

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOLOGÍA EN ACUICULTURA



EFFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE EXTRACTO ACUOSO DEL SEDIMENTO DE LA BAHÍA “EL FERROL” EN EL CRECIMIENTO POBLACIONAL Y CONTENIDO DE LÍPIDOS DE LA MICROALGA *Scenedesmus acutus* EN CONDICIONES DE LABORATORIO

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE BIÓLOGO ACUICULTOR

AUTORES:

BACH. EDWIN WILLIAN VERAU NECIOSUP

BACH. KARLA FIORELA QUIROZ REYNA

ASESOR:

BLGA. ACUI. SORAYDA MENDOZA ESPINOZA

NUEVO CHIMBOTE - PERÚ

2015

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOLOGÍA EN ACUICULTURA



EFFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE EXTRACTO ACUOSO DEL SEDIMENTO DE LA BAHÍA “EL FERROL” EN EL CRECIMIENTO POBLACIONAL Y CONTENIDO DE LÍPIDOS DE LA MICROALGA *Scenedesmus acutus* EN CONDICIONES DE LABORATORIO

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE BIÓLOGO ACUICULTOR

AUTORES:

BACH. EDWIN WILLIAN VERAU NECIOSUP

BACH. KARLA FIORELA QUIROZ REYNA

Revisado y Aprobado por el Asesor

BLGA. ACUI. SORAYDA MENDOZA ESPINOZA

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



**EFFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE EXTRACTO
ACUOSO DEL SEDIMENTO DE LA BAHÍA “EL FERROL” EN EL
CRECIMIENTO POBLACIONAL Y CONTENIDO DE LÍPIDOS DE
LA MICROALGA *Scenedesmus acutus* EN CONDICIONES DE
LABORATORIO**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE BIÓLOGO ACUICULTOR

AUTORES:

BACH. EDWIN WILLIAN VERAU NECIOSUP

BACH. KARLA FIORELA QUIROZ REYNA

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

**Dr. Juan Fernando Merino Moya
Presidente**

**Blga. Acuic. Sorayda Mendoza Espinoza
Integrante del Jurado**

**Blgo. Acuic. Lenin Benites Pareja
Integrante del Jurado**

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS	i
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
Objetivos general	4
Objetivos específicos	4
Hipótesis	4
II. MATERIALES Y MÉTODOS	5
2.1. Localización del experimento	5
2.2. Material experimental	5
2.2.1. Material biológico	5
2.3. Preparación del extracto acuoso de lodo de la bahía “El Ferrol”	5
2.4. Acondicionamiento de las unidades experimentales	7
2.5. Preparación del medio control HM	8
2.6. Análisis químico del EAS	8
2.7. Determinación de parámetros del cultivo	9
2.8. Tratamiento del agua del medio de cultivo	9
2.9. Determinación del crecimiento poblacional de <i>Sc. acutus</i>	10
2.10. Determinación del contenido de lípidos en <i>Sc. acutus</i>	10
2.11. Determinación de biomasa	12
2.12. Análisis estadístico	12
III. RESULTADOS	13
3.1. Parámetros ambientales del cultivo	13
3.1.1. Temperatura	13
3.1.2. pH	14
3.2. Crecimiento poblacional en los cultivos de <i>Sc. acutus</i>	15
3.2.1. Curvas de crecimiento poblacional	15
3.2.2. Tasa de crecimiento y tiempo de duplicación poblacional diaria	17

3.3. Contenido de lípidos en <i>Sc. acutus</i>	18
IV. DISCUSIÓN.....	21
V. CONCLUSIONES	27
VI. RECOMENDACIONES.....	28
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
VIII. ANEXOS.....	37

DEDICATORIA

Gracias a DIOS por darme la vida, a mis padres Narciso Quiroz Miranda y Gladys Reyna Ulloa por su confianza y apoyo incondicional y a mis Hermanos y amigos.

Karla

Gracias a DIOS por haberme dado la oportunidad de estar presente, a mis padres Luis y Zoraida, a mi hijo Luis Mario y a mis hermanos que siempre creyeron en mí.

Edwin

AGRADECIMIENTOS

A nuestra Asesora BLGA. ACUI. SORAYDA MENDOZA ESPINOZA, por su amistad, respeto, consejos, enseñanzas y por ser nuestra guía en la realización y culminación del presente informe.

A quienes colaboraron desinteresadamente en la realización de nuestro trabajo de investigación: William Capa, Maribel Astete y Edwing Cotos.

A los profesores de la Escuela Académico Profesional de Biología en Acuicultura, quienes nos apoyaron y brindaron sus conocimientos durante el desarrollo de nuestra formación académica.

A nuestros amigos que siempre nos brindaron su amistad, apoyo y respeto.

Los Autores

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos en los cultivos microalgales de la investigación.	7
Tabla 2. Composición química del medio HM.....	8
Tabla 3. Valores proximales del contenido de los principales componentes del EAS utilizado en el cultivo de <i>Sc. acutus</i>	8
Tabla 4. Composición química (mg L ⁻¹) de los medios HM y EAS.....	9
Tabla 5. Densidad Poblacional (x10 ⁶ cél. mL ⁻¹) de <i>Sc. acutus</i> en los cultivos con EAS y grupo control (HM).....	15
Tabla 6. Tasa de crecimiento (μ) y Tiempo de duplicación poblacional diaria (TD) de <i>Sc. acutus</i> en los cultivados con EAS y grupo control (HM)..	17
Tabla 7. Contenido de lípidos en porcentaje (%) y biomasa (mg L ⁻¹) al quinto día de cultivo de <i>Sc. acutus</i> en los dosificados con EAS y grupo control (HM).	19

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Flujo de la preparación del EAS para los cultivos de <i>Sc. acutus</i> ..	6
Fig. 2. Unidades experimentales en los cultivos microalgales de <i>Sc. acutus</i> utilizando diferentes concentraciones de EAS..	7
Fig. 3. Flujograma para determinar el contenido de lípidos de <i>Sc. acutus</i> en los cultivados con EAS y grupo control HM.	11
Fig. 4. Variación de la temperatura promedio (°C) en los cultivos de <i>Sc. acutus</i> con EAS y grupo control (HM).	13
Fig. 5. Variación del pH promedio de los cultivos de <i>Sc. acutus</i> con EAS y grupo control (HM).	14
Fig. 6. Variación de la densidad poblacional de <i>Sc. acutus</i> cultivados con EAS y grupo control (HM).	15
Fig. 7. Unidades experimentales al quinto día de cultivo de <i>Sc. acutus</i> utilizando EAS y grupo control (HM)...	16
Fig. 8. Variación de la tasa de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación poblacional diaria (TD) de <i>Sc. acutus</i> en los cultivados con EAS y grupo control (HM).	18
Fig. 9. Contenido de lípidos en porcentaje de <i>Sc. acutus</i> en los cultivados con EAS y grupo control (HM).	19
Fig. 10. Contenido de lípidos en biomasa de <i>Sc. acutus</i> en los cultivados con EAS y grupo control (HM).	20

RESUMEN

Se estudió el efecto de diferentes concentraciones del extracto acuoso del sedimento de la bahía el Ferrol (EAS), sobre el crecimiento y el contenido de lípidos de la microalga *Scenedesmus acutus*, bajo condiciones de laboratorio, cultivada a concentraciones de 10, 15 y 20 mL L⁻¹ del EAS. La mayor densidad poblacional al quinto día de cultivo de *Sc. acutus* se encontró con 15 mL L⁻¹ de EAS con 36,92 x10⁶ cél. mL⁻¹; mientras que la menor concentración se obtuvo con 10 mL L⁻¹ de EAS con 28,94 x10⁶ cél. mL⁻¹. La mayor μ al quinto día de cultivo para *Sc. acutus*, se encontró con 15 mL L⁻¹ de EAS con 0,564 día⁻¹; mientras que la menor μ con 10 mL L⁻¹ de EAS con 0,504 día⁻¹. El mayor TD al quinto día de cultivo en *Sc. acutus* estuvo con 10 mL L⁻¹ de EAS con 1,374 día; mientras que el menor TD estuvo con 15 mL L⁻¹ de EAS con 1,229 día. Los mayores porcentajes de lípidos en *Sc. acutus* al quinto día de cultivo se obtuvieron con 10 y 15 mL L⁻¹ de EAS con 26,13 % y 24,58 %, respectivamente. Los mayores contenidos en biomasa de lípidos en *Sc. acutus* al quinto día de cultivo, estuvieron con 15 y 20 mL L⁻¹ de EAS con 223,7 mg L⁻¹ y 203,2 mg L⁻¹, respectivamente. Se concluye que el mejor tratamiento, por la densidad poblacional y contenido de lípidos, fue el dosificado con 15 mL L⁻¹ de EAS.

Palabras Clave: Microalga, *Scenedesmus acutus*, extracto acuoso, sedimento, crecimiento poblacional, lípidos, Bahía el Ferrol.

ABSTRACT

Was studied, the effect of different concentrations of the aqueous extract sediment Ferrol bay (AES) on the growth and lipid content of the microalgae *Scenedesmus acutus*, under laboratory conditions, cultivated at concentrations of 10, 15 and 20 mL L⁻¹ of AES. The highest population density on the fifth day of culture of *Sc. acutus* was found with 15 mL L⁻¹ AES with 36,92 x10⁶ cél. mL⁻¹; while the lower concentration was obtained with 10 mL L⁻¹ of EAS with 28,94 cél x10⁶ mL⁻¹. The highest μ the fifth day of culture for *Sc. acutus* was found with 15 mL L⁻¹ of AES with 0,564 day⁻¹; while lower μ with 10 mL L⁻¹ of AES with 0,504 day⁻¹. The TD greater the fifth day of culture in *Sc. acutus* was with 10 mL L⁻¹ of AES with 1,374 day; while the lowest TD was 15 mL L⁻¹ of AES with 1,229 day. The highest percentages of lipids the fifth day of culture of *Sc. acutus* were obtained with 10 and 15 mL L⁻¹ of EAS with 26,13 % and 24,58 %, respectively. The highest content of lipid in biomass the fifth day of culture of *Sc. acutus* were with 15 and 20 mL L⁻¹ of AES with 223,7 mg L⁻¹ and 203,2 mg L⁻¹, respectively. We conclude that the best treatment, for the population density and lipid content was dosed with 15 mL L⁻¹ AES.

Key Words: Microalgae, *Scenedesmus acutus*, aqueous extract, sediment, population growth, lipids, Ferrol bay.

I. INTRODUCCIÓN

Las microalgas se caracterizan por ser fotosintéticos pero requieren de diferentes factores para su crecimiento óptimo como la luz, temperatura CO₂, pH y nutrientes principalmente el nitrógeno, fósforo y algunos metales como el magnesio y hierro que forman parte de su composición (Becker, 1994; Hu *et al.*, 2008); por lo tanto durante muchos años, las microalgas son utilizadas para la alimentación humana y animal ,y recientemente son aprovechadas para la producción de proteínas, vitaminas, carbohidratos, y también para el tratamiento de aguas residuales (Venkatamaran, 1986; Ventosa & Nieto, 1995; De Philippis & Vicenzini, 1998; Mora *et al.*, 2004); asimismo, existe interés en su cultivo debido a la necesidad de obtener alimento vivo considerando su alto valor alimenticio, su tamaño, digestibilidad y accesibilidad para diversos estadios de organismo acuáticos como larvas y juveniles de moluscos, crustáceos y peces (Rodríguez *et al.*, 2007).

