

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOLOGÍA EN ACUICULTURA**



**“Efecto de diferentes concentraciones de aguas residuales del procesamiento primario de *Engraulis ringens* “anchoveta” en el crecimiento y contenidos de proteínas de *Spirulina maxima*”**

**PRESENTADO POR:**

**Bach. Crisanto Madrid, Gissela Beatriz**

**Bach. Yataco Guevara, Karina Jeanette**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE BIÓLOGO  
ACUICULTOR**

**NUEVO CHIMBOTE - PERÚ**

**2018**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOLOGÍA EN ACUICULTURA**



**“Efecto de diferentes concentraciones de aguas residuales del procesamiento primario de *Engraulis ringens* “anchoveta” en el crecimiento y contenidos de proteínas de *Spirulina maxima*”**

**PRESENTADO POR:**

**Bach. Crisanto Madrid, Gissela Beatriz**

**Bach. Yataco Guevara, Karina Jeanette**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE BIÓLOGO ACUICULTOR**

Revisado y Aprobado por el Asesor

---

**M.Sc. Sorayda Mendoza Espinoza**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOLOGÍA EN ACUICULTURA**



**“Efecto de diferentes concentraciones de aguas residuales del procesamiento primario de *Engraulis ringens* “anchoveta” en el crecimiento y contenidos de proteínas de *Spirulina maxima*”**

**TESISTAS:**

**Bach. Crisanto Madrid, Gissela Beatriz**

**Bach. Yataco Guevara, Karina Jeanette**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE BIÓLOGO ACUICULTOR  
APROBADO POR EL JURADO CALIFICADOR INTEGRADO POR**

---

**Dr. JUAN FERNANDO MERINO MOYA**  
**PRESIDENTE**

---

**Mg. JUAN CARHUAPOMA GARAY**  
**SECRETARIO**

---

**M.Sc. SORAYDA MENDOZA ESPINOZA**  
**INTEGRANTE**

## ACTA DE CALIFICACIÓN DE LA SUTENTACIÓN DE LA TESIS

En el Distrito de Nuevo Chimbote, en la Universidad Nacional de Santa, en el Auditorio del 3º Piso de Ciencias, siendo las 6:00 horas del día 10 de Mayo del 2018, dando cumplimiento a la Resolución N° ....., se reunió el Jurado Evaluador presidido por Fernando Morán Moya, teniendo como miembros a Juan Carlos Carhuayana Góngora (secretario) (a), y Sara de Mendoza Espinoza (integrante), para la sustentación de tesis a fin de optar el título de Biólogo Acuicultor realizado por el, (la), (los) tesista (as) .....

CRISANTO MADRIO, GISELA BEATRIZ - YATASO CUEVAS KIRAS JEMELTE, quien (es) sustentó (aron) la tesis intitulada: Efecto de diferentes concentraciones de aguas residuales del procesamiento primario de Esgresos ringera "rubber" en el crecimiento y contenido de proteína de Spirulina maxima .....

Terminada la sustentación, el (la), (los) tesista (as)s respondió (ieron) a las preguntas formuladas por los miembros del jurado.

El Jurado después de deliberar sobre aspectos relacionados con el trabajo, contenido y sustentación del mismo y con las sugerencias pertinentes, declara la sustentación como Muy Buena asignándole un calificativo de 27 puntos, según artículo 103° del Reglamento General de Grados y Títulos de la Universidad Nacional del Santa, vigente (Resolución N° 492-2017-CU-R-UNS)

Siendo las 7:30pm horas del mismo día se dio por terminado el acto de sustentación firmando los miembros del Jurado en señal de conformidad

Nombre: Fernando Morán Moya  
Presidente

Nombre: Juan Carlos Carhuayana Góngora  
Secretario

Nombre: Sara de Mendoza Espinoza  
Integrante

Distribución: Integrantes J.E ( ), tesistas (1) y archivo (02).



## DEDICATORIA

A Dios por ser mi mejor guía, por darme fuerzas y permitir llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos.

A mis sobrinos quienes han sido mi mayor motivación para nunca rendirme en los estudios y poder llegar a ser ejemplo para ellos.

A mis compañeros de estudios quienes sin esperar nada a cambio compartieron su conocimiento, alegrías y tristezas, logrando que este sueño se haga realidad.

A mi esposo por su confianza, por su amor y por brindarme el tiempo necesario para realizarme profesionalmente.

Karina Jeanette Yataco Guevara.

Esta tesis es dedicada a mi Madre por ese ejemplo de perseverancia y constancia que me ha enseñado siempre, por su apoyo incondicional que me da día a día, por sus consejos, sus valores y su gran amor.

A mis hermanos quienes siempre me han brindado su apoyo y me alentaron a seguir adelante con la carrera profesional.

A mi esposo e hijas quienes han sido el motor principal para seguir adelante en cada uno de mis proyectos y quienes me dieron el aliento de poder culminar tan valioso proyecto.

A todos aquellos, amigos y familiares y maestros quienes estuvieron pendientes durante el proceso de mi carrera profesional.

Gissela Beatriz Crisanto Madrid

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por darnos la vida, la salud y permitirnos lograr realizar nuestras metas trazadas.

A nuestros docentes por todo el amor y el apoyo brindado en una de las metas de nuestras vidas, por las enseñanzas de valorar los estudios y a superarnos cada día les agradecemos por la orientación que siempre nos han otorgado y a nuestra asesora queremos que se sienta que el objetivo logrado también es de ustedes, con admiración respeto muchas gracias.

## RESUMEN

Se estudió el efecto de tres concentraciones (1 %, 2 % y 3 %) de aguas residuales del procesamiento primario de *Engraulis ringens* “anchoveta” (ARPA) en el crecimiento y contenido de proteínas de *Spirulina maxima*. Las mayores concentraciones de biomasa de *Sp. maxima* al octavo día de cultivo se obtuvieron con 2 % y 3 % de ARPA con valores de 0,723 g L<sup>-1</sup> y 0,556 g L<sup>-1</sup>, respectivamente. La mayor tasa de crecimiento ( $\mu$ ) en biomasa de *Sp. maxima* al octavo día de cultivo estuvo con 2 % de ARPA (0,248 d<sup>-1</sup>); asimismo, los menores valores de tiempo de duplicación (TD) se determinaron con 2 % (2,796 d) y 3 % (3,242 d) de ARPA y los mayores porcentajes de proteínas se obtuvieron en los cultivos dosificados con 2 % (58,11 %) y 3 % (59,24 %) de ARPA, concluyéndose que el mejor tratamiento fue con 2 % de ARPA.

**Palabras Clave:** Microalga, *Spirulina maxima*, agua residual, procesamiento de anchoveta, crecimiento, biomasa, proteínas.

## ABSTRACT

The effect of three concentrations (1 %, 2 % and 3 %) of wastewater from the primary processing of *Engraulis ringens* “anchoveta” (ARPA) on the growth and protein content of *Spirulina maxima* was studied. The highest concentrations of biomass of *Sp maxima* on the eighth day of culture were obtained with 2 % and 3 % of ARPA with values of 0,723 g L<sup>-1</sup> and 0.556 g L<sup>-1</sup>, respectively. The highest growth rate ( $\mu$ ) in biomass of *Sp. maxima* on the eighth day of culture, was 2 % ARPA (0,248 d<sup>-1</sup>); likewise, the lowest values of duplication time (TD) were determined with 2 % (2,796 d) and 3 % (3,242 d) of ARPA and the highest percentages of proteins were obtained in the cultures dosed with 2 % (58,11%) and 3 % (59,24 %) of ARPA, concluding that the best treatment was 2 % ARPA.

**Key Words:** Microalgae, *Spirulina maxima*, wastewater, anchovy processing, growth, biomass, proteins.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA .....	v
AGRADECIMIENTOS .....	vi
RESUMEN .....	vii
ABSTRACT .....	viii
NDICE DE CONTENIDOS.....	ix
ÍNDICE DE TABLAS .....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xii
INDICE DE ANEXOS.....	xiii
I. INTRODUCCIÓN .....	1
Objetivos general .....	5
Objetivos específicos .....	5
Hipótesis .....	5
II. MATERIALES Y MÉTODOS .....	6
2.1. Localización del experimento .....	6
2.2. Material experimental.....	6
2.2.1. Material biológico.....	6
2.2.2. Preparación del inóculo .....	6
2.3. Preparación de los medios de cultivo.....	7
2.3.1. Medio Zarrouk.....	7
2.3.2. Preparación del medio de cultivo (ARPA).....	7
2.4. Preparación de las unidades experimentales.....	8
2.5. Evaluación de los parámetros ambientales del cultivo .....	9
2.6. Determinación del crecimiento de <i>Sp. maxima</i> .....	10
2.7. Determinación del contenido de proteínas en <i>Sp. maxima</i> .....	10
2.8. Análisis estadístico de los datos .....	12
III. RESULTADOS.....	13
3.1. Parámetros ambientales del cultivo .....	13
3.1.1. Temperatura .....	13
3.1.2. pH.....	14
3.2. Crecimiento en biomasa de <i>Sp. maxima</i> .....	14
3.3. Contenido de proteínas en <i>Sp. maxima</i> .....	17

IV. DISCUSIÓN.....	19
V. CONCLUSIONES .....	25
VI. RECOMENDACIONES.....	26
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	27
VIII. ANEXOS.....	35

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición química del medio de cultivo Zarrouk.....	7
Tabla 2. Composición de solución micronutrientes del medio Zarrouk .....	7
Tabla 3. Composición base del medio ARPA.....	8
Tabla 4. Constituyentes de los cultivos de <i>Sp. maxima</i> dosificados con ARPA.....	8
Tabla 5. Aporte de N inorgánico y orgánico, y P de los medios de cultivo de <i>Sp. maxima</i> .....	9
Tabla 6. Contenido en biomasa ( $\text{g L}^{-1}$ ) de <i>Sp. maxima</i> cultivados con medio ARPA y control Z.....	15
Tabla 7. Tasa de crecimiento ( $\mu$ ) y Tiempo de duplicación en biomasa (TD) de <i>Sp. maxima</i> en los cultivados con ARPA y control Z.....	17
Tabla 8. Contenido de proteínas (%) y biomasa ( $\text{mg L}^{-1}$ ) en el octavo día de cultivo de <i>Sp. maxima</i> en los tratamientos con ARPA y control Z.....	17

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de las unidades experimentales de los cultivos de <i>Sp. maxima</i> .....	9
Figura 2. Flujograma para determinar el contenido de proteínas totales de <i>Sp. maxima</i> en los cultivos, según Lowry <i>et al.</i> (1951).....	11
Figura 3. Variación de la temperatura (°C) de los cultivos de <i>Sp. maxima</i> dosificados con 3 concentraciones de ARPA.....	13
Figura 4. Variación del pH de los cultivos de <i>Sp. maxima</i> dosificados con 3 concentraciones de ARPA..	14
Figura 5. Variación del peso seco de <i>Sp. maxima</i> cultivados con medio ARPA y control Z.....	16
Figura 6. Coloración de los cultivos de <i>Sp. maxima</i> dosificados con ARPA. ....	16
Figura 7. Contenido porcentual de proteínas de los cultivos de <i>Sp. maxima</i> dosificados con ARPA.....	18
Figura 8. Contenido de proteínas (mg L <sup>-1</sup> ) de los cultivos de <i>Sp. maxima</i> dosificados con ARPA.....	18

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Temperatura (°C) en los cultivos de <i>Sp. máxima</i> con ARPA y control Z. ....	36
Anexo 2. Temperatura promedio (°C; ±D.E.) en los cultivos de <i>Sp. maxima</i> con ARPA y control z. ....	36
Anexo 3. Valores de pH en los cultivos de <i>Sp. maxima</i> con ARPA y control Z.....	37
Anexo 4. Valores de pH promedio (± D.E.) en los cultivos de <i>Sp. maxima</i> con ARPA y control Z. ....	37
Anexo 5. Peso seco (g L <sup>-1</sup> ; ±D.E.) de <i>Sp. maxima</i> con ARPA y control Z. ....	38
Anexo 6. Tasa de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación en biomasa (TD) de <i>Sp. maxima</i> con ARPA y control Z. ....	38
Anexo 7. Biomasa, absorbancia, porcentaje y biomasa de proteínas de <i>Sp. maxima</i> cultivada con ARPA y control Z al octavo día de cultivo. ....	39
Anexo 8. Curva de calibración con seroalbúmina para la determinación de proteínas totales de la microalga <i>Sp. maxima</i> con corrección a cero utilizando blanco de reactivos. ....	39

## I. INTRODUCCIÓN

Las microalgas son fuente natural, de una gran variedad de sustancias como DHA (ácido docosahexaenoico) y EPA (ácido eicosapentaenoico), carotenoides, pigmentos, proteínas, ficocianina, ficoeritrina, exopolisacáridos y vitaminas como la A, B1, B2, B6, C, y E, minerales, ácidos grasos poliinsaturados (omega 3 y omega 6) y antioxidantes (carotenos) y otros productos químicos de interés (Abalde *et al.*, 1995; Colla *et al.*, 2007; Del Campo *et al.*, 2007; Quevedo *et al.*, 2008; Ulloa, 2011; Salazar, 2012; Thirumala, 2012), y algunas especies con un alto contenido de proteínas son poco utilizadas por sus elevados costos de producción que impide competir con los alimentos tradicionales (Quevedo *et al.*, 2008; Ulloa, 2011; Madkour *et al.*, 2012; Salazar, 2012).

