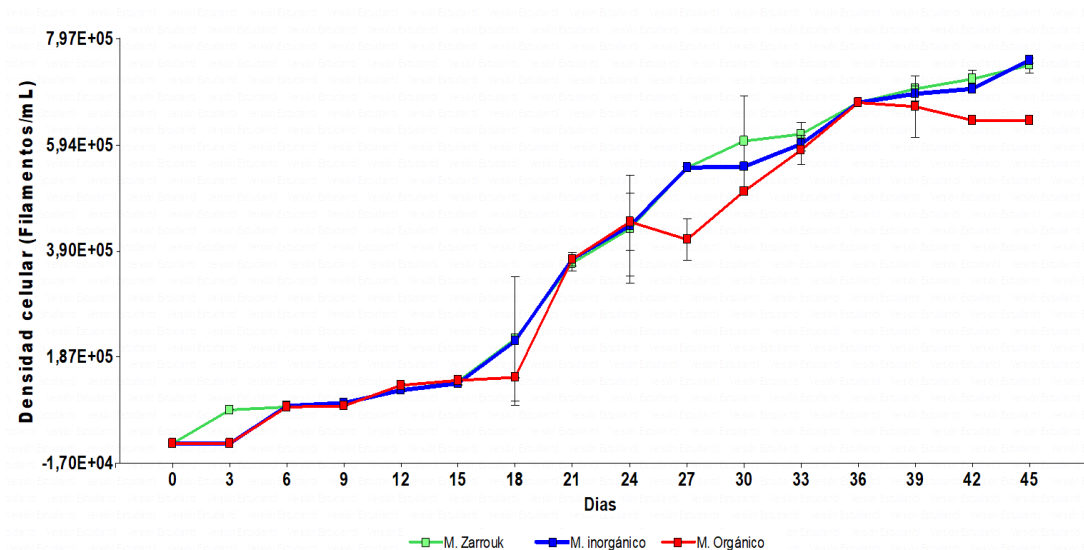


Figura 17 Curva de crecimiento de la cianobacteria *Arthrospira platensis* en medio Zarrouk, Orgánico e Inorgánico modificado en condiciones de laboratorio

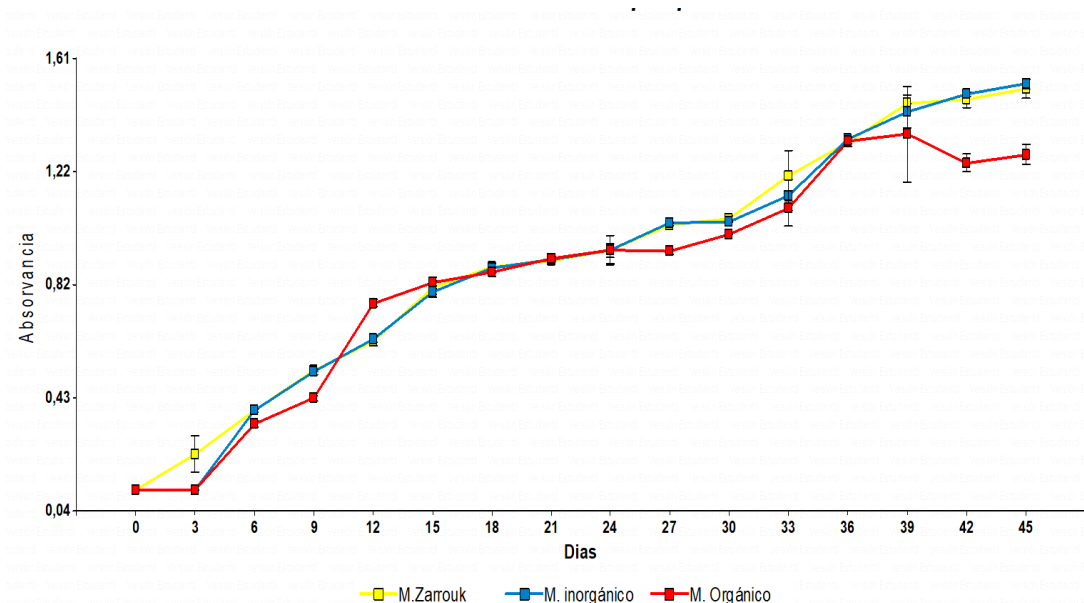


Figura 18 Curva de crecimiento de la cianobacteria *Arthrospira platensis* en medio Zarrouk, Orgánico e Inorgánico modificado por espectrofotometría UV en condiciones de laboratorio

Se evaluó las características del crecimiento celular de la cianobacteria *Arthrospira platensis*, en donde se masificó en medio de cultivo líquido con una densidad celular inicial de 2×10^4 filamentos mL^{-1} con aireación constante, irradiación de $78,8 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad durante 40 días, alcanzando una densidad celular máxima de 2×10^4 filamentos mL^{-1} , equivalente

a la lectura de 1,03 nm por espectrofometría UV (Figura 17 y 18). Las curvas obtenidas ilustran todas las fases de crecimiento, características de un cultivo de cianobacterias. La densidad celular se expresó en filamentos mL⁻¹.

Para el tratamiento Control (Zarrouk), en la curva de crecimiento (Figura 19) no se observó una fase de latencia, sino que se especificó una fase exponencial temprana, que se mantuvo hasta el día tres, a partir del día seis se observó un crecimiento celular leve que se mantuvo hasta el día 16 obteniendo una densidad celular de $1,8 \times 10^4$ filamentos mL⁻¹, equivalente a la lectura de 0,87 nm por espectrofometría UV (Figura 18).

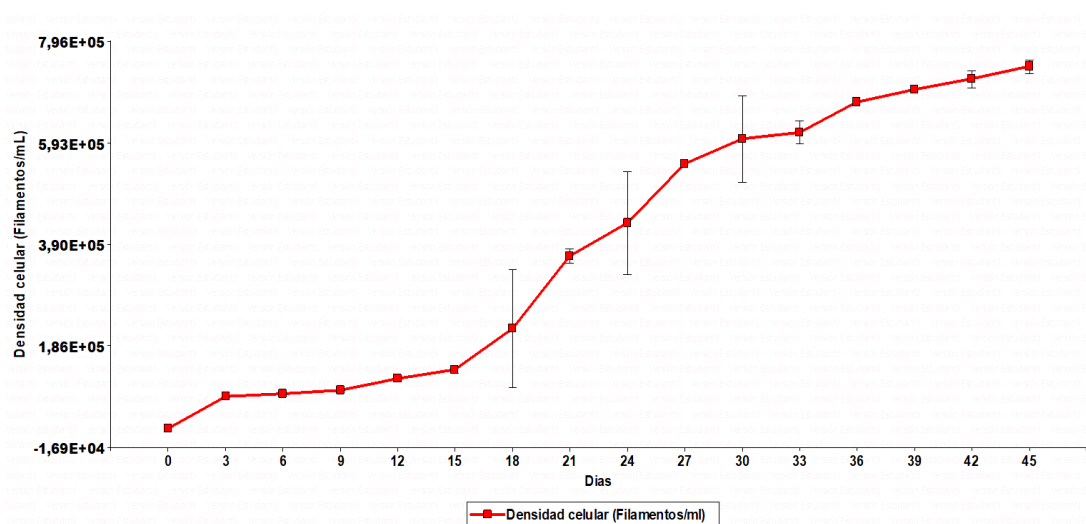


Figura 19 Curva de crecimiento de la cianobacteria *Arthrospira platensis* en medio Zarrouk en condiciones de laboratorio

Con respecto al tratamiento con fertilizante foliar, en la curva de crecimiento (Figura 20), se observó una fase de latencia entre el día cero y tres. Posteriormente, se determinó una fase exponencial durante los días tres y seis, presentando una densidad celular de $1,87 \times 10^5$ filamentos mL⁻¹, equivalente a la lectura de 1,03 nm por espectrofometría UV (Figura 18). Seguidamente, en la fase estacionaria se especificó un decaimiento de la densidad celular en el día 16.

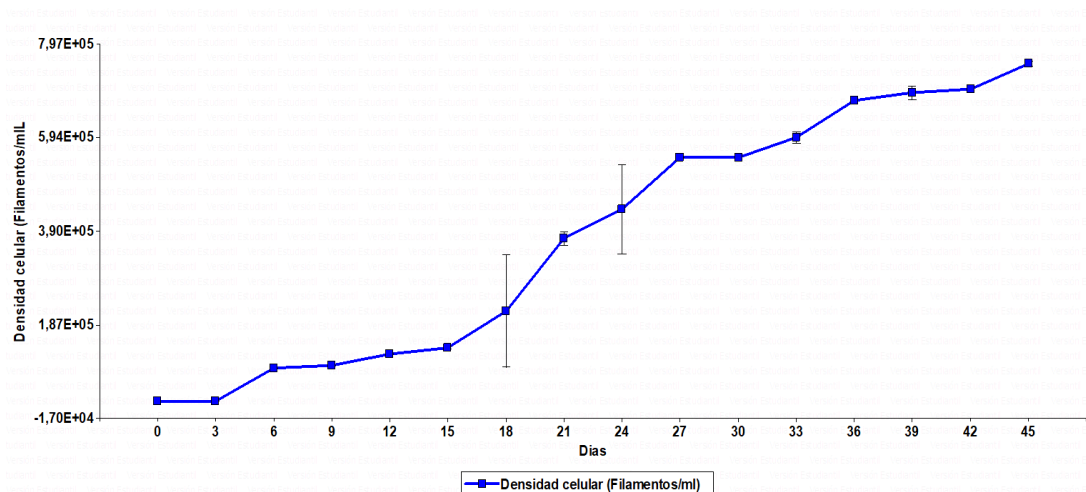


Figura 20 Curva de crecimiento de la cianobacteria *Arthrospira platensis* en medio inorgánico modificado (Fertilizante foliar) en condiciones de laboratorio

En relación a la curva de crecimiento del tratamiento con medio nutritivo a base de orina de vaca (orgánico) (Figura 21), la fase de latencia se evidenció desde el día 0 al 3; y de día 6 al 9. Durante la fase exponencial entre los 12 y 21 días se observó un aumento en la densidad celular hasta alcanzar valores de $3,72 \times 10^6$ filamentos mL^{-1} , equivalente a la lectura de 0,83 nm por espectrofometría UV (Figura 18). Mientras que la fase estacionaria se presentó un leve decaimiento del cultivo de 2×10^4 filamentos mL^{-1} hasta el día 42 y finalmente se ubicó en una densidad celular constante hasta el final del ensayo.

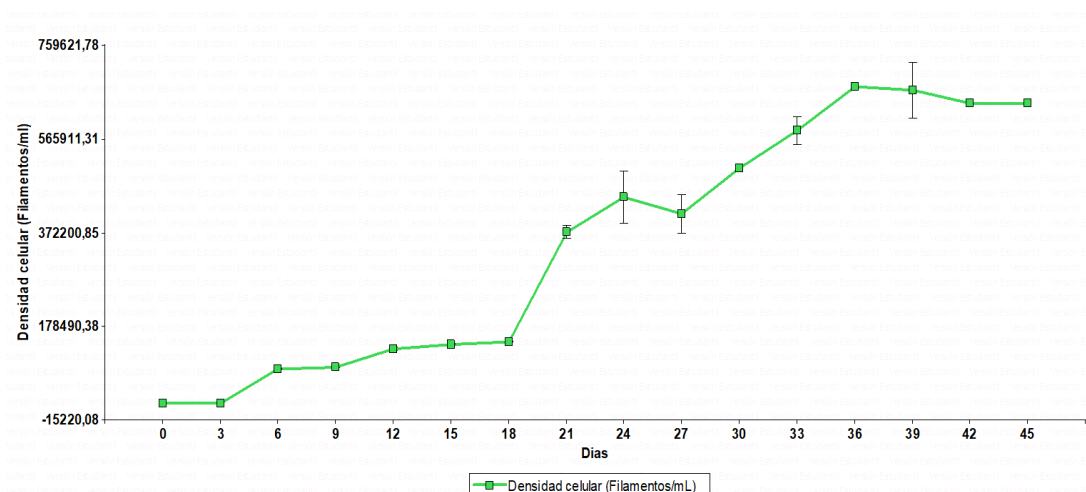


Figura 21 Curva de crecimiento de la cianobacteria *Arthrospira platensis* en medio orgánico modificado (Orina de vaca) en condiciones de laboratorio

4.1.1.3 Análisis cinético para el crecimiento de *Arthrospira platensis* en condiciones de laboratorio

En base a la densidad celular obtenida de los tratamientos con medios de cultivos Control (Zarrouk), orgánico e inorgánico modificado se obtuvieron parámetros cinéticos: velocidad específica de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (Td). Los valores fueron determinados en la fase exponencial y se especifican en la Tabla 9.

