



Universidad Nacional

SAN LUIS GONZAGA



Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional

Esta licencia permite a otras combinar, retocar, y crear a partir de su obra de forma no comercial, siempre y cuando den crédito y licencia a nuevas creaciones bajo los mismos términos.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0>

UNIVERSIDAD NACIONAL SAN LUIS GONZAGA DE ICA
VICERRECTORADO DE INVESTIGACION Y DESARROLLO

Facultad de Ciencias Biológicas



Productividad de biomasa de *Arthrospira platensis* “espirulina”,
de las cepas Orovilca y Paracas en biorreactores tipo *raceways*
en Ica, enero – junio 2018

Línea de investigación: Salud pública y conservación del medio ambiente

Autores:

Bach. ESCRIBA ORTIZ CORALÍ BREHTSY

Bach. HUAMANÍ ALVARADO GIANMARCO

Ica – Perú

2021

DEDICATORIA

Dedicamos esta tesis a Dios, quien nos inspiró para la realización de este estudio, por darnos salud y bendición para alcanzar nuestras metas como personas y como profesionales.

También dedicamos a nuestras familias que gracias a su apoyo pudimos concluir nuestra carrera.

A nuestros padres, por su apoyo y confianza, por brindarnos los recursos necesarios y aconsejarnos siempre y a nuestras madres por hacernos una mejor persona a través de su enseñanza y amor. A nuestros hermanos, por tener su apoyo incondicional y a nuestro hijo, por darnos el tiempo para realizarnos como profesionales.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, deseamos expresar nuestro agradecimiento a nuestra asesora de esta tesis, Dra. Rosa Bertha Altamirano Díaz y nuestro asesor externo Gregory Guerra Bieberach, por la dedicación y el apoyo que nos han brindado para la realización de este trabajo.

Gracias por la confianza de los asesores y docentes desde que llegamos a esta facultad.

Nuestro trabajo de investigación es el fruto de ideas, proyectos, esfuerzos realizados durante la investigación para lograr un aporte científico.

ÍNDICE

| | |
|--|------|
| ÍNDICE DE TABLAS | iv |
| ÍNDICE DE FIGURAS | vi |
| RESUMEN | viii |
| ABSTRAC | ix |
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. ESTRATEGIA METODOLÓGICA | 6 |
| 2.1. Material biológico..... | 6 |
| 2.1.1. Población de estudio..... | 6 |
| 2.1.2. Muestra de estudio..... | 6 |
| 2.2. Procedimientos metodológicos..... | 6 |
| 2.2.1. Reactivación, mantenimiento y traspase de las cepas..... | 6 |
| 2.2.2. Cultivos de <i>A. platensis</i> “espirulina”..... | 7 |
| 2.2.3. Producción de cepas <i>A. platensis</i> Orovilca y <i>A. platensis</i> Paracas..... | 7 |
| 2.2.4. Evaluación de los cultivos..... | 8 |
| 2.2.5. Evaluación de la productividad..... | 10 |
| 2.2.6. Obtención de biomasa seca..... | 11 |
| 2.2.7. Análisis de pigmentos..... | 13 |
| 2.2.8. Evaluación de estadística..... | 15 |
| III. RESULTADOS | 16 |
| 3.1. Cinética de crecimiento..... | 16 |
| 3.2. Determinación de adaptación morfológica..... | 20 |
| 3.3. Determinación de la productividad de biomasa..... | 21 |
| 3.4. Obtención de biomasa seca..... | 24 |
| 3.5. Análisis de pigmentos..... | 24 |
| IV. DISCUSION | 25 |
| V. CONCLUSIONES | 31 |
| VI. RECOMENDACIONES | 32 |
| VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 33 |
| VIII. ANEXOS | 38 |

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1. Parámetros de crecimiento de las cepas *A. platensis* Orovilca y *A. platensis* Paracas, durante la productividad de los biorreactores *raceways* en la etapa de pre-cosecha, junio 2018.
- Tabla 2. Productividad superficial y volumétrica en la etapa de pre-cosecha y post-cosecha de los cultivos de las cepas *A. platensis* Orovilca y *A. platensis* Paracas, en el biorreactor *raceway*, junio 2018.
- Tabla 3. Cálculos de concentración de biomasa seca (g/L) a cosechar, de los cultivos de las cepas *A. platensis* Orovilca y *A. platensis* Paracas, del biorreactor *raceway*.
- Tabla 4. Biomasa seca obtenida en (g) de los cultivos de las cepas *A. platensis* Orovilca y *A. platensis* Paracas, del biorreactor *raceway*, junio 2018.
- Tabla 5. Determinación cuantitativa de los pigmentos de las cepas *A. platensis* Orovilca y *A. platensis* Paracas.
- Tabla 6. Medio espirulina modificado (MEM).
- Tabla 7. Solución de micronutrientes.
- Tabla 8. Medio base.
- Tabla 9. Medio mix de oligo-micronutrientes.
- Tabla 10. Cinética de crecimiento y parámetros físicos-químicos de la cepa *A. platensis* Orovilca, poza experimental 6C, durante 30 días.
- Tabla 11. Cinética de crecimiento y parámetros físicos-químicos de la cepa *A. platensis* Orovilca, poza experimental 6D, durante 30 días.
- Tabla 12. Cinética de crecimiento y parámetros físicos-químicos de la cepa *A. platensis* Paracas, poza experimental 6G, durante 30 días.
- Tabla 13. Cinética de crecimiento y parámetros físicos-químicos de la cepa *A. platensis* Paracas, poza experimental 6H, durante 30 días.
- Tabla 14. Cinética de crecimiento de las cepas *A. platensis* Orovilca y *A. platensis* Paracas en un biorreactor *raceway*, durante 30 días.
- Tabla 15. Conteo de tricomas ondulados y rectos en el cultivo de las cepas *A. platensis* Orovilca y *A. platensis* Paracas en sus respectivas pozas experimentales.
- Tabla 16. Conteo de tricomas por ondas en el cultivo de las cepas *A. platensis* Orovilca y *A. platensis* Paracas en sus respectivas pozas experimentales.
- Tabla 17. Productividad superficial y volumétrica de la cepa *A. platensis* Orovilca, en el biorreactor *raceway*, durante 30 días.
- Tabla 18. Productividad superficial y volumétrica de la cepa *A. platensis* Paracas, en el biorreactor *raceway*, durante 30 días.

Tabla 19. Determinación cuantitativa de ficocianina pura y cruda del cultivo de *A. platensis* Orovilca y *A. platensis* Paracas.

Tabla 20. Determinación cuantitativa de Clorofila “a” y “b” del cultivo de *A. platensis* Orovilca y *A. platensis* Paracas.

Tabla 21. Determinación cuantitativa de Carotenoides “b” del cultivo de *A. platensis* Orovilca y *A. platensis* Paracas.

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Curva de crecimiento de la cepa *A. platensis* Orovilca en un cultivo de 1200 L, llevada a cabo en la etapa de pre-cosecha.
- Figura 2. Curva de crecimiento de la cepa *A. platensis* Paracas en un cultivo de 1200 L, llevada a cabo en la etapa de pre-cosecha.
- Figura 3. Crecimiento exponencial de la cepa *A. platensis* Orovilca en la etapa pre-cosecha.
- Figura 4. Crecimiento exponencial de la cepa Paracas en la etapa pre-cosecha.
- Figura 5. Comparación del crecimiento de las cepas *A. platensis* Orovilca y *A. platensis* Paracas, en la etapa de pre-cosecha.
- Figura 6. Evaluación del crecimiento y el comportamiento de las dos cepas en estudio, durante la etapa de pre-cosecha y post-cosecha (día 30).
- Figura 7. Recuento de tricomas ondulados y rectos de las cepas *A. platensis* Orovilca y *A. platensis* Paracas, al inicio (día 0) y al final del cultivo (día 30).
- Figura 8. Recuento de tricomas por número de ondas de las cepas de *A. platensis* Orovilca y *A. platensis* Paracas, al inicio (día 0) y al final del cultivo (día 30).
- Figura 9. Determinación de la productividad de biomasa seca superficial de la cepa *A. platensis* Orovilca en un cultivo de 1200 L durante 30 días.
- Figura 10. Determinación de la productividad de biomasa seca volumétrica de la cepa *A. platensis* Orovilca en un cultivo de 1200 L durante 30 días.
- Figura 11. Determinación de la productividad de biomasa seca superficial de la cepa *A. platensis* Paracas en un cultivo de 1200 L durante 30 días.
- Figura 12. Determinación de la productividad de biomasa seca volumétrica de la cepa *A. platensis* Paracas en un cultivo de 1200 L durante 30 días.
- Figura 13. Las cepas *A. platensis* Orovilca y *A. platensis* Paracas en tubos Falcon de 10 mL, en el laboratorio de Alimenta Algae S.A.C.
- Figura 14. Documento de adquisición de las cepas *A. platensis* Orovilca y *A. platensis* Paracas por el Instituto del Mar del Perú (MARPE).
- Figura 15. Flujograma de desdoble y traspase de inóculos (cepa reactivada) a volúmenes mayores.
- Figura 16. Traspase de las cepas *A. platensis* Orovilca y *A. platensis* Paracas a volúmenes mayores en laboratorio.
- Figura 17. Traspase de las cepas *A. platensis* Orovilca y *A. platensis* Paracas a volúmenes mayores en medio externo.
- Figura 18. Prototipo de cultivo de espirulina a nivel industrial en un sistema al aire libre (biorreactor *raceway*).

- Figura 19. El sistema de biorreactor *raceways* al aire libre con sus dos pozas experimentales (malla raschel, día 0).
- Figura 20. Proceso de cosecha del cultivo de espirulina.
- Figura 21. Biomasa húmeda de espirulina prensada, llamada “torta”.
- Figura 22. Pelletizado de la biomasa húmeda prensada en forma de fideos llamada “pellets” sobre una bandeja del deshidratador de alimentos.
- Figura 23. Observación morfológica de los tricomas ondulados y rectos en la cámara Sedgewick-Rafter: a) *A. platensis* cepa Orovilca, b) *A. platensis* cepa Paracas.
- Figura 24. Color del cultivo al inicio de su crecimiento en el biorreactor *raceway*; parte superior (cepa Orovilca) e inferior (cepa Paracas).
- Figura 25. Observación morfológica de espirulina, tricomas rectos y ondulados de las cepas Orovilca y Paracas en sus respectivas pozas experimentales.
- Figura 26. Color marrón del cultivo de la cepa *A. platensis* Paracas al final del estudio; izquierda (poza experimental 6G) y derecha (poza experimental 6H).
- Figura 27. Color de las muestras secas de espirulina: a) cepa Orovilca color (PMS 371), b) cepa Paracas color (PMS 3995), c) Tabla de escala de PANTONE® (PMS).

RESUMEN

Arthrospira platensis “espirulina” constituye una fuente proteica usada en la alimentación. Se ha estudiado las cepas Orovilca y Paracas para determinar la productividad de biomasa en un biorreactor tipo *raceway*. Los objetivos fueron determinar la curva de crecimiento, la adaptabilidad morfológica, la producción de pigmentos y la productividad superficial y volumétrica de biomasa. Las cepas *A. platensis* Orovilca y *A. platensis* Paracas se cultivaron en medio base en sistemas cerrados hasta 18 L, iluminación LED y aireado; en sistemas abiertos hasta 1200 L en un biorreactor *raceway*, iluminación solar, aireación mecánica y con agitación. Se realizó una pre-cosecha entre los días 19 y 20, luego una post-cosecha hasta el día 30. Según la curva de crecimiento, en la etapa pre-cosecha la cepa Orovilca tuvo una μ_x de $0.0035 \text{ (g/L)h}^{-1}$ y la cepa Paracas $0.0015 \text{ (g/L)h}^{-1}$. La cepa Orovilca tuvo mejor adaptación con 98% de tricomas ondulados y 2% rectos; mientras que la cepa Paracas 68 % y 32 %, respectivamente. La biomasa seca de la cepa Orovilca en la etapa pre-cosecha fue 391g y de Paracas 369 g. La productividad superficial y volumétrica durante 30 días con Orovilca fue $3.6711 \text{ g/m}^2/\text{día}$ y 0.0374 g/L/día y de $1.9972 \text{ g/m}^2/\text{día}$ y 0.0100 g/L/día con Paracas. Con la cepa Orovilca, la concentración de ficocianina fue 10.1047 %, clorofila “a” $11.1660 \text{ }\mu\text{g/L}$ y carotenoides $10.0205 \text{ }\mu\text{g/L}$ y con la cepa Paracas de 2.5990 %, $4.4112 \text{ }\mu\text{g/L}$ $6.6102 \text{ }\mu\text{g/L}$, respectivamente. Se determinó que no hay diferencia significativa en la producción superficial y volumétrica de biomasa seca entre ambas cepas y se concluye que puede usarse cualquiera de ellas.

Palabras Clave: *Arthrospira platensis*, tricomas, productividad de biomasa seca, biorreactor *raceway*.

ABSTRACT

Arthrospira platensis "spirulina" is a protein source used in food. The Orovilca and Paracas strains have been studied to determine biomass productivity in a *raceway* type bioreactor. The objectives were to determine the growth curve, morphological adaptability, pigment production and surface and volumetric productivity of biomass. The *A. platensis* Orovilca and *A. platensis* Paracas strains were grown in base medium in closed systems up to 18 L, LED lighting and aerated; in open systems up to 1200 L in a *raceway* bioreactor, solar lighting, mechanical aeration and stirring. A pre-harvest was carried out between days 19 and 20 and a post-harvest until the day 30. According to the growth curve, in the pre-harvest stage the Orovilca strain had a μ_x of $0.0035 \text{ (g / L) h}^{-1}$ and the Paracas strain $0.0015 \text{ (g / L) h}^{-1}$. The Orovilca strain had better adaptation with 98% wavy trichomes and 2% straight; while the Paracas strain 68% and 32%, respectively. The dry biomass of the Orovilca strain in the pre-harvest stage was 391 g and of Paracas 369 g. The surface and volumetric productivity during 30 days with Orovilca was $3.6711 \text{ g / m}^2 \text{ / day}$ and $0.0374 \text{ g / L / day}$ and $1.9972 \text{ g / m}^2 \text{ / day}$ and $0.0100 \text{ g / L / day}$ with Paracas. With the Orovilca strain, the phycocyanin concentration was 10.1047%, chlorophyll "a" $11.1660 \text{ } \mu\text{g / L}$ and carotenoids $10.0205 \text{ } \mu\text{g / L}$ and with the Paracas strain it was 2.5990%, $4.4112 \text{ } \mu\text{g / L}$ $6.6102 \text{ } \mu\text{g / L}$, respectively. It was determined that there is no significant difference in the production of both strains and it is concluded that either of them can be used.

Keywords: *A. platensis*, trichomes, biomass productivity, *raceway* bioreactor.

I. INTRODUCCIÓN

Las cianobacterias existen desde hace 3.500 millones de años, pero siguen siendo los organismos fotosintéticos más importantes del planeta para el ciclo del carbono y el nitrógeno (Whitton y Potts, 2012). Las cianobacterias se denominaban algas azules-verdosas; sin embargo, al final del siglo XIX se descubrió que no poseía núcleo y tampoco cloroplasto. Los géneros *Spirulina* y *Arthrospira*, llamadas “espirulinas”, debido a su riqueza en proteínas y su perfil de aminoácidos, se utilizan como nutracéutico o son incluidas en alimentos funcionales para prevenir algunas enfermedades. Los efectos beneficiosos se han atribuido a los polifenoles, ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), terpenos, clorofila y pigmentos accesorios del aparato fotosintético. Con la “espirulina” la absorción es muy eficiente por parte del sistema digestivo, entre 85 y 95%; tiene cualidades inmunológicas, antioxidantes, antiviral, protector contra el cáncer (Henrikson, 1994).

Las cianobacterias de los géneros *Arthrospira*, *Spirulina* y *Phormidium* a pesar de las diferencias en su morfología y hábitats, pertenecen al mismo grupo en los árboles filogenéticos según el ADNr 16S o PC-IGS. Las cepas de *Spirulina* forman un grupo separado distinto al del grupo de *Arthrospira*, pero ambas especies son conocidas a nivel mundial con el nombre común de “espirulina” (Ballot et al, 2004).

Arthrospira platensis “espirulina”, es una cianobacteria filamentosa fotosintética planctónica, identificada por las características morfológicas principales del género, disposición de tricomas cilíndricos multicelulares en una hélice, a lo largo de toda la longitud de los filamentos (Vonshak, 1997; Vonshak y Tomaselli, 2000). Cuando las condiciones cambian en una fuente de agua, como aumento de salinidad y alcalinidad, el hábitat se hace inadecuado para otras formas de vida y está se convierte en la única especie predominante, creciendo de manera exponencial en los cuerpos de agua (Henrikson, 1994). La “espirulina” por tener un alto contenido proteico, de hasta 65%, es usada en la alimentación humana; asimismo, en la alimentación de animales; en acuicultura, para la crianza de microcrustáceos; para tratamiento de aguas residuales y como fuente energética en la eliminación de desechos (Vonshak, 1997; Fox, 1999; Sánchez, 2018). Además, hay muchos productos químicos, bioquímicos y farmacéuticos que pueden ser extraídos de microalgas y que podrían ser utilizados en la industria alimentaria, farmacéutica, cosmética y química. Además, se han destacado las ventajas que ofrece el cultivo masivo de microalgas sobre cultivos convencionales: ciclo corto, producción continua a lo largo del año, ingeniería genética más fácil y posibilidad de crecimiento en agua salobre en lugar de agua dulce, que se está convirtiendo en un recurso escaso (Vonshak, 1997).

La producción del cultivo de *A. platensis* “espirulina”, se inició en la empresa Earthrise Farms en Estados Unidos, fue la primera en explotar “espirulina”, utilizaron para sus

cultivos artificiales el agua proveniente del río Colorado, rica en nutrientes minerales, obtuvieron una producción de 10 toneladas de polvo de “espirulina” al año (Henrikson, 1994). En el Perú, se viene desarrollando la producción en diferentes lugares como en Arequipa, entre otros; se comercializa en polvo o en forma de grageas, cápsulas y comprimidos, entre sus bondades nutricionales posee 8 aminoácidos esenciales, omega, vitaminas liposolubles e hidrosolubles y minerales, es considerado el alimento del futuro porque posee fitonutrientes como clorofila, carotenos y ficocianina, utilizada como alimento funcional, suplemento dietético, nutraceuticos y alimento para animales (Vásquez et al, 2014; Sánchez, 2018). Los pigmentos son los principales indicadores de calidad de la biomasa seca de “espirulina”; por estas razones la biomasa de *A. platensis* presenta potencial biotecnológico por sus altos contenidos de clorofila, ficocianina y carotenoides (Romero et al, 2017) y puede ser cultivada en forma artesanal, planta piloto e industrial (Richmond y Hu, 2013).

La producción de “espirulina” se puede llevar a cabo en sistemas cerrados o abiertos. El primero implica fotobiorreactores y no se utiliza en la producción industrial por su complejidad, son de estructura plana o tubular, son utilizados en laboratorio y su mantenimiento es costoso (Vonshak, 1997). Se han documentado que usando un fotobiorreactor tubular cónico de 6.313 L de capacidad, bajo condiciones ambientales, se obtuvo una biomasa seca de “espirulina” de 3.362 g/m²/L y la concentración de clorofila “a” de 0.05658 mg/L, con iluminación de 5 617.23 Lux, inyección de aire de 0.0021 L/s; este tipo de biorreactor cónico es recomendable para mantener la “espirulina” como cepa madre para producción industrial o bioensayos (Huarachi, et al. 2015). Con un fotobiorreactor (FBR) fotovoltaica para la obtención de biomasa de *A. platensis*, iluminado con fluorescente y medio de cultivo Zarrouk, se ha logrado una alta producción de biomasa (1.353 ± 0.004 mg/L) y porcentaje de proteína (33.75) (Sánchez, 2018). El segundo sistema es cerrado y se realiza en los biorreactores llamados “*raceway*” (Rodríguez y Triana, 2006). Los biorreactores *raceways* al aire libre son utilizados exclusivamente en la producción comercial de biomasa de “espirulina”, debido a su bajo costo de producción son relativamente simples de construir, fácil manejo y alta producción de biomasa, muy usado para la producción industrial (Rodríguez y Triana, 2006). Un estanque *raceway* es esencial en un canal de recirculación de un circuito cerrado sea rectangular, semi-rectangular o cuadradas; el área de estos estanques varía dependiendo de la necesidad y terreno utilizado, se trabaja con una profundidad de 15 – 40 cm. Estos están contruidos de concreto, que puede estar revestido de plástico o geomembranas para evitar filtraciones. La selección del área depende de varios factores, incluida las condiciones de mezcla y los costos operativos (Richmond y Hu, 2013).