Las microalgas habitan aguas marinas, dulces y salobres, con una gran diversidad de especies (Licet, 2008; Andrade *et al.*, 2009; Garibay *et al.*, 2009), formas y tamaños, capaces de sobrevivir en diferentes hábitats (Abalde *et al.*, 1995; Chojnacka & Noworyta, 2004; Colla *et al.*, 2007; Licet, 2008; Ruiz, 2011; Salazar, 2012). Estas requieren de adecuadas condiciones ambientales para su crecimiento como la luz, temperatura CO<sub>2</sub>, pH, fotoperiodo y nutrientes, y utilizan moléculas orgánicas y micronutrientes como catalizadores, a fin de producir lípidos, proteínas y carbohidratos a gran velocidad de crecimiento en menores tiempos (Becker, 1994; Hu *et al.*, 2008; Palomino *et al.*, 2010).

En general las microalgas tienen la capacidad de convertir sustancias inorgánicas en azúcares simples mediante la captura de energía luminosa (Andrade & Costa, 2007; Honty, 2010; Ruiz, 2011), existiendo algunas especies capaces de crecer metabolizando materia orgánica como fuente de energía o de carbono (Andrade & Costa, 2007; Ruiz, 2011). Además, por sus altas tasas de crecimiento y producción de biomasa son potencialmente útiles para la producción a gran escala considerando que la elección de determinada especie debe tener en cuenta su tasa de crecimiento y composición química (Licet, 2008; Borges *et al.*, 2010; Chen, 2011), así como variables influenciadas por otros factores, tales como el medio de cultivo, edad del cultivo, intensidad

luminosa, temperatura, salinidad y fotoperiodo (Garibay *et al.*, 2009; Chen, 2011).

También las microalgas son importantes para la acuicultura por su utilización como alimento natural de alto valor nutricional y bajo costo, de gran aceptabilidad por la mayoría de las especies en cultivo en sus primeras etapas, y también por su tamaño que posibilita su consumo directo por peces pequeños y organismos filtradores (Basurto, 1994), en tal sentido, Band (1999) considera que *Spirulina* sp. es una cianofita muy utilizada en la acuicultura como alimento para zooplancton como *Artemia* que a su vez sirven para alimentar diversos organismos acuáticos como crustáceos y peces.

Las cianofitas, como *Spirulina*, son microorganismos procariotas conteniendo pigmentos (clorofila a, ficobiliproteínas, carotenoides) para realizar fotosíntesis oxigénica o anoxigénica bajo determinadas condiciones ambientales y su versatilidad metabólica está relacionada con su grado de adaptación a condiciones ambientales extremas de temperatura, pH, salinidad y limitación de nutrientes (Whitton & Potts, 2000).

*Spirulina* se caracteriza por ser planctónica y filamentosa que crecen en hábitats tropicales, subtropicales y aguas templadas (Vonshak, 1997; Colla *et al.*, 2007; Rodrigues *et al.*, 2011; Madkour *et al.*, 2012), y es importante por su alto contenido de proteína utilizado como suplemento en la alimentación humana, animales y peces, y por sus numerosos componentes bioactivos como vitaminas, ácidos grasos poliinsaturados, aminoácidos esenciales, minerales, biopigmentos y antioxidantes (Kamat, 1995; Abu *et al.*, 2007; Pandey & Tiwari, 2010; Pandey *et al.*, 2010; Madkour *et al.*, 2012; Thirumala, 2012).

Las cianofitas, por ser procariotas comparten semejanzas con las bacterias, especialmente las de nutrición, en tal sentido, *Spirulina* se comporta como heterótrofa facultativa capaz de asimilar el nitrógeno orgánico procedente de residuos o efluentes pesqueros e industriales.

Diversas actividades productivas pesqueras generan residuos o efluentes orgánicos, así tenemos que el proceso productivo de la industria anchovetera se generan diversos residuos tales como el agua de bombeo, sanguaza y agua de cola (CONAM, 1995; Cabrera, 2002; Alva, 2009); los procesos artesanales e industriales de “langostinos” y “concha de abanico” generan residuos que pueden constituir hasta el 50 % de su peso, que por su contenido de proteínas y otros nutrientes pueden ser aprovechados en procesos biológicos de ensilaje en los cultivos de microorganismo, aperturando nuevas formas de aprovechamiento de sustancias residuales (Berenz, 1996; Encomendero & Uchpa, 2002).

En región Ancash, la industria pesquera industrial y de consumo humano directo vienen generando residuos cuyo destino final es el ambiente marino ocasionando perturbaciones en las condiciones acuáticas y biota marina siendo necesario desarrollar metodologías y/o estrategias tendientes a controlar o minimizar sus efectos negativos mediante el reciclaje de tales residuos y cumplir con las normas de control estatales establecidos y evitar las correspondientes multas (Alva, 2009).

Existen grandes impactos negativos por la emisión directa de residuos pesqueros al ambiente, contaminando los ambientes acuáticos y terrestres, en tal sentido, dado la facilidad que tienen las microalgas de metabolizar nutrientes orgánicos e inorgánicos, son eficientemente utilizados en el tratamiento de las aguas residuales (Romero, 2011) con la ventaja de mejorar la calidad de los efluentes líquidos y preservar el ambiente, la salud y la calidad de vida. Adicionalmente, por su alta sensibilidad a los efluentes industriales, las microalgas pueden ser utilizadas como indicadores biológicos de contaminación respecto a la calidad de las aguas (Gómez & Ramírez, 2004).

La presencia de diversos elementos en los efluentes industriales hacen difícil desarrollar un método adecuado para su tratamiento que por sus características de bioadsorción y bioacumulación debe equilibrarse en el sistema (Travieso *et al.*, 1999), se recomienda realizar un tratamiento preliminar para remover la materia orgánica y sólidos suspendidos a fin de

minimizar la interferencia de algunas sustancias, especialmente las nitrogenadas previo a su empleo en el cultivo de microalgas (Silva *et al.*, 2011).

En la búsqueda de un medio de cultivo alternativo para el cultivo de microalgas, se ha recurrido al uso de diversos insumos evaluando su influencia en el crecimiento y composición química a fin de reducir los costos y mejorar la producción. Entre los trabajos realizados con medios no convencionales podemos mencionar el de Gómez *et al.* (2011), quienes utilizando residuos de pollos en el cultivo de *Chlorella sp.* determinaron densidades máximas de  $7,93 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup>, con  $56,15 \mu\text{g mL}^{-1}$  de proteínas.

Las microalgas presentan mucho interés por la industria acuícola y biotecnológica por la producción de sustancias alimenticias (proteínas, lípidos y carbohidratos), utilizadas para la elaboración de alimentos y en la industria farmacéutica (Fábregas *et al.*, 1984; Pulz *et al.*, 2001; Licet, 2008). También son utilizadas exitosamente en aplicaciones ecologistas (Pulz *et al.*, 2001; Markou *et al.*, 2011), aunque es importante evaluar aspectos económicos de rentabilidad en el uso de las aguas residuales del procesamiento pesquero para la producción de biomasa y fuente de proteínas.

Las microalgas se pueden cultivar de manera fotoautótrofa, fotoheterótrofa, heterótrofa o mixótrofa, siendo la forma fotoautótrofa el método de producción de microalgas más utilizado a gran escala que resulta económicamente rentable y técnicamente viable en el caso de que no haya producción de energía (Chojnacka & Noworyta, 2004; Brennan & Owende, 2010).

Las microalgas son capaces de metabolizar materia orgánica residual y en base a ensayos previos realizados con *Sp. maxima* utilizando aguas residuales del procesamiento de anchoveta, la producción de biomasa microalgal permitirá desarrollar una metodología de su cultivo masivo.

La utilización de aguas residuales del procesamiento primario de *Engraulis ringens* “anchoveta” (ARPA) en el cultivo de *Sp. maxima* permitirá minimizar o eliminar las actuales perturbaciones del ambiente acuático que recepciona

tales aguas residuales mejorando la salubridad del ambiente marino mediante la eliminación de sustancias nocivas o de nutrientes que afectan negativamente el hábitat y la biota presente en ella.

En consecuencia, la importancia del presente trabajo de investigación radica principalmente en la biotransformación de las aguas residuales del procesamiento primario de “anchoveta” en biomasa microalgal y proteínas de *Sp. maxima*, que pueden ser utilizados en hatcheries como alimento de organismos acuáticos, alimentación humana y reducir la contaminación del ambiente marino., por lo que planteamos el siguiente problema de investigación: ¿Cuál será el efecto de diferentes concentraciones de aguas residuales del procesamiento primario de *Engraulis ringens* “anchoveta” (ARPA) en el crecimiento y contenido de proteínas de *Spirulina maxima*?

Objetivo general:

Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de aguas residuales del procesamiento primario de *Engraulis ringens* “anchoveta” en el crecimiento y contenido de proteínas de *Spirulina maxima*.

Objetivos específicos:

- Determinar la variación de biomasa ( $\text{mg L}^{-1}$ ) de *Spirulina maxima* cultivada con concentraciones de 1, 2 y 3 % de ARPA en condiciones de laboratorio.
- Determinar la tasa de crecimiento ( $\text{d}^{-1}$ ) y tiempo de duplicación (TD) de *Spirulina maxima* cultivada con concentraciones de 1, 2 y 3 % de ARPA en condiciones de laboratorio.
- Determinar el contenido de proteínas (%) de *Spirulina maxima* cultivada con concentraciones de 1, 2 y 3 % de ARPA en condiciones de laboratorio.

Hipótesis:

Si cultivamos *Spirulina maxima* con diferentes concentraciones (1, 2 y 3 %) de ARPA se obtendrá mejor crecimiento y mayor contenido de proteínas con la concentración del 2 % de ARPA.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Localización del experimento

El experimento fue desarrollado en el laboratorio de Genética de la E.A.P. Biotecnología, Facultad de Ciencias en la Universidad Nacional del Santa.

### 2.2. Material experimental

#### 2.2.1. Material biológico

La microalga *Sp. maxima* se obtuvo del Laboratorio de Cultivos de Especies Auxiliares de la E.A.P. Biología en Acuicultura de la Facultad de Ciencias en la Universidad Nacional del Santa.

#### 2.2.2. Preparación de inóculo

Los inóculos de *Sp. maxima* fueron realizados utilizando agua de mar y agua dulce tratada con hipoclorito de sodio al 4 % ( $1\text{ mL L}^{-1}$ ) durante 24 h antes de ser neutralizada con tiosulfato de sodio al 15 % ( $1\text{ mL L}^{-1}$ ) aplicando vigorosa aireación ( $5\text{ L min}^{-1}$ ) por 1 h para volatilizar el cloro residual. Los inóculos se iniciaron en 2 matraces de 500 mL con 200 mL volumen efectivo de cultivo fertilizados con medio Zarrouk durante por 10 días con iluminación constante (2000 lux) y agitados manualmente. Luego los cultivos fueron diluidos en 2 botellas de 1500 mL con un volumen efectivo de 1000 mL y mantenidos con iluminación (2000 lux) y aireación ( $500\text{ mL min}^{-1}$ ) constantes.

### 2.3. Preparación de los medios de cultivo

#### 2.3.1. Medio Zarrouk

El medio de cultivo modificado de Zarrouk fue preparado según Aiba & Ogawa (1977) cuyos ingredientes se muestran en las tablas 1 y 2.