Tabla 9
Parámetros cinéticos del crecimiento celular *Arthrospira platensis* en tres medios de cultivo Zarrouk, Inorgánico y Orgánico en condiciones de laboratorio

Tratamiento	Velocidad de crecimiento (μ) (filamentos día ⁻¹)	Tiempo de duplicación (Td) (h ⁻¹)
M. Zarrouk	0,081±1,9E-04 a	8,61±0,09 a
M. Orgánico	0,077±1,9E-04 b	9,11±0,01 b
M. Inorgánico	0,081±1,9E-04 a	8,59±0,01 a
p-valor	0,008	0,008

4.1.1.4 Producción de biomasa

Una vez que el cultivo de *Arthrospira platensis* llegó a un volumen de masificación de 20 litros, con una densidad celular promedio de $3,8 \times 10^4$ filamentos mL⁻¹ y máxima de 7×10^4 filamentos mL⁻¹, equivalente a una lectura de 1,43 por espectrofotometría UV. Se procedió a cosechar la biomasa viva durante los días 43, 44 y 45, como se presenta en la tabla 10.

Tabla 10
Promedio y desviación estandar del crecimiento celular y absorbancia de *Arthrospira platensis* en condiciones de Laboratorio

	Crecimiento celular (filamentos⁻¹ mL)	Absorbancia (concentración⁻¹ longitud⁻¹)
Días	Media ± D.E.	Media ± D.E.
0	2x10 ⁴ ±0,00	0,11±0,00
3	4,16x10 ⁴ ±32327	0,15±0,07
6	9,0x10 ⁴ ±643,13	0,37±0,02
9	9,6x10 ⁴ ±2389	0,49±0,05
12	1,2x10 ⁵ ±5400	0,67±0,07
15	1,3x10 ⁵ ±4161	0,81±0,02
18	1,9x10 ⁵ ±924	0,88±0,02
21	3,7x10 ⁵ ±1264	0,91±0,01
24	4,3x10 ⁵ ±7627	0,94±0,04
27	5,03x10 ⁵ ±7238	1,00±0,05
30	5,5x10 ⁵ ±5973	1,03±0,03
33	5,9x10 ⁵ ±2349	1,14±0,08
36	6,7x10 ⁵ ±0,00	1,32±0,01
39	6,8x10 ⁵ ±3333	1,41±0,10
42	6,8x10 ⁵ ±3708	1,40±0,12
45	7,1x10 ⁵ ±5570	1,43±0,12
p-valor	0,005	0,005

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes (LSD Fisher)

4.1.2 Parámetros ambientales evaluados en la primera fase de investigación (laboratorio)

4.1.2.1 Potencial de hidrógeno (pH) evaluado en condiciones de laboratorio

El potencial de hidrógeno representa una de las principales variables a medir ya que muestra si existe un equilibrio en el medio nutritivo. Dado que espirulina requiere de medios alcalinos para promover el crecimiento y en pH ácidos produce muerte celular temprana durante la fase de adaptación. Si se presentaron diferencias significativas para el valor de pH ($p=0,0008$). Por lo tanto se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparación de medias LSD Fisher con un nivel de significancia del 95% (Tabla 11). Los promedios indican que el pH del Control y medio inorgánico modificado, presentaron una leve diferencia de 0,12 sobre el nivel de pH, mientras que el medio orgánico presento un valor de pH de 9,70 en

comparación al control y el medio inorgánico se observa una diferencia de 0,12 y 0,10 respectivamente.

Tabla 11
Promedio \pm error estándar del pH de los medios nutritivos para *Arthrospira platensis* durante la fase de laboratorio

Tratamiento	Media \pm ee
M. Zarrouk	9,52 \pm 0,03 a
M. Orgánico	9,70 \pm 0,03 b
M. Inorgánico	9,60 \pm 0,03 a
p-valor	0,0008

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes (LSD Fisher)

Durante el ensayo se observó un incremento de pH en la fase exponencial, durante el día 36 alcanzó un pH máximo de 10 para el control, de 9,98 para el medio inorgánico y para el medio orgánico se observó un incremento durante la fase exponencial y fase estacionaria de 9,91 (Figura 22).

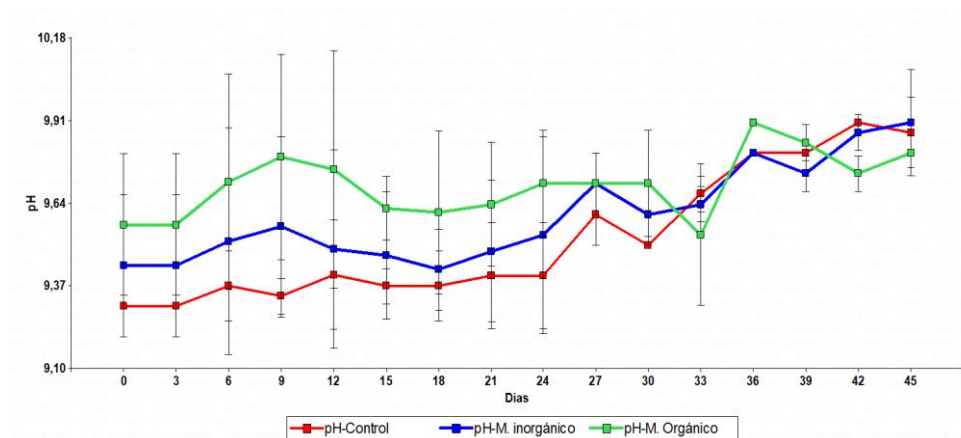


Figura 22 pH registrado de los medios de cultivo (Zarrouk, Inorgánico y Orgánico) para *Arthrospira platensis* bajo condiciones de laboratorio

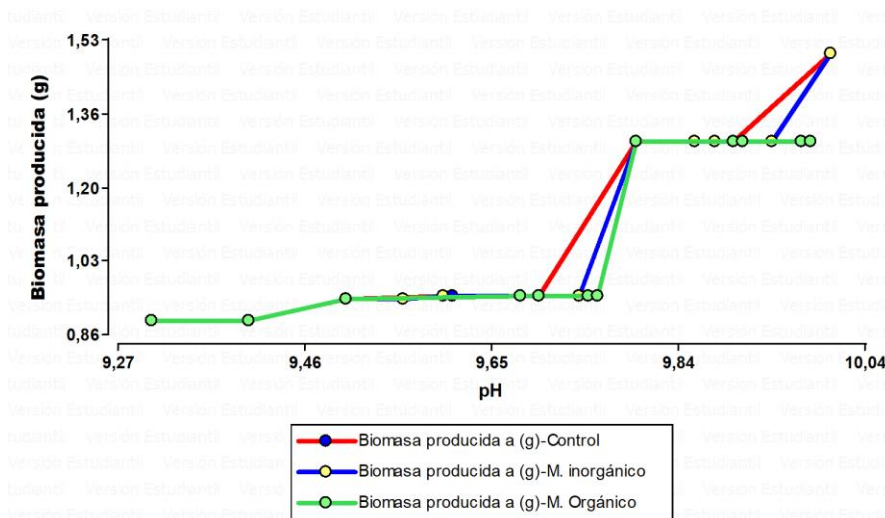


Figura 23 Correlación biomasa producida vs pH evaluado para *Arthrospira platensis* en condiciones de laboratorio

En cuanto al valor del pH con respecto al tiempo, se observó que en todos los ensayos aumentó paralelamente al crecimiento de la cianobacteria, tendencia que se observó de igual manera en el control existiendo así una relación directamente proporcional entre estas dos variables. Al relacionar el pH y la producción de biomasa obtenida se observó que a medida que aumenta la biomasa aumenta el pH (Tabla 12), alcanzando un pH máximo de 10 con una concentración de biomasa de $1,5 \text{ g L}^{-1}$ en peso seco.

Tabla 12

Promedio de la biomasa producida con respecto al pH para *Arthrospira platensis* en medio de cultivo Zarrouk, Inorgánico y Orgánico en 20 litros

pH	Biomasa producida (g)		
	Zarrouk	Inorgánico	Orgánico
9,3	0,89	0,89	0,89
9,5	0,94	0,94	0,94
9,8	1,3	1,30	1,30
10	1,5	1,5	-

4.1.2.2 Temperatura evaluada para *Arthrospira platensis* durante la fase de laboratorio

Esta variable fue medida diariamente por 45 días no mostró diferencias significativas entre tratamientos, manteniéndose la temperatura con una media de $18,3^{\circ}\text{C}$, mínima de 16°C y máximo de 20°C (Figura 24).

Sin embargo, no existieron diferencias entre los días de evaluación ($p < 0,0001$) como se evidencia en la figura 23, en donde se observan los días 10, 19, 35 y 45 con bajas temperaturas ($< 18^\circ\text{C}$) y los días 1, 7, 22 y 40 con altas temperaturas.

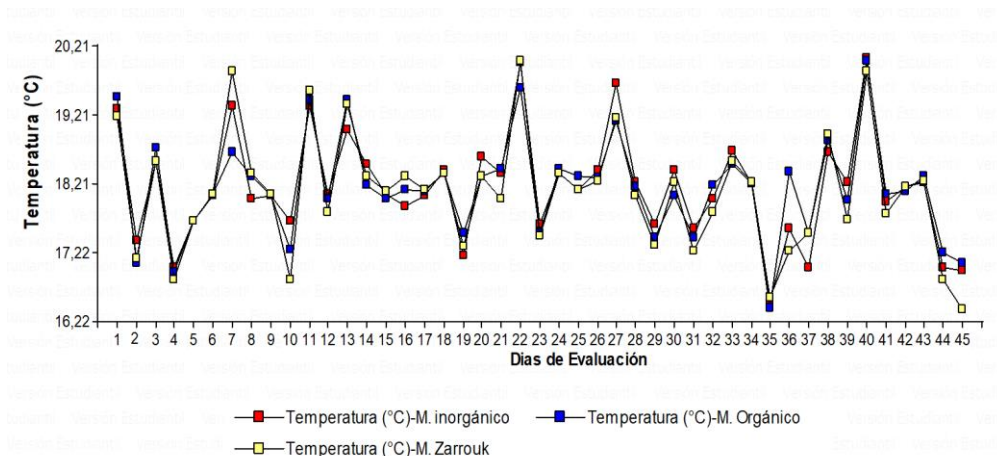


Figura 24 Seguimiento de la temperatura de los medios de cultivo Zarrouk, inorgánico y orgánico en laboratorio, durante 45 días

4.1.2.3 Salinidad evaluada para *Arthrospira platensis* durante la fase de laboratorio

Considerando que los supuestos de normalidad y homocedasticidad si se cumplieron. Se presentaron diferencias significativas para el valor de salinidad ($p < 0,0001$) durante los 45 días de evaluación. Por lo tanto se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparación de medias LSD Fisher con un nivel de significancia del 95% (Tabla 13)

Tabla 13
Promedio \pm error estándar para la salinidad *Arthrospira platensis* en condiciones de laboratorio

Tratamiento	Salinidad (ppt)
	Media \pm ee
M. Zarrouk	7,07 \pm 0,08 a
M. Inorgánico	7,85 \pm 0,08 b
M. orgánico	9,34 \pm 0,08 c
p-valor	<0,0001

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes (LSD Fisher)

4.1.3 Calidad de la biomasa producida de *Arthrospira platensis* durante la fase de laboratorio

4.1.3.1 Análisis proximal de la biomasa seca de *Arthrospira platensis* (Laboratorio)

La biomasa obtenida con los medio nutritivos Zarrouk, Inorgánico y orgánico fueron sometidos a la prueba Kjendahl, en la que se determinó un contenido proteico promedio de 55,85%, 63,40% y 56,52% respectivamente; por medio del método de Soxhlet se determinó un porcentaje lipídico promedio de 9,19%, 11,58% y 10,72% respectivamente para los medios nutritivos Zarrouk, inorgánico y orgánico; mientras que por técnicas de secado y calcinación se obtuvo un porcentaje de ceniza de 8,58%, 11,65% y 11,89% (Tabla14).

