

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOLOGÍA EN ACUICULTURA**



**EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DEL EFLUENTE DEL  
PROCESAMIENTO DE LA FLOR DE *Tagetes erecta* “MARIGOLD” EN EL  
CRECIMIENTO POBLACIONAL Y CONTENIDO DE LÍPIDOS TOTALES DE  
LA MICROALGA *Scenedesmus acutus*, EN LABORATORIO**

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

**TESISTAS:**

**BACH. JARA LIÑÁN, PAUL DARD**

**BACH. ROQUE SÁNCHEZ, MÁXIMO ANTONIO**

**ASESOR:**

**Dr. JUAN FERNANDO MERINO MOYA**

**NUEVO CHIMBOTE - 2016**

**PERÚ**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOLOGÍA EN ACUICULTURA**



**EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DEL EFLUENTE DEL  
PROCESAMIENTO DE LA FLOR DE *Tagetes erecta* “MARIGOLD” EN EL  
CRECIMIENTO POBLACIONAL Y CONTENIDO DE LÍPIDOS TOTALES DE  
LA MICROALGA *Scenedesmus acutus*, EN LABORATORIO**

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

**TESISTAS:**

**BACH. JARA LIÑÁN, PAUL DARD**

**BACH. ROQUE SÁNCHEZ, MÁXIMO ANTONIO**

**APROBADO POR EL ASESOR**

---

**Dr. Juan Fernando Merino Moya**

**Asesor**

**NUEVO CHIMBOTE - 2016**

**PERÚ**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOLOGÍA EN ACUICULTURA**



**EFEECTO DE LA CONCENTRACIÓN DEL EFLUENTE DEL  
PROCESAMIENTO DE LA FLOR DE *Tagetes erecta* “MARIGOLD” EN EL  
CRECIMIENTO POBLACIONAL Y CONTENIDO DE LÍPIDOS TOTALES DE  
LA MICROALGA *Scenedesmus acutus*, EN LABORATORIO**

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

**TESISTAS:**

**BACH. JARA LIÑÁN, PAUL DARD**

**BACH. ROQUE SÁNCHEZ, MÁXIMO ANTONIO**

**APROBADO POR EL JURADO CALIFICADOR INTEGRADO POR LOS  
SEÑORES MIEMBROS DEL JURADO**

---

**Dr. Walter Eduardo Reyes Avalos**  
**Presidente**

---

**Dr. Juan Fernando Merino Moya**  
**Integrante del Jurado**

---

**Blga. Acuic. Carmen Gabriela Yzásiga Barrera**  
**Integrante del Jurado**

**NUEVO CHIMBOTE - 2016**  
**PERÚ**

## DEDICATORIA

A Dios y a nuestros padres, a quienes amamos y queremos mucho, por su apoyo moral, consejos, cariño y comprensión.

A nuestros hermanos y amigos, que nos impulsaron a seguir adelante a pesar de los tropiezos que pudimos encontrar en el transcurso de nuestra formación académica.

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar damos gracias a Dios, por habernos dado fuerza y valor para culminar con esta etapa de nuestra vida profesional.

Agradecemos también la confianza y el apoyo brindado por parte de cada uno de nuestros padres, que sin duda alguna en el trayecto de mi vida nos han demostrado su amor, corrigiendo nuestras faltas y celebrando nuestros triunfos.

A nuestro asesor Fernando Merino Moya por toda la colaboración brindada, no solo en la elaboración nuestro trabajo sino también en toda nuestra formación profesional y como persona.

**Los Autores**

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

|  |      |
|--|------|
| DEDICATORIA .....  | i    |
| AGRADECIMIENTOS.....   | ii   |
| ÍNDICE DE CONTENIDOS .....   | iii  |
| ÍNDICE DE TABLAS.....  | v    |
| ÍNDICE DE FIGURAS .....  | vi   |
| RESUMEN .....  | vii  |
| ABSTRACT.....  | viii |
| I. INTRODUCCIÓN .....  | 1    |
| Hipótesis .....  | 5    |
| Objetivos general .....  | 5    |
| Objetivos específicos.....   | 5    |
| II. MATERIALES Y MÉTODOS.....  | 6    |
| 2.1. Localización del experimento .....                                  | 6    |
| 2.2. Material experimental.....  | 6    |
| 2.2.1. Material biológico .....  | 6    |
| 2.3. Preparación del medio control HM .....                              | 7    |
| 2.4. Efluente del procesamiento de <i>Tagetes erecta</i> “marigold”..... | 7    |
| 2.5. Acondicionamiento de las unidades experimentales .....              | 8    |
| 2.6. Análisis químico del EPT .....                                      | 9    |
| 2.7. Determinación de parámetros del cultivo .....                       | 10   |
| 2.8. Agua del medio de cultivo .....                                     | 10   |

|   |    |
|---|----|
| 2.9. Conteos celulares y determinación del crecimiento poblacional de <i>Sc. acutus</i> ..... | 10 |
| 2.10. Determinación de lípidos totales en <i>Sc. acutus</i> .....                             | 11 |
| 2.11. Determinación de biomasa de <i>Sc. acutus</i> .....                                     | 13 |
| 2.12. Análisis estadístico .....  | 13 |
| III. RESULTADOS .....   | 14 |
| 3.1. Parámetros del cultivo .....   | 14 |
| 3.1.1. Temperatura  | 14 |
| 3.1.2. pH   | 15 |
| 3.2. Crecimiento poblacional de <i>Sc. acutus</i> .....                                       | 16 |
| 3.2.1. Tasa de crecimiento y tiempo de duplicación poblacional                                | 18 |
| 3.3. Contenido de lípidos totales en <i>Sc. acutus</i> .....                                  | 19 |
| IV. DISCUSIÓN .....   | 22 |
| V. CONCLUSIONES .....   | 27 |
| VI. RECOMENDACIONES .....   | 28 |
| VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....   | 29 |
| VIII. ANEXOS .....  | 39 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| Tabla 1.Composición química del medio HM (Merino, 1999)..   | 7  |
| Tabla 2.Tratamientos utilizados en los cultivos de <i>Sc. acutus</i> .....  | 8  |
| Tabla 3.Contenido de los principales componentes del EPT.....   | 9  |
| Tabla 4.Composición química ( $\text{mg L}^{-1}$ ) del medio de cultivo EPT .....   | 9  |
| Tabla 5.Densidad poblacional ( $\times 10^6$ cél. $\text{mL}^{-1}$ ) de <i>Sc. acutus</i> en los cultivos dosificados con el efluente del procesamiento de la flor de <i>T. erecta</i> “marigold”, y HM.....                                    | 16 |
| Tabla 6.Tasa de crecimiento ( $\mu$ ) y tiempo de duplicación (TD) poblacional de <i>Sc. acutus</i> al quinto día de ser cultivados con el efluente del procesamiento de la flor de <i>T. erecta</i> “marigold”, y HM.....                      | 18 |
| Tabla 7.Contenido de lípidos totales (%) y biomasa ( $\text{mg L}^{-1}$ ) al quinto día de cultivo de <i>Sc. acutus</i> cultivados con diferentes concentraciones del efluente del procesamiento de la flor de <i>T. erecta</i> “marigold”..... | 20 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Fig. 1.Unidades experimentales en los cultivos microalgales de <i>Sc. acutus</i> .....   | 8  |
| Fig. 2. Flujoograma para determinar lípidos totales de <i>Sc. acutus</i> cultivados con EPT y HM.....  | 12 |
| Fig. 3.Temperatura promedio (°C) en los cultivos de <i>Sc. acutus</i> con diferentes concentraciones del efluente del procesamiento de la flor de <i>T. erecta</i> “marigold”.....   | 14 |
| Fig. 4.pH promedio en los cultivos de <i>Sc. acutus</i> con diferentes concentraciones del efluente del procesamiento de la flor de <i>T. erecta</i> “marigold” .....  | 15 |
| Fig. 5.Crecimiento poblacional de <i>Sc. acutus</i> cultivados con EPT y HM.....   | 17 |
| Fig. 6.Tasa de crecimiento ( $\mu$ ) y tiempo de duplicación (TD) poblacional de <i>Sc. acutus</i> al quinto día de cultivo con diferentes concentraciones del efluente del procesamiento de la flor de <i>T. erecta</i> “marigold”, y HM..... | 19 |
| Fig. 8.Lípidos totales (%) de <i>Sc. acutus</i> en los cultivos con diferentes concentraciones del efluente del procesamiento de la flor de <i>T. erecta</i> “marigold” ..   | 20 |
| Fig. 9.Biomasa de lípidos totales de <i>Sc. acutus</i> en los cultivos con diferentes concentraciones del efluente del procesamiento de la flor de <i>T. erecta</i> “marigold”.....  | 21 |

## RESUMEN

Se estudió el efecto de la concentración de 2, 5 y 10 mL L<sup>-1</sup> del efluente del procesamiento de la flor *Tagetes erecta* “marigold”, sobre el crecimiento poblacional y el contenido de lípidos de la microalga *Scenedesmus acutus*, en laboratorio. El mayor crecimiento poblacional al quinto día de cultivo de *Sc. acutus* se obtuvo con 5 mL L<sup>-1</sup> con 24,17 x10<sup>6</sup> cél. mL<sup>-1</sup>; mientras los menores promedios estuvieron con 2 y 10 mL L<sup>-1</sup> con 19,71 x10<sup>6</sup> cél. mL<sup>-1</sup> y 21,70 x10<sup>6</sup> cél. mL<sup>-1</sup>. La mayor tasa de crecimiento ( $\mu$ ) al quinto día de cultivo para *Sc. acutus*, fue obtenido con 5 mL L<sup>-1</sup> con 0,531 día<sup>-1</sup>; mientras la  $\mu$  fue menor con 2 mL L<sup>-1</sup> 0,490 día<sup>-1</sup>. El mayor tiempo de duplicación al quinto día de cultivo en *Sc. acutus* se obtuvo con 2 mL L<sup>-1</sup> con 1,416 día; y el menor tiempo de duplicación fue con 5 mL L<sup>-1</sup> con 1,306 día. Los porcentajes de lípidos totales en *Sc. acutus* al quinto día de cultivo fueron similares con 21,86, 22,78 y 23,31% para 2, 5 y 10 mL L<sup>-1</sup> del efluente del procesamiento de la flor *T erecta* “marigold”. Los mayores contenidos como biomasa de lípidos totales en *Sc. acutus* al quinto día de cultivo, estuvieron con 5 y 10 mL L<sup>-1</sup> con 135,7 mg L<sup>-1</sup> y 124,8 mg L<sup>-1</sup>. Se concluye que por el crecimiento poblacional y contenido de lípidos totales, el mejor tratamiento es el dosificado con 5 mL L<sup>-1</sup> del efluente del procesamiento de la flor *T erecta* “marigold”.

**Palabras Clave:** Microalga, *Scenedesmus acutus*, marigold, *Tagetes erecta*, efluente, crecimiento, lípidos.

## ABSTRACT

There was studied the effect of the concentration of 2, 5 and 10 mL L<sup>-1</sup> of the effluent one of the processing of the flower *Tagetes erecta* "marigold", on the population growth and the content of lipids of the microalga *Scenedesmus acutus*, in laboratory. The major population growth to the fifth day of culture of *Sc. acutus* was obtained by 5 mL L<sup>-1</sup> by 24,17 x10<sup>6</sup>cél. mL<sup>-1</sup>; while the average minors were with 2 and 10mL L<sup>-1</sup> with 19,71 x10<sup>6</sup>cél. mL<sup>-1</sup> and 21,70 x10<sup>6</sup>cél. mL<sup>-1</sup>. The major rate of growth ( $\mu$ ) to the fifth day of culture for *Sc. acutus*, it was obtained with 5mL L<sup>-1</sup> by 0,531 day<sup>-1</sup>; while her  $\mu$  was minor with 2mL L<sup>-1</sup> 0,490 day<sup>-1</sup>. The major time of duplication to the fifth day of culture in *Sc. acutus* was obtained with 2mL L<sup>-1</sup> with 1,416 day; and the minor time of duplication was with 5mL L<sup>-1</sup> with 1,306 day. The percentages of total lipids in *Sc. acutus* to the fifth day of culture were similar with 21,86; 22,78 and 23,31 % for 2, 5 and 10 mL L<sup>-1</sup> of the effluent one of the processing of the flower *T. erecta* "marigold". The major contents like biomass of total lipids in *Sc. acutus* to the fifth day of culture, were with 5 and 10 mL L<sup>-1</sup> with 135,7 mg L<sup>-1</sup> y 124,8 mg L<sup>-1</sup>. It is conclude that for the population growth and content of total lipids, the best treatment is the dosed one with 5mL L<sup>-1</sup> of the effluent one of the processing of the flower *T. erecta* "marigold".

**Key Words:** Microalgae, *Scenedesmus acutus*, marigold, *Tagetes erecta*, effluent, growth, lipids.

## I. INTRODUCCIÓN

Las microalgas se consideran como alimentos funcionales, capaces no solo de elevar el contenido nutricional de los alimentos tradicionales, sino también de afectar positivamente la salud de animales y humanos.(Quevedo *et al.*, 2008), ya que son fuente rica de proteínas, ácidos grasos insaturados, vitaminas, minerales, pigmentos, enzimas, aceites esenciales, antibióticos y otros metabolitos biológicamente activos (Arad & Yaron, 1992; Bermejo *et al.*, 2002; Fernández-Reiriz, 1989; Morales *et al.*, 2002; Quevedo *et al.*, 2008; Ritter *et al.*, 1999; Ventosa & Nieto, 1995). Asimismo, el uso de materiales orgánicos de diversos orígenes y otros desechos como fertilizantes en los cultivos microalgales se han realizado desde hace varios años (Oswald, 1988; Borowitzka & Borowitzka, 1989; Benedetti *et al.*, 1998; Knud-Hansen, 1998; Olgúin *et al.*, 2001).