Existe una gran variedad de microalgas que tienen la capacidad para crecer exitosamente en diferentes medios, siendo capaces de metabolizar fuentes nitrogenadas orgánicas e inorgánicas de diferentes procedencias tales como aguas residuales, materiales de desecho (Paniagua *et al.*, 1989). Dentro de esta variedad de microalgas tenemos a *Scenedesmus acutus* que pertenece a la División Chlorophyta, Clase Chlorophyceae, Orden Chlorococcales, Familia Scenedesmaceae, habita ríos, lagos, lagunas, formando colonias llamados cenobios (Garibay *et al.*, 2009); se caracteriza por tolerar elevadas concentraciones de nutrientes presentes en aguas residuales, además de poseer una alta actividad metabólica que le permite resistir bruscas variaciones en las condiciones ambientales y soporta algunas condiciones extremas (Andrade, 2009; Garibay *et al.*, 2009). En tal sentido, se han desarrollado medios para cultivar microalgas que van desde las fórmulas de enriquecimiento del agua de mar hasta la utilización de medios sintéticos totalmente conocidos en su composición; por lo que la selección de un medio de cultivo adecuado debe ser la primera y más importante actividad a desarrollarse para que el cultivo se realice de manera óptima (Paniagua *et al.*, 1989).

Debido al alto costo de los medios de cultivo sintéticos, es necesario la búsqueda de nuevas alternativas por empresas e investigadores (Paniagua *et al.*, 1989; González, 2006; Rosales *et al.*, 2007) por lo que resulta interesante la utilización de residuos industriales o lodos depositados en el fondo de las bahías, ya que estos aportan nitrógeno, carbono, fósforo, y metales para el crecimiento y producción de microalgas (Knud-Hansen, 1998). En tal sentido, el cultivo de microalgas utilizando lodos formados por la descomposición orgánica en fondos marinos que son ricos en N y P, se presenta como una alternativa, para ser usados como medios de cultivo de microalgas

El Instituto del Mar del Perú (IMARPE) en el año 2000 (CTM, 2011), determina electroacústicamente que en el fondo de la bahía “El Ferrol” existen algunas áreas, que supera los 2,5 m de altura de lodos, estimándose aproximadamente 54 millones de metros cúbicos de este material, estas se acumulan principalmente en la parte central de la bahía, y en la zona del “27 de Octubre” estos lodos contienen abundantes escamas de pescado con un fuerte olor a sulfuros, lo que se torna riesgoso para la vida acuática, fundamentalmente los que habitan el fondo marino. Este problema es crítico, ya que los representantes de la Dirección de Hidrografía y Navegación de la Marina, en sesión de la Comisión Técnica Multisectorial para la recuperación ambiental de la bahía “El Ferrol”, estiman en 15 millones de m³ de sedimentos acumulados a los ya existentes en la bahía “El Ferrol” durante el período comprendido entre los años 1994 - 2006 (CTM, 2011).

Paniagua *et al.* (1986), mencionan que es necesario viabilizar la utilización de residuos como los sedimentos mediante la aplicación de tratamientos adecuados, formulando un medio de cultivo adecuado en base a sedimentos para *Sc. acutus*, y que permitiría transformar eficientemente tales residuos en biomasa microalgal y lípidos, los que son requeridos por la industria acuícola y el sector energético, implicando en la conversión de residuos en biomasa microalgal con la consecuente reducción de impactos ambientales negativos y la reducción de los costos de producción microalgal (Fábregas *et al.*, 1984; Cano & Pisfil, 2007; Gómez *et al.*, 2008), así como la generación de sustancias químicas (proteínas, pigmentos, lípidos, etc.) de gran demanda industrial y

alimentaria, lo que implica mayores ingresos al darle valor monetario al sedimento.

La utilización de aguas residuales municipales, excremento animal y otros desechos como fuente orgánica de nutrientes para el cultivo de microalgas es utilizado desde los años 50 (Oswald, 1988; Borowitzka & Borowitzka, 1989; Benedetti *et al.*, 1998; Knud-Hansen, 1998; Olguin *et al.*, 2001); no se han reportado estudios relacionados a la utilización de sedimentos originados por la pesquería o actividad antrópica en nuestro país. En Alemania, Thain (1992), cultivó *Tetraselmis suecica* utilizando muestras de agua (testigo) y sedimentos marinos (tratamientos); obtuvo densidades poblacionales con el testigo al quinto día de cultivo de $0,15 \times 10^6$ a $0,45 \times 10^6$ cél. mL⁻¹ y al noveno día de $0,35 \times 10^6$ a $0,55 \times 10^6$ cél. mL⁻¹; y utilizando sedimento, al quinto día los cultivos presentaron densidades poblacionales desde $0,25 \times 10^6$ a $0,45 \times 10^6$ cél. mL⁻¹ y al noveno día de $0,40 \times 10^6$ a $0,16 \times 10^6$ cél. mL⁻¹. Esto demuestra la viabilidad de las microalgas para metabolizar sedimentos acuáticos y su utilidad como una medida biológica de regulación de la disponibilidad de los nutrientes (N, P, K) en los sedimentos marinos.

En lo que respecta al contenido de lípidos, las microalgas contienen de 20 a 80%, comparado con el 15% al 30% que contienen las especies vegetales empleadas en la producción de los aceites; estas microalgas están influenciadas por factores ambientales, tipo de cosecha y método de secado de las células, los mismos determinan la cantidad de sustancias potencialmente útiles en estas (Satyanarayana *et al.*, 2011).

Ipanaqué & Paredes (2009), evaluaron el ensilado de los desechos blandos de *Argopecten purpuratus* "concha de abanico" (EDBCA), en el crecimiento poblacional y en el contenido de lípidos totales de *T. suecica*, demostrando que la concentración de 80 mL L⁻¹ es la más adecuada para favorecer el crecimiento poblacional y concentraciones de lípidos. Asimismo, Fernández & Paredes (2007), evaluaron la utilización de extracto del ensilado de pescado (EEP) en el crecimiento y composición química de *T. suecica*, dosificando diversas concentraciones (20, 30, 40 y 50 mL L⁻¹) en comparación a Guillard

utilizado como control, demostrando que con 40 mL L⁻¹ de EEP se obtuvieron los mejores crecimientos.

Considerando la abundante presencia de lodos en la bahía “El Ferrol”, procedentes principalmente de los residuos orgánicos de la industria pesquera y aguas domésticas, mediante el presente trabajo de investigación se pretende darle valor económico y ambiental mediante el cultivo de la microalga *Sc. acutus*. Estos lodos son aprovechables debido a la gran cantidad de nutrientes que contienen, sobre todo derivados de los procesos de mineralización y reducción de los componentes orgánicos que sumado al aporte inorgánico propiamente de la zona. Por todo ello, planteamos el presente problema de investigación: ¿Cuál será el efecto de diferentes concentraciones de extracto acuoso del sedimento de la bahía “El Ferrol” en el crecimiento poblacional y contenido de lípidos de la microalga *Sc. acutus* en laboratorio?

El objetivo general fue: Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de extracto acuoso del sedimento de la bahía “El Ferrol” en el crecimiento poblacional y contenido de lípidos de la microalga *Scenedesmus acutus* en laboratorio; y se plantearon los siguientes objetivos específicos: Determinar el efecto de 10; 15 y 20 mL L⁻¹ del extracto acuoso del sedimento de la bahía “El Ferrol” en la densidad poblacional, tasas de crecimiento y tiempo de duplicación de la microalga *Sc. acutus* en laboratorio; y determinar el efecto de 10; 15 y 20 mL L⁻¹ del extracto acuoso del sedimento de la bahía “El Ferrol” en el contenido de lípidos de la microalga *Sc. acutus* en laboratorio.

Se plantea la hipótesis, para el crecimiento poblacional y contenido de lípidos:

$$H_0: T1 = T2 = T3$$

$$H_a: T1 < T2 > T3$$

T1: Tratamiento a concentración de 10 mL L⁻¹ de EAS (1 g L⁻¹).

T2: Tratamiento a concentración de 15 mL L⁻¹ de EAS (1,5 g L⁻¹).

T3: Tratamiento a concentración de 20 mL L⁻¹ de EAS (2 g L⁻¹).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Localización del experimento

El experimento fue desarrollado en el laboratorio de Genética de la Escuela Académico Profesional de Biotecnología, Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional del Santa.

2.2. Material experimental

2.2.1. Material biológico

La microalga *Scenedesmus acutus* procedió del stock que se mantiene con iluminación y aireación constante en el laboratorio de Cultivos de Especies Auxiliares de la E.A.P. Biología en Acuicultura. Estos fueron mantenidos con medio HM (Merino, 1999) en 2 matraces de vidrio de 500 mL con 200 mL de cultivo microalgal, y luego fueron escalados a botellas de plástico de 3 L de capacidad con 2 L de volumen efectivo de cultivo hasta su utilización en la experiencia.

La proporción de los inóculos en cada unidad experimental fue en proporción de 1:10, tomando 200 mL de inóculo microalgal aforado a 2 L de cultivo final. Estos inóculos microalgales estuvieron en la fase de crecimiento exponencial, y se obtuvo una densidad poblacional inicial promedio de $2,20 \times 10^6$ cél. mL⁻¹ en cada botella de cultivo.

Los cultivos microalgales fueron iluminados constantemente con dos fluorescentes de luz blanca de 40 w, cada fluorescente emite una intensidad luminosa de 2000 lux, y fueron medidos con un luxómetro digital Hanna ($\pm 0,1$ lux).

2.3. Preparación del extracto acuoso del sedimento de la bahía “El Ferrol”

Se utilizaron 4 kg de sedimento procedente de la bahía “El Ferrol” (09°07'S; 78°35'O), en Chimbote, región Ancash, obtenido mediante una draga Eckman, y trasladado al laboratorio de Genética en un balde plástico con tapa.

Para la preparación del extracto acuoso de sedimento se pesó 1000 g de sedimento fresco y se llevó a estufa para su secado a 60°C por 12 h hasta peso constante, luego se tomó 100 g para ser pulverizados con un mortero y disuelto en agua potable aforándolo hasta 1000 mL. Inmediatamente se llevó a ebullición por 15 min, que después de enfriado se volvió a aforar a 1000 mL. Finalmente fue filtrado con papel Whatman N° 42 y almacenada en un frasco de vidrio a 5 °C (Fig. 1).

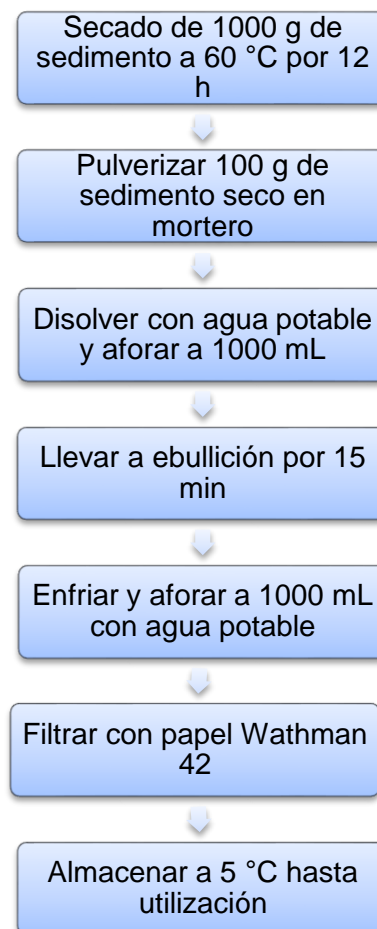


Fig. 1. Flujo de la preparación del EAS para los cultivos de *Sc. acutus*.

La solución de agua y sedimento o extracto acuoso de sedimento, se dosificó a los cultivos microalgales a razón de 10; 15 y 20 mL de EAS por litro de cultivo. Estas dosificaciones han sido tomadas en referencia de ensayos previos en laboratorio, encontrándose que a menores valores de 10 mL de EAS y mayores 20 mL de EAS, la microalga disminuye su crecimiento poblacional.