La mezcla adecuada y turbulenta es esencial para la alta productividad de biomasa (Vonshak, 1997); la mezcla en estanques *raceways* se realiza mediante una rueda de paleta; se utiliza velocidades de mezcla de 5 – 60 cm/s, está relacionada con la profundidad del estanque dado que la luz cae verticalmente en los estanques, si el cultivo no está mezclado entonces las algas cerca de la superficie reciben mayor cantidad de luz que las más profundas en el cultivo (Richmond y Hu, 2013). Ellos presentan una geometría simple, su diseño es mediante la construcción de pozas ovaladas con una separación longitudinal en el centro para mantener homogéneo al cultivo, agitado por una rueda de paleta. Su exposición abierta facilita la incidencia de luz al cultivo (Ponce, 2013). Para el cultivo discontinuo de “espirulina” se ha utilizado el medio Zarrouk diluido, inóculo de 0.40 g/L y biorreactores *raceways* abiertos de 6 L; obtuvieron una tasa de crecimiento específico (μ_x) de 0.138 día⁻¹ y una productividad de biomasa (P_x) de 0.046 g/L/día., durante 60 días (Radmann, et al. 2007). A nivel de planta piloto la producción de la cepa *Spirulina platensis* en el biorreactor *raceway*, construida con fibra de vidrio y agitada con ruedas de paletas, obtiene una producción diaria desde 3 g/m²/día en otoño-invierno y hasta 4 g/m²/día en primavera-verano (Ponce, 2013). La concentración de la salinidad del medio es importante para el crecimiento y contenido de pigmentos, se evidenció en *Spirulina subsalsa* al 9% de salinidad y 14 mmol/L de nitrógeno, se obtiene valores altos de biomasa, pero la presencia de clorofila “a” y la ficocianina mostraron mayores valores a 0% de salinidad, a una temperatura de 30±1 °C, iluminación: 3000 lux, agitación manual y fotoperiodo 12:12, durante 21 días (Romero-Maza et al., 2018).

En la naturaleza, *Arthrospira* se encuentra en lagos tropicales y subtropicales con alta alcalinidad y pH \geq 11, este ambiente extremo inhibe el crecimiento de otros microorganismos y predomina la población de *Arthrospira*; algunos de estos lagos presentan la productividad más alta registrada para cualquier sistema natural; estos requisitos ambientales han hecho que la mayoría de industrias se ubiquen en regiones tropicales y subtropicales del mundo donde la intensidad y la duración de la irradiación y la temperatura son altas para permitir la producción durante todo el año. Un requisito esencial para la producción también es la precipitación mínima y los climas secos y calurosos también producen altas tasas de evaporación, esto necesita reemplazos de agua constantemente (Richmond y Hu 2013). La productividad de biomasa de espirulina depende de la cepa utilizada, buen manejo del cultivo, nutrición adecuada y la incidencia de la luz solar, estos factores hacen que el proceso final de biomasa seca de espirulina (materia prima) obtenida aumente y favorezca los recursos económicos y/o crecimiento de las instalaciones. Para la producción y uso es necesario optimizar sus requerimientos nutricionales, adaptabilidad, condiciones de operación en el biorreactor y recuperación del

producto para obtener la máxima tasa de producción de “espirulina” en el cultivo en masa al aire libre (Vonshak, 1997).

Para medir la productividad de *Arthrospira platensis* “espirulina” en el estudio, esta fue llevada diariamente recogiendo un volumen determinado del cultivo (100 mL), obteniendo una concentración de biomasa seca de espirulina, mediante el método gravimétrico, usando un sistema de filtración al vacío y luego llevado a realizar el peso seco (g/L).

Vonshak (1987) identificó cinco criterios de selección para la utilización de *Arthrospira* en cultivos en masa: (1) resistencia a la fotoinhibición, (2) bajas tasas de respiración oscura, (3) tolerancia a altas concentraciones de oxígeno disuelto, (4) tolerancia a un amplio rango de condiciones de temperatura y (5) tolerancia a altas concentraciones de sal. A estos se puede agregar (a) tolerancia al esfuerzo de corte, (b) tolerancia a un amplio rango de pH y alcalinidad, (c) eficiencia de utilización de nutrientes, (d) cosechabilidad (relacionada con el tamaño del tricoma) y (e) compatibilidad con el agua a utilizar (agua de pozo o residual). Es difícil obtener cepas que cumplan con todos los criterios anteriores, pero algunas tienen una elasticidad fisiológica y morfológica que ayuda a su aclimatación o adaptación a estas condiciones a lo largo del tiempo. En la naturaleza, las especies de *Arthrospira* existen en un amplio rango de pH, alcalinidad y salinidades, lo que sugiere que hay aclimatación a estos ambientes. En Ica y Pisco, se aislaron dos cepas de *A. platensis* una de la laguna de Orovilca y otra de Paracas (siendo este objeto de estudio), fueron reportadas en 1980 y 1993 respectivamente, por el investigador Ripley D. Fox (Fox, 1999).

La “espirulina” es una cianobacteria que por su alto contenido nutricional es utilizada para la alimentación, puede ayudar a reducir la desnutrición para aquellas personas de bajos recursos económicos presentes en nuestro país. La nutrición y la alimentación son temas de prioridad en el Perú, el indicador de desnutrición descendió de 5.3% en 2009 a 3.9% en 2019 y en el primer semestre del 2020 fue de 3.4%, 0.5 puntos porcentuales menor que en el mismo periodo del 2019 (INS, 2020). La organización mundial de la salud (OMS) ha confirmado que la espirulina representa un alimento interesante por múltiples razones, no necesita tierra fértil para el cultivo y por lo tanto conserva tierra y suelo fértiles; tiene más del 60% de proteínas que es la más alta que cualquier otro alimento, además de los beneficios de un crecimiento rápido y mayor rendimiento. Es un gran productor de oxígeno que es incluso más eficiente que los árboles y los bosques (IIMSAM, 2014).

Las ventajas del uso de sistemas abiertos es poco control y menor gasto en personal, si bien no están eficiente, son los de menor costo comparados con otros, estas son más utilizadas en la producción de biomasa de cianobacterias. De hecho, la elección de un biorreactor abierto depende mucho de los factores, como la especie a cultivar, el metabolito a producir y el diseño del equipo, radiación solar eficiente, nutrientes esenciales y una correcta homogenización del cultivo.

El propósito de la investigación es proporcionar información relevante sobre la producción de biomasa seca de espirulina de las dos cepas aisladas en la región, así como determinar cuál de ellas tiene un mejor crecimiento y calidad nutricional, conocer los métodos de recuperación, secado y empaque, y poner en servicio para la producción industrial a escalas superiores tanto local como nacional; asimismo, ser pioneros en la producción de proteína de origen microbiano: Para ello, es necesario determinar ¿Con cuál de las cepas *A. platensis* Orovilca o *A. platensis* Paracas se obtiene la mayor productividad de biomasa en el biorreactor tipo *raceways*?, para ello se planteó los siguientes objetivos: determinar la curva de crecimiento de las cepas en estudio, evaluar la adaptabilidad morfológica de las cepas, evaluar la productividad superficial y volumétrica, en la obtención de biomasa de los biorreactores tipo *raceway*, determinar y cuantificar la presencia de pigmentos de las cepas. Se formula la hipótesis nula que las cepas Orovilca y Paracas bajo las condiciones del experimento se comportan iguales en el desarrollo y producción de biomasa en el biorreactor *raceways*.

II. ESTRATEGÍA METODOLÓGICA

2.1. MATERIAL BIOLÓGICO.

2.1.1. Población de estudio: se utilizó la cianobacteria *Arthrospira platensis* “espirulina”.

2.1.2. Muestra de estudio: se empleó las cepas *A. platensis* Orovilca y *A. platensis* Paracas (ver Anexo, Figura 13), ambas aisladas de Ica y Paracas, respectivamente, reportadas por Ripley D. Fox donadas para la investigación, por el Instituto del Mar del Perú (IMARPE) (ver Anexos, Figura 14). Las evaluaciones de crecimiento y producción de *A. platensis* se desarrolló en el mes de junio del 2018 en las instalaciones de la empresa Alimenta Algae S.A.C, ubicada en las coordenadas geográficas 14° 08' 46.8" S - 75° 37' 49.7" W. El diseño de investigación es de tipo experimental.

2.2. PROCEDIMIENTOS METODOLÓGICOS

2.2.1. Reactivación, mantenimiento y traspase de las cepas:

a. Reactivación.

Las cepas *A. platensis* Orovilca y *A. platensis* Paracas fueron reactivadas por duplicado en tubos de 15 mL, conteniendo 5 mL de inóculo y 5 mL de “Medio Espirulina Modificado – MEM” (ver Anexo, Tabla 6 y Tabla 7), agitados de forma cuidadosa cada 24 horas y expuestos en forma directa a una fuente de luz en forma continua con lámparas LED de 18 watts a 2.5 Klx, a 30 ± 2 °C; las cepas se mantuvieron en las mismas condiciones por espacio de 7 a 10 días, hasta obtener un denso crecimiento y características de viabilidad (Madkour et al, 2012).

b. Mantenimiento y traspase.

Se llevó a cabo desdoblado y traspasando los inóculos (cepa reactivada) a tubos de vidrio de mayores volúmenes (ver Anexo, Figura 15); los cultivos deben de ser mantenidos en forma axénica, controlando los mismos parámetros mencionados en la etapa anterior.

El inóculo reactivado (10 mL), se procedió a realizar el traspase iniciando en tubos de 25 mL y 50 mL con 20 mL y 40 mL de inóculo respectivamente; y finalizando en matraces de 250 mL, agregando 40 mL de inóculo y luego de manera progresiva 40 mL de MEM, hasta obtener un total de 200 mL de inóculo. A la par del proceso se colocó el sistema de aireación; esto conlleva a que el inóculo se vaya

adaptando a los futuros procesos de transferencia y escalamiento a volúmenes mayores.

2.2.2. Cultivos de *A. platensis* “espirulina”:

a. A nivel laboratorio.

Las condiciones en esta etapa de crecimiento para los inóculos son axénicas y en sistemas cerrados, con parámetros controlados como luminosidad mediante lámparas LED de 18 Watts y aireación, con una compresora de 50 kW; transfiriendo el inóculo a traspases sucesivos hasta llegar a volúmenes mayores (800 mL, 2.5 L, 7 L y 18 L) a nivel de laboratorio (ver Anexo, Figura 16), se utilizó “medio base”, que es el medio de mayor cantidad en el cultivo (ver Anexo, Tabla 8) y “medio mix de oligo-micronutrientes” que brinda los elementos trazas importantes en el crecimiento de la espirulina (ver Anexo, Tabla 9) preparado con agua osmotizada y blanda; la fórmula que se aplicó para determinar el volumen de inóculo es el siguiente:

$$V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

Donde:

V_1 : volumen inicial del inóculo.

C_1 : concentración inicial del inóculo.

V_2 : volumen final del inóculo.

C_2 : concentración final del inóculo.

La C_1 es de 0.5 – 0.6 g/L; y C_2 es de 0.15 – 0.20 g/L, aproximado.

b. Adaptación en medio externo.

Se realizó escalamientos de los inóculos a mayores volúmenes de forma ascendente (40 L, 250 L, 600 L y 1500 L), los cultivos se establecieron en sistemas abiertos para su adaptación, con iluminación directa del sol, se le inyecta oxígeno con la ayuda de una compresora de 50 kW y luego con un soplador industrial (Pumpower) para los volúmenes mayores (ver Anexo, Figura 17); Se utilizó el medio base preparado con agua dura (agua de pozo), el volumen de inóculo se determina con la fórmula mencionada anteriormente para una C_2 de 0.24 – 0.30 g/L, aproximado.

2.2.3. Producción de *A. platensis* de las cepas Orovilca y Paracas:

a. Biorreactores raceways.

El biorreactor *raceway* se construyó en un área externa colindante al laboratorio, de material de concreto armado y revestido con geomembrana de 15 m² (para cubrir las pozas); con una altura de 30 cm y una separación longitudinal (baffle o isleta), hecho de madera de 2 m

de largo y 25 cm de ancho; agitado mediante paletas de madera y acoplada a un motorreductor trifásico; se muestra un prototipo de biorreactor *raceway* industrial en Anexo, Figura 18.

Se instaló dos biorreactores *raceways*, cada uno con sus dos pozas experimentales (ver Anexo, Figura 19), para la cepa Orovilca las pozas experimentales 6C y 6D, mientras para la cepa Paracas 6G y 6H.

b. Inoculación y funcionamiento del biorreactor *raceway*

Para iniciar el proceso de producción en los biorreactores *raceways* fueron desinfectados con una solución de hipoclorito de calcio $\text{Ca}(\text{ClO})_2$, enjuagados con abundante agua y secados al sol.

Se inóculo para cada poza experimental 600 L de inóculo + 600 L de medio base, llevando a un volumen final de 1200 L para cada una de ellas. Al inicio del proceso se cubre con una malla raschel verde para dar un 75% de sombra a todas las pozas experimentales, esto brinda reducir la radiación solar y mejorar la adaptación al nuevo medio, después de 10 días se retira gradualmente la malla raschel dado que el cultivo se ira adaptando al sistema y el medio ambiente.

Los biorreactores *raceways* funcionaron todo el día y en las noches se apaga el sistema, la agitación debe ser constante con un promedio de velocidad de 30-50 cm/s.

2.2.4. Evaluación de los cultivos:

a. Parámetro físico-químico.

Los parámetros fueron evaluados desde el inicio de la inoculación, adaptación, crecimiento y productividad, todo esto llevado en las cuatro pozas experimentales 6C, 6D, 6G y 6H.

- Los parámetros físicos evaluados son: la temperatura, evaporación e iluminación, se realizaron diariamente en las mañanas, donde el cultivo recién inicia su metabolismo y fotosíntesis.
- Las pruebas químicas evaluadas son: pH, salinidad, nitrato, y amoníaco estos análisis se realizaron cada tres días.

b. Cinética de crecimiento

Para la cuantificación del crecimiento de la población de las cepas de *A. platensis* Orovilca y Paracas, se utilizó el método gravimétrico para calcular la concentración o densidad del peso seco en g/L, de la biomasa de “espirulina” de todas las pozas experimentales, los procedimientos se llevaron a cabo de la siguiente manera:

- Se pesó el papel de filtro después de secar dos minutos en el horno microondas.
- Se colocó el papel de filtro en el sistema de filtración y se añadió 100 mL de muestra e iniciar la filtración con la bomba de aspiración (TOMAS Medi-Pump).
- Se colocó el papel de filtro con biomasa húmeda filtrada en la estufa por 1h a 105 °C.
- El filtrado se guardó para ser cuantificado más adelante para pruebas químicas.
- Finalmente se pesó y realizo los cálculos:

Biomasa seca “n” = peso final (papel de filtro + biomasa seca) – peso inicial (papel de filtro seco)

Densidad de biomasa seca (g/L) = [(Biomasa 1 + Biomasa 2) / 2] [1000 / volumen filtrado]

Para determinar la velocidad específica de crecimiento celular se usa la siguiente formula:

$$\mu(\text{g/L/h}) = \frac{\{\ln(N_f - N_0)\}}{(T_f - T_0)}$$

Donde:

μ : velocidad específica de crecimiento.

\ln : logaritmo neperiano.

N_f : concentración final de estudio (g/L)

N_0 : concentración inicial de estudio (g/L)

T_f : tiempo final de estudio.

T_0 : tiempo inicial de estudio.

Para el tiempo de duplicación, la siguiente formula:

$$t_d (\text{h}) = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Donde:

t_d : tiempo de duplicación.

$\ln 2$: logaritmo neperiano de dos.

μ : velocidad especifica de crecimiento.

Para determinar el número de generación, la siguiente formula:

$$n = 3.3 (\text{Log}N_f - \text{Log}N_0)$$

Donde:

n: número de generaciones.

$\text{Log}N_f$: logaritmo de la concentración final de estudio.

$\text{Log}N_0$: logaritmo de la concentración inicial de estudio.

c. Método de Sedgewick-Rafter

En esta prueba se utilizó la cámara de conteo Sedgewick-Rafter, que tiene como objetivo determinar el número de tricomas ondulados y rectos, así como también el porcentaje predominante del número de tricomas en los cultivos de “espirulina” de todas las pozas experimentales; el conteo se realizó en la fase de adaptación (inicio) y fase de crecimiento exponencial (final) de los cultivos, se realizó mediante el siguiente protocolo:

- Se tomó una alícuota directamente del cultivo de espirulina (1 mL) y luego se realizó una dilución de 1/10. Se tomó 1 mL de la muestra ya diluida, se carga a la cámara y se coloca el cubreobjetos.
- Se realizó la observación microscópica utilizando un microscopio binocular con un aumento de 100X.
- Se contó una fila de 50 cuadritos del centro de la cámara (conteo representativo).
- El resultado se determinó por número de tricomas ondulados y rectos de la siguiente manera:

$$N^{\circ} \cdot mL^{-1} = (N^{\circ} \text{ de tricomas}) (\text{dilución}) (20)$$

- Se multiplico por la dilución y el número total de cuadros que equivale a 1 mL (50x20).

2.2.5. Evaluación de la productividad

La productividad de biomasa que se obtiene de los biorreactores *raceways* tanto para Orovilca como Paracas, se realizó durante el mes de junio del 2018. Se priorizo una lectura de productividad de pre-cosecha (de mayor consideración por ser un cultivo nuevo) y post-cosecha, se determina mediante dos formas:

a. Productividad superficial.

Se determinó mediante la toma de 100 mL de cultivo cada 24 h y se procede a realizar el método gravimétrico para cuantificar biomasa seca en g/L de todas las pozas expe., siendo el área de los biorreactores *raceways* 6 m² y el volumen de los cultivos es de 1200 L.

Se calculó mediante la siguiente ecuación de productividad superficial:

$$P_x(\text{g/m}^2/\text{día}) = [(X_2 - X_1) (V_c)] / A_{br}$$

Donde:

P_x: productividad superficial de la cepa en estudio.

X₁: concentración del cultivo en el día n.

X_2 : concentración del cultivo en el día $n+1$.

V_c : volumen del cultivo de la cepa en estudio.

A_{br} : área del biorreactor *raceway*.

b. Productividad volumétrica.

Se obtuvo los resultados mediante un factor de conversión (200 L/m²), este factor se halló mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Area} \cdot \text{Altura} = \text{Volumen}$$

Se aplicó en todas las pozas expe., con un área de 1 m² y una altura de 0.20 m, se obtuvo como resultado 200 L de cultivo en 1 m². Se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$P_y(\text{g/L/día}) = P_x / 200 \text{ L/m}^2$$

Donde:

P_y : productividad volumétrica de la cepa en estudio.

P_x : productividad superficial de la cepa en estudio.

200 L/m²: factor de conversión.

2.2.6. Obtención de biomasa seca

El proceso de cosecha de “espirulina” se realizó el día 19 para la cepa de Orovilca y Paracas el día 20 de las pozas expe. 6C y 6G respectivamente, según la metodología de (Rojas et al, 2012), donde se considera una cosecha parcial (50%). Se consideró la concentración a cosechar entre los rangos de 0.6 – 0.7 g/L, que representa a un cultivo saturado, óptimo para realizar la cosecha. Se dividió el proceso en cuatro etapas, estos son:

a. Filtración o Cosecha.

En esta etapa se eliminó el 10 % del líquido intersticial de la espirulina. Antes de realizar la filtración se calculó la cantidad necesaria a cosechar de biomasa seca mediante las siguientes fórmulas:

$$V_{ci}(\text{L}) = V_c - [(D_f \cdot V_c) / D_i]$$

$$P_c(\text{g}) = K \cdot V_{ci}$$

$$V_a(\text{L}) = P_c / D_i$$

$$V_{ct}(\text{L}) = V_a + V_{ci}$$

Donde:

V_{ci} : volumen de cosecha inicial.

P_c : pérdida de cosecha.

V_a : volumen de ajuste.

V_{ct} : volumen de cosecha total.

V_c : volumen del cultivo de la cepa en estudio.

D_f : densidad final.

D_i: densidad inicial.

K: constante por pérdida de biomasa al filtrar la cepa en estudio (Orovilca) 0.028 g/L y Paracas 0.050 g/L).

El proceso de filtrado se aplicó de la siguiente manera:

- Se efectuó por gravedad a través de una tela sintética de poliéster *ponguee* de aproximadamente 100 µm de poro, se colocó encima de un bastidor de madera y se realizó el filtrado en las mismas pozas experimentales (ver Anexo, Figura 20).
- Antes de ser filtrado el cultivo se pasó por un tamiz de 500 µm, para eliminar cualquier cuerpo extraño como: insectos, rastros, aglomeraciones de tricomas.
- Después del filtrado la biomasa fresca es colocada en un recipiente desinfectado.

b. Prensado.

En esta etapa se eliminó el 75 % del líquido intersticial de la “espirulina”, al finalizar el exprimido o prensado se obtiene una bola de biomasa fresca llamada “torta”, los siguientes pasos que se realizó son los siguientes:

- La biomasa fresca se colocó en un *ponguee* y se envolvió dos veces, con el objetivo de que filtrado sea de mayor eficiencia.
- Luego se llevó dentro de una canastilla, para aplicarle un peso, la presión necesaria debe ser $\geq 2 \text{ kgf/m}^2$ durante 20 minutos para eliminar el agua intersticial.
- Se obtuvo la “torta” que es suficientemente consistente y factible para el pelletizado (ver Anexo, Figura 21).

c. Pelletizado.

Se realiza mediante una bolsa de polietileno de aluminio laminado y el producto final de este proceso se llama “pellets”, los pasos a seguir son los siguientes:

- La bolsa de polietileno se corta en una de sus esquinas inferiores, el tamaño del agujero es de 2 mm \varnothing .
- La torta se colocó dentro de la bolsa.
- Se aplicó una presión manual sobre la bolsa y se obtuvo los “pellets” cilíndricos de 2 mm \varnothing en promedio, luego se esparció sobre una bandeja del deshidratador de alimentos (ver Anexo, Figura 22).

d. Secado.

Es la última etapa donde se obtiene la biomasa seca libre de agua y se reduce la presencia de cualquier agente patógeno, sin degradar las propiedades alimenticias de la “espirulina”.

