

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



**Efecto de diferentes concentraciones de extracto acuoso del subproducto de
yuca (*Manihot sculenta*) en el crecimiento y contenido de clorofilas de la
microalga *Tetraselmis suecica* en condiciones de laboratorio**

TESISTAS: Bach. PATRICIA ROXANA ALVAREZ VELÁSQUEZ
Bach. JENIFFER OLENKA VEGA VILLEGAS

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE BIOLOGO
ACUICULTOR

Nuevo Chimbote – Perú

2018

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



“Efecto de diferentes concentraciones de extracto acuoso del subproducto de yuca (*Manihot sculenta*) en el crecimiento y contenido de clorofilas de la microalga *Tetraselmis suecica* en condiciones de laboratorio”

TESIS PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE BIOLOGO ACUICULTOR

REVISADO Y APROBADO POR EL ASESOR DE TESIS

Dr. Juan Fernando Merino Moya

NUEVO CHIMBOTE, Perú

2018

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



“Efecto de diferentes concentraciones de extracto acuoso del subproducto de yuca (*Manihot sculenta*) en el crecimiento y contenido de clorofilas de la microalga *Tetraselmis suecica* en condiciones de laboratorio”

**TESIS PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE BIOLOGO
ACUICULTOR**

JURADO EVALUADOR

Msc. Rómulo Loayza Aguilar
Presidente

Msc. Sorayda Mendoza Espinoza
Secretaria

Dr. Fernando Merino Moya
Integrante del jurado

DEDICATORIA

A Dios, por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

*A mis **padres Rosario y Rolando**, por el esfuerzo realizado, por estar siempre presentes y darme la mano a lo largo de este camino en pos de mi bienestar.*

*A mis **abuelitos Doris y Pedro**, por estar siempre pendiente de mí y llevarme en sus oraciones siempre.*

*A mi **hermana Zayda** por el afecto y apoyo incondicional.*

Con amor.....

JENIFFER VEGA

A Dios, por haberme dado la vida y estado conmigo en cada paso que doy, cuidándome y dándome fortaleza para continuar.

A mis padres, JULIA y OSWALDO por su interminable apoyo en todo momento de mi vida y que con su sacrificio, ejemplo y consejos han sabido guiarme en mi formación académica. Por ellos he podido llegar a este punto de mi carrera, les agradezco infinitamente.

A mi hermano Jean Franco por brindarme siempre su apoyo.

A mis abuelos María y Ruperto por estar siempre para mí y brindarme su amor.

PATRICIA ALVAREZ

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional del Santa por permitirnos ser parte de ella y brindarnos la preparación necesaria para el desarrollo de nuestra carrera.

A todos nuestros profesores de la Escuela Académico Profesional de Biología en Acuicultura, por su valiosa contribución en nuestra formación profesional, por habernos inculcado y brindado conocimientos, valores morales y experiencias, dándonos los últimos conocimientos para nuestro buen desenvolvimiento.

A nuestro asesor Dr. Fernando Merino Moya, por el tiempo brindado y los conocimientos transmitidos para poder realizar con éxito el desarrollo del presente proyecto.

Un agradecimiento especial a los docentes William Capa Robles, Rómulo Loayza y Sorayda Mendoza por la amistad, colaboración, paciencia y tiempo otorgado para que este trabajo culmine de manera exitosa.

ÍNDICE

I. Introducción	16
II. Materiales y métodos	21
2.1. Localización del experimento	21
2.2. Material experimental	21
2.2.1. Material biológico	21
2.2.2. Tratamiento del agua de cultivo	21
2.2.3. Preparación de los inóculos de <i>T. suecica</i>	22
2.2.4. Determinación del crecimiento poblacional de <i>T. suecica</i>	23
2.3. Preparación de los medios de cultivos	24
2.3.1. Medio de cultivo Guillard	24
2.3.2. Medio extracto acuoso de residuos de <i>M. esculenta</i>	25
2.3.3. Análisis químico del: extracto acuoso del subproducto de <i>M. esculenta</i>	27
2.4. Diseño experimental	27
2.5. Acondicionamiento de las unidades experimentales	28
2.6. Determinación de clorofilas α y β de <i>T. suecica</i>	29
2.7. Análisis estadístico	32
III. Resultados	33
3.1. Crecimiento poblacional de <i>T. suecica</i>	33
3.2. Tasa de crecimiento y duplicación poblacional	35
3.3. Contenido de clorofila α y β	37
3.4. Parámetros ambientales del cultivo <i>T. suecica</i>	39
3.4.1. pH de los cultivos	39
3.4.2. Temperatura	40