Tabla 1. Composición química del medio de cultivo Zarrouk.

SOLUCIÓN STOCK (SS)	VOLUMEN	COMPONENTES	CONCENTRACIÓN
SS-1	500 mL	NaHCO <sub>3</sub>	13,61 g
		Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	4,03 g
		K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,50 g
SS-2	500 mL	NaNO <sub>3</sub>	2,50 g
		K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,00 g
		NaCl	1,00 g
		MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,20 g
		CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,04 g
		FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01 g
		EDTA (Titriplex III)	0,08 g
		Solución de Micronutrientes (Aiba & Ogawa, 1977)	6,0 mL

Tabla 2. Composición de solución micronutrientes del medio Zarrouk.

COMPONENTES	CONCENTRACIÓN STOCK (g L <sup>-1</sup> )	CANTIDAD EN EL MEDIO FINAL (mL)
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,00	1,00
MnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,00	1,00
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10,00	1,00
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> .6H <sub>2</sub> O	1,00	1,00
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	1,00	1,00
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,005	1,00

### 2.3.2. Preparación del medio de cultivo ARPA

El agua residual fue colectada de la poza de decantación secundaria de una empresa que procesa recursos hidrobiológicos en la ciudad de Chimbote en un balde plástico de 4 L con tapa y traslada al laboratorio de Cultivos de Especies Auxiliares de la Universidad Nacional del Santa, donde se procedió su filtrado con malla de Nyltal de 100 µm y 10 µm y guardada en refrigeración hasta la utilización. Las diluciones del medio de cultivo ARPA fueron realizadas con agua potable tratada y dosificadas con 5g de bicarbonato de sodio y llevada a 5 ups de salinidad con cloruro de sodio.

Se determinaron la humedad, proteínas, lípidos, cenizas, sólidos totales y materia orgánica del ARPA según AOAC (1995) y el contenido de sulfuros, nitratos, nitritos, amonio y fosfatos según APHA (2005), que fueron realizados en el Laboratorio de Biología y Ecología de la Universidad Nacional del Santa (Tabla 3). Cabe destacar el elevado aporte de materia orgánica nitrogenada y de fosfatos.

Tabla 3. Composición base del medio ARPA.

PARÁMETROS	CONCENTRACIÓN
Humedad (%)	98,13
Materia orgánica (%)	1,78
Sólidos Totales (mg L <sup>-1</sup> )	18170,00
Proteínas (mg L <sup>-1</sup> )	6942,00
Lípidos (mg L <sup>-1</sup> )	1240,00
Cenizas (mg L <sup>-1</sup> )	870,00
Sulfuros (mg L <sup>-1</sup> )	0,91
Nitratos (mg-N L <sup>-1</sup> )	137,19
Nitritos (mg-N L <sup>-1</sup> )	4,11
Amonio (mg-N L <sup>-1</sup> )	81,20
Fosfatos (mg-P L <sup>-1</sup> )	118,36

#### 2.4. Preparación de las unidades experimentales

Los cultivos fueron realizados en 12 botellas plásticas de 1500 mL de volumen total y con 1000 mL de volumen efectivo (Tabla 4), iniciándose con 0,10 g L<sup>-1</sup> de biomasa y colocados al azar en un estante metálico (Fig. 1).

Tabla 4. Constituyentes de los cultivos de *Sp. maxima* dosificados con ARPA.

PARÁMETROS	ARPA (%)			
	0	1	2	3
Agua Residual (mL)	0	10	20	30
Agua Potable (mL)	900	890	880	870
Inóculo (mL)	100	100	100	100
TOTAL (mL)	1000	1000	1000	1000

Tabla 5. Aporte de nitrógeno N inorgánico y orgánico, y P, de los medios de cultivo de *Sp. maxima*.

Parámetro	ARPA (100%)	Control (Z)	ARPA (%)		
			1	2	3
N inorgánico (mg L <sup>-1</sup> )	222,50	412,00	2,23	4,45	6,68
N orgánico (mg L <sup>-1</sup> )*	1110,72	0,00	11,11	22,21	33,32
P (mg L <sup>-1</sup> )	118,36	88,92	1,18	2,37	3,55

\* : Valores obtenidos con un factor proteico de 6,25.

Los valores porcentuales de ARPA fueron determinados previamente en laboratorio y cada tratamiento fueron realizados por triplicado.



Figura 1. Distribución de las unidades experimentales de los cultivos de *Sp. maxima*.

## 2.5. Evaluación de los parámetros ambientales del cultivo

Se registró diariamente en cada unidad experimental el pH y la temperatura, utilizando un pHmetro digital marca Hanna ( $\pm 0,01$  unidades) y un termómetro digital marca Boeco ( $\pm 0,1$  °C), respectivamente.

La aireación fue proporcionada por un blower de 1/2 HP y conducida con tubos de PVC de 1/2" y mangueras de 0,5 cm de diámetro con llaves. La aireación fue medida periódicamente con un flujómetro Cole Parmer ( $\pm 10$  mL min<sup>-1</sup>) y la

iluminación suministrada por un fluorescente de 40 w cuya intensidad fue medida con luxómetro digital Hanna ( $\pm 0,1$  lux).

## 2.6. Determinación del crecimiento de *Sp. maxima*

El crecimiento fue determinado en biomasa seca diaria ( $\text{g L}^{-1}$ ) de los cultivos mediante lecturas de absorbancia a 560 nm, tomando 5 mL de muestra microalgal de cada unidad experimental, según Leduy & Therien (1977), cuya curva de calibración de la relación biomasa vs densidad óptica fue determinada previamente en espectrofotómetro UV-VIS con celda de cuarzo de 1 cm.

La biomasa microalgal de *Sp. maxima* fue determinada diariamente, y la tasa de crecimiento ( $\mu$ ) y el tiempo de duplicación diaria (TD) fueron calculados al octavo día según Levasseur *et al.* (1993) aplicando las fórmulas siguientes:

$$\mu = \frac{\ln(B_f/B_0)}{T_f - T_0} \qquad TD = \frac{\ln(2)}{\mu}$$

Donde  $B_0$  y  $B_f$  corresponden al peso seco de *Sp. maxima* (biomasa) en gramos al inicio ( $T_0$ ) y final ( $T_f$ ) del cultivo, respectivamente.

## 2.7. Determinación del contenido de proteínas en *Sp. maxima*

El contenido de proteínas totales empleando el método colorimétrico de Lowry *et al.* (1951) fueron determinados al final de la experiencia según el siguiente flujograma (Fig. 2).

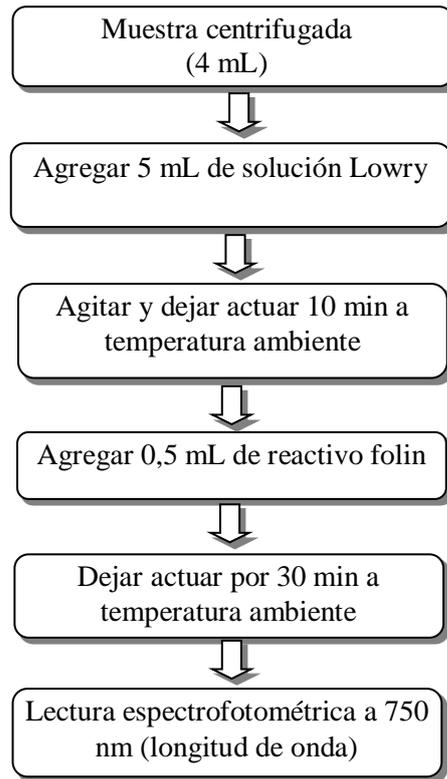


Figura 2. Flujograma para determinar el contenido de proteínas totales de *Sp. maxima* en los cultivos, según Lowry *et al.* (1951).

De cada unidad experimental fue centrifugado 4 mL del cultivo microalgal a 10000 rpm por 10 min, eliminándose el sobrenadante y la pasta de microalga y secada en estufa a 60 °C por 3 h. La muestra seca fue colocada en tubos de ensayo y se agregó 5 mL de solución de Lowry que luego de agitado se dejó a temperatura ambiente por 10 min y se agregó 0,5 mL de reactivo Folin por 30 min a temperatura ambiente. Las lecturas de absorbancia se midieron en espectrofotómetro a 750 nm de longitud de onda.

En la elaboración de la curva de calibración (anexo 8), se recurre a seroalbúmina bovina como patrón en concentraciones conocidas y para la determinación de las proteínas totales (P) se aplicó la siguiente ecuación:

$$P (\%) = \frac{\left( \left( \frac{\text{Absorbancia}}{p} \right) \times V \right)}{M} \times 100$$

Donde:

- V : Volumen final de muestra analizada (10 mL).  
M : Peso equivalente al peso seco (mg) en 4 mL de cultivo.  
p : Pendiente de la curva de calibración (3,1487).

La biomasa de proteínas (PB) es determinada mediante la siguiente fórmula:

$$PB \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = \frac{P \times B}{100}$$

Donde:

P: Porcentaje de proteínas (%).

B: Biomasa seca (mg L<sup>-1</sup>).

## 2.8. Análisis estadístico de los datos

Los datos de crecimiento en biomasa y contenido de proteínas de *Sp. maxima*, temperatura y pH, de todos los tratamientos fueron sometidos al análisis de varianza (ANOVA) para establecer diferencias entre sus promedios (Steel & Torrie, 1988). Además, se utilizó el test de Tukey HSD para establecer el mejor promedio. Para ambos casos se aplicó un nivel de significancia de 0,05. Todo el tratamiento estadístico se desarrolló utilizando los programas, Microsoft Office Excel 2013 y SPSS 21.0 para Microsoft Windows 8.1.

### III. RESULTADOS

#### 3.1. Parámetros ambientales del cultivo

##### 3.1.1. Temperatura

La temperatura en las unidades experimentales con *Sp. maxima* varió de 23,5 a 24,6 °C siendo estadísticamente similares ( $p>0,05$ ) en todos los días del cultivo (Fig. 3).

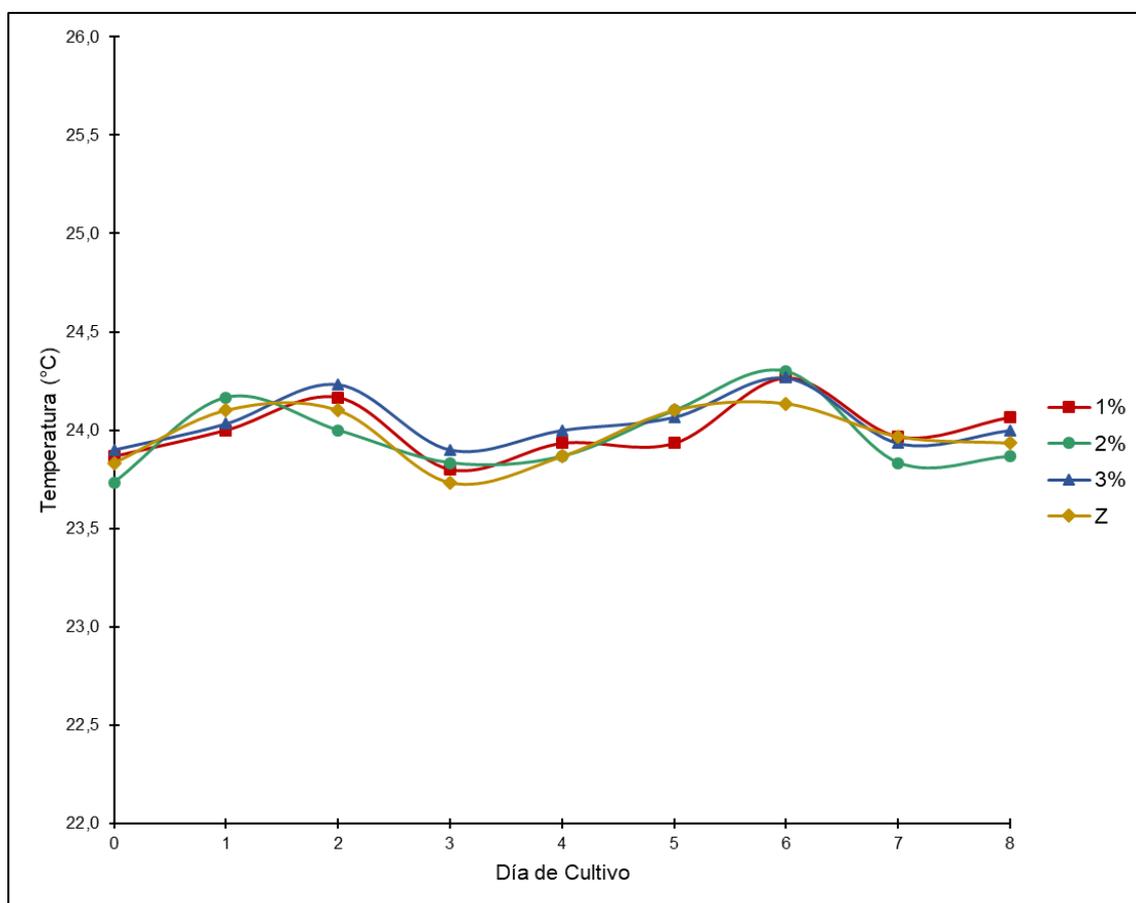


Figura 3. Variación de la temperatura (°C) de los cultivos de *Sp. maxima* dosificados con 3 concentraciones de ARPA.