- En las bandejas fueron esparcidas uniformemente los “pellets”, seguidamente se llevó al deshidratador de alimentos (EXCALIBUR).
- El deshidratador se calibró a una temperatura promedio de 55 °C por 24 horas.
- Los “pellets” secos, fueron recogidos de inmediato en bolsas de polietileno de aluminio laminado.

2.2.7. Análisis de pigmentos.

Es la etapa final del proceso, se procedió a cuantificar los pigmentos de la biomasa seca de espirulina (pulverizada), tanto para la cepa Orovilca como Paracas, entre ellas la ficocianina, clorofila “a” y carotenoides. A continuación, se realizó el protocolo estandarizado para cada una de ellas:

a. Ficocianina.

Se realizó la extracción mediante la ayuda de tres protocolos, según (Cabranes et al, 2000; Romero et al, 2017 y Strickland y Parsons, 1972):

- Se preparó un buffer de fosfato a 100 mM a un pH de 7.
- Se pulverizó los “pellets” de biomasa seca en un mortero de porcelana y luego se pesa 20-30 mg en promedio.
- Con la ayuda de la termobalanza (OHAUS®) se determinó el porcentaje de humedad de la biomasa seca pulverizada.
- Se agregó la biomasa seca pulverizada “muestra” a un tubo de vidrio de centrifuga previamente cubiertas con papel aluminio y se añade 9 mL de buffer fosfato.
- En el área de trabajo se colocó hielo en un beaker y dentro de este el tubo con la “muestra”, la temperatura estuvo por debajo de 10 °C.
- Se colocó el sonotrodo del sonicador (hielscher Ultrasound Technology) dentro de la “muestra” y se realizó la sonicación (50 KHz), durante 15 minutos, se agrega hielo cuando la temperatura sobrepasa los 10 °C.

- La muestra sonicada se guardó en la refrigeradora (SAMSUNG) por un periodo de 12 horas.
- Después de haber pasado las 12 horas se retiró la muestra de la refrigeradora y se aplicó vortex por 10 segundos. Todo este proceso se lleva a cabo en absoluta oscuridad y la “muestra” en una temperatura de ≤ 10 °C.
- Luego se centrifugó durante 15 minutos a 3200 RPM (centrífuga Thermo Scientific TM).
- Seguidamente se tomó el sobrenadante del tubo y se dejó el sedimento, previamente se preparó el buffer de fosfato como blanco, para la lectura en el espectrofotómetro.
- Al finalizar el proceso se realizó la lectura de absorbancia de cada replica a 620 nm, y luego se calculó mediante la ecuación para C-ficocianina de (Strickland y Parsons, 1972):

$$\% \text{ C - Ficocianina pura} = [(A_{620})(V)(100)] / [(7.3)(\text{biomasa seca en mg})(\% \text{ peso seco})]$$

$$\% \text{ C - Ficocianina pura} = [(A_{620})(V)(100)] / [(3.39)(\text{biomasa seca en mg})(\% \text{ peso seco})]$$

Donde:

A₆₂₀: absorbancia de la muestra.

V: volumen de la muestra sonicada.

100: representa el 100 %.

7.3: coeficiente de extinción de CPC a 620nm.

3.39: coeficiente de extinción de CPC a 620 nm.

b. Clorofila “a” y carotenoides.

El protocolo de extracción se realizó según los métodos y protocolos propuestos por (Rosas, 2007; Romero et al, 2017 y Strickland y Parsons, 1972):

- Se preparó acetona al 80% diluida en agua destilada.
- Se pulverizó los “pellets” de biomasa seca en un mortero de porcelana y luego se pesó 20-30 mg en promedio.
- Luego se agregó la biomasa seca pulverizada a un tubo de vidrio de centrifuga previamente cubierta con papel aluminio y se añadió 5 mL de acetona al 80%.
- Se colocó hielo en un beaker, dentro de esté el tubo con la “muestra”, la temperatura se mantuvo por debajo de los 10 °C.

- Luego se colocó el sonotrodo dentro de la “muestra” y se realizó la sonicación (50 Khz), durante 15 minutos; se agregó hielo cuando la temperatura sobrepasa los 10 °C.
- Se aplicó vortex por 10 segundos, todo este proceso se lleva a cabo en total oscuridad y la muestra a una temperatura menor de 10 °C. A continuación, se centrifugó durante 15 minutos a 3200 rpm.
- Se recogió el sobrenadante en un tubo limpio, luego se agregó 3 mL de acetona al 80 % en el tubo con la “muestra” dentro, se aplicó de nuevo vortex y centrifugación, para finalizar esta etapa se agregó 2 mL de acetona y se centrifugó por tercera vez.
- Para los carotenoides totales se realizó lectura de absorbancia a 480 nm y 510 nm, se utilizó como blanco la acetona al 80%.
- Finalizado el proceso se calcula el porcentaje de clorofila “a” (ug/L) y carotenoides (ug/L), mediante la ecuación de Clorofila “a” y Carotenoides de (Strickland y Parsons,1972):

$$\text{Clorofila "a"} = [(11.85 \times \text{Abs}_{664}) - (1.54 \times \text{Abs}_{647}) - (0.08 \text{Abs}_{630})] (\text{FD})$$

$$\% \text{ Clorofila} = \{[(\text{clorofila})(V) / (\text{biomasa seca en mg})] (\% \text{ peso seco})\} (100)$$

$$\text{Carotenoides} = \{[(7.60) (\text{Abs}_{480})] - [(1.49) (\text{Abs}_{510})]\} (\text{FD})$$

$$\% \text{ Carotenoides} = \{[(\text{Carotenoides}) (V) / (\text{biomasa seca en mg})] (\% \text{ peso seco})\} (100)$$

Donde:

A₆₆₄, A₆₄₇, A₆₃₀, A₄₈₀, A₅₁₀: absorbancia de la muestra.

11.85: coef. de extinción de Clorofila *a* 664 nm.

1.54: coef. de extinción de Clorofila *a* 647 nm.

0.08: coef. de extinción de Clorofila *a* 630 nm.

7.60: coef. de extinción de Carotenoides totales *a* 480 nm.

1.49: coef. de extinción de Carotenoides totales *a* 510 nm.

FD: factor de dilución.

2.2.8. Evaluación de estadísticas

Los resultados fueron procesados estadísticamente utilizando media, varianza y prueba t-student para dos poblaciones suponiendo varianzas iguales, para determinar la diferencia significativa de las cepas en estudio.

III. RESULTADOS

3.1. Cinética de crecimiento:

La evaluación se realizó en las cuatro pozas experimentales de los biorreactores *raceways* en g/L, en la etapa de pre-cosecha, al término de 19 días para Orovilca y 20 días a Paracas, como se muestra en las Figuras 1 y 2.

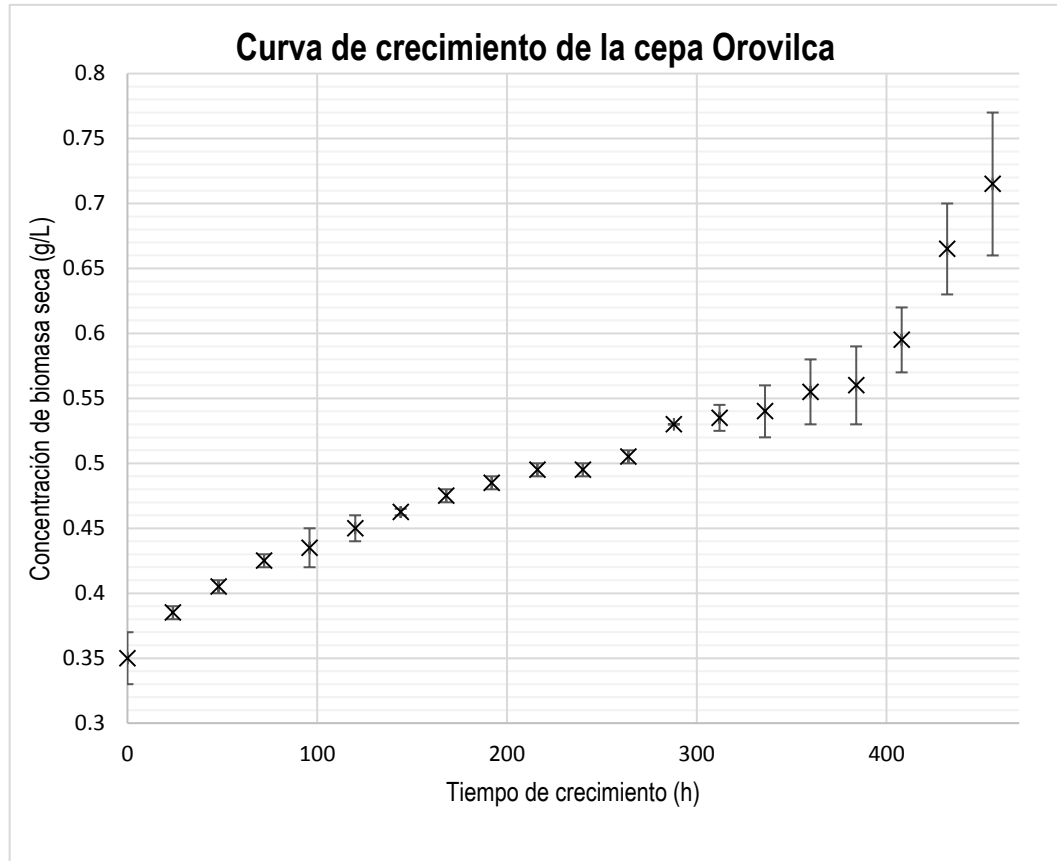


Figura 1. Cinética de crecimiento de *A. platensis* de la cepa Orovilca, en un cultivo de 1200 L. Datos tomados de la etapa de pre-cosecha de las pozas experimentales 6C y 6D, temperatura del medio de cultivo 17 ± 0.5 °C, temperatura ambiental 20.82 °C, pH promedio de inicio 9.39 y final 10.19, promedio máximo niveles de PAR de $1488.62 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Fuente: Anexo, Tabla 10 y Tabla 11.

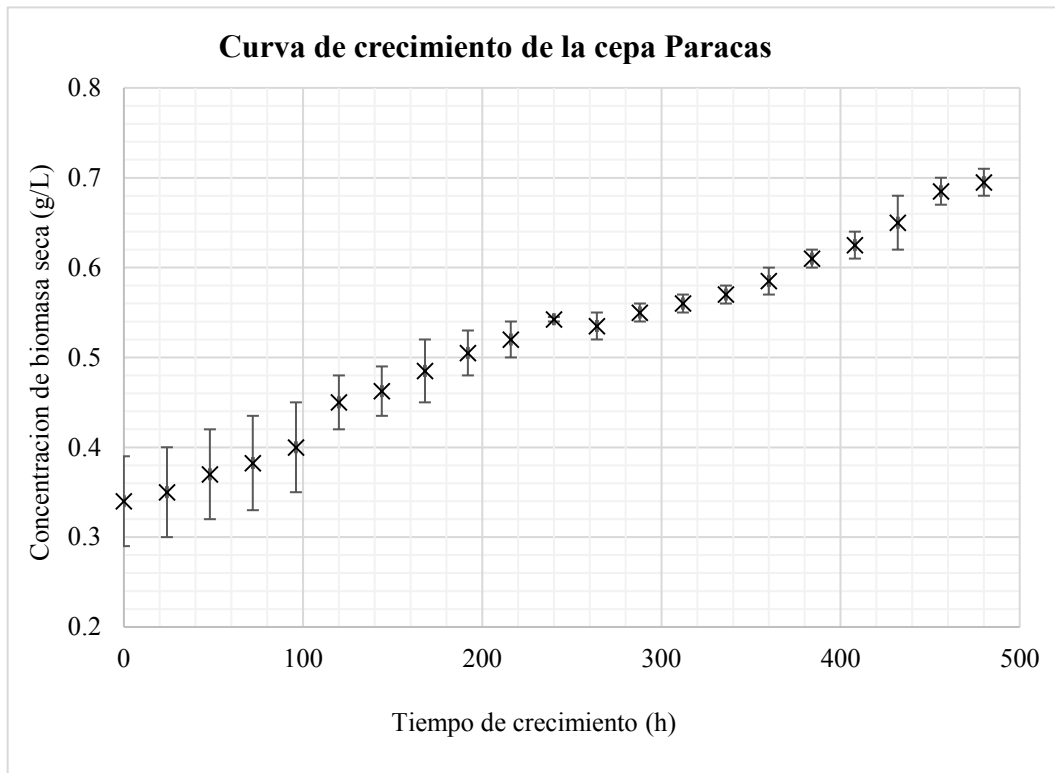


Figura 2. Cinética de crecimiento de *A. platensis* de la cepa Paracas, en un cultivo de 1200 L. Datos tomados de la etapa de pre-cosecha de las pozas experimentales 6G y 6H, temperatura del medio de cultivo 16.5 ± 0.5 °C, temperatura ambiental 20.82 °C, pH promedio de inicio 9.69 y final 10.10, promedio máximo niveles de PAR de $1488.62 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Fuente: Anexo, Tabla 12 y Tabla 13.

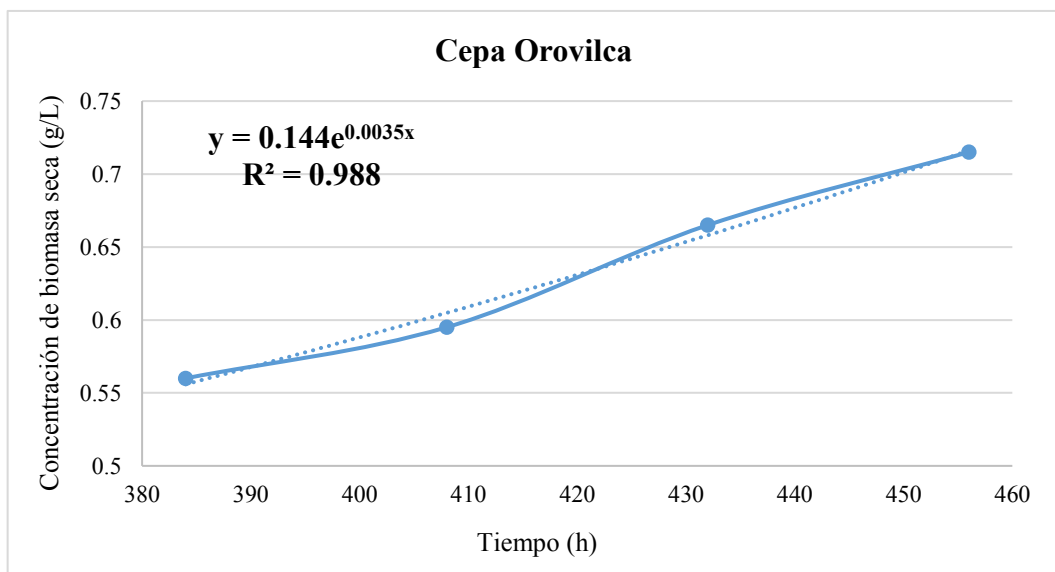


Figura 3. Crecimiento exponencial de la cepa Orovilca, en la etapa de pre-cosecha.

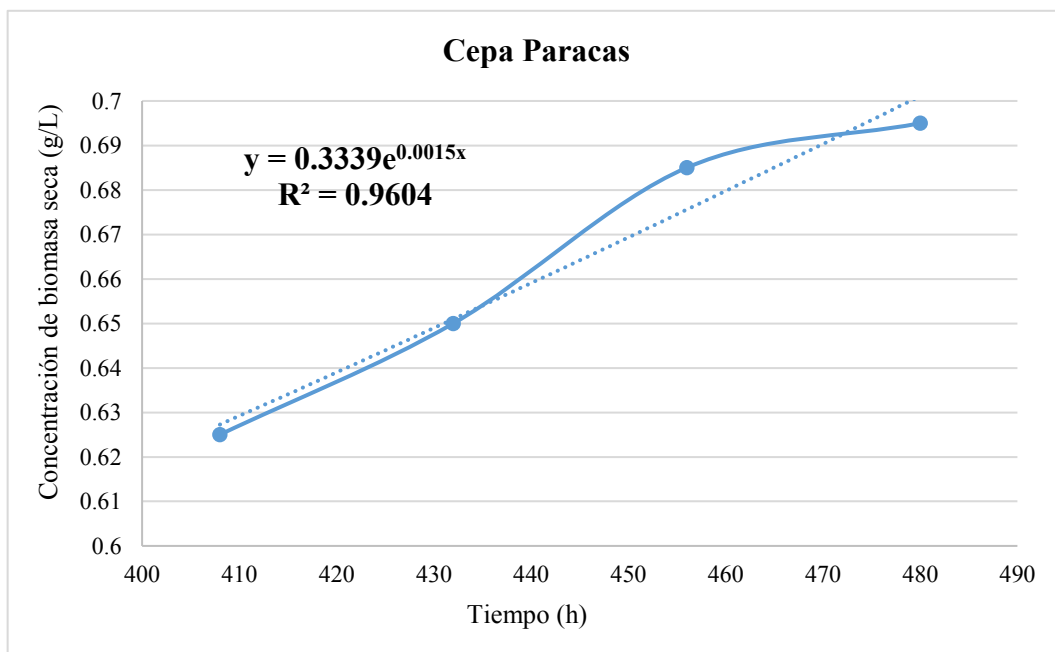


Figura 4. Crecimiento exponencial de la cepa Paracas, en la etapa de pre-cosecha.

Tabla 1. Parámetros de crecimiento de las cepas *A. platensis* Orovilca y *A. platensis* Paracas, durante la productividad de los biorreactores *raceways* en la etapa de pre-cosecha, junio 2018.

| Cepa | Parámetros de crecimiento | | | |
|----------|---------------------------|--------------|--------|-------|
| | μ (g/L/h) | t_d (h) | n | r^2 |
| Orovilca | 0.0035 | 198.04 | 0.1316 | 0.98 |
| Paracas | 0.0015 | 433.22 | 0.0445 | 0.96 |

μ : velocidad específica de crecimiento, t_d : tiempo de duplicación, n: número de generaciones, r^2 : coeficiente de correlación

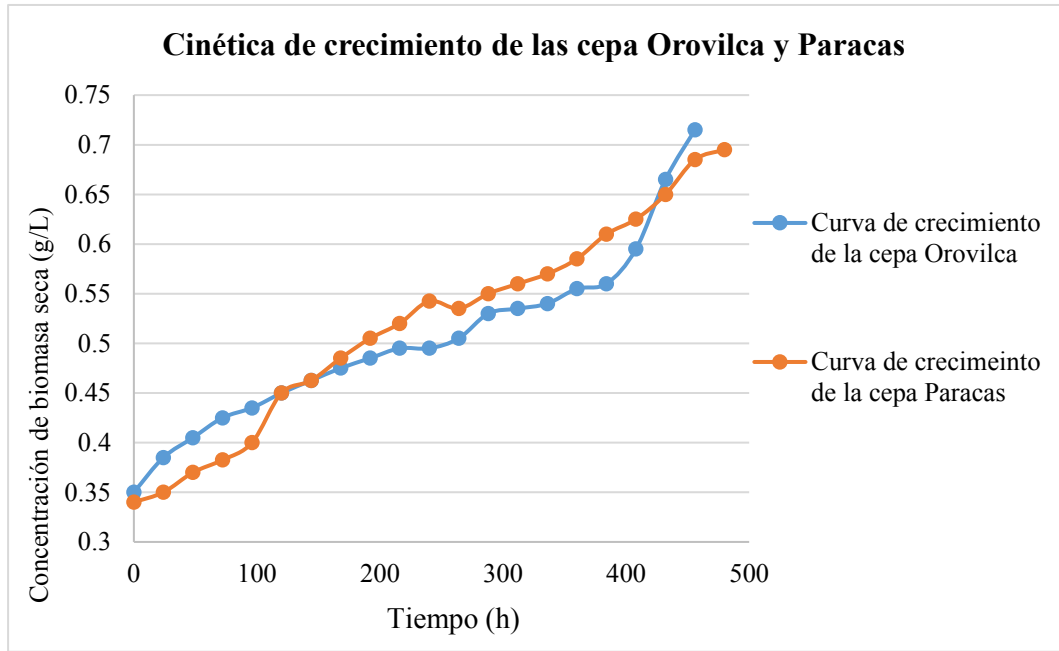


Figura 5. Comparación de cinética de crecimiento de la biomasa seca de las dos cepas en estudio Orovilca y Paracas en los biorreactores *raceways* de un cultivo de 1200 L, monitoreados durante la fase de adaptación y productividad parcial (etapa de pre-cosecha). Fuente: Anexo, Tabla 14.