IV. Discusión	42
V. Conclusiones	48
VI. Recomendaciones	50
VII. Referencias Bibliográficas	51
VIII. Anexos	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1. Composición química del medio Guillard (F/2).	24
Tabla N° 2. Análisis químico del Extracto acuoso del subproducto de <i>M. esculenta</i> (EAM).	27
Tabla N°3. Preparación de las unidades experimentales.	28
Tabla N° 4. Crecimiento poblacional (cel.ml^{-1}) de la micro alga <i>T. suecica</i> , cultivada con diferentes concentraciones de extracto acuoso de yuca <i>Manihot esculenta</i> en condiciones de laboratorio.	34
Tabla N°5. Tasa de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación diaria (TD) de los cultivos de <i>T. suecica</i> , dosificados con EAM.	36
Tabla N°6. Contenido de clorofilas α y β en la micro alga <i>T. suecica</i> , dosificados con diferentes concentraciones de EAM.	37
Tabla N°7. Valores del pH de los cultivos de <i>T. suecica</i> , dosificados con diferentes concentraciones de EAM.	39
Tabla N°8. Valores de la temperatura de los cultivos de <i>T. suecica</i> , dosificados con diferentes concentraciones de EAM.	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N°01. Flujograma de la preparación del extracto acuoso de <i>M. esculenta</i> para el cultivo de <i>T. suecica</i> .	26
Figura N°02. Distribución de las unidades experimentales en los cultivos microalgales de <i>T. suecica</i> .	29
Figura N°03. Flujograma para determinar las clorofilas α y β de <i>T. suecica</i> . en los cultivos microalgales.	30
Figura N°04. Crecimiento poblacional (cel.ml^{-1}) de la microalga <i>T. suecica</i> , cultivada con diferentes concentraciones de extracto acuoso de yuca <i>Manihot sculenta</i> en condiciones de laboratorio.	35
Figura N°05. Variación de la tasa de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación diaria (TD) de los cultivos de <i>T. suecica</i> , dosificados con EAM.	36
Figura N°06. Contenido de clorofilas α y clorofila β en la micro alga <i>T. suecica</i> , dosificados con diferentes concentraciones de EAM.	38
Figura N°07. Variaciones del pH en los cultivos <i>T. suecica</i> en condiciones de laboratorio.	40
Figura N°08. Variación de la temperatura en los cultivos de <i>T. suecica</i> .	41

INDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. Densidad poblacional (10^6 cel. mL^{-1}) de <i>T. suecica</i> con medio de cultivo EAM.	60
ANEXO 2. Valores de pH en los cultivos de <i>T. suecica</i> con medio de cultivo EAM y grupo Control.	60
ANEXO 3. Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) en los cultivos de <i>T. suecica</i> dosificados con EAM y grupo Control (Guillard f/2).	61
ANEXO 4. Contenido de clorofila α y β al quinto día de cultivo de <i>T. suecica</i> .	61
ANEXO 5. Coloración de cada unidad experimental en el día 5 de cultivo de <i>T. suecica</i> : A) Control, B) 1 mgL^{-1} , C) $1,5 \text{ mgL}^{-1}$, D) 2 mgL^{-1} de EAM.	62
ANEXO 6. Fotografía del análisis químico del extracto acuoso del subproducto de <i>M. esculenta</i>	63