Tabla 14

Promedio± error estándar para el porcentaje de proteína, grasa y ceniza de *Arthrospira platensis* en condiciones de laboratorio

Tratamiento	Proteína (%)	Grasa (%)	Ceniza(%)
	Media ± ee	Media ± ee	Media ± ee
M. Zarrouk	55,85± 5,58	9,19± 1,63	8,58± 2,23 a
M. Inorgánico	56,52± 5,58	10,72± 1,63	11,89± 2,23 b
M. orgánico	63,40± 5,58	11,58± 1,63	11,65± 2,23 b
p-valor	0,5973	0,6023	0,4414

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes (LSD Fisher)

De acuerdo con las variables nutricionales expresadas en porcentajes, no se encontraron diferencias significativas proteína ($F_{2,6}=0,56$; $p=0,5973$), grasa ($F_{2,6}=0,55$; $p=0,6023$), ceniza ($F_{2,6}=0,94$; $p=0,4414$) entre cada uno de los tratamientos.

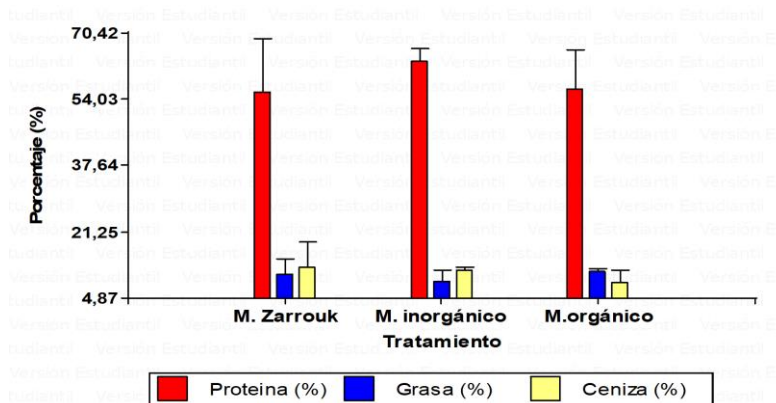


Figura 25 Análisis proximal de *Arthrospira platensis* durante la fase de laboratorio

Para la variable porcentaje de proteína no se encontraron diferencias significativas obteniendo un porcentaje más alto con el medio nutritivo Zarrouk, con 55,85% y el menor porcentaje de proteína fue en el tratamiento orgánico con 56,52% (Figura 25), mientras que para el contenido lipídico no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos los valores oscilaron en 9,19%, 11,58% y 10,72% para los medios Zarrouk, inorgánico modificado y orgánico respectivamente (Tabla 14). Por otro lado el porcentaje de ceniza si tuvo diferencias significativas entre tratamientos mostrándose una leve diferencia en el porcentaje de 3,31% entre el medio Zarrouk e inorgánico y 4,07 % entre el control y medio orgánico, pese a los resultados obtenidos en el ensayo, el valor promedio de proteína, grasa y ceniza se encuentran en el rango óptimo, en comparación a la espirulina comercial ofertada por empresas privadas con fines industriales (Tabla 15).

Tabla 15
Análisis proximal de (*Arthrospira platensis*) en comparación con productos cárnicos

ANÁLISIS	<i>A. platensis</i> (%)	Espirulina comercial (%)	Carne de vacuno(%)	Carne de pescado(%)	Carne de pollo(%)
Proteína	58,59	43-68	22	18	23
Grasa	10,49	4-8	5,7	6,2	6,2
Ceniza	11,03	7-11	1,2	1,5	1,15

4.1.3.2 Concentración de clorofila total obtenida para *Arthrospira platensis* durante la fase de laboratorio

En base al método espectrofotométrico se determinó la cantidad de clorofila α y β obtenidos por triplicado en la muestras de microalgas (Tabla 16).

Para clorofila no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos aplicando la prueba de LSD Fisher ($F_{2,6}=0,32$; $P= 0,7385$), en donde se puede observar que el tratamiento con mayor concentración es el M. inorgánico con 10,24 mg g⁻¹ y menor concentración es el medio orgánico con un valor de 8,16 mg g⁻¹.

En la figura 38 se puede observar que independientemente cada tratamiento tiene acumulación de clorofila. Debido a que esta se encuentra en todos los organismos

fotosintéticos como plantas y cianobacterias, mientras que la concentración de clorofila B se encuentra en mayor cantidad en las algas.

Tabla 16

Promedio± error estándar del contenido (mg g⁻¹) de clorofila total en *Arthrospira platensis* en fase de laboratorio

Tratamiento	Clorofila (mg g ⁻¹ peso fresco)
M. Zarrouk	8,96± 1,86
M. Inorgánico	10,24± 1,86
M. Orgánico	8,16± 1,86

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes (LSD Fisher $p > 0,005$)

4.1.3.3 Análisis microbiológicos de los medios de cultivo de *Arthrospira platensis* durante la fase de laboratorio

No se evidenció ningún tipo de concentración de UFC bacterianas al utilizar el medio MACConkey y EMB (Tabla 17). Estos medio son selectivos para enterobacterias y no se observó la presencia de bacterias en ninguno de los tratamientos evaluados (Figura 26). Por otro lado ninguno de los medios nutritivos Zarrouk, inorgánico modificado y orgánico resulto positiva para hongos y levaduras para lo cuál se utilizó el medio Agar PDA.

Tabla 17

Análisis de la presencia bacteriana en los medios de cultivo para *Arthrospira platensis* durante la fase de laboratorio y campo

Medio	Muestra				
	C1	F1	O1	P1	P2
PDA	-	-	-	-	-
MACConkey	-	-	-	+-	+-
EMB	-	-	-	-	-

UFC = Unidades formadoras de colonias; (-)Ausente; (+-) <100 UFC/20 µl permisible; (+) >500 UFC/20 µl (Crítico)

Incubación 37°C, muestra analizada líquida volumen 20 µl

C1: Medio zarrouk (Laboratorio)

P1: Medio zarrouk (Campo)

F1: Medio inorgánico (Laboratorio)

P2: Medio inorgánico (Campo)

O1: Medio orgánico (Laboratorio)

Las pruebas de catalasa fueron negativas, al igual que las pruebas de oxidasa. Con estos resultados se puede afirmar que no existen bacterias fermentadoras de glucosa y lactosa con producción de gas presentes en los medios de cultivo para *Arthrospira platensis*.

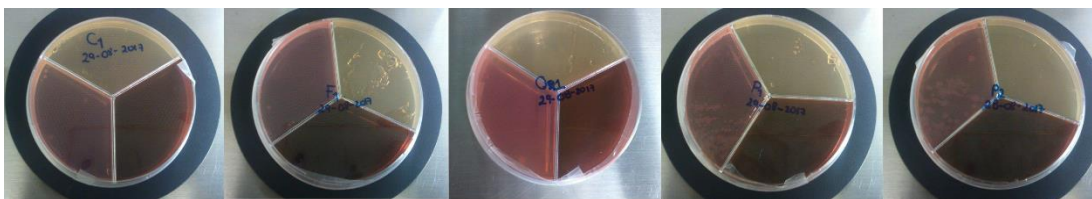


Figura 26 Análisis microbiológicos de medios de cultivo Zarrouk, inorgánico y orgánico (Laboratorio y campo)

Segunda fase de investigación del crecimiento de *Arthrospira platensis* bajo el efecto del mejor tratamiento obtenido en laboratorio y su adaptación en campo

4.1.5 Parámetros productivos evaluados durante la fase de campo

4.1.5.1 Evaluación del crecimiento celular de *Arthrospira platensis* en campo

Considerando que los supuestos de normalidad y homocedasticidad, no se cumplieron se utilizó un modelo lineal mixto con un 95% de confianza, en donde no se presentaron diferencias significativas en la densidad celular final ($p=0,9720$). Los promedios indican que la densidad celular del Control y medio inorgánico modificado, presentaron un promedio que no difiere el uno del otro con valores de $3,284 \times 10^5$ filamentos mL^{-1} y $3,824 \times 10^5$ filamentos mL^{-1} respectivamente. A través de una prueba múltiple de rangos LSD Fisher, se encontró que el tratamiento con fertilizantes inorgánicos promueve un crecimiento celular igual al medio Zarrouk bajo condiciones de invernadero (Tabla 18).

Tabla 18

Promedio \pm error estándar de la densidad celular de *Arthrospira platensis* en dos medios de cultivo (Zarrouk e Inorgánico) bajo condiciones de campo

Tratamiento	Media \pm ee (filamentos mL^{-1})
M. Zarrouk	$3,2\text{E}-05 \pm 2,9\text{E}-05$
M. Inorgánico	$3,2\text{E}-05 \pm 2,9\text{E}-05$
p-valor	0,9720

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes (LSD Fisher $p > 0,005$)

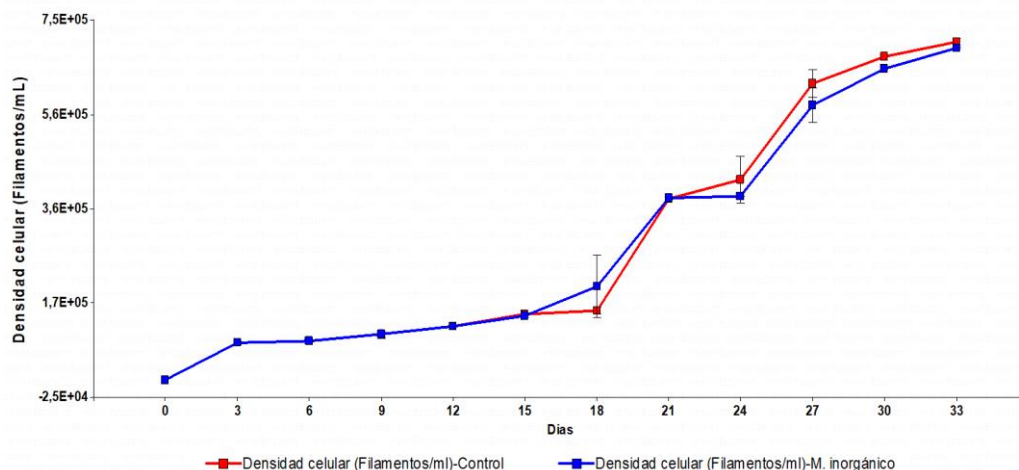


Figura 27 Curva de crecimiento de la cianobacteria *Arthrospira platensis* en medio Zarrouk e Inorgánico modificado durante la fase de campo

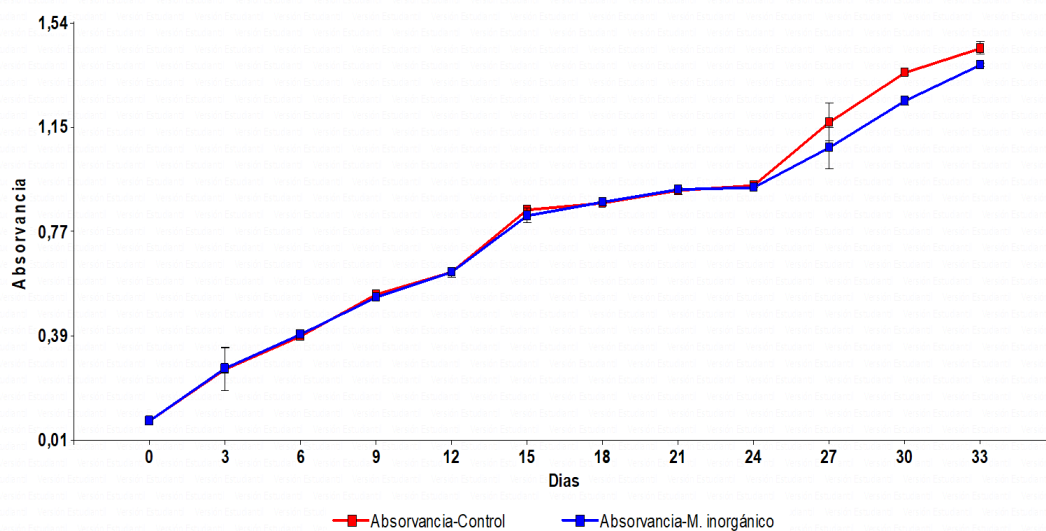


Figura 28 Curva de crecimiento de la cianobacteria *Arthrospira platensis* en medio Zarrouk, Orgánico e Inorgánico modificado por espectrofotometría UV durante la fase de campo

Se evaluó las características del crecimiento celular de la cianobacteria *Arthrospira platensis*, bajo condiciones de invernadero se masificaron en medio de cultivo líquido con una densidad celular inicial de 1×10^4 filamentos mL^{-1} con aireación constante, fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad durante 33 días, alcanzando una densidad celular máxima de 7×10^6 filamentos mL^{-1} , equivalente a la lectura de 1,53 nm por espectrofotometría UV (Figura 28). Las curvas obtenidas ilustran todas las fases de crecimiento, características de un cultivo de cianobacterias. La densidad celular se expresó en filamentos mL^{-1} .