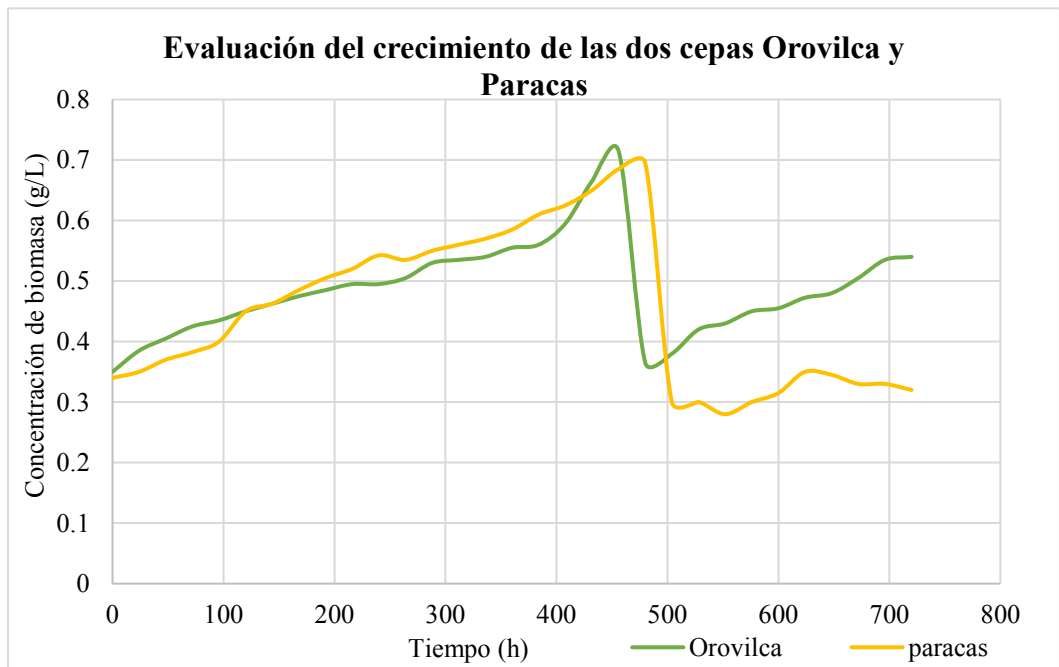


Figura 6. Evaluación del crecimiento y comportamiento de las dos cepas en estudio Orovilca y Paracas dentro de los 30 días de productividad (etapa pre-cosecha y post-cosecha); en los biorreactores *raceways* de un cultivo de 1200 L. Fuente: Anexo, Tabla 14.

3.2. Determinación de adaptación morfológica:

Los siguientes resultados se cuantificó mediante conteo de tricomas en la cámara Sedgewick-Rafter (ver Anexo, Figura 23), tanto al inicio y final del crecimiento de “espirulina”, como se muestra en la Figura 7.

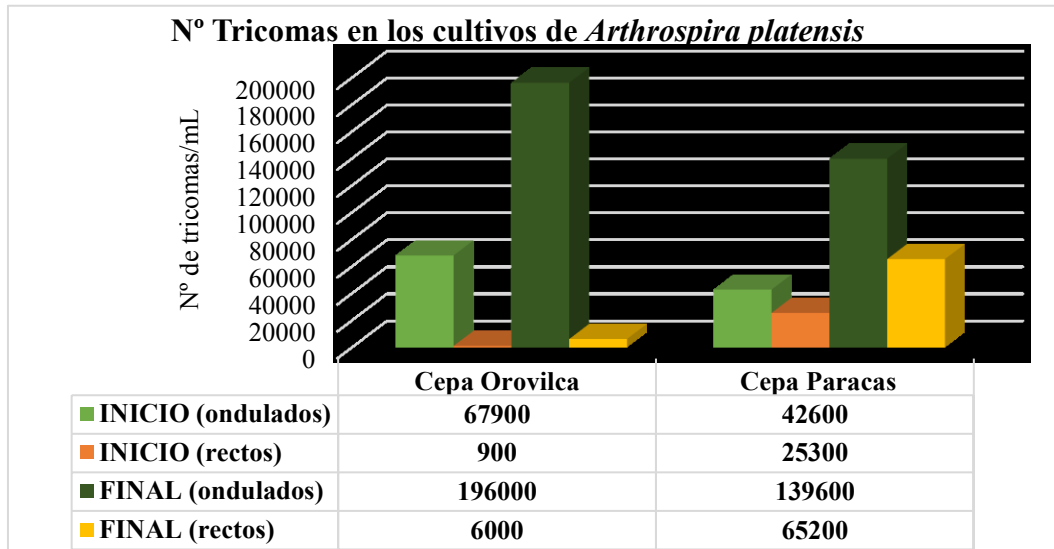


Figura 7. Recuento de tricomas ondulados y rectos de las cepas de *A. platensis* Orovilca y Paracas en los biorreactores *raceways* al inicio del cultivo (día 0) y al final (día 30). Fuente: Anexo, Tabla 15.

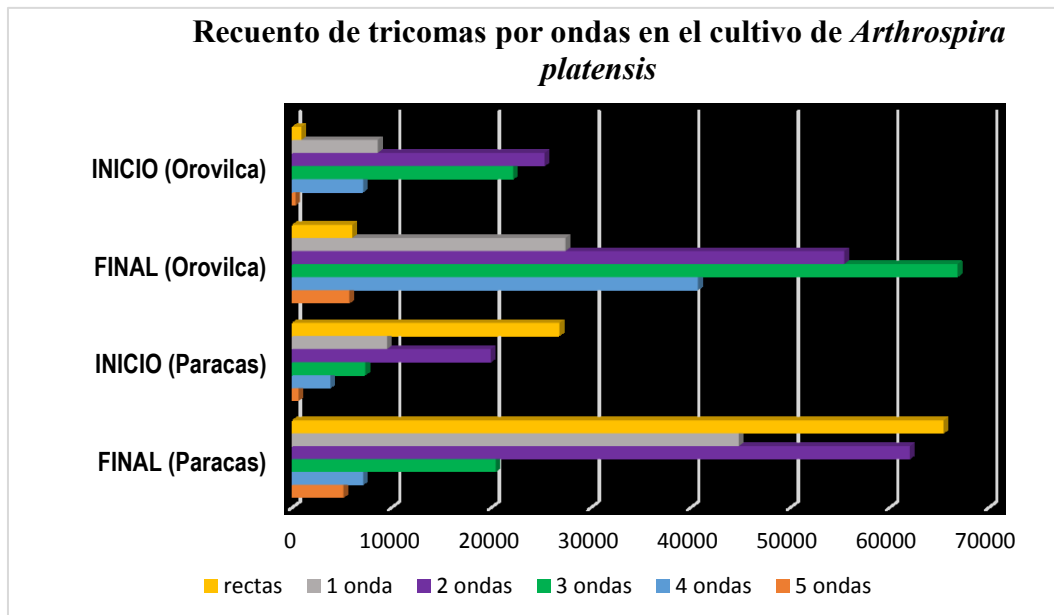


Figura 8. Recuento de tricomas por número de ondas de las cepas de *A. platensis* Orovilca y Paracas en los biorreactores *raceways* al inicio del cultivo (día 0) y al final (día 30). Fuente: Anexo, Tabla 16.

3.3. Determinación de la productividad de biomasa seca:

Se obtuvo del promedio de los duplicados de biorreactores *raceways*, con capacidad de 1200 L del cultivo de las cepas *A. platensis* Orovilca (poza expe. 6C y 6D) y Paracas (poza expe. 6G y 6H) en $\text{g/m}^2/\text{día}$ y g/L/día , respectivamente.

Para la cepa Orovilca, en la primera etapa (pre-cosecha) en el 0 día se inició con una productividad de biomasa seca $7 \text{ g/m}^2/\text{día}$ y de 0.035 g/L/día , hasta el día 19 con una productividad de $10 \text{ g/m}^2/\text{día}$ y 0.05 g/L/día . En la segunda etapa (post-cosecha) se inició con una productividad de biomasa seca de $3 \text{ g/m}^2/\text{día}$ y 0.015 g/L/día , el día 20 y finaliza con una productividad $1 \text{ g/m}^2/\text{día}$ correspondiente del día 29, como se muestra en la Figura 9 y Figura 10.

Para la cepa Paracas, en la primera etapa (pre-cosecha) en el 0 día se inició con una productividad de biomasa seca $2 \text{ g/m}^2/\text{día}$ y 0.01 g/L/día , hasta el día 20 con una productividad de $2 \text{ g/m}^2/\text{día}$. En la segunda etapa (post-cosecha) se inició con una productividad de biomasa seca de $0 \text{ g/m}^2/\text{día}$ y 0.0 g/L/día , el día 21 y finaliza con una productividad $-2 \text{ g/m}^2/\text{día}$ correspondiente al día 29, como lo muestra la Figura 11 y Figura 12.

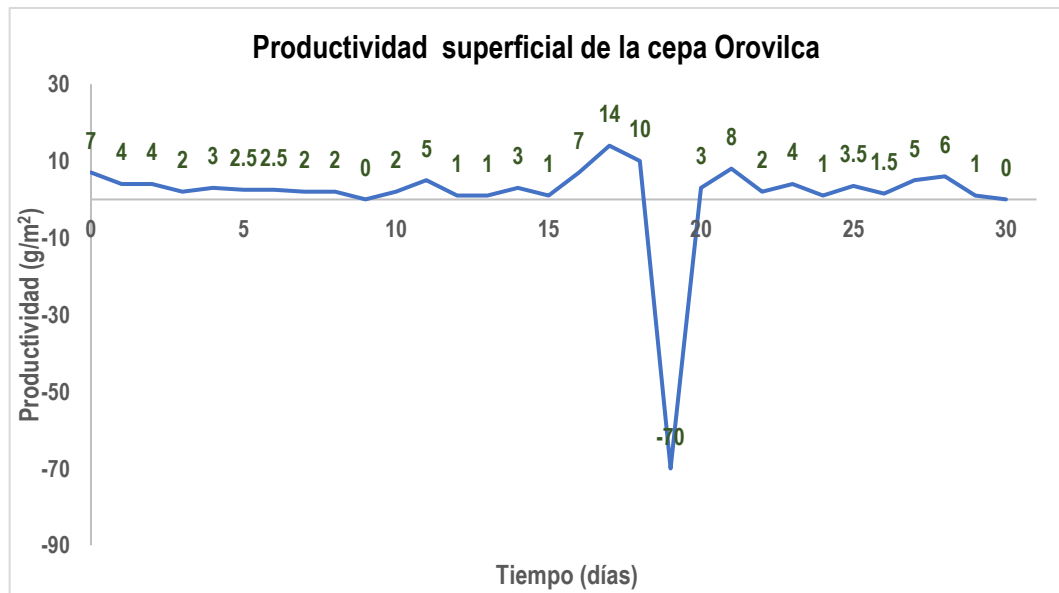


Figura 9. Determinación de la productividad de biomasa seca superficial de la cepa *A. platensis* Orovilca en un cultivo de 1200 L durante los 30 días de estudio (pre-cosecha y post-cosecha), en el biorreactor *raceway*. Fuente: Anexo, Tabla 17.

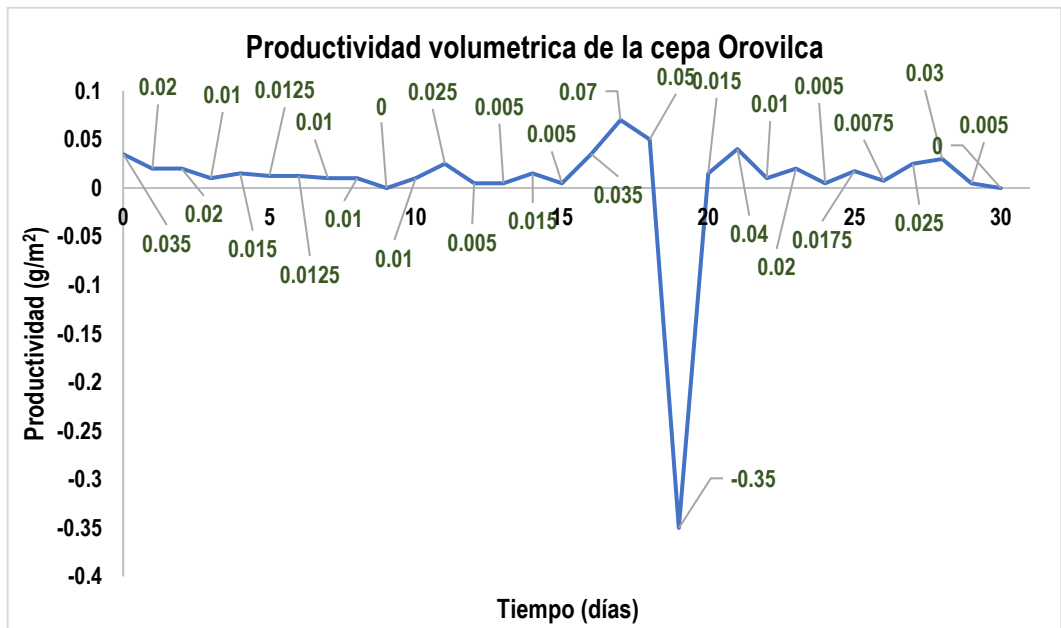


Figura 10. Determinación de la productividad de biomasa seca volumétrica de la cepa *A. platensis* Orovilca en un cultivo de 1200 L durante los 30 días de estudio (pre-cosecha y post-cosecha), en el biorreactor *raceway*. Fuente: Anexo, Tabla 17.

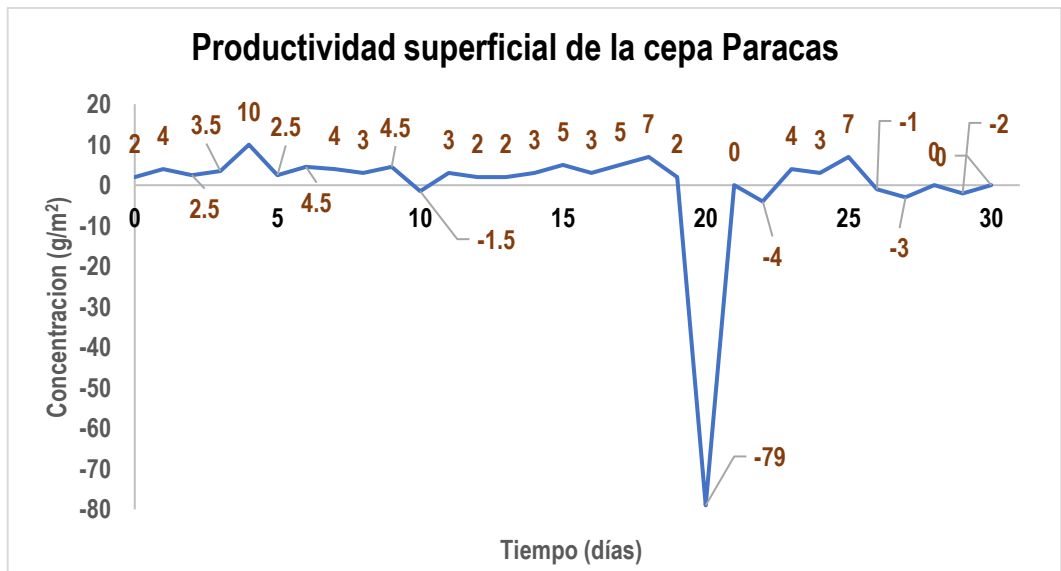


Figura 11. Determinación de la productividad de biomasa seca superficial de la cepa *A. platensis* Paracas en un cultivo de 1200 L durante los 30 días de estudio (pre-cosecha y post-cosecha), en el biorreactor *raceway*. Fuente: Anexo Tabla 18.

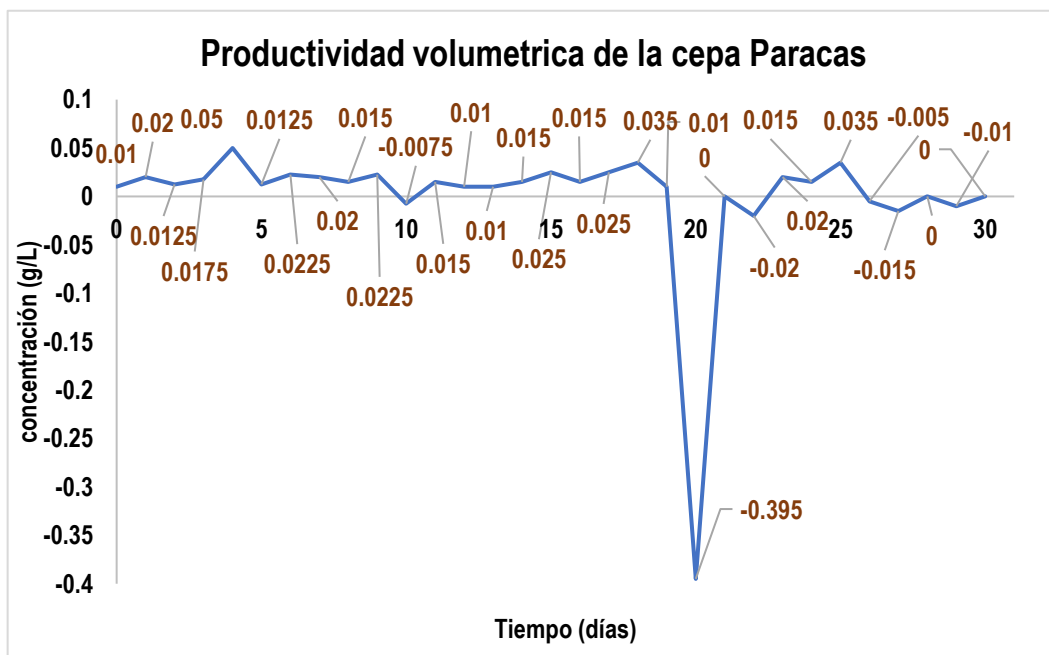


Figura 12. Determinación de la productividad de biomasa seca volumétrica de la cepa *A. platensis* Paracas en un cultivo de 1200 L durante los 30 días de estudio (pre-cosecha y post-cosecha), en el biorreactor *raceway*. Fuente: Anexo, Tabla 18.

Tabla 2. Productividad superficial y volumétrica en la etapa pre-cosecha y post-cosecha de los cultivos de la cepa *A. platensis* “espirulina” Orovilca y Paracas, en el biorreactor *raceway*, junio 2018.

| CEPA | Px (g/m ² /día)* | | $\bar{P}x$ | Py (g/L/día)** | | $\bar{P}y$ |
|----------|-------------------------------|--------------|------------|------------------|--------------|------------|
| | Pre-cosecha | Post-cosecha | | Pre-cosecha | Post-cosecha | |
| Orovilca | 3.8421 | 3.5000 | 3.6711 | 0.0358 | 0.0390 | 0.0374 |
| Paracas | 3.5500 | 0.4444 | 1.9972 | 0.0178 | 0.0022 | 0.0100 |

* Px : Productividad de biomasa seca superficial de la cepa en estudio.

** Py : Productividad de biomasa seca volumétrica de la cepa en estudio.

P ($t < 2.92$) $t_{\text{evaluado}} 1.66$, $\alpha=0.05$

3.4. Obtención de biomasa seca:

Tabla 3. Cálculos de concentración de biomasa seca (g/L) a cosechar, del cultivo de la cepa *A. platensis* “espirulina” Orovilca y Paracas, del biorreactor *raceway*. junio 2018.

| CONCENTRACIÓN DE LOS CULTIVOS | | | | |
|-------------------------------|-------------------------|-----------------------------|---------------------------|-------------------------------|
| Cepa | Volumen del cultivo (L) | Concentración inicial (g/L) | Concentración final (g/L) | Concentración cosechada (g/L) |
| Orovilca | 1200 L | 0.72 | 0.34 | 0.38 |
| Paracas | 1200 L | 0.70 | 0.32 | 0.38 |

Tabla 4. Biomasa seca obtenida en (g) de los cultivos de las cepas *A. platensis* “espirulina” Orovilca y Paracas, del biorreactor *raceway*. Junio 2018.

| BIOMASA SECA * | | | |
|----------------|-------------------------|-------------------------|------------------------------|
| Cepa | Volumen de cosechar (L) | Rendimiento teórico (g) | Rendimiento experimental (g) |
| Orovilca | 655 | 468 | 391 |
| Paracas | 694 | 482 | 369 |

* Se obtiene mediante la fórmula de filtrado.

3.5. Análisis de pigmentos:

A partir de la biomasa seca del cultivo de *A. platensis* cepa Orovilca y Paracas se obtuvieron los resultados de ficocianina, clorofila “a” y carotenoides (ver Anexos, Figura 28), como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Determinación cuantitativa de los pigmentos de la cepa *A. platensis* “espirulina” Orovilca y Paracas. Llevado a cabo en junio del 2018.

| PIGMENTOS | CEPA | |
|-----------------------|----------|---------|
| | Orovilca | Paracas |
| % C-Ficocianina pura | 10.1047 | 2.5990 |
| % C-Ficocianina cruda | 21.7576 | 5.5968 |
| Clorofila “a” (ug/L) | 11.1660 | 4.4112 |
| % Clorofila | 0.5565 | 0.2165 |
| Carotenoides (ug/L) | 10.0205 | 6.6102 |
| % Carotenoides | 0.4993 | 0.3247 |

Fuente: Anexos, Tabla 19, Tabla 20 y Tabla 21.

IV. DISCUSIÓN

Los valores de productividad del cultivo de *A. platensis* mayormente son reportados de cultivos en laboratorios con condiciones estándares y de biorreactores cerrados, basado en el uso de tubos bioespirales y fotobiorreactores (Henrikson, 1994; Vonshak, 1997) y pocos son de biorreactores abiertos, que son sistemas artificiales o estanques al aire libre (Pedraza, 1989; Richmond y Hu, 2013). La presente investigación aporta con resultados obtenidos utilizando biorreactores abiertos tipo *raceways*.