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo determinar el efecto de tres dosificaciones (1.0, 1.5, 2.0 g mL⁻¹) de la solución acuosa de glucosa obtenida de residuos de *Manihot esculenta* “yuca” en el crecimiento y contenido de clorofila de la microalga *Tetraselmis suecica* en condiciones de laboratorio, se empleó tres unidades experimentales (1.0, 1.5, 2.0 g mL⁻¹ de extracto acuoso de *M. esculenta*) y un tratamiento control (medio de cultivo Guillard, 1975), con tres repeticiones respectivamente. La toma de muestra se realizó durante 5 días consecutivos. Los mayores crecimientos poblacionales de *T. suecica*, fueron encontrados en el quinto día de cultivo en el tratamiento experimental dosificado con 1.5 g mL⁻¹ de EAM (extracto acuoso de *M. esculenta*) a diferencia de los demás tratamientos experimentales incluidos el tratamiento control. Estas diferencias se mantuvieron hasta el final del experimento, alcanzando los más altos valores del crecimiento poblacional (131.133 x 10⁶ cel mL⁻¹) en el día 5, seguido del tratamiento control (118,633 x 10⁶ cel mL⁻¹), del tratamiento experimental dosificado con 1 g mL⁻¹ (117,867 x 10⁶ cel mL⁻¹), y del tratamiento experimental dosificado con 2 g mL⁻¹ (111,367 x 10⁶ cel mL⁻¹).

El mayor contenido de clorofila de clorofila “α” se pudo observar en al menos una de la concentraciones de EAM y en el tratamiento control, siendo el tratamiento experimental dosificado con 1,5 g mL⁻¹ de EAM el de mayor contenido de clorofila “α” (5,087 ug mL⁻¹); Asimismo, el contenido de clorofila “β” tiene diferencia significativa entre al menos una de la concentraciones de EAM y en el tratamiento control, siendo el tratamiento experimental dosificado con 1,5 g mL⁻¹ el de mayor contenido de clorofila “β” (3,160 ug mL⁻¹).

Se concluye que el mejor tratamiento en la experiencia realizada fue el tratamiento con 1,5 g mL⁻¹ que alcanzó valores estadísticos significativos mejores que el tratamiento control que

estuvo dosificado con medio Guillard afirmando el uso de este como medio de cultivo alternativo de bajo costo para cultivo de microalgas.

Frases claves

Microalgas, *Tetraselmis suecica*, crecimiento poblacional, clorofila, *Manihot esculenta*.

ABSTRACT

The objective of this study was to determine the effect of three dosages, (1.0, 1.5, 2.0 gmL^{-1}) of the aqueous glucose solution obtained from *Manihot esculenta* "cassava" residues on the growth and chlorophyll content of the microalga *Tetraselmis suecica* in laboratory conditions, three experimental units were used (1.0, 1.5, 2.0 gmL^{-1} aqueous extract of *M. esculenta*) and a control treatment (Guillard culture medium, 1975), with three repetitions respectively. The sample was taken for 5 consecutive days. The highest population growths of *T. suecica* were found on the fifth day of cultivation in the experimental treatment dosed with 1.5 gmL^{-1} of EAM (aqueous extract of *M. esculenta*) unlike the other experimental treatments including control treatment. These differences were maintained until the end of the experiment, reaching the highest values of population growth ($131,133 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$) on day 5, followed by control treatment ($118,633 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$), of the experimental treatment dosed with 1 gmL^{-1} ($117,867 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$), and from the experimental treatment dosed with 2 gmL^{-1} ($111,367 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$).

The highest chlorophyll content of chlorophyll "a" could be observed in at least one of the EAM concentrations and in the control treatment, with the experimental treatment dosed with 1.5 gmL^{-1} of EAM having the highest chlorophyll content "a" (5.087 ug mL^{-1}); Likewise, the content of chlorophyll "b" has a significant difference between at least one of the concentrations of EAM and in the control treatment, with the experimental treatment dosed with 1.5 gmL^{-1} having the highest chlorophyll content "b" ($3,160 \text{ ug mL}^{-1}$).

It is concluded that the best treatment in the experience was the treatment with 1.5 g mL⁻¹ that reached significant statistical values better than the control treatment that was dosed with Guillard medium affirming the use of this as a low cost alternative culture medium for the cultivation of microalgae.

Keywords

Microalgae, *Tetraselmis suecica*, population growth, chlorophyte, *Manihot esculenta*.

