



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS



ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOLOGÍA EN
ACUICULTURA

INFORME DE TESIS

**Efecto de tres concentraciones de melaza (0.5, 1.0 y 2.0 g l⁻¹)
como fuente de carbono orgánico en el crecimiento y
contenido de lípidos en *Tetraselmis suecica*, en condiciones de
laboratorio.**

AUTOR:

Bach. REYES LUNA Jesús Manuel

ASESOR:

M. Sc. CAPA ROBLES Willian

NUEVO CHIMBOTE, ENERO DEL 2014

PERÚ

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

INFORME DE TESIS

**Efecto de tres concentraciones de melaza (0.5, 1.0 y 2.0 g l⁻¹)
como fuente de carbono orgánico en el crecimiento y
contenido de lípidos en *Tetraselmis suecica*, en condiciones de
laboratorio.**

TESISTA:

Bach.: REYES LUNA Jesús Manuel

M. Sc. CAPA ROBLES Willian
ASESOR

Nuevo Chimbote, enero del 2014
PERÚ

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

INFORME DE TESIS

**Efecto de tres concentraciones de melaza (0.5, 1.0 y 2.0 g l⁻¹)
como fuente de carbono orgánico en el crecimiento y
contenido de lípidos en *Tetraselmis suecica*, en condiciones de
laboratorio.**

TESISTA:

Bach.: REYES LUNA Jesús Manuel

**M. Sc. MERINO MOYA Juan Fernando
PRESIDENTE**

**Blgo. Acuic. MENDOZA ESPINOZA Sorayda
MIEMBRO DEL JURADO**

**M. Sc. CAPA ROBLES Willian
MIEMBRO DEL JURADO**

**Nuevo Chimbote, enero del 2014
PERÚ**

DEDICATORIA

A Dios por guiarme por un buen camino todos estos años, por cuidarme y darme la fortaleza para afrontar los malos momentos.

A mis abuelas Julia y María Teresa, que formaron parte de mi vida y ahora ocupan un lugar muy grande en mi corazón. Para Ana y Jesús, a los que amo muchísimo, no hubiese alcanzado las metas trazadas sin su apoyo incondicional, por la motivación que me daban para salir adelante y por haberme guiado por un camino beneficioso. A mi hermano Gustavo, que a pesar de todo lo malo me saca una sonrisa y me motiva a seguir a adelante. Y a mis amores Jackeline y María Jesús a las cual amo y adoro.

Al Profesor Juan F. Merino Moya, porque sin su motivación no hubiese seguido el camino hacia el fantástico mundo de las microalgas.

A mis Formadores, los Catedráticos de la Escuela de Biología en Acuicultura.

A mi amigo y hermano Martín, por cuidarme. Y por ayudarme a tomar la decisión más importante de mi vida, el de ser BIOLOGO ACUICULTOR.

A Mayra y Antonio Mendoza, unas personas muy especiales.

A mis mejores amigos que me acompañaron en mi época universitaria: Karen, Balvina, Roxana, Raúl, Juan Daniel y Junior;

AGRADECIMIENTO

A Dios por apoyarme espiritualmente y emocionalmente para salir adelante y no quedarme en el camino que elegí.

A mis padres Jesús y Ana, que contribuyeron con mi educación en todos los niveles posibles.

Al profesor Willian Capa Robles por el apoyo brindado en la elaboración de mi proyecto de tesis.

Al profesor Juan Fernando Merino Moya, por todo el apoyo logístico e intelectual durante la ejecución de mi proyecto de tesis, estaré eternamente agradecido por la cogida en su laboratorio de trabajo.

A la profesora Sorayda Mendoza, por asesorarme y despejar dudas con respecto a las microalgas.

Al profesor Luis Pajuelo por el apoyo con el análisis estadístico.

A la Sr. Maribel Astete y el Sr. Oscar Chauca; por el apoyo brindado con materiales, equipos de laboratorio y el asesoramiento correspondiente.

A Edwin Cotos, por todo el apoyo intelectual brindado.

Giuseppe Alayo Vidal, por la información brindada respecto al análisis estadístico.

A Henry Lujan Monja, por el apoyo brindado con material bibliográfico.

INDICE

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTO	ii
INDICE DE TABLAS	v
INDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
INTRODUCCIÓN	1
MATERIALES Y MÉTODOS	5
1. Localización del experimento.....	5
2. Diseño experimental.....	5
3. Microalga <i>Tetraselmis suecica</i>	6
4. Tratamiento de agua de mar.....	7
5. Medio Guillard f/2.....	7
6. Preparación de la fuente de carbono.....	8
7. Determinación del crecimiento poblacional.....	9
8. Determinación de lípidos totales.....	10
9. Determinación de parámetros físicos y químicos del cultivo.....	12
10. Análisis estadístico.....	12
RESULTADOS	13
1. Efecto de la dosificación de melaza como fuente de carbono en el crecimiento poblacional de <i>T. suecica</i>	13
2. Tasa de crecimiento específico (μ) y tiempo de duplicación diaria (TD) de <i>T. suecica</i>	14
3. Contenido de lípidos totales.....	15
4. Variación del pH.....	16
5. Variación de la temperatura.....	17

DISCUSIÓN.....	18
CONCLUSIONES.....	22
RECOMENDACIONES.....	23
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24
ANEXOS.....	31

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Se muestran los tratamientos con sus respectivas repeticiones, el medio de cultivo y la dosificación de melaza para cada tratamiento experimental.....	5
Tabla 2. Composición química del medio Guillard f/2 (Guillard, 1975)....	7
Tabla 3. Composición química de la melaza.....	8

INDICES DE FIGURAS

Figura 1. Observación de <i>T. suecica</i> con un microscopio óptico a 40x.....	6
Figura 2. Escalamiento de <i>T. suecica</i> . a. cultivo de 500 ml; b. cultivo de 2 litros; c. cultivo de 5 litros.....	6
Figura 3. Cultivo experimental de <i>T. suecica</i> en condiciones de laboratorio.....	7
Figura 4. Preparación de la fuente de carbono orgánico: a. pesaje de 100 gr de melaza; b. vertimiento de la melaza en una probeta de 500ml; c. adición de agua potable hasta enrasar los 500ml; d. cocción del homogenizado a 80 °C por 15 min.....	7
Figura 5. Crecimiento poblacional de <i>T. suecica</i> con distintas concentraciones de melaza como fuente de carbono orgánico.....	14
Figura 6. Tiempo de variación de la tasa de crecimiento específico (μ) y el tiempo de duplicación (TD) de los cultivos experimentales de <i>T. suecica</i> con diferentes concentraciones de melaza.....	15
Figura 7. Contenido de lípidos totales en porcentaje (%) y en masa seca (mg.l^{-1}) del cultivo experimental de <i>T. suecica</i> con distintas concentraciones de melaza.....	16
Figura 8. La fluctuación del pH se muestra por cada tratamiento experimental, durante los 5 días de cultivo de <i>T. suecica</i> con distintas concentraciones de melaza.....	17
Figura 9. Se muestra la fluctuación de la temperatura por días de cada tratamiento del cultivo experimental de <i>T. suecica</i> con melaza.....	17

RESUMEN

Se investigó el efecto de la melaza de caña como fuente de carbono orgánico en el crecimiento y contenido de lípidos de *Tetraselmis suecica*, la investigación se realizó en el laboratorio de Cultivos de Especies Auxiliares de la Escuela de Biología en Acuicultura de la Universidad Nacional del Santa, el cultivo de *T. suecica* tuvo una duración de 5 días. Para el tratamiento control se usó el medio de cultivo Guillard (f/2) y para los tratamientos experimentales se trabajó con dosis de 0.5, 1.0 y 2.0 g.l⁻¹ de melaza. Obteniéndose como resultado una densidad algal de 1958.0 x10³, 2207.33 x10³ y 1184.33 x10³ cel.ml⁻¹ respectivamente. Determinándose así que la dosis con 1.0 g.l⁻¹ de melaza es diferente significativa ($p < 0.05$) con respecto a los otros tratamientos experimentales. En cuanto al contenido de lípidos el tratamiento con 0.5 g.l⁻¹ y el tratamiento control no tuvieron diferencia significativa, sin embargo estos tratamientos si tienen diferencia significativa con respecto al tratamiento 1.0 y 2.0 g.l⁻¹. Por lo tanto se pudo determinar que se obtiene un mejor crecimiento algal con el tratamiento con 1 g.l⁻¹ de melaza.

Palabras claves: *Tetraselmis suecica*, carbono orgánico, melaza, cultivo heterotrófico.

ABSTRACT

The effect of cane molasses as organic carbon source on growth and lipid content of *Tetraselmis suecica* was investigated, the research was conducted in the laboratory of Auxiliary Crop Species in Aquaculture Biology School of National University of Santa the culture of *T. suecica* lasted 5 days. Control treatment Guillard culture medium (f/2) was used and experimental treatments are worked with doses of 0.5, 1.0 and 2.0 g.l⁻¹ of molasses. Yielding results in algal density 1958.0 x10³, 2207.33 x10³ y 1184.33 x10³ cel.ml⁻¹ respectively. Thereby determining the dose with 1.0 g.l⁻¹ of molasses is significantly different (p<0.05) compared to the other experimental treatments. Regarding the lipid content treatment 0.5 g.l⁻¹ and the control treatment had no significant difference, however if these treatments have significant difference with respect to treatment 1.0 and 2.0 g.l⁻¹. Therefore it was determined that a better algal growth to treatment with 1 g.l⁻¹ is obtained of molasses.

Keywords: *Tetraselmis suecica*, organic carbon, molasses, heterotrophic cultivation

INTRODUCCIÓN

Las microalgas es un grupo de microorganismos fotosintéticos con una estructura simple, lo que permite el rápido crecimiento celular y por lo tanto una mayor producción de biomasa (Li *et al.*, 2009). La producción de microalgas se ha convertido en un campo muy atractivo para la biotecnología y acuicultura, debido a que posibilita el desarrollo de sistemas de producción a bajo costo como una apropiada alternativa para el desarrollo de unidades de cultivo a nivel masivo e industrial (Amat, 1987; Le Borgne, 1990; Solis, 1987; Uribe, 1993; Vega, 1993).

Las microalgas se proveedoras de compuestos de alto valor nutricional y de interés comercial. De manera muy general la microalgas poseen de 30 a 45 % proteínas, el contenido de lípidos oscilan entre 10 y 20 %, en cuanto a los carbohidratos se tiene valores de 10 a 25% en su composición bioquímica proximal.

Representan una muy buena fuente de vitaminas, dado su elevado contenido de vitamina C, niacina, riboflavina, tiamina, ácido pantoténico, cianocobalamia, piridoxina y biotina, pudiendo variar su contenido debido a los factores externos de cultivo (Cañavate, 2011). También posee pigmentos como la astaxantina, el β -caroteno, luteína, cantaxantina y clorofila (Quin *et al.*, 2008). Actualmente es una fuente de alimento vivo para los primeros estadios larvales en acuicultura, fuente de pigmentos y biodiesel (Bitog *et al.*, 2009).