### 3.1.2. pH

Los valores del pH en los cultivos de *Sp. maxima* variaron de 8,13 a 9,35 mostrando paulatinos incrementos (Fig. 4) y no mostrar diferencias estadísticamente significativas ( $p>0,05$ ). Inicialmente los valores de pH fueron estadísticamente similares ( $p>0,05$ ) con valores entre 8,15 y 8,16, no obstante que en los días 2 y 3 los mayores valores se presentan en los dosificados con 2 % (8,61) y 3 % (8,61) de ARPA. Sin embargo, en los siguientes días se observa mayores incrementos en los tratamientos con 2 % y 3 % de ARPA (Fig. 5).

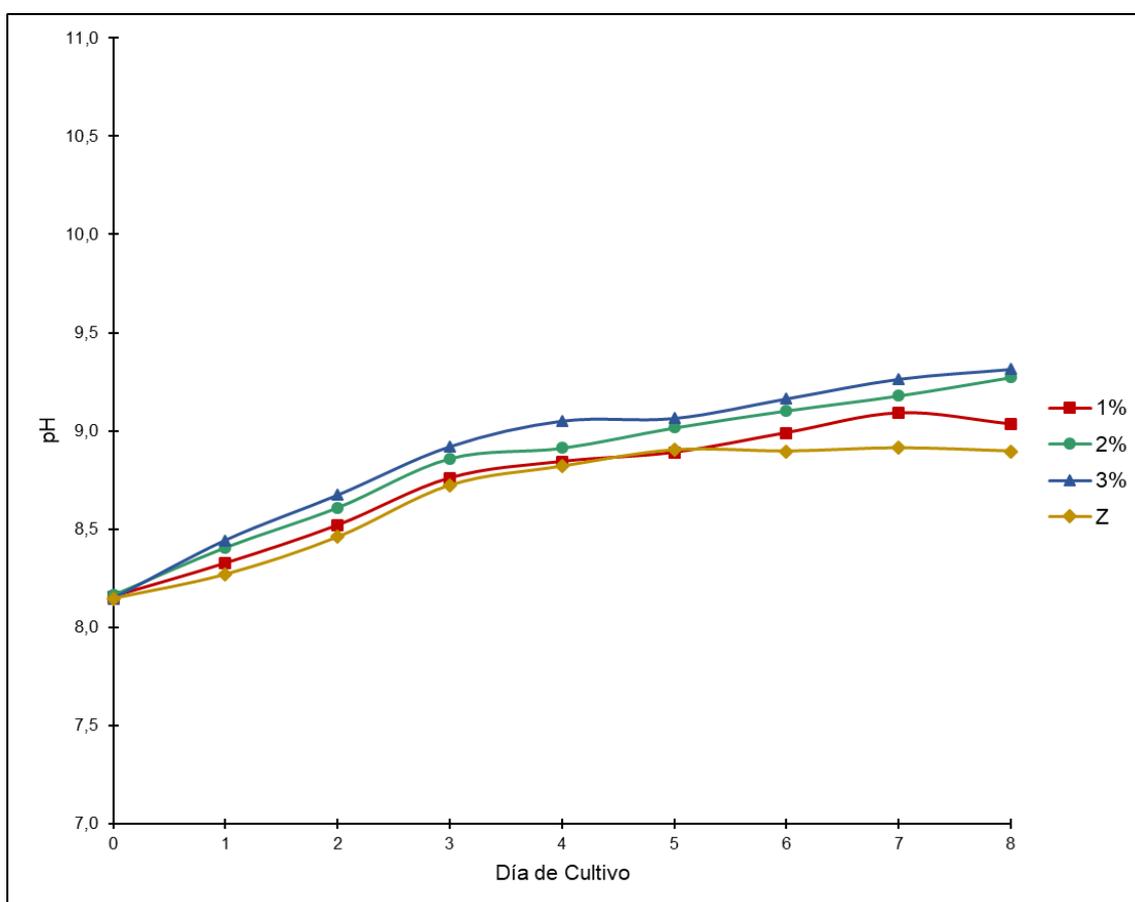


Figura 4. Variación del pH de los cultivos de *Sp. maxima* dosificados con 3 concentraciones de ARPA.

### 3.2. Crecimiento en biomasa de *Sp. maxima*

Los cultivos de *Sp. maxima* iniciados con  $0,100 \text{ g L}^{-1}$  muestran incrementos progresivos en todos los tratamientos siendo los tratamientos y los dosificados con 2 % de ARPA los que alcanzaron mayores valores en biomasa durante los

8 días que duraron las experiencias. Sin embargo, en los 3 primeros días todos los tratamientos presentaron similares incrementos de biomasa.

A partir del día 4 los dosificados con 2% de ARPA presentó un mayor crecimiento estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) con  $0,416 \text{ g L}^{-1}$ ; seguido del tratamiento con 3 % ( $0,384 \text{ g L}^{-1}$ ) y del 1 % ( $0,281 \text{ g L}^{-1}$ ). En el día 5, los de 2 % de ARPA fueron mayores ( $0,538 \text{ g L}^{-1}$ ), asimismo, este comportamiento se mantuvo durante los siguientes días, así tenemos que en los días 6, 7 y 8 sus valores fueron de  $0,617$ ;  $0,627$  y  $0,723 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente (Tabla 6 y Fig. 5).

Tabla 6. Contenido en biomasa ( $\text{g L}^{-1}$ ) de *Sp. maxima* cultivados con medio ARPA y control Z.

DÍA DE CULTIVO	ARPA (%)			
	CONTROL (Z)	1	2	3
0	$0,100 \pm 0,010a$	$0,100 \pm 0,006a$	$0,100 \pm 0,009a$	$0,100 \pm 0,008a$
1	$0,141 \pm 0,005a$	$0,133 \pm 0,005ab$	$0,127 \pm 0,002b$	$0,136 \pm 0,004ab$
2	$0,196 \pm 0,003a$	$0,174 \pm 0,003b$	$0,188 \pm 0,008a$	$0,170 \pm 0,005b$
3	$0,272 \pm 0,011a$	$0,234 \pm 0,005c$	$0,253 \pm 0,004b$	$0,225 \pm 0,007c$
4	$0,375 \pm 0,020b$	$0,281 \pm 0,011c$	$0,416 \pm 0,006a$	$0,384 \pm 0,004b$
5	$0,510 \pm 0,030ab$	$0,351 \pm 0,008c$	$0,538 \pm 0,007a$	$0,469 \pm 0,009b$
6	$0,602 \pm 0,017a$	$0,404 \pm 0,016c$	$0,617 \pm 0,010a$	$0,518 \pm 0,016b$
7	$0,643 \pm 0,015a$	$0,423 \pm 0,010c$	$0,627 \pm 0,026a$	$0,526 \pm 0,022b$
8	$0,697 \pm 0,023a$	$0,434 \pm 0,017c$	$0,723 \pm 0,039a$	$0,556 \pm 0,034b$

Letras diferentes en la misma fila, indica diferencia significativa ( $\alpha=0,05$ ).

La coloración de todos los cultivos presenta la coloración verde azulado característica de las cianofitas creciendo en buenas condiciones (Fig. 6).

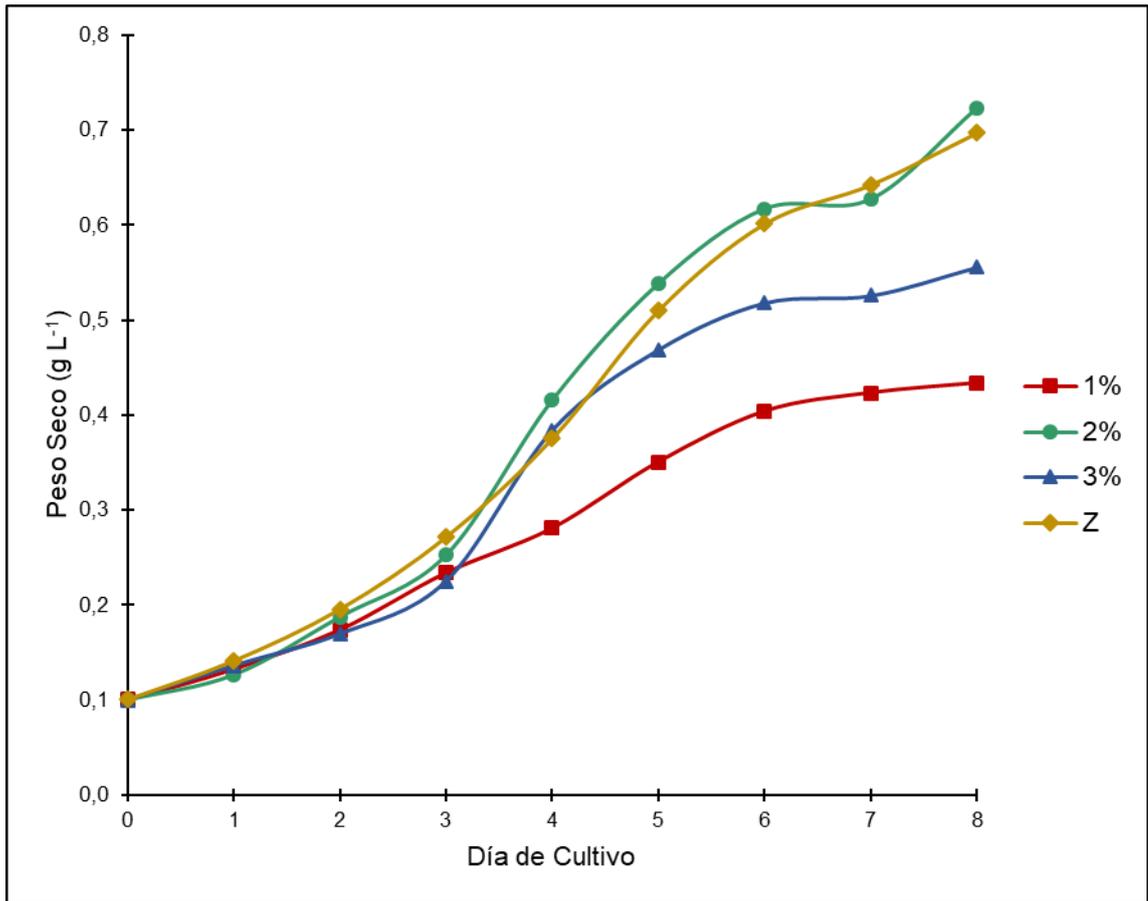


Figura 5. Variación del peso seco de *Sp. maxima* cultivados con medio ARPA y control Z.



Figura 6. Coloración de los cultivos de *Sp. maxima* dosificados con ARPA.

Respecto a la tasa de crecimiento ( $\mu$ ) y el tiempo de duplicación (TD), los cultivos de *Sp. maxima* dosificada con 2 % de ARPA al final de la experiencia, presentaron los mejores valores estadísticamente similares a los controles, sin embargo, los valores de TD de los cultivos controles y los dosificados con 2 % y 3 % de ARPA fueron estadísticamente similares (Tabla 7).

Tabla 7. Tasa de crecimiento ( $\mu$ ) y Tiempo de duplicación en biomasa (TD) de *Sp. maxima* en los cultivados con ARPA y control Z.