I. INTRODUCCIÓN

Las microalgas son organismos fotosintéticos que requieren del acondicionamiento de diferentes factores ambientales para su crecimiento como la luz, temperatura, CO₂, pH, fotoperiodo y nutrientes, usando moléculas orgánicas y micronutrientes como catalizadores (Becker, 1994; Hu *et al.*, 2008), a fin de producir lípidos, proteínas y carbohidratos en grandes cantidades en tiempos cortos (Palomino *et al.*, 2010).

En los últimos años, se ha mostrado un gran interés por el cultivo de microalgas de forma intensiva, debido a la necesidad de obtener alimento vivo considerando su alto valor alimenticio, su tamaño, digestibilidad y fácil captura para las crías de larvas y estadios juveniles de moluscos, crustáceos y peces (Rodríguez *et al.*, 2007), motivando la atención mundial hacia el uso, como medio de cultivo, de materiales orgánicos de diversos orígenes (Benedetti *et al.*, 1998). Según Knud-Hansen (1998) el uso de desechos animales tiene una larga historia como fuente de fósforo, nitrógeno y carbono para el crecimiento y la producción de alimento natural, en consecuencia, la generación de nuevas metodologías y desarrollo tecnológico para la producción masiva de microalgas, mediante el uso de medios de cultivos alternativos. Una alternativa a los medios de cultivo tradicionales ya estandarizados de cultivo inorgánico costoso (puros y químicamente definidos, como el medio Guillard) son los sustratos orgánicos, mayormente subproductos de otras industrias y en cuya composición se encuentran fuentes de C, N, P (Fábregas *et al.*, 2001).

Las microalgas están representadas por una gran variedad de organismos, que además de aportar oxígeno, tienen contenidos nutritivos importantes tales como polisacáridos, aminoácidos, enzimas y proteínas (Capa, 2010).

El género *Tetraselmis* pertenece a la división Chlorophyta, clase Chrolophyceae, orden Tetraselmiales habita en cuerpos de agua de mar en forma solitaria o en colonias formando cenobios bajo condiciones adecuadas de crecimiento como temperatura 26 ± 2 °C, pH 6,5-9,5 (Garibay *et al.*, 2009), además esta microalga se caracteriza por tener un nivel muy alto en lípidos y su capacidad de soportar elevadas concentraciones de nutrientes, poseer actividad metabólica elevada y resistir variaciones ambientales que la hacen sobrevivir en ambientes extremos (Andrade, 2009), el pH mantiene influencia sobre una gran cantidad de procesos bioquímicos asociados al crecimiento y el metabolismo de las microalgas, incluyendo la ionización de metabolitos bioquímicos, solubilidad, además de la biodisponibilidad de CO₂ y nutrientes (García *et al.*, 2000), incrementado los niveles proteínas, lípidos y carbohidratos, α -tocoferol (Vit. E), carotenoides (como fucoxantina y β -caroteno) y como toda planta verde, clorofila.

En cuanto al contenido de los pigmentos, Serpa & Calderón (2006), sustentan que la cantidad de clorofila se correlaciona positivamente con la densidad o biomasa celular y que las fuentes de nitrógeno promueven la acumulación de clorofila, lo que a su vez se considera como un indicador del crecimiento poblacional; hecho posiblemente fundamentado en que los niveles mayores de clorofila promuevan una mayor producción de oxígeno y posteriormente la producción de radicales oxidantes.

En acuicultura, unos de los factores limitantes para su desarrollo son la obtención y producción de alimentos que sustituya todos los requerimientos para las especies en cultivo y que resulten económicos (Torretera & Tacon, 1989), por lo que la producción de biomasa microalgal sería de gran importancia por su rápida obtención y buena calidad nutricional, por esto los medios de cultivo alternativo vienen siendo evaluados para el cultivo de microalgas, entre ellos, están los efluentes industriales y agrícolas, que posibilitan la reutilización del residuo orgánico, convirtiéndolo en biomasa enriquecida desde el punto de vista nutricional, ya que puede ser utilizada como complemento alimenticio, para la acuicultura y otras áreas de producción (Bertoldo *et al.*, 2006).