Una de las microalgas marinas más estudiadas es *Tetraselmis suecica* siendo un alga eurihalina, que crece a temperaturas entre 18 y 30 °C, pH entre 7.5 y 8.0 y salinidades de 25 a 40 e iluminación constante con fotoperiodo natural (Cañavate, 2011). Es común observarla en aguas costeras y estuarinas (Borowizka *et al.*, 1989), su tamaño celular es de alrededor de 10 micrómetros de diámetro, aunque regularmente, mediante granulometría láser se determinó que mide 8 micrómetros (Morineau *et al.*, 2001), ajustándose a la fracción fitoplanctónica de nanoplancton y su principal importancia está en que posee las dimensiones que le permiten ser consumida por las fases larvales de los bivalvos filtradores (Borowizka *et al.*, 1989).

El cultivo de *Tetraselmis* a gran escala es relativamente fácil, constituyéndose como una buena fuente de alimento en la acuicultura (Padilla, 1975). Siendo ampliamente utilizada como alimento para juveniles de moluscos bivalvos, larvas de camarones

peneidos y rotíferos (Day *et al.*, 1991). La microalga *T. suecica* posee en su composición celular proximal 10.5% de proteína, 51.9% carbohidratos y 14% de lípidos (Azma *et al.*, 2009). Pudiéndose modificar la composición proximal de esta microalga en cultivo semicontinuo, al variar los factores externos, obteniéndose una concentración 45% de proteína, 13% de carbohidratos y 32% de lípidos (Chini – Zittelli *et al.*, 2006).

Existen distintos tipos de cultivos algales, entre ellos: el cultivo fototrófico es aquel donde la microalga utiliza la luz como fuente de energía y el CO₂ (Huang *et al.*, 2010). Cuando se sustituye el CO₂ por carbono orgánico se denomina cultivo heterotrófico. En cambio, cuando se utiliza simultáneamente para su crecimiento luz y sustratos orgánicos como fuente de energía, y una fuente de carbono inorgánico u orgánicos, la microalga manifiesta su capacidad mixotrófica (Van Baalen, 1973).

Las microalgas por ser heterotróficas pueden asimilar una gran variedad de fuentes de carbono orgánico para su crecimiento, como glucosa, acetato, glicerol, fructosa, sacarosa, lactosa, galactosa y manosa, actualmente se está incidiendo más en aspectos tales como la búsqueda de nuevas fuentes de carbono más económicas como el hidrolizado de harina de maíz en lugar de azúcares, obteniendo mayor productividad de biomasa y de lípidos (Chen *et al.*, 2011). Sin embargo, la necesidad de una fuente de carbono orgánico (principalmente glucosa) para cultivos heterótrofos hace que no sea tan económicamente favorable como cultivos fotoautotrófico. Por eso se han propuestos azúcares residuales industriales para sustituir a la glucosa (Xu *et al.*, 2006; Cheng *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2009). Una fuente alternativa de carbono orgánico para el cultivo de microalgas puede ser la melaza de caña, que es un desperdicio de la industria azucarera, que consta con aproximadamente 50% de azúcares totales (principalmente sacarosa, glucosa y fructosa), agua, proteína cruda, grasa, metales pesados, vitaminas y otros (Jiang *et al.*, 2009). La melaza de caña con el tratamiento adecuado resultó ser una fuente de carbono adecuada para el cultivo heterotrófico del género *Dunaliella*, *Chlorella* y *Scenedesmus* (Liu *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2011).

La melaza es un subproducto de la refinación de azúcar, siendo una reserva de carbono barata que puede utilizarse para la producción de lípidos en algas (Yan *et*

al., 2011). Contando con aproximadamente 14% de glucosa libre, 60% de sacarosa, 16% de agua, 9% de ceniza, 3% de proteínas y 0.4% de lípidos además de otros nutrientes incluyendo vitaminas y oligoelementos en su composición (Téllez, 2004). Con el tratamiento adecuado resulta ser una fuente de carbono adecuada para el cultivo de una serie de microorganismos (Liu *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2011).

T. suecica ha sido cultivada heterotróficamente, ya que posee la habilidad de absorber y metabolizar compuestos orgánicos, mejorando la densidad celular del cultivo y la productividad, además de aumentar la cantidad de lípidos (Azma *et al.*, 2011). Sin embargo, la composición bioquímica de la célula puede ser afectada por la fuente de carbono utilizada en el cultivo heterótrofo (Cid *et al.*, 1992).

La melaza de caña como fuente de carbono para el crecimiento celular y la producción de compuestos con valor agregado, ha sido estudiada en *Chlorella zofingiensis* (Jin Liu *et al.*, 2011), *Chlorella protothecoides* (Yan *et al.*, 2011), *Scenedemus obliquus* (Mostafa *et al.*, 2012), *Scenedesmus obliquus* (Toyub *et al.*, 2008), *Dunaliella salina* y *Scenedesmus* sp. (Merino, 2000). Obteniéndose resultados favorables como fuente alternativa de carbono orgánico.

En la investigación se utilizará la melaza como fuente de carbono orgánico en el cultivo experimental de *T. suecica*, con la finalidad de obtener mayor crecimiento y mayor producción de lípidos. Aprovechando el residuo generado por la industria azucarera, que posee una gran cantidad de azúcares (principalmente sacarosa, glucosa y fructosa), que pueden ser usadas como sustrato orgánico en el cultivo algal, con excelentes posibilidades de producir mayor biomasa algal y lípidos a bajo costo y/o producción de microalgas como alimento vivo para diversas fases larvarias de organismos acuáticos de importancia económica.

Se planteó el siguiente problema de investigación: ¿Cuál es el efecto de tres concentraciones de la melaza (0.5, 1.0 y 2.0 g.l⁻¹) como fuente de carbono orgánico en el crecimiento y la producción de lípidos en *Tetraselmis suecica*, en condiciones de laboratorio?

Hipótesis:

Si se usa dosis de 0.5 g l⁻¹, 1.0 g l⁻¹ y 2.0 g l⁻¹ de melaza de caña de azúcar como fuente de carbono orgánico en *T. suecica* se obtendrá un mayor crecimiento y una mayor producción de lípidos con la dosis de 1 g l⁻¹.

Hipótesis estadística:

$$H_0: T_c = T_1 = T_2 = T_3$$

$$H_1: T_c < T_1 < T_2 > T_3$$

Objetivo General

- Determinar el efecto de tres concentraciones de melaza (0.5 g l⁻¹, 1.0 g l⁻¹ y 2.0 g l⁻¹) como fuente de carbono orgánico en el crecimiento y contenido de lípidos de *Tetraselmis suecica* en condiciones de laboratorio.

Objetivos Específicos

- Determinar el efecto de las diferentes concentraciones de la melaza como fuente de carbono orgánico en el crecimiento de *T. suecica*.
- Determinar el efecto de las diferentes concentraciones de melaza como fuente de carbono orgánico en el contenido de lípidos en *T. suecica*.
- Determinar la variación del pH del cultivo experimental de *T. suecica* según la dosificación de la melaza de caña de azúcar.

MATERIALES Y METODOS

1. Localización del experimento

El trabajo de investigación se desarrolló en el laboratorio de Cultivos de Especies Auxiliares de la Escuela Académico Profesional de Biología en Acuicultura de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional del Santa, desde el 1 de junio hasta el 8 de noviembre del 2013.

2. Diseño experimental

Para el trabajo de investigación, se empleó un diseño experimental de estímulo creciente, con un tratamiento control (medio Guillard f/2) y tres tratamientos experimentales (melaza), y cada tratamiento con tres repeticiones, tal como se muestra en la tabla 1.

Para el ensayo se usaron dosis de 0.5 g.l^{-1} , 1.0 g.l^{-1} y 2.0 g.l^{-1} de melaza (Tabla 1) en el cultivo experimental de *Tetraselmis suecica*, estas dosis fueron determinadas a través de un ensayo realizado, basándonos en la experiencia de Mostafa *et al.*, (2012), en el cultivo de *Scenedesmus obliquus*, usando dosis de 1 g.l^{-1} , 3 g.l^{-1} y 5 g.l^{-1} de melaza.

Tabla 1. Se muestran los tratamientos con sus respectivas repeticiones, el medio de cultivo y la dosificación de melaza para cada tratamiento experimental.

TRATAMIENTO	REPETICIONES	MEDIO DE CULTIVO Y DOSIS DE MELAZA
CONTROL	1	Medio Guillard f/2
	2	
	3	
I	1	Medio Guillard f/2 + 0.5 g.l^{-1} de melaza
	2	
	3	
II	1	Medio Guillard f/2 + 1.0 g.l^{-1} de melaza
	2	
	3	
III	1	Medio Guillard f/2 + 2.0 g.l^{-1} de melaza
	2	
	3	

3. Microalga *Tetraselmis suecica*

La cepa de la microalga marina *T. suecica* (Fig.1) fue proporcionada por el Laboratorio de Cultivos de Especies Auxiliares de la Escuela Académico Profesional de Biología en Acuicultura de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional del Santa.

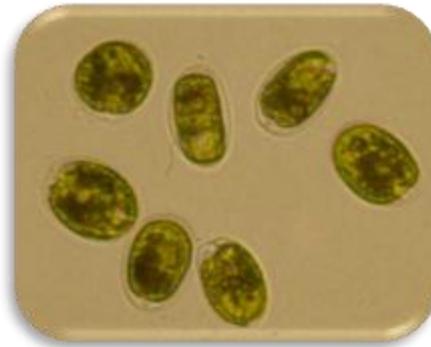


Figura 1. Observación de *T. suecica* con un microscopio óptico a 40 x.

La cepa de *T. suecica* inicialmente se cultivó en recipientes de 500 ml (Fig.2a), con agua de mar tratada y enriquecida con medio Guillard f/2, luego se realizó el escalamiento a recipientes de 2 litro (Fig.2b). Y posteriormente a recipientes de 5 litros (Fig.2c).

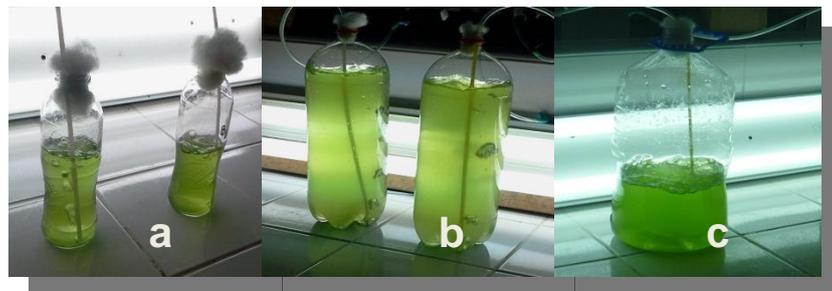


Figura 2. Escalamiento de *T. suecica*. **a.** cultivo de 500 ml; **b.** cultivo de 2 litros; **c.** cultivo de 5 litros.

Para el cultivo experimental de *T. suecica* se utilizó 12 botellas plásticas de 3000 ml de capacidad, utilizando agua de mar, previamente tratada y dosificada con medio Guillard f/2 en condiciones de laboratorio, en cada botella se trabajó con un volumen efectivo de un litro (fig. 3)

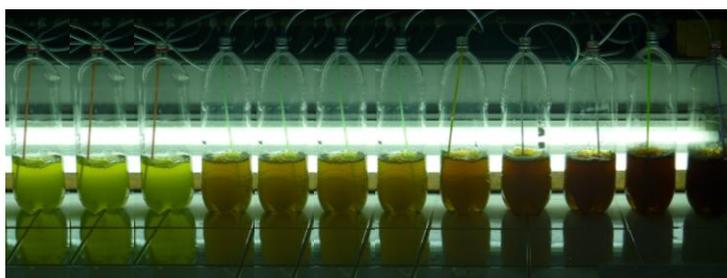


Figura 3. Cultivo experimental de *T. suecica* en condiciones de laboratorio.