2.4. Acondicionamiento de las unidades experimentales

En el experimento 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 $2,20 \times 10^6$ cél. mL⁻¹ de *Sc. acutus*.

Para el trabajo de investigación fue empleado el diseño estímulo creciente (Steel & Torrie, 1988), con tres tratamientos y un grupo control (HM), con tres repeticiones cada uno (Tabla 1), siendo estos los siguientes:

Tabla 1. Tratamientos en los cultivos microalgales de la investigación.

TRATAMIENTOS	ESPECIFICACIONES
T0	Cultivo de la microalga <i>Sc. acutus</i> con medio de cultivo HM (Control).
T1	Cultivo de la microalga <i>Sc. acutus</i> utilizando 10 mL L ⁻¹ (1,0 g L ⁻¹) de EAS.
T2	Cultivo de la microalga <i>Sc. acutus</i> utilizando 15 mL L ⁻¹ (1,5 g L ⁻¹) de EAS.
T3	Cultivo de la microalga <i>Sc. acutus</i> utilizando 20 mL L ⁻¹ (2,0 g L ⁻¹) de EAS.

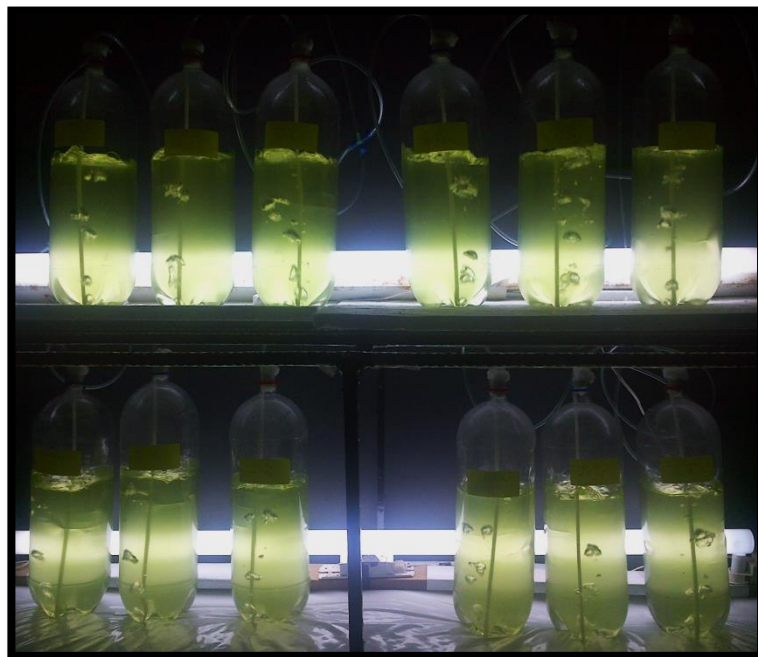


Fig. 2. Unidades experimentales en los cultivos microalgales de *Sc. acutus* utilizando diferentes concentraciones de EAS.

2.5. Preparación del medio control HM

El medio HM (control) está compuesto por sustancias inorgánicas (Merino, 1999) y agua potable, la que luego de la preparación de las soluciones stock, fueron llevadas al autoclave para su esterilización a 121 °C por 15 min. Las soluciones stock de nutrientes del medio HM fueron refrigeradas a 5 °C. La composición de nutrientes del medio de cultivo HM se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Composición química del medio HM.

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN (mg L ⁻¹)
Urea	206,0
H ₃ PO ₄	35,0
KCl	19,0
FeCl ₃	2,5

2.6. Análisis químico del EAS

Se realizó el análisis del contenido de nutrientes del EAS, como el nitrógeno, fósforo, hierro y potasio, según metodologías colorimétricas de APHA (2005), ello para conocer el aporte del sedimento en cada uno de los tratamientos. Estos análisis fueron realizados utilizando 10 mL de EAS por cada parámetro, en el laboratorio de Biología y Ecología, de la facultad de Ciencias, Universidad Nacional del Santa utilizando reactivos CHEMetrics inc (tabla 3). Comparativamente la composición química de los medios HM y EAS, muestran valores diferentes respecto a los elementos N, P, K y Fe (tabla 4).

Tabla 3. Valores proximales del contenido de los principales componentes del EAS utilizado en el cultivo de *Sc. acutus*.

PARÁMETROS *	CONCENTRACIÓN
Fe (Fe-mg L ⁻¹)	241,8
K (K-mg L ⁻¹)	36,3
Nitratos (N-mg L ⁻¹)	641,7
Nitritos (N-mg L ⁻¹)	1,2
Nitrógeno Amoniacal (N-mg L ⁻¹)	8,1
Fosfatos (P-mg L ⁻¹)	73,5

*Parámetros determinados en el laboratorio de Biología y Ecología de la Universidad Nacional del Santa.

Tabla 4. Composición química (mg L⁻¹.) de los medios HM y EAS.

PARÁMETROS	Control (HM)	EAS		
		10 mL L ⁻¹	15 mL L ⁻¹	20 mL L ⁻¹
Nitrógeno (N-mg)	96,13	6,51	9,77	13,02
Fósforo (P-mg)	11,06	0,74	1,11	1,47
Potasio (K-mg)	9,96	0,36	0,54	0,73
Hierro (Fe-mg)	0,52	2,42	3,63	4,84

2.7. Determinación de parámetros del cultivo

Se registró diariamente la temperatura con un termómetro digital Hanna ($\pm 0,1$ °C) y pH con un pH-metro digital Hanna ($\pm 0,01$). Asimismo, se mantuvo constante el flujo de aire suministrado por un blower a 500 mL min⁻¹ por unidad experimental, medido con un flujómetro Cole Parmer (± 10 mL min⁻¹).

La iluminación continua fue suministrada con dos fluorescentes de luz blanca de 40 w colocados a 10 cm de las botellas de cultivos microalgales, irradiando a una intensidad luminosa promedio de 2000 lux medidos con un luxómetro digital Hanna ($\pm 0,1$ lux).

2.8. Tratamiento del agua del medio de cultivo

El agua utilizada en el cultivo procedió del sistema de abastecimiento de agua potable de Seda Chimbote, el cual se almacenó en un bidón de plástico de 150 L de capacidad y se dejó sedimentar por 48 h.

Seguido se filtró a 10 μ m con malla de Nyltal transfiriéndose a dos botellones de plástico de 20 L cada uno, y se agregó 1 mL de hipoclorito de sodio (4 %) por cada litro dejándolo actuar por 24 h. Luego se neutralizó con 1 mL de tiosulfato de sodio (15 %) por litro de agua y se colocó aireación (2 L min⁻¹) por espacio de 1 h para eliminar el posible cloro residual en el medio.

2.9. Determinación del crecimiento poblacional de *Sc. acutus*

La densidad poblacional de *Sc. acutus* en los cultivos se determinó por conteos diarios (cél. mL⁻¹) utilizando cámara de Neubauer y microscopio binocular Olympus, durante 7 días que dura la experiencia.

Los valores de la densidad poblacional se utilizaron para graficar las curvas de crecimiento poblacional; del mismo modo, fueron determinados la tasa de crecimiento poblacional (μ) y el tiempo de duplicación (*TD*) al quinto día de cultivo, según Guillard (1975) para lo cual se utilizaron las siguientes fórmulas:

$$\mu = \frac{\ln(N_f/N_0)}{t_f - t_0} \quad \begin{array}{l} N_f \text{ y } N_0 : \text{Número de células final e inicial (cél. mL}^{-1}\text{).} \\ t_f \text{ y } t_0 : \text{Tiempo final e inicial (d).} \end{array}$$

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

2.10. Determinación del contenido de lípidos en *Sc. acutus*

El contenido de lípidos se realizó al quinto día de cultivo, cuando los cultivos de *Sc. acutus* han alcanzado el máximo crecimiento poblacional, fueron determinados según Bligh & Dyer (1959) y Marsh & Weinstein (1966) (Fig. 2); utilizando 4 mL de muestra de cada unidad experimental del cultivo microalgal, centrifugadas a 10000 rpm por 10 min, luego se eliminó el sobrenadante dejando la pasta de microalga en el fondo. El sedimento fue resuspendido en agua destilada y nuevamente centrifugada a 10000 rpm por 10 min; luego se eliminó el sobrenadante, y la materia sedimentada fue secada en estufa a 60 °C por 3 h. Luego se les adicionó 3 mL de una solución de cloroformo:metanol (2:1) y se dejó reposar por 12 h en refrigeración a 5 °C y en oscuridad.

Transcurrida 12 h se agregó 2 mL de agua destilada a cada tubo, y fueron centrifugados a 6000 rpm por 10 min, se evaporó en baño María, y fueron llevados a secar en estufa a 105 °C por 30 min.

Al contenido de cada tubo de ensayo se añadieron 2 mL de ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄) y calentados a 200 °C durante una hora; luego de enfriada, se realizaron lecturas en un espectrofotómetro Aquamate Plus con celdas de cuarzo de 1 cm a 375 nm de longitud de onda.

Para determinar el contenido de lípidos se utilizó la siguiente ecuación:

$$L (\%) = \frac{\left(\left(\frac{\text{Absorbancia}}{4,3681} \right) \times V \right)}{M} \times 100$$

Donde:

V: Volumen final de muestra analizada (8mL).

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

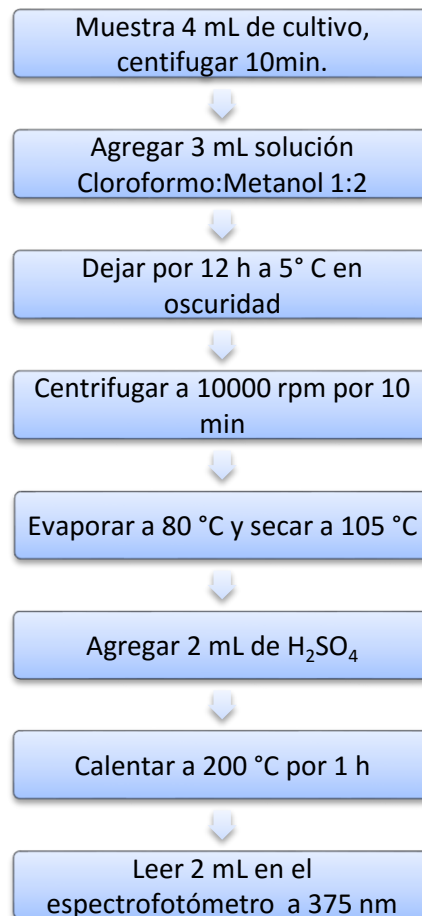


Fig. 3. Flujograma para determinar el contenido de lípidos de *Sc. acutus* en los cultivados con EAS y grupo control HM.

2.11. Determinación de biomasa

La biomasa microalgal se determinó por gravimetría: se pesaron tubos de ensayo rotulados y se tomaron 10 mL de suspensión microalgal por cada unidad experimental, se centrifugó a 10000 rpm por 10 min, se eliminó el sobrenadante, seguido se agregó agua destilada para resuspender la muestra, y centrifugados a 10000 rpm por 10 min; se descartó el sobrenadante y secados en estufa a 60 °C por 6 h, y 15 min a 105 °C, dejándose enfriar por 1 h, y se pesaron cada uno de ellos en una balanza analítica con sensibilidad de 0,0001 g.