Actualmente, la obtención de pigmentos como la clorofila cobra mucha importancia por sus múltiples aplicaciones en la salud humana, por el alivio de los problemas gastrointestinales, anemias y mejorías en el aparato reproductor femenino (Chernomorsky & Segelmam, 1988), por lo tanto, la biotransformación en biomasa algal adquiere mucho interés por: a) mitigar sus impactos negativos, b) disminución de los costos de producción algal y c) obtención de pigmentos clorofilianos.

Manihot esculenta, es una raíz tropical con alto contenido de almidón que se cultiva principalmente en la amazonia peruana, cuyas raíces poseen 35% de carbohidratos, que concentra la mayor área de producción (67%) con rendimiento promedio anual del país de 10.7 t/ha⁻¹ (Montoya, 2004).

Se considera que la raíz de la yuca es la segunda fuente de almidón, después del maíz, y su obtención se realiza mediante tecnologías sencillas (Chuzel, 1990).

El almidón de *M. esculenta*, por su contenido de carbono orgánico, puede utilizarse en el cultivo de microalgas de nutrición heterotrófica como *Scenedesmus* para la generación de biomasa y pigmentos a bajo costo, debido a la gran disponibilidad como residuos en los centros de procesamiento (Chuzel, 1989).

En el año 2016 se alcanzó 12 327 toneladas de producción nacional de *M. esculenta* “yuca”, si consideramos que los residuos (extremos sobrantes de la yuca no utilizados en el consumo humano y actualmente desechados) generados durante su producción fluctúan entre el 1%, se podría disponer de 12 327 t de tales residuos como medio de cultivo alternativo para la producción de biomasa algal con la finalidad de sustituir medios inorgánicos de elevados costos (Webb & Fernández-Baca, 2016).

La extracción del almidón de yuca consiste fundamentalmente en romper las paredes celulares para liberar los gránulos de almidón, la adición de agua y filtración sirven para separar las partículas de almidón suspendidas en el medio líquido de las fibras vegetales (Alarcón & Dufour, 1989), obtenido el almidón se procede a la aplicación de calor de obtener glucosa para ser utilizada en los cultivos algales como portador de carbono orgánico.

Ensayos previos realizados con solución acuosa de glucosa obtenida del almidón de yuca, nos permite plantear la siguiente hipótesis: si utilizamos dosificaciones de 1.0, 1.5 y 2.0 g mL⁻¹ de extracto acuoso en el cultivo de *T. suecica* se obtendrá mayor tasa de crecimiento y contenido de clorofila de la microalga con la concentración de 1.5 g mL⁻¹.

OBJETIVOS

- **OBJETIVO GENERAL:**

Determinar el efecto de tres dosificaciones 1.0, 1.5 y 2.0 g mL⁻¹ de la solución acuosa del subproducto de *M. esculenta*, “yuca”, en el crecimiento y contenido de clorofila de la microalga *T. suecica* en condiciones de laboratorio.

- **OBJETIVOS ESPECIFICOS:**

Determinar el crecimiento poblacional y el contenido de clorofila de *T. suecica* cultivada con tres dosificaciones de la solución acuosa del subproducto de *M. esculenta*, “yuca” en condiciones de laboratorio.

II. MATERIAL Y METODO

2.1. LOCALIZACIÓN DEL EXPERIMENTO

Se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivos de Especies Auxiliares del Departamento Académico de Biología, Microbiología y Biotecnología de la Universidad Nacional de la Santa, localidad de Nuevo Chimbote, provincia de la Santa, departamento de Ancash.

2.2. MATERIAL EXPERIMENTAL

2.2.1. Material biológico

La microalga *T. suecica* fue obtenida del Laboratorio de Evaluación de Recursos Acuáticos y Cultivos de Especies Auxiliares de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional del Santa, la que fue mantenida en botellas de plástico de 2L con medio Guillard (Guillard, 1975) e iluminados constantemente con un fluorescente de 40 w, y agitados con Blower de 1/2 HP hasta su utilización en el experimento.

2.2.2. Tratamiento del agua de cultivo

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 de Santa (Ancash, Perú) almacenado en un recipiente de 100 L para su posterior tratamiento, se dejó sedimentar por 48 h y luego

de ser filtrado con malla Nyltal de 10 μm se le agregó 0,5 ml de hipoclorito de sodio por cada litro.