4. Tratamiento del agua de mar

El agua de mar empleada para la ejecución de la investigación procedió de la playa El Dorado, ubicada en la bahía de Samanco, distrito de Nuevo Chimbote, Provincia del Santa y Departamento de Ancash, Perú.

El agua de mar recolectada se almacenó en un tanque de 250 litros de capacidad y se dejó sedimentar por 2 días. Luego se filtró con una malla de algodón (manga) de 2μ de diámetro; para luego colocarla en recipientes de 20 litros; se agregó 1ml l^{-1} de hipoclorito de sodio al agua de mar, después de 24 horas se adicionó 1ml l^{-1} tiosulfato de sodio al 15% para neutralizar el del hipoclorito de sodio libre en el agua de mar.

5. Medio de cultivo Guillard f/2

El medio Guillard f/2 está compuesto por nutrientes, metales traza y vitaminas establecidas por Guillard en 1975 (Tabla 2), fue usada para el escalamiento del inoculo y en el tratamiento control de *T. suecica* durante la experiencia.

Tabla 2. Composición química del medio Guillard f/2 (Guillard, 1975).

Solución básica de nutrientes	Cantidad por litro
NaNO_3	75 mg.
$\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na.H}_2\text{O}$	5 mg.
Solución de metales traza	Cantidad
Na_2EDTA	4.36 mg.
$\text{Cl}_3\text{Fe.6H}_2\text{O}$	3.15 mg.
$\text{SO}_4\text{Cu.5H}_2\text{O}$	0.01 mg.
$\text{SO}_4\text{Zn.7H}_2\text{O}$	0.022 mg.
$\text{Cl}_2\text{Co.6H}_2\text{O}$	0.01 mg.

$\text{Cl}_2\text{Mn}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.18 mg.
$\text{MoO}_4\text{Na}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.06 mg.
Solución de Vitaminas	Cantidad
Cianocobalamina (B12)	0.5 mg.
Tiamina. HCl (B1)	0.1 mg.
Biotina (Vit. H)	0.5 mg.

6. Preparación de la fuente de carbono orgánico

La melaza es un subproducto de la caña de azúcar, la cual posee un bajo costo y una composición química (Tabla 3) adecuada para ser usada como fuente de carbono orgánico.

Tabla 3. Composición química de la melaza.

COMPONENTES	CONSTITUYENTE	CONTENIDO (P/P)
Componentes Mayores	Materia seca	78%
	Proteínas	3%
	Sacarosa	60 - 63 % p/p
	Azúcares reductoras	3 - 5 % p/p
	Agua	16%
	Grasas	0.40%
	cenizas	9%
Contenido de Minerales	Calcio	0.74%
	Magnesio	0.35%
	Fósforo	0.08%
	Potasio	3.67%
Contenido De Aminoácidos	Glicina	0.10%
	Leucina	0.01%
	Lisina	0.01%
	Treonina	0.06%
	Valina	0.02%
Contenido de Vitaminas	Colina	600 ppm
	Niacina	48,86 ppm
	Ácido Pantoténico	42.90 ppm
	Piridoxina	44 ppm
	Riboflavina	4.40 ppm
	Tiamina	0.88 ppm

Fuente: Tellez (2004); Yopez (1995).

Para la preparación, se pesó 100 g de melaza (Fig.4a), luego se agregó la melaza a una probeta (Fig.4b), se enrazó con agua de caño hasta alcanzar los 500 ml (Fig.4c). Se mezcló hasta homogenizarla. Después se vertió en un matraz de vidrio y con la ayuda de una cocina eléctrica se hirvió hasta que el homogenizado llegue a una temperatura de 80 °C aproximadamente, por 15 min. (Fig.4d). Luego se retiró el homogenizado y se enfrió a temperatura ambiente. Cada 5ml de la solución stock equivale a 1g de melaza adicionada al cultivo de *T. suecica*.

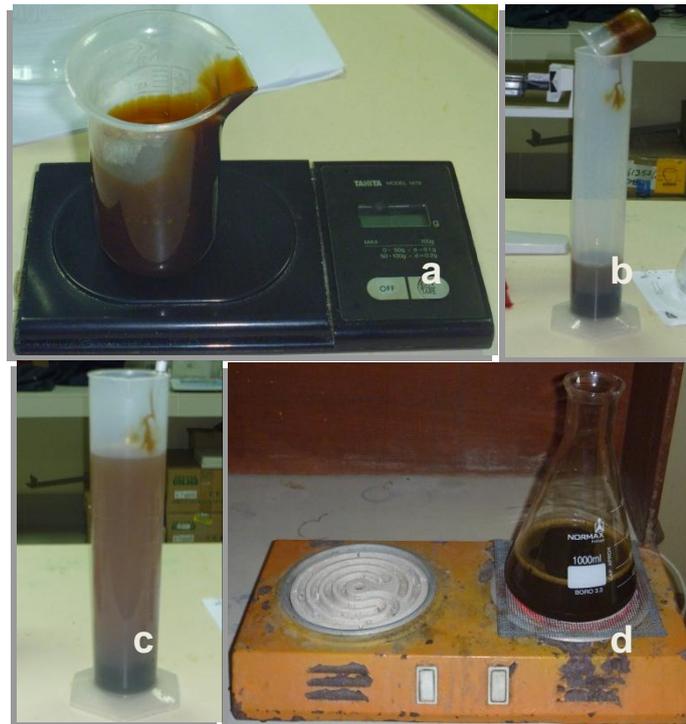


Figura 4. Preparación de la fuente de carbono orgánico: **a.** pesaje de 100 g de melaza; **b.** vertimiento de la melaza en una probeta de 500ml; **c.** adicionamiento de agua potable hasta enrazar los 500ml; **d.** cocción del homogenizado a 80 °C por 15 min.

7. Determinación del crecimiento poblacional

Se determinó el crecimiento poblacional de *T. suecica* realizándose conteos celulares diarios, usando la cámara de Neubauer y un microscopio Motic a 40x, por un periodo de 5 días. Las muestras de *T. suecica* fueron extraídas con una pipeta Pauster, agregándose solución lugol para inmovilizar a la célula y facilitar el conteo celular.

La cantidad de células por mililitro (cel. ml⁻¹) se determinaron a través de la ecuación de Neubauer (French *et al.*, 1982).

$$N_b = \frac{\sum \text{Cel. } C_b}{4} \times 10000$$

Dónde:

N_b: Número de células por m l⁻¹ (cel/ml)
∑cel.C_b: Suma de células en 4 cuadrantes externos de la cámara Neubauer.

También se determinó y graficó la tasa de crecimiento específico (μ) y el tiempo de duplicación diaria (TD) a través de las siguientes ecuaciones de Guillar (1975):

$$\mu = \frac{\ln\left(\frac{N_f}{N_o}\right)}{T_f - T_o}$$

$$TD = \frac{\ln(2)}{U}$$

Dónde:

N_o: Número inicial de células
N_f: Número final de células
T_o: Tiempo inicial
T_f: Tiempo final

8. Determinación de lípidos totales

Para la determinación de lípidos totales se realizó según Bligh *et al.*, (1959), se extrajo 10ml de muestras de cultivo de *T. suecica* que fueron tomadas al 5° día de la fase experimental. La muestra se centrifugó a 10 000 rpm por 10 min., luego se eliminó el sobrenadante y se realizó el secado de la masa algal con la ayuda de una estufa a 45 °C por 24 horas. Al día siguiente, se pesaron 5 mg de la muestra seca de cada unidad experimental y se colocaron en tubos de ensayo, se añadió 3 ml de metanol: cloroformo (2:1); se agitó y se protegió de la luz, manteniéndolo refrigerado a 5 °C por 24 horas.

Transcurrido este tiempo se adicionó 3 ml de agua destilada, se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 minutos; enseguida se extrajo la capa superior y se realizó la evaporación de cloroformo por secado con calor a 80°C aproximadamente. Se agregó 2 ml de ácido sulfúrico concentrado (98 %) y se llevó a un digestor a una temperatura de 200 °C por 30 minutos; luego se enfrió con agua a 10 °C. Luego se realizaron las lecturas en el espectrofotómetro Turner Barstearnd Internacional con celdas de cuarzo a una longitud de onda de 375nm.

La ecuación general para determinar el contenido, en % y en mg l⁻¹, de los lípidos (Bligh *et al.*, 1959; Marsh *et al.*, 1966) son las siguientes:

$$L (\%) = \frac{\left(\left(\frac{\text{Absorbancia}}{1,5597} \right) x V \right)}{M} x 100$$

Dónde:

V: Volumen final de la muestra analizada (5ml de cada muestra)

M: Pesos de muestra seca (mg)

Para determinar los lípidos totales (mg l⁻¹), los datos obtenidos se reemplazaron en la siguiente fórmula:

$$L (mg l^{-1}) = \frac{\left(\left(\frac{\text{Absorbancia}}{1,5597} \right) x V \right)}{M} x B = \frac{L x B}{100}$$

Dónde:

V: Volumen final de la muestra analizada (5ml de cada muestra)

M: Pesos de muestra seca (mg)

B: Biomasa seca total por litro (mg)

9. Determinación de parámetros físicos y químicos del cultivo

Se registró el pH cada 24 horas en todos los tratamientos experimentales, utilizando un pH-metro digital Oakton con ± 0.01 de sensibilidad y el registro de la temperatura se realizó usando termómetro digital marca Hanna con ± 0.1 de sensibilidad. La iluminación se mantuvo constante, utilizando 2 fluorescentes de 40 watts colocados a una distancia de 10 cm de los cultivos algales, obteniéndose 2000 lux de intensidad luminosa de 2000 lux, medidos con un luxómetro digital Hanna de ± 0.1 de sensibilidad.

El flujo de aire fue suministrado constantemente por un blower de 1HP, medido con flujómetro Cole Parmer con sensibilidad de 10 ml min.^{-1} , a través de tubos de PVC, para agitar los cultivos y evitar la sedimentación algal e incrementar la exposición luminosa de las algas.

Análisis estadístico

A los datos de crecimiento poblacional, contenido de lípidos, pH y temperatura obtenido durante la experiencia, se le realizó un análisis estadístico con el software SPSS20. Se usó el análisis de varianza (ANOVA) y se estableció la existencia de la diferencia significativa entre las medias. De existir diferencia significativa se procedió a realizar la prueba de Tukey, identificando los promedios significativamente diferentes; para el análisis estadístico se usó un nivel de significancia de 0.05.

RESULTADOS

1. Efecto de la dosificación de melaza como fuente de carbono en el crecimiento poblacional de *T. suecica*

Los resultados obtenidos se muestran en la Fig.5, se puede observar los promedios de cada tratamiento experimental, siendo el tratamiento con 1.0 g.l⁻¹ de melaza ($8.10 \times 10^5 \text{cel.ml}^{-1}$), mayor que los otros tratamientos experimentales en el primer día de la experiencia. Sin embargo de acuerdo al análisis estadístico no existe diferencia significativa entre los tratamientos experimentales para este día.

En el segundo día del cultivo, se puede observar que el tratamiento con 0.5 g.l⁻¹ y 1.0 g.l⁻¹ de melaza se diferencia ($p < 0.05$) de los otros tratamientos experimentales, alcanzando crecimientos de $11.97 \times 10^5 \text{cel.ml}^{-1}$ y $12.99 \times 10^5 \text{cel.ml}^{-1}$ respectivamente.