Para el tratamiento Control (Zarrouk), en la curva de crecimiento (Figura 29). No se observó una fase de latencia, sino que se especificó una fase exponencial temprana, que se mantuvo hasta el día tres obteniendo una densidad celular de $8,5 \times 10^4$ filamentos mL^{-1} , equivalente a la lectura de 0,32 nm por espectrofometría UV (Figura 28).

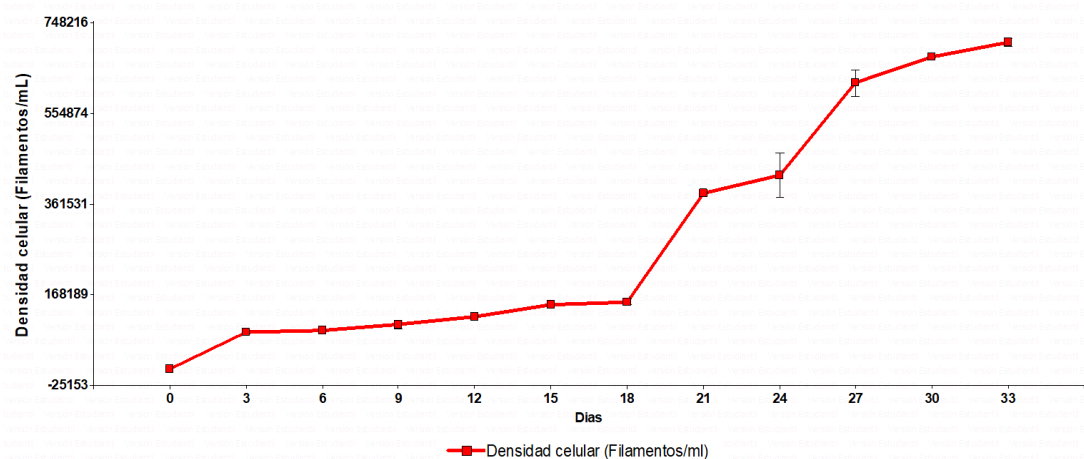


Figura 29 Curva de crecimiento de la cianobacteria *Arthrospira platensis* en medio Zarrouk bajo condiciones de campo durante 33 días

Con respecto al tratamiento con fertilizante foliar, en la curva de crecimiento (Figura 30), no se observó una fase de latencia esto se le atribuye al proceso de adaptación que se dió durante tres meses al inóculo. Posteriormente, se determinó una fase exponencial durante los días 6 y 21, presentando una densidad celular de 6×10^5 filamentos mL^{-1} , equivalente a la lectura de 1,23 nm por espectrofometría UV (Figura 28). Seguidamente, en el día 24 se dió decaimiento de la densidad celular llegando hasta la concentración de $3,8 \times 10^4$ filamentos mL^{-1} , esto se debe al agotamiento de la fuente de carbono.

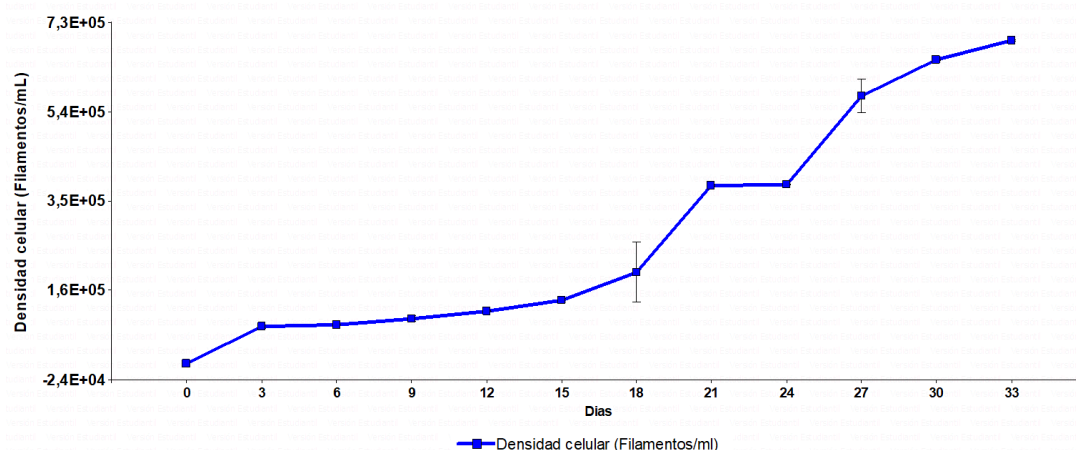


Figura 30 Curva de crecimiento de la cianobacteria *Arthrospira platensis* en medio inorgánico modificado (Fertilizante foliar), bajo condiciones de campo

4.1.5.2 Análisis cinético para el crecimiento de *Arthrospira platensis* bajo condiciones de campo

En base a la densidad celular obtenida de los tratamientos con medios de cultivos Control (Zarrouk), orgánico e inorgánico modificado se obtuvieron parámetros cinéticos: velocidad específica de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (Td). Los valores fueron determinados en la fase exponencial y se especifican en la (Tabla 19).

Tabla 19

Parámetros cinéticos del crecimiento celular *Arthrospira platensis* en medio de cultivo Zarrouk e Inorgánico durante la fase de campo

Tratamiento	Velocidad de crecimiento (μ) (filamentos día ⁻¹)	Tiempo de duplicación (Td) (h ⁻¹)
M. Zarrouk	0,129±1,9E-04	5,374±0,09
M. Inorgánico	0,128±1,9E-04	5,395±0,09

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes (LSD Fisher)

4.1.6 Parámetros ambientales evaluados para *Arthrospira platensis* en la fase de campo

4.1.6.1 Potencial de hidrógeno (pH) evaluado en la fase campo

El potencial de hidrógeno representa una de las principales variables a medir ya que muestra si existe un equilibrio en el medio nutritivo. Dado que espirulina requiere de medios alcalinos para promover el crecimiento y en pH ácidos produce muerte celular temprana durante la fase de adaptación. No se presentaron diferencias significativas para el valor de pH ($p=0,345$). Por lo tanto se utilizó un análisis de

varianza (ANOVA) y la prueba de comparación de medias Fisher con un nivel de significancia del 95% (Tabla 20). Los promedios indican que el pH del Control y medio inorgánico modificado, presentaron una leve diferencia de 0,04 sobre el nivel de pH, mientras que el medio orgánico presentó un valor de pH de 9,69 en comparación al control y el medio inorgánico se observa una diferencia de 0,07 y 0,03 respectivamente.

Tabla 20
Promedio \pm error estándar del pH de los medios nutritivos (Zarrouk e Inorgánico) para *Arthrospira platensis* durante la fase de campo

Tratamiento	Media \pm ee
M. Zarrouk	9,52 \pm 0,03a
M. Inorgánico	9,60 \pm 0,03a
p-valor	0,0008

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes (LSD Fisher $p > 0,005$)

Durante el ensayo se observó que el incremento de pH se dió durante la fase exponencial en el día 6 y 21 alcanzando un pH máximo de 10 para el control, y para el medio inorgánico de 9,98 se observó que tuvo un incrementó durante la fase exponencial y fase estacionaria (Figura 31).

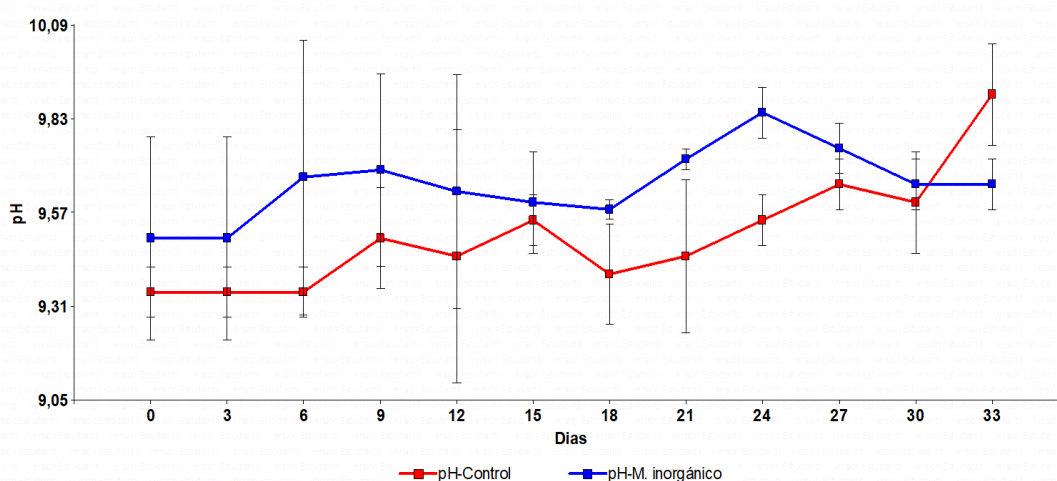


Figura 31 pH registrado de los medios de cultivo (Zarrouk e Inorgánico) para *Arthrospira platensis* bajo condiciones de campo

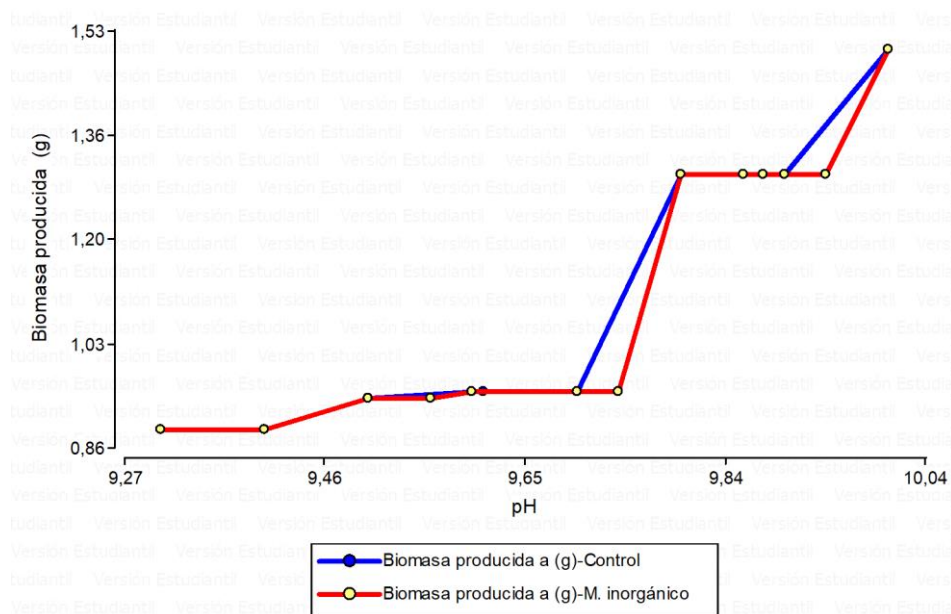


Figura 32 Correlación biomasa producida vs pH evaluado para *Arthrospira platensis* en condiciones de campo

En cuanto al valor del pH con respecto al tiempo, se observó que en todos los ensayos aumentó paralelamente al crecimiento de la cianobacteria, tendencia que se observó de igual manera en el control (Figura 31), existiendo así una relación directamente proporcional entre estas dos variables. Al relacionar el pH y la producción de biomasa obtenida se observó que ambas variables se incrementan paralelamente con respecto al tiempo (Tabla 21), alcanzando un pH máximo de 10 con una concentración de biomasa de $1,36 \text{ g}^{-1} \text{ L}$ en peso seco.