La velocidad específica de crecimiento (μ_x) que se muestra es el resultado de los cultivos de *A. platensis* “espirulina” Orovilca y *A. platensis* Paracas, desarrollados en los biorreactores *raceways*, en cuatro pozas experimentales 6C y 6D para la cepa Orovilca y 6G y 6H para la cepa Paracas. A partir de los valores promedios de crecimiento por hora se obtuvieron las velocidades de crecimiento (ver Anexos, Tabla 5 y Tabla 6), se determinó que la cepa Orovilca mostró una μ_x de $0.0035 \text{ (g/L) h}^{-1}$, mientras la cepa Paracas una menor μ_x con $0.0015 \text{ (g/L) h}^{-1}$, con un tiempo de duplicación de 182.40 h y 433.22 h respectivamente. Se ha documentado la obtención de valores mayores de μ_x de $0.0056 \text{ (g/L) h}^{-1}$, $0.0048 \text{ (g/L) h}^{-1}$ y $0.0058 \text{ (g/L) h}^{-1}$, obteniendo una concentración de biomasa de hasta 0.45 g/L (Radmann et al, 2007). Asimismo, se han obtenido valores de μ_x de *A. platensis* entre 0.012 y $0.034 \text{ (g/L) h}^{-1}$ (Çelekli et al, 2009), ambos valores superiores a los obtenidos en la presente investigación, debido que utilizaron condiciones (variables y parámetros) controladas a nivel de laboratorio y en biorreactores cerrados.

Las condiciones ambientales como nutrientes, intensidad de luz y pH afectan directamente al crecimiento de los organismos debido a sus requerimientos fisiológicos (Ogbonda et al, 2007). La región Ica tiene condiciones ambientales diversos, como luminosidad, horas luz por día y vientos, que favorece a la cepa Orovilca que fue aislada de la laguna de Orovilca - Ica, no fue igual para la cepa Paracas debido que pertenece a Pisco; condiciones que permite a la célula tener buena adaptación biológica y fisiológica en el medio de cultivo y biorreactor, obteniéndose un adecuado crecimiento celular y productividad. Los cambios de sus características de crecimiento son debido a las diferentes condiciones ambientales (Whitton y Potts, 20). Para evitar problemas de variación de comportamiento por factores ambientales se colocó una malla raschel verde al 75% de sombreado sobre los biorreactores *raceways* al inicio de las evaluaciones, para evitar fotoinhibición o muerte del cultivo, según lo sugerido por Vonshak (1997). También se sugiere el uso de plástico y malla raschel al 50% (Huarachi et al, 2015). Con el tratamiento aplicado se obtuvo resultados favorables presentando un buen crecimiento, adaptación y observándose un color verde en el cultivo (ver Anexos, Figura 24).

Para iniciar el proceso de crecimiento celular en los biorreactores *raceways* se consideró un inóculo en cada una de las pozas experimentales, a una concentración de 0.33 g/L en 6C, 0.37 g/L en 6D, para la cepa Orovilca y 0.29 g/L en 6G y 0.39 g/L en 6H para la cepa Paracas. La determinación de la concentración de biomasa inicial para el proceso es importante porque se evita problemas como fotoinhibición o estrés fisiológico por factores ambientales (Bao et al, 2012). Se menciona que la concentración debe ser de 0.3 g/L para dar inicio al crecimiento del cultivo, el uso de densidades bajas de biomasa, son más susceptibles a la inhibición por amoníaco (Madkour et al, 2012). Entre los principales factores limitantes del crecimiento de “espirulina” bajo condiciones ambientales, es la excesiva radiación solar (Huarachi et al, 2015), debido a que la radiación ultravioleta disminuye la tasa fotosintética, su crecimiento y daña el ADN (Ma y Gao, 2009).

La temperatura óptima de crecimiento de “espirulina” para una buena fotosíntesis están entre los rangos de 25 - 28 °C (Richmond y Hu, 2013; Vonshak, 1997), dicha temperaturas no se registraron en el presente estudio porque se realizó durante el mes de junio, con temperaturas menores no óptimas para el cultivo. Sin embargo, se obtuvo un crecimiento esperado en la primera semana, los valores de temperatura oscilaron entre 14 °C y 23 °C para la cepa Orovilca y de 14 °C y 25 °C para la cepa Paracas. El medio de cultivo presento pH entre los valores de 9.69 - 10.10, se consideran rangos de pH de 9.50 - 10.00 como óptimos y como valor crítico pH > 10.50 (Whitton y Potts, 2012), donde la tasa de crecimiento máxima se obtuvo alrededor de un pH de 9.8 y cuando se incubo a pH 7.0 la tasa de crecimiento se inhibió severamente, este requisito de pH alto define claramente a *Arthrospira platensis* como un alcalófilo obligatorio.

La fuente de nutrientes para “espirulina” debe estar constituida por componentes químicos básicos para que realice la síntesis de las sustancias orgánicas; se requiere una buena fuente de nitrógeno, para producir compuestos proteicos, una característica resaltante de *A. platensis*, según como lo sugiere Yilmaz y Sezgin (2014). Las fuentes de nitrógeno inorgánico que la célula de “espirulina” puede utilizar son compuestos de nitrato NO_3^- , amonio NH_4^+ y urea $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$; tanto el tipo como la cantidad de la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo puede influir en el crecimiento, composición y alterar la productividad de biomasa (Colla et al, 2007). Se considera que el costo de los nutrientes es el segundo factor importante que influye en el costo de producción de biomasa de “espirulina”, después se encuentra la mano de obra (Madkour et al, 2012). Se utilizó nitrato de amonio NH_4NO_3 como fuente de nitrógeno inorgánico alternativo por su bajo costo y una fuente de oligo-micronutrientes. El régimen de alimentación fue diario durante todo el tiempo de estudio, se agregó concentraciones de 20 g de NH_4NO_3 y 100 mL de mix de nutrientes a cada una de las pozas experimentales para un crecimiento aproximado de 0.05 - 0.1 g/L. Los mayores rendimientos de biomasa de hasta 3.5 g/L se observaron a 2.5 g/L de nitrato (Çelekli y

Yavuzatmaca, 2009), demostrando que las concentraciones de nitrato en el medio de cultivo se pueden reducir (4:1), sin pérdida de productividad, siendo un importante factor de ahorro de costos en cultivos a gran escala (Colla et al, 2007). Se puede obtener una producción de biomasa de 3.495 g/L usando 2500 mg/L de NO^{-3} y 1500 mg/L NaCl, como también el mayor rendimiento de clorofila “a” con 29.92 mg/L, llevados a cabo en sistemas cerrados *in vitro* y en volúmenes pequeños de 100 mL (Çelekli y Yavuzatmaca, 2009). Para la producción de biomasa en nuestro estudio los valores de NO^{-3} en el cultivo fueron los siguientes: para la cepa Orovilca un promedio de 207.90 mg/L y para la cepa Paracas 407.14 mg/L de NO^{-3} en la etapa de pre-cosecha, mientras que en la etapa de post-cosecha para la cepa Orovilca un promedio de 523.76 mg/L y para la cepa Paracas > 900 mg/L. El mayor rendimiento de clorofila “a” se presentó en la cepa Orovilca con 11.166 ug/L, no se concuerda con los resultados de otros investigadores porque durante el monitoreo se puede observar oscilaciones de productividad con concentraciones heterogéneas de NO^{-3} . La causa de la diferencia de los resultados con otros investigadores puede deberse a que el presente estudio se llevó a cabo en volúmenes de 1200 L en pozas experimentales en sistema de biorreactores *raceways* al aire libre y esto puede influir en los rangos, debido a bacterias nitrificantes en el medio ambiente y en el cultivo que alteran las cantidades de este compuesto.

Como fuente de carbono se utilizó el bicarbonato de sodio NaHCO_3 presente en el medio base enriquecido por sales, otra forma de tomar carbono es la alta eficiencia de fijación de CO_2 de manera natural, esto favorece al medio de cultivo dando un valor de pH óptimo de 10, proporcionando mayor tasa de crecimiento del organismo (Ramanan et al, 2010). Se documenta que los valores más bajos de biomasa de “espirulina” se obtuvieron con concentraciones de 3.0 g/L de bicarbonato y de 0.7 g/L de salinidad y la mayor productividad de biomasa con concentraciones de 1.6 y 4.4 g/L de bicarbonato, salinidad (Vásquez et al, 2014). En el presente estudio se utilizó 16 g/L de NaHCO_3 cantidad cuatro veces superior a su máximo, nos brindó una alta alcalinidad en el medio de cultivo y la cantidad de salinidad fue de 8.29 ppt para la cepa Orovilca y 16.12 ppt para la cepa Paracas. En comparación con otras investigaciones estos valores brindaron la productividad esperada.

Los filamentos o tricomas de “espirulina” cultivadas en los sistemas de biorreactores *raceways* al aire libre cambiaron de la forma espiral típica a una forma recta llamada a este cambio linealización de tricomas. La linealización de los filamentos según Wang y Zhao (2005), es una variación en el nivel genético que podría ser inducida por factores ambientales. Esto se observó este caso en los cultivos de la cepa Paracas, presentando la mayor cantidad de tricomas rectos, en un 37 % al inicio y 32 % al final de la evaluación del cultivo (ver Anexo, Figura 25). También se pudo apreciar el cambio de color del cultivo

con el transcurso de los días de verde a un verde caqui y la última semana de color marrón con posterior muerte del cultivo (ver Anexo, Figura 26). Se apreció también aglomeración de tricomas con presencia de mucílago; esto se debe al efecto de la radiación ultravioleta (Huarachi et al, 2015). Se demostró que la morfología de “espirulina” cambia de forma espiral típica a una forma recta por exposición directa a la radiación ultravioleta de los rayos solares con PAR de 1625 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$; sin embargo, la tasa de crecimiento no fue afectada significativamente. En el cultivo de la cepa Orovilca se presentó menor cantidad de tricomas rectos con 1.3 % al inicio y 3 % al final de la evaluación. Esto muestra que no hubo una fotoinhibición marcada en esta cepa: el cultivo mantuvo el color verde característico durante los 30 días de estudio, los valores mínimos de PAR fueron 945 - 1140.30 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ y los valores máximos fueron 1633.80 - 1646.40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ durante el tiempo que duro el estudio. La cepa Orovilca mostro algunos tricomas con mayor compresión de sus ondas con respecto a la cepa Paracas que en su mayoría presento linealización, esto concuerda con algunas investigaciones donde la compresión de las espirales en un paso de la hélice más apretado condujo a una menor fotoinhibición expuestos a 1500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (Ma y Gao, 2009). En la cepa Orovilca la compresión de sus tricomas muestran una respuesta de defensa fisiológica a las radiaciones solares, no observa estrés fisiológico a grandes rasgos que puedan influir en la productividad y todo lo contrario con la cepa Paracas, ésta presentó un estrés fisiológico, fotoinhibición y linealización muy marcado afectando la productividad. La linealización es una condición que rara vez se revierte en sistemas al aire libre (Wang y Zhao, 2005), durante el estudio no se observó ninguna reversión de tricomas rectos a ondulados; varios investigadores mencionan que el periodo de adaptación puede variar en distintas cepas de *A. platensis* ya que su respuesta a una tensión de luz puede diferir significativamente, aunque se hayan cultivado en las mismas condiciones (Richmond y Hu, 2013; Huarachi et al, 2015; Vonshak, 1997). Se observó en la cepa Orovilca la mayor presencia de tricomas ondulados con 99 % y Paracas con 63 % al inicio del cultivo y al final con 97 % y 68% respectivamente. La población predominante al inicio del cultivo en la cepa Orovilca es de tricomas de dos ondas con 39 % y al final con tres ondas siendo un 33 %, mientras que la cepa Paracas la población predominante al inicio del cultivo es de tricomas rectos con 40 % y al final del cultivo repitiendo la población de tricomas rectos con 32 %.

La determinación de la productividad superficial y volumétrica de *A. platensis* en el biorreactor *raceway* en la etapa pre-cosecha para la cepa Orovilca, se realizó en el día 19 y fue de 3.8421 $\text{g}/\text{m}^2/\text{día}$ y 0.0358 $\text{g}/\text{L}/\text{día}$, respectivamente. Para la cepa Paracas se determinó el día 20 y fue de 3.5500 $\text{g}/\text{m}^2/\text{día}$ y 0.0178 $\text{g}/\text{L}/\text{día}$ respectivamente. El cultivo se continuó hasta los 30 días dando nuevos valores de productividad, a esta etapa se le llamo post-cosecha, presentado los siguientes valores para la cepa Orovilca con 3.5000

g/m²/día y 0.0390 g/L/día y para la cepa Paracas con 0.4444 g/m²/día y 0.0022 g/L/día. Los valores de productividad general superficial y volumétrica de biomasa seca durante el tiempo de estudio (pre-cosecha y post-cosecha) con la cepa Orovilca fueron 3.6711 g/m²/día y 0.0374 g/L/día, mientras que para la cepa Paracas fueron de 1.9972 g/m²/día y 0.0100 g/L/día, respectivamente. Por consiguiente, se puede observar una superioridad de productividad de la cepa Orovilca en todas las etapas del cultivo a una temperatura promedio de 20.82 °C. En los estudios de (Radmann et al, 2007) encontraron que la mayor productividad (Px) y velocidad máxima específica (μ_{max}) de *A. platensis*, se presentaron en la prueba con Px: 0.0462 g/L/día y μ_{max} : 0.138 día⁻¹; donde la concentración de mezcla o concentración final del crecimiento de un cultivo fue de 0.4 g/L, la tasas de renovación con 40%, con medio Zarrouk al 20% y todos llevados a cabo a una temperatura promedio de 30 °C, todos los valores altos de μ_x fueron aquellas donde la concentración de mezcla nunca fue superior a 0.45 g/L, lo que probablemente permite una eficiencia fotosintética óptima o semi-óptima. En los estudios de (Ponce, 2013) llevadas a cabo en la planta piloto, con sistemas de estanques abiertos “*raceways*” las instalaciones fueron de tipo invernadero (con plástico resistente a la luz UV); las respuestas indicaron que la medida de producción fue diaria de 3 g/m² en otoño-invierno y 4 g/m² en primavera-verano, empleando una temperatura de cultivo ≤ 30 °C y un pH entre 9 – 11. En nuestro estudio la cepa Orovilca presentó mayor productividad general con 3.6711 g/m²/día con respecto al investigador en mención, a pH entre 9.39 - 10.19 y a una temperatura del medio de cultivo de 17 ± 0.5 °C y mientras las cepas Paracas presenta una menor productividad general con 1.9972 g/m²/día, pH entre 9.69 - 10.10 a una temperatura del medio de cultivo de 16.5 ± 0.5 . La diferencia con Ponce (2013) radica en el tipo de biorreactor *raceway* utilizado y en la latitud ejecutada en la investigación, en nuestro trabajo de estudio no fue aplicado ningún tipo de invernaderos y los resultados de productividad fueron llevados a cabo en latitud Sur (-14.1737219, -75.3779765) durante el mes de junio, donde se presenta la estación de invierno. Los estudios de Zhang et al (2015) realizados en biorreactores a escala de laboratorio de cultivo adjunto de aire libre; obtuvieron que la productividad de biomasa basada en el área unitaria del sustrato en cuatro superficies cultivadas en EFC (tela de flocado electrostático), osciló entre 6 - 7 g/m²/día. Según estos investigadores se mostraron una pequeña variación en la productividad del cultivo, debido a la temperatura inestable de 15 - 33 °C y un PAR de 1000 - 2000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ durante el cultivo al aire libre. Los máximos valores de productividad de biomasa fueron de 14 y 18 g/m²/día, estos valores obtenidos del cultivo adjunto al aire libre es mucho más alto que los registrados en estanques abiertos. Dando constancia que los resultados de los investigadores anteriormente mencionados, son superiores a la productividad de la cepa Orovilca 3.6711 g/m²/día y la cepa Paracas 1.9972 g/m²/día, en cambio los máximos valores de productividad de biomasa seca unitaria de la

cepa Orovilca se acerca más a los valores presentados por Zhang et al (2012), Orovilca con 10 y 14 g/m²/día, en cambio la cepa Paracas con 7 y 10 g/m²/día.

Durante el evaluación del cultivo de “espirulina” en los biorreactores *raceways*, se determinó y estandarizo la profundidad de suspensión siendo de 20 cm y la velocidad de mezcla en promedio de 30 - 40 cm/s; en concordancia con los trabajos de Richmond y Hu (2013) donde consideran de 15 - 40 cm de profundidad y la velocidad de mezcla de 5 - 60 cm/s, así como también se toma referencia los estudios de Ponce (2013) con 20 cm de profundidad y 25 cm/s de agitación; dando en ambos casos un crecimiento óptimo, iniciaron la agitación durante los primeros rayos solares (6 am.) y finalizaron en la tarde (6 am.). El efecto de la agitación turbulenta tiene que ver con el rol de la disponibilidad de la luz y su distribución en cultivos densos, así como también se afirma que el aumento de la productividad es el resultado de una mejor absorción de nutrientes y eliminación de oxígeno tóxico debido a la agitación (Vonshak, 1997). Si el cultivo no se mezcla la “espirulina” en la superficie pueden ser fotoinhibidas mientras que en la parte inferior estaría limitada por la luz, debido a los efectos de auto-sombra. Por lo tanto, es esencial regular la profundidad del estanque y las velocidades de mezcla para optimizar la productividad (Richmond y Hu, 2013). Es esencial compensar la pérdida del medio de cultivo (agua) por evaporación del día anterior, como lo sugiere Zhang et al (2015). Por lo que, se procedió a agregar agua dura e intercalo con medio base en las primeras horas del día, esto se realizó diariamente.

Los análisis de pigmentos realizados a cada una de las cepas en estudio, dieron resultados diferentes entre la cepa Orovilca y Paracas: 10.1047 ug/L y 2.5990 ug/L de C-ficocianina pura, 11.1160 ug/L y 4.4112 ug/L de clorofila “a” y 10.0205 ug/L y 6.6102 ug/L de carotenoides, respectivamente para cada cepa. Esto se debe a la exposición directa del cultivo al aire libre y por ende a la radiación solar, como lo muestran los siguientes estudios. La producción de clorofila “a” por *A. platensis* en respuesta a diferentes radiaciones obedece a un mecanismo de fotoadaptación en cianobacterias, la “espirulina” puede responder a diferentes intensidades y radiación cambiando el contenido de clorofila y carotenoides; por lo tanto, la calidad y cantidad de luz son dos posibles variables cuya manipulación podría aumentar la producción total de estos pigmentos (Huarachi et al, 2015). El color de la biomasa seca pulverizada utilizada en estas pruebas nos da un indicio directo de los resultados de análisis de pigmentos, siendo la cepa Orovilca de color verde y la cepa Paracas verde caqui, según la escala de PANTONE® (ver Anexo, Figura 27). Este análisis muestra que los resultados de pigmentos pueden servir de indicador de calidad de la “espirulina” en polvo en la industria alimentaria u otros.

V. CONCLUSIONES

Al término del trabajo de investigación se llegó a las siguientes conclusiones:

1. La cepa *A. platensis* Orovilca presentó mayor productividad superficial (3.6711 g/m²/día) y volumétrica (0.0374 g/L/día) que la cepa *A. platensis* Paracas con 1.9972 g/m²/día y 0.0100 g/L/día, respectivamente.
2. La cepa *A. platensis* Orovilca tuvo una mejor velocidad específica de crecimiento ($\mu_x=0.0035$ (g/L)h⁻¹) y tiempo de duplicación (td=182.40 h) que la cepa *A. platensis* Paracas que presentó 0.0015 (g/L)h⁻¹ y 433.21 h, respectivamente, en la etapa pre-cosecha.
3. La cepa *A. platensis* Orovilca tuvo una mejor adaptación morfológica en el medio de cultivo, con un 98% de tricomas ondulados y 2% de tricomas rectos, frente a la cepa *A. platensis* Paracas con 68% y 32 % respectivamente.
4. *A. platensis* Orovilca generó mayor biomasa seca en el día 19 (391g) que la cepa *A. platensis* Paracas en el día 20 con 369 g.
5. Se obtuvo mayor concentración de ficocianina 10.1047 %, clorofila "a" 11.1660 µg/L y carotenoides 10.0205 µg/L con la cepa *A. platensis* Orovilca en comparación con la cepa *A. platensis* Paracas, que generó ficocianina 2.5990 %, clorofila "a" 4.4112 µg/L y carotenoides 6.6102 µg/L.
6. No hay diferencia significativa en la producción superficial y volumétrica de biomasa seca entre las cepas *A. platensis* Orovilca y *A. platensis* Paracas.