El deterioro de la calidad del agua, supone un grave problema ambiental y socioeconómico, que se acentúa en zonas de escasos recursos. Una alternativa de solución es el uso de estas aguas residuales como medio de crecimiento microalgal, que podría disminuir los costos de producción, debido a los grandes volúmenes generados y a las altas concentraciones de nitrógeno (N) y fósforo (P) naturalmente presentes (Hernández, 2010, & Griffiths *et al.*, 2012), ya que el principal potencial de las microalgas usando agua residual, radica en su capacidad de asimilación, y por tanto eliminación del medio de nutrientes, principalmente nitrógeno y fósforo.

Por otro lado, las aguas residuales utilizadas para el cultivo de microalgas permite mejorar notoriamente la calidad del efluente con bajo costo energético (Arce, 2006) por el aprovechamiento de la luz solar, que adicionalmente pueden producir sustancias con alto valor agregado como: pigmentos, fármacos y biocombustibles entre otros (Hernández *et al.*, 2012) además de eliminar los impactos negativos en los ambientes terrestres o acuáticos (Orta de Velásquez *et al.*, 2006). Es por ello que la mayoría de estudios se centran en el uso de las microalgas como tratamiento terciario de las aguas, es decir, aquél tras el cual el agua es devuelta al medio, y previo al cual se ha eliminado la mayor parte de materia orgánica disuelta y suspendida.

En concreto, algunas especies de microalgas verdes presentan especial tolerancia a medios altos en nutrientes. Estas especies son *Chlorella* y *Scenedesmus*, ya que estas presentan una elevada capacidad de soportar elevadas concentraciones de nutrientes contenidos en diferentes tipos de aguas residuales, poseer actividad metabólica elevada, y capacidad de resistir variaciones ambientales lo que la hacen sobrevivir y ser un género común de aguas residuales (González, 2006).

Sin dejar de lado que existen gran cantidad de estudios sobre el uso de microalgas, así por ejemplo, (*Chlorella sp*, *Scenedesmus sp*, y *Scenedesmus quadricauda*) utilizadas en el de tratamiento de agua residual urbana (Chacón *et al.*, 2004; Hernández, 2010; Méndez *et al.*, 2010; Ruiz, 2011), tratamiento de purines para la producción de biomasa microalgal de *Scenedesmus sp* y *Chlorella sp* (Cervera del Catillo, 2011), uso de residuales agroindustriales del grano de soya y lactosuero de masa de queso, en el cultivo de *Chlorella vulgaris* (Rivero, 2010), uso de desechos agrícolas y sub productos agroindustriales en la producción de biomasa de la microalga de *Dunaliella salina* (Sabido *et al.*, 2007), uso de residuales pesqueros, en el cultivo de *Chlorella sp* (Romero, 2011), y uso de microalgas en la remoción de metales pesados de aguas residuales (Alejo, 2010; Pellon *et al.*, 2003), donde estas microalgas demuestran ser una opción importante, en el cultivo con dichos efluentes con fines de producción de biomasa algal.

Es así que, en el proceso de selección de medios de cultivo, la asimilación de nitrógeno reviste una importancia básica para el desarrollo de los cultivos de microalgas, la fuente y concentración de nitrógeno determinan en gran medida los cambios en el crecimiento y composición bioquímica de una especie microalgal, influyendo fundamentalmente sobre el contenido proteico, la fracción lipídica y la síntesis de clorofila. Un factor importante en la preparación de un medio de cultivo para microalgas es la forma en la cual el nitrógeno es suministrado.

En nuestra región, se dispone de fuentes ricas en nutrientes necesarios para el cultivo de microalgas. Una de ellas es el efluente del procesamiento de *Tagetes erecta* “marigold”, que contiene grandes cantidades de nutrientes (Tabla 3), donde es posible relacionarlo con el uso de otros residuos orgánicos como efluentes de pescaderías y efluentes municipales, que han demostrado ser metabolizados por microalgas marinas y dulceacuícolas (Fernández & Paredes, 2007; Ipanaque & Paredes, 2009). En tal sentido,

consideramos pertinente el uso de este efluente por su contenido de sales minerales y materiales orgánicos derivados del procesamiento de las flores de “marigold” posibilitando la realización de cultivos heterotróficos, que según Borowitzka (1997), son una buena alternativa para la producción masiva de biomasa microalgal.

Además, según Vásquez (2008), se sabe que las flores y hojas *T. erecta* “marigold” contienen aceites esenciales, resinas, materia colorante amarilla, grasa y taninos, pigmentos no polares betacaroteno, fitofeno y alfa-caroteno, luteína, auteraxantina, alfa-criptoxantina, kaempferol, kaempferol-7-o-ramosa, 6-hidroxi-kaempferol-7-o-glucósido, alfa-tertienil, lactonas, alcaloides cuaternarios y no cuaternarios, polisacáridos, saponinas, glicósidos y esteroides, leucoantocianinas, por lo que su utilización en los cultivos heterotróficos de la microalga *S. acutus* produciría cambios importantes en el crecimiento y composición bioquímica de esta microalga (Fábregas *et al.*, 1984).

También se debe tener en cuenta, que durante el proceso fermentativo al que son sometidas las flores de *T. erecta* “marigold”, se generan aguas residuales o efluentes con bajos tenores de pH (2-3) y una alta carga de bacterias y levaduras que las microalgas neutralizan y contribuyen a la disminución total de aquellos microorganismos como consecuencia de las condiciones altamente aeróbicas y al vigoroso crecimiento de los cultivos microalgales (Rangel *et al.*, 2008).

Es así que, el efluente del procesamiento de la flor de *T. erecta* “marigold”, será suministrada en los cultivos de *Sc. acutus* con concentraciones de 2, 5 y 10 mL L<sup>-1</sup>, siendo estas concentraciones tomadas en referencia a ensayos previos en laboratorio, en donde dosificaciones menores a 2mL de EPT no permiten sostener el crecimiento microalgal, y concentraciones mayores 10 mL de EPT limitan el crecimiento y generan flóculos no deseados en el cultivo.

Por otra parte, no podemos descuidar la importancia que tienen las microalgas, con respecto a la composición bioquímica que presentan. Los estudios enfocados en microalgas consideran de suma importancia la composición lipídica que estas pueden tener; ya que en las microalgas los principales componentes de la fracción lipídica se pueden encontrar como: triacilglicéridos, ácidos grasos libres, ceras, esteroides, hidrocarburos, glicolípidos (predominantes en membranas cloroplásticas), fosfolípidos

(abundantes en plasmalema y diversos sistemas endomembranosos); además, el metabolismo lipídico de las microalgas es similar al de plantas superiores, particularmente en la biosíntesis de ácidos grasos y triglicéridos, como consecuencia de las homologías de secuencia y la similitud de características bioquímicas observadas entre ciertos genes y enzimas, de origen vegetal y microalgal, involucrados en la producción de lípidos (Garibay *et al.*, 2009).

Estudios realizados en algunas microalgas con respecto a su porcentaje lipídico en peso seco, como *Scenedesmus dimorphus* (6 - 40%) (Arredondo & Vázquez-Duhalt, 1991); *Chlorella vulgaris* (5,1-56,0%), *Scenedesmus obliquus* (11,0 - 55,0%) (Gouveia & Oliveira, 2009) y *Tetraselmis suecica* (15,0 - 23,0%) (Chisti, 2007) muestran que los lípidos comprendidos en las microalgas por lo general constituyen del 20 al 50% de su peso seco, y en otros casos sobre pasan estos porcentajes. Incluso en algunos casos, la composición de los lípidos puede ser regulada mediante la adición o restricción de algunos componentes en el medio de cultivo como, las fuentes de nitrógeno o sílice, así como de otros factores como estrés, que podrían incrementar la producción total de lípidos (Garibay *et al.*, 2009; Millán-Oropeza & Fernández-Linares, 2012; Tarkus & Valdés, 2011).

Con respecto del punto de vista económico, es recomendable el utilizar el efluente del procesamiento de la flor de *T. erecta* “marigold”, por la presencia de nutrientes para la producción masiva de *S. acutus*, ya que es muy importante el uso de un medio de cultivo, que además, de permitir adecuados crecimientos en tan poco tiempo, sea de muy bajo costo. Considerando la importancia de un mercado fijo y el uso biotecnológico extendido a muchas áreas, como elaboración de alimentos, cosméticos e industrias farmacéuticas (Pulz, 2001).

En vista de la disponibilidad de experiencias en el cultivo de microalgas utilizando residuos orgánicos (Fernández & Paredes, 2007; Ipanaque & Paredes, 2009), y considerando los nutrientes presentes en los efluentes, nos planteamos el siguiente problema: ¿Cuál es el efecto de la concentración del efluente del procesamiento de la flor de *T. erecta* “marigold” en el crecimiento poblacional y contenido de lípidos totales de la microalga *Scenedesmus acutus*, en laboratorio?

Se planteó la hipótesis, si utilizamos concentraciones de 2, 5 y 10 mL L<sup>-1</sup> del efluente del procesamiento de la flor de *T. erecta* “marigold” (EPT), se obtendrá mayor crecimiento de biomasa y contenido de lípidos totales de *Scenedesmus acutus* con la concentración de 5 mL L<sup>-1</sup>.

El objetivo general fue: Evaluar el efecto de la concentración del efluente del procesamiento de la flor de *T. erecta* “marigold” en el crecimiento poblacional y contenido de lípidos totales de la microalga *Scenedesmus acutus*, en laboratorio; y fueron planteados los siguientes objetivos específicos:

Determinar el efecto de la concentración del efluente del procesamiento de la flor de *T. erecta* “marigold” en el crecimiento poblacional de *Sc. acutus* en laboratorio; y determinar el efecto de la concentración de efluentes del procesamiento de la flor de *T. erecta* “marigold” en el contenido de lípidos totales de *Sc. acutus* en laboratorio.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Localización del experimento

La experiencia fue desarrollada en el laboratorio de Recursos Acuáticos y Cultivos de Especies Auxiliares de la Escuela Académico Profesional de Biología en Acuicultura, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional del Santa.

### 2.2. Material experimental

#### 2.2.1. Material biológico

La microalga *Scenedesmus acutus* utilizada correspondió a la cepa que se mantuvo con iluminación y aireación constante en el Laboratorio de Recursos Acuáticos y Cultivos de Especies Auxiliares de la E.A.P. Biología en Acuicultura. Inicialmente los cultivos de *Sc. acutus* se mantuvieron con medio HM (Merino, 1999) en cuatro matraces de vidrio de 250 mL con 100 mL de cultivo, luego fueron transferidos, para realizar el escalamiento, a dos botellas de 3 L con 2 L de medio HM.

El inóculo a utilizar en cada unidad experimental estuvo en la proporción de 1:10, respecto al medio final; es decir, cada unidad experimental se adicionó 100 mL de inóculo. Los cultivos microalgales que se utilizaron como inóculo, estuvieron en la fase de crecimiento exponencial; y los cultivos experimentales se iniciaron con una concentración promedio de  $1,70 \times 10^6 \text{cél.mL}^{-1}$ .

Todos los cultivos experimentales estuvieron iluminados continuamente con fluorescentes de luz blanca de 40w (2000 lux) y agitados constantemente con aire proveniente de un blower de  $\frac{1}{4}$  HP.

### 2.3. Preparación del medio control HM

El medio de cultivo HM (control) está compuesto por sustancias inorgánicas (Merino, 1999) y agua potable. Se prepararon soluciones stock de nutrientes que fueron llevadas a la autoclave para su esterilización a 121 ° C por 15 min, se enfriaron y se mantuvieron refrigeradas a 5 °C en frascos oscuros. La composición de nutrientes del medio de cultivo HM. (Tabla 1).

Tabla 1. Composición química del medio HM (Merino, 1999).

| COMPONENTE                     | CONCENTRACIÓN (mg L <sup>-1</sup> ) |
|--------------------------------|-------------------------------------|
| Urea                           | 206,0                               |
| H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> | 35,0                                |
| KCl                            | 19,0                                |
| FeCl <sub>3</sub>              | 2,5                                 |

### 2.4. Efluente del procesamiento de *Tagetes erecta* “marigold”

El efluente del procesamiento de *T. erecta* “marigold” (EPT) se obtuvo de una muestra de 5 L procedente de la fábrica de extracción de colorantes de la flor de “marigold” SEAGRO S.A.C., ubicada en la localidad de Tambo Real, distrito de Santa, Región Ancash. Una vez en el laboratorio, este se filtró a través de un embudo de vidrio conteniendo gasa y algodón en su interior, para impedir el paso de partículas de gran tamaño; y fue almacenado en frascos de vidrio en refrigeración (5 °C) protegido de la luz hasta su utilización en los cultivos experimentales.

El efluente fue dosificado directamente, a razón de 2; 5 y 10 mL de EPT por litro de cultivo. Estas dosificaciones fueron tomadas en referencia a ensayos previos en laboratorio, en donde dosificaciones menores a 2mL de EPT no permitían sostener el crecimiento microalgal, y concentraciones mayores 10 mL de EPT limitaba el crecimiento y generaban flóculos no deseados en el cultivo.

## 2.5. Acondicionamiento de las unidades experimentales

En la experiencia se utilizaron 12 botellas plásticas de 3000 mL conteniendo 2000 mL de volumen efectivo de cultivo (Fig. 2), los que se iniciaron con un promedio de la densidad poblacional de  $1,70 \times 10^6$  cél. mL<sup>-1</sup> de *Sc. acutus*.