PARÁMETRO	ARPA (%)			
	0	1	2	3
$\mu$ (d <sup>-1</sup> )	0,243 ±0,012ab	0,184 ±0,011c	0,248 ±0,007a	0,215 ±0,016bc
TD (d)	2,857 ±0,145a	3,777 ±0,240b	2,796 ±0,079a	3,242 ±0,255a

Letras diferentes en la misma fila, indica diferencia significativa ( $\alpha=0,05$ ).

### 3.3. Contenido de proteínas en *Sp. maxima*

El contenido porcentual de proteínas de los cultivos de *Sp. máxima*, al final de la experiencia, fueron significativamente similares ( $p<0,05$ ) en los dosificados con 2 % y 3 % de ARPA con 58,11 % y 59,24 % y el control (56,42%), mientras que el contenido de proteínas expresados en mg L<sup>-1</sup>, los cultivos controles y los dosificados con 2% de ARPA fueron estadísticamente similares (Tabla 8, Fig. 7 y 8).

Tabla 8. Contenido de proteínas (%) y biomasa seca (mg L<sup>-1</sup>) en el octavo día de cultivo de *Sp. maxima* en los tratamientos con ARPA y control Z.

PARÁMETROS	ARPA (%)			
	0	1	2	3
Biomasa (mg L <sup>-1</sup> )	697,33 ±22,50a	433,67 ±17,24c	723,33 ±38,73a	556,00 ±34,04b
Proteínas (%)	56,42 ±1,91a	48,76 ±2,19b	58,11 ±1,16a	59,24 ±1,37a
Proteínas (mg L <sup>-1</sup> )	393,71 ±25,16a	211,24 ±5,95c	420,03 ±14,37a	329,09 ±12,94b

Letras diferentes en la misma fila, indica diferencia significativa ( $\alpha<0,05$ ).

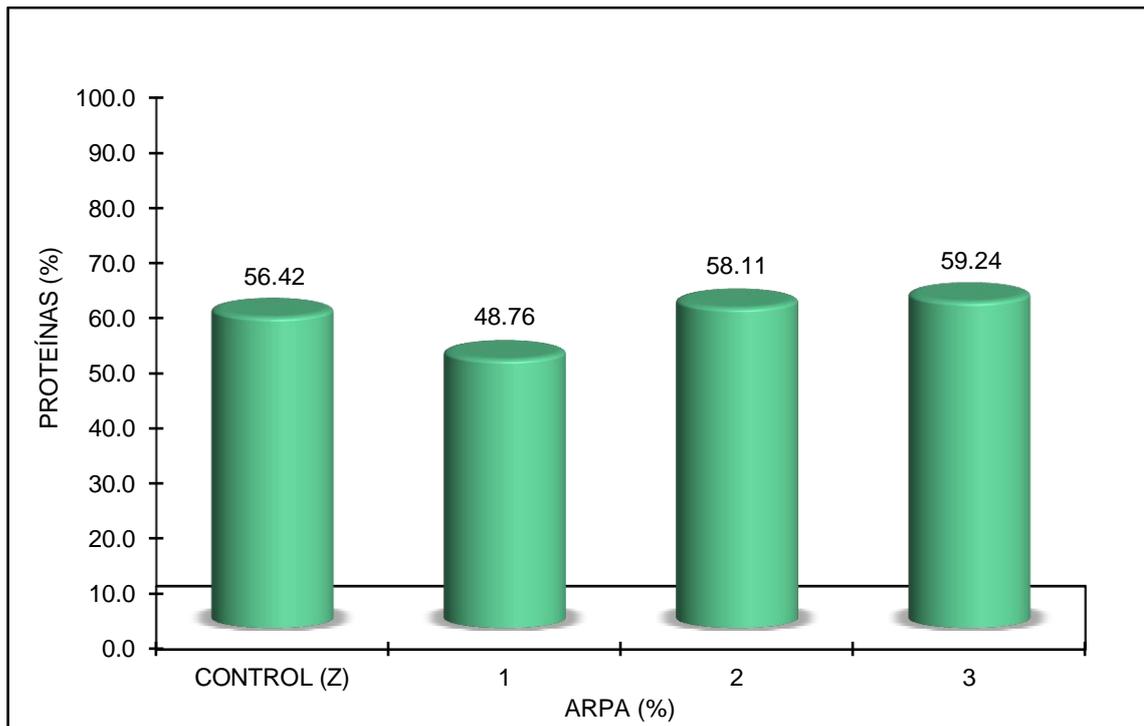


Figura 7. Contenido porcentual de proteínas de los cultivos de *Sp. maxima* dosificados con ARPA.

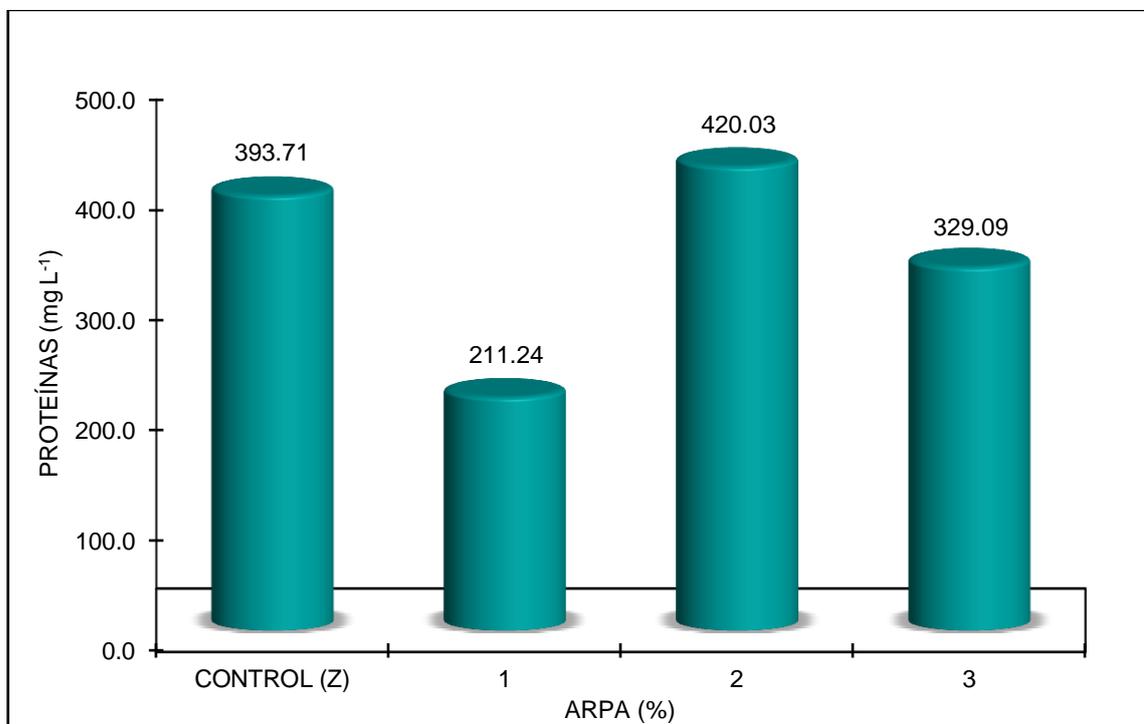


Figura 8. Contenido de proteínas (mg L<sup>-1</sup>) de los cultivos de *Sp. maxima* dosificados con ARPA.

#### IV. DISCUSIÓN

Las condiciones de cultivo de las microalgas pueden alterar el crecimiento, producción de biomasa y su contenido nutricional, por ejemplo, las condiciones estresantes (limitación de nutrientes, intensidad de luz y sustancias tóxicas) pueden desencadenar o suprimir la acumulación de almidón y de lípidos en algunas especies mediante la regulación del metabolismo del carbono (Fabregas *et al.*, 1984, 1985; Wang *et al.*, 2009), por lo tanto, deben controlarse o mantenerse en rangos óptimos para no afectar la dinámica del crecimiento microalgal.

Respecto a la temperatura de los cultivos, las microalgas pueden tolerar amplios rangos de temperatura mientras que algunas suelen estar por debajo de los 25 °C otras soportan hasta 36 °C (Abalde *et al.*, 1995). En los cultivos de *Sp maxima*, es necesario considerar la temperatura de la suspensión microalgal por su influencia directa en la velocidad de crecimiento y que *Spirulina spp.* no inicia el crecimiento debajo de 20°C alcanzando máxima velocidad de crecimiento entre los 35 y 38 °C y a mayores temperaturas hay riesgo de la destrucción rápida del cultivo, asimismo, cambios bruscos de temperatura disminuyen el rendimiento de la biomasa (González, 1995). En la experiencia, los valores de temperatura de 23,5 °C a 24,6°C estuvieron dentro de estos rangos establecidos y no influyeron en los resultados obtenidos.

En relación al pH de los cultivos, Pelizer (2000) considera que es un parámetro clave en el desarrollo del cultivo de *Spirulina spp.* por cuanto el medio de cultivo se alcaliniza por el consumo de la fuente de carbono, generando bases como el NaOH. Diversos autores (González, 1995; Pelizer, 2000; Monaselidze, 2002) consideran que el intervalo óptimo de pH para una buena preservación en la viabilidad de las células de *Spirulina spp.* en medio Zarrouk es de 9,4 a 10,3 y el rango de pH óptimo esta entre 8 y 11 unidades. Los valores del pH de los cultivos de *Sp. maxima* determinados en la experiencia están dentro del rango adecuado por lo que este parámetro no ha interferido en los resultados obtenidos de crecimiento y contenido de proteínas.

La biomasa microalgal, tasa de crecimiento ( $\mu$ ) y tiempo de duplicación (TD) permiten evaluar el crecimiento de una especie de microalga en cultivo, sobre todo si los nutrientes presentes en su medio son asimilados y transformados en biomasa, existiendo resultados exitosos en el crecimiento de microalgas utilizando medios orgánicos (Basurto, 1994; Merino *et al.*, 2003; Ipanaqué & Paredes, 2009; Cervera, 2011); y se conoce que las microalgas asimilan diversas fuentes de nitrógeno como nitrógeno amoniacal, nitrato, urea, extracto de levadura, peptona, aminoácidos y purinas (Oh-Hama & Miyachi, 1992; Merino, 1999; Chen & Chen, 2006; Wilhelm *et al.*, 2006; Piña *et al.*, 2007; Ganuza *et al.*, 2008), observándose en el presente trabajo de investigación, que las microalgas presentaron buenos crecimientos de *Sp. maxima* con el medio Zarrouk (Z) y las diferentes dosificaciones de ARPA.

La mayor biomasa de *Sp. maxima* fue obtenida con la dosificación de 2 % de ARPA ( $0,723 \text{ g L}^{-1}$ ) cercano a los reportados por Gami *et al.*, (2011) para *Spirulina sp.* (NCIM 5421), cultivada con medio Zarrouk modificado ( $0,53 \text{ g L}^{-1}$ ) y con fertilizantes ( $0,75 \text{ g L}^{-1}$ ) indicando buen aprovechamiento de los nutrientes presentes en el medio ARPA.

La tasa de crecimiento microalgal ( $\mu$ ) indica el potencial biológico de la especie, siendo mayor en los primeros días de cultivo debido a la disponibilidad de nutrientes (Griffiths *et al.*, 2012; Roleda *et al.*, 2013). Este efecto ha sido demostrado por Roleda *et al.*, (2013), en el cultivo de *Chromulina ochromonoides* y *Dunaliella tertiolecta* utilizando medio Guillard f/2 con valores de  $\mu$  más altos a los cinco días con  $0,677 \text{ d}^{-1}$  y  $0,745 \text{ d}^{-1}$ , respectivamente; mientras que *Thalassiosira pseudonana*, *Nannochloropsis oculata* e *Isochrysis galbana* tuvieron un  $\mu$  de  $0,564 \text{ d}^{-1}$ ,  $0,481 \text{ d}^{-1}$  y  $0,451 \text{ d}^{-1}$ , respectivamente.