VI. RECOMENDACIONES

1. El cambio de color de un cultivo de “espirulina” de verde oscuro a verde caqui, es un indicativo de la necesidad de un sombreado.
2. Es necesario monitorear y registrar la cantidad de nutrientes agregados al medio de cultivo y no exagerar en medios nuevos, solo se considera agregar una cantidad adecuada de nutrientes después de una cosecha de biomasa húmeda, realizada esto, se debe recuperar la concentración umbral retirada del medio del cultivo.
3. Para lograr que los cultivos de “espirulina” tengan tricomas onduladas con 3, 4 y 5 ondas; si es necesario agregar cultivos nuevos a los viejos para mantener una morfología adecuada.
4. Para obtener un medio de cultivo optimo se debe considerar mantener el rango de pH entre 9.50 y 10.00 o mayores a estos, se puede agregar medio base o inyectar CO₂ industrial.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Whitton B, Potts M. Introduction the cianobacteria. En Whiton B, editor. Ecology of cianobacteria II: Their diversity in space time. Ed. Nueva york: Springer [Internet].2012 [citado 28 Jun 2021];1-13 p. Disponible en:
https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=4oJ_vi27s18C&oi=fnd&pg=PR3&dq=whitton+2012+ecology+of+cyanobacteria+II&ots=JG0lWStKWZ&sig=IdMs mGzWBiTzMSuTz0Qddn7EMc4#v=onepage&q=whitton%202012%20ecology%20of%20cyanobacteria%20II&f=false
2. Henrikson R. Microalga spirulina super alimento del futuro: una notable alga azul que puede transformar su salud y nuestro planeta. 1th ed.Barcelona: Urano. 1994.
3. Ballot A, Krienitz L, Kotut K, Wiegand C, Metical J, Codd G, et al. Cyanobacteria and cyanobacterial toxins in three alkaline Rift Valley lakes of Kenya---Lakes – Bogoria Nakuru and Elmenteita. journal of plankton research [Internet]. 2004 [28 de Junio 2021] 26(8):925-935.
<https://doi.org/10.1093/plankt/fbh084>
4. Vonshak A. Spirulina Platensis (Arthrospira): Physiology, Cell-Biology And Biotechnology.1th. ed.USA: CRC Press Taylor & Francis group;1997. Disponible en:
<https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=RUZZDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=vonshak+1997+spirulina&ots=zeHpR344rp&sig=WwmRkLRMlc49ka Yucl1MXsg5Fow#v=onepage&q&f=false>
5. Vonshak A, Tomaselli L. Arthrospira (spirulina): Systematics and ecophysiology. En Whiton B, Potts M, editores. Ecology of cianobacteria of cianobacteria: Their diversity in space time. Ed. Nueva york: Springer [Internet] 2000 [consultado 28 Jun 2021]; 505-522 p. Disponible en:
<https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=qRfoBwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR16&dq=whitton+y+potts+2000+the+ecology+of+cyanobacteria&ots=G2Zkrshx IV&sig=xvr9BXnzSKFfgpT5t5xWR3Vc1TY#v=onepage&q=whitton%20y%20potts%202000%20the%20ecology%20of%20cyanobacteria&f=false>
6. Fox R. Spiruline technique: Ptatique et promesse. Paris:Edisud;1999.
7. Sánchez KP. Evaluación del diseño de un fotobiorreactor con iluminación fotovoltaica para la obtención de biomasa **Arthrospira platensis (Nordstedt) Gomont** empleando agua residual hidróponica.[Tesis de bachiller]Lima: Universidad católica sedes sapientiae;2018 [citado 27 Jun 2021]. Disponible en:
http://repositorio.ucss.edu.pe/bitstream/handle/UCSS/537/Sanchez_Karol_tesis_bachiller_2018.pdf?sequence=1&isAllowed=y

8. Vásquez V, Vergay D, Suarez S, Valladares J, Zamora A, Zamora A, et al. 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* [Internet]. 2014 [citado 28 Jun 2021];5(4): 199-209 p. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/agro/v5n4/a04v5n4.pdf>
9. Romero L, Guevara M, Gómez B, Vega B, Cortez R, Licet B. Producción de pigmentos procedentes de *Arthrospira* máxima cultivada en fotobiorreactores. *Colomb. Biotecnol* [Internet]. 2017 [28 de Junio 2021] XIX(1): 108-114 p. Disponible en: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/59671/pdf>
10. Richmond, A. & Hu, Q. 2013. Handbook of microalgal culture: Applied phycology and Biotechnology. Belay, A. Biology and Industrial Production of *Arthrospira* (*Spirulina*). 2° Ed. New Jersey: Wiley Blackwell; p. 339-358.
11. Huarachi R, Yapo Ú, Dueñas Á, Gonzáles R, Condori J, Pacheco D, et al. Adaptabilidad de *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* (cyanophyta) en fotobiorreactores tubular cónico bajo condiciones ambientales. *Idesia* [Internet]. 2015 [citado 27 Jun 2021]; 33(1): 103-112 p. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S0718-34292015000100011&script=sci_arttext#:~:text=http%3A//dx.doi.org/10.4067/S0718-34292015000100011%C2%A0
12. Rodríguez AR, Triana FC. Evaluación del Ph en el cultivo de *Spirulina spp.*(=*Arthrospira*) bajo condiciones de laboratorio. [Tesis de título] Bogotá. Pontificia Universidad Javeriana.2006. Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8281/tesis261.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
13. Ponce E. superalimento para un mundo en crisis: *Spirulina* a bajo costo. *Idesia* [Internet]. 2013 [citado 27 Jun 2021]; 31(1):135-139. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292013000100016>
14. Radmann E, Reinehr C, Costa J. Optimization of the repeated batch cultivation of microalga *Spirulina platensis* in open Raceway ponds. *Acuicultura* [Internet].2007 [citado 27 Jun 2021] 265:118-126. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.02.001>
15. Madkour F, Kamil A, Nasr H. Production and nutritive value of *Spirulina platensis* in reduced cost media. *Egypt. J. Aquat. Res.* [Internet]. 2012 [Citado 27 Jun 2021]; 38: 51-57. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2012.09.003>

16. Romera-Maza, L., Guevara, M., & Bernal, J.F 2018. Crecimiento y pigmentos de Spirulina subsalsa cultivada a diferentes salinidades y concentraciones de nitrógeno. MUTIS 8(2) 25-36 p. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v19n1/0123-3475-biote-19-01-00108.pdf>
17. INS (2020). Vigilancia del Sistema de Información del estado nutricional en EESS: Informe Gerencial Anual 2020. Lima: Instituto Nacional de Salud (INS) - Centro Nacional de Alimentación y Nutrición (CENAN). Disponible en: https://web.ins.gob.pe/sites/default/files/Archivos/cenan/van/informes/2019/informe_gerencial_sien_his_2020.pdf
18. IIMSAM (2014). Centro de recursos IIMSAM Spirulina. Disponible en: <http://iimsam.org/en/iimsam-spirulina-resource-centre/>
19. Cccryo. Spiruline-Medium.Fraunhofer [Internet]. 2014 [28 Jun 2021] Disponible en: <http://cccryo.fraunhofer.de/sources/files/medien/Spir.pdf>
20. Rojas E, Ávila M, Parada G. Aplicación de estrategias nutricionales y su efecto en el crecimiento en el cultivo continuo de Spirulina (Arthrospira platensis). Lat. Am. J. Aquat Res. [Internet]. 2012 [25 Jun 2021]; 40(3): 763-771. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S0718-560X2012000300023&script=sci_arttext&tlng=p
21. Cabranes Y, Lagomasino J.M, Lagomasino J. A. Aislamiento, purificación y caracterización parcial de la C-ficocianina-620 obtenida a partir de la Spirulina platensis. CENIC [Internet]. 2000 [consultado 28 Jun 2021]; 3: 199-205 p. Disponible en: <https://biblat.unam.mx/es/revista/revista-cenic-ciencias-biologicas/articulo/aislamiento-purificacion-y-caracterizacion-parcial-de-la-c-ficocianina-620-obtenida-a-partir-de-la-spirulina-platensis>
22. Strickland, Parsons. A, editors. A practical handbook of seawater analysis. Bulltin 167 2da ed. Fisheries research board of Canada-otawa [Internet].1972 [28 Jun 2021]. Pigments analysis: 185-1999 p. Disponible en: https://epic.awi.de/id/eprint/39262/1/Strickland-Parsons_1972.pdf
23. Rosas C. Pigmentos fotosintéticos en la columna de agua determinados mediante técnicas espectroscópicas y cromatográficas (HLP-RP): variabilidad espacio-temporal y efecto de radiación UV.[Tesis gado de Licencia] .Valdivia: Universidad Austral de Chile. 2007. Disponible en : <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2007/fcr789p/doc/fcr789p.pdf>

24. Pedraza G. cultivo de Spirulina máxima para suplementación proteica. Liverstock Research for Rural Development [Internet]. 1989 [30 Jun 2021]; 1(1). Disponible en;
<http://www.fao.org/AG/aGa/agap/FRG/FEEDback/lrrd/lrrd1/1/gloria.htm>
25. Celekli A, Yavuzatmaca M, Boskurt H. Modeling of biomass production by Spirulina platensis as function of phosphate concentrations and pH regimes. Bioresource technology [Internet]. 2009 [consultado 1 Jul 2021]; 100: 3625-3629p. Disponible en:
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.02.055>
26. Ogbonda K, Aminigo R, Abu G. Influence of temperatura and pH on biomasa production and protein biosynthesis in a putative Spirulina Sp. Bioresource Technology [Internet]. 2007 [30 Jun 2021]; 98: 2207-2211 p. Disponible en:
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.08.028>
27. Bao Y, Liu M, Wu X, Cong W, Ning Z. In situ carbon supplementation in large-scale cultivations of Spirulina platensis in open raceway pond. Biotechnology and Bioprocess Engineering[Internet]. 2012 [30 Jun 2021]; 17: 93-99 p. Disponible en:
<https://link.springer.com/article/10.1007/s12257-011-0319-9>
28. Ma, Z. y Gao, K. Photoregulation of morphological structure and its physiological relevance in the cyanobacterium *Arthrospira* (Spirulina) *platensis*. Planta [Internet] 2009 [30 Jun 2021]. 230 (1): 329-337. Disponible en:
<https://link.springer.com/article/10.1007/s00425-009-0947-x>
29. Colla L, Reinerhr C, Reichert C, Vieira J. Production of biomasa and netraceutical compounds by Spirulina platensis under different temperatura and nitrogen regimes. Bioresource technology [Internet]. 20007 [consultado 1Jul 2021];98: 1489-1493 p. disponible en:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852405004761?via%3Dihub>
30. Celekli A, Yavuzatmaca M. Predictive modeling of biomass production by Spirulina platensis as function of nitrate and NaCl concentrations. Bioresource technology [Internet] 2009 [1 Jul 2021]; 100; 1847-1851 p. disponible en:
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.09.042>
31. Ramanan R, Kannan K, Deshkar A, Yadav R, Chakrabarti T. Enhanced algal CO2 sequestration through calcite deposition by Chlorella sp. And Spirulina platensis in mini-raceway pond. Bioresource Technology [Internet]. 2010 [30 Jun 2021]; 101: 2616-2622 p. Disponible en:
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.061>

32. Wang Z, Zhao Y. morphological reversion of spirulina (arthrospira) platensis (cyanophyta): from linear to helical. J Phycol. [Internet]. 2005 [30 Jun 2021]; 41: 622-628 p. disponible en: <file:///C:/Users/CENTRO%20MINERO/Downloads/MORPHOLOGICALREVERSIONOFSPIRULINAARTHROSPIRAPLATENSIS.pdf>
33. Zhang L, Chen L, Wang J, Chen Y, Gao X, Zhang Z, et al. Attached cultivation for improving the biomass productivity of Spirulina platensis. Bioresource Technology [Intertent]. 2015 [Consultado 30 Jun 21]; 181: 136-142 p. disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/191608639.pdf>

VIII. ANEXOS

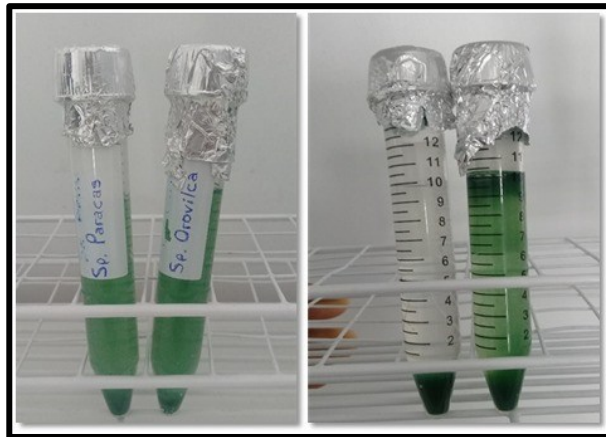



Figura 13. Las cepas *A. platensis* Orovilca y *A. platensis* Paracas en tubos Falcon de 10 mL, en el laboratorio de Alimenta Algae S.A.C.

 INSTITUTO DEL MAR DEL PERÚ
ÁREA FUNCIONAL DE INVESTIGACIONES EN ACUICULTURA
BANCO DE GERMOPLASMA DE ORGANISMOS ACUÁTICOS

FICHA DE ENTREGA DE CEPAS

Mediante la presente se entrega en calidad de venta dos tubos de cepas de microalga del Banco de Germoplasma de Organismos Acuáticos del Instituto del Mar del Perú - IMARPE:

- 1. Sp-orovilca**
Nombre : *Arthrospira platensis*
Temperatura : 18-19 °C
Cantidad : Tubo de 10ml
Medio de cultivo : spirulina
- 2. Sp-paracas**
Nombre : *Arthrospira platensis*
Temperatura : 18-19 °C
Cantidad : Tubo de 10ml
Medio de cultivo : spirulina

Chucuito, 08 de junio del 2017



Miguel Castro ROSAS
ALIMENTA ALGAE SAC

Figura 14. Documento de adquisición de las cepas *A. platensis* Orovilca y *A. platensis* Paracas por el Instituto del Mar del Perú (MARPE).

Tabla 6. Medio espirulina modificado (MEM).

| SOLUCIÓN DE STOCK | VOLUMEN | COMPONENTES | CONCENTRACIÓN | CONCENTRACIÓN FINAL DEL MEDIO |
|-------------------|---------|---------------------------------------|---------------|-------------------------------|
| SS I | 500 mL | NaHCO ₃ | 13.61 g | 4.05/10 ⁻² M |
| | | Na ₂ CO ₃ | 4.03 g | 9.50/10 ⁻³ M |
| | | KCL | 0.42 g | |
| | | Resultado en un pH de 9.0 – 9.2 | | |
| SS II | 500 mL | NaNO ₃ | 2.50 g | 7.35/10 ⁻³ M |
| | | K ₂ SO ₄ | 1.00 g | 1.43/10 ⁻³ M |
| | | NaCl | 1.00 g | 4.27/10 ⁻³ M |
| | | MgSO ₄ .7H ₂ O | 0.20 g | 4.15/10 ⁻⁴ M |
| | | CaCl ₂ .2H ₂ O | 0.04 g | 9.01/10 ⁻⁵ M |
| | | FeSO ₄ .6H ₂ O | 0.01 g | 1.64/10 ⁻⁵ M |
| | | EDTA | 0.08 g | |
| | | Solución de micronutrientes | 5.0 mL | |
| | | Da un resultado de un pH de 3.8 – 4.0 | | |

Tabla 7. Solución de micronutrientes.

| SOLUCIÓN I | | SOLUCIÓN II | | SOLUCIÓN I y II |
|------------|--------------------------------------|-------------|--------------------------------------|-----------------------------|
| 900 mL | Agua destilada | 100 mL | Agua destilada | - Preparación por separado. |
| 1.9 g | ZiFerMan™ (Zn 12.3 %) | 0.7 g | FeSO ₄ .7H ₂ O | - Autoclavar. |
| 2.0 g | MnSO ₄ .7H ₂ O | 0.4 g | EDTA | - Dejar enfriar. |
| 10.0 g | H ₃ BO ₃ | | | - Agrupar juntos. |
| 0.81 g | CoCl ₂ .6H ₂ O | | | |
| 6.5 g | Keylate™ (Mo 6%) | | | |
| 0.005 g | CuSO ₄ .5H ₂ O | | | |
| 0.4 g | EDTA | | | |

Tabla 8. Medio base.

| MEDIO | COMPONENTES | VOLUMEN | CONCENTRACIÓN |
|-----------|---------------------------------|---------|---------------|
| Zarrouk | NaHCO ₃ | 1 L | 13.61 g |
| Spirulina | | | |
| Zarrouk | K ₂ HPO ₄ | | 0.50 g |
| Spirulina | | | |
| Zarrouk | Na ₂ CO ₃ | | 1.03 g |
| Spirulina | | | 4.03 g |
| Zarrouk | NaCl | | 0.20 g |
| Spirulina | | | 1.00 g |

Tabla 9. Medio mix de oligo-micronutrientes.

| MEDIO | COMPONENTES | VOLUMEN | CONCENTRACIÓN |
|-----------|--|---------|---------------|
| Zarrouk | MnCl ₂ .4H ₂ O | 1 L | 1.810 g |
| Spirulina | MnSO ₄ .7H ₂ O | | 1.000 g |
| Zarrouk | | | 0.049 g |
| Spirulina | Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O | | 0.200 g |
| Zarrouk | | | 0.050 g |
| Spirulina | Fe ₂ SO ₄ .7H ₂ O | | 0.100 g |
| Zarrouk | | | |
| Spirulina | K ₂ SO ₄ | | 1.000 g |
| Zarrouk | | | 2.860 g |
| Spirulina | H ₃ BO ₃ | | 2.000 g |
| Zarrouk | | | 0.390 g |
| Spirulina | NaMoO ₄ .7H ₂ O | | 0.200 g |
| Zarrouk | | | 0.220 g |
| Spirulina | ZnSO ₄ .7H ₂ O | | 1.000 g |
| Zarrouk | | | 0.040 g |
| Spirulina | MgSO ₄ .7H ₂ O | | 1.000 g |
| Zarrouk | | | |
| Spirulina | K ₂ HPO ₄ | | 0.500 g |

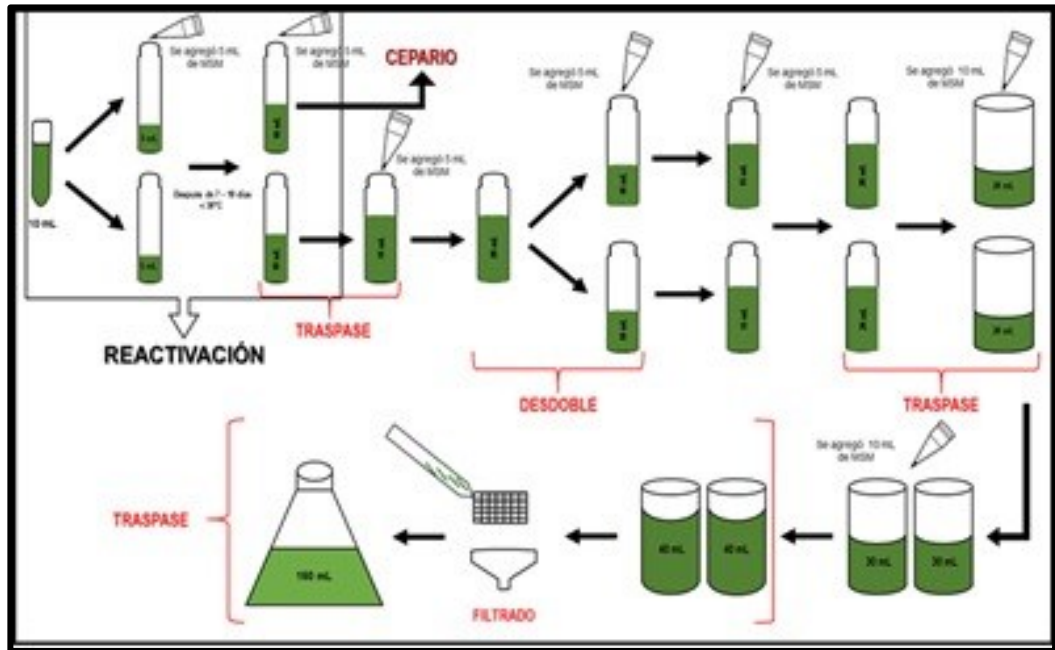


Figura 15. Flujograma de desdoble y traspase de inóculos (cepa reactivada) a volúmenes mayores.



Figura 16. Traspase de las cepas *A. platensis* Orovilca y *A. platensis* Paracas a volúmenes mayores en laboratorio.

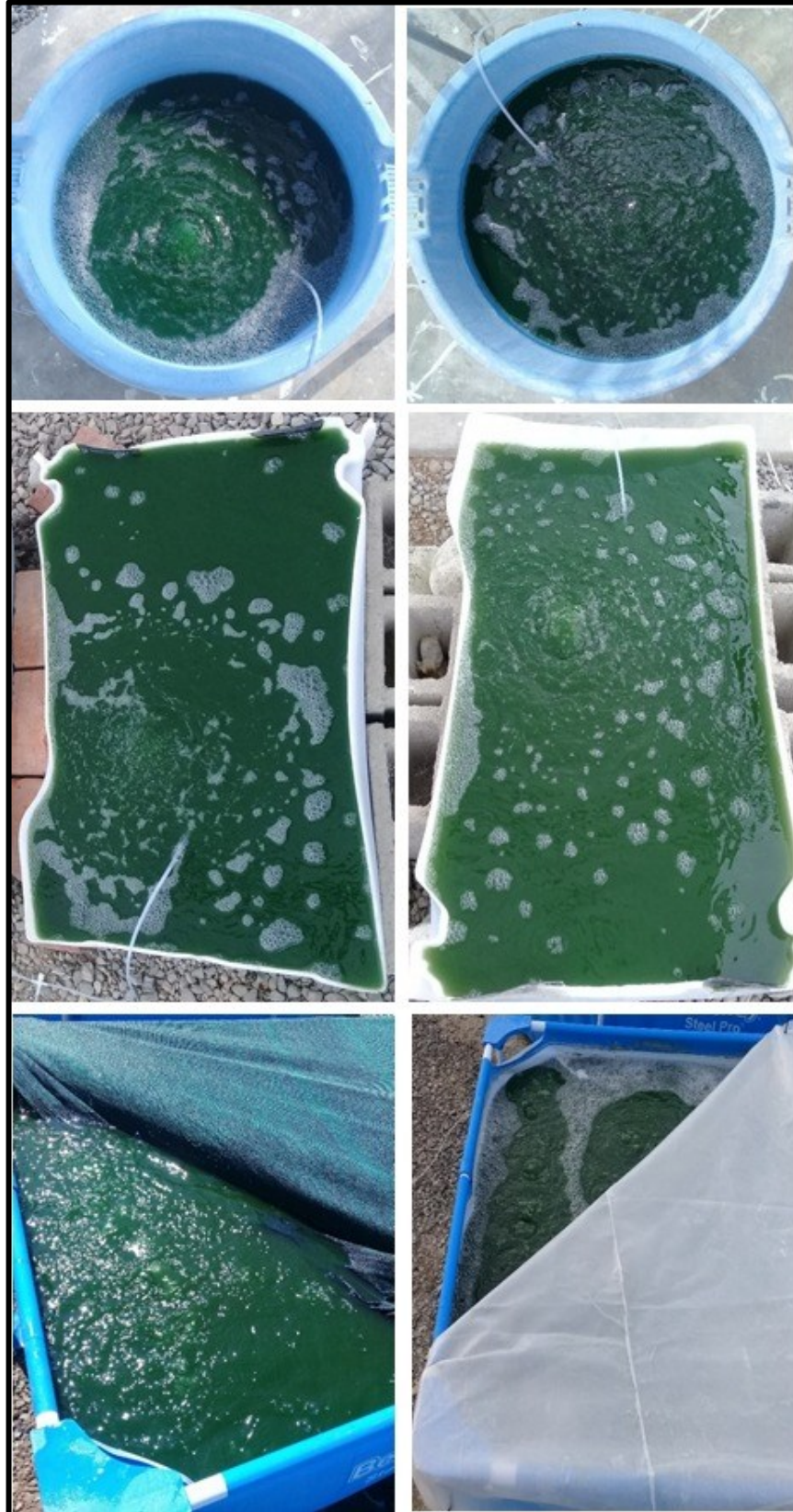


Figura 17. Traspase de las cepas *A. platensis* Orovilca y *A. platensis* Paracas a volúmenes mayores en medio externo.