Se empleó el diseño estímulo creciente, con tres tratamientos y un grupo control (HM), con tres repeticiones cada uno (Tabla 2), siendo estos los siguientes:

Tabla 2. Tratamientos utilizados en los cultivos de *Sc. acutus*.

| TRATAMIENTOS | ESPECIFICACIONES   |
|--------------|--|
| T0           | Cultivo de la microalga <i>Sc. acutus</i> utilizando medio HM (Control).           |
| T1           | Cultivo de la microalga <i>Sc. acutus</i> utilizando 2 mL L <sup>-1</sup> de EPT.  |
| T2           | Cultivo de la microalga <i>Sc. acutus</i> utilizando 5 mL L <sup>-1</sup> de EPT.  |
| T3           | Cultivo de la microalga <i>Sc. acutus</i> utilizando 10 mL L <sup>-1</sup> de EPT. |



Fig. 1. Unidades experimentales en los cultivos microalgales de *Sc. acutus*.

## 2.6. Análisis químico del EPT

Para complementar el contenido de nutrientes que aporte el EPT, fue realizado El análisis de nutrientes, como El nitrógeno, fósforo y hierro, según metodologías colorimétricas de APHA (2005), los que fueron realizados utilizando 20 mL de muestra de EPT por cada parámetro, en el Laboratorio de Biología y Ecología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional del Santa utilizando reactivos de marca CHEMetricsinc, cuyos valores se muestran en la Tabla 3, y se calculó su aporte en cada tratamiento (Tabla 4).

Tabla 3. Contenido de los principales componentes del EPT.

| PARÁMETROS                                  | CONCENTRACIÓN |
|---|---------------|
| Fe (mg-Fe L <sup>-1</sup> )                 | 11,4          |
| Nitratos (mg-N L <sup>-1</sup> )            | 2,6           |
| Nitritos (mg-N L <sup>-1</sup> )            | 17,3          |
| Nitrógeno Amoniacal (mg-N L <sup>-1</sup> ) | 260,0         |
| Nitrógeno Orgánico (mg-N L <sup>-1</sup> )  | 780,0         |
| Fosfatos (mg-P L <sup>-1</sup> )            | 940,0         |

Tabla 4. Composición química (mg L<sup>-1</sup>) del medio de cultivo EPT.

| PARÁMETROS  | Control<br>(HM) | EPT (mL L <sup>-1</sup> ) |       |       |
|---|-----------------|---------------------------|-------|-------|
|   |                 | 2                         | 5     | 10    |
| Nitrógeno Total (mg L <sup>-1</sup> )                             | -               | 2,12                      | 5,30  | 10,60 |
| Nitrógeno CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> (mg L <sup>-1</sup> ) | 48,04           | -                         | -     | -     |
| Fósforo (mg L <sup>-1</sup> )                                     | 11,06           | 1,88                      | 4,70  | 9,40  |
| Hierro (mg L <sup>-1</sup> )                                      | 0,52            | 0,023                     | 0,057 | 0,114 |

## **2.7. Determinación de parámetros del cultivo**

Diariamente fueron registrados la temperatura con un termómetro digital Hanna ( $\pm 0,1$  °C) y el pH con un pH-metro digital Hanna ( $\pm 0,01$  unid.). El flujo de aire fue suministrado constantemente por un blower a razón de  $1000 \text{ mL min}^{-1}$  por cada botella medido con un flujómetro Cole Parmer ( $\pm 10 \text{ mL min}^{-1}$ ).

La iluminación en los tratamientos estuvo provisto por un fluorescente de luz blanca de 40 w colocado a 10 cm de cada botella de los cultivos microalgales, irradiando aproximadamente 2000 lux medido con un luxómetro digital Hanna ( $\pm 0,1$  lux).

## **2.8. Agua del medio de cultivo**

El agua utilizada para los cultivos fue tomada del sistema de abastecimiento de agua potable de Seda Chimbote, siendo almacenada en un bidón de plástico de 100 L de capacidad, por 48 h. Se filtró a  $10 \mu\text{m}$  con malla de Nyltal y se transfirió a cinco botellones de plástico de 20 L cada uno, agregándose 1 mL de hipoclorito de sodio (4 %) por cada litro dejándolo actuar. Transcurrido 24 h se neutralizó con 1 mL de tiosulfato de sodio (15 %) por litro de agua, seguido fue aireado vigorosamente ( $2 \text{ L min}^{-1}$ ) por 1 h para eliminar el cloro residual u otro gas nocivo producido.

## **2.9. Conteos celulares y determinación del crecimiento poblacional de *Sc. acutus***

El crecimiento poblacional de *Sc. acutus* en los cultivos se determinó por conteos diarios (cél.  $\text{mL}^{-1}$ ) utilizando cámara de Neubauer y microscopio binocular Nikon, durante los 7 días del experimento.

Con los promedios de la densidad poblacional se graficaron las curvas de crecimiento poblacional; igualmente, se determinó la tasa de crecimiento poblacional ( $\mu$ ) y el tiempo de duplicación ( $TD$ ), ambos al quinto día de cultivo, utilizando para ello las fórmulas según Guillard (1975).

$$\mu = \frac{\ln(N_f/N_0)}{t_f - t_0} \quad N_f \text{ y } N_0 : \text{Número de células al final e inicio del cultivo (cél. mL}^{-1}\text{).}$$

$$TD = \frac{\ln(2)}{\mu} \quad T_f \text{ y } t_0 : \text{T tiempo final e inicial del cultivo (d).}$$

### 2.10. Determinación de lípidos totales en *Sc. acutus*

Cuando los cultivos alcanzaron el final de la fase de crecimiento exponencial, se determinó el contenido de lípidos totales en *S. acutus*, para lo cual se utilizó la metodología de Bligh & Dyer (1959) y Marsh & Weinstein (1966) (Fig. 2); utilizando 4 mL de muestra por unidad experimental, siendo centrifugadas a 10000 rpm por 10 min, luego se eliminó el sobrenadante dejando la pasta de microalga. Esta pasta se resuspendió con agua destilada y fue centrifugada a 10000 rpm por 10 min; se eliminó el sobrenadante, y la pasta fue secada en estufa a 60 °C por 6 h. Seguido se les adicionó 3 mL de una solución de cloroformo:metanol (2:1) y se dejó reposar en oscuridad a 5 °C.

Transcurrida 12 h se transfirieron a tubos de 15 mL y se agregó 2 mL de agua destilada a cada tubo, fueron centrifugados a 6000 rpm por 10 min, y se evaporó el solvente en baño María, siendo finalmente llevados a secar en estufa a 105 °C por 60 min.

Como último procedimiento, a cada tubo de ensayo se añadió 2 mL de ácido sulfúrico concentrado (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se calentó a 200 °C por una hora; luego fueron enfriados con agua potable y se realizaron lecturas en el espectrofotómetro Aquamate Plus con celdas de cuarzo de 1 cm a 375 nm de longitud de onda, previa lecturas de los patrones de calibración con aceite de oliva y colesterol.

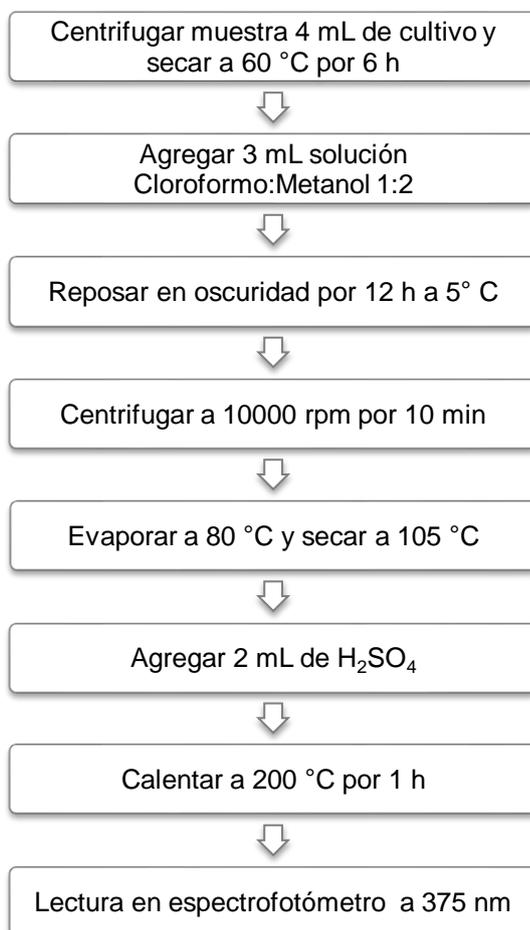
El contenido de lípidos totales fue calculado según la siguiente fórmula:

$$L (\%) = \frac{\left( \left( \frac{\text{Absorbancia}}{4,2295} \right) \times V \right)}{M} \times 100$$

Dónde:

V: Volumen final de muestra analizada (6mL).

M: Peso seco (mg) en 4mL de cultivo.



**Fig. 2.** Flujograma para determinar lípidos totales de *Sc. acutus* cultivados con EPT y HM.

### 2.11. Determinación de biomasa de *Sc. acutus*

La biomasa microalga se determinó por gravimetría, rotulando placas de Petri y pesando papel filtro Whatman N° 42 en una balanza analítica de sensibilidad 0,01 mg. Para ello, se filtró 50 mL de suspensión microalgal por cada unidad experimental, colocándose papeles filtro en embudo Büchner y con matraz Kitasato con una bomba de vacío, seguido fue llevado a estufa a 60 °C por 6 h, y luego se incrementó la temperatura hasta

105 °C por 60 min. Por último se dejó enfriar en un secador de campana por 1 h y se registraron los pesos. Los datos obtenidos se reemplazaron en la siguiente fórmula:

$$\text{Biomasa (mg L}^{-1}\text{)} = \frac{\text{(P1 - P2) x 1000}}{50}$$

Dónde:

P1: Peso papel seco + muestra seca (mg)

P2: Peso del papel seco (mg)

A la vez se determinó la biomasa de lípidos totales, según la siguiente fórmula:

$$\text{Biomasa de Lípidos (mg L}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Biomasa x \% Lípidos}}{100}$$

Dónde:

Biomasa: Peso seco de *S. acutus* por litro (mg L<sup>-1</sup>)

% Lípidos: Porcentaje de lípidos en cada unidad experimental

## 2.12. Análisis estadístico

Nuestros datos de crecimiento poblacional y contenido de lípidos totales, fueron probados mediante la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov, donde ( $p > 0.05$ ). Luego fueron sometidos al análisis de varianza (ANOVA) para establecer diferencias entre promedios; además, se aplicó la prueba de Tukey HSD para establecer el mejor promedio. Para todos los casos la significancia fue de 0,05. Estos procesos fueron desarrollados utilizando los programas Microsoft Excel 2010 y el SPSS 20.0 para Microsoft Windows 8.

### III. RESULTADOS

#### 3.1. Parámetros del cultivo

##### 3.1.1. Temperatura

Las temperaturas en los cultivos de *Sc. acutus* presentaron variaciones entre los 25,1 y 25,7 °C durante los 7 días de la experiencia (Fig. 3); siendo similares ( $p>0,05$ ) por cada día del cultivo.

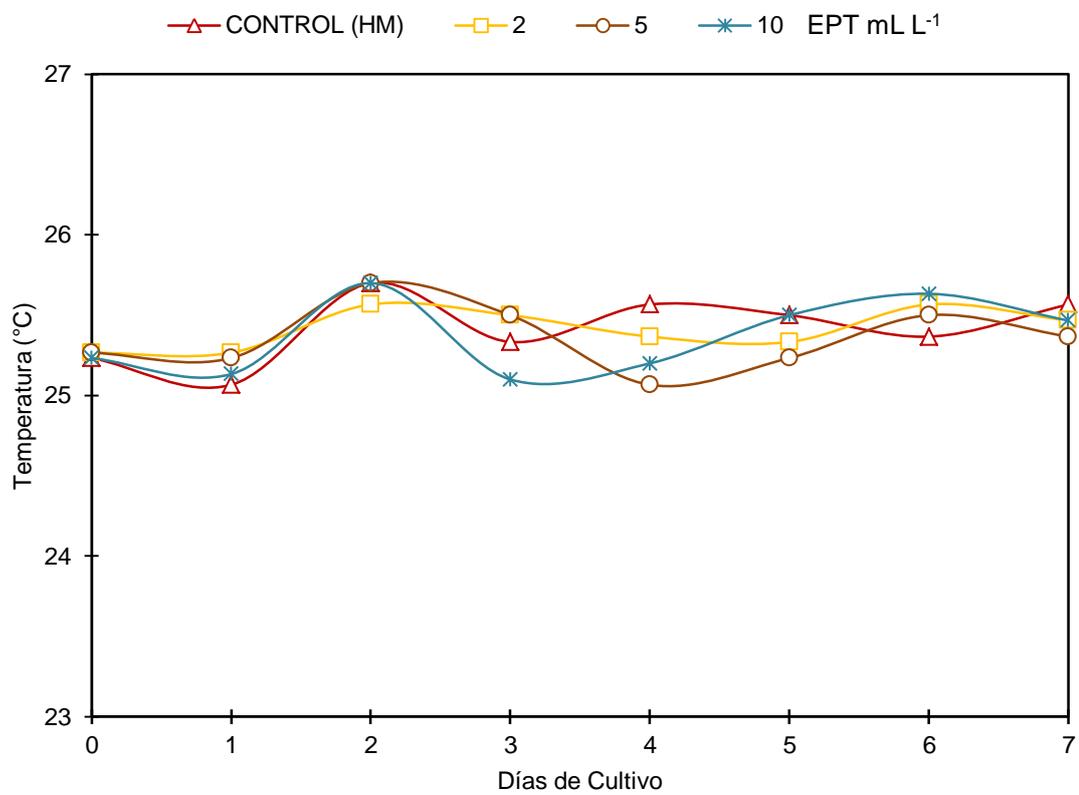


Fig. 3. Temperatura promedio (°C) en los cultivos de *Sc. acutus* con diferentes concentraciones del efluente del procesamiento de la flor de *T. erecta* “marigold”.