El crecimiento máximo se observó a partir del tercer día de cultivo en los tratamientos con 0.5 g.l⁻¹ y 1.0 g.l⁻¹ de melaza alcanzando una densidad algal de $19.58 \times 10^5 \text{cel.ml}^{-1}$ y $22.07 \times 10^5 \text{cel.ml}^{-1}$ respectivamente, siendo estos dos tratamiento estadísticamente diferentes al tratamiento control y al tratamiento con 2.0 g.l⁻¹ de melaza que llegaron a alcanzar densidades de $14.77 \times 10^5 \text{cel.ml}^{-1}$ y $11.84 \times 10^5 \text{cel.ml}^{-1}$ respectivamente.

A partir del cuarto día los tratamientos experimentales con melaza detienen su crecimiento y comienza la fase de muerte, disminuyendo la población algal, a comparación del tratamiento control que sigue aumentando su densidad (fig.5).

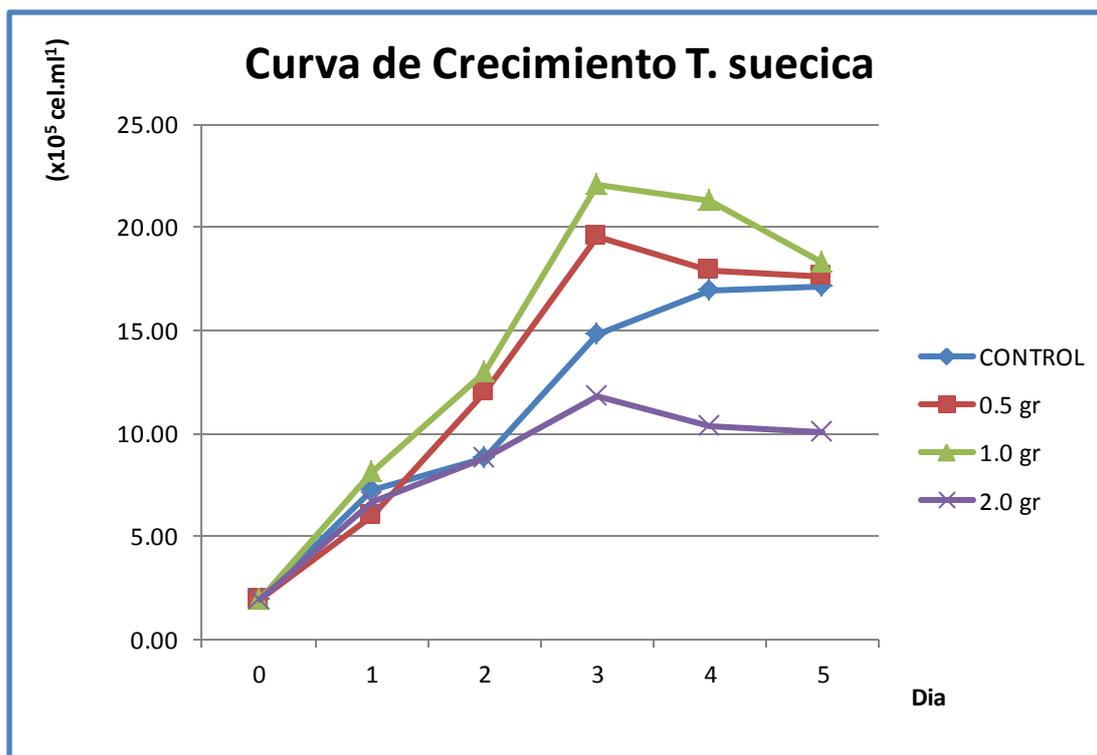


Figura 5. Crecimiento poblacional de *T. suecica* con distintas concentraciones de melaza como fuente de carbono orgánico.

2. Tasa de crecimiento específico (μ) y tiempo de duplicación diaria (TD) de *T. suecica*

Los datos obtenidos de la tasa de crecimiento específico (μ) y tiempo de duplicación diaria (TD) se muestran en la figura 6.

En los datos obtenidos para la tasa de crecimiento (Fig.6), se puede observar que el tratamiento con 0.5 g.l⁻¹ (0.7688 día⁻¹) y 1.0 g.l⁻¹ (0.8103 día⁻¹) son diferentes ($p < 0.05$) al tratamiento control (0.5072 día⁻¹) y al tratamiento con 2.0 g.l⁻¹ (0.5998 día⁻¹). Demostrándose que la mayor tasa de crecimiento en los tratamientos con 0.5 y 1.0 g.l⁻¹ de melaza.

En cuanto al tiempo de duplicación diaria, no se encontró diferencias entre los tratamientos con 0.5 y 1.0 g.l⁻¹ de melaza, obteniéndose valores de 0.9034 y 0.8556 día⁻¹ respectivamente. Estos tratamientos se diferenciaron del tratamiento control (1.3678 día⁻¹) y del tratamiento con 2.0 g.l⁻¹ de melaza (1.1631 día⁻¹), confirmando el efecto de la melaza en el crecimiento.

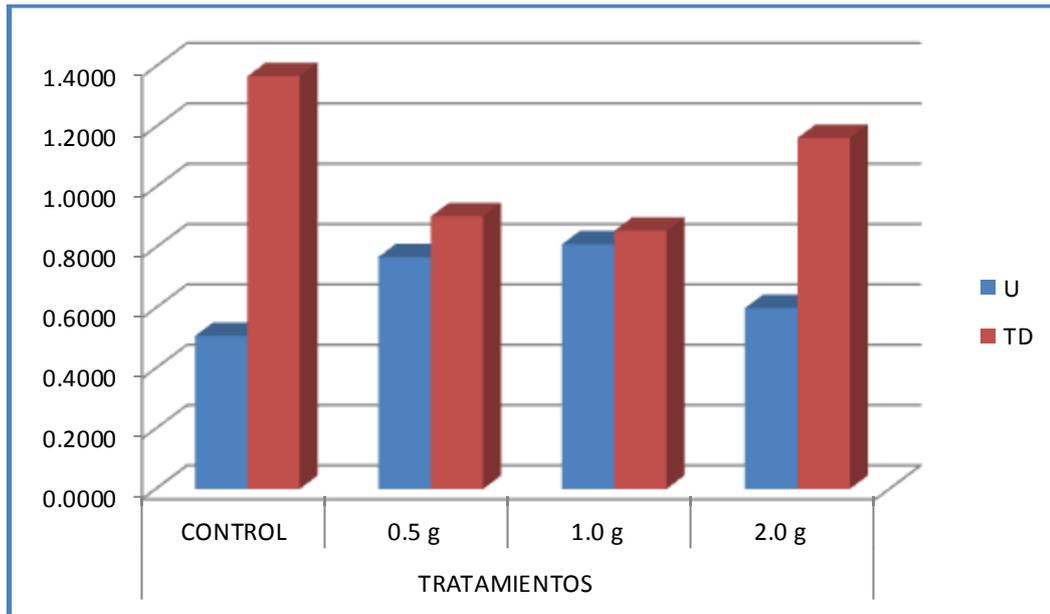


Figura 6. Tasa de crecimiento específico (μ) y el tiempo de duplicación (TD) de los cultivos experimentales de *T. suecica* con diferentes concentraciones de melaza al tercer día de cultivo

3. Contenido de lípidos totales

El análisis del contenido de lípidos totales se realizó al quinto día del cultivo experimental, obteniéndose los siguientes resultados (Fig. 7), el tratamiento control obtuvo un mayor porcentaje de lípidos (20.33 %) en relación a los tratamientos experimentales con 0.5, 1.0 y 2.0 g.l⁻¹ que alcanzaron valores de 16.17, 10.33 y 11.20 % respectivamente. De acuerdo al análisis estadístico el tratamiento control y el tratamiento con 0.5 g.l⁻¹ de melaza no poseen diferencia significativa. Sin embargo estos tratamientos si poseen diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto a los tratamientos 1.0 y 2.0 g.l⁻¹.

En cuanto al contenido de lípidos (mg.l⁻¹) de los cultivos algales (Fig.8), indican que el tratamiento con 0.5 g.l⁻¹ de melaza posee 97.40mg.l⁻¹, siendo este tratamiento mayor a los demás, sin embargo no posee diferencia significativa con el tratamiento control que posee 97.73 mg.l⁻¹. El tratamiento control y el tratamiento con 0.5 g.l⁻¹ de melaza si poseen diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto a los tratamientos con 1.0 y 2.0 g.l⁻¹.

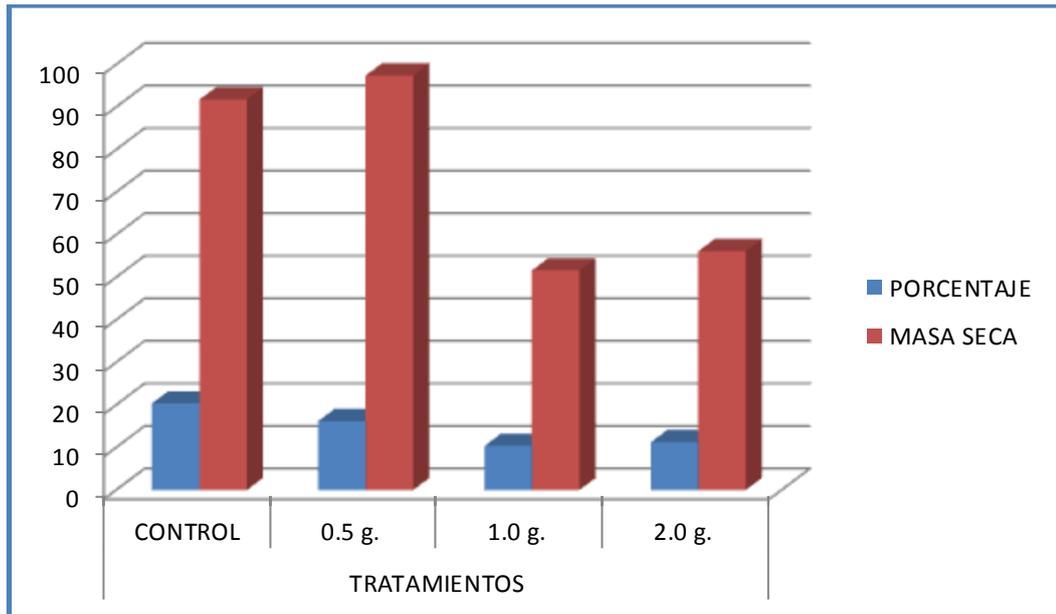


Figura 7. Contenido de lípidos totales en porcentaje (%) y en masa seca (mg.l⁻¹) del cultivo experimental de *T. suecica* con distintas concentraciones de melaza.

4. Variación del pH

El pH del cultivo experimental de *T. suecica* con melaza como fuente de carbono orgánico se presenta en la Tabla 7 y Fig. 8, los valores del pH fluctuaron entre 7.8 y 9.0. A través del análisis estadístico se determinó que entre los tratamientos experimentales no existió diferencia significativa ($p > 0.05$) durante el proceso de cultivo experimental.