Después de 24 horas fue neutralizado con 0,5 ml de tiosulfato de sodio por litro de agua y aireado durante 1 h para eliminar el cloro residual.

2.2.3. Preparación de los inóculos de *T. suecica*

- **Fase cultivo inicial:** Los inóculos microalgales se iniciaron en 4 matraces de 250 mL de capacidad los cuales contenían 200 mL de agua de mar esterilizada y 50 mL de inóculo microalgal y mantenidos durante 5 días con aireación constante (2 mL min^{-1}) proporcionado por un Blower de 1/2 HP, el flujo de aire fue determinado con flujómetro Cole Parmer ($\pm 10 \text{ ml/min}^{-1}$) y la iluminación continua suministrada por dos fluorescentes de luz blanca de 40 w colocados a 10 cm de las botellas de cultivos microalgales, proporcionando 8000 lux de intensidad luminosa medidos con luxómetro digital Hanna ($\pm 0,1 \text{ lux}$).
- **Fase cultivo intermedio:** Se realizaron diluciones de los inóculos iniciales en matraces de 500 mL manteniendo iguales condiciones de iluminación (8000 lux) y aireación (2 mL/min^{-1}) con la finalidad de ser utilizados como inóculos de los cultivos experimentales.
- **Fase experimental:** Todos los cultivos experimentales fueron inoculados con suficiente volumen procedente de cultivos contenidos en recipientes de 500 mL. Los cultivos de *T. suecica* fueron mantenidas con el medio f/2 de Guillard (1975).

2.2.4. Determinación del crecimiento poblacional de *T. suecica*

El crecimiento poblacional de los cultivos se determinó mediante conteos celulares diarios (cel mL^{-1}) utilizando una cámara Neubauer y un microscopio binocular marca Olympus y las observaciones microscópicas fueron realizadas a 40x de aumento durante los días que duró el experimento. Los recuentos celulares fueron expresados a través de graficas de curvas de crecimiento poblacional para precisar el final de la fase logarítmica, que nos permitió determinar la tasa de crecimiento poblacional por día (μ) y el tiempo de duplicación diaria (TD) aplicando las fórmulas siguientes (Guillard, 1975)

$$\mu = \frac{\ln(N_f/N_0)}{T_f - T_0} \quad \dots (1)$$

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

Donde N_0 y N_f corresponden al número de células por ml en los tiempos T_0 y T_f respectivamente

2.3. PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

2.3.1. Medio de cultivo Guillard

El medio Guillard f/2 (Guillard, 1975), preparada con sales minerales conteniendo los principales nutrientes (Tabla 1), fue utilizado para la generación de los inóculos y los cultivos control de *T. suecica* durante la experiencia.

Tabla 1: Composición química del medio f/2 de Guillard (Guillard, 1975).

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN (mg L ⁻¹)
NUTRIENTES MAYORES	
NaNO ₃	75.0
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	5.0
NH ₄ CL	26.5
MICRONUTRIENTES	
Na ₂ EDTA	4.36
FeCl ₃ .6H ₂ O	3.15
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.01
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.022
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.01
MnCl ₂ .4H ₂ O	0.18
Na ₂ MnO ₄ .2H ₂ O	0.006
VITAMINAS	
Tiamina	0.1
Biotina	0.5
Cianocobalina	0.5

2.3.2. Medio extracto acuoso de residuos de *M. esculenta* (EAM)

La preparación del medio EAM consistió en lavar, pelar y rallar la yuca para liberar los gránulos de almidón, resultando de esta manera 100g de yuca producto del rallado, el cual tuvo que ser exprimido con la ayuda de un colador para obtener 30.5 mL de extracto puro de yuca que fue aforado a 100 mL con agua de caño. Esta solución fue llevada a cocción a fuego lento por un espacio de 3 min para disolver los polímeros de la amilopectina y, por rompimiento de los enlaces glucosídicos, obtener moléculas de glucosa demostrada mediante la prueba de Fehling, (Loren, 2010) para ello se utilizó 10 mL de muestra a la cual se le aplicó los reactivos de Fehling A y Fehling B obteniendo como resultado una coloración naranja luego de colocar la muestra a calor, lo que indicó la presencia de azúcares reductores (glucosa). Obteniendo como resultado final 100 mL de solución acuosa (EAM), que contiene 0.305 g/mL del extracto de yuca que fue utilizada como patrón en el cultivo microalgal, y considerando la total transformación del almidón 20% en glucosa, se concluye que 1 mL de solución acuosa (EAM) aportará 0.061 g/ml de glucosa por litro de cultivo.