Por otro lado, valores de  $\mu$ , expresados en biomasa ( $\text{g L}^{-1}$ ), reportados por Gami *et al.* (2011) en el cultivo durante 8 días de *Spirulina sp.* (NCIM 5421), utilizando medios Zarrouk modificado y fertilizantes encontraron valores de  $0,32 \text{ d}^{-1}$  y de  $0,37 \text{ d}^{-1}$ , respectivamente, ligeramente superiores al encontrado en el presente trabajo con 2 % de ARPA ( $0,248 \text{ d}^{-1}$ ). Sin embargo, Madkour *et al.* (2012), cultivando *Sp. platensis*, con medio Zarrouk, con suplemento de nitrato

de amonio ( $0,353 \text{ g L}^{-1}$ ) y urea ( $0,088 \text{ g L}^{-1}$ ), obtuvieron las mayores tasas de crecimiento fue de  $0,321 \text{ d}^{-1}$ ,  $0,233 \text{ d}^{-1}$  y  $0,225 \text{ d}^{-1}$ , respectivamente, similares a las reportadas ( $0,248 \text{ d}^{-1}$ ).

En relación al tiempo de duplicación, Fábregas *et al.* (1985), afirman que la deficiencia de nitrógeno en el medio de cultivo incrementa el TD en *I. galbana*, debido que la velocidad de división celular disminuye, y depende también de un adecuado balance de nutrientes como nitrógeno y fósforo, condición óptima que se da al inicio de un cultivo, requiriéndose del adecuado balance nutrientes para sostener el cultivo microalgal. Estas condiciones pueden ser modificadas para obtener mejores resultados que los medios de cultivo inorgánicos (Rosales *et al.*, 2007). Durante la fase lag el cultivo de *Spirulina* spp. se acoplan a las condiciones establecidas, periodo en la que la tasa de crecimiento es baja, pero se incrementa paulatinamente con el tiempo (Becker, 1982), similar al obtenido en el presente trabajo de investigación, dejando en evidencia que la dosificación con 2 % de ARPA es la concentración más adecuada para el crecimiento de *Sp. máxima*.

Además, Madkour *et al.* (2012), cultivando *Spirulina platensis*, con medio Zarrouk, con suplemento de nitrato de amonio ( $0,353 \text{ g L}^{-1}$ ) y urea ( $0,088 \text{ g L}^{-1}$ ), obtuvieron los menores tiempos de duplicación de 2,157 d, de 2,978 d y 3,088 d, respectivamente; mientras que, a los 8 días de cultivo de *Spirulina* sp. (NCIM 5421), con medio Zarrouk modificado se encontró un tiempo de duplicación de 2,15 d y con medio Fertilizantes 1,89 d (Gami *et al.*, 2011), valores menores a los determinados por nosotros en los dosificados con 2 % de ARPA. Los resultados demuestran claramente la capacidad de *Sp máxima* para metabolizar los nutrientes orgánicos presente en los efluentes o residuos de la pesquería, especialmente en el ARPA para crecer similarmente a los cultivos controles dosificados con medio Zarrouk elaborado para el cultivo de *Spirulina*.

La composición química de las microalgas es influenciada por varios factores (temperatura, pH, salinidad, perfil de nutrientes) en el cultivo (Thompson, 1996; Tzovenis *et al.*, 2003; Garibay *et al.*, 2009; Alsull & Wan, 2012) y según la fuente de nitrógeno y fósforo, orgánico o inorgánico, es posible modificar la

composición química de la biomasa microalgal generada. La investigación el medio de cultivo utilizado (ARPA), por su contenido de nitrógeno, fósforo y carbono orgánicos permite la obtención de altos contenidos porcentuales de proteínas, correspondiendo 58,11 % y 59,24 % para las dosificaciones con 2 % y 3 % de ARPA con respectivamente.

El contenido de proteína de las microalgas depende de sus características genéticas y de la fuente nitrogenada utilizada, así tenemos que algunas cepas bajo diferentes concentraciones de desechos de la crianza de aves de corral están del orden del 39 %, sin mostrar correlación significativa entre el contenido de proteína y la productividad de biomasa (Singh *et al.*, 2011) así tenemos valores de 43 % en *Chlorella minutissima* y 37 % en *Scenedesmus bijuga* cultivada con desechos de la crianza de aves de corral (12 mg L<sup>-1</sup>).

Borges *et al.* (2010), evaluaron el crecimiento y composición química de 10 especies cultivadas en medio Conway, encontrando los valores más altos de proteínas en *Tetraselmis gracilis* (33,6 %), *Prorocentrum minimum* (30,9 %) e *Isochrysis galbana* (29,4 %); asimismo, Piña *et al.* (2007), cultivaron cuatro especies de microalgas con medio Guillard f/2, Nutrilake y urea, encontraron para *Isochrysis sp.* concentraciones de proteínas de 20,77; 21,36 y 23,97 %, respectivamente. También Sánchez *et al.* (2000), cultivaron *I. galbana* con diferentes concentraciones de nitrógeno en forma de nitrato, con medios de cultivo Guillard f/2 (12,353 mg L<sup>-1</sup>), Ukeles (28,000 mg L<sup>-1</sup>), Ben-Amotz (70,000 mg L<sup>-1</sup>), S-88 (13,848 mg L<sup>-1</sup>) y Algal-1 (39,375 mg L<sup>-1</sup>) y hallaron contenidos de proteínas de 20,6; 25,3; 37,0; 27,4 y 30,3 %, respectivamente.

Estos resultados son menores que los reportados para cianofitas, especialmente para el género *Spirulina* que puede alcanzar hasta 62 % de proteínas (Vonshak, 1997); sin embargo, se han hallado valores bajos, de 22,04 a 38,13 % de proteínas en cultivos de *Sp. platensis* utilizando aguas residuales de la producción de aceite de oliva considerándose al nitrógeno como el nutriente limitante, asimismo obtuvieron con medio Zarrouk suplementado con nitrato de amonio (0,353 g L<sup>-1</sup>) y urea (0,088 g L<sup>-1</sup>) las mayores concentraciones de proteínas de 52,95; 52,62 y 47,10 %, respectivamente.

respectivamente (Markou *et al.*, 2012). Estos resultados son ligeramente menores a los obtenidos en los cultivos de *Sp. máxima* dosificados con 2 % (58,11 %) y 3 % (59,24 %) de ARPA, debido al nitrógeno orgánico aportado por su alto contenido de proteínas del ARPA (6942 mg L<sup>-1</sup>).

El contenido de nitrógeno en los medios de cultivo microalgales es muy importante por su activa participación en la síntesis de proteínas necesarias para mantener el crecimiento y división celulares, y por ser el constituyente principal de proteínas y ácidos nucleicos abundante en las células vivas (Sukenik *et al.*, 1993; Jiang, 2002; Huang *et al.*, 2003), en tal sentido el medio ARPA, por contener elementos minerales y proteínas, permiten óptimos crecimientos y contenido de proteínas en *Sp. máxima*, de buena calidad por su alto contenido de aminoácidos indispensables que según Tiboni (1985) alcanzan el 47 % del peso total de las mismas.

Los cultivos dosificados con 3 % de ARPA pese a presentar menor crecimiento y menor biomasa (556,00 mg L<sup>-1</sup>) que el control (697,33 mg L<sup>-1</sup>) tiene mayor contenido de proteínas (59,24 %) que el control (56,42 %), al parecer, debido al mayor estrés que ejerce el medio de cultivo sobre las células de *Sp. máxima* incrementa la acumulación intracelular de proteínas.

El nitrógeno es requerido para la síntesis de aminoácidos que forman parte de las proteínas celulares y otros componentes como clorofilas y ficocianina que, al parecer, concentraciones de nitrato de 0,625 a 2,500 g L<sup>-1</sup>, no afecta el porcentaje de proteínas de *Sp. platensis* normalmente de 57,63 a 60,82 % (Colla *et al.*, 2007), coincidiendo con la concentración del medio Zarrouk (2,500 g L<sup>-1</sup>). También se ha demostrado que el bajo contenido de nitrógeno disminuye el contenido de clorofila de *Sp. platensis* presentando coloración verde-amarillo (Carvalho *et al.*, 2004). Este cambio de coloración fue observado en los cultivos dosificados con 1 % de ARPA no obstante presentaron alto contenido de proteínas (48,76 %) y menores crecimientos (Fig. 6), que podría ser consecuencia de la calidad y cantidad del nitrógeno dosificado, que según Mostert & Grobbelaar (1987), los cambios en la fuente de nitrógeno y la

cantidad en los medios cultivados limitan el crecimiento intensivo de microalgas alterando su pigmentación y composición bioquímica.

En consecuencia, los mejores crecimientos y contenidos de proteínas determinados en los cultivos de *Sp. máxima* dosificadas con 2% de ARPA revelan un adecuado balance de nutrientes y el contenido óptimo del nitrógeno orgánico aportado.

## V. CONCLUSIONES

- ✓ Las mayores concentraciones de biomasa de *Spirulina maxima* se obtuvieron en los cultivos dosificados con 2 y 3 % de ARPA con valores de 0,723 g L<sup>-1</sup> y 0,556 g L<sup>-1</sup>, respectivamente.
- ✓ La mayor tasa de crecimiento ( $\mu$ ) fue obtenido en los dosificados con 2 % de ARPA (0,248 d<sup>-1</sup>).
- ✓ Los mayores contenidos de proteínas *Sp. maxima* fueron obtenidos en los cultivos dosificados con 2 % y 3 % de ARPA con valores de 58,11 % y 59,24 %, respectivamente.

## VI. RECOMENDACIONES

- Determinar diariamente el contenido de proteínas, carbohidratos y lípidos totales de los cultivos de *Sp. maxima* dosificados con 1, 2 y 3 % de ARPA en laboratorio, asimismo, escalar estos resultados en cultivos al aire libre utilizando agua de mar y otros efluentes y/o residuos orgánicos.
- Evaluar la producción de biomasa microalgal y el contenido de pigmentos en cultivos masivos al aire libre en biorreactores y piletas someras con la finalidad de desarrollar una nueva metodología de producción aprovechando la capacidad de *Sp. maxima* de metabolizar residuos orgánicos tan abundantes en nuestra localidad.
- Realizar ensayos en sistemas de cultivo (reactores o piletas someras) de grandes volúmenes con fines de biorremediación y evaluar económica y técnicamente la instalación y funcionamiento de grandes unidades de cultivo y producción de microalgas.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abalde, J.; A. Cid; P. Fidalgo; E. Torres & C. Herrero. 1995. Microalgas: Cultivos y Aplicaciones. Monografía N° 26. Coruña: Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias, Universidad de Coruña. La Coruña, España. 181p.
- Abu, G.; K. Ogbonda & R. Aminigo. 2007. Optimization studies of biomass production and protein biosynthesis in a *Spirulina* sp. isolated from polluted flame pit in the Niger Delta. *Afr. J. Biotechnol.* 6(22):2550-2554.
- Aiba, S. & T. Ogawa. 1977. Assessment of growth yield of a blue-green alga: *Spirulina platensis*, in axenic and continuous culture. *J. Gen. Microbiol.* 102:179-182.
- Alsull, M. & W. Wan. 2012. Responses of *Tetraselmis* sp. and *Nannochloropsis* sp. isolated from Penang National Park coastal waters, Malaysia, to the combined influences of salinity, light and nitrogen limitation. International Conference on Chemical, Ecology and Environmental Sciences (ICEES'2012) 17-18 de marzo, 2012. Bangkok, Tailandia. 142-145pp.
- Alva, J. 2009. Calidad de recepción de materia prima y aumento de eficiencia en recuperación de aceite a partir del agua de bombeo en una planta pesquera. Tesis para optar al título de Ingeniero Mecánico, Facultad de Ciencias e Ingeniería, Pontificia Universidad Católica del Perú. Lima, Perú. 97p.
- Andrade, C.; A. Vera; C. Cárdenas & E. Morales. 2009. Biomass production of microalgae *Scenedesmus* sp. with wastewater from fishery. *Rev. Tec. Ing. Univ. Zulia.* 32(2):126-134.
- Andrade, M. & J. Costa. 2007. Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. *Aquaculture.* 264:130-134.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1995. Official Methods of Analysis. 16th. AOAC 0066-961X, Arlington, Va. U.S.A. 1093p.
- APHA. 2005. Métodos estándares para el análisis de agua potable y agua residuales. Standard Methods for the examination of wastewater. 21 edit. American Public Health Association (APHA) - American Water

- Works Association (AWWA) - Water Environment Federation (WEF). 1082p.
- Band, C. 1999. Efecto de la composición bioquímica de microalgas sobre el valor nutritivo de dos cepas de *Artemia*. Tesis para Obtener el Grado de Maestro en Ciencias. Instituto Politécnico Nacional - Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, México. 78p.
- Basurto, E. 1994. Bioabono líquido como medio de cultivo para microalgas. Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, México. 31p.
- Becker, E. 1994. Biotechnology and microbiology. Cambridge University Press, Cambridge. U.S.A. 293p.
- Berenz, Z. 1996. XII Curso internacional tecnología de procesamiento de productos pesqueros, del 15 de Enero al 01 de Marzo de 1996. Instituto Tecnológico Pesquero del Perú. Callao, Perú.
- Borges, V.; E. Barbarino & S. Oliveira. 2010. Crescimento e composição química de dez espécies de microalgas marinhas em cultivos estanques. *Ciência Rural*. 40(2):339-347.
- Brennan, M. & P. Owende. 2010. Biofuels From microalgae- a Review of technologies for production, processing and extraction of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 14:557-557.
- Cabrera, C. 2002. Estudio de la contaminación de las aguas costeras en la Bahía de Chancay. Tesis par el Grado Académico de Maestría en Gestión Ambiental, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú. 177p.
- Carvalho, J.; F. Francisco; K. Almeida; S. Sato & A. Converti. 2004. Cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* (Cyanophyceae) by fed-batch addition of ammonium chloride at exponentially-increasing feeding rates. *J. Phycol.* 40:589-597.
- Cervera, O. 2011. Tratamiento de purines para la producción de biomasa microalgal. Tesis para Optar el Grado de Máster en Biotecnología Industrial y Agroalimentaria. Facultad de Ciencias Experimentales. Almería, España. 32p.
- Chen, G. & F. Chen. 2006. Growing phototrophic cells without light. *Biotechnol. Lett.* 28:607-616.