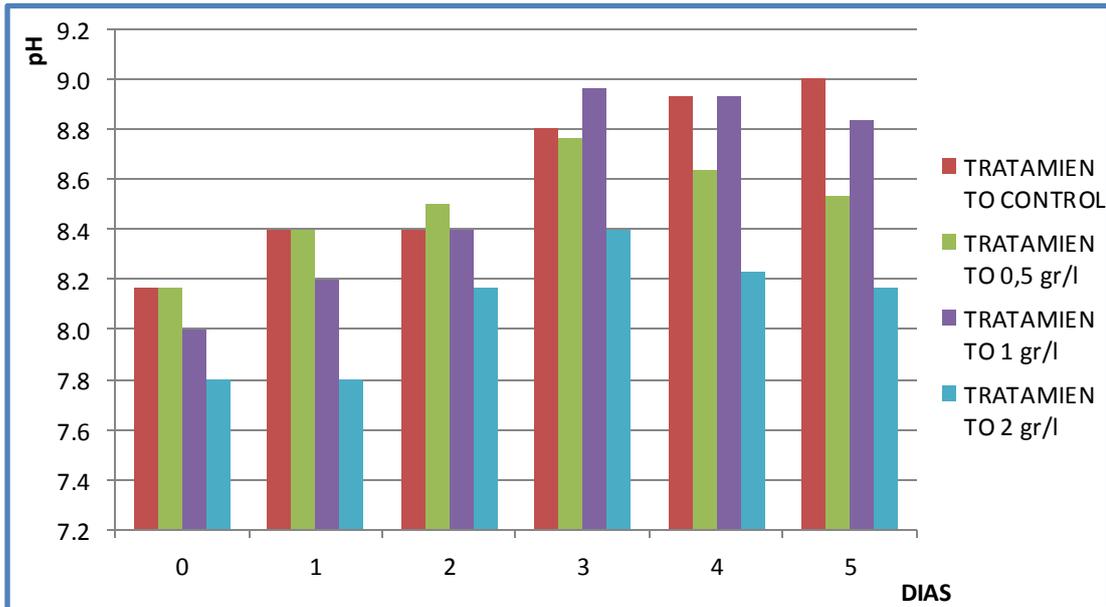


Figura 8. Fluctuación del pH de los tratamientos experimentales, durante los 5 días del cultivo experimental.

5. Variación de la temperatura

La temperatura del cultivo experimental de *T. suecica* se mantuvo constante entre 23.0 y 25.3 °C (Fig. 9), de acuerdo al análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos experimentales.

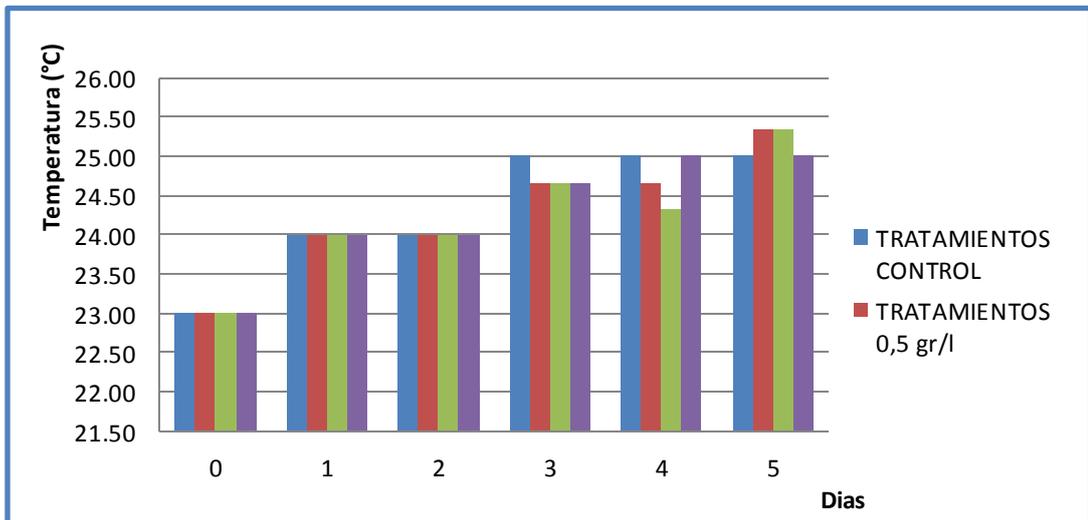


Figura 9. Se muestra la fluctuación de la temperatura por días de cada tratamiento del cultivo experimental de *T. suecica* con melaza.

DISCUSIÓN

En la experiencia con melaza como fuente de carbono orgánico en el cultivo de *T. suecica* se obtuvo un mejor crecimiento algal (Fig. 5) con los tratamientos con 0.5 y 1.0 g.l⁻¹ de melaza con una densidad algal de 19.58 x10⁵ y 22.07 x10⁵ cel.ml⁻¹ respectivamente, al tercer día de cultivo. Quedando demostrado que la melaza como fuente de carbono alternativa si tiene influencia sobre el crecimiento de la biomasa algal de *T. suecica*. Confirmando lo descrito por Liu *et al.*, (2010) y Gao *et al.*, (2010), quienes manifiestan que la melaza puede ser usada de manera eficiente en el cultivo de microalgas, obteniendo un mejor resultado en crecimiento de la biomasa algal, a comparación de otras fuentes de carbono, debido a que la melaza contiene tres tipos de azúcares (glucosa, fructuosa y sacarosa) que son aprovechadas por la microalga.

El tratamiento con 2.0 g.l⁻¹ de melaza fue el que menos crecimiento algal obtuvo al tercer día del cultivo experimental, con una densidad de 11.84 x10⁵ cel.ml⁻¹. Probablemente esto se deba a algún compuesto que esté presente en la melaza y que a mayor concentración inhiba el crecimiento. Jiang *et al.*, (2009), describe que la melaza no solamente contiene nutrientes esenciales que pueden ser usadas por las algas, además posee iones metálicos y coloides suspendidos, la cual en cantidades considerables puede disminuir el crecimiento algal de la microalga.

Por otro lado Liu *et al.*, (2011a), en su experiencia con melaza como fuente de carbono orgánico obtuvo 6.2 g. l⁻¹ de biomasa algal seca de *Chlorella zofingiensis*, con una dosis de 20 g.l⁻¹ de melaza. En contraste Yan *et al.*, (2011), obtuvo una producción de biomasa algal de 18.3 g.l⁻¹ de *Chlorella protothecoides* con una dosis de 30 g.l⁻¹ de melaza como fuente de carbono orgánico. Mientras que Mostafa *et al.*, (2012) describe que a concentraciones de 1, 3 y 5 g l⁻¹ de melaza obtuvo un producción de biomasa algal seca de 0.241, 0.275 y 0.292 g l⁻¹ de *Scenedesmus obliquus* respectivamente. También Merino, (2000) uso melaza como fuente de carbono orgánico en *Scenedesmus sp*, obteniendo 21 x10⁴ cel.ml⁻¹, con una dosis de 100 mg.l⁻¹. Y obtuvo una biomasa algal de 52 x10⁴ cel.ml⁻¹ en *Dunaliella sp*. Con una dosis de 140 mg.l⁻¹. No obstante Azma *et al.*, (2010), obtuvo 11.7 g.l⁻¹ de biomasa seca de *Tetraselmis suecica*, usando 5 g.l⁻¹ de glucosa como fuente de carbono orgánico. Mientras que Liu *et al.*, (2011b), obtuvo 9.7 g.l⁻¹ de biomasa seca

de *Chlorella zofingiensis*, usando como fuente de carbono orgánico 30 g.l⁻¹ de glucosa.

La tasa de crecimiento (μ) y el tiempo de duplicación (TD) es mejor en el tratamiento con 1.0 g.l⁻¹ de melaza, obteniéndose 0.8103 día⁻¹ y 0.8556 día⁻¹ respectivamente (Fig. 6). Lo cual nos confirma que la melaza como fuente de carbono orgánica tiene efecto en el crecimiento algal de *T. suecica*. Siendo corroborado con lo que describe Merino, (2000) de que los cultivos dosificados con melaza muestran mayor tasa de crecimiento, debido a la eficiente asimilación y metabolización del sustrato por las algas. También es importante justificar que esto se debe a al valioso aporte de las sales minerales, azúcares y otras sustancias presentes en la melaza que permite incrementar la actividad fotosintética.

Los valores más desfavorables para la tasa de crecimiento (μ) y el tiempo de duplicación (TD) se encontraron en el tratamiento con 2.0 g.l⁻¹ de melaza siendo estos de 0.5997 día⁻¹ y 1.1631 día⁻¹ respectivamente, probablemente esto se deba a algún compuesto que contenga la melaza que a mayor concentración disminuya la producción de biomasa algal. Liu *et al.*, (2011^a), describe que la tasa de crecimiento (μ) y el tiempo de duplicación (TD) se ve afectado por coloides suspendidos y iones metálicos presentes en la melaza, lo cual impide que la microalga utilice eficientemente los nutrientes presentes en la melaza.

En la experiencia de Liu *et al.* (2011a) con *Chlorella zofingiensis* con melaza, obtuvo una tasa de crecimiento de 0.56 día⁻¹. Mientras Liu *et al.*, (2011b) obtuvo una tasa de crecimiento de 0.769 día⁻¹ en *Chlorella zofingiensis*, usando 30 g.l⁻¹ de glucosa como fuente de carbono orgánico. A parte de ello, en la experiencia de Toyub., *et al.*, (2008) obtuvo una tasa de crecimiento máximo de 0.38 día⁻¹ y un mínimo de 0.32 día⁻¹, en el cultivo de *Scenedesmus obliquus* con distintas dosis de melaza.

Se ha demostrado (Lewin, 1962), que los sustratos orgánicos asimilados por las algas en la luz son realizados directamente y no mediante el rompimiento oxidativo a CO₂; así mismo, los sustratos que reemplazan al CO₂ obviamente pueden penetrar en la célula y estar sujeto a su metabolismo, permitiéndole cumplir con su rol de fuente de carbono y de energía, parte de la cual es liberada y la otra utilizada

en la conversión de material celular. Por tal motivo las microalgas son capaces de tomar carbohidratos (por ejemplo: glucosa) directamente y transformarla en lípidos (Miao *et al.*, 2006).

El contenido de lípidos (%) encontrado en el cultivo experimental de *T. suecica* con melaza, fue de 16.17% para el tratamiento con 0.5 g.l⁻¹ de melaza, 10.33% en el tratamiento con 1 g.l⁻¹ de melaza y 11.20% en el tratamiento con 2 g.l⁻¹ de melaza, mientras que en el tratamiento control obtuvo 20.33% de lípidos. De acuerdo al análisis estadístico el tratamiento control y el tratamiento con 0.5 g.l⁻¹ de melaza no poseen diferencia significativa. Sin embargo estos se diferencian de los tratamientos con 1.0 y 2.0 g.l⁻¹ de melaza. En cuanto al contenido de lípido en mg.l⁻¹ fue de 97.40 mg.l⁻¹ en el tratamiento con 0.5 g.l⁻¹ de melaza y 91.73 mg.l⁻¹ en el tratamiento control, los cuales no tuvieron diferencia significativa. Sin embargo se diferenciaron del tratamiento con 1.0 y 2.0 g.l⁻¹ de melaza. Los tratamientos con melaza no superaron al tratamiento control en cuanto a la producción de lípidos, probablemente se deba a que la concentración de algún compuesto presente en la melaza, el cual está inhibiendo la producción de lípidos en *T. suecica*. En contraste Yan *et al.*, (2011), describe que el aumento de los niveles de nitrógeno reducen aún más el contenido de lípidos en un cultivo con melaza como fuente de carbono, ya que la melaza contiene fuentes de nitrógeno adicionales. Sugiriendo además que al aumentarse los niveles de nitrógeno se obtendrá un mayor crecimiento algal, mas no un mayor contenido de lípidos en la microalga cultivada, ya que el alga recibirá un aporte de nitrógeno por parte del medio de cultivo y la melaza, recomendando dosificar la cantidad de nitrógeno presente en el cultivo algal.