Al relacionar el pH y la producción de biomasa obtenida se observó que a medida que aumenta la biomasa aumenta el pH (Figura 32), alcanzando un pH máximo de 10 con una concentración de biomasa de $1,5 \text{ g}^{-1} \text{ L}$ en peso seco.

Tabla 21
Promedio de la biomasa producida con respecto al pH para *Arthrospira platensis* en medio de cultivo Zarrouk e Inorgánico en 2000 litros

pH	Biomasa producida (g)	
	Zarrouk	Inorgánico
9,3	9,3	0,97
9,4	9,4	1,04
9,6	9,6	1,12
9,8	9,8	1,36

4.1.6.2 Temperatura evaluada para *Arthrospira platensis* durante la fase de campo

Esta variable fue medida diariamente por 33 días no mostró diferencias significativas entre tratamientos, manteniéndose la temperatura con una media de 18,3°C, mínima de 16°C y máximo de 20°C (Figura 33).

Sin embargo, existieron diferencias entre los días de evaluación ($p < 0,0001$) como se evidencia en la figura 23, en donde se observan los días 6,8 y 14 con bajas temperaturas ($< 20^\circ\text{C}$) y los días 11 y 13 con altas temperaturas ($> 20^\circ$).

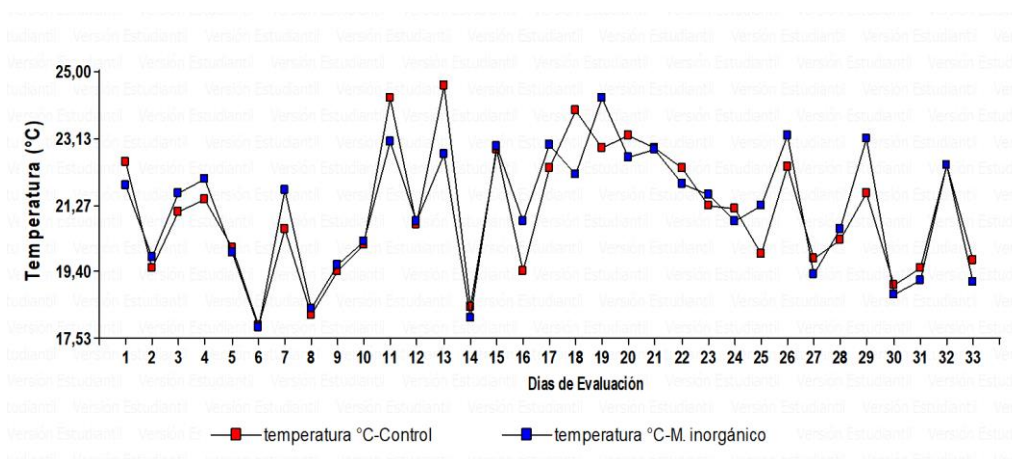


Figura 33 Seguimiento de la temperatura de los medios de cultivo Zarrouk, inorgánico y orgánico en laboratorio, durante 33 días

4.1.6.3 Salinidad evaluada para *Arthrospira platensis* durante la fase de laboratorio

Considerando que los supuestos de normalidad y homocedasticidad si se cumplieron. Se presentaron diferencias significativas para el valor de salinidad ($p < 0,0001$) durante los 33 días de evaluación. Por lo tanto se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparación de medias LSD Fisher con un nivel de significancia del 95% (Tabla 22). En donde se determinó que el valor de salinidad se mantiene en un promedio de 7 ppt durante toda la fase de desarrollo de *Arthrospira platensis*.

Tabla 22
Promedio± error estándar para la salinidad
Arthrospira platensis en condiciones de campo

Tratamiento	Salinidad (ppt)
	Media ± ee
M. Zarrouk	7,90± 0,11 a
M. Inorgánico	7,51± 0,11 b
p-valor	<0,0001

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes (LSD Fisher)

4.1.7 Calidad de la biomasa producida de *Arthrospira platensis* durante la fase de campo

4.1.7.1 Análisis proximal de *Arthrospira platensis* (campo)

La biomasa obtenida con los medio nutritivos Zarrouk e Inorgánico fueron sometidos a la prueba Kjendahl, en la que se determinó su contenido proteico promedio de 65,86% y 66,04% respectivamente; por medio del método de Soxhlet se determinó un porcentaje lipídico promedio de 10,33% y 11,68% respectivamente para los medios nutritivos Zarrouk e inorgánico; mientras que por técnicas de secado y calcinación se obtuvo un porcentaje de ceniza de 10,80% y 11,07% (Tabla 23).

Tabla 23
Promedio± error estándar para el porcentaje de proteína, grasa y ceniza de
Arthrospira platensis en condiciones de campo

Tratamiento	Proteína (%)	Grasa (%)	Ceniza (%)
	Media ± ee	Media ± ee	Media ± ee
M. Zarrouk	65,86± 1,64	10,33± 2,74	10,80± 2,20
M. Inorgánico	66,04± 1,64	11,58± 2,74	11,07± 2,20
p-valor	0,9451	0,7776	0,3166

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes (LSD Fisher)

De acuerdo con las variables nutricionales expresadas en porcentajes, no se encontraron diferencias significativas proteína ($F_{1,2}=0,01$, $p=0,9451$), grasa ($F_{1,2}=0,10$, $p=0,7776$), ceniza ($F_{1,2}=1,75$; $p=0,3166$) entre cada uno de los tratamientos.

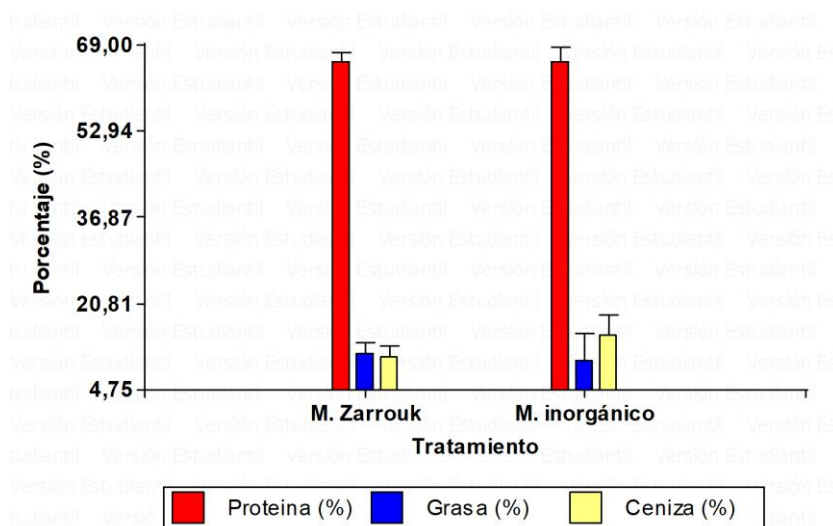


Figura 34 Análisis proximal de *Arthrospira platensis* durante la fase de campo

Para la variable porcentaje de proteína no se encontraron diferencias significativas obteniendo un porcentaje más alto con el medio inorgánico con 66,04% y el menor porcentaje de proteína fue en el medio nutritivo Zarrouk con 65,86% (Tabla 23), mientras que para el contenido lipídico no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos los valores oscilaron en 10,33% y 11,58% para los medios Zarrouk e inorgánico modificado. Por otro lado el porcentaje de ceniza no tuvo diferencias significativas entre tratamientos mostrándose una leve diferencia en el porcentaje de 0,27% entre el medio Zarrouk e inorgánico, pese a los resultados obtenidos en el ensayo, el valor promedio de proteína, grasa y ceniza se encuentran en el rango óptimo, en comparación a la espirulina comercial ofertada por empresas privadas con fines industriales cuyos valores de proteína, lípidos y ceniza se encuentran en valores de 68%, 8% y 11% respectivamente (Tabla 15).

4.1.7.2 Concentración de clorofila total obtenida para *Arthrospira platensis* durante la fase de campo

En base al método espectrofotométrico se determinó la cantidad de clorofila α y β obtenidos por triplicado en la muestras de microalgas (Tabla 24).

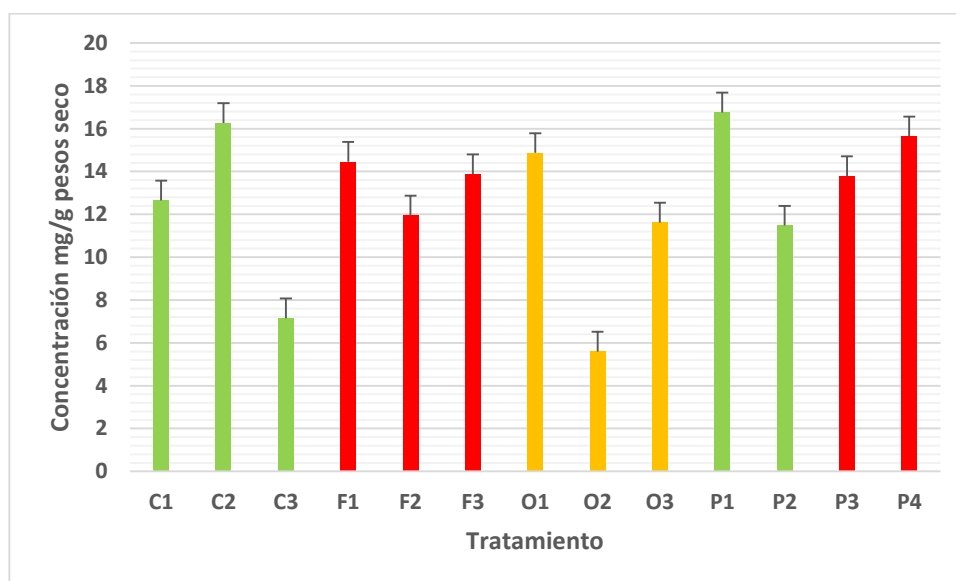
Para la clorofila no se encontraron diferencias significativas entre cada uno de los tratamientos aplicando la prueba de LSD Fisher ($F_{2,6}=0,23$; $p= 0,7976$), en donde se puede observar que el tratamiento con mayor concentración es el M. inorgánico con $11,41 \text{ mg g}^{-1}$ y menor concentración es el inorgánico con $10,86 \text{ mg g}^{-1}$.

En la figura 35 se puede observar que independientemente de cada tratamiento existe una mayor acumulación de clorofila. Debido a que esta se encuentra presente en todos los organismos fotosintéticos como plantas, microalgas y cianobacterias, mientras que la concentración de clorofila B se encuentra en mayor cantidad en las algas

Tabla 24
Promedio \pm error estándar del porcentaje de clorofila total en *Arthrospira platensis* en fase de campo

Tratamiento	Clorofila α (mg g⁻¹ peso fresco)	Clorofila β (mg g⁻¹ peso fresco)
M. Zarrouk	10,86 \pm 1,81	3,26 \pm 0,40
M. Inorgánico	11,41 \pm 1,81	3,29 \pm 0,40
p-valor	0,7976	0,3464

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes (LSD Fisher $p>0,005$)



C1,C2,C3: M. zarrouk (Laboratorio); **F1,F2,F3:** M. inorgánico (Laboratorio)
O1,O2,O3: M. orgánico (Laboratorio); **P1,P2:**M. zarrouk (Campo); **P3,P4:** M. inorgánico (Campo).