- Chen, Y.C. 2011. The effect of shifts in medium types on the growth and morphology of *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*). *Journal of Marine Science and Technology*. 19(5):565-570.
- Chojnacka, K. & A. Noworyta. 2004. Evaluation of *Spirulina* sp. growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. *Enzyme and Microbial Technology*. 34:461-465.
- Colla, L.; C. Reinehr; C. Reichert & J. Vieira. 2007. Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. *Bioresource Technology*. 98:1489-1493.
- CONAM. 1998. Prácticas recomendadas para mejorar la eficiencia de los procesos en la industria de harina de pescado. Proyecto SMREM (CONAM-USAID) "Gestión Sostenible del Ambiente y los Recursos Naturales, en coordinación con el Consejo Nacional del Ambiente (CONAM). Lima, Perú. 93p.
- Del Campo, J.; M. García & M. Guerrero. 2007. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. Universidad de Sevilla. *Revista Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74(1):1163-1174.
- Encomendero, E. & F. Uchpa. 2002. Producción de ensilado biológico de subproductos de "concha de abanico" (*Argopecten purpuratus*). Comunicación Científica - CIVA 2002. <<http://www.revistaaquatic.com/civa2002>>. Accesado: 23 de agosto del 2017.
- Fábregas, J.; C. Herrero & C. Abalde. 1985. Growth, chlorophyll  $\alpha$  and protein of the marine microalga *Isochrysis galbana* in batch cultures with different salinities and high nutrient concentrations. *Aquaculture*. 50:1-11.
- Fábregas, J.; J. Abalde; C. Herrero; B. Cabezas & M. Veiga. 1984. Growth of marine microalgae *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities y nutrient concentration. *Aquaculture*. 42:207-215.
- Gami, B.; A. Naik & B. Patel. 2011. Cultivation of *Spirulina* species in different liquid media. *J. Algal Biomass Utiln.* 2(3):15-26.

- Ganuza, E.; A. Anderson & C. Ratledge. 2008. High-cell-density cultivation of *Schizochytrium* sp. in an ammonium/pH auxostat fed-batch system. *Biotechnol. Lett.* 30:1559-1564.
- Garibay, A., R. Vázquez-Duhalt; M. Sánchez; L. Serrano & A. Martínez. 2009. Biodiesel a partir de microalgas. *BioTecnología.* 13(3):38-61.
- Gómez, L. & Z. Ramírez. 2004. Microalgas como Biomonitores de Contaminación. *Revista Cubana de Química.* 16(2):34-48.
- Gómez, O.; R. Rodríguez & S. Subero. 2011. Cultivo polialgal (*Chaetoceros gracilis*, *Chlorella* sp. y *Tetraselmis chuii*) en medios nutritivos no convencionales. *Revista saber.* 23(1):84-90.
- González, M.; O. Parra & A. Cifuentes. 1995. Técnicas de cultivo de microalgas en laboratorio. In: Alveal, K.; M. Ferrario; E. Oliveira & E. Sar. Eds. Manual de métodos ficológicos. Universidad de Concepción, Concepción, Chile. 219-250pp.
- Griffiths, M.; R. Van Hille & S. Harrison. 2012. Lipid productivity, settling potential and fatty acid profile of 11 microalgal species grown under nitrogen replete and limited conditions. *J. Appl. Phycol.* 24:989-1001.
- Honty, G.; A. Raffaele & R. Pedace. 2010. Tecnología y biocombustibles de segunda generación: Una herramienta para la toma de decisiones. Reunión regional de expertos. Serie Buenas Prácticas en Cambio Climático. UNESCO. Vol. 2. Montevideo, Uruguay. 156p.
- Hu, Q.; M. Sommerfeld; E. Jarvis; M. Ghirardi; M. Posewitz; M. Seibert & A. Darzins. 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstock for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J.* 54(4):621-639.
- Huang, X.; H. Zhou; C. Yuan & M. Sun. 2003. The effects of nitrogen source and concentration on the nutritional value of *Nannochloropsis oculata*. *J. Shanghai Fish Univ.* 12:113-116.
- Ipanaqué, J. & I. Paredes. 2009. Efecto del ensilado de los desechos blandos de *Argopecten purpuratus* "concha de abanico", en el crecimiento poblacional y contenido de lípidos totales de *Tetraselmis suecica*, en condiciones de laboratorio. Tesis para optar el Título de Biólogo Acuicultor. Universidad Nacional del Santa. Nuevo Chimbote, Perú. 65p.

- Jiang, X.M. 2002. Effects of temperatures, light intensity and nitrogen concentrations on the growth and fatty acid composition of *Nannochloropsis oculata*. *Mar. Science*. 26:9-12.
- Kamat, G. 1995. Gamma linolenic acid production from *Spirulina platensis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43:466-469.
- Leduy, A. & N. Therien. 1977. An improved method for optical density measurement of the semimicroscopic blue green algae *Spirulina maxima*. *Biotechnol. Bioeng.* 19:1219-1224.
- Levasseur, M.; P. Thompson & P. Harrison. 1993. Physiological acclimation of marine phytoplankton to different nitrogen sources. *Journal of Phycology*. 29(5):587–595.
- Licet, B. 2008. Cultivo de *Arthrospira platensis* (División Cyanophita) a diferentes salinidades y fuentes de nitrógeno como estrategia para modificar su composición bioquímica. Tesis Magister Scientiarum en Ciencias Marinas. Universidad de Oriente, Venezuela. 84p.
- Lowry, O.; N. Rosebrough.; A. Farr & R. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Madkour, F.; A. Kamil & H. Nasr. 2012. Production and nutritive value of *Spirulina platensis* in reduced cost media. *Egyptian Journal of Aquatic Research*. 38:51-57.
- Markou, G.; I. Chatzipavlidis & D. Georgakakis. 2011. Cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* in olive-oil mill wastewater treated with sodium hypochlorite. *Bioresource Technology*. 112:234-241.
- Merino, F. 1999. Efecto del ácido acético con sustrato limitante en el crecimiento de *Scenedesmus acutus* usando cultivos batch. Informe de Investigación Docente. Universidad Nacional del Santa. Nuevo Chimbote, Perú.
- Merino, F.; W. Capa & G. Alayo. 2003. Efecto combinado de la fuente nitrogenada y la concentración de silicato en el crecimiento y contenido de lípidos y carbohidratos de *Chaetoceros gracilis* en laboratorio. Informe de investigación. Universidad Nacional del Santa. Chimbote - Perú. 32p.
- Monaselidze, J.; Sh. Barbakadze; Sh. Kvirikashvili; G. Majagaladze; D. Khachidze & L. Topchishvili. 2002. Thermal characteristics of *Spirulina*

- platensis* cells under nongrowing conditions at various values of pH medium. *Biomacromolecules*. 3:783-786.
- Mostert, E. & J. Grobbelaar. 1987. The influence of nitrogen and phosphorus on algal growth and quality in outdoor mass algal cultures. *Biomass*. 13:219-233.
- Oh-Hama, T. & S. Miyachi. 1992. *Chlorella*. In: Borowitzka, M.A. & L.J. Borowitzka (Eds.), *Microalgal Biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge. United Kingdom. 3-26pp.
- Palomino, A.; C. Estrada & J. López. 2010. Microalgas: potencial para la producción de biodiesel. Congreso Brasileiro De Mamona, 4 & Simpósio Internacional De Oleaginosas Energéticas, 1, 2010. João Pessoa. Inclusão Social e Energia: Anais. Campina grande: Embrapa Algodão. Brasil. 149-157pp.
- Pandey, J. & A. Tiwari. 2010. Optimization of biomass production by *Spirulina platensis*. *J. Algal Biomass Utiln.* 1(2):20-32.
- Pandey, J. & P. Neerajpathak & T. Amit. 2010. Standardization of pH and light intensity for the biomass production of *Spirulina platensis*. *J. Algal Biomass Utiln.* 1(2):93-102.
- Pelizer, L.; J. Carvalho; S. Sato & I. De oliveira. 2002. *Spirulina platensis* growth estimation by pH determination at different cultivations conditions. *Electr. J. Biotech.* 5(3):251-257.
- Piña, P.; M. Medina; M. Nieves; S. Leal; J. López-Elías & M. Guerrero. 2007. Cultivo de cuatro especies de microalgas con diferentes fertilizantes utilizados en acuicultura. *Rev. Invest. Mar.* 28(3):225-236.
- Pulz, O.; K. Scheibenbogen W. Gross. Biotechnology with cyanobacteria and microalgae. In: Rehm H.-J., Reed Editors. *Biotechnology*, vol. 10. Weinheim: Wiley-VCH. 105-136pp.
- Quevedo, C.; S. Morales & A. Acosta. 2008. Crecimiento de *Scenedesmus* sp. en diferentes medios de cultivo para la producción de proteína microalgal. *Vitae. Rev. Fac. Quím. Farm.* 15(1):25-31.
- Rodrigues, M.; L. Ferreira; A. Converti & S. Sato. 2011. Influence of ammonia sulphate feeding time on fed-batch *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultivation and biomass composition with and without pH control. *Bioresour. Technol.* 102: 6587-6592.

- Roleda, M.; S. Slocombe; R. Leakey; J. Day; E. Bell & M. Stanley. 2013. Effects of temperature and nutrient regimes on biomass and lipid production by six oleaginous microalgae in batch culture employing a two-phase cultivation strategy. *Bioresource Technology*. 129:439-449.
- Romero, T. 2011. Desarrollo de *Chlorella* spp. en riles orgánicos pesqueros y su influencia en la remoción de la contaminación. *Ingeniería hidráulica y Ambiental*. 32(3):32-38.
- Rosales, N.; J. Bermúdez; R. Moronta & E. Morales. 2007. Gallinaza: Un residual avícola como fuente alternativa de nutrientes para producción de biomasa microalgal. *Rev. Colomb. Biotechnol.* 9(1):41-48.
- Ruíz, A. 2011. Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente. Máster Universitario en Ingeniería Hidráulica y Medio Ambiente. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España. 102p.
- Salazar, E. 2012. Evaluación de métodos de extracción de aceite de microalgas para la producción de biodiesel. Tesis para optar el Título de Ingeniero Industrial y de Sistemas de la Facultad de Ingeniería. Universidad de Piura, Perú. 145p.
- Sánchez, S.; M. Martínez & F. Espinola. 2000. Biomass production and biochemical variability of the marine microalga *Isochrysis galbana* in relation to culture medium. *Biochemical Engineering Journal*. 6:13-18.
- Silva, J.; V. Vásquez & F. Merino. 2011. Producción de biomasa de *Tetraselmis suecica* empleando agua de mar con sanguaza. *Scientia Agropecuaria*. 2(2011):13-23.
- Singh, M.; D. Reynolds & K. Das. 2011. Microalgal system for treatment of effluent from poultry litter anaerobic digestion. *Bioresource Technology*. 102:10841-10848.
- Steel, R. & J. Torrie. 1988. *Bioestadística: Principios y procedimientos*. 2da. edic. Edit. McGraw-Hill. Traducción por Ricardo Martínez. México. 622p.
- Sukenik, A.; O. Zamora & Y. Carmeli. 1993. Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. II. *Nannochloropsis* sp. *Aquaculture*. 117:313-326.