Sin embargo Rodolfi *et al.*, (2009) y Azma *et al.*, (2010), reportan que *T. suecica* puede obtener de 20% a 54% de lípidos, dependiendo del tipo de cultivo realizado. No obstante Toyub *et al.*, (2008), obtuvieron de 12.64% a 16.13% de lípidos en *Scenedesmus obliquus* cultivado con melaza, mientras que Mostafa *et al.*, (2012) obtuvieron 121.5 mg l⁻¹, 135.8 mg l⁻¹ y 135.2 mg l⁻¹ de lípidos utilizando 1, 3 y 5 g.l⁻¹ de melaza, respectivamente. Por otro lado, Yan *et al.*, (2011), obtuvo 27.2% de contenido de lípido en *C. protothecoides* usando melaza como fuente de carbono orgánico indicando que la melaza influye de distinta manera en la contenido de lípidos de las microalgas por las características propias de las algas o por la calidad de la melaza utilizada en los diferentes ensayos.

Por otro lado Richmond, (1986), menciona que las microalgas muestran una clara dependencia respecto al pH del medio de cultivo y diferentes especies varían ampliamente en su respuesta al mismo. Cada microalga presenta un pH óptimo para su cultivo entre (7 y 8). Un descenso de pH puede ser letal, en cambio suelen soportar mejor los incrementos de pH, hasta un cierto límite. Se reporta cultivos de *T. suecica* en intervalos de pH de 7.3 a 8.5 (Millán-Núñez *et al.*, 2010), mientras que Jiménez *et al.*, (2012) reporta un pH adecuado de 8.2 a 9.1 para el cultivo de *T. suecica* bajo el efecto del ensilado de desechos blandos de concha de abanico. Por tal motivo se puede determinar que el pH del cultivo se encontró en un rango adecuado y no afectó al cultivo experimental de *T. suecica* bajo el efecto de la melaza.

Los valores de la temperatura encontrados en el cultivo experimental de *T. suecica* fueron de 23 a 25.3, no se encontró diferencia significativa entre los 4 tratamientos. La temperatura no tuvo influencia en el cultivo de *T. suecica*, y se mantuvo en el rango adecuado. Siendo confirmado por la investigación de Gonzales, (2000), describe que el rango óptimo para el cultivo de microalgas va desde 18 a 25 °C. Reportándose también rangos de temperaturas adecuadas para el cultivo de *T. suecica* de entre 18 a 23 °C (Jiménez *et al.*, 2012; Serdar *et al.*, 2007; Coll - Morales, 1983 y Laing *et al.*, 1981).

CONCLUSIONES

- ✓ Se observó un mayor crecimiento poblacional en el cultivo dosificado con 1.0 g. l⁻¹ de melaza (2207.33 x 10³ cel. ml⁻¹), siendo confirmado por la tasa de crecimientos (0.8103 día⁻¹) y el tiempo de duplicación (0.8556 día⁻¹).
- ✓ El contenido de lípidos del control (20.33 %) y el tratamiento con 0.5 g.l⁻¹ (16.7 %) de melaza no mostraron diferencia significativa, sin embargo estos tratamientos son diferentes al tratamiento con 1.0 y 2.0 g.l⁻¹ de melaza.
- ✓ El pH de los cultivos de *T. suecica* dosificados con melaza (0.5, 1.0 y 2.0 g. l⁻¹), y el control no mostraron variaciones significativas (p>0.05), por lo tanto el pH no afectó la dinámica del crecimiento algal.

RECOMENDACIONES

- ✓ Realizar escalamientos de los cultivos de *T. suecica* al aire con la finalidad de aprovechar los residuos de la industria azucarera (melaza) en la producción de biomasa algal.
- ✓ Realizar estudios bioquímicos con la finalidad de precisar la ruta metabólica que sigue la melaza en la formación de lípidos en la microalga *T. suecica*.
- ✓ Realizar estudios para determinar la influencia de la melaza en la producción de proteínas y pigmentos en *T. suecica*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amat F. 1987. Cultivos de especies auxiliares en Acuicultura. Curso Internacional, Univ. Nac. José Faustino Sánchez Carrión. 23 – 28 de marzo de 1987. Libro de resúmenes. pp. 28. Huacho - Perú
- Azma M., Mohamed M., Mohamad R., Rahim R., Ariff A. 2010. Improvement of medium composition for heterotrophic cultivation of Green microalgae, *Tetraselmis suecica*, using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal* 53 (2011) 187–195.
- Azma M, Rahim RA, Mohames R, Ariff AB. 2009. Heterotrophic cultivation of microalga *Tetraselmis suecica* in stirred tank bioreactor for biomass and biofuel production. *International Advanced of Technology Congress*. Malaysia.
- Bitog JP, Lee IB, Yoo JI, Hwang SB, Hong SW and Seo IH. 2009. Development of a large-sized photobioreactor for microalgae production. In *Proceedings of the 2009 CIGR International Symposium of the Australian Society for Engineering in Agriculture*, Brisbane, Queensland, Australia, September 13–16.
- Bligh EG, Dyer J(1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *J BiochemPhysiol* 37:911-917
- Borowitzka M & Borowitzka L. 1989. *Microalgal Biotechnology*. Second Edition. Cambridge University Press. 477p.
- Cañavate J. 2011. Funciones de las Microalgas en Acuicultura. IFAPA Centro El Toruño. Apartado 16. 11500 Puerto de Santa María. Cádiz. 12 -15
- Carballo E., Tuan P., Jansen M., Wijffels R. 2003. Vitamin E (α - tocopherol) production by the marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* and *Tetraselmis suecica* in batch cultivation, *Biomol. Eng.* 20 (2003) 139–147.

- Chen CY, Yeh KL, Aisyah R, Lee DJ, Chang JH. 2011. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *BioresourTechnol* 102(1):71-81
- Cheng, Y., Zhou, W., Gao, C., Lan, K., Gao, Y., Wu, Q., 2009. Biodiesel production from Jerusalem artichoke (*Helianthus Tuberosus* L.) tuber by heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 84, 777–781.
- Chini-Zittelli G, Rodolfi L, Biondi N, Tredicci NR. 2006. Productivity and photosynthetic efficiency of outdoor cultures of *Tetraselmis suecica* in annular columns. *Aquaculture* 261:932-943
- Cid A, Abalde J, Herrero C. 1992. High yield mixotrophic cultures of the marine microalga *Tetraselmis suecica* (Kyllin) Butcher (Prasinophyceae). *Journal of Applied Phycology* 4: 31-37.
- Coll-Morales, J. 1983. *Acuicultura Marina Animal*. Mundi-Prensa, Madrid. España.
- Day J., Edwards A., Rodgers G. 1991. Development of an industrial-scale process for the heterotrophic production of a micro-algal mollusc feed, *Bioresour. Technol.* 38 (1991) 245–249.
- Fabregas J., Abalde J., C. Herrero, B. Cabezas, M. Veiga, Growth of the marine microalga *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations, *Aquaculture* 42 (1984) 207–215.
- French, R.E. y T. Hebert. 1982. *Métodos de investigación fitopatológica*. 1ª ed. 1ª reimpresión. IICA - Serie de libros y material educativo. No. 43. San José de Costa Rica. 103 -110.
- Gao, C.F., Zhai, Y., Ding, Y., Wu, Q.Y., 2010. Application of sweet sorghum for biodiesel production by heterotrophic microalga *Chlorella protothecoides*. *Applied Energy* 87, 756–761.

- Guillard, R. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrate. *In* Smith L. & Chandley H. (eds). Culture of marine invertebrates animal, Plenum Press. London, England. pp.29 – 60.
- González A. 2000. Alternativas en el cultivo de microalgas. Tesis para la obtención del Título de Acuicultor. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Guayaquil – Ecuador
- Gunstheimer S and Jahreis G. 1998. Marine macroalgae. *Ernahrungs-umschau*. 45: 424–428
- Helm M., Bourne N., Lovatelli A., Tall M., Cigarría J. 2006. Cultivo de bivalvos en criadero. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma. 25 -31
- Huang WY, Cai YZ, Zhang YB. 2010. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. *Nutr Cancer* 62:85 1-20.
- Jiang, L., Wang, J., Liang, S., Wang, X., Cen, P., Xu, Z., 2009. Butyric acid fermentation in a fibrous bed bioreactor with immobilized *Clostridium tyrobutyricum* from cane molasses. *Bioresour. Technol.* 100, 3403–3409.
- Jiménez B. Prada C. 2012. Efecto del ensilado de los desechos blandos de *Argopecten purpuratus* “concha de abanico” como medio de cultivo en el crecimiento poblacional, contenido de clorofila α y carotenoides de *Tetraselmis suecica*, en condiciones de laboratorio. Tesis para optar el grado de Biólogo Acuicultor. Escuela Académica Profesional de Biología en Acuicultura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional del Santa. Ancash – Perú.
- Laing, I.; Helm, M. 1981. Factors affecting the semi-continuous production of *Tetraselmis suecica* (Kyllin) Butch. in 200-l vessels. *Aquaculture* 22: 137-148.

- Le Borgne, R. 1990. Culture of Microalgae. In Gelbert Bernabé (ed) *Acuiculture of microalgae*. University of Aberdeen Scotland, England. 1:197 – 206.
- Li Y and Huang J. 2009. High-light and sodium chloride stress differentially regulate the biosynthesis of astaxanthin in *Chlorella zofingiensis*. *Journal of Phycology* 45: 635-641.
- Liu, Y.-P., Zheng, P., Sun, Z.-H., Ni, Y., Dong, J.-J., Zhu, L.-L., 2008. Economical succinic acid production from cane molasses by *Actinobacillus succinogenes*. *Bioresour. Technol.* 99, 1736–1742.
- Liu, J., Fan, K.-W., Zhong, Y., Sun, Z., Huang, J., Jiang, Y., Chen, F., 2010. Production potential of *Chlorella zofingiensis* as a feedstock for biodiesel. *Bioresour. Technol.* 101, 8658–8663.
- Liu J., Huang J., Jiang Y., Chen F., 2011a. Molasses-based growth and production of oil and astaxanthin by *Chlorella zofingiensis*. *Bioresour. Technol.* 107 (2012) 393–398
- Liu, J., Huang, J., Sun, Z., Zhong, Y., Jiang, Y., Chen, F., 2011b. Differential lipid and fatty acid profiles of photoautotrophic and heterotrophic *Chlorella zofingiensis*: assessment of algal oils for biodiesel production. *Bioresour. Technol.* 102, 106–110.
- Martin FPH. 2010. Optimization of photobioreactor for astaxanthin production in *Chlorella zofingiensis*. Tesis de Maestría en Ingeniería. National University of Singapore.
- Marsh JB, Weinstein DB (1966) Simple charring method for determination of lipids. *J Lipid Res* 7:574-576.
- Merino F. 2000. Utilización de Melaza como Fuente Orgánica de Carbono en la Producción Masiva de Microalgas. Universidad Nacional del Santa. Nuevo Chimbote, Perú