Figura 35 Concentración de clorofila total presente en *Arthrospira platensis* bajo condiciones de laboratorio y campo

4.1.7.3 Análisis microbiológicos de los medios de cultivo de *Arthrospira platensis* durante la fase de campo

Para la segunda fase de investigación se realizó un análisis microbiológico del agua que fue utilizada para la masificación de *Arthrospira platensis* el mismo que provenía del reservorio de agua que es utilizado para todo el proyecto acuícola.

El medio donde se pudo evidenciar la mayor concentración de UFC bacterianas es MACConkey y Agar EMB con rangos que varían de 40,08 UFC valor que se encuentra en los límites permisibles para *E. coli* para aguas superficiales, este medio inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivas lo cual facilita la diferenciación de bacterias fermentadoras y no fermentadoras de lactosa. Al realizar la prueba con MACConkey permitió conocer el comportamiento real de la cuenca principal. Con la ayuda de este medio se pudo comprobar la presencia de *E. coli* en donde las colonias tomaron un color verde metálico en el medio de cultivo (Figura 36).



Figura 36 Aplicación de pruebas microbiológicas en los diferentes medios de cultivos de *Arthrospira platensis* evaluados durante la fase de campo

Por otro lado el medio Sabouraud no presentó una concentración de hongos y levaduras y no generó crecimiento de los mismos durante los 4 días de incubación.

Las pruebas de catalasa para las colonias obtenidas de MACConkey fueron negativas mientras que para las colonias del medio Trypticasa soya (TSA) el resultado fue positivo. Se pudo afirmar que las bacterias presentes son fermentadores de glucosa y lactosa con producción de gas, dado que la prueba TSI fue positiva. Por otro lado se realizaron pruebas bioquímicas para lo que se utilizó Agar TSI en donde se determinó que las bacterias son fermentadoras de lactosa por el pico amarillo y producción de ácido sulfhídrico (Color negro) (Figura 36), Agar citrato de Simmons muestra la fermentación del citrato, en donde el medio se torna de color azul (Figura 36), para la prueba del medio movilidad indol ornitina (MIO). Además se realizaron pruebas por tinción Gram y se observó al microscopio 10X, identificándose para la primera muestra Bacilos cortos Gram negativos y para la segunda muestra Bacilos largos Gram negativos.

Los resultados de las prueba bioquímicas (Tabla 25) fueron analizadas por el programa ABIS online, donde se detectó la presencia de *E. coli* y *Citrobacter freudi* con una probabilidad del 99%.

Tabla 25
Rangos evaluados para determinar la presencia bacteriana en la cuenca hídrica del proyecto acuícola en fase de campo

Muestra	Fermentación								
	Glucosa	Lactosa	Sacarosa	H ₂ S	Gas	Citrato	Movilidad	Indol	Ornitina
1	+	+	+	-	+ -	-	+	+	-
2	+	+	+	+	+	+	-	+ -	-

(-)Ausente; (+-) Posible; (+) presencia

Muestra 1: Tanque de sedimentación Paylones

Muestra 2: Toma de agua de los estanques

Para las pruebas realizadas con los medios nutritivos se evidencio presencia de bacterias anaerobias propias del agua <100 UFC/ $20\mu\text{L}$ (Tabla 17). Al utilizar el agar MACConkey no se observó la presencia de entero-bacterias en ninguno de los tratamientos evaluados: Zarrouk e inorgánico modificado. Además se realizó la prueba de PDA la cual resultó negativa para hongos y levaduras (Figura 26).

Las pruebas de catalasa fueron negativas al no observarse una reacción catalítica (efervescencia). Con estos resultados se puede afirmar que no existen bacterias fermentadoras de glucosa y lactosa con producción de gas presentes en los medios de cultivo para *Arthrospira platensis*.

4.1.7.4 Correlaciones para la evaluación del crecimiento de *Arthrospira platensis* en condiciones de laboratorio y campo

A continuación, se detallan las correlaciones encontradas entre variables según el coeficiente de Pearson (significancia del 95%) (Anexo 1).

Densidad celular: para los parámetros productivos de *Arthrospira platensis* se evidenció que la densidad celular se correlaciona positivamente con el pH, es decir, a mayor pH existe un incremento en la densidad celular. Por lo cual, un indicativo de crecimiento en el medio de cultivo.

Mientras que para las variables densidad celular y temperatura no se correlacionan, es decir a mayor temperatura no existe crecimiento celular. Pero esto se debe a *Arthrospira platensis* es organismos que se adapta a las condiciones del medio y no depende de este factor.

La biomasa se correlaciona positivamente con el pH, es decir a mayor pH existe un incremento en la producción de biomasa, son variables directamente proporcionales entre si y al tiempo.

Tabla 26
Coefficiente de correlación de Pearson para las variables de calidad ambiental y parámetros productivos para *Arthrospira platensis* en fase de laboratorio y campo

Positivo	r	p
Densidad celular y Biomasa	0,93	$2,3 \times 10^{-12}$
pH y biomasa	0,84	0
pH y Densidad celular	0,52	$3,2 \times 10^{-11}$
pH y salinidad	0,41	$1,4 \times 10^{-11}$

4.1.7.5 Análisis Económico para la producción de *Arthrospira platensis* durante la fase de campo

A continuación, se presenta un análisis de los costos que intervinieron en el proyecto, los cuales fueron proyectados a un cultivo de 10 m^3 con terreno propio.

En la tabla muestra la inversión de activos fijos necesarios para un cultivo de espirulina bajo invernadero.

Tabla 27
Inversiones de activos fijos para la producción de *Arthrospira platensis* bajo diferentes medios de cultivos en condiciones de campo

Inversión de activos fijos					
Descripción	Cantidad	Valor unitario	Valor total	Vida útil (años)	Depreciación
Terreno (m^2)	100	80,00	8.000		
Infraestructura					
Blower	1	1.300	1.300	20	65
Invernadero	1	600,00	600	15	40
Piscinas 2m^2	5	600,00	3.000	25	120
Varios	1	200,00	200,00	5	40
				TOTAL	265

Los costos operativos fijos y variables para una producción de 30 días en 100 m^2 se detallan en siguiente tabla.

Tabla 28
Costos operativos de cada tratamiento de una producción de 10m³ de
***Arthrospira platensis* en campo**

Costos operativos			
Tratamientos	Zarrouk	Inorgánico	Orgánico
COSTOS FIJOS			
Depreciación	265,00	265,00	265,00
Mano de obra	680,00	680,00	680,00
Luz Blower	30,10	30,10	30,10
Agua	15,00	15,00	15,00
COSTOS VARIABLES			
Fertilizante foliar	-	5,90	-
Bicarbonato de sodio	136,10	68,00	68,00
Carbonato de sodio	45,00	22,50	22,50
Fosfato di potásico	35,00	-	-
Nitratos	63,00	-	-
Sulfatos	60,00	-	-
Cloruro de sodio	30,00	-	-
Solución de minerales	25,00	-	-
Vitaminas	20,00	15,00	15,00
Recipientes herméticos	-	-	50,00
Autoclave	-	-	200,00
Inóculos algas	5,00	5,00	5,00
I. Laboratorio(pHmetro, microscopio)	500,00	500,00	500,00
Kit de análisis bromatológicos	100,00	100,00	100,00
Fundas Herméticas	10,00	10,00	10,00
Filtros de agua	50,00	50,00	50,00
Malla 50 μ	20,00	20,00	20,00
TOTAL	2089,2	1786,5	2030,6

La tabla 29 indica los ingresos por conceptos de espirulina en polvo y Biofertilizantes. Para la obtención de los ingresos, se tomó en cuenta la densidad celular al día 30 y volumen de medio nutritivo útil para la producción de Biofertilizantes.

Tabla 29
Ingresos de cada tratamiento de una producción de 10m³ de *Arthrospira platensis* en condiciones de campo

Ingresos			
Tratamientos	Zarrouk	Inorgánico	Orgánico
Biofertilizantes	975	975	975
Espirulina polvo	1012,5	1012,5	1000
TOTAL	1987,5	1987,5	1975

La tabla 30 indica el flujo de caja para el proyecto, en él se da un resumen de costos operativos e ingresos del estudio, con estos datos obtenidos se realizó el cálculo del beneficio neto obtenido por cada tratamiento, en comparación al control.

El tratamiento con medio de cultivo Inorgánico presento mayor beneficio neto en el estudio con un valor de \$ 201; el tratamiento con medio Zarrouk presentó un valor de pérdida de \$ 101,70; y el medio Orgánico de igual manera presenta un valor de pérdida de \$ 55,60.

Tabla 30
Flujo de caja de cada tratamiento de una producción de 10m³ de *Arthrospira platensis* en condiciones de campo

Flujo de caja			
Tratamiento	Ingresos	Costos operativos	Beneficio neto
Zarrouk	1987,5	2089,2	-101,7
Inorgánico	1987,5	1786,5	201
Orgánico	1975	2030,6	-55,6

4.2 Discusión

Una de las principales actividades que se llevó a cabo para la realización de esta investigación, fue el análisis el crecimiento de *Arthrospira platensis* en medios de cultivos alternativos con características de pH iguales al medio comercial Zarrouk. Al estandarizar medios de cultivo a base de orina de ganado vacuno y la utilización de fuentes inorgánicas para la masificación se encontró una concentración de biomasa viva de 0,5 - 1g L⁻¹ tanto para el medio orgánico como inorgánico; este resultado coincide con el expuesto por (Murugan & Radhamadhavan, 2010), cultivaron espirulina en medio Zarrouk como medio basal con la adición de agua de coco, extracto de heces y orina de vaca, medios con los que alcanzaron una concentración de biomasa de 0,54 g L⁻¹. Por otro lado (Feng & Zu-Cheng, 2006),

obtuvieron una producción de biomasa de 0,26 g L⁻¹ con medios nutritivos con orina humana.

Variables productivas evaluadas para *Arthrospira platensis* durante la fase de laboratorio y campo

Evaluación del crecimiento celular

El crecimiento de microalgas y cianobacterias está relacionada con el crecimiento bacteriano, el cual presenta cuatro fases bien definidas: latencia, exponencial, estacionaria y muerte (Li, y otros, 2011).

Con respecto al tratamiento con el medio Zarrouk presentó un crecimiento normal durante los días 0-15 (Figura 22), es decir presentó una tasa fotosintética normal, no obstante (Rojas, Ávila, & Parada, 2012) encontraron que en los primeros días de cultivo *A. platensis* presenta una fase heterotrófica dominante, en donde la fuente de carbono es consumida durante los 3 primeros días, esta fase se caracteriza por la alta tasa fotosintética.

Durante el día 33 se observó un leve decaimiento de la densidad celular 6x10⁵ filamentos mL⁻¹, lo que pudo estar relacionado con el agotamiento de nutrientes en especial la fuente de Carbono y Nitrógeno.

Con relación al medio orgánico e inorgánico se observó una fase de latencia entre los días 0-3 y 6-9 respectivamente, debido a que el cultivo microalgal presenta cambios en su perfil de nutrientes. Este resultado no se evidenció en campo dado que las células del inóculo tuvieron una fase adaptación al perfil de nutrientes antes de su siembra en campo. Al evaluar el factor tiempo para laboratorio y campo se encontró que la densidad celular más alta fue 7x10⁵ filamentos mL⁻¹ en el día 45 (laboratorio) y 33 (campo), lo que marco un pico máximo en la fase exponencial. Mientras que (Huarachi, Yapó, Dueñas, Soto, & González, 2013), al utilizar un fotobioreactor obtuvieron un crecimiento de 2,37x10⁵ filamentos mL⁻¹ en el día 11, sin embargo en el día 16 la densidad celular descendió hasta 1,037x10⁵ filamentos⁻¹ mL, llegando a un crecimiento máximo de 1,7x10⁵ filamentos mL⁻¹. Este argumento coincide con lo expuesto por (Oliveira, y otros, 2015), que alcanzaron el máximo crecimiento 1,42x10⁵ filamentos mL⁻¹ en el día 18 al utilizar un fotobioreactor cónico de 0,28 m², con medio f/2 y agua de mar por un periodo de 24 días.

Velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación valoradas para *Arthrospira platensis* durante la fase de laboratorio y campo

Al evaluar la densidad celular en función de los tratamientos (medios de cultivo), no existió diferencias significativas, pero en función a la velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación existen diferencias significativas ($p > 0,05$). El medio inorgánico presentó condiciones similares al medio Zarrouk con una velocidad de $0,08 \text{ día}^{-1}$ y un tiempo de duplicación de $8,59 \text{ h}^{-1}$.

Por otro lado bajo condiciones de campo el medio Zarrouk presentó una velocidad de crecimiento de $0,129 \text{ día}^{-1}$ y el medio inorgánico $0,128 \text{ día}^{-1}$; mientras que el tiempo de duplicación fue de $5,374 \text{ h}^{-1}$; lo cual concuerda con el estudio de (Vásquez, y otros, 2014), en donde indica que la utilización de 1,6; 3 y $4,4 \text{ g L}^{-1}$ de bicarbonato y 1,2 y 1,3% de sal cruda de mar 0,1% , resultan favorables para el crecimiento de espirulina. Con este estudio se obtuvieron valores de biomasa en 168,8 horas con un tiempo de duplicación de 0,928; 0,879; 0,840. Mientras que los valores más bajos de biomasa se alcanzaron en medios con 0,7% de salinidad y 3 g L^{-1} de bicarbonato con un pH de 9,1.

Producción de biomasa de *Arthrospira platensis* estimadas para *Arthrospira platensis* durante la fase de laboratorio y campo

El inóculo de espirulina se mantuvo en producción por 45 días bajo en tres medios de cultivo, hasta alcanzar una densidad de cosecha de $7,0 \times 10^5$ filamentos mL^{-1} ; equivalente a $1,4 \text{ g L}^{-1}$ de peso seco, además, según (Guarienti, 2012), la producción de biomasa depende de muchos factores ambientales como pH, salinidad y temperatura. Este resultado coincide por lo expuesto por (Colla, Oliveira , Vieira , & Reichert, 2006), en donde se obtuvo una concentración de $1,3 \text{ g L}^{-1}$ al fertilizar el medio de cultivo con diferentes fuentes de Nitrógeno, para reducir el uso de nitrato de sodio. Este resultado difiere con el obtenido en campo en donde la máxima densidad celular fue $7,1 \times 10^5$ filamentos mL^{-1} ; equivalente a $1,51 \text{ g L}^{-1}$ en el día 33.

Variable ambientales valoradas para *Arthrospira platensis* durante la fase de laboratorio y campo

El equilibrio de estas variables es indispensable para mantener el correcto funcionamiento de los medios de cultivo, cambios bruscos pueden alterar el metabolismo de las microalgas y generar una fase de declive en la densidad celular.

Potencial de Hidrógeno evaluado para *Arthrospira platensis* en fase de laboratorio y campo

El pH representa una de las principales variables a medir ya que muestra si el medio de cultivo está en equilibrio. El potencial hidrógeno debe mantenerse entre 9,3 y 10. De acuerdo a los resultados obtenidos en su estudio (Monaselidze, 2002), el pH inferior al intervalo de 9,3-10, tiene una menor fase de adaptación con respecto a los valores establecidos en otros ensayos, mientras que un pH 10,2, presenta una fase de adaptación al cultivo más prolongada indicando que las condiciones muy alcalinas no son favorables para un buen desarrollo del cultivo. Bajo las condiciones anteriores en este estudio genero niveles constantes de pH: para el medio Zarrouk de $9,52 \pm 0,03$; medio orgánico $9,70 \pm 0,03$; y para el medio orgánico de $9,60 \pm 0,03$.

Por otro lado el ensayo bajo invernadero no muestra diferencias significativas y se observó que el pH se incrementó durante la fase exponencial en el día 6 y 21; manteniendo un promedio de 9,52 para el medio Zarrouk y 9,60 para el medio inorgánico. Con respecto al valor de pH con relación al tiempo se observó que en todos los ensayos tanto para la fase de laboratorio y campo aumentaba paralelamente el crecimiento de espirulina (Tabla 26). (Rodríguez, 2006). Obtuvo resultados semejantes en su investigación en donde con pH 10 obtuvo una concentración de $1,81 \text{ g L}^{-1}$ y presento un pH de 8,2 con una concentración de $1,58 \text{ L}^{-1}$.

Temperatura evaluada para *Arthrospira platensis* en fase de laboratorio y campo

La temperatura es el factor fundamental para todos los organismos vivos. La temperatura afecta todas las actividades metabólicas, como también afecta la disponibilidad de nutrientes y su absorción. La temperatura ambiental óptima se encuentra entre 35 a 38°C, sin embargo las cepas de espirulina difieren en su temperatura óptima de crecimiento, así como su sensibilidad y rangos extremos (Huarachi, Yapó, Dueñas, Soto, & González, 2013). Durante 45 días se mantuvo

una temperatura mínima de 16°C y máxima de 20°C en condiciones de laboratorio. mientras que bajo invernadero se manejó una temperatura mínima de 18°C y máxima de 25°C, en donde existe una correlación negativa, es decir la temperatura no es un factor esencial durante el crecimiento de espirulina. Estos resultados difiere a los obtenidos por (Ogbonda, Aminigo, & Gideon, 2006), quienes con una combinación de factores ambientales de temperatura en 30°C con un pH de 9, obtuvieron valores de 4,60 mg g⁻¹ de biomasa y 48,2 % de proteína cruda. Este resultado se debe a que *Arthrospira platensis* es un organismo termorregulador y se adapta a las condiciones de campo.

Concentración de salinidad evaluada para *Arthrospira platensis* en fase de laboratorio y campo

La cepa de *Arthrospira platensis* creció bajo diferentes niveles de salinidad presentes en cada medio de los cultivo (Zarrouk, orgánico e inorgánico), alcanzando un crecimiento máximo de 7×10^{-6} filamentos mL⁻¹, existiendo una correlación positiva entre salinidad pH en donde a medida que la salinidad va aumentando el valor de pH se incrementa paulatinamente caso contrario al agotarse los nutrientes el pH baja disminuyendo la producción de biomasa, siendo de esta manera un indicativo de fertilización del medio. La exposición de *Arthrospira platensis* a altas concentraciones de NaCl da lugar a un cese del crecimiento durante 24 horas después de la exposición y se establece una fase estacionaria pero no se observó disminución en la biomasa después de la cual se estableció una nueva tasa de crecimiento exponencial. Una disminución en la tasa de crecimiento debido al estrés salino se ha demostrado en otras cianobacterias como Nostoc y *Oscillatoria sp* evaluadas en el estudio de (Fuenmayor, Jonte, Rosales, & Morales, 2009) en donde se valoró el efecto de la salinidad y la concentración de nutrientes en dos cianobacterias encontrando así que a un nivel de salinidad de 35 ppt el crecimiento celular se detiene provocando una fase estacionaria por 36 horas sin cese de crecimiento ($2,5 \times 10^5$ filamentos mL⁻¹). Sin embargo (Rosales & Ortega, 2004) y (Vásquez, 2014) estudiaron la influencia de la concentración de agua de mar para evaluar la producción de biomasa en donde se obtuvo el mayor crecimiento promedio de $3,5 \times 10^5$ filamentos mL⁻¹, a un pH de 8,8 a una temperatura de 25°C y a una concentración de salinidad de 1,2% $1,6 \text{ g L}^{-1}$ de bicarbonato. Estos resultados

sugieren que el crecimiento y el contenido de metabolitos presentes en *Arthrospira platensis*, está determinado por la salinidad con la cual se ha demostrado su tolerancia a medios salinos.

Calidad de la biomasa evaluada para *Arthrospira platensis* en fase de laboratorio y campo

Análisis proximal valorado para *Arthrospira platensis* en fase de laboratorio y campo

Los resultados obtenidos en el presente estudio indican un contenido de proteína de 55,85% medio Zarrouk , y para el medio orgánico e inorgánico de 56,52% y 63,40% respectivamente; estos resultados se asemejan a los obtenidos por (Ogbonda, Aminigo, & Gideon, 2006) quien determinó 48,2% de proteína al utilizarse fotobioreactores cónicos por 24 días. El porcentaje de grasa y ceniza fluctúa entre 6,1% y 3,87% para los medios (zarrouk, inorgánico y orgánico), valores que son similares a los encontrados por (Colla, Oliveira , Vieira , & Reichert, 2006), que al manejar diferentes fuentes de carbono y nitrógeno el porcentaje de grasa y ceniza fue de 5% y 3% respectivamente. Al realizar el análisis proximal de las muestras de campo, el contenido de proteína fue superior al obtenido en laboratorio 65,86% para el medio Zarrouk y 66,04% para el medio inorgánico. Según (Quevedo, Morales, & Acosta , 2008), afirman que esta diferencia se marca al modificar el medio de cultivo (balance de hidrógeno) y la relación carbono/nitrógeno en el medio. El contenido de proteína se incrementa al inicio, en respuesta a la disponibilidad de nitrógeno. En la relación carbono/nitrógeno el consumo de nitrógeno aumenta en los primeros días y se mantiene constante hasta el último día por la presencia de nitratos y carbonatos. El nitrógeno en presencia de carbono se incorpora rápidamente al medio para producir polisacáridos y proteínas. Este resultado coincide con lo expuesto por (Durán, Solano, González, & Barajas, 2011) quienes demuestran que el contenido de proteína es directamente proporcional al contenido de carbono y nitrógeno presentes en el medio. Para lo cual se reportó un porcentaje de 34% y 30% de proteína para *Scenedesmus sp.* y 36% y 46% para *Chlorella vulgaris* con diferentes niveles de nitrato y carbonatos.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

El crecimiento de espirulina (*Arthrospira platensis*), mostrado por el medio orgánico e inorgánico expresaron un crecimiento igual al medio Zarrouk ($7,0 \times 10^5$ filamentos mL^{-1}), con una productividad de $1,4 \text{ g L}^{-1}$ de biomasa seca en condiciones de laboratorio y campo. Demostrando la factibilidad de los medios para procesos industriales.

El crecimiento de espirulina (*Arthrospira platensis*), en medio inorgánico presentó mejores condiciones en cuanto a cinética de crecimiento, a diferencia del medio orgánico e igual condiciones que el medio zarrouk. Por tanto los medios se ajustaron a parámetros físicos- químicos, generando de esta manera su crecimiento desde un volumen de 0,01 L a 20 L en condiciones de laboratorio.

El medio de cultivo inorgánico permitió un rápido crecimiento celular, en concentraciones de 3×10^5 filamentos mL^{-1} , a comparación del medio orgánico (Laboratorio). Por lo tanto es promisorio para la producción industrial. La cinética de crecimiento en condiciones de campo expresaron un mayor crecimiento de organismos, lo que permitió a este tratamiento alcanzar un alto nivel de productividad. Cumpliendo con el reto de masificación de biomasa a 2 m^3 .

Las curvas de crecimiento y los parámetros cinéticos de la cianobacteria *Arthrospira platensis*, demostraron su capacidad de adaptación a diferentes medios de cultivo en laboratorio y campo, con una densidad celular de 7×10^5 filamentos mL^{-1} al día 33 y 45 respectivamente.

Los factores físicos-químicos y microbiológicos de los medios de cultivo mantuvieron rangos aceptables a los requerimientos de cultivo de espirulina, permitiendo el desarrollo favorable de la cianobacteria en condiciones de laboratorio y campo.

El contenido nutricional promedio de la biomasa de *Arthrospira platensis*, se encuentra con 58,59% de proteína, 10,49% grasa y 11,03% de ceniza. Ubicándose

dentro del rango óptimo en comparación a la espirulina comercial ofertada por empresas privadas con un contenido de 68% proteína, 9 % grasa y 11% ceniza.

5.2 Recomendaciones

Mantener las cepas bajo luz constante para fomentar un crecimiento acelerado , hasta alcanzar la densidad celular deseada para después continuar a la fase de producción masiva, en donde se debe acostumbrar al cultivo a la fase 12 horas de luz natural y 12 horas de oscuridad por un periodo de 5 días de adaptación antes de la siembra.