### 3.1.2. pH

Los promedios de pH en los cultivos de *Sc. acutus* (Fig. 4), mostraron al inicio del experimento, y hasta el segundo día de cultivo un incremento de pH de 8.38 a 8.59 de manera similar ( $p>0,05$ ) con el control HM, y los cultivos con 2, 5, y 10 mL L<sup>-1</sup> de EPT. Al tercer día de cultivo, el pH fue mayor ( $p>0,05$ ) en el control 8.73, que con 2, 5 y 10 mL L<sup>-1</sup> de EPT. Para el quinto día de cultivo, los mayores valores de pH, se encontraron en 2 y 5 mL L<sup>-1</sup> de EPT, con valores de 8.62, y 8.61 de pH, mientras que los menores valores ( $p<0,05$ ) se presentaron para el cultivo con 10 mL L<sup>-1</sup> de EPT y el control HM, con valores de 8.21 y 8.43

Al final del experimento, los valores significativos ( $p<0,05$ ) se presentaron en el cultivo con 5 mL L<sup>-1</sup> de EPT y el control (HM) con 8.46 y 8.32 respectivamente; y los menores valores de pH ( $p<0,05$ ) para el mismo día en los cultivos con 2 y 10 mL L<sup>-1</sup> de EPT, con 8.19 y 8.13.

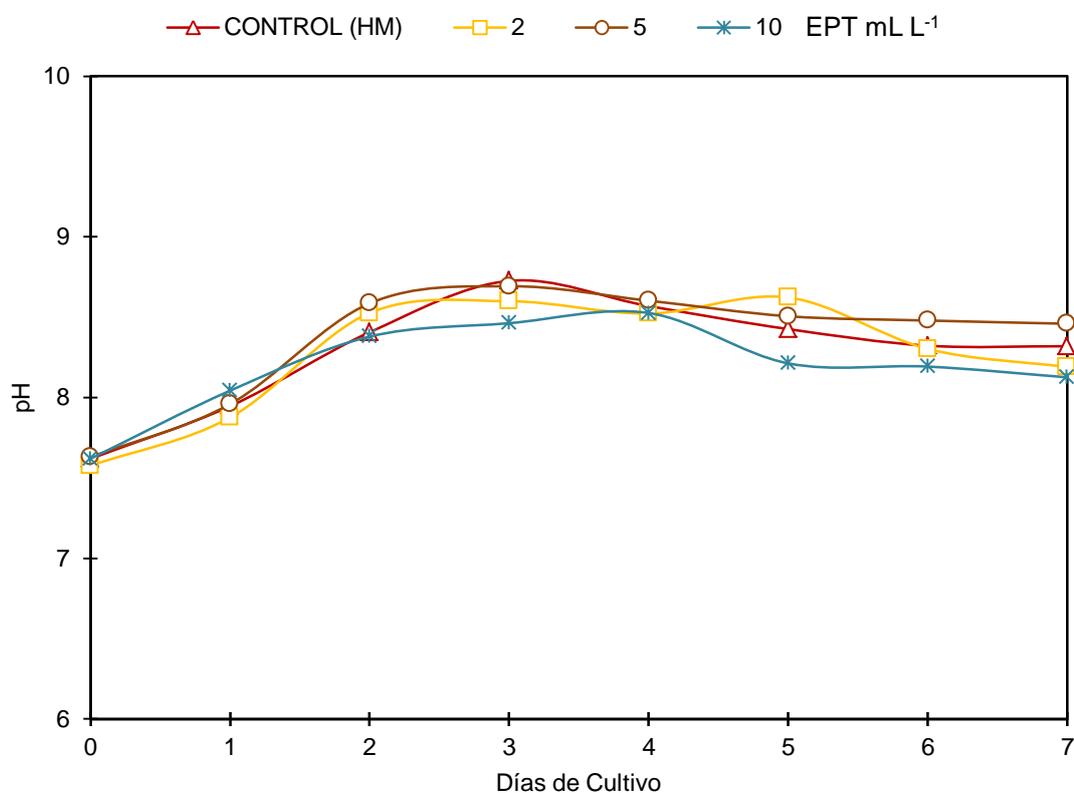


Fig. 4. pH promedio en los cultivos de *Sc. acutus* con diferentes concentraciones del efluente del procesamiento de la flor de *T. erecta* "marigold".

### 3.2. Crecimiento poblacional de *S. acutus*

Las densidades poblacionales de *Sc. acutus*, se iniciaron con valores similares ( $p>0,05$ ) de  $1,70 \times 10^6$  cél.  $\text{mL}^{-1}$  en todos los tratamientos, incrementándose en densidad con tendencias no marcadas hasta el quinto día de cultivo (Tabla 5, Fig. 5). Con mejores promedios para el grupo control ( $24,41 \times 10^6$  cél.  $\text{mL}^{-1}$ ), y el cultivo con 5  $\text{mL L}^{-1}$  de EPT ( $24,17 \times 10^6$  cél.  $\text{mL}^{-1}$ ).

Tabla 5. Densidad poblacional ( $\times 10^6$  cél.  $\text{mL}^{-1}$ ) de *Sc. acutus* en los cultivos dosificados con el efluente del procesamiento de la flor de *T. erecta* “marigold”, y HM.

| DÍA DE CULTIVO | CONTROL (HM)       | EPT ( $\text{mL L}^{-1}$ ) |                    |                       |
|----------------|--------------------|----------------------------|--------------------|-----------------------|
|                |                    | 2                          | 5                  | 10                    |
| 0              | $1,70 \pm 0,00^a$  | $1,70 \pm 0,00^a$          | $1,70 \pm 0,00^a$  | $1,70 \pm 0,00^a$     |
| 1              | $2,88 \pm 0,13^a$  | $2,47 \pm 0,12^b$          | $2,44 \pm 0,14^b$  | $3,00 \pm 0,14^a$     |
| 2              | $5,95 \pm 0,67^a$  | $5,38 \pm 0,29^a$          | $5,68 \pm 0,49^a$  | $6,56 \pm 0,24^a$     |
| 3              | $11,26 \pm 0,34^b$ | $11,82 \pm 0,37^{ab}$      | $12,89 \pm 0,87^a$ | $11,67 \pm 0,72^{ab}$ |
| 4              | $19,24 \pm 0,98^a$ | $16,98 \pm 0,48^a$         | $19,54 \pm 1,42^a$ | $18,07 \pm 1,10^a$    |
| 5              | $24,41 \pm 0,72^a$ | $19,71 \pm 0,68^b$         | $24,17 \pm 0,89^a$ | $21,70 \pm 0,98^b$    |
| 6              | $25,78 \pm 0,83^a$ | $19,64 \pm 0,99^c$         | $25,46 \pm 0,49^a$ | $22,62 \pm 0,55^b$    |
| 7              | $26,45 \pm 0,53^a$ | $20,15 \pm 0,91^c$         | $25,71 \pm 0,74^a$ | $23,02 \pm 0,46^b$    |

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

Los cultivos con *Sc. acutus* al tercer día de cultivo, mostraron una mayor densidad poblacional ( $p<0,05$ ) en el cultivo con 5  $\text{mL L}^{-1}$  de EPT, con  $12,89 \times 10^6$  cél.  $\text{mL}^{-1}$ , y la menor densidad para el control (HM), y los dosificados con 2 y 10  $\text{mL L}^{-1}$  de EPT, con 11,26, 11,82, y 11,67  $\times 10^6$  cél.  $\text{mL}^{-1}$  respectivamente.

Al quinto día de cultivo, los mayores valores ( $p<0,05$ ) en densidad poblacional de *Sc. acutus*, se encontraron en el control (HM), y el cultivo con 5  $\text{mL L}^{-1}$  de EPT, con valores de 24,41 y 24,17  $\times 10^6$  cél.  $\text{mL}^{-1}$ ; mientras que los menores

valores ( $p < 0,05$ ) fueron con 2 y 10 mL L<sup>-1</sup> de EPT con 19,71 y 21,70 x10<sup>6</sup> cél. mL<sup>-1</sup>, respectivamente.

Al final del cultivo (día 7), la mayor densidad poblacional ( $p < 0,05$ ) de *Sc. acutus* estuvo en el grupo control (HM), con 26,45 x10<sup>6</sup> cél. mL<sup>-1</sup>; seguido por el cultivo con 5 mL L<sup>-1</sup> de EPT con 25,71 x10<sup>6</sup> cél. mL<sup>-1</sup>; mientras el menor promedio ( $p < 0,05$ ) se presentó en el dosificado con 2 mL L<sup>-1</sup> de EPT con un promedio de 20,15 x10<sup>6</sup> cél. mL<sup>-1</sup>.

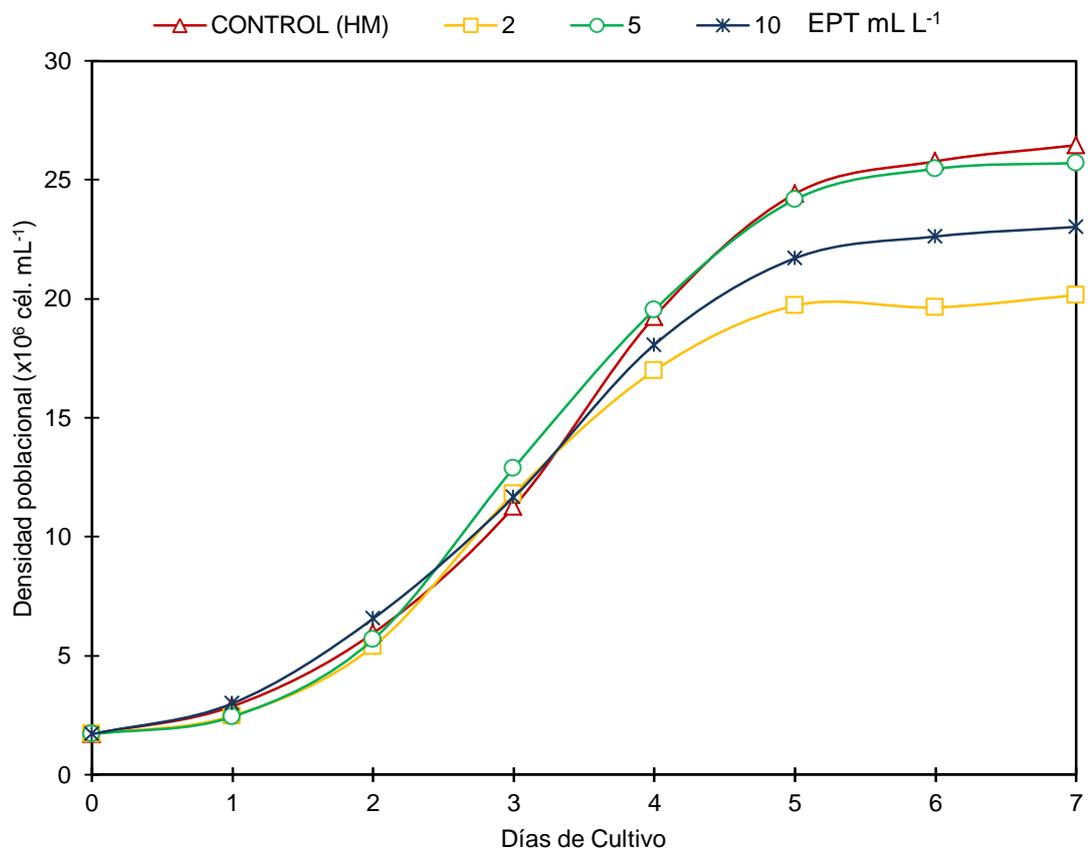


Fig. 5. Crecimiento poblacional de *Sc. acutus* cultivado con EPT y HM.

### 3.2.2. Tasa de crecimiento y tiempo de duplicación poblacional

La tasa de crecimiento poblacional ( $\mu$ ) al quinto día de cultivo de *Sc. acutus* (Tabla 6, Fig. 7), presentaron mayores promedios de manera similar ( $p>0,05$ ) en el dosificado con 5 mL L<sup>-1</sup> de EPT con 0,531 día<sup>-1</sup>, y grupo control HM, con 0,533 día<sup>-1</sup>; seguido por el de 10 mL L<sup>-1</sup> de EPT con 0,509 día<sup>-1</sup>; mientras que la menor fue con 2 mL L<sup>-1</sup> de EPT con 0,490 día<sup>-1</sup>.

Para el caso del tiempo de duplicación poblacional (TD) al quinto día de cultivo de *Sc. acutus* (Tabla 6, Fig. 8) el mayor promedio se encontró en el dosificado con 2mL L<sup>-1</sup> de EPT con 1,416 día; seguido por 10mL L<sup>-1</sup> de EPT con 1,362 día; mientras que el menor TD ( $p<0,05$ ) fue obtenido con 5 mL L<sup>-1</sup> de EPT con 1,306 día, y grupo control HM, con 1,301 día.