- Miao, X.L., Wu, Q.Y., 2006. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresource Technology* 97, 841–846.
- Millán-Núñez, R.; Valenzuela-Espinoza, E.; Trees, C.; Santamaría del Ángel, E.; Núñez, F. 2010. Efecto de la intensidad de luz en la razón de pigmentos de *Tetraselmis suecica*. *Revista Acuicultura*. Disponible en: <http://promepsol.sep.gob.mx/archivospdfs/produccion/Producto773306.PDF>
- Morineau TO, Legentilhomme P, Jaouen P, Lepine B, Rince Y. 2001. Influence a swirl motion on the interaction between microalgal cells and environmental medium during ultrafiltration of a culture of *Tetraselmis suecica*. *Biotechnology Letters*, 23: 1539-1545.
- Norton TA, Melkonian N and Andersen R. 1996. Algal biodiversity. *Phycologia*. 35: 308–326
- Okauchi M., Fukusho K. 1984. Environmental conditions and medium required for mass culture of a minute alga, *Tetraselmis tetraele* (Prasinophyceae), *Bull. Nat. Res. Inst. Aquacult.* 5 (1984) 1–11.
- Padilla M. 1975. Crecimiento poblacional de *Tetraselmis suecica*. Universidad Nacional Agraria de la Molina *Rev. Ecología aplicada*. pp 111 – 116.
- Qin S, Liu G and Hua Z. 2008. The accumulation and metabolism of astaxanthin in *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae). *Process Biochemistry* 43: 795–802.
- Richmond A. 1986. Cell response to environmental factor. En: *Handbook of Microalgal Mass Culture*. Richmond A. (ed.). pp: 66 – 69. CRC Press Inc. Boca Raton Florida.
- Rodolfi L, Chini G, Bassi N, Padovani G, Biondi N, Bonini G. 2009. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol Bioeng.* 2009;102(1):100-112.

- Satyanarayana KG, Mariano AB, Vargas JVC. 2011. A review on microalgae, a versatile source for sustainable energy and materials. *Int. J. Energy Res.* 35:291–311.
- Sharma, A., Vivekanand, V., Singh, R.P., 2008. Solid-state fermentation for gluconic acid production from sugarcane molasses by *Aspergillusniger* ARNU-4 employing tea waste as the novel solid support. *Bioresour.Technol.* 99, 3444–3450.
- Serdar, S.; Lök, A.; Acarli, S.; Köse, A. 2007. The effect of two different culture media and five different salinities on growth of *Tetraselmis suecica*. *Rapp. Comm. int. MerMédit.* 38: 394.
- Solis, N. 1987. Cultivo experimental y masivo de Artemia alimentada con 4 especies de microalgas. Tesis Ing. Pesq. Univ. Nac. Agraria de la Molina. Lima – Perú. 246p.
- Toyub M, Miah M., Habib M., Rahman M. 2008. Growth performance and nutritional value of *Scenedesmus obliquus* cultured in different concentrations of sweetmeat factory waste media. *Bang. J. Anim. Sci.* 2008, 37 (1): 86 – 93.
- Uribe, E. 1993. Cultivo de microalgas. *In* 6° Curso Internacional en Cultivos de Moluscos, 25 de octubre al 19 de noviembre de 1993. Univ. Católica del Norte, Facultad de Ciencias del Mar/JICA. Coquimbo, Chile. pp. 32 – 65.
- Vega, A. 1993. Producción masiva de pulgas de agua de *Moina macrocops* en tanques alimentadas con la microalga *Chlorella vulgaris*. Tesis para optar el título de Ing. Pesq. Univ. Nac. Agraria La molina. Facultad de Pesquería. Lima – Perú. 181p.
- Van Baalen C., Pulich W. 1973. ***Critical Reviews in Microbiology*** 2: 229-255, 1973.

- Xu, H., Miao, X., Wu, Q., 2006. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *J. Biotechnol.* 126, 499–507.
- Yan, D., Lu, Y., Chen, Y.-F., Wu, Q., 2011. Waste molasses alone displaces glucosebased medium for microalgal fermentation towards cost-saving biodiesel production. *Bioresour. Technol.* 102, 6487–6493.

ANEXOS

Anexo 1. Crecimiento poblacional ($\times 10^5$ cel. ml^{-1}), de *T. suecica* durante la experimentación con melaza como fuente de carbono orgánico.

DIAS	TRATAMIENTOS			
	CONTROL	0.5 g l^{-1}	1.0 g l^{-1}	2.0 g l^{-1}
0	1.94 \pm 0.0 ^a	1.94 \pm 0.0 ^a	1.94 \pm 0.0 ^a	1.94 \pm 0.0 ^a
1	7.23 \pm 171.5 ^b	6.00 \pm 98.3 ^b	8.10 \pm 59.0 ^b	6.66 \pm 82.4 ^b
2	8.75 \pm 103.1 ^b	11.97 \pm 788.8 ^c	12.99 \pm 224.9 ^c	8.84 \pm 192.8 ^b
3	14.77 \pm 104.54 ^c	19.58 \pm 247.68 ^d	22.07 \pm 96.10 ^d	11.84 \pm 196.87 ^c
4	16.93 \pm 83.2 ^c	17.93 \pm 144.68 ^{cd}	21.33 \pm 205.2 ^d	10.33 \pm 434.41 ^c
5	17.13 \pm 78.47 ^{cd}	17.61 \pm 103.23 ^{cd}	18.21 \pm 329.48 ^{cd}	10.08 \pm 120.03 ^c

Anexo 2. Tasa de crecimiento específico (μ) y tiempo de duplicación diaria (TD) de los cultivos experimentales de *T. suecica* con diferentes concentraciones de melaza al tercer y cuarto día.

CRECIMIENTO POBLACIONAL	TRATAMIENTO			
	CONTROL	0.5 g l^{-1}	1.0 g l^{-1}	2.0 g l^{-1}
No	194.00 \pm 0.0	194.00 \pm 0.0	194.00 \pm 0.0	194.00 \pm 0.0
Nf	1477.67 \pm 104.54	1958.00 \pm 247.68	2207.33 \pm 96.10	1184.33 \pm 196.87
Tf-TO	3	3	3	3
U	0.5072 \pm 0,017 ^a	0.7688 \pm 0,042 ^b	0.8103 \pm 0,014 ^b	0,5998 \pm 0,057 ^a
TD	1.3678 \pm 0.047z	0.9034 \pm 0,049 ^x	0.8556 \pm 0,016 ^x	1.1631 \pm 0,116 ^y

Anexo 3. Contenido de lípidos totales del cultivo experimental de *T. suecica*, con distintas concentraciones de melaza

ONTENIDO DE LÍPIDOS	TRATAMIENTOS			
	CONTROL	0.5 g. l^{-1}	1 g. l^{-1}	2 g. l^{-1}
Porcentaje (%)	20.33 \pm 13.87a	16.17 \pm 9.46a	10.33 \pm 3.85b	11.20 \pm 5.94b
Masa seca (mg. l^{-1})	91.73 \pm 62,41x	97.40 \pm 60.93x	51.63 \pm 19.13y	56.10 \pm 29.81y

Anexo 4. Fluctuación del pH del cultivo experimental de *T. suecica* con distintas concentraciones de melaza como fuente de carbono orgánico.

DIAS	TRATAMIENTOS			
	CONTROL	0.5 g.l ⁻¹	1 g.l ⁻¹	2 g.l ⁻¹
0	8.2± 0.577 ^a	8.2± 0.577 ^a	8.± 0.0 ^a	7.8± 0.0 ^a
1	8.4 ± 0.00 ^a	8.4 ± 0.0 ^a	8.2 ± 0.0 ^a	7.8 ± 0.0 ^a
2	8.4 ± 0.0 ^a	8.5 ± 0.0 ^a	8.4 ± 0.0 ^a	8.2 ± 0.577 ^a
3	8.8 ± 0.0 ^a	8.8 ± 0.577 ^a	8.9 ± 0.577 ^a	8.4 ± 0.0 ^a
4	8.9 ± 0.058 ^a	8.7 ± 0.058 ^a	8.9 ± 0.058 ^a	8.2 ± 0.058 ^a
5	9.000 ± 0.0 ^a	8.533 ± 0.577 ^a	8.833 ± 0.577 ^a	8.167 ± 0.334 ^a

Anexo 5. Fluctuación de la temperatura del cultivo experimental de *T. suecica* con melaza, se muestran los valores por cada tratamiento durante los 5 días del cultivo.

DIAS	TRATAMIENTOS			
	CONTROL	0.5 g.l ⁻¹	1.0 g.l ⁻¹	2.0 g.l ⁻¹
0	23.00± 0.0 ^a	23.00± 0.0 ^a	23.00± 0.0 ^a	23.00± 0.0 ^a
1	24.00± 0.0 ^a	24.00± 0.0 ^a	24.00± 0.0 ^a	24.00± 0.0 ^a
2	24.00± 0.0 ^a	24.00± 0.0 ^a	24.00± 0.0 ^a	24.00± 0.0 ^a
3	25.00± 0.0 ^a	24.67± 0.58 ^a	24.67± 0.58 ^a	24.67± 0.58 ^a
4	25.00± 0.0 ^a	24.67± 0.58 ^a	24.33± 0.58 ^a	25.00± 0.0 ^a
5	25.00± 0.0 ^a	25.33± 0.58 ^a	25.33± 0.58 ^a	25.00 ± 0.0 ^a

Anexo 6. Resultados del análisis de varianza del crecimiento poblacional de *T. suecica*.

Source	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Corrected Model	8	3235922541666,669	58,643	,000	,882
Intercept	1	95407542253472,250	1729,022	,000	,965
dias	5	4515210870138,888	81,827	,000	,867
tratamientos	3	1103775327546,297	20,003	,000	,488
Error	63	55180058145,944			
Total	72				
Corrected Total	71				

Anexo 7. Resultados de la prueba de Tukey para el crecimiento poblacional de *T. suecica*.