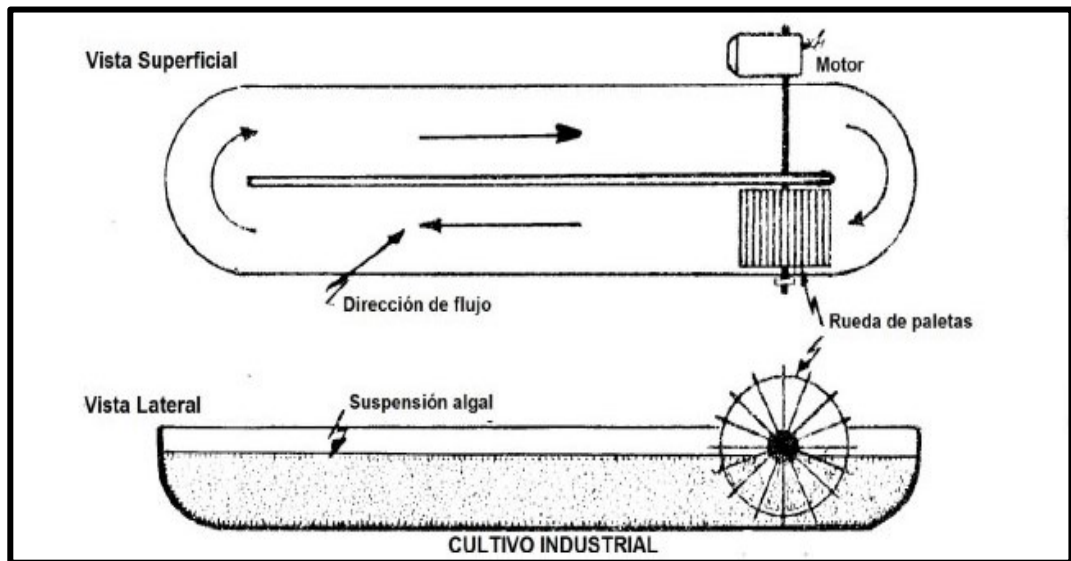


Figura 28. Prototipo de cultivo de espirulina a nivel industrial en un sistema al aire libre (biorreactor *raceway*).



Figura 19. El sistema de biorreactor *raceways* al aire libre con sus dos pozos experimentales (con malla raschel, día 0).



Figura 20. Proceso de cosecha del cultivo de espirulina.

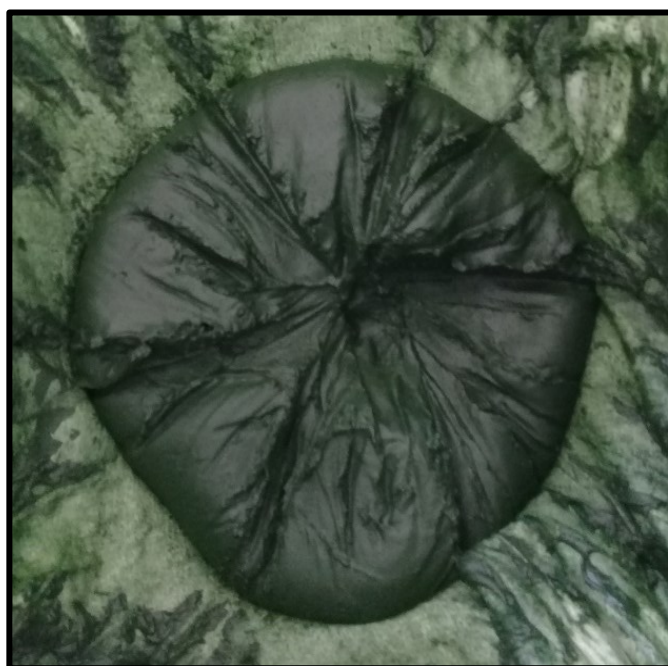


Figura 21. Biomasa húmeda de espirulina prensada, llamada “torta”.

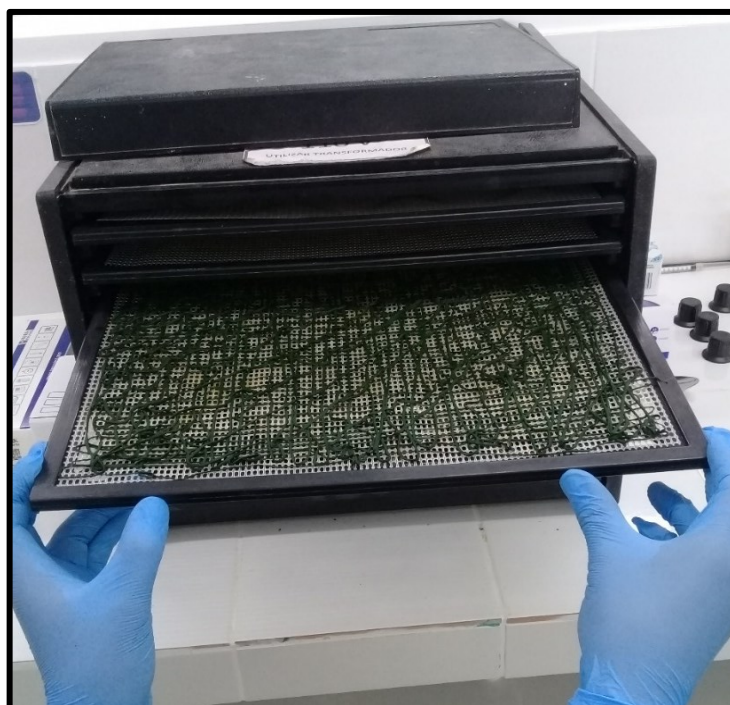


Figura 22. Pelletizado de la biomasa húmeda prensada en forma de fideos llamada “pellets” sobre una bandeja del deshidratador de alimentos.

Tabla 10. Cinética de crecimiento y parámetros físicos-químicos de la cepa *A. platensis* Orovilca, poza experimental 6C, durante 30 días.

| Tiempo (h) | Concentración (g/L) | pH | Temperatura (Cultivo) | Mayor PAR ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) | Salinidad (ppt) | Evaporación del cultivo (L) | NO_3^- (mg/L) | NH_3 (mg/L) |
|------------|---------------------|-------|-----------------------|---|-----------------|-----------------------------|------------------------|----------------------|
| 0 | 0.35 | 9.60 | 16 | 1509.9 | 9.93 | 00 | | |
| 24 | 0.40 | 9.70 | 15 | 1140.3 | | 20 | 48 | 0.82 |
| 48 | 0.41 | 9.74 | 17 | 945 | | 20 | | |
| 72 | 0.42 | 9.90 | 16 | 1539.3 | | 20 | 95 | |
| 96 | 0.42 | 9.79 | 22 | 1451.1 | | 10 | | |
| 120 | 0.44 | 9.60 | 17 | 1512 | | 25 | 151.3 | |
| 144 | 0.460 | | | 1417.2 | | | | |
| 168 | 0.48 | 9.90 | 17 | 1533 | | 34 | | |
| 192 | 0.49 | 9.36 | 16 | 1535.1 | 6.65 | 30 | 270 | |
| 216 | 0.50 | 9.60 | 16 | 1572.9 | | 30 | | 1.0 |
| 240 | 0.50 | 10.04 | 18 | 1568.7 | | 33 | 270 | |
| 264 | 0.51 | 10.14 | 15 | 1633.8 | 6.88 | 20 | | |
| 288 | 0.53 | 10.09 | 15 | 1176 | | 17 | 33 | |
| 312 | 0.545 | | | 1480.5 | | 20 | | 1.26 |
| 336 | 0.56 | 10.18 | 18 | 1501.5 | | 11 | | |
| 360 | 0.58 | 10.09 | 17 | 1407 | 6.83 | 35 | 79 | |
| 384 | 0.59 | 10.05 | 17 | 1512 | | 24 | | 1.1 |
| 408 | 0.62 | 10.10 | 17 | 1459.5 | | 28 | 198.6 | |
| 432 | 0.70 | 10.11 | 16 | 1526.7 | 6.80 | 26 | | |
| 456 | 0.77 | 10.13 | 21 | 1562.4 | | 26 | 600 | |
| 480 | 0.39 | 9.42 | 14 | 1503.6 | | 60 | 27 | |
| 504 | 0.41 | 9.48 | 15 | 1570.8 | 9.03 | 33 | | |
| 528 | 0.44 | 9.46 | 15 | 1524.6 | | 22 | 300 | |
| 552 | 0.45 | 9.65 | 16 | 1638 | 9.09 | 20 | | 3.3 |
| 576 | 0.48 | 9.82 | 17 | 1524.6 | | 22 | 515 | |
| 600 | 0.48 | | | 1646.4 | | | | |
| 624 | 0.50 | 9.46 | | 1520.4 | | | 800 | |
| 648 | 0.50 | 9.84 | 17 | 1589.7 | | 80 | | |
| 672 | 0.53 | 9.90 | 22 | 1560.3 | | 40 | | |
| 696 | 0.56 | | | 1566.6 | | | 800 | |
| 720 | 0.57 | | | 1518.3 | | | | 0.89 |

Tabla 11. Cinética de crecimiento y parámetros físicos-químicos de la cepa *A. platensis* Orovilca, poza experimental 6D, durante 30 días.

| Tiempo (h) | Concentración (g/L) | pH | Temperatura Cultivo (°C) | Mayor PAR (umol/m ² /s) | Evaporación (L) | Salinidad (ppt) | NO ⁻³ | NH ₃ |
|------------|---------------------|-------|--------------------------|------------------------------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|
| 0 | 0.35 | 9.18 | 16 | 1509.9 | 00 | 9.93 | | |
| 24 | 0.40 | 9.34 | 15 | 1140.3 | 20 | 7.07 | 48 | 0.82 |
| 48 | 0.40 | 9.49 | 17 | 945 | 20 | | | |
| 72 | 0.43 | 9.57 | 16 | 1539.3 | 20 | | 95 | |
| 96 | 0.45 | 9.90 | 23 | 1451.1 | 10 | 7.20 | | |
| 120 | 0.46 | 9.60 | 17 | 1512 | 20 | | 151.3 | |
| 144 | 0.465 | | | 1417.2 | | | | |
| 168 | 0.47 | 9.67 | 17 | 1533 | 36 | | | |
| 192 | 0.48 | 9.77 | 16 | 1535.1 | 30 | | 270 | |
| 216 | 0.49 | 9.88 | 16 | 1572.9 | 30 | 7.22 | | 1.0 |
| 240 | 0.49 | 9.92 | 18 | 1568.7 | 35 | | 270 | |
| 264 | 0.50 | 10.05 | 15 | 1633.8 | 20 | 7.56 | | |
| 288 | 0.53 | 10.11 | 15 | 1176 | 16 | | 33 | |
| 312 | 0.525 | | | 1480.5 | 20 | | | 1.26 |
| 336 | 0.52 | 10.14 | 18 | 1501.5 | 10 | | | |
| 360 | 0.53 | 10.15 | 17 | 1407 | 30 | | 79 | |
| 384 | 0.53 | 10.18 | 17 | 1512 | 24 | 7.68 | | 1.1 |
| 408 | 0.57 | 10.19 | 17 | 1459.5 | 28 | | 198.6 | |
| 432 | 0.63 | 10.23 | 16 | 1526.7 | 28 | 7.61 | | |
| 456 | 0.66 | 10.25 | 21 | 1562.4 | 26 | | 600 | |
| 480 | 0.34 | 9.30 | 14 | 1503.6 | 20 | | 27 | |
| 504 | 0.35 | 9.37 | 15 | 1570.8 | 40 | | | |
| 528 | 0.40 | 9.60 | 15 | 1524.6 | 28 | 9.65 | 300 | |
| 552 | 0.41 | 9.48 | 16 | 1638 | 30 | | | 3.3 |
| 576 | 0.42 | 9.65 | 17 | 1524.6 | 27 | 9.77 | 515 | |
| 600 | 0.43 | 9.76 | 17 | 1646.4 | 26 | | | |
| 624 | 0.445 | | | 1520.4 | | | 800 | |
| 648 | 0.46 | 9.76 | 17 | 1589.7 | 40 | | | |
| 672 | 0.48 | 9.80 | 15 | 1560.3 | 30 | | | |
| 696 | 0.51 | 9.90 | 21 | 1566.6 | 28 | | 800 | |
| 720 | 0.51 | | | 1518.3 | | | | 0.89 |

Tabla 12. Cinética de crecimiento y parámetros físicos-químicos de la cepa *A. platensis*
Paracas, poza experimental 6G, durante 30 días.

| Tiempo (h) | Concentración (g/L) | pH | Temperatura Cultivo (°C) | Mayor PAR (umol/m ² /s) | Evaporación (L) | Salinidad (ppt) | NO ⁻³ | NH ₃ |
|------------|---------------------|-------|--------------------------|------------------------------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|
| 0 | 0.29 | 9.70 | 17 | 1509.9 | 00 | | 112 | 0.55 |
| 24 | 0.30 | 9.70 | 16 | 1140.3 | 20 | 14.36 | 21 | |
| 48 | 0.32 | 9.80 | 16 | 945 | 20 | | | 0.19 |
| 72 | 0.33 | 9.80 | 17 | 1539.3 | 20 | | 4.2 | |
| 96 | 0.35 | 9.80 | 16 | 1451.1 | 24 | 14.10 | | |
| 120 | 0.42 | 9.80 | 21 | 1512 | 20 | | 139.2 | |
| 144 | 0.435 | | | 1417.2 | | | | |
| 168 | 0.45 | 9.76 | 23 | 1533 | 30 | | 655 | |
| 192 | 0.48 | 9.90 | 23 | 1535.1 | 40 | | | 0.32 |
| 216 | 0.50 | 9.95 | 15 | 1572.9 | 40 | 14.28 | 6.6 | |
| 240 | 0.54 | 9.77 | 23 | 1568.7 | 26 | | | |
| 264 | 0.52 | 9.99 | 16 | 1633.8 | 30 | 14.08 | 123 | |
| 288 | 0.54 | 9.91 | 15 | 1176 | 26 | | | |
| 312 | 0.55 | | | 1480.5 | | | | |
| 336 | 0.56 | 10.01 | 16 | 1501.5 | 26 | | 796.8 | |
| 360 | 0.57 | 10.03 | 15 | 1407 | 26 | 13.48 | | 3.12 |
| 384 | 0.60 | 10.07 | 15 | 1512 | 25 | | 416.4 | |
| 408 | 0.61 | | | 1459.5 | | | | |
| 432 | 0.62 | 10.10 | 14 | 1526.7 | 24 | 13.42 | 250 | 0.55 |
| 456 | 0.67 | 10.11 | 14 | 1562.4 | 26 | | 112 | |
| 480 | 0.68 | 10.18 | 15 | 1503.6 | 30 | | 21 | 0.19 |
| 504 | 0.31 | | | 1570.8 | | | | |
| 528 | 0.29 | | | 1524.6 | | | 4.2 | |
| 552 | 0.26 | | | 1638 | | | | |
| 576 | 0.29 | | | 1524.6 | | | 139.2 | |
| 600 | 0.30 | | | 1646.4 | | | | |
| 624 | 0.35 | | | 1520.4 | | | 655 | 0.32 |
| 648 | 0.33 | | | 1589.7 | | | | |
| 672 | 0.29 | | | 1560.3 | | | 6.6 | |
| 696 | 0.27 | | | 1566.6 | | | | |
| 720 | 0.24 | | | 1518.3 | | | | |

Tabla 13. Cinética de crecimiento y parámetros físicos-químicos de la cepa *A. platensis*
Paracas, poza experimental 6H, durante 30 días.

| Tiempo (h) | Concentración (g/L) | pH | Temperatura Cultivo (°C) | Mayor PAR (umol/m ² /s) | Evaporación (L) | Salinidad (ppt) | NO ⁻³ | NH ₃ |
|------------|---------------------|-------|--------------------------|------------------------------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|
| 0 | 0.39 | 9.68 | 22 | 1509.9 | 00 | 17.26 | 100 | 0.40 |
| 24 | 0.40 | 9.79 | 20 | 1140.3 | 20 | | | 0.33 |
| 48 | 0.42 | 9.88 | 16 | 945 | 20 | | 20.4 | |
| 72 | 0.435 | | | 1539.3 | 20 | | | |
| 96 | 0.45 | 9.94 | 14 | 1451.1 | 24 | | | |
| 120 | 0.48 | 9.95 | 19 | 1512 | 20 | | | |
| 144 | 0.49 | 9.98 | 21 | 1417.2 | | 17.02 | | |
| 168 | 0.52 | 9.98 | 20 | 1533 | 30 | | 335 | |
| 192 | 0.53 | 9.78 | 19 | 1535.1 | 40 | 16.20 | | |
| 216 | 0.54 | 9.94 | 19 | 1572.9 | 40 | | 514.2 | |
| 240 | 0.545 | | | 1568.7 | 26 | | | |
| 264 | 0.55 | 9.76 | 15 | 1633.8 | 30 | 17.80 | 900 | |
| 288 | 0.56 | 9.70 | 20 | 1176 | 26 | | | |
| 312 | 0.57 | 9.72 | 25 | 1480.5 | | 18.00 | | |
| 336 | 0.58 | 9.75 | 20 | 1501.5 | 26 | | 980 | |
| 360 | 0.60 | 9.77 | 17 | 1407 | 26 | 18.82 | | 1.7 |
| 384 | 0.62 | 9.92 | 15 | 1512 | 25 | | 920 | |
| 408 | 0.64 | | | 1459.5 | | | | |
| 432 | 0.68 | 9.87 | 18 | 1526.7 | 24 | | 725.3 | |
| 456 | 0.70 | 9.90 | 16 | 1562.4 | 26 | | | |
| 480 | 0.71 | 9.98 | 19 | 1503.6 | 30 | | | |
| 504 | 0.29 | 10.03 | 20 | 1570.8 | | | | |
| 528 | 0.31 | 10.02 | 15 | 1524.6 | | | | |
| 552 | 0.30 | | | 1638 | | | | |
| 576 | 0.31 | | | 1524.6 | | | | |
| 600 | 0.33 | | | 1646.4 | | | | |
| 624 | 0.35 | | | 1520.4 | | | | |
| 648 | 0.36 | | | 1589.7 | | | | |
| 672 | 0.37 | | | 1560.3 | | | | |
| 696 | 0.39 | | | 1566.6 | | | | |
| 720 | 0.40 | | | 1518.3 | | | | |

Tabla 14. Cinética de crecimiento de las cepas *A. platensis* Orovilca y *A. platensis* Paracas en un biorreactor *raceway*, durante 30 días.

| OROVILCA | | PARACAS | |
|----------|--------------------------------|----------|--------------------------------|
| Hora (h) | Concentración de biomasa (g/L) | Hora (h) | Concentración de biomasa (g/L) |
| 0 | 0.35 | 0 | 0.34 |
| 24 | 0.385 | 24 | 0.35 |
| 48 | 0.405 | 48 | 0.37 |
| 72 | 0.425 | 72 | 0.3825 |
| 96 | 0.435 | 96 | 0.4 |
| 120 | 0.45 | 120 | 0.45 |
| 144 | 0.4625 | 144 | 0.4625 |
| 168 | 0.475 | 168 | 0.485 |
| 192 | 0.485 | 192 | 0.505 |
| 216 | 0.495 | 216 | 0.52 |
| 240 | 0.495 | 240 | 0.5425 |
| 264 | 0.505 | 264 | 0.535 |
| 288 | 0.53 | 288 | 0.55 |
| 312 | 0.535 | 312 | 0.56 |
| 336 | 0.54 | 336 | 0.57 |
| 360 | 0.555 | 360 | 0.585 |
| 384 | 0.56 | 384 | 0.61 |
| 408 | 0.595 | 408 | 0.625 |
| 432 | 0.665 | 432 | 0.65 |
| 456 | 0.715 | 456 | 0.685 |
| 480 | 0.365 | 480 | 0.695 |
| 504 | 0.38 | 504 | 0.3 |
| 528 | 0.42 | 528 | 0.3 |
| 552 | 0.43 | 552 | 0.28 |
| 576 | 0.45 | 576 | 0.3 |
| 600 | 0.455 | 600 | 0.315 |
| 624 | 0.4725 | 624 | 0.35 |
| 648 | 0.48 | 648 | 0.345 |
| 672 | 0.505 | 672 | 0.33 |
| 696 | 0.535 | 696 | 0.33 |
| 720 | 0.54 | 720 | 0.32 |