Los pesos obtenidos se utilizaron para calcular la biomasa total y los lípidos en peso seco por litro de cultivo de cada unidad experimental para lo cual se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{Biomasa (mg L}^{-1}\text{)} = (\text{P1} - \text{P2}) \times 1000 / 10$$

Donde:

P1: Peso inicial muestra (mg)

P2: Peso final muestra (mg)

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

Donde:

Biomasa: Peso de las microalgas en un litro (mg L⁻¹)

%Lípidos: Porcentaje de lípidos de las muestras

2.12. Análisis estadístico

Los datos de crecimiento poblacional y contenido de lípidos, fueron sometidos al análisis de varianza (ANOVA) para establecer diferencias entre tratamientos y se empleó la prueba de Tukey HSD para establecer el mejor promedio. Para todos los casos el nivel de significancia fue de 0,05. El proceso estadístico ha sido desarrollado utilizando los programas Microsoft Excel 2010 y el SPSS 20.0 para Microsoft Windows 7.

III. RESULTADOS

3.1. Parámetros ambientales del cultivo

3.1.1. Temperatura

La variación de la temperatura en los cultivos de *Sc. acutus* se muestra en la Fig. 4, y Anexos 1 y 2.

La temperatura de los cultivos varió entre los 23,0 y 24,3 °C durante el experimento; siendo estadísticamente similares ($p>0,05$) en cada día del cultivo microalgal.

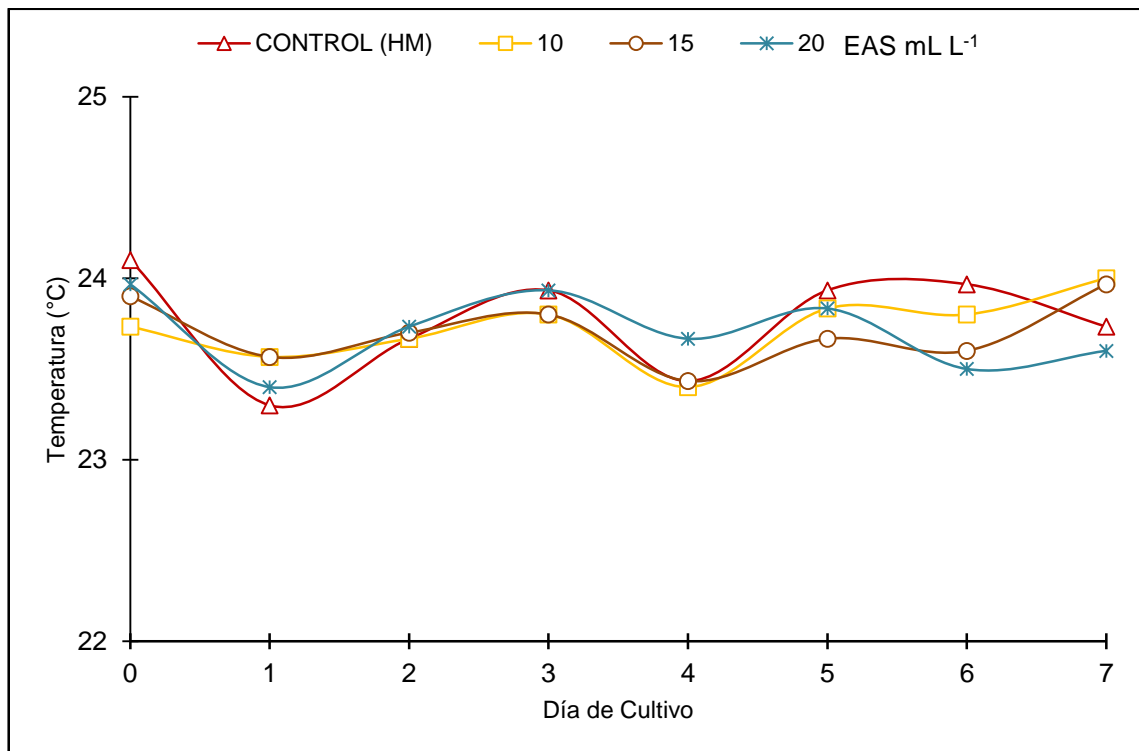


Fig. 4. Variación de la temperatura promedio (°C) en los cultivos de *Sc. acutus* con EAS y grupo control (HM).

3.1.2. pH

Las variaciones del pH en los cultivos son mostrados en la Fig. 5, y los Anexos 3 y 4. Estando la variación del pH en los cultivos de *Sc. acutus* entre los 7,79 unid. al inicio y 9,08 unid. al tercer día de cultivo.

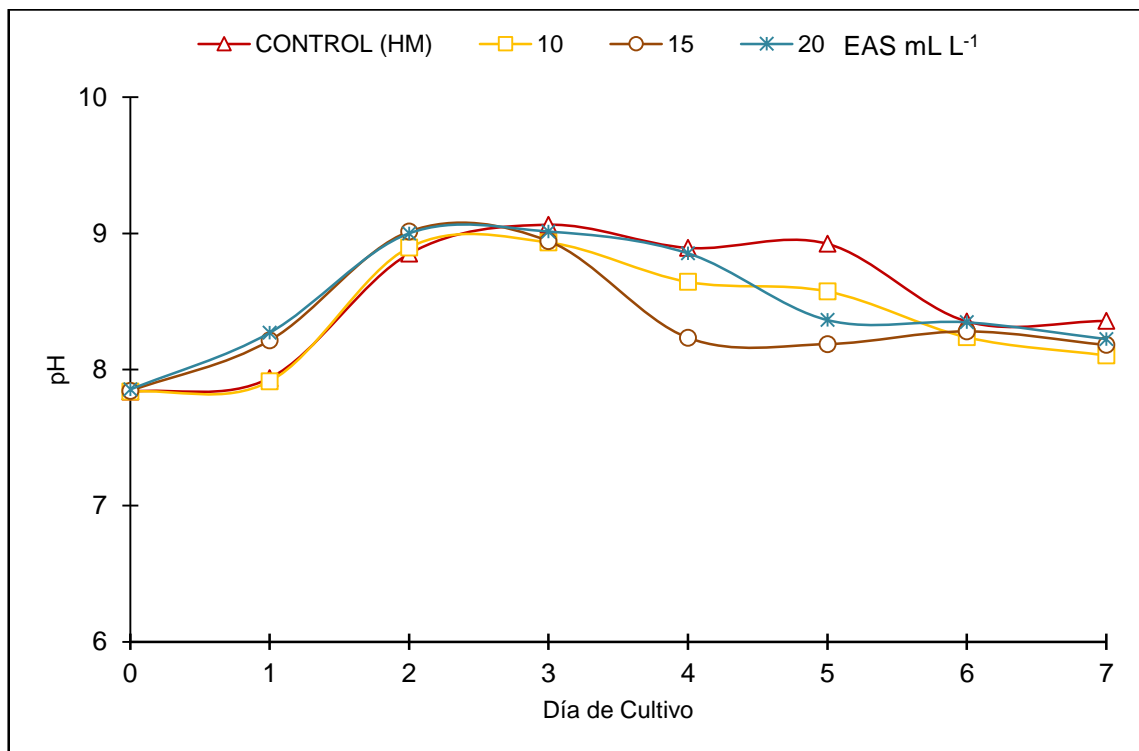


Fig. 5. Variación del pH promedio de los cultivos de *Sc. acutus* con EAS y grupo control (HM).

Al inicio del experimento, los valores de pH en los cultivos fueron estadísticamente similares ($p > 0,05$). De la misma manera, en el tercer día de cultivo, el pH en los cultivos fueron estadísticamente similares ($p > 0,05$). Mientras al quinto día de cultivo, el mayor valor ($p < 0,05$) estuvo en el grupo control con 8,92 unid. y similar al dosificado con 10 mL L⁻¹ de EAS con 8,57 unid.

Durante el sexto y séptimo día de cultivo, los valores de pH fueron similares ($p > 0,05$) entre tratamientos.

3.2. Crecimiento poblacional en los cultivos de *Sc. acutus*

3.2.1. Curvas de crecimiento poblacional

En la Tabla 5, Fig. 6 y 7, y Anexo 5, se observa las variaciones en las densidades poblacionales en los cultivos de *Sc. acutus*.

Tabla 5. Densidad Poblacional ($\times 10^6$ cél. mL⁻¹) de *Sc. acutus* en los cultivos con EAS y grupo control (HM).

DÍA DE CULTIVO	CONTROL (HM)	EAS (mL L ⁻¹)		
		10	15	20
0	2,20 ±0,00a	2,20 ±0,00a	2,20 ±0,00a	2,20 ±0,00a
1	4,35 ±0,41a	3,45 ±0,07b	3,59 ±0,09b	3,67 ±0,06b
2	8,55 ±0,45bc	8,11 ±0,19c	9,22 ±0,26ab	9,52 ±0,22a
3	18,15 ±0,54c	19,67 ±0,42b	21,69 ±0,57a	21,27 ±0,31a
4	26,12 ±1,08b	25,23 ±0,58b	29,76 ±0,56a	28,13 ±0,28a
5	28,94 ±0,72c	27,37 ±0,47c	36,92 ±0,88a	34,07 ±0,29b
6	30,69 ±0,64c	30,29 ±0,63c	37,48 ±0,60a	33,56 ±0,66b
7	31,63 ±0,96c	31,03 ±0,89c	37,97 ±0,54a	33,71 ±0,62b

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

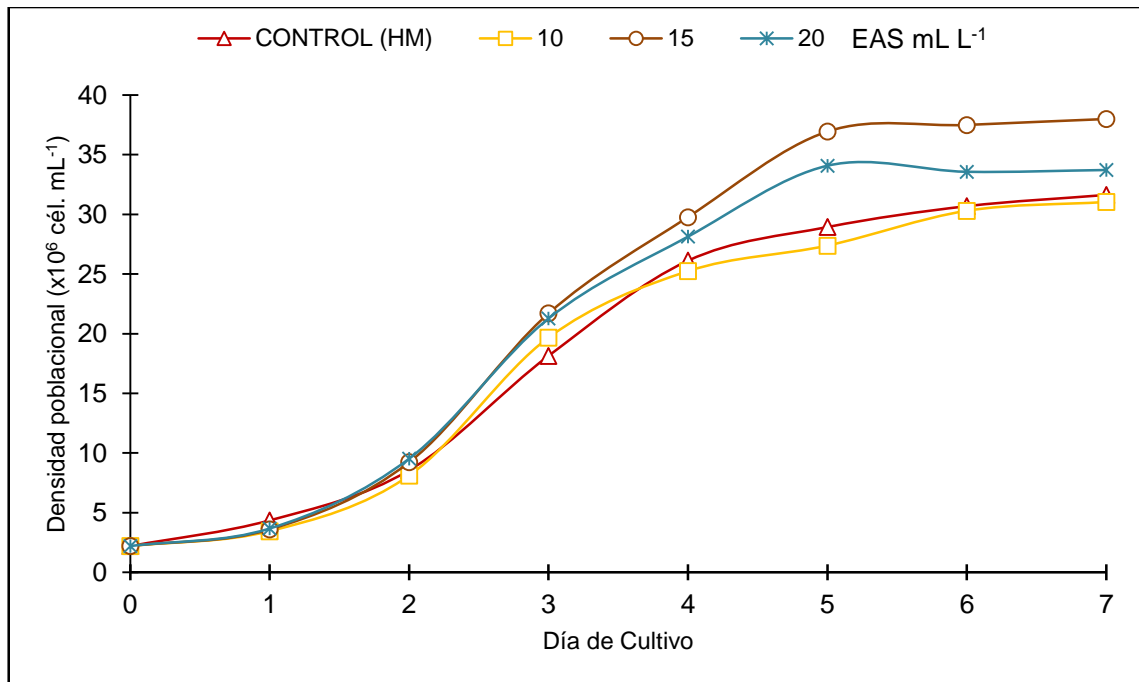


Fig. 6. Variación de la densidad poblacional de *Sc. acutus* cultivados con EAS y grupo control (HM).