Tabla 6. Tasa de crecimiento ( $\mu$ ) y tiempo de duplicación (TD) poblacional de *Sc. acutus* al quinto día de ser cultivados con el efluente del procesamiento de la flor de *T. erecta* “marigold”, y HM.

| PARÁMETRO                  | CONTROL (HM)               | EPT (mL L <sup>-1</sup> )  |                            |                            |
|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
|                            |                            | 2                          | 5                          | 10                         |
| $\mu$ (día <sup>-1</sup> ) | 0,533 ± 0,006 <sup>a</sup> | 0,490 ± 0,007 <sup>c</sup> | 0,531 ± 0,007 <sup>a</sup> | 0,509 ± 0,009 <sup>b</sup> |
| TD (día)                   | 1,301 ± 0,014 <sup>a</sup> | 1,416 ± 0,020 <sup>c</sup> | 1,306 ± 0,017 <sup>a</sup> | 1,362 ± 0,024 <sup>b</sup> |

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

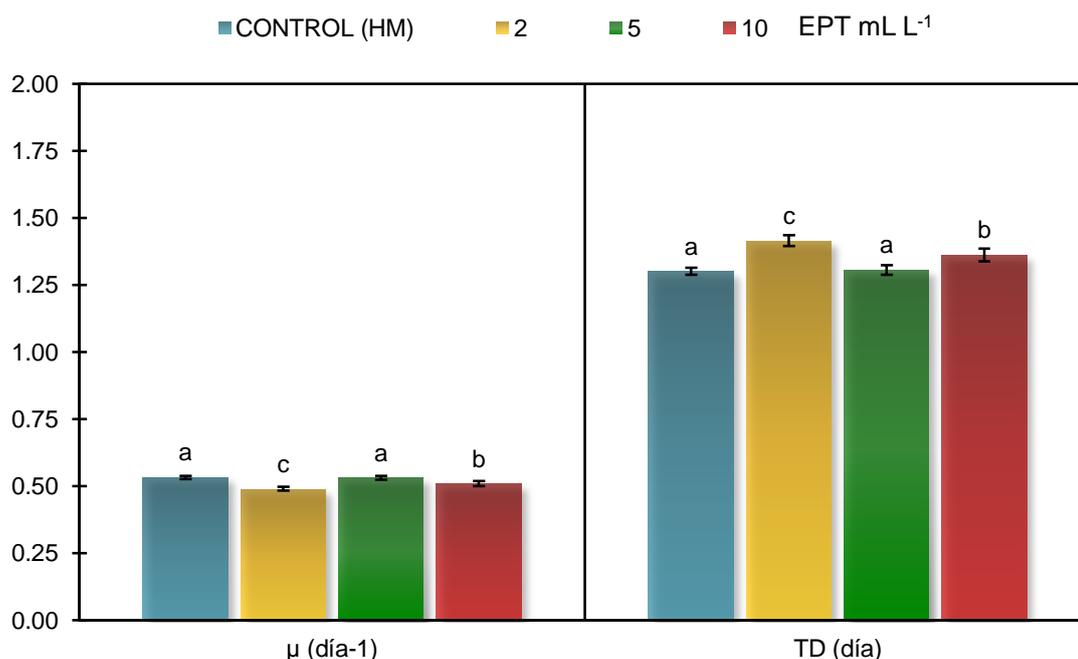


Fig. 6. Tasa de crecimiento ( $\mu$ ) y tiempo de duplicación (TD) poblacional de *Sc. acutus* al quinto día cultivo con diferentes concentraciones del efluente del procesamiento de la flor de *T. erecta* “marigold”, y HM.

### 3.3. Contenido de lípidos totales en *Sc. acutus*

El contenido de lípidos totales (%) (Tabla 7 y Fig. 8) al quinto día de cultivo, fueron significativamente similares ( $p > 0,05$ ), aunque numéricamente fueron mayores los dosificados con 5 y 10 mL L<sup>-1</sup> de EPT con 22,78% y 23,31%, respectivamente; mientras el menor porcentaje de lípidos totales se obtuvo con 2 mL L<sup>-1</sup> de EPT con 21,86 %, y grupo control (HM), con 19,11%.

Por otro lado, la biomasa de lípidos totales (mg L<sup>-1</sup>) de *Sc. acutus* (Tabla 7, Fig. 9) al quinto día de cultivo, fueron significativamente mayores ( $p < 0,05$ ) en los dosificados con 5 y 10 mL L<sup>-1</sup> de EPT con promedios de 135,7 mg L<sup>-1</sup> y 124,8 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente; mientras el menor ( $p < 0,05$ ) contenido como biomasa de lípidos totales se obtuvo con 2 mL L<sup>-1</sup> de EPT con 106,4 mg L<sup>-1</sup>, y grupo control (HM), con 114,9 mL L<sup>-1</sup>.

Tabla 7. Contenido de lípidos totales (%) y biomasa ( $\text{mg L}^{-1}$ ) al quinto día de cultivo de *Sc. acutus* cultivado con diferentes concentraciones del efluente del procesamiento de la flor de *T. erecta* “marigold”.

| PARÁMETRO          | CONTROL (HM)         | EPT ( $\text{mL L}^{-1}$ ) |                    |                      |
|--------------------|----------------------|----------------------------|--------------------|----------------------|
|                    |                      | 2                          | 5                  | 10                   |
| Lípidos (%)        | $19,11 \pm 0,89^b$   | $21,86 \pm 0,56^a$         | $22,78 \pm 0,64^a$ | $23,31 \pm 0,59^a$   |
| Biomasa de lípidos | $114,9 \pm 2,2^{bc}$ | $106,4 \pm 5,3^c$          | $135,7 \pm 6,2^a$  | $124,8 \pm 3,1^{ab}$ |

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

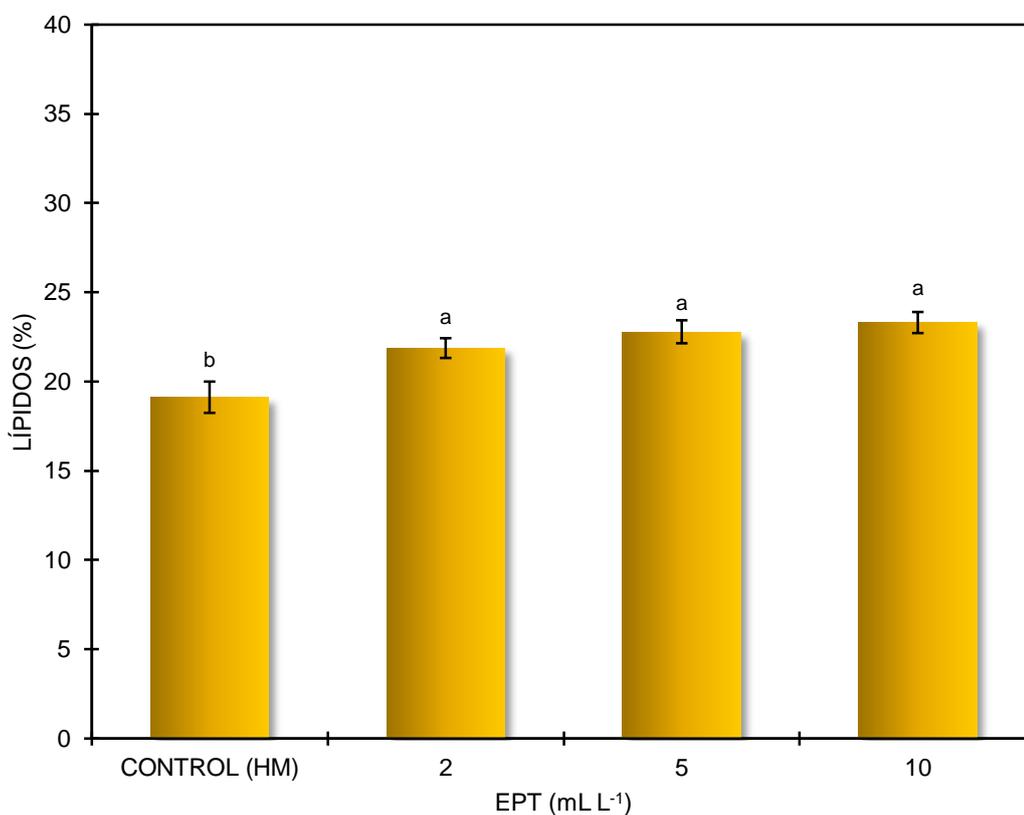


Fig. 7. Lípidos totales (%) de *Sc. acutus* en los cultivos con diferentes concentraciones del efluente del procesamiento de la flor de *T. erecta* “marigold”.

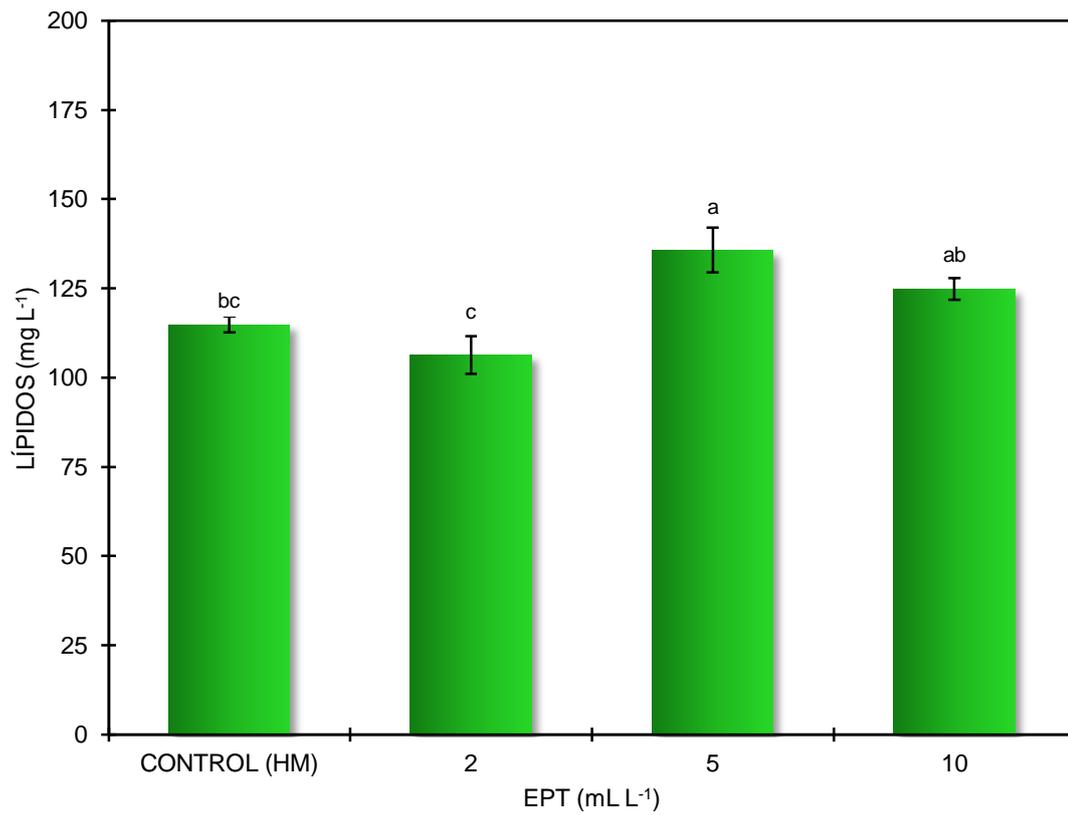


Fig. 8. Biomasa de lípidos totales de *Sc. acutus* en los cultivos con diferentes concentraciones del efluente del procesamiento de la flor de *T. erecta* “marigold”.

#### IV. DISCUSIÓN

En el trabajo de investigación con respecto a la temperatura, se registró un rango entre 25,1°C y 25,7 °C, estando en el rango (25 °C a 36 °C), mencionado por (Abalde *et al.* 1995; Richmond & Becker, 1986), aunque un poco menor (28 °C), de lo mencionado por Garibay *et al.* (2009); así mismo, Vargas *et al.* (2014), cultivando *Scenedesmus sp.* con temperaturas entre 20 y 35°C no muestran efectos significativos. Por lo que la temperatura del cultivo de *Sc. acutus* no tuvo efectos en los resultados obtenidos en el experimento con diferentes dosificaciones de EPT.

En la experiencia se obtuvieron valores de pH entre 7,58 unid. y 8,69 unid., encontrándose en el rango (6,5 a 9,5 unid), mencionado por Garibay *et al.* (2009). Notándose una ligera elevación en su valor, para el caso del tratamiento con 5 mL L<sup>-1</sup> de EPT, desde el inicio del experimento con 7,63; hasta el día tres con 8,69 de pH, esto se explica ya que dependiendo de la velocidad de crecimiento de las microalgas, ocurre un rápido consumo del carbono disponible, tornándose como un factor limitante del crecimiento poblacional, lo que ocasiona una elevación del pH a 9 si el medio de cultivo no es tamponado (Lourenço, 2006), caso contrario sucedería cuando existen elevadas concentraciones de CO<sub>2</sub> el pH sería bajo afectando un óptimo crecimiento microalgal e inclusive podría inhibir el crecimiento (Pires *et al.*, 2012; Richmond & Becker, 1986). Por lo tanto, las similares variaciones del pH de todos los cultivos, no influyeron en los resultados obtenidos.

La mayor densidad poblacional de *Sc. acutus*, se registraron al quinto día de cultivo con 5 mL L<sup>-1</sup> (24,17 x10<sup>6</sup>cél. mL<sup>-1</sup>), y 10 mL L<sup>-1</sup>(21,70 x10<sup>6</sup>cél. mL<sup>-1</sup>) cultivados con EPT, siendo estas concentraciones mayores a los reportados por Alam (2004), y Toyub *et al.* (2008), quienes usan el primero medio basal Bold (BBM) en el cultivo de *Sc. obliquus*, encontró densidades poblacionales de 10,97 x10<sup>6</sup>cél. mL<sup>-1</sup> a 19,73 x10<sup>6</sup>cél. mL<sup>-1</sup>, y el segundo, donde cultivando *Sc. obliquus* con residuos de la fabricación de dulces, obtuvo una densidad de 9,71 x10<sup>6</sup>cél. mL<sup>-1</sup>. Siendo estos menores en comparación con el presente estudio usando 2, 5, y 10 mL L<sup>-1</sup> de EPT.