(I) dias	(J) dias	Mean Difference (I- J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
dia 0	dia 1	- 505875,0000*	95899,30322	,000	-787745,6760	-224004,3240
	dia 2	- 870000,0000*	95899,30322	,000	- 1151870,676 0	-588129,3240
	día 3	- 1512833,333 3*	95899,30322	,000	- 1794704,009 3	- 1230962,657 4
	dia4	- 1469333,333 3*	95899,30322	,000	- 1751204,009 3	- 1187462,657 4
	dia 5	- 1384750,000 0*	95899,30322	,000	- 1666620,676 0	- 1102879,324 0
dia 1	dia 0	505875,0000*	95899,30322	,000	224004,3240	787745,6760
	dia 2	- 364125,0000*	95899,30322	,004	-645995,6760	-82254,3240
	día 3	- 1006958,333 3*	95899,30322	,000	- 1288829,009 3	-725087,6574
	dia4	- 963458,3333*	95899,30322	,000	- 1245329,009 3	-681587,6574
	dia 5	- 878875,0000*	95899,30322	,000	- 1160745,676 0	-597004,3240
dia 2	dia 0	870000,0000*	95899,30322	,000	588129,3240	1151870,676 0
	dia 1	364125,0000*	95899,30322	,004	82254,3240	645995,6760
	día 3	- 642833,3333*	95899,30322	,000	-924704,0093	-360962,6574
	dia4	- 599333,3333*	95899,30322	,000	-881204,0093	-317462,6574
	dia 5	-	95899,30322	,000	-796620,6760	-232879,3240

		514750,0000*				
día 3	dia 0	1512833,333 3*	95899,30322	,000	1230962,657 4	1794704,009 3
	dia 1	1006958,333 3*	95899,30322	,000	725087,6574	1288829,009 3
	dia 2	642833,3333*	95899,30322	,000	360962,6574	924704,0093
	dia4	43500,0000	95899,30322	,997	-238370,6760	325370,6760
	dia 5	128083,3333	95899,30322	,764	-153787,3426	409954,0093
dia4	dia 0	1469333,333 3*	95899,30322	,000	1187462,657 4	1751204,009 3
	dia 1	963458,3333*	95899,30322	,000	681587,6574	1245329,009 3
	dia 2	599333,3333*	95899,30322	,000	317462,6574	881204,0093
	día 3	-43500,0000	95899,30322	,997	-325370,6760	238370,6760
	dia 5	84583,3333	95899,30322	,949	-197287,3426	366454,0093
dia 5	dia 0	1384750,000 0*	95899,30322	,000	1102879,324 0	1666620,676 0
	dia 1	878875,0000*	95899,30322	,000	597004,3240	1160745,676 0
	dia 2	514750,0000*	95899,30322	,000	232879,3240	796620,6760
	día 3	-128083,3333	95899,30322	,764	-409954,0093	153787,3426
	dia4	-84583,3333	95899,30322	,949	-366454,0093	197287,3426

Anexo 8. Resultados del análisis de varianza para la tasa de crecimiento (μ)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,183	3	,061	43,285	,000
Within Groups	,011	8	,001		
Total	,194	11			

Anexo 9. Resultados de la prueba de Tukey para la tasa de crecimiento (μ)

(I) melaza	(J) melaza	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
control	0.5 gr de melaza	-,26165148 [*]	,03062538	,000	-,3597247	-,1635782
	1 gr de melaza	-,30317447 [*]	,03062538	,000	-,4012477	-,2051012
	2 gr de melaza	-,09261919	,03062538	,064	-,1906924	,0054541
0.5 gr de melaza	control	,26165148 [*]	,03062538	,000	,1635782	,3597247
	1 gr de melaza	-,04152298	,03062538	,557	-,1395962	,0565503
	2 gr de melaza	,16903229 [*]	,03062538	,002	,0709590	,2671055
1 gr de melaza	control	,30317447 [*]	,03062538	,000	,2051012	,4012477
	0.5 gr de melaza	,04152298	,03062538	,557	-,0565503	,1395962
	2 gr de melaza	,21055527 [*]	,03062538	,001	,1124820	,3086285
2 gr de melaza	control	,09261919	,03062538	,064	-,0054541	,1906924
	0.5 gr de melaza	-,16903229 [*]	,03062538	,002	-,2671055	-,0709590
	1 gr de melaza	-,21055527 [*]	,03062538	,001	-,3086285	-,1124820

Anexo 10. Resultados del análisis de varianza para el tiempo de duplicación (TD).

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,513	3	,171	36,953	,000
Within Groups	,037	8	,005		
Total	,550	11			

Anexo 11. Resultados de la prueba de Tukey del tiempo de duplicación (TD) de *T. suecica* al 3° día de cultivo.

(I) melaza	(J) melaza	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Control	0.5 gr de melaza	,4644094*	,0555539	,000	,286506	,642312
	1 gr de melaza	,5122387*	,0555539	,000	,334336	,690142
	2 gr de melaza	,2047121*	,0555539	,026	,026809	,382615
0.5 gr de melaza	control	-,4644094*	,0555539	,000	-,642312	-,286506
	1 gr de melaza	,0478292	,0555539	,824	-,130074	,225732
	2 gr de melaza	-,2596973*	,0555539	,007	-,437600	-,081794
1 gr de melaza	control	-,5122387*	,0555539	,000	-,690142	-,334336
	0.5 gr de melaza	-,0478292	,0555539	,824	-,225732	,130074
	2 gr de melaza	-,3075265*	,0555539	,002	-,485430	-,129624
2 gr de melaza	control	-,2047121*	,0555539	,026	-,382615	-,026809
	0.5 gr de melaza	,2596973*	,0555539	,007	,081794	,437600
	1 gr de melaza	,3075265*	,0555539	,002	,129624	,485430

Anexo 12. Resultados del análisis de varianza del porcentaje de lípidos en *T. suecica*.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	515,449	3	171,816	,410	,751
Within Groups	3356,460	8	419,557		
Total	3871,909	11			

Anexo 13. Resultados de la prueba de Tukey para el porcentaje de lípidos en *T. suecica*.

(I) gr de melaza	(J) gr de melaza	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					LowerBound	UpperBound
control	0,5 gr de melaza	4,16667	7,43752	,941	-19,6509	27,9842
	1 gr de melaza	10,00000	7,43752	,563	-13,8175	33,8175
	2 gr de melaza	9,13333	7,43752	,628	-14,6842	32,9509
0,5 gr de melaza	control	-4,16667	7,43752	,941	-27,9842	19,6509
	1 gr de melaza	5,83333	7,43752	,860	-17,9842	29,6509
	2 gr de melaza	4,96667	7,43752	,906	-18,8509	28,7842
1 gr de melaza	control	-10,00000	7,43752	,563	-33,8175	13,8175
	0,5 gr de melaza	-5,83333	7,43752	,860	-29,6509	17,9842
	2 gr de melaza	-,86667	7,43752	,999	-24,6842	22,9509
2 gr de melaza	control	-9,13333	7,43752	,628	-32,9509	14,6842
	0,5 gr de melaza	-4,96667	7,43752	,906	-28,7842	18,8509
	1 gr de melaza	,86667	7,43752	,999	-22,9509	24,6842

Anexo 14. Resultados del análisis de varianza de la masa seca de lípidos en *T. suecica*.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
BetweenGroups	515,449	3	171,816	,410	,751
WithinGroups	3356,460	8	419,557		
Total	3871,909	11			

Anexo 15. Resultados de la prueba de Tukey para la masa seca de lípidos en *T. suecica*.

(I) gr de melaza	(J) gr de melaza	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
control	0,5 gr de melaza	1,80000	16,72438	1,000	-51,7574	55,3574
	1 gr de melaza	14,96667	16,72438	,808	-38,5907	68,5240
	2 gr de melaza	12,73333	16,72438	,869	-40,8240	66,2907
0,5 gr de melaza	control	-1,80000	16,72438	1,000	-55,3574	51,7574
	1 gr de melaza	13,16667	16,72438	,858	-40,3907	66,7240
	2 gr de melaza	10,93333	16,72438	,911	-42,6240	64,4907
1 gr de melaza	control	-14,96667	16,72438	,808	-68,5240	38,5907
	0,5 gr de melaza	-13,16667	16,72438	,858	-66,7240	40,3907
	2 gr de melaza	-2,23333	16,72438	,999	-55,7907	51,3240
2 gr de melaza	control	-12,73333	16,72438	,869	-66,2907	40,8240
	0,5 gr de melaza	-10,93333	16,72438	,911	-64,4907	42,6240
	1 gr de melaza	2,23333	16,72438	,999	-51,3240	55,7907

Anexo 16. Resultados del análisis de varianza para la variación del pH en el cultivo de *T. suecica*.

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Corrected Model	7,999 ^a	8	1,000	68,645	,000	,897
Intercept	5132,533	1	5132,533	352371,301	,000	1,000
dia	4,971	5	,994	68,252	,000	,844
melaza	3,028	3	1,009	69,300	,000	,767
Error	,918	63	,015			
Total	5141,450	72				
Corrected Total	8,917	71				

Anexo 17. Resultados de la prueba de Tukey para la variación del pH en el cultivo de *T. suecica*.

(I) día	(J) día	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0 días	1 día	-,1667*	,04927	,015	-,3115	-,0218
	2 días	-,3333*	,04927	,000	-,4782	-,1885
	3 días	-,7000*	,04927	,000	-,8448	-,5552
	4 días	-,6500*	,04927	,000	-,7948	-,5052
	5 días	-,6083*	,04927	,000	-,7532	-,4635
1 día	0 días	,1667*	,04927	,015	,0218	,3115
	2 días	-,1667*	,04927	,015	-,3115	-,0218
	3 días	-,5333*	,04927	,000	-,6782	-,3885
	4 días	-,4833*	,04927	,000	-,6282	-,3385
	5 días	-,4417*	,04927	,000	-,5865	-,2968
2 días	0 días	,3333*	,04927	,000	,1885	,4782
	1 día	,1667*	,04927	,015	,0218	,3115
	3 días	-,3667*	,04927	,000	-,5115	-,2218
	4 días	-,3167*	,04927	,000	-,4615	-,1718
	5 días	-,2750*	,04927	,000	-,4198	-,1302
3 días	0 días	,7000*	,04927	,000	,5552	,8448
	1 día	,5333*	,04927	,000	,3885	,6782
	2 días	,3667*	,04927	,000	,2218	,5115
	4 días	,0500	,04927	,911	-,0948	,1948
	5 días	,0917	,04927	,436	-,0532	,2365
4 días	0 días	,6500*	,04927	,000	,5052	,7948
	1 día	,4833*	,04927	,000	,3385	,6282
	2 días	,3167*	,04927	,000	,1718	,4615
	3 días	-,0500	,04927	,911	-,1948	,0948
	5 días	,0417	,04927	,958	-,1032	,1865
5 días	0 días	,6083*	,04927	,000	,4635	,7532
	1 día	,4417*	,04927	,000	,2968	,5865
	2 días	,2750*	,04927	,000	,1302	,4198
	3 días	-,0917	,04927	,436	-,2365	,0532
	4 días	-,0417	,04927	,958	-,1865	,1032

Anexo 18. Resultados del análisis de varianza para la variación de la temperatura en el cultivo de *T. suecica*.

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
CorrectedModel	36,389 ^a	8	4,549	47,322	,000
Intercept	42437,556	1	42437,556	441506,312	,000
dias	36,278	5	7,256	75,484	,000
melaza	,111	3	,037	,385	,764
Error	6,056	63	,096		
Total	42480,000	72			
Corrected Total	42,444	71			

Anexo 19. Resultados de la prueba de Tukey para la variación de la temperatura en el cultivo de *T. suecica*.

(I) melaza	(J) melaza	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
control	0.5 gr de melaza	,0556	,10334	,950	-,2172	,3283
	1 gr de melaza	,1111	,10334	,706	-,1616	,3838
	2 gr de melaza	,0556	,10334	,950	-,2172	,3283
0.5 gr de melaza	control	-,0556	,10334	,950	-,3283	,2172
	1 gr de melaza	,0556	,10334	,950	-,2172	,3283
	2 gr de melaza	,0000	,10334	1,000	-,2727	,2727
1 gr de melaza	control	-,1111	,10334	,706	-,3838	,1616
	0.5 gr de melaza	-,0556	,10334	,950	-,3283	,2172
	2 gr de melaza	-,0556	,10334	,950	-,3283	,2172
2 gr de melaza	control	-,0556	,10334	,950	-,3283	,2172
	0.5 gr de melaza	,0000	,10334	1,000	-,2727	,2727
	1 gr de melaza	,0556	,10334	,950	-,2172	,3283