Fig. 7. Unidades experimentales al quinto día de cultivo de *Sc. acutus* utilizando EAS y grupo control (HM).

Los cultivos con *Sc. acutus* se iniciaron con valores promedio significativamente similares ($p > 0,05$) de $2,20 \times 10^6$ cél. mL^{-1} , y fueron incrementándose en densidad microalgal al transcurrir los días cultivados, con tendencias no muy marcadas hasta el cuarto día de cultivo.

A partir del quinto día de cultivo, se observan marcadas tendencias aunque con incrementos en menor proporción, pasando de una fase exponencial a logarítmica y posterior estacionaria, obteniéndose la mayor densidad poblacional ($p < 0,05$) de *Sc. acutus* en la dosificación de 15 mL L^{-1} de EAS con $36,92 \times 10^6$ cél. mL^{-1} ; seguido del dosificado con 20 mL L^{-1} de EAS con $34,07 \times 10^6$ cél. mL^{-1} ; mientras los menores promedios ($p < 0,05$) se obtuvieron en los dosificados con 10 mL L^{-1} de EAS y el grupo control (HM) con $27,37 \times 10^6$ cél. mL^{-1} y $28,94 \times 10^6$ cél. mL^{-1} , respectivamente.

En el sexto día de cultivo, la mayor densidad poblacional ($p < 0,05$) de *Sc. acutus* se encontró en el dosificado con 15 mL L⁻¹ de EAS con 37,48 x10⁶ cél. mL⁻¹; seguido del dosificado con 20 mL L⁻¹ de EAS con 33,56 x10⁶ cél. mL⁻¹; mientras los menores promedios ($p < 0,05$) se obtuvieron en los dosificados con 10 mL L⁻¹ de EAS y el grupo control (HM) con 30,29 x10⁶ cél. mL⁻¹ y 30,69 x10⁶ cél. mL⁻¹, respectivamente.

En el último día de cultivo (7), la mayor densidad poblacional ($p < 0,05$) de *Sc. acutus* se encontró en el dosificado con 15 mL L⁻¹ de EAS con 37,97 x10⁶ cél. mL⁻¹; seguido del dosificado con 20 mL L⁻¹ de EAS con 33,71 x10⁶ cél. mL⁻¹; mientras los menores promedios ($p < 0,05$) se obtuvieron en los dosificados con 10 mL L⁻¹ de EAS y el grupo control (HM) con 31,03 x10⁶ cél. mL⁻¹ y 31,63 x10⁶ cél. mL⁻¹, respectivamente.

3.2.2. Tasa de crecimiento y tiempo de duplicación poblacional diaria

En la Tabla 6, Fig. 8 y Anexo 6, se muestran la tasa de crecimiento (μ) y el tiempo de duplicación poblacional diaria (TD) en los cultivos de *Sc. acutus* con EAS y grupo control (HM), determinados al quinto día de cultivo para todos los tratamientos.

Tabla 6. Tasa de crecimiento (μ) y Tiempo de duplicación poblacional diaria (TD) de *Sc. acutus* en los cultivados con EAS y grupo control (HM).

PARÁMETRO	CONTROL (HM)	EAS (mL L ⁻¹)		
		10	15	20
N₀	2,20 ±0,00a	2,20 ±0,00a	2,20 ±0,00a	2,20 ±0,00a
N_f	28,94 ±0,72c	27,37 ±0,47c	36,92 ±0,88a	34,07 ±0,29b
Día	5	5	5	5
μ (día⁻¹)	0,515 ±0,005c	0,504 ±0,004d	0,564 ±0,005a	0,548 ±0,002b
TD (día)	1,345 ±0,013b	1,374 ±0,010a	1,229 ±0,010d	1,265 ±0,005c

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

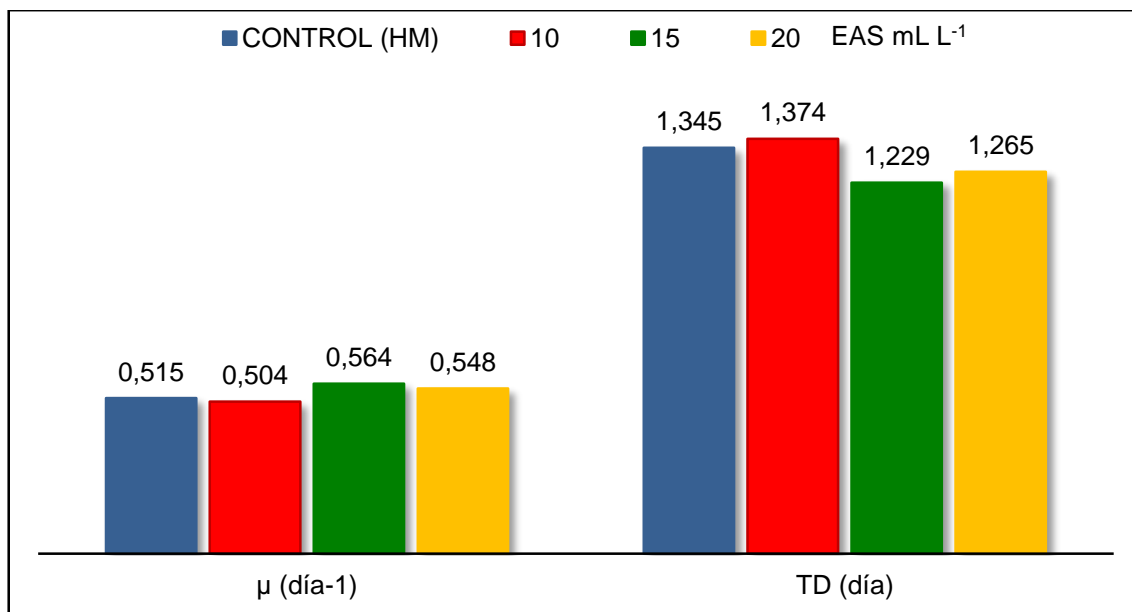


Fig. 8. Variación de la tasa de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación poblacional diaria (TD) de *Sc. acutus* en los cultivados con EAS y grupo control (HM).

La tasa de crecimiento poblacional diaria (μ) al quinto día de cultivo de *Sc. acutus* (Tabla 6, Fig. 8) presentó el mayor valor ($p < 0,05$) en el dosificado con 15 mL L⁻¹ de EAS con 0,564 día⁻¹; seguido del dosificado con 20 mL L⁻¹ de EAS con 0,548 día⁻¹, y el grupo control (HM) con 0,515 día⁻¹; mientras que la menor μ ($p < 0,05$) de *Sc. acutus* se encontró en el dosificado con 10 mL L⁻¹ de EAS con 0,504 día⁻¹.

Asimismo, se encontró que el tiempo de duplicación poblacional diaria (TD) al quinto día de cultivo de *Sc. acutus* (Tabla 6, Fig. 8) fue mayor ($p < 0,05$) en el dosificado con 10 mL L⁻¹ de EAS con 1,374 día; seguido del el grupo control (HM) con un TD de 1,345 día, y el dosificado con 20 mL L⁻¹ de EAS con 1,265 día; mientras que el menor promedio ($p < 0,05$) se obtuvo en el dosificado con 15 mL L⁻¹ de EAS con 1,229 día.

3.3. Contenido de lípidos en *Sc. acutus*

En la siguiente Tabla 7, Fig. 9 y 10 y anexo 7, pueden observarse los promedios del contenido de lípidos en porcentaje (%) y biomasa (mg L⁻¹) de *Sc. acutus* analizados al quinto día de cultivo para todos los tratamientos.

Tabla 7. Contenido de lípidos en porcentaje (%) y biomasa (mg L^{-1}) al quinto día de cultivo de *Sc. acutus* en los dosificados con EAS y grupo control (HM).

PARÁMETROS	EAS (mL L^{-1})			
	CONTROL (HM)	10	15	20
Lípidos (%)	22,16 \pm 0,62c	26,13 \pm 0,76a	24,58 \pm 0,64ab	24,21 \pm 0,48b
Lípidos (mg L^{-1})	158,2 \pm 8,4b	176,4 \pm 7,3b	223,7 \pm 11,4a	203,2 \pm 5,5a

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

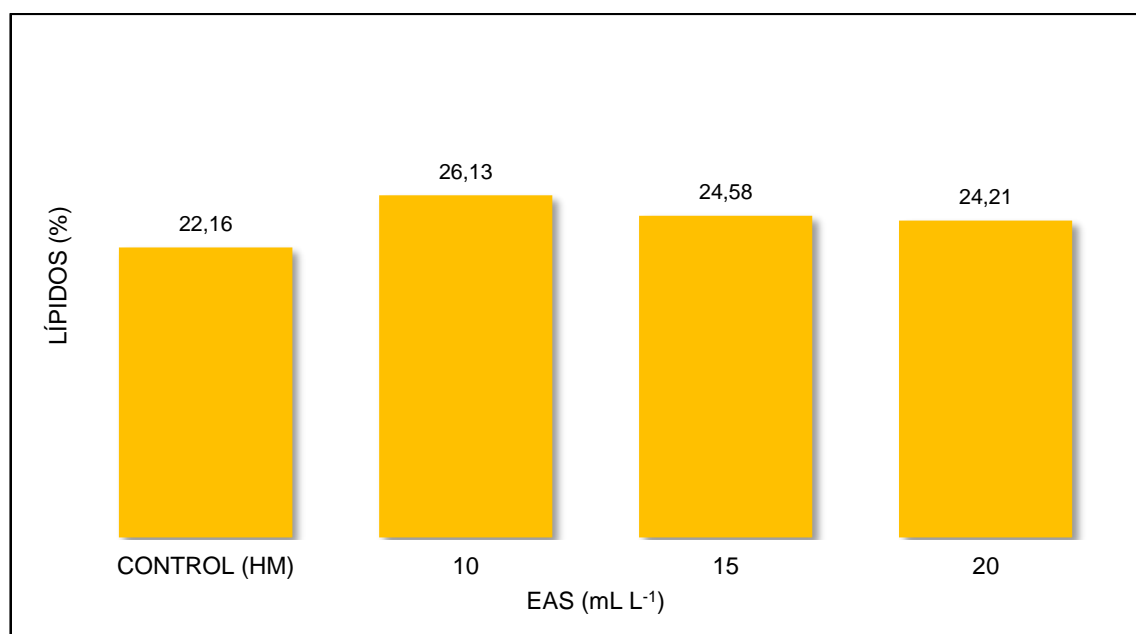


Fig. 9. Contenido de lípidos en porcentaje de *Sc. acutus* en los cultivados con EAS y grupo control (HM).

El contenido de lípidos en porcentaje (Tabla 7 y Fig. 9) al quinto día de cultivo, presentaron los mayores valores significativos ($p<0,05$) en los tratamientos dosificados con 10 y 15 mL L^{-1} de EAS con 26,13 % y 24,58 %, respectivamente; seguido del dosificado con 20 mL^{-1} de EAS con 24,21 %; mientras el menor contenido de lípidos en porcentaje se presentó en el grupo control con 22,16 %.