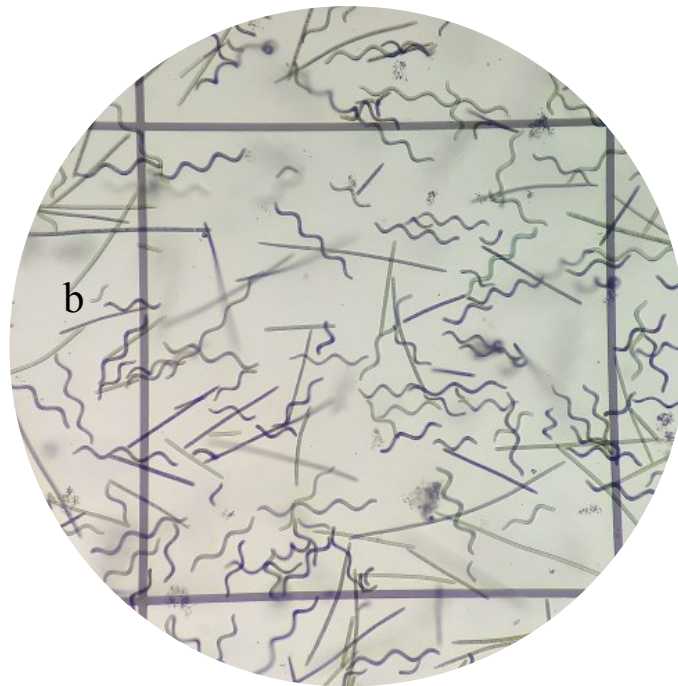
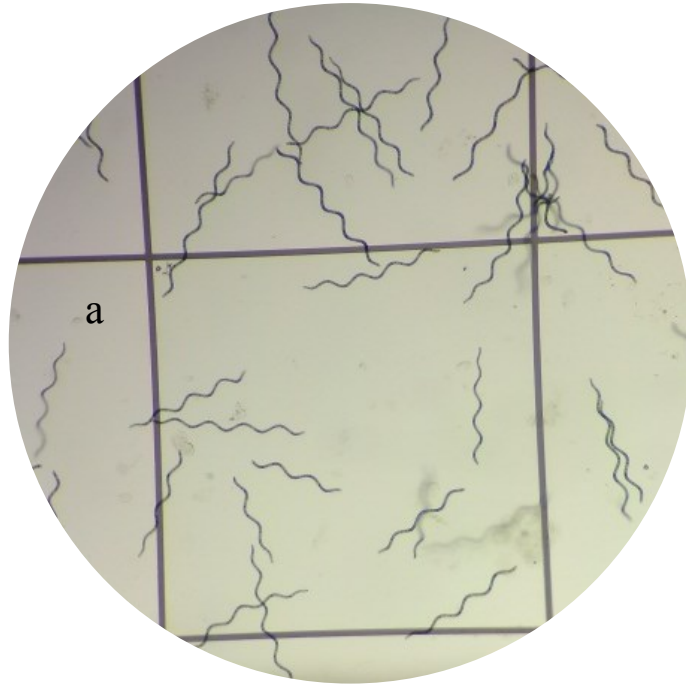


Figura 23. Observación morfológica de los tricomas ondulados y rectos en la cámara Sedgewick-Rafter: a) *A. platensis* cepa Orovilca, b) *A. platensis* cepa Paracas.

Tabla 15. Conteo de tricomas ondulados y rectos en el cultivo de las cepas *A. platensis* Orovilca y *A. platensis* Paracas en sus respectivas pozas experimentales.

| Cepas | Concentración (g/L) | Código | Tricomas ondulados (N°. mL ⁻¹) | Tricomas rectos (N°. mL ⁻¹) |
|-----------------|---------------------|--------|--|---|
| Orovilca | 0.33 | 6C | 70 800 | 00 |
| | 0.70 | | 216 000 | 00 |
| | 0.37 | 6D | 56 000 | 1 800 |
| | 0.63 | | 176 000 | 12 000 |
| Paracas | 0.29 | 6G | 33 200 | 18 600 |
| | 0.62 | | 138 400 | 52 200 |
| | 0.39 | 6H | 52 000 | 32 000 |
| | 0.70 | | 140 800 | 78 200 |

Tabla 16. Conteo de tricomas por ondas en el cultivo de las cepas *A. platensis* Orovilca y *A. platensis* Paracas en sus respectivas pozas experimentales.

| Cepas | (g/L) | Cód. | N.º de tricomas | | | | | rectos |
|-----------------|-------|------|-----------------|---------|---------|---------|---------|--------|
| | | | 1 ondas | 2 ondas | 3 ondas | 4 ondas | 5 Ondas | |
| Orovilca | 0.33 | 6C | 2100 | 30400 | 26900 | 11400 | 00 | 00 |
| | 0.70 | | 4400 | 60400 | 73600 | 71200 | 6400 | 00 |
| | 0.37 | 6D | 15000 | 20200 | 17400 | 2800 | 600 | 1800 |
| | 0.63 | | 50400 | 50400 | 60000 | 10200 | 5000 | 12000 |
| Paracas | 0.29 | 6G | 6000 | 14200 | 8800 | 800 | 400 | 21600 |
| | 0.62 | | 45800 | 60400 | 21000 | 7600 | 3800 | 52000 |
| | 0.39 | 6H | 13000 | 25600 | 5800 | 6800 | 800 | 32000 |
| | 0.70 | | 43800 | 63600 | 19800 | 6600 | 6400 | 78800 |

Tabla 17. Productividad superficial y volumétrica de la cepa *A. platensis* Orovilca, en el biorreactor *raceway*, durante 30 días.

| Tiempo (d) | PRODUCTIVIDAD OROVILCA | |
|---------------|--|--------------------------|
| | SUPERFICIAL (g/m ² /día) | VOLUMÉTRICA (g/L/día) |
| 0 | 7 | 0.035 |
| 1 | 4 | 0.02 |
| 2 | 4 | 0.02 |
| 3 | 2 | 0.01 |
| 4 | 3 | 0.015 |
| 5 | 2.5 | 0.0125 |
| 6 | 2.5 | 0.0125 |
| 7 | 2 | 0.01 |
| 8 | 2 | 0.01 |
| 9 | 0 | 0 |
| 10 | 2 | 0.01 |
| 11 | 5 | 0.025 |
| 12 | 1 | 0.005 |
| 13 | 1 | 0.005 |
| 14 | 3 | 0.015 |
| 15 | 1 | 0.005 |
| 16 | 7 | 0.035 |
| 17 | 14 | 0.07 |
| 18 | 10 | 0.05 |
| 19 | -70 | -0.35 |
| 20 | 3 | 0.015 |
| 21 | 8 | 0.04 |
| 22 | 2 | 0.01 |
| 23 | 4 | 0.02 |
| 24 | 1 | 0.005 |
| 25 | 3.5 | 0.0175 |
| 26 | 1.5 | 0.0075 |
| 27 | 5 | 0.025 |
| 28 | 6 | 0.03 |
| 29 | 1 | 0.005 |
| 30 | 0 | 0 |

Tabla 18. Productividad superficial y volumétrica de la cepa *A. platensis* Paracas, en el biorreactor *raceway*, durante 30 días.

| Tiempo (d) | PRODUCTIVIDAD PARACAS | |
|---------------|--|--------------------------|
| | SUPERFICIAL (g/m ² /día) | VOLUMÉTRICA (g/L/día) |
| 0 | 2 | 0.01 |
| 1 | 4 | 0.02 |
| 2 | 2.5 | 0.0125 |
| 3 | 3.5 | 0.0175 |
| 4 | 10 | 0.05 |
| 5 | 2.5 | 0.0125 |
| 6 | 4.5 | 0.0225 |
| 7 | 4 | 0.02 |
| 8 | 3 | 0.015 |
| 9 | 4.5 | 0.0225 |
| 10 | -1.5 | -0.0075 |
| 11 | 3 | 0.015 |
| 12 | 2 | 0.01 |
| 13 | 2 | 0.01 |
| 14 | 3 | 0.015 |
| 15 | 5 | 0.025 |
| 16 | 3 | 0.015 |
| 17 | 5 | 0.025 |
| 18 | 7 | 0.035 |
| 19 | 2 | 0.01 |
| 20 | -79 | -0.395 |
| 21 | 0 | 0 |
| 22 | -4 | -0.02 |
| 23 | 4 | 0.02 |
| 24 | 3 | 0.015 |
| 25 | 7 | 0.035 |
| 26 | -1 | -0.005 |
| 27 | -3 | -0.015 |
| 28 | 0 | 0 |
| 29 | -2 | -0.01 |
| 30 | 0 | 0 |

Tabla 19. Determinación cuantitativa de ficocianina pura y cruda del cultivo de *A. platensis* Orovilca y *A. platensis* Paracas.

| Cepa | % C-Ficocianina pura | % C-Ficocianina cruda |
|-----------------------|----------------------|-----------------------|
| Orovilca ₁ | 10.433 | 22.4670 |
| Orovilca ₂ | 9.9673 | 21.4635 |
| Orovilca ₃ | 9.9139 | 21.3424 |
| Paracas ₁ | 2.7508 | 5.9236 |
| Paracas ₂ | 2.6180 | 5.6376 |
| Paracas ₃ | 2.4283 | 5.2291 |

Tabla 20. Determinación cuantitativa de Clorofila “a” y “%” del cultivo de *A. platensis* Orovilca y *A. platensis* Paracas.

| Cepa | Clorofila a (ug/L) | % Clorofila |
|-----------------------|--------------------|-------------|
| Orovilca ₁ | 11.3397 | 0.5552 |
| Orovilca ₂ | 12.0840 | 0.6090 |
| Orovilca ₃ | 10.0743 | 0.5053 |
| Paracas ₁ | 4.3281 | 0.2101 |
| Paracas ₂ | 4.4161 | 0.2164 |
| Paracas ₃ | 4.4895 | 0.2232 |

Tabla 21. Determinación cuantitativa de Carotenoides “%” del cultivo de *A. platensis* Orovilca y *A. platensis* Paracas.

| Cepa | Carotenoides (ug/L) | % Carotenoides |
|-----------------------|---------------------|----------------|
| Orovilca ₁ | 10.4342 | 0.5108 |
| Orovilca ₂ | 11.0766 | 0.5582 |
| Orovilca ₃ | 8.5508 | 0.4288 |
| Paracas ₁ | 6.4735 | 0.3146 |
| Paracas ₂ | 6.6312 | 0.3250 |
| Paracas ₃ | 6.7260 | 0.3344 |

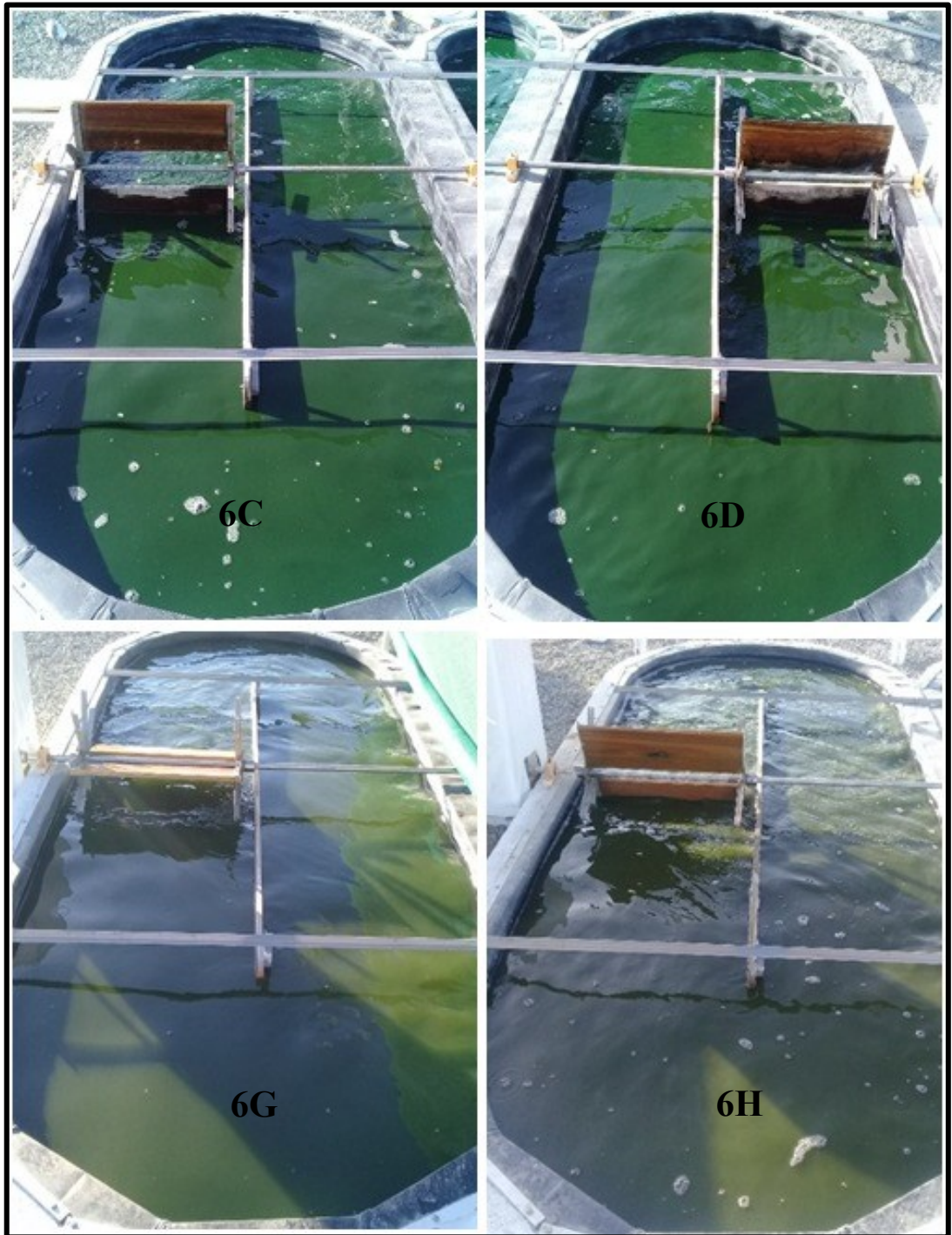


Figura 24. Color del cultivo al inicio de su crecimiento en el biorreactor *raceway*; parte superior (cepa Orovilca) e inferior (cepa Paracas).

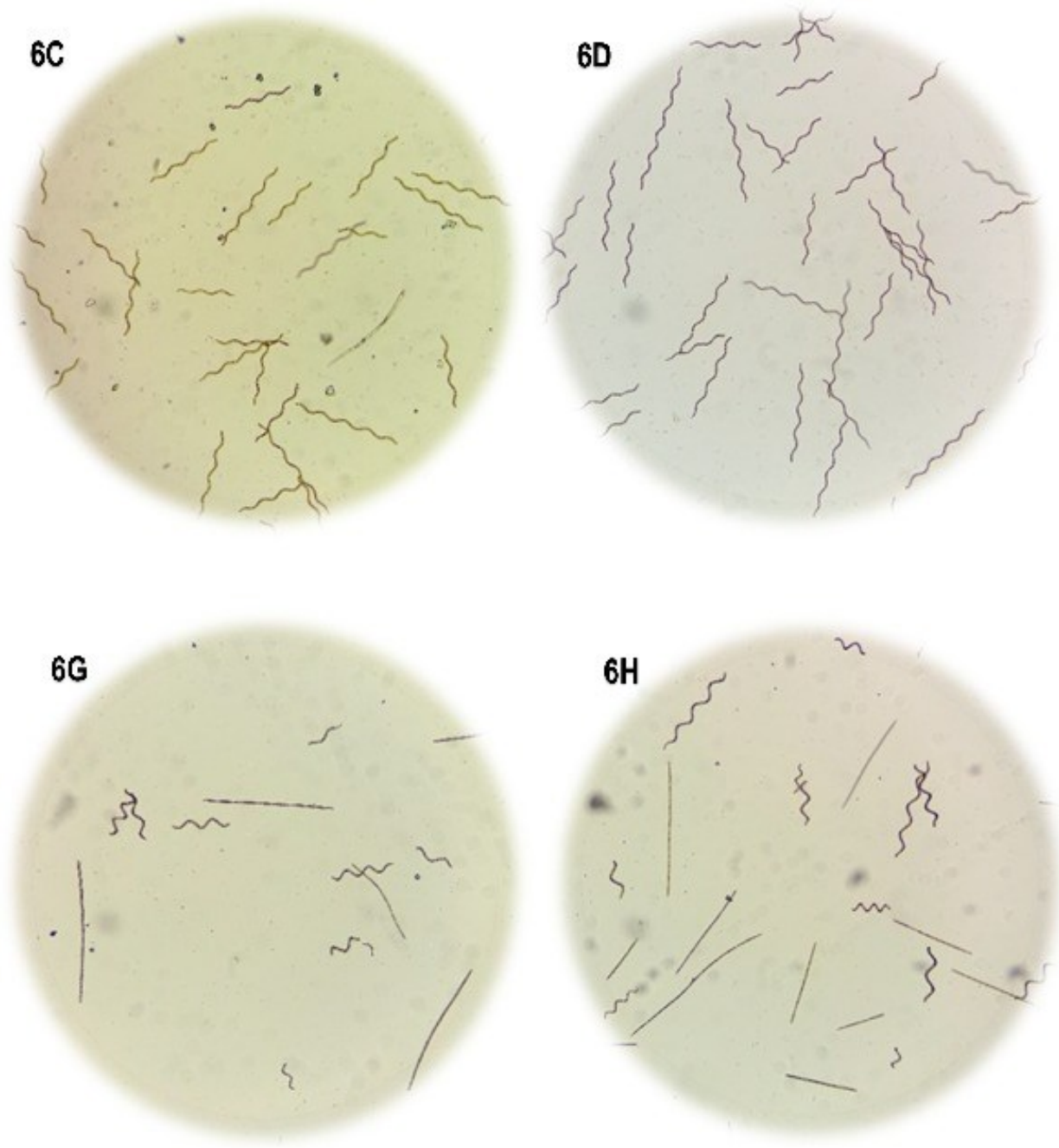


Figura 25. Observación morfológica de espirulina, tricomas rectos y ondulados de las cepas Orovilca y Paracas de sus respectivas pozas experimentales.



Figura 26. Color marrón del cultivo de la cepa *A. platensis* Paracas, al final del estudio; izquierda (poza experimental 6G) y derecha (poza experimental 6H).

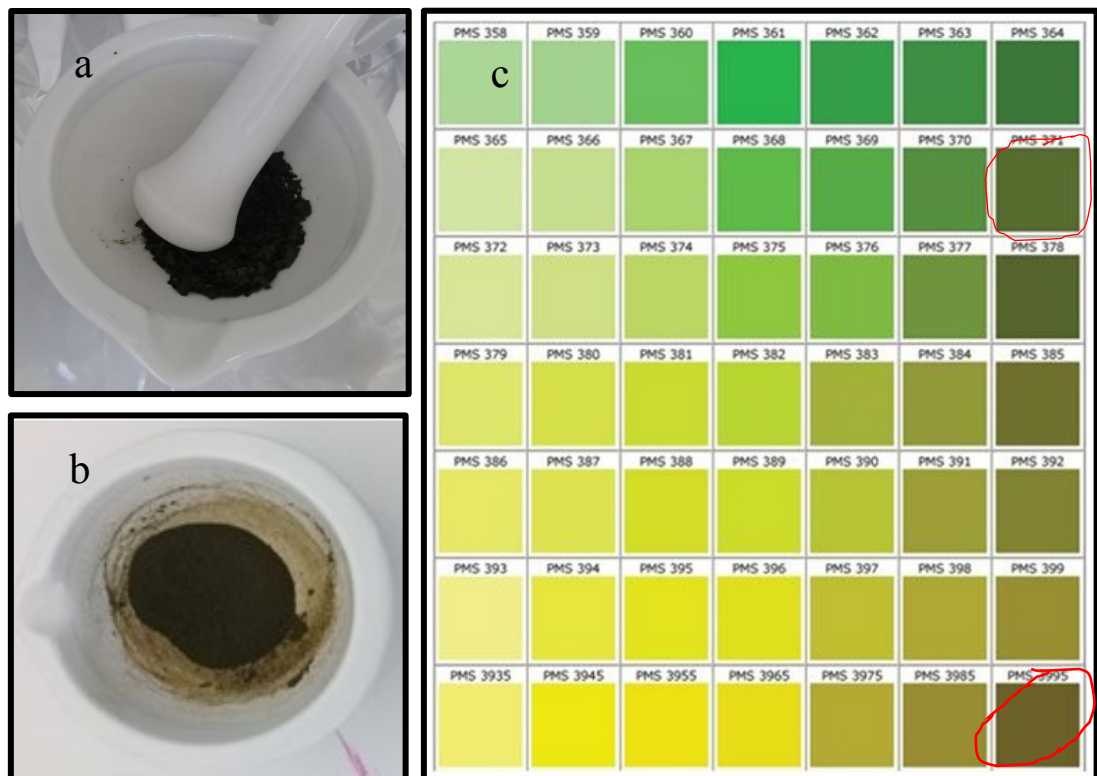


Figura 27. Color de las muestras secas de espirulina: a) cepa Orovilca color (PMS 371), b) cepa Paracas color (PMS 3995), c) Tabla de escala de PANTONE® (PMS).