Nuestros resultados se deben posiblemente a los nutrientes presentes en el EPT como Nitrógeno Total (1059,9 mg L<sup>-1</sup>), y fosforo (940 mg L<sup>-1</sup>), (Tabla 3), a diferencia del medio basal Bold, que contiene menor nitrógeno en forma de NaNO<sub>3</sub> (250 mg L<sup>-1</sup>), y

fosforo en forma de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $175 \text{ mg L}^{-1}$ ), (Alam, 2004), por lo que *Sc. acutus* podría metabolizar sin ningún problema el contenido de nutrientes presentes en el EPT. No obstante, a pesar de estos altos valores en este medio, *Sc. acutus* con  $5 \text{ mL L}^{-1}$  con ( $24,17 \times 10^6 \text{ cél. mL}^{-1}$ ), usando EPT, exhibió un crecimiento similar ( $p > 0,05$ ) al control HM ( $24,41 \times 10^6 \text{ cél. mL}^{-1}$ ), (Tabla 5), teniendo este nitrógeno en forma de urea  $206.0 \text{ mg L}^{-1}$  (Merino, 1999), pero que fueron menores al Nitrógeno Total en EPT (Tabla 3). Este crecimiento similar se debe, posiblemente al mecanismo de asimilación del nitrógeno en microalgas, ya que normalmente este nutriente se absorbe directamente en forma de amonio (Beevers & Hageman, 1983), pero que según Serpa & Calderón (2006), la urea sería asimilado directamente sin previo rompimiento a amonio, teniendo este un gasto menor de energía para su consumo. Caso contrario a lo que sucedería con el medio EPT, que teniendo gran concentración de este nutriente pero en forma de nitrito, nitrato, y nitrógeno orgánico (Tabla 3), requeriría un gasto mayor de energía para reducir estos nutrientes en amonio, Justificando tal vez así, el crecimiento similar que existe en los resultados encontrados con  $5 \text{ mL L}^{-1}$  de EPT, y el control HM (Tabla 5 y Fig. 5).

La mayor tasa de crecimiento poblacional de *Sc. acutus*, se obtuvo con  $5 \text{ mL L}^{-1}$  de EPT, con valores de  $0,531 \text{ día}^{-1}$ , menor a lo obtenido por Ortega-Salas & Reyes-Bustamante (2012), donde encontraron que *Sc. quadricauda* con medio Guillard f/2, presentó la más alta tasa de crecimiento ( $\mu$ ) con  $0,72 \text{ día}^{-1}$ ; a diferencia de lo obtenido con  $5 \text{ mL L}^{-1}$  de EPT ( $0,531 \text{ día}^{-1}$ ); ya que el medio utilizado por estos autores, a diferencia de nuestro medio EPT, es un medio nutritivo formulado especialmente para el cultivo de microalgas, donde contiene concentraciones adecuadas de hierro el cual se ha determinado mejora la productividad en sistemas acuáticos, al igual que el Mn, Mo, Co y Zn, se encuentran aquí también en las concentraciones necesarias para el crecimiento microalgal, (Guillard, 1975). Sin embargo nuestros resultados muestran ser mejores que, Roleda *et al.* (2013), que utilizando también Guillard f/2, obtuvieron valores de  $0,481 \text{ día}^{-1}$  para *Nannochloropsis oculata*;  $0,451 \text{ día}^{-1}$  para *Isochrysis galbana* y  $0,131 \text{ día}^{-1}$  para *Odontella aurita*, menores a los obtenidos con  $5 \text{ mL L}^{-1}$  de EPT ( $0,531 \text{ día}^{-1}$ ); esto debido tal vez, al nitrógeno usado en este medio, ya que fue mediante un régimen (agotado y repleto), donde este podría haber tenido, un efecto negativo en el metabolismo, el requerimiento nutricional y la composición de biomasa de estas microalgas, demostrando así que los nutrientes presentes en el EPT, posiblemente

podrían mantener buenos crecimientos poblacionales de *Sc. acutus*; asimismo, los menores valores de la tasa de duplicación de los cultivos dosificados con 5 mL L<sup>-1</sup> de EPT (1,306 día) corroboraría lo anteriormente mencionado.

Los lípidos totales con medio de cultivo EPT, registraron mayores porcentajes con 5 mL L<sup>-1</sup> (22,78 %) y 10 mL L<sup>-1</sup> (23,31%), (Tabla 7 y Fig. 8), estando dentro de lo indicado por Mandal & Mallick (2009) y Francisco *et al.* (2010) quienes consideran que el contenido de los lípidos totales en microalgas puede variar de 1 % a 70 %. Tomando en cuenta, que la naturaleza orgánica o inorgánica, y la concentración del nitrógeno en los medios de cultivo ejercen diferentes cambios en el crecimiento y composición química de las microalgas (Kaplan *et al.*, 1986; Vieira & Klaveness, 1986; Vonshak, 1986; Henriksen *et al.*, 2002), de tal manera que el nitrógeno presente en el EPT (Tabla, 4), sustentaría el crecimiento e incrementaría los porcentajes de lípidos de *Sc. acutus*.

Es así que el porcentaje de lípidos, presente en los dosificados con 5 mL L<sup>-1</sup> (22,78 %) y 10 mL L<sup>-1</sup> (23,31 %) de EPT, muestran ser mejores a lo reportado por Sheehan *et al.* (1998), que cultivando *T. suecica* con Guillard f/2 lograron hasta 22 % de lípidos totales; esto posiblemente debido al contenido de nutrientes como nitrógeno presentes en 5 mL L<sup>-1</sup> (5,30 mg L<sup>-1</sup>), y 10 mL L<sup>-1</sup> (10,60 mg L<sup>-1</sup>) de EPT, Tabla (4), que al ser menores que, el nitrógeno presente en el medio guillar (NaNO<sub>3</sub> 750 mg L<sup>-1</sup>), podrían hacer que *Sc. acutus* direcciona su metabolismo a la producción de reservas como ácidos grasos saturados, preparando a la célula para un período de privación nutricional (Santos *et al.*, 2003; López *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2012). Mostrándose estos efectos en los altos porcentajes de lípidos totales con 5 mL L<sup>-1</sup>, y 10 mL L<sup>-1</sup> de EPT (Fig. 8). Sin embargo, nuestros resultados son menores a los de Azma *et al.* (2010), donde cultivando *Sc. obliquus* en cultivos autotrófos y heterotróficos, obtuvieron 24,5 % y 51,9 % de lípidos totales, demostrándose la influencia del tipo de medio, ya que al usar diferentes concentraciones de glucosa (5, 10 y 15 g/L) y acetato de sodio (2 g/L), a demás de una serie de sustancias orgánicas (enzimas, aminoácidos, amidas, etc.), (Moronta *et al.*, 2006), hacen que sean fácilmente asimilados por la microalga, justificando los resultados obtenidos. Pero que a aun así, nuestros resultados usando el medio de cultivo EPT, podrían ser suficientes para aumentar el contenido de lípidos totales en *Sc. acutus*.

Los lípidos totales obtenidos con 2, 5 y 10 mL L<sup>-1</sup> EPT (21,86; 22,78 y 23,31%) son mejores en comparación con el control HM (19,11%), ya que el HM conteniendo alta concentración de nitrógeno en forma de urea 206 mg L<sup>-1</sup> (Tabla 1), promovería la síntesis de proteínas para mantener el crecimiento y la división celular, mientras que en condiciones de privación o agotamiento de este nutriente como el caso del EPT (Tabla 4), posiblemente produciría un aumento de las sustancias de reserva, como hidratos de carbono y lípidos a expensas de la síntesis proteica (Chiu *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2012; Penteado, 2010), en tal sentido, por los resultados obtenidos en este trabajo, podríamos decir que, a menor concentración de nitrógeno mayor porcentaje de lípidos (Tabla 4 y Fig. 8).

El fósforo es otro de los componentes a tener en cuenta, que puede modificar la composición química de las microalgas (Lourenço, 2006; Ördög *et al.*, 2011, & Siron *et al.* 1989), ya que igual al nitrógeno, es uno de los principales factores limitantes del crecimiento algal. En tal sentido, la concentración de fósforo presente con 5 mL L<sup>-1</sup> de EPT (4,70 mg L<sup>-1</sup>), (Tabla 4), presentaría la concentración más adecuada por el alto contenido de lípidos totales (22,78 %) en comparación al control HM, que teniendo mayor concentración de este nutriente en forma de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, con 11,6 mg L<sup>-1</sup> (Tabla 4), presenta menor porcentaje de lípidos (19,11%), por lo que las concentraciones de fosforo presente en el medio EPT (Tabla 4), serian tal vez suficientes para la producción de lípidos totales en *Sc. acutus*.

La biomasa de lípidos totales en *Sc. acutus* con 5 mL L<sup>-1</sup> de EPT presentaron valores de 0,135 g L<sup>-1</sup>, menores a los obtenidos por Andrade *et al* (2009), y De Oliveira (2013), que cultivando el primero *Scenedesmus sp* con aguas residuales del procesamiento de pescado fresco obtuvo 0,37 g L<sup>-1</sup>; y el segundo cultivando también *Scenedesmus sp* pero con efluente biodigerido de la bovinocultura obtiene 0,48 g L<sup>-1</sup>, siendo estos valores mayores a los obtenidos con 5 mL L<sup>-1</sup> de EPT; esto posiblemente a las cantidades de nitrógeno (48.72 a 229.2 mg L<sup>-1</sup>), y fosforo (6.01 a 29.2 mg L<sup>-1</sup>), en los medios de cultivos mencionado por Andrade *et al.* (2009), y De Oliveira (2013), que en comparación con el nitrógeno (5,30mg L<sup>-1</sup>), y fosforo (4,70 mg L<sup>-1</sup>) presente en 5 mL L<sup>-1</sup> de EPT, hacen que puedan ser fácilmente asimilados por la microalga, justificando así sus resultados. Sin embargo a pesar de esto, el medio EPT al no tener un balance adecuado de nitrógeno y fosforo (Tabla 4), tendría nutrientes en cantidad suficiente, para producir biomasa de lípidos totales en *Sc. acutus*, inclusive por en encima del

control HM, con un valor de 0,114 g L<sup>-1</sup> de lípidos (Tabla 7, y Fig. 9). De esta manera el usar el medio EPT, facilitaría la producción de lípidos en biomasa en *Sc. acutus*.

Los resultados obtenidos demuestran que el EPT es un medio que favorece el crecimiento poblacional y contenido de lípidos totales de *Sc. acutus*, siendo 5 mL L<sup>-1</sup> de EPT la concentración más adecuada para obtener mejores crecimientos poblacionales y contenido lipídico, posibilitando la transformación de tales efluentes residuales en biomasa algal. Estableciéndose así posiblemente un nuevo medio de cultivo, que favorezca la producción masiva de microalgas.

## V. CONCLUSIONES

- ✓ El mayor crecimiento poblacional ( $p < 0,05$ ) de *Sc. acutus* se obtuvo en los cultivos dosificados con  $5 \text{ mL L}^{-1}$  de EPT, en el día 5, con densidad poblacional de  $24,17 \times 10^6 \text{ cél. mL}^{-1}$ , tasa de crecimiento poblacional de  $0,531 \text{ día}^{-1}$ ; y tiempo de duplicación de 1,306 día.
- ✓ Los porcentajes de lípidos totales en *Sc. acutus* fueron similares ( $p > 0,05$ ) para todos los tratamientos con promedios de 21,86 %, 22,78 % y 23,31 % para los dosificados con 2, 5 y  $10 \text{ mL L}^{-1}$  de EPT, siendo mejores que el control HM 19,11%.
- ✓ La biomasa de lípidos totales en *Sc. acutus* fueron mayores ( $p < 0,05$ ) dosificando los cultivos con 5 y  $10 \text{ mL L}^{-1}$  de EPT con promedios de  $135,7 \text{ mg L}^{-1}$  y  $124,8 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente.

## VI. RECOMENDACIONES

- Determinar el contenido diario de carbohidratos y proteínas de *Sc. acutus* cultivado con 2, 5 y 10 mL L<sup>-1</sup> de EPT durante 7 días en laboratorio con la finalidad de evaluar la dinámica de su formación y complementar la caracterización química de la microalga cultivada con este tipo de efluente.
- Realizar cultivos al aire libre que nos permita establecer los parámetros más importantes de tales cultivos con la doble finalidad de producir biomasa algal y elaborar un proyecto de inversión para instalar plantas de cultivos algales para la producción de biocombustible.

## 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.
- Alam, M.J. 2004. Growth performance of *Scenedesmus obliquus* cultured in sweetmeat factory waste media. M.S. Thesis, Bangladesh Agricultural University, Mymensingh. 71p.
- Alejo, K. 2010. Bioprospección de microalgas para La remoción de metales pesados de aguas residuales y ambientes costeros: una aproximación para la detección de metalotioninas clase III. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Baja California, México. 102 pp.
- 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.
- 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.
- Arad, S. & A. Yaron. 1992. Natural pigments from red microalgae for use in foods and cosmetics. *Trends Food Science and Technology*. 3:92-97.
- Arce, O.O. 2006. Indicadores biológicos de calidad del agua. Tesis de Maestría, Universidad Mayor de San Simón. Cochabamba, Bolivia. 21p.
- Arredondo, B. & R. Vázquez-Duhalt. 1991. Aplicaciones biotecnológicas en el cultivo de microalgas. *Ciencia y Desarrollo*. 17:99-111.