- Thirumala, M. 2012. Optimization of growth of *Spirulina platensis* LN1 for production of carotenoids. *Int. J. LifeSc. Bt & Pharm. Res.* 1(2):152-157.
- Thompson, G.A. 1996. Lipids and membrane function in green algae. *Biochim. Biophys. Acta.* 1302(1):17-45.
- Tiboni, O., Ciferri, O. 1985. The biochemistry and industrial potential of *Spirulina* sp. *Ann. Rev. Microbiol.* 39:503-526.
- Travieso, L.; O. Canizares; R. Borja; F. Beniztez; R. Dominguez; R. Dupeyron & V. Valiente. 1999. Heavy metal removal by microalgae. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology.* 62:144-151.
- Tzovenis, I.; N. De Pauw & P. Sorgeloos. 2003. Optimisation of T-ISO biomass production rich in essential fatty acids. I. Effect of different light regimes on growth and biomass production. *Aquaculture.* 216(1-4):203-222.
- Ulloa, R. 2011. Inducción de productos bioactivos de la microalga marina *Tetraselmis suecica*. Tesis para optar al grado de Doctor, Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela, España. 220p.
- Vonshak, A. 1997. *Spirulina*: growth, physiology and Biochemistry. *In*: Vonshak, A., (Eds): *Spirulina platensis* (Arthrospira): Physiology, Cell Biology and Biotechnology. Taylor and Francis. Londres, Reino Unido. 43-65pp.
- Wang, B. & C. Lan. 2011. Biomass production and nitrogen and phosphorus removal by the green alga *Neochloris oleoabundans* in simulated wastewater and secondary municipal wastewater effluent. *Bioresour Technol.* 102(10):5639-644.
- Whitton, B. & M. Potts. 2000. Introduction to cyanobacteria. *In*: The ecology of cyanobacteria. B. Whitton & M. Potts (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Países Bajos. 1-11pp.
- Wilhelm, C.; C. Büchel; J. Fisahn; R. Goss; T. Jakob; J. LaRoche; J. Lavaud; M. Lohr; U. Riebesell; K. Stehfest; K. Valentin & P. Kroth. 2006. The regulation of carbon and nutrient assimilation in diatoms is significantly different from green algae. *Protist.* 157:91-124.

## **VIII. ANEXOS**

Anexo 1. Temperatura (°C) en los cultivos de *Sp. maxima* con ARPA y control Z.

DÍA DE CULTIVO	ARPA (%)											
	CONTROL (Z)			1			2			3		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
0	24,0	23,7	23,8	23,8	23,8	24,0	23,7	23,9	23,6	24,0	23,6	24,1
1	24,2	24,0	24,1	24,2	24,1	23,7	24,1	24,1	24,3	23,8	24,2	24,1
2	24,3	24,2	23,8	24,3	24,1	24,1	23,9	24,0	24,1	24,2	24,2	24,3
3	23,5	23,7	24,0	23,7	23,8	23,9	23,9	23,8	23,8	23,6	24,0	24,1
4	24,0	23,9	23,7	24,2	24,0	23,6	23,9	23,7	24,0	24,0	24,1	23,9
5	24,1	24,2	24,0	23,7	24,0	24,1	24,2	24,3	23,8	24,1	24,3	23,8
6	24,3	24,1	24,0	24,2	24,1	24,5	23,9	24,4	24,6	24,2	24,4	24,2
7	24,0	24,1	23,8	23,7	24,1	24,1	24,0	23,8	23,7	24,1	23,9	23,8
8	23,9	23,9	24,0	24,2	23,9	24,1	23,8	24,0	23,8	23,9	23,9	24,2

Anexo 2. Temperatura promedio (°C;  $\pm$ D.E.) en los cultivos de *Sp. maxima* con ARPA y control z.

DÍA DE CULTIVO	ARPA (%)			
	CONTROL (Z)	1	2	3
0	23,8 $\pm$ 0,2a	23,9 $\pm$ 0,1a	23,7 $\pm$ 0,2a	23,9 $\pm$ 0,3a
1	24,1 $\pm$ 0,1a	24,0 $\pm$ 0,3a	24,2 $\pm$ 0,1a	24,0 $\pm$ 0,2a
2	24,1 $\pm$ 0,3a	24,2 $\pm$ 0,1a	24,0 $\pm$ 0,1a	24,2 $\pm$ 0,1a
3	23,7 $\pm$ 0,3a	23,8 $\pm$ 0,1a	23,8 $\pm$ 0,1a	23,9 $\pm$ 0,3a
4	23,9 $\pm$ 0,2a	23,9 $\pm$ 0,3a	23,9 $\pm$ 0,2a	24,0 $\pm$ 0,1a
5	24,1 $\pm$ 0,1a	23,9 $\pm$ 0,2a	24,1 $\pm$ 0,3a	24,1 $\pm$ 0,3a
6	24,1 $\pm$ 0,2a	24,3 $\pm$ 0,2a	24,3 $\pm$ 0,4a	24,3 $\pm$ 0,1a
7	24,0 $\pm$ 0,2a	24,0 $\pm$ 0,2a	23,8 $\pm$ 0,2a	23,9 $\pm$ 0,2a
8	23,9 $\pm$ 0,1a	24,1 $\pm$ 0,2a	23,9 $\pm$ 0,1a	24,0 $\pm$ 0,2a

Letras diferentes en la misma fila, indica diferencia significativa ( $\alpha=0,05$ ).

Anexo 3. Valores de pH en los cultivos de *Sp. maxima* con ARPA y control Z.

DÍA DE CULTIVO	ARPA (%)											
	CONTROL (Z)			1			2			3		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
0	8,15	8,16	8,13	8,14	8,18	8,15	8,14	8,17	8,18	8,13	8,16	8,15
1	8,27	8,26	8,28	8,35	8,32	8,31	8,42	8,40	8,40	8,45	8,44	8,44
2	8,45	8,43	8,50	8,51	8,53	8,52	8,58	8,63	8,62	8,71	8,69	8,62
3	8,70	8,70	8,77	8,73	8,76	8,79	8,90	8,85	8,83	8,92	8,88	8,96
4	8,84	8,83	8,79	8,85	8,81	8,87	8,92	8,93	8,89	9,05	9,07	9,03
5	8,92	8,93	8,86	8,90	8,86	8,91	9,01	9,02	9,02	9,06	9,03	9,10
6	8,88	8,89	8,92	9,00	8,96	9,01	9,09	9,12	9,10	9,16	9,13	9,20
7	8,95	8,88	8,91	9,10	9,06	9,11	9,20	9,22	9,12	9,26	9,23	9,30
8	8,91	8,86	8,92	9,01	9,03	9,06	9,26	9,27	9,29	9,31	9,28	9,35

Anexo 4. Valores de pH promedio ( $\pm$  D.E.) en los cultivos de *Sp. maxima* con ARPA y control Z.

DÍA DE CULTIVO	ARPA (%)			
	CONTROL (Z)	1	2	3
0	8,15 $\pm$ 0,02a	8,16 $\pm$ 0,02a	8,16 $\pm$ 0,02a	8,15 $\pm$ 0,02a
1	8,27 $\pm$ 0,01d	8,33 $\pm$ 0,02c	8,41 $\pm$ 0,01b	8,44 $\pm$ 0,01a
2	8,46 $\pm$ 0,04b	8,52 $\pm$ 0,01b	8,61 $\pm$ 0,03a	8,67 $\pm$ 0,05a
3	8,72 $\pm$ 0,04b	8,76 $\pm$ 0,03b	8,86 $\pm$ 0,04a	8,92 $\pm$ 0,04a
4	8,82 $\pm$ 0,03c	8,84 $\pm$ 0,03c	8,91 $\pm$ 0,02b	9,05 $\pm$ 0,02a
5	8,90 $\pm$ 0,04b	8,89 $\pm$ 0,03b	9,02 $\pm$ 0,01a	9,06 $\pm$ 0,04a
6	8,90 $\pm$ 0,02c	8,99 $\pm$ 0,03b	9,10 $\pm$ 0,02a	9,16 $\pm$ 0,04a
7	8,91 $\pm$ 0,04c	9,09 $\pm$ 0,03b	9,18 $\pm$ 0,05ab	9,26 $\pm$ 0,04a
8	8,90 $\pm$ 0,03c	9,03 $\pm$ 0,03b	9,27 $\pm$ 0,02a	9,31 $\pm$ 0,04a

Letras diferentes en la misma fila, indica diferencia significativa ( $\alpha=0,05$ ).

Anexo 5. Peso seco ( $\text{g L}^{-1}$ ;  $\pm$ D.E.) de *Sp. maxima* con ARPA y control Z.

DÍA DE CULTIVO	ARPA (%)											
	CONTROL (Z)			1			2			3		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
0	0,095	0,094	0,112	0,095	0,098	0,106	0,094	0,095	0,110	0,097	0,094	0,109
1	0,146	0,141	0,137	0,128	0,132	0,138	0,125	0,129	0,126	0,140	0,137	0,132
2	0,193	0,196	0,198	0,174	0,177	0,171	0,187	0,196	0,180	0,174	0,171	0,164
3	0,284	0,268	0,263	0,229	0,235	0,238	0,251	0,257	0,250	0,232	0,225	0,219
4	0,354	0,393	0,379	0,294	0,275	0,274	0,412	0,422	0,413	0,384	0,388	0,381
5	0,476	0,534	0,521	0,342	0,352	0,358	0,537	0,546	0,532	0,477	0,470	0,460
6	0,587	0,620	0,598	0,418	0,407	0,387	0,628	0,610	0,613	0,537	0,512	0,506
7	0,631	0,659	0,638	0,431	0,427	0,412	0,656	0,619	0,607	0,550	0,522	0,506
8	0,672	0,715	0,705	0,437	0,449	0,415	0,681	0,732	0,757	0,589	0,558	0,521

Anexo 6. Tasa de crecimiento ( $\mu$ ) y tiempo de duplicación en biomasa (TD) de *Sp. maxima* con ARPA y control Z.

PARÁMETRO	ARPA (%)											
	CONTROL (Z)			1			2			3		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
<b>B<sub>0</sub></b>	0,095	0,094	0,112	0,095	0,098	0,106	0,094	0,095	0,110	0,097	0,094	0,109
<b>B<sub>f</sub></b>	0,672	0,715	0,705	0,437	0,449	0,415	0,681	0,732	0,757	0,589	0,558	0,521
<b>Días</b>	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
<b><math>\mu</math> (<math>\text{d}^{-1}</math>)</b>	0,245	0,254	0,230	0,191	0,190	0,171	0,248	0,255	0,241	0,225	0,223	0,196
<b>TD (d)</b>	2,829	2,729	3,014	3,629	3,648	4,053	2,795	2,718	2,876	3,081	3,108	3,536

Anexo 7. Biomasa, absorbancia, porcentaje y biomasa de proteínas de *Sp. maxima* cultivada con ARPA y control Z al octavo día de cultivo.

PARÁMETROS	ARPA (%)											
	CONTROL (Z)			1			2			3		
<b>Biomasa Muestra x4 mL (mg)</b>	2,69	2,86	2,82	1,75	1,80	1,66	2,72	2,93	3,03	2,36	2,23	2,08
<b>Biomasa Total (mg L<sup>-1</sup>)</b>	672,00	715,00	705,00	437,00	449,00	415,00	681,00	732,00	757,00	589,00	558,00	521,00
<b>Absorbancia</b>	0,464	0,527	0,497	0,275	0,262	0,262	0,509	0,532	0,546	0,432	0,413	0,398
<b>Proteínas (%)</b>	54,78	58,52	55,97	49,91	46,23	50,13	59,43	57,67	57,23	58,14	58,82	60,77
<b>Proteínas (mg L<sup>-1</sup>)</b>	368,12	418,42	394,59	218,11	207,57	208,04	404,72	422,14	433,23	342,44	328,22	316,61

Anexo 8. Curva de calibración con seroalbúmina para la determinación de proteínas totales de la microalga *Sp. maxima* con corrección a cero utilizando blanco de reactivos.