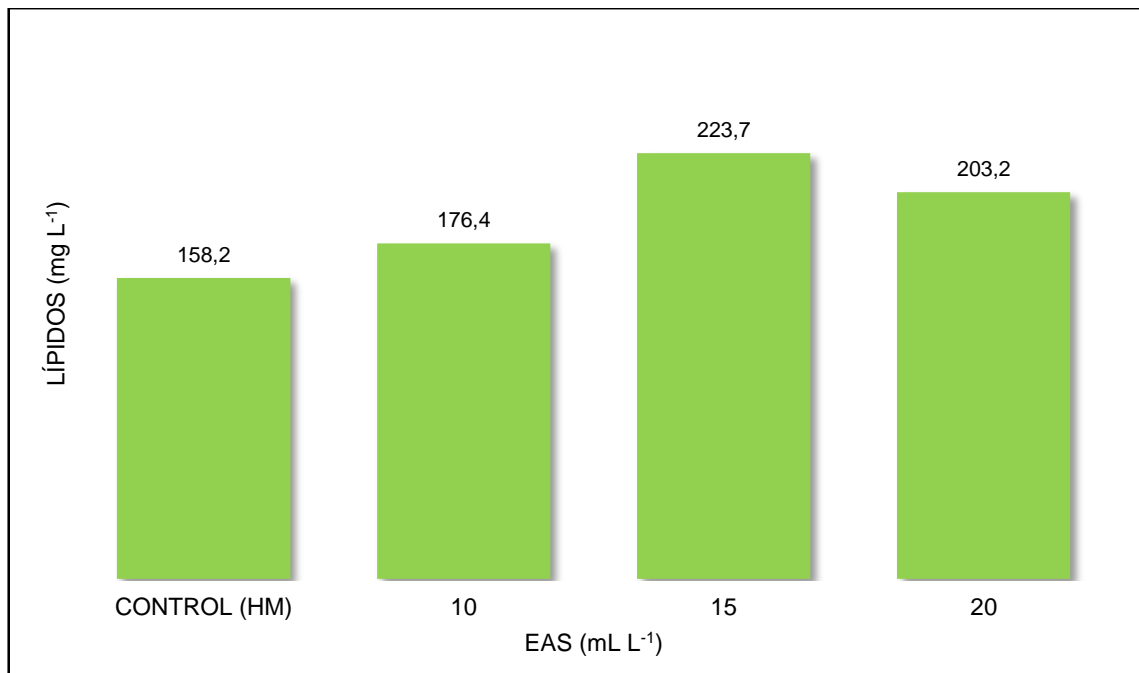


Fig. 10. Contenido de lípidos en biomasa de *Sc. acutus* en los cultivados con EAS y grupo control (HM).

Respecto al contenido de lípidos en biomasa (mg L^{-1}) de *Sc. acutus* (Tabla 7, Fig. 10) al quinto día de cultivo, fueron significativamente mayores ($p < 0,05$) en los dosificados con 15 y 20 mL L^{-1} de EAS con $223,7 \text{ mg L}^{-1}$ y $203,2 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente; mientras que los menores ($p < 0,05$) contenidos en biomasa de lípidos se encontraron en el grupo control (HM) y en el dosificado con 10 mL L^{-1} de EAS con $158,2 \text{ mg L}^{-1}$ y $176,4 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente.

IV. DISCUSIÓN

Factores ambientales como la temperatura, el pH, el flujo de aire, la calidad, intensidad de luz, la cantidad y calidad de nutrientes en los cultivos de microalgas condicionan su crecimiento y composición química, por lo que deben encontrarse en el rango óptimo para evitar resultados no deseados en los estudios a realizarse con microalgas. Sobre ello, Abalde *et al.* (1995), mencionan que la temperatura óptima para los cultivos microalgales varía según la especie, así algunas no soportan temperaturas por encima a los 25 °C, mientras que otras resisten hasta los 36 °C; asimismo, Garibay *et al.* (2009), describen un óptimo de temperatura para *Scenedesmus* alrededor de los 28 °C. En el presente experimento los cultivos de *Scenedesmus acutus* presentaron un rango de temperatura entre 23,0 y 24,3 °C, encontrándose en el rango mencionado por Abalde *et al.* (1995), y cercanas a lo mencionado por Garibay *et al.* (2009), por lo que la temperatura del cultivo de *Sc. acutus* no tendría influencia en los resultados encontrados.

En cuanto al pH en los cultivos de microalgas, Richmond & Becker (1986), consideran que estos deberían estar entre 7 y 8 unid., aunque pueden variar en algunas unidades sin afectar su crecimiento, pero son muy sensibles si disminuyen bruscamente, por lo que se debe controlar en caso estén fuera del óptimo, caso contrario tendría interferencia en su crecimiento y composición química. Garibay *et al.* (2009), encuentra que las condiciones adecuadas de pH para el crecimiento microalgal puede estar entre 6,5 a 9,5 unid. En el presente experimento se encontraron valores de pH entre 7,79 unid. y 9,08 unid., estando en el rango mencionado por Garibay *et al.* (2009), por lo que este parámetro no limitaría los cultivos, y no tendrían influencia en los resultados de crecimiento y contenido de lípidos de *Sc. acutus*.

Muchas microalgas presentan buenos crecimientos en condiciones heterotróficas, como utilizando residuos de la pesca y maricultura (Merino *et al.*, 2003; Fernández & Paredes, 2007; Ipanaqué & Paredes, 2009). Merino *et al.* (2003), cultivaron *Tetraselmis suecica* con ensilado de pescado, obteniendo el mayor crecimiento ($5,0 \times 10^6$ cél. mL⁻¹) con 0,5 g L⁻¹ del ensilado. Ipanaqué &

Paredes (2009), utilizaron extracto de ensilado de residuos de “concha de abanico” obteniendo las mayores densidades poblacionales con 60 y 80 mL L⁻¹ de extracto de ensilado con 6,38 y 6,88 x10⁶ cél. mL⁻¹, respectivamente. En el presente experimento con EAS, se encontró que la mayor densidad poblacional de *Sc. acutus* al quinto día de cultivo se obtuvo en el tratamiento dosificado con 15 mL L⁻¹ de EAS con 36,92 x10⁶ cél. mL⁻¹; mientras que el menor se encontró dosificando con 10 mL L⁻¹ de EAS con 28,94 x10⁶ cél. mL⁻¹. Indicando que los nutrientes presentes en el EAS son utilizados eficientemente por *Sc. acutus*. Esto indicaría la óptima utilización del EAS, notoriamente mayor en la dosificación de 15 mL L⁻¹ de EAS, debido quizás a un mejor balance de nutrientes como nitrógeno, fósforo y hierro, lo que permite incrementar de manera óptima la población microalgal.

Toyub *et al.* (2008), evaluaron el crecimiento de *Sc. obliquus* con diferentes concentraciones de residuos de una fábrica de dulces con cuatro concentraciones (1,5; 2,0; 2,5 y 3,0 %), y un control con medio basal Bold (BBM), durante 14 días bajo condiciones de laboratorio, iniciándose con una densidad poblacional de 0,21 x10⁶ cél. mL⁻¹, encontrando al décimo día de cultivo una densidad máxima de 13,63 x10⁶ cél. mL⁻¹ con el medio control, y densidades de 9,71; 8,32; 6,52 y 5,12 x10⁶ cél. mL⁻¹, utilizando 2,5; 3,0; 2,0 y 1,5 % de los residuos, respectivamente. Estas densidades son menores a las encontradas para *Sc. acutus* utilizando EAS en el quinto día del presente experimento; además, Alam (2004), encontró densidades poblacionales para *Sc. obliquus* con medio BBM de 10,97 x10⁶ cél. mL⁻¹ a 19,73 x10⁶ cél. mL⁻¹.

Respecto a la tasa de crecimiento en microalgas, Griffiths *et al.* (2012) y Roleda *et al.* (2013), indican que la tasa máxima de crecimiento específico (μ_{max}) muestra el potencial biológico respecto al tiempo de duplicación de la especie en un entorno de crecimiento particular momentos después del inicio de un cultivo, que es cuando la concentración de biomasa es baja y no existe deficiencia de nutrientes o la luz no es limitante dado el efecto de ensombrecimiento. Martínez *et al.* (1997), al emplear *Sc. obliquus* cultivada en matraz Erlenmeyer a una temperatura de 30 °C en diferentes concentraciones de fósforo obtuvieron un μ_{max} de 0,047 h⁻¹.

En otros estudios, como el realizado por Ortega-Salas & Reyes-Bustamante (2012), cultivaron las microalgas dulceacuícolas *Kirchneriella obesa*, *Sc. quadricauda* y *Chlorococcum infusorium*, y compararon las tasas de crecimiento y su rendimiento con tres medios de cultivo, Guillard f/2, Fert I y Fert II, encontraron que *Sc. quadricauda* presentó la más alta tasa de crecimiento promedio con $0,72 \text{ día}^{-1}$ obtenida con el medio Guillard f/2 y la más baja de $0,64 \text{ día}^{-1}$ con el tratamiento Fert II, siendo estos cercanos a los obtenidos en el experimento con EAS; aunque comparando los cultivos de *Sc. acutus* dosificados con 15 mL L^{-1} de EAS, se obtuvo una tasa de crecimiento ($0,564 \text{ día}^{-1}$) mayor a los encontrados por Roleda *et al.* (2013) para las microalgas *Nannochloropsis oculata* con $0,481 \text{ día}^{-1}$, *Isochrysis galbana* con $0,451 \text{ día}^{-1}$ y *Odontella aurita* con $0,131 \text{ día}^{-1}$. Por ello se puede inferir que el aporte de nutrientes por el EAS, básicamente de N, P y Fe, propician el crecimiento óptimo de la microalga *Sc. acutus*.

Fábregas *et al.* (1985), afirman que la deficiencia de nitrógeno en el cultivo incrementa el tiempo de duplicación de las células de *Isochrysis galbana*, dado que la velocidad de multiplicación disminuye, aunque también depende de un adecuado balance de nutrientes como nitrógeno y fósforo. Mientras, que en *T. suecica*, Sheehan *et al.* (1998), determinaron con medio Guillard f/2 un tiempo de duplicación de 1,500 día, si comparamos esta microalga con lo obtenido en el experimento con 15 mL L^{-1} de EAS (1,229 día), aquella fue mayor, indicando que el medio con EAS presenta buenas condiciones para el cultivo. De ello, en condiciones limitantes de nitrógeno, los procesos enzimáticos son más lentos que el proceso de fotosíntesis (proceso fotoquímico), por lo tanto se ve influenciado la tasa de crecimiento y el tiempo de duplicación, y González-Rodríguez & Maestrini (1984), han demostrado que existe una relación inversa entre la tasa de crecimiento y la cantidad de nitrógeno celular; como lo encontrado por Fábregas *et al.* (1985), en donde la deficiencia de nitrógeno en las células de *Isochrysis galbana* reduce la tasa de crecimiento. Es así que a menores concentraciones de EAS se obtienen menores densidades de *Sc. acutus*, pero aun en esa limitación permite obtener densidades microalgales importantes, aunque está influenciado su composición química.

Además, Kaplan *et al.* (1986), Vieira & Klaveness (1986), Vonshak (1986), y Henriksen *et al.* (2002), dan importancia a la fuente y concentración de nitrógeno en la obtención de importantes cambios en el crecimiento y composición bioquímica de una especie microalgal; así también, el agotamiento de nitrógeno en el medio puede causar el cese de la división celular, aunque el metabolismo del carbono continúa (Beopoulos *et al.*, 2009), lo que indica que los crecimientos pueden darse en condiciones de limitación de nutrientes, pero su composición química son variadas en las diferentes concentraciones de EAS, entre 26,13 %, 24,58 % y 24,21 %, para las dosificaciones de 10, 15, y 20 mL L⁻¹ de EAS, respectivamente.