- Azma, M.; R. Rahim; R. Mohamad & A. Ariff. 2010. Heterotrophic cultivation of microalga *Tetraselmis suecica* in stirred tank bioreactor for biomass and biofuel production. International Advanced of Technology Congress, PTWC. 3-5 noviembre del 2009. Malaysia. Care 001.
- Benedetti, A.; S. Canali & F. Lianello. 1998. La fertilizzazione organica de isuoli. En I Fertilizzanti Organici. Paolo Sequi (Ed.). Italia. Edizioni L'Informatore Agrario. 1-12pp.
- Beevers, L. & R. Hageman. 1983. Uptake and reduction of nitrate: bacteria and higher plants. *In: Encyclopedia of Plant Physiology*. 15: 351-375.
- Bermejo, R.; P. Álvarez; F. Acién & G. Molina. 2002. Recovery of pure N-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*. *J. Biotechnology*. 93:73-85.
- Bligh, E. & W. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 3:911-917.
- Borowitzka, M.A. 1997. Microalgae for aquaculture: Opportunities and constraints. *Journal of Applied Phycology*. 9:393-401.
- Borowitzka, M. & I. Borowitzka. 1989. *Microalgal biotechnology*. Eds. Cambridge University Press. España.
- Chacón, C; C. Andrade; C. Cárdenas; I. Araujo & E. Morales. 2004. Uso de *Chlorella* sp. Y *Scenedesmus* sp. en la remoción de nitrógeno, fósforo y DQO de aguas residuales urbanas de Maracaibo. Universidad del Zulia -Maracaibo, Venezuela. 13p.
- Cervera del Castillo, O. 2011. Tratamiento de purines para la producción de biomasa microalgal. Facultad de Ciencias Experimentales. Máster en Biotecnología Industrial y Agroalimentaria. Universidad de Almería, España. 32p.

- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances*. 25:294-306.
- Chiu, S.; C. Kao; M. Tsai; S. Ong; C. Chen & C. Lin. 2009. Lipid accumulation and CO<sub>2</sub> utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO<sub>2</sub> aeration. *Bioresource Technol.* 100(2):833-838.
- De Oliveira, A. 2013. Produção de biomassa de microalgas *Scenedesmus sp.* em efluente de bovino cultura biodigerido. Disertación del Programa de Postgrado en Ingeniería y Ciencias de los Materiales, Universidad Federal de Paraná. Curitiba, Brasil. 82p.
- Fábregas, J.; J. Abalde; C. Herrero; B. Cabezas & M. Veiga. 1984. Growth of marine microalgae *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentration. *Aquaculture*.42:207-215.
- Fernández, M. & C. Paredes. 2007. Efecto del extracto de ensilado de pescado y urea en el crecimiento poblacional y contenido de carbohidratos y lípidos de la microalga *Tetraselmis suecica* cultivada en condiciones de laboratorio. Tesis para Título. Universidad Nacional del Santa. Nuevo Chimbote, Perú. 62p.
- Fernández-Reiriz, M. 1989. Biomass production and variation in the biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. *Aquaculture*. 83:17-37.
- Francisco, E.; D. Neves; E. Jacob-Lopes & T. Franco. 2010. Microalgae as feedstock for biodiesel production: carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. *J. Chem Technol Biotechnol.* 85:395-403.
- Garibay, A.; R. Vázquez-Duhalt; M. Sánchez; L. Serrano & A. Martínez. 2009. Biodiesel a partir de microalgas. *Biotecnología*. 13(3):38-61.
- González L., R. Cañizales & S. Baena. 1997. "Efficiency of Ammonia and Phosphorus Removal from a Colombian Agroindustrial Wastewater by the Microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*". *Bioresource Technology* Vol.60, 259-262.

- Gouveia, L. & A.C. Oliveira. 2009. Microalgae as raw material for biofuels production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36:269-274.
- 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.
- Guillard, R. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. *In*: W.L. Smith and M. H. Chanley, eds., Culture of marine invertebrate animals. Plenum Book Publ. Corp., New York, U.S.A. 29-60pp.
- Henriksen, P.; B. Riemann; H. Kaas; H. Munk & H. Lang. 2002. Effects of nutrient limitation and irradiance on marine phytoplankton Pigments. *J. Plank. Res.* 24(9):835-858.
- Hernández, B. 2010. Remoción de ortofosfato y amonio de agua residual municipal por tres cultivos libres e inmovilizados de microalgas. Tesis de Especialidad, Unidad Iztapalapa, Universidad Autónoma Metropolitana. México D. F., México. 57p.
- Hernández, B.M.; M.C. Rodríguez; C. Lozano & P. Castilla. 2012. Remoción de nutrientes por tres cultivos de microalgas libres e inmovilizados. *Méxic. Rev. Latinoam. Biotecnol. Amb. Algal.* 3(1):80-94.
- 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 Título. Universidad Nacional del Santa. Nuevo Chimbote, Perú. 65p.

- Kaplan, D.; A. Richmond; Z. Dubinsky & S. Aaronson. 1986. *Algal nutrition*. In: Handbook of Microalgal Mass Culture. Richmond, A. (ed.), CRC Press, Boca Raton. Florida, U.S.A. 147-198pp.
- Knud-Hansen, C. 1998. *Pond fertilization: ecological approach and practical applications*. Pond dyn MICS/Aquaculture collaborative research support program. Oregon State University, Corvallis, Or. U.S.A. 125p.
- López, D.; E. Belarbib; J. Fernández-Sevillab; J. Rodríguez-Ruiza & E. Molina. 2000. Acyl lipid composition variation related to culture age and nitrogen concentration in continuous culture of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Phytochemistry*. 54:461-471.
- Lourenço, S. O. 2006. *Cultivo de Microalgas Marinhas - princípios e aplicações*. 1era. edic. São Carlos: RiMa, Brasil. 606p.
- Mandal, S. & N. Mallick. 2009. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84:281-291.
- Marsh, J. & D. Weinstein. 1966. Simple charring method for determination of lipids. *J. Lipid Res.* 7:574-576.
- Méndez, L; I. Albarracín; M. Cravero & R. Salomón. Crecimiento de *Scenedesmus quadricauda* en efluentes cloacales de la ciudad de Trelew, chubut, argentina. Facultad de Ciencias Naturales – UNPSJB. 9p.
- Merino, F. 1999. Efecto del ácido acético con sustrato limitante en el crecimiento de *Scenedesmus acutus* usando cultivos batch. Informe de Investigación. Universidad Nacional del Santa. Nuevo Chimbote, Perú.
- Millán-Oropeza, M. & L. Fernandez-Linares. 2012. Efecto de la limitación de nitrógeno en la producción de lípidos en *Neochloris oleoabundans* y *Scenedesmus sp.* Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología -IPN, Av. Acueducto s/n Col. Barrio la Laguna Ticomán, C.P. 07340 México D.F., México. 7p.

- Morales, E.; M. Rodríguez; D. García; C. Loreto & E. Marco. 2002. Crecimiento, producción de pigmentos y exopolisacáridos de la cianobacteria *Anabaena sp.* PCC 7120 en función del pH y CO<sub>2</sub>. *Interciencias*. 27:373-378.
- Moronta, R., R. Mora & E. Morales. 2006. Respuesta de la microalga *Chlorella sorokiniana* al pH, salinidad y temperatura en condiciones axénicas y no axénicas. *Rev. Fac. Agron. Luz.*, 23: 28-43.
- Olgún E.; S. Galicia; O. Angulo-Guerrero & E. Hernández. 2001. The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina sp.* (*Arthrospira*) grown on digested pig waste. *Bioresource Technology*. 77:19-24.
- Ördög, V.; W. Stirk; P. Bálint; J. Van Staden & C. Lovász. 2012. Changes in lipid, protein and pigment concentrations in nitrogen-stressed *Chlorella minutissima* cultures. *Journal of Applied Phycology*. 24(4):907-914.
- Orta de Velásquez, T.; V. Rojas; I. Yáñez & J. Londoño. 2006. Alternativa de tratamiento de lixiviados de rellenos sanitarios en plantas de aguas residuales urbanas. Instituto de ingeniería, Coordinación de Ingeniería Ambiental, Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F., México. 12p.
- Ortega-Salas, A. & H. Reyes-Bustamante. 2012. Cultivo de las microalgas dulceacuícolas *Kirchneriella obesa*, *Scenedesmus quadricauda* y *Chlorococcum infusorium* empleando tres medios de cultivo. *A.I.A.* 16(2):35-44.
- Oswald, W. 1988. Micro-algae and waste-water treatment. Borowitzka M.A., L.J. Borowitzka, (eds.). *Micro-Algal Biotechnology*. New York, Cambridge University Press. U.S.A. 305-328pp.
- Pellón, A; E Benítez; J. Frades; L. García; A. Cerpa & EJ. Alguacil. Empleo de microalga *Scenedesmus obliquus* en la eliminación de cromo presente en aguas residuales galvánicas. *Rev. Metal Madrid* 39 (2003) 9-16.  
<http://revistademetalurgia.revistas.csic.es>

- Penteado, D.M.R. 2010. Estudos de otimização do meio de cultura para a microalga *Phaeodactylum tricornutum* para a produção de Lipídios. Disetacion del Masterado en Bioquímica, Área de Ciencias Biológicas, Universidad Federal de Paraná. Curitiba, Brasil. 114p.
- Pires, J.C.; M.C. Alvim-Ferraz; F.G. Martins & M. Simões. 2012. Carbon dioxide capture from flue gases using microalgae: Engineering aspects and biorefinery concept. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 16:3043-3053.
- Pulz, O. 2001. Photobioreactors: Production systems for phototrophic microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57(3):287-293.
- Quevedo, C.; S. Morales & A. Acosta. 2008. Crecimiento de *Scenedesmus sp.* en diferentes medios de cultivo para la producción de proteína microalgal. *Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*. 15(1):25-31.
- Rangel, C.; J. Botello; H. Jimenez; R. Rico & J. Navarrete. 2008. Optimización del proceso de tratamiento enzimático de la flor del cempasúchil para la extracción de xantofilas. *Revista de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioenergía*. 12(1):10-22.
- Richmond, A. & E.W. Becker. 1986. *Technological aspects of mass cultivation - A general outline*. In: Richmond A (ed.), *CRC Handbook of microalgal mass culture*. CRC Press Inc., Boca Raton. 245-264pp.
- Ritter, S.; R. Hiller; P. Wrench; W. Welte & K. Diederichs. 1999. Crystal structure of a phycourobilin-containing phycoerythrin at 1.90-Å resolution. *J. Struct. Biol.* 126:86-97.
- Rivero, R. 2010. Cultivo de *Chlorella vulgaris* sobre residuales Industriales: una alternativa responsable y útil. 7mo Congreso Internacional de Educación Superior. Universidad de Oriente. 13p.

- 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 sp.* en riles orgánicos pesqueros y su influencia en la remoción de la contaminación. *Ingeniería Hidráulica y Ambiental*, 32(3):32-38.
- Ruiz, 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, España. 102p.
- Sabido, M; C. Domínguez; S. Solís; A. Cardos; S. Ortiz & G. Rivera. 2007. Uso de desechos agrícolas y subproductos agroindustriales en la recuperación, por adsorción, de biomasa de *Dunaliella salina*. IV Reunión de investigación agrícola, forestal y pesca. Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica. Instituto Tecnológico de Mérida. Yucatán, México. 4p.
- Santos, G.M.; R.V. Macedo & R.M. Alegre. 2003. Influencia do teor de nitrogênio no cultivo de *Spirulina máxima* em duas temperaturas – Parte I: Alteração da Composição da Biomassa. *Ciênc.Tecnol. Aliment.* 23(Supl):17-21.
- Serpa, R.& A. Calderón. (2006). Efecto de diferentes fuentes de nitrógeno en el contenido de carotenoides y clorofilade cuatro cepas peruanas de *Dunaliella salina* , Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima - Perú. Vol. 5, num. 1-2, diciembre, 2006, p. 93-99.
- Sheehan, J.; T. Dunahay; J. Benemann & P. Roessler. 1998. A look back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from algae. Close-Out report. National Renewable Energy Lab., Department of Energy, Golden. Colorado, U.S.A. Report number NREL/TP-580-24190.

- Siron, R.; G. Giusti & B. Berland. 1989. Changes in the fatty acid composition of *Phaeodactylum tricornutum* and *Dunaliella tertiolecta* during growth and under phosphorus deficiency. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 55:95-100.
- Tarkus, R. & A. Valdés. 2011. La Producción de biocombustibles y su impacto alimentario, energético y medio ambiental. Programa CYTED. Resultado de la Cooperación entre: Agencia Medio Ambiente (AMA) Cuba, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) México, Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) México, Universidad Autónoma de Yucatán (UADY) México, Universidad de la Frontera Chile. La Habana, Cuba. 135p.
- Toyub, M.; M. Miah; M. Habib & M. Rahman. 2008. Growth performance and nutritional value of *Scenedesmus obliquus* cultured in different concentrations of sweetmeat factory waste media. *Bang. J. Anim. Sci.* 37(1):86-93.
- Vargas, N.; M. Farenzena & J. Otávio. 2014. Growth of microalgae *Scenedesmus sp* in ethanol vinasse. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 57(5):630-635.
- Vásquez, C. 2008. Validación farmacológica de la actividad diurética de hojas de flor de muerto (*Tagetes erecta* L.), hojas de Santo Domingo (*Baccharis trinervis* Lam.) y hojas de matasano (*Casimiroa edulis* Llave. et Lex.) en infusión acuosa. Tesis para Título. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala. 41p.
- Ventosa, A. & J. Nieto. 1995. Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganism. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 11:85-94.
- Vieira, A. & D. Klaveness. 1986. The utilization of organic nitrogen compounds as sole nitrogen source by some freshwater phytoplankters. *Nord. J. Bot.* 6(1):93-97.
- Vonshak, J. 1986. Laboratory techniques for the culturing of microalgae. *In: Handbook of microalgal mass culture.* Richmond, A. (ed.), CRC Press Inc. Boca Raton. Florida, U.S.A. 117-145pp.

Xu, L.; F. Wang; C. Guo & C. Liu. 2012. Improved algal oil production from *Botryococcus braunii* by feeding nitrate and phosphate in an airlift bioreactor. Eng. Life Sci. 12(2):171-177.