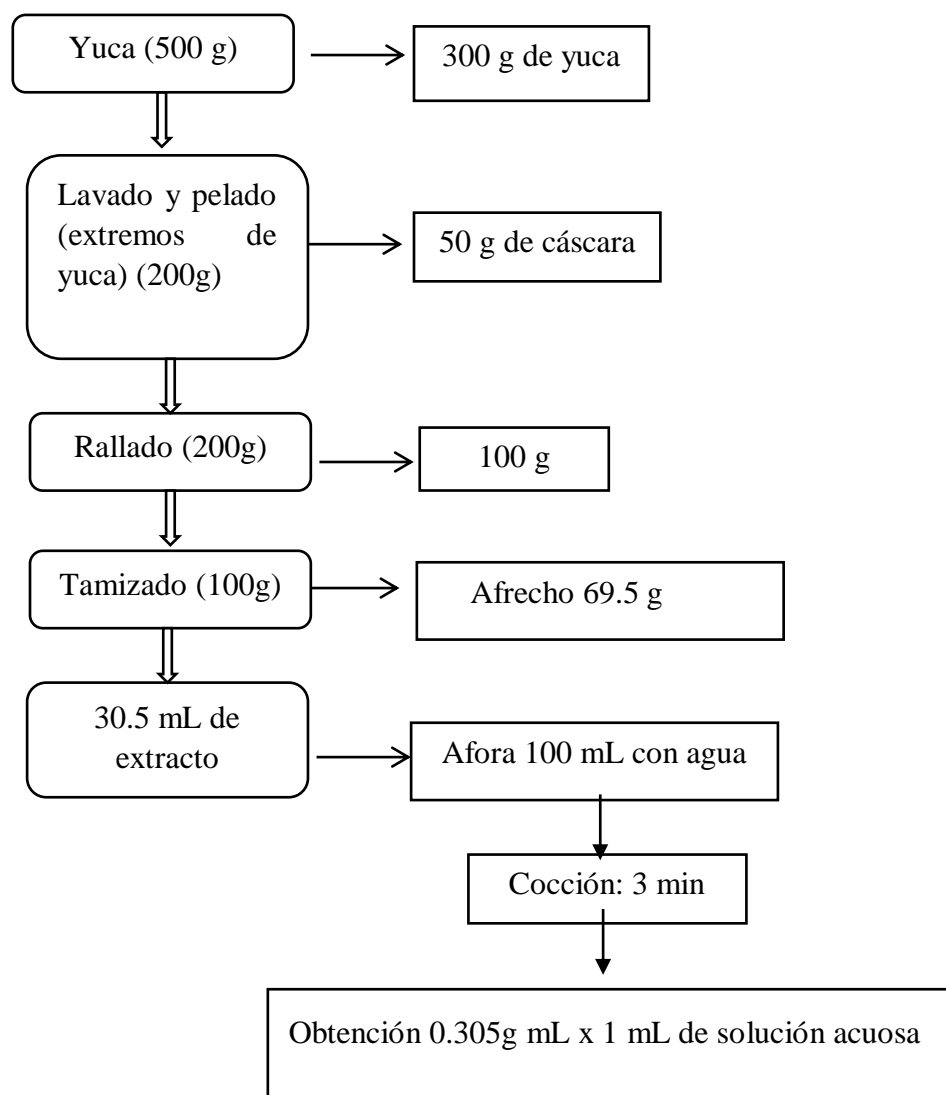


Fig. 1. Balance de materia para la preparación del extracto acuoso de *M. esculenta* para el cultivo de *T. suecica*.

2.3.3. Análisis químico del extracto acuoso del subproducto de *M. esculenta*

El contenido de los componentes del extracto