Para cultivos industriales de *Arthrospira platensis* se recomienda desarrollar medios de cultivo con un porcentaje de inclusión del 50% y 25% de Bicarbonato de sodio y Carbonato de sodio, o buscar fuentes alternativas al uso de las mismas como la inclusión de melaza en el medio de cultivo.

Espirulina no puede absorber material orgánico como nutriente o fertilizante directamente sino solo pueden absorber estos en forma inorgánica, por lo tanto el material orgánico debe ser diluido con agua antes de ser agregado al medio de cultivo base.

Renovar periódicamente el cultivo por completo, para mantener la salud del inoculo inicial con el fin de obtener espirulina de buena calidad.

Durante el proceso de cosecha se recomienda quitar la aireación dos días antes del filtrado si la densidad celular es baja para lo cuál utilizar un filtro de 50 μ de porosidad para que no exista pérdida de biomasa viva.

Durante la producción bajo invernadero utilizar filtros o una malla de 100 μ de porosidad para evitar la contaminación por el ingreso de insectos.

5.3 Bibliografía

- Aiba, S., & Ogawa, T. (1997). Assessment of growth yield of a blue-green alga: *Spirulina platensis* in axenic and continuous culture. *J. Gen Microbiol*, 179-182.
- Algaefix*. (2016). Obtenido de Cultivo de microalgas: Sistemas abiertos vs sistemas cerrados: Cultivo de microalgas: sistemas abiertos vs sistemas cerrados. España. Obtenido de: <http://www.madrimasd.org/blogs/espirulina/>
- Arredondo, B., & Voltolina, D. (2014). Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. *ResearchGate*.
- Centeno, A. (2013). *Producción de microalgas Spirulina (Arthrospira) en cultivo semicontinuo en diferentes concentraciones de nutriente*. Universidad Río Grande: Tesis de grado.
- Chamorro, G., Salazar, M., Gómez, K., Pereira dos Santos, G., & Castillo, L. (2002). Actualización en la farmacología de *Spirulina (Arthrospira)*, un alimento no convencional. *Caracas Set*.
- Chen, F., & Zhang, Y. (1997). High cell density mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucose for phycocyanin production using a fed-batch system. *Enz. Microb. Technol*, 221-224.
- Colla, L., Oliveira, C., Vieira, J., & Reichert, C. (2006). Production of biomass and nutraceutical compounds by *Bioresource Technology*, 1489-1493.
- Cornet, J., Dussap, C., & Dubertret, G. (1992). A Structured Model for Simulation of Cultures of the Cyanobacterium *Spirulina platensis* in Photobioreactors: Coupling Between Light Transfer and Growth Kinetics. *Biotechnology and Bioengineering*, 817-825.
- Durán, L., Solano, B., González, A., & Barajas, C. (2011). Influencia de la relación Carbono/Nitrógeno en la producción de proteínas totales en *Chlorella vulgaris*. 48-58.

- El Agro*. (2016). Obtenido de Ecuador produce spirulina más limpia. Ecuador: <http://www.revistaelagro.com/ecuador-produce-espirulinas-mas-limpias>
- Espada, J. (2016). *Universidad Rey Juan Carlos*. Obtenido de www.madrimasd.org/blogs/espirulina/
- Estación de Meteorología e Hidrología – Hacienda El Prado. (Octubre de 2016). *Boletín climatológico anual*. Sangolquí.
- Fedekar, S., El-Bahad, A., & Hoda, S. (2012). Production and nutritive value of *Spirulina platensis* in reduced cost media. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 51-57.
- Feng, D. -L., & Zu-Cheng, W. (2006). Culture of *Spirulina platensis* in human urine for biomass production and O₂ evolution. *Zhejiang University Science*, 34-37.
- Fuenmayor, G., Jonte, L., Rosales, N., & Morales, E. (2009). Efecto de la salinidad y la concentración de nutrientes sobre el crecimiento y composición bioquímica de la cianobacteria autóctona *Oscillatoria* sp. *Ciencia2009*, 50-57.
- Guarienti, C. (2012). *Potencial Antioxidante de la microalga Spirulina frente a condiciones de estrés oxidativo*. Rio Grande: Tesis de Grado.
- Harbone, J. (1973). Chlorophyll extraction. In: *Phytochemical methods*. *Chapman and hall*, 205-207.
- Henrikson, R. (2009). *Usos y aplicaciones de productos a base de Spirulina*. Obtenido de <http://www.spirulinasource.com/resources/robert-henrikson>
- Hernández, A., & Labbé, J. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Biología Marina y Oceanografía*, 157-173.
- Huarachi, R., Yapo, U., Dueñas, A., & González, R. (2014). Adaptabilidad de *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* en fotobioreactor tubular cónico bajo condiciones ambientales. 103-112.

- Huarachi, R., Yapo, U., Dueñas, A., Soto, J., & González, R. (2013). Producción de *Spirulina platensis* (Cyanophyta) en fotobioreactor tubular cónico bajo condiciones de laboratorio. *The Biologist*, 217-227.
- INEN. (1981). *INEN. (1981). Determinación de la proteína cruda como alimento para animales, norma técnica ecuatoriana 543. Recuperado el 05 de enero de 2016, de Instituto Ecuatoriano de Normalización, INEN. Obtenido de <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.0543.1981.pdf>*
- Infante, C., Angulo, E., Flores, Z., Barrlos, F., & Zapata, C. (2012). Propagación de la microalga *Chlorella* sp. en cultivo por lote: cinética del crecimiento celular. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 159-164.
- Li, Y., Chen, Y.-F., Chen, P., Min, M., Zhou, W., Martinez, B., . . . Ruan, R. (2011). Characterization of a microalga *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production. *Bioresource Technology*, 5138-5144.
- Mahavir, J., Kiranjot, K., Tulika, M., & Sanpreet, S. (2014).). To evaluate Lab scale Cultivation of *Spirulina* by using different substrates and to Evaluate its Chlorophyll and Protein content. *Interbatinal Research Journal of Biological Sciences*, 22-30.
- Margarites, A., Araújo, E., Garbin, L., Bertolin, L., Colla, L., & Costa, A. (2016). *Spirulina platensis* is more efficient than *Chlorella homosphaera* in carbohydrate productivity. *Environmental Technology*.
- Materassi, R., Tredici, M., & Waldemaro, B. (1984). *Spirulina* culture in sea- water. *Microbiology Biotechnology*, 384-386.
- Materassi, R., Tredici, M., & Waldemaro, B. (1984). *Spirulina* culture in sea-warter. *Microbiology Biotechnology*, 384-386.
- Meixner, K., Fritz, I., & Daffert, K. (2016). Processing recommendations for using low-solids digestate as nutrient solution for poly- β -hydroxybutyrate production with *Synechocystis salina*. *Journal of Biotechnology*, 1-29.

- Mezzomo, N., Saggiorato, A., Siebert, R., Oliveira, P., & Lago, M. (2010). Cultivation of microalgae *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) from biological treatment of swine wastewater. *Ciencia y tecnología de alimentos*, 173-178.
- Monaselidze, J. (2002).
- Murugan, T., & Radhamadhavan, L. (2010). Media Optimization for the Enhanced Growth and Yield of *Spirulina*. *International Journal of Medical Science*, 34-39.
- Mutileno, A., Correa, P., Vieira, C., & Hemkemeier, M. (2005). Cultivo mixotrófico da microalga *Spirulina platensis* embatelada alimentada. *Ciênc. Agrotec., Lavras*, 1132-1138.
- Naranjo, E. (12 de 09 de 2015). *Ciclo de Calvin o fase oscura*. Obtenido de <http://archivedemo.cnx.org/contents/e4ec8942-4fca-4507-a99b-8e6d381235fc@2/el-ciclo-de-calvin>
- Ogbonda, K., Aminigo, R., & Gideon, J. (2006). Influence of temperature and pH on biomass production and protein biosynthesis. *Bioresearch Technology*.
- Oliveira, I., Oliveira, R., Rocha, N., & Oliveira, R. (2012). *Spirulina platensis*: process optimization to obtain biomass. *Ciencia y tecnología de alimentos*, 179-183.
- Oliveira, R., Yapó, U., Dueña, A., Condori, J., Pacheco, D., & Flores, J. (2015). Cultivo de *Arthrospira platensis* (*Spirulina*) en fotobiorreactor tubular doblemente curvado a condiciones ambientales en el sur del Perú. *Redalyc*, 142-149.
- Ortiz, M., Cortés, C., Castillo, M., Padilla, J., & Otero, A. (2011). Evaluación del crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* en diferentes medios de cultivo en condiciones autotróficas y mixotróficas. 234-244.
- Piña, P., Medina, M., Nieves, M., Leal, S., López, A., & Guerrero, M. (2007). Cultivo de cuatro especies de microalgas con diferentes fertilizantes utilizados en acuicultura. 225-236.

- Piñero, J., Bermejo, P., & Villar del Fresno, M. (2001). Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. *Elsevier*, 497-500.
- Prepelitchi, L., Pujadas, J., & Wisnivesky, C. (2015). The effect of *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) (Oscillatoriales: Cyanobacteria) on the experimental breeding of *Pseudosoma columella* (Basommatophora: Lymnaeidae). *Revista de Biología Tropical*, 479-489.
- Quevedo, C., Morales, S., & Acosta, A. (2008). Producción de proteína microalgal *Scenedesmus* sp. *Vitae*, 25-31.
- Quintero, E., Arredondo, O., Flores, T., Maldonado, A., & Carballo, B. (2016). Selección de un medio de cultivo a nivel de laboratorio para el cultivo de la cianobacteria *Spirulina* (*Arthrospira maxima*) y cuantificación de los nutraceuticos. *Investigación y desarrollo en ciencia y tecnología de alimentos*, 532-537.
- Rincón, D., Velásquez, H., Dávila, M., & Semprum, A. (2012). Niveles de sustitución de harina de pescado por harina de *Arthrospira* (*Spirulina máxima*), en dietas experimentales para alevines de tilapia roja (*Oreochromis* sp.). *Revista Colombiana de Ciencia Pecuarias*, 430-437.
- Rodríguez, A. (2006). *Evaluación del pH en el cultivo de Spirulina bajo condiciones de laboratorio*. Bogotá.
- Rojas, E., Ávila, M., & Parada, G. (2012). Aplicación de estrategias nutricionales y su efecto en el crecimiento en el cultivo continuo de *Spirulina* (*Arthrospira platensis*). *Environment and Resources of the South Pacific*, 763-771.
- Rosales, N., & Ortega, J. (2004). Influencia de la salinidad sobre crecimiento y composición bioquímica de la cianobacteria *Synechococcus* sp. *Ciencia*.
- Saitama, O. (27 de 08 de 2010). *DOGAN Arthrospira platensis*. Obtenido de <http://www.bio.nite.go.jp/dogan/project/view/SP2>
- Sánchez, N., Bu, M., León, N., & Pérez, H. (2002). Fundamentos de una posible acción beneficiosa de la *Spirulina platensis* en la neuropatías periféricas. *Rev Cubana Plant Ned.*

- Spolaore, P., Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial Applications of Microalgae. *Bioscience and Bioengineering*, 87-96.
- Tuanted, K., Janssen, M., Temmink, H., Zeeman, G., Wijffels, R., & Buisman, C. (2014). Microalgae growth on concentrated human urine. *Biotechnology and Bioengineering*, 287-297.
- Udayasree, V., Manjula, K., & Sowjanya, M. (2013). Effect of Spirulina as a Nutritional Supplement in Malnourished Children. *International journal*, 311-312.
- Vásquez, V. (2014). Influencia de la proporción agua de mar y bicarbonato en la producción de biomasa Spirulina sp. con iluminación de diodo emisor de luz. *Scientia Agropecuaria*.
- Vásquez, V., Vergaray, D., Suárez, S., Valladares, J., Gaspar, K., & Ecurra, X. (2014). Influencia de la proporción agua de mar y bicarbonato en la producción de biomasa de Spirulina sp. con iluminación de diodo emisor de luz. *Scientia Agropecuaria*, 199-209.