## **VIII. ANEXOS**

Anexo 1. Temperatura (°C) en los cultivos de *Sc. acutus* con EPT y HM.

| DÍA DE CULTIVO | CONTROL (HM) |      |      | EPT (mL L <sup>-1</sup> ) |      |      |      |      |      |      |      |      |
|----------------|--------------|------|------|---------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|                |              |      |      | 2                         |      |      | 5    |      |      | 10   |      |      |
|                | R1           | R2   | R3   | R1                        | R2   | R3   | R1   | R2   | R3   | R1   | R2   | R3   |
| 0              | 25,2         | 25,3 | 25,2 | 25,4                      | 25,2 | 25,2 | 25,3 | 25,2 | 25,3 | 25,2 | 25,3 | 25,2 |
| 1              | 24,9         | 24,7 | 25,6 | 25,5                      | 25,3 | 25,0 | 25,2 | 25,5 | 25,0 | 24,9 | 25,5 | 25,0 |
| 2              | 25,7         | 25,9 | 25,5 | 26,0                      | 25,2 | 25,5 | 26,0 | 25,8 | 25,3 | 26,0 | 25,2 | 25,9 |
| 3              | 25,6         | 25,2 | 25,2 | 25,2                      | 25,6 | 25,7 | 25,4 | 25,7 | 25,4 | 25,2 | 24,9 | 25,2 |
| 4              | 25,7         | 25,6 | 25,4 | 25,4                      | 25,2 | 25,5 | 24,7 | 25,2 | 25,3 | 24,9 | 25,5 | 25,2 |
| 5              | 25,8         | 25,1 | 25,6 | 25,5                      | 25,2 | 25,3 | 25,1 | 25,2 | 25,4 | 25,6 | 25,5 | 25,4 |
| 6              | 25,1         | 25,7 | 25,3 | 25,5                      | 25,2 | 26,0 | 25,8 | 25,5 | 25,2 | 25,5 | 25,5 | 25,9 |
| 7              | 25,4         | 25,5 | 25,8 | 25,0                      | 25,9 | 25,5 | 25,7 | 25,4 | 25,0 | 25,2 | 25,4 | 25,8 |

Anexo 2. Temperatura promedio (°C) en los cultivos de *Sc. acutus* con EPT y HM.

| DÍA DE CULTIVO | CONTROL (HM)            | EPT (mL L <sup>-1</sup> ) |                         |                         |
|----------------|-------------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------|
|                |                         | 2                         | 5                       | 10                      |
| 0              | 25,2 ± 0,1 <sup>a</sup> | 25,3 ± 0,1 <sup>a</sup>   | 25,3 ± 0,1 <sup>a</sup> | 25,2 ± 0,1 <sup>a</sup> |
| 1              | 25,1 ± 0,5 <sup>a</sup> | 25,3 ± 0,3 <sup>a</sup>   | 25,2 ± 0,3 <sup>a</sup> | 25,1 ± 0,3 <sup>a</sup> |
| 2              | 25,7 ± 0,2 <sup>a</sup> | 25,6 ± 0,4 <sup>a</sup>   | 25,7 ± 0,4 <sup>a</sup> | 25,7 ± 0,4 <sup>a</sup> |
| 3              | 25,3 ± 0,2 <sup>a</sup> | 25,5 ± 0,3 <sup>a</sup>   | 25,5 ± 0,2 <sup>a</sup> | 25,1 ± 0,2 <sup>a</sup> |
| 4              | 25,6 ± 0,2 <sup>a</sup> | 25,4 ± 0,2 <sup>a</sup>   | 25,1 ± 0,3 <sup>a</sup> | 25,2 ± 0,3 <sup>a</sup> |
| 5              | 25,5 ± 0,4 <sup>a</sup> | 25,3 ± 0,2 <sup>a</sup>   | 25,2 ± 0,2 <sup>a</sup> | 25,5 ± 0,1 <sup>a</sup> |
| 6              | 25,4 ± 0,3 <sup>a</sup> | 25,6 ± 0,4 <sup>a</sup>   | 25,5 ± 0,3 <sup>a</sup> | 25,6 ± 0,2 <sup>a</sup> |
| 7              | 25,6 ± 0,2 <sup>a</sup> | 25,5 ± 0,5 <sup>a</sup>   | 25,4 ± 0,4 <sup>a</sup> | 25,5 ± 0,3 <sup>a</sup> |

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

Anexo 3. Valores de pH en los cultivos de *Sc. acutus* con EPT y HM.

| DÍA DE CULTIVO | CONTROL (HM) |      |      | EPT (mL L <sup>-1</sup> ) |      |      |      |      |      |      |      |      |
|----------------|--------------|------|------|---------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|                |              |      |      | 2                         |      |      | 5    |      |      | 10   |      |      |
|                | R1           | R2   | R3   | R1                        | R2   | R3   | R1   | R2   | R3   | R1   | R2   | R3   |
| 0              | 7,63         | 7,62 | 7,61 | 7,54                      | 7,53 | 7,66 | 7,60 | 7,57 | 7,72 | 7,61 | 7,64 | 7,61 |
| 1              | 7,94         | 7,97 | 7,93 | 7,99                      | 7,84 | 7,80 | 8,13 | 7,87 | 7,88 | 8,00 | 8,05 | 8,08 |
| 2              | 8,40         | 8,47 | 8,35 | 8,49                      | 8,53 | 8,56 | 8,50 | 8,65 | 8,61 | 8,39 | 8,47 | 8,28 |
| 3              | 8,69         | 8,78 | 8,71 | 8,65                      | 8,55 | 8,60 | 8,81 | 8,64 | 8,63 | 8,54 | 8,36 | 8,49 |
| 4              | 8,54         | 8,55 | 8,62 | 8,43                      | 8,61 | 8,53 | 8,68 | 8,42 | 8,71 | 8,38 | 8,68 | 8,52 |
| 5              | 8,47         | 8,38 | 8,43 | 8,32                      | 8,69 | 8,86 | 8,39 | 8,77 | 8,36 | 8,24 | 8,10 | 8,30 |
| 6              | 8,35         | 8,24 | 8,38 | 8,20                      | 8,43 | 8,28 | 8,59 | 8,52 | 8,33 | 8,21 | 8,21 | 8,16 |
| 7              | 8,46         | 8,14 | 8,36 | 8,28                      | 8,21 | 8,08 | 8,48 | 8,26 | 8,64 | 7,95 | 8,22 | 8,21 |

Anexo 4. pH promedio en los cultivos de *Sc. acutus* con EPT y HM.

| DÍA DE CULTIVO | CONTROL (HM)              | EPT (mL L <sup>-1</sup> ) |                          |                          |
|----------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                |                           | 2                         | 5                        | 10                       |
| 0              | 7,62 ± 0,01 <sup>a</sup>  | 7,58 ± 0,07 <sup>a</sup>  | 7,63 ± 0,08 <sup>a</sup> | 7,62 ± 0,02 <sup>a</sup> |
| 1              | 7,95 ± 0,02 <sup>a</sup>  | 7,88 ± 0,10 <sup>a</sup>  | 7,96 ± 0,15 <sup>a</sup> | 8,04 ± 0,04 <sup>a</sup> |
| 2              | 8,41 ± 0,06 <sup>ab</sup> | 8,53 ± 0,04 <sup>ab</sup> | 8,59 ± 0,08 <sup>a</sup> | 8,38 ± 0,10 <sup>b</sup> |
| 3              | 8,73 ± 0,05 <sup>a</sup>  | 8,60 ± 0,05 <sup>ab</sup> | 8,69 ± 0,10 <sup>a</sup> | 8,46 ± 0,09 <sup>b</sup> |
| 4              | 8,57 ± 0,04 <sup>a</sup>  | 8,52 ± 0,09 <sup>a</sup>  | 8,60 ± 0,16 <sup>a</sup> | 8,53 ± 0,15 <sup>a</sup> |
| 5              | 8,43 ± 0,05 <sup>a</sup>  | 8,62 ± 0,28 <sup>a</sup>  | 8,51 ± 0,23 <sup>a</sup> | 8,21 ± 0,10 <sup>a</sup> |
| 6              | 8,32 ± 0,07 <sup>ab</sup> | 8,30 ± 0,12 <sup>ab</sup> | 8,48 ± 0,13 <sup>a</sup> | 8,19 ± 0,03 <sup>b</sup> |
| 7              | 8,32 ± 0,16 <sup>a</sup>  | 8,19 ± 0,10 <sup>a</sup>  | 8,46 ± 0,19 <sup>a</sup> | 8,13 ± 0,15 <sup>a</sup> |

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

Anexo 5. Densidad poblacional ( $\times 10^6$  cél. mL<sup>-1</sup>) de *Sc. acutus* con EPT y HM.

| DÍA DE<br>CULTIVO | CONTROL (HM) |       |       | EPT (mL L <sup>-1</sup> ) |       |       |       |       |       |       |       |       |
|-------------------|--------------|-------|-------|---------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                   |              |       |       | 2                         |       |       | 5     |       |       | 10    |       |       |
|                   | R1           | R2    | R3    | R1                        | R2    | R3    | R1    | R2    | R3    | R1    | R2    | R3    |
| 0                 | 1,70         | 1,70  | 1,70  | 1,70                      | 1,70  | 1,70  | 1,70  | 1,70  | 1,70  | 1,70  | 1,70  | 1,70  |
| 1                 | 2,82         | 2,79  | 3,02  | 2,61                      | 2,44  | 2,37  | 2,49  | 2,28  | 2,54  | 2,89  | 3,16  | 2,94  |
| 2                 | 5,18         | 6,26  | 6,41  | 5,19                      | 5,72  | 5,24  | 5,90  | 5,12  | 6,03  | 6,82  | 6,51  | 6,35  |
| 3                 | 11,32        | 10,89 | 11,57 | 11,47                     | 12,21 | 11,77 | 12,61 | 12,19 | 13,86 | 12,40 | 11,64 | 10,96 |
| 4                 | 19,61        | 19,98 | 18,13 | 16,61                     | 17,52 | 16,81 | 18,04 | 19,71 | 20,86 | 16,83 | 18,93 | 18,45 |
| 5                 | 24,23        | 25,21 | 23,80 | 19,64                     | 20,43 | 19,07 | 23,22 | 24,31 | 24,98 | 21,47 | 20,86 | 22,78 |
| 6                 | 26,42        | 26,07 | 24,84 | 19,12                     | 20,78 | 19,01 | 25,31 | 26,01 | 25,06 | 23,11 | 22,03 | 22,71 |
| 7                 | 27,01        | 26,40 | 25,95 | 19,35                     | 21,14 | 19,96 | 25,63 | 26,49 | 25,01 | 23,31 | 23,26 | 22,49 |

Anexo 6. Tasa de crecimiento ( $\mu$ ) y Tiempo de duplicación (TD) poblacional de *Sc. acutus* con EPT y HM.

| DÍA DE CULTIVO                             | CONTROL (HM) |       |       | EPT (mL L <sup>-1</sup> ) |       |       |       |       |       |       |       |       |
|--|--------------|-------|-------|---------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|  |              |       |       | 2                         |       |       | 5     |       |       | 10    |       |       |
|  | R1           | R2    | R3    | R1                        | R2    | R3    | R1    | R2    | R3    | R1    | R2    | R3    |
| <b>N0</b>                                  | 1,70         | 1,70  | 1,70  | 1,70                      | 1,70  | 1,70  | 1,70  | 1,70  | 1,70  | 1,70  | 1,70  | 1,70  |
| <b>Nf</b>                                  | 24,23        | 25,21 | 23,80 | 19,64                     | 20,43 | 19,07 | 23,22 | 24,31 | 24,98 | 21,47 | 20,86 | 22,78 |
| <b>Día</b>                                 | 5            | 5     | 5     | 5                         | 5     | 5     | 5     | 5     | 5     | 5     | 5     | 5     |
| <b><math>\mu</math> (día<sup>-1</sup>)</b> | 0,531        | 0,539 | 0,528 | 0,489                     | 0,497 | 0,483 | 0,523 | 0,532 | 0,537 | 0,507 | 0,501 | 0,519 |
| <b>TD (día)</b>                            | 1,305        | 1,286 | 1,313 | 1,417                     | 1,395 | 1,435 | 1,325 | 1,303 | 1,291 | 1,367 | 1,384 | 1,336 |

Anexo 7. Biomasa, absorbancia, porcentaje y biomasa de lípidos de *Sc. acutus* cultivada con EPT y HM.

| PARÁMETROS                            | EPT (mL L <sup>-1</sup> ) |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
|---------------------------------------|---------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|                                       | CONTROL (HM)              |        |        | 2      |        |        | 5      |        |        | 10     |        |        |
| <b>Biomasa (mg x4mL<sup>-1</sup>)</b> | 2,39                      | 2,48   | 2,35   | 1,94   | 2,02   | 1,88   | 2,29   | 2,40   | 2,46   | 2,12   | 2,06   | 2,25   |
| <b>Biomasa (mg L<sup>-1</sup>)</b>    | 597,50                    | 620,00 | 587,50 | 485,00 | 505,00 | 470,00 | 572,50 | 600,00 | 615,00 | 530,00 | 515,00 | 562,50 |
| <b>Absorbancia</b>                    | 0,326                     | 0,317  | 0,329  | 0,307  | 0,310  | 0,283  | 0,372  | 0,373  | 0,403  | 0,346  | 0,348  | 0,362  |
| <b>Lípidos (%)</b>                    | 19,35                     | 18,13  | 19,86  | 22,45  | 21,77  | 21,35  | 23,04  | 22,05  | 23,24  | 23,15  | 23,96  | 22,82  |
| <b>Lípidos (mg L<sup>-1</sup>)</b>    | 115,6                     | 112,4  | 116,7  | 108,9  | 109,9  | 100,3  | 131,9  | 132,3  | 142,9  | 122,7  | 123,4  | 128,4  |