El contenido de los lípidos en las microalgas puede variar desde 1 hasta 90 % del peso seco, dependiendo de la especie y de las condiciones de cultivo (Spolaore *et al.*, 2006). Así, Gouveia & Oliveira (2009), investigaron con 6 especies de microalgas marinas y dulceacuícolas para elegir en términos de cantidad y calidad de lípidos para la producción de biocombustibles, encontrando que *Neochloris oleoabundans* (dulceacuícola) y *Nannochloropsis* sp. (marina) tienen un mayor contenido de lípidos con 29,0 % y 28,7 %, respectivamente. Asimismo, Sheehan *et al.* (1998), determinaron que *T. suecica* cultivada con medio Guillard f/2, contenía hasta 22 % de lípidos, y Azma *et al.* (2009), encontraron valores de 24,5 % y 51,9 % de lípidos, cuando son cultivadas en condiciones autotróficas y heterotróficas, respectivamente, estando influenciado por el tipo de medio, siendo posible manipular la composición química por este medio. Estos valores se encuentran cercanos a los encontrados en el presente experimento obteniendo los mayores porcentajes con 10 y 15 mL L⁻¹ de EAS con 26,13 % y 24,58 %, respectivamente, seguido del dosificado con 20 mL⁻¹ de EAS con 24,21 %.

Es conocido que la acumulación de lípidos en las células microalgales está asociada con el crecimiento poblacional, así, Chiu *et al.* (2009), encontraron que los contenidos de lípidos en células de *Nannochloropsis oculata*, en un medio limitado en nitrógeno durante la fase logarítmica, estacionaria temprana, y estacionaria final, fueron 30,8 %, 39,7 % y 50,4 % de lípidos, respectivamente, esto debido a que durante el tiempo de cultivo, el

agotamiento de nitrógeno limita o detiene la división celular, permitiendo que el metabolismo del carbono continúe, dando como resultado la desviación de carbono para la producción de lípidos (Beopoulos *et al.*, 2009).

Jiang (2002) y Huang *et al.* (2003), demostraron que la microalga *Nannochloropsis oculata* acumula más lípidos totales celulares cuando crecen en un medio deficiente en nitrógeno, por lo que la deficiencia de nitrógeno es una condición severa de estrés para las microalgas dado que es un constituyente principal de proteínas y ácidos nucleicos que son altamente abundante en las células vivas. Situación similar obtenida en las dosificadas con 10 y 15 mL L⁻¹ de EAS, que presentan un mayor porcentaje que el dosificado con 20 mL L⁻¹ de EAS, aunque en esta última el porcentaje de lípidos se ve compensado con la producción de biomasa, obteniendo los mayores contenidos de lípidos en peso seco dosificando con 15 y 20 mL L⁻¹ de EAS con 223,7 mg L⁻¹ y 203,2 mg L⁻¹, respectivamente.

Entonces queda claro que la composición bioquímica de las microalgas puede ser manipulado mediante el cambio de los parámetros físicos y químicos del medio de cultivo, tal como lo afirma Huang *et al.* (2012). Esto lo explica Sukenik *et al.* (1993), en los medios de cultivo con suficiente nitrógeno las células sintetizan principalmente proteínas para mantener el crecimiento y la división celular, pero ante condiciones de limitación de nitrógeno no hay nutrientes suficientes para mantener el crecimiento celular por lo que aumentan las sustancias de reserva, hidratos de carbono y lípidos de reserva, a expensas de la síntesis proteica, situación que sucede cuando cultivamos *Sc. acutus* con 10 y 15 mL L⁻¹ de EAS.

Queda claro que el contenido de lípidos de una microalga se debe a la calidad y cantidad de nutrientes que se emplean como medio de cultivo, como en *Dunaliella* sp. en condiciones de limitación de nitrógeno y con 1 % de CO₂, los lípidos aumentan del 1 % al 22 % (Gordillo *et al.*, 1998). El aumento del contenido de lípidos va de acuerdo con el estrés ambiental, siendo este un eficaz gatillador para la acumulación de lípidos en las células de microalgas (Hong *et al.*, 2008); que para nuestro experimento comprendió la variación de

la concentración de EAS, a menor concentración de EAS (10 mL L^{-1}) se incrementa el porcentaje de lípidos, pero con una menor densidad poblacional y biomasa; y con mayor concentración de EAS (20 mL L^{-1}) el porcentaje de lípidos es menor pero con mayor biomasa producida; siendo la concentración de 15 mL L^{-1} de EAS, el punto de balance entre porcentaje de lípidos (24,58 %) y biomasa de lípidos producida ($223,7 \text{ mg L}^{-1}$).

V. CONCLUSIONES

- ✓ El mejor crecimiento poblacional ($p < 0,05$) de *Sc. acutus* se encontró en el tratamiento dosificado con 15 mL L⁻¹ de EAS obteniendo una densidad de $36,92 \times 10^6$ cél. mL⁻¹; tasa de crecimiento poblacional de 0,564 día⁻¹; y tiempo de duplicación poblacional de 1,229 día; quedando demostrado que *Sc. acutus* puede utilizar de manera óptima los nutrientes contenidos en el medio EAS.
- ✓ Los mayores porcentajes de lípidos ($p < 0,05$) en *Sc. acutus* se presentaron con 10 y 15 mL L⁻¹ de EAS con 26,13 % y 24,58 %, respectivamente; evidenciando que *Sc. acutus* produce mayores porcentajes de lípidos a menores concentraciones de sedimento.
- ✓ Los mayores contenidos en biomasa de lípidos ($p < 0,05$) en *Sc. acutus* se encontraron en los dosificados con 15 y 20 mL L⁻¹ de EAS con 223,7 mg L⁻¹ y 203,2 mg L⁻¹, respectivamente; con lo cual se evidencia que a mayores concentraciones de EAS se obtuvieron mayores producciones de lípidos en biomasa; además, que es posible utilizar EAS para producir en buena medida lípidos a ser utilizados en otros procesos.

VI. RECOMENDACIONES

- Determinar la composición de aminoácidos de *Sc. acutus* cultivado con 10, 15 y 20 mL L⁻¹ de EAS durante 7 días en laboratorio para evaluar la posibilidad de su uso como alimento de organismos acuáticos.
- Determinar el efecto de diferentes concentraciones de extracto acuoso del sedimento de la bahía “El Ferrol” en el crecimiento poblacional y contenido de lípidos de la microalga *Scenedesmus acutus* en condiciones de aire libre, con fines de escalamiento y producción piloto de biomasa microalgal.
- Evaluar el costo de producción de utilizar diferentes concentraciones de extracto acuoso del sedimento de la bahía “El Ferrol” en el cultivo de *Sc. acutus* en condiciones de laboratorio y aire libre, con fines de producción a gran escala de biomasa microalgal.

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 submitted to the department of Fisheries Management, Bangladesh Agricultural University, Mymensingh. 71p.
- 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.
- Azma, M.; R. Rahim; R. Mohamad & A. Ariff. 2009. 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.
- Becker, E. 1994. *Biotechnology and microbiology*. Cambridge University Press, Cambridge. U.S.A. 293p.
- Beopoulos, A.; T. Chardot & J. Nicaud. 2009. *Yarrowia lipolytica*: a model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation. *Biochimie*. 91(6):692-696.

- Benedetti, A.; S. Canali & F. Lianello. 1998. La fertilizzazione organica dei suoli. En I Fertilizzanti Organici. Paolo Sequi (Ed.). Italia. Edizioni L'Informatore Agrario. 1-12pp.
- Bligh, E. & W. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 3:911-917.
- Borowitzka, M. & I. Borowitzka. 1989. Microalgal Biotechnology. Eds. Cambridge University Press. España.
- Cano, J. & J. Pisfil. 2007. Cultivo de *Tetraselmis suecica* utilizando CO₂ obtenido a partir de valvas de *Argopecten purpuratus* en condiciones de laboratorio. En: Libro de resúmenes del V Congreso Internacional de Estudiantes en Ciencias Biológicas, VIII Congreso Nacional de Estudiantes de Biología, del 4 al 9 de noviembre del 2007. Tacna, Perú.
- Chiu, S.; C. Kao; M. Tsai; S. Ong; C. Chen & C. Lin. 2009. Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration. *Bioresource Technol.* 100(2):833-838.
- CTM. 2011. Plan de recuperación ambiental de la bahía "El Ferrol" (Chimbote, Perú). Comisión Técnica Multisectorial para la Recuperación Ambiental de la Bahía El Ferrol (CTM). D.S. N° 005-2002-PE.
- Darley, W. 1982. *Algal biology: A physical approach*. In: Wilkinson J.F. ed. Basic Microbiology. Vol. 9. Blackwell Scientific Publications. 30-52pp.
- De Philippis, R. & M. Vincenzini. 1998. Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. *F.E.M.S. Microbiol. Rev.* 22:151-175.
- Donohue, T. & R. Cogdell. 2006. Microorganisms and clean energy. *Nat. Rev. Microbiol.* 4(11):800.

- Fábregas, J.; J. Abalde; C. Herrero; B. Cabezas & M. Veiga. 1984. Growth of marine microalgae *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities y nutrient concentration. *Aquaculture*. 42:207-215.
- Fábregas, J.; C. Herrero & C. Abalde. 1985. Growth, chlorophyll a and protein of the marine microalga *Isochrysis galbana* in batch cultures with different salinities and high nutrient concentrations. *Aquaculture*. **50**:1-11.
- 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 optar el Título de Biólogo Acuicultor. Universidad Nacional del Santa. Nuevo Chimbote, Perú. 62p.
- Garibay, A.; R. Vázquez-Duhalt; M. Sánchez; L. Serrano & A. Martínez. 2009. Biodiesel a partir de microalgas. *BioTecnología*. 13(3):38-61.
- Gómez, C.; S. Mendoza & C. Yzásiga. 2008. Efecto del extracto de valvas de *Argopecten purpuratus* “concha de abanico” en el crecimiento de *Tetraselmis suecica* en condiciones de laboratorio. *En*: Libro de resúmenes del VI Congreso Internacional de Estudiantes en Ciencias Biológicas, IX Congreso Nacional de Estudiantes de Biología, del 5 al 10 de noviembre del 2008. Piura, Perú.
- González, M. 2006. Aplicación e importancia de las microalgas en el tratamiento de aguas residuales. *Contactos*. 59:64-70.
- González-Rodríguez, E. & S. Maestrini. 1984. The use of some agricultural fertilizers for the mass production of marine microalgae. *Aquaculture*. 36:245-256.

- Gordillo, F.; M. Goutx; F. Figueroa & F. Niell. 1998. Effects of light intensity, CO₂ and nitrogen supply on lipid class composition of *Dunaliella viridis*. *J. Appl. Phycol.* 10(2):135-144.
- Gouveia, L. & A. Oliveira. 2009. Microalgae as a raw material for biodiesel production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36(2):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.
- Hong, Y.; H. Hu & F. Li. 2008. Physiological and biochemical effects of allelochemical ethyl 2-methyl acetoacetate (EMA) on cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 71:527-534.
- Hu, Q.; M. Sommerfeld; E. Jarvis; M. Ghirardi; M. Posewitz; M. Seibert & A. Darzins. 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstock for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J.* 54(4):621-639.
- Huang, X.; H. Zhou; C. Yuan & M. Sun. 2003. The effects of nitrogen source and concentration on the nutritional value of *Nannochloropsis oculata*. *J. Shanghai Fish Univ.* 12:113-116.
- Ipanaqué, J. & I. Paredes. 2009. Efecto del ensilado de los desechos blandos de *Argopecten purpuratus* "concha de abanico", en el crecimiento

- poblacional y contenido de lípidos totales de *Tetraselmis suecica*, en condiciones de laboratorio. Tesis para optar el Título de Biólogo Acuicultor. Universidad Nacional del Santa. Nuevo Chimbote, Perú. 65p.
- Jiang, X.M. 2002. Effects of temperatures, light intensity and nitrogen concentrations on the growth and fatty acid composition of *Nannochloropsis oculata*. *Mar. Science*. 26:9-12.
- 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. 125p.
- Marsh, J. & D. Weinstein. 1966. Simple charring method for determination of lipids. *J. Lipid Res*. 7:574-576.
- Martínez, M.; J. Jiménez & E. Farida. 1997. Influence of phosphorus concentration on the growth kinetics and stoichiometry of the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Process Biochem*. 32(8):657-664.
- Meng, X.; X. Yang; X. Xu; L. Zhang; Q. Nie & M. Xian. 2009. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy*. 34(1):1-5.
- 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.
- Merino, F.; W. Capa & G. Alayo. 2003. Efecto combinado de la fuente nitrogenada y la concentración de silicato en el crecimiento y contenido

de lípidos y carbohidratos de *Chaetoceros gracilis* en laboratorio. Informe de investigación. Universidad Nacional del Santa. Chimbote - Perú. 32p.

Mora, R.; J. Ortega & R. Moronta. 2004. Crecimiento y producción de pigmentos de la microalga nativa *Chlorella* sp. aislada de la represa de Tulé, Municipio Mara Estado Zulia, Venezuela. *Ciencia*. 12(2):117-124.

Olguin, E.; S. Galicia; O. Angulo-Guerrero & E. Hernandez. 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.

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*. En: Borowitzka M.A., L.J. Borowitzka, (eds.). *Micro-Algal Biotechnology*. New York, Cambridge University Press. 305-328pp.

Paniagua, J.; F. Buckle; C. Granados & D. Loya. Daniel. 1989. Manual de metodologías y alternativas para el cultivo de microalgas. Informe OC-89-01, CICESE. Ensenada Nuevo México, México. 67p.

Paniagua, J., F. Buckles, C. Granados & D. Loya. 1986. Manual de metodologías y alternativas para el cultivo de microalgas. CICESE. México 93p.

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.

- Rodolfi, L.; Z. Chini; N. Bassi; G. Padovani; N. Biondi; G. Bonini & M. Tredici. 2009. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low cost photobioreactor. *Biotechnol Bioeng.* 102(1):100-112.
- Rodríguez, L; J. Juscamaita & J. Vargas. 2007. Efecto del medio EM-Bokashi en el cultivo de la microalga marina *Tetraselmis suecica* K. *Ecología Aplicada.* 6:111-116.
- 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.
- Rosales, N.; J. Bermúdez; R. Moronta & E. Morales. 2007. Gallinaza: Un residual avícola como fuente alternativa de nutrientes para producción de biomasa microalgal. *Rev. Colomb. Biotechnol.* 9(1):41-48.
- Satyanarayana, K.G.; A.B. Mariano & J.V. Vargas. 2011. A review on microalgae, a versatile source for sustainable energy and materials. *Int. J. Energy Res.* 35:291-311.
- Schenk, P.M.; S.R. Thomas-Hall; E. Stephens; U.C. Marx; J.H. Mussgnug; C. Posten; O. Kruse & B. Hankamer. 2008. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenerg. Res.* 1:20-43.
- 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.
- Spolaore, P.; C. Joannis-Cassan; E. Duran & A. Isambert. 2006. Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* 101(2):87-96.

- Sukenik, A.; O. Zamora & Y. Carmeli. 1993. Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. II. *Nannochloropsis* sp. *Aquaculture*. 117:313-326.
- Steel, R. & J. Torrie. 1988. Bioestadística: Principios y procedimientos. 2da. edic. Edit. McGraw-Hill. Traducción por Ricardo Martínez. México. 622p.
- Thain, J. 1992. Growth of the algae *Isochrysis galbana* and *Tetraselmis suecica* in water and sediment elutriate samples from the German Bight. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 91:229-231.
- 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.
- Venkatamaran, L. 1986. Blue-Green algae as biofertilizer. *In: Handbook of Microalgal Mass Culture*. Ed. A. Richmond. C.R.C. Press Inc. Boca Raton, Florida. U.S.A. 455-472pp.
- 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.

VIII. ANEXOS

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

DÍA DE CULTIVO	CONTROL (HM)			EAS (mL L ⁻¹)								
				10			15			20		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
0	24,1	24,2	24,0	23,9	23,6	23,7	23,7	23,9	24,1	24,3	23,5	24,1
1	23,1	23,0	23,8	23,7	23,6	23,4	23,5	24,0	23,2	23,1	23,7	23,4
2	23,7	24,0	23,3	23,8	23,5	23,7	23,8	23,9	23,4	24,1	23,3	23,8
3	24,0	23,7	24,1	23,6	24,0	23,8	24,2	23,9	23,3	23,7	23,9	24,2
4	23,3	23,6	23,4	23,3	23,3	23,6	23,8	23,3	23,2	23,8	23,5	23,7
5	24,1	23,8	23,9	24,1	23,7	23,7	23,6	23,8	23,6	23,9	23,7	23,9
6	23,9	24,0	24,0	23,9	23,5	24,0	23,3	23,7	23,8	23,3	23,6	23,6
7	24,0	23,5	23,7	23,7	24,2	24,1	23,9	24,0	24,0	23,4	23,6	23,8

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

DÍA DE CULTIVO	CONTROL (HM)	EAS (mL L ⁻¹)		
		10	15	20
0	24,1 ±0,1a	23,7 ±0,2a	23,9 ±0,2a	24,0 ±0,4 ^a
1	23,3 ±0,4a	23,6 ±0,2a	23,6 ±0,4a	23,4 ±0,3 ^a
2	23,7 ±0,4a	23,7 ±0,2a	23,7 ±0,3a	23,7 ±0,4 ^a
3	23,9 ±0,2a	23,8 ±0,2a	23,8 ±0,5a	23,9 ±0,3 ^a
4	23,4 ±0,2a	23,4 ±0,2a	23,4 ±0,3a	23,7 ±0,2 ^a
5	23,9 ±0,2a	23,8 ±0,2a	23,7 ±0,1a	23,8 ±0,1 ^a
6	24,0 ±0,1a	23,8 ±0,3a	23,6 ±0,3a	23,5 ±0,2 ^a
7	23,7 ±0,3a	24,0 ±0,3a	24,0 ±0,1a	23,6 ±0,2 ^a

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

Anexo 3. Valores de pH en los cultivos de *Sc. acutus* con EAS y grupo control (HM).

DÍA DE CULTIVO	CONTROL (HM)			EAS (mL L ⁻¹)								
				10			15			20		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
0	7,80	7,87	7,84	7,83	7,79	7,89	7,83	7,80	7,90	7,89	7,81	7,86
1	7,94	7,94	7,93	8,02	7,83	7,89	8,36	8,13	8,15	8,27	8,26	8,28
2	8,87	8,86	8,82	8,87	8,90	8,92	9,00	9,08	8,96	8,97	9,07	8,96
3	9,08	9,03	9,08	8,97	8,92	8,91	9,06	8,87	8,90	9,08	8,93	9,03
4	8,91	8,82	8,95	8,54	8,74	8,65	8,41	7,89	8,40	8,76	8,97	8,83
5	8,96	8,92	8,89	8,30	8,62	8,80	7,97	8,51	8,08	8,37	8,23	8,49
6	8,34	8,32	8,40	8,14	8,29	8,28	8,34	8,40	8,10	8,38	8,32	8,34
7	8,41	8,21	8,45	8,18	8,14	7,99	8,27	7,92	8,35	8,09	8,30	8,28

Anexo 4. Valores de pH promedio en los cultivos de *Sc. acutus* con EAS y grupo control (HM).

DÍA DE CULTIVO	CONTROL (HM)	EAS (mL L ⁻¹)		
		10	15	20
0	7,84 ±0,04a	7,84 ±0,05a	7,84 ±0,05a	7,85 ±0,04 ^a
1	7,94 ±0,01b	7,91 ±0,10b	8,21 ±0,13a	8,27 ±0,01 ^a
2	8,85 ±0,03b	8,90 ±0,03ab	9,01 ±0,06a	9,00 ±0,06 ^a
3	9,06 ±0,03a	8,93 ±0,03a	8,94 ±0,10a	9,01 ±0,08 ^a
4	8,89 ±0,07a	8,64 ±0,10ab	8,23 ±0,30b	8,85 ±0,11 ^a
5	8,92 ±0,04a	8,57 ±0,25ab	8,19 ±0,29b	8,36 ±0,13b
6	8,35 ±0,04a	8,24 ±0,08a	8,28 ±0,16a	8,35 ±0,03 ^a
7	8,36 ±0,13a	8,10 ±0,10a	8,18 ±0,23a	8,22 ±0,12 ^a

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

Anexo 5. Densidad poblacional ($\times 10^6$ cél. mL⁻¹) de *Sc. acutus* con EAS y grupo control (HM).

DÍA DE CULTIVO	CONTROL (HM)			EAS (mL L ⁻¹)									
				10			15			20			
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	
0	2,20	2,20	2,20	2,20	2,20	2,20	2,20	2,20	2,20	2,20	2,20	2,20	2,20
1	4,23	4,02	4,81	3,37	3,49	3,50	3,57	3,69	3,52	3,62	3,73	3,67	
2	9,06	8,19	8,41	8,09	8,31	7,94	9,13	9,02	9,51	9,47	9,76	9,34	
3	17,56	18,61	18,27	19,52	20,14	19,35	21,53	22,33	21,22	21,52	21,37	20,93	
4	25,61	27,36	25,39	24,66	25,82	25,21	30,11	29,12	30,05	28,16	28,39	27,84	
5	28,77	29,73	28,31	26,94	27,31	27,87	36,16	36,72	37,89	34,34	33,76	34,11	
6	30,43	31,41	30,22	29,68	30,26	30,93	37,36	38,13	36,94	34,05	33,82	32,81	
7	32,52	31,76	30,61	31,12	30,09	31,87	37,98	38,51	37,43	33,78	34,29	33,06	

Anexo 6. Valores de la Tasa de crecimiento (μ) y Tiempo de duplicación diaria (TD) poblacional de *Sc. acutus* con EAS y grupo control (HM).

PARÁMETRO	CONTROL (HM)			EAS (mL L ⁻¹)									
				10			15			20			
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	
μ (día ⁻¹)	0,514	0,521	0,511	0,501	0,504	0,508	0,560	0,563	0,569	0,550	0,546	0,548	
TD (día)	1,349	1,330	1,356	1,384	1,375	1,364	1,238	1,231	1,218	1,260	1,270	1,265	

Anexo 7. Valores de la biomasa, absorbancia, porcentaje y biomasa de lípidos de *Sc. acutus* cultivada con EAS y grupo control (HM).

PARÁMETROS	EAS (mL L ⁻¹)											
	CONTROL (HM)			10			15			20		
Biomasa (mg x4mL⁻¹)	2,84	2,93	2,79	2,66	2,69	2,75	3,56	3,62	3,74	3,38	3,33	3,36
Biomasa (mg L⁻¹)	710,00	732,50	697,50	665,00	672,50	687,50	890,00	905,00	935,00	845,00	832,50	840,00
Absorbancia	0,342	0,365	0,329	0,381	0,372	0,403	0,471	0,478	0,517	0,456	0,432	0,443
Lípidos (%)	22,05	22,82	21,60	26,23	25,33	26,84	24,23	24,18	25,32	24,71	23,76	24,15
Lípidos (mg L⁻¹)	156,6	167,2	150,7	174,4	170,3	184,5	215,6	218,8	236,7	208,8	197,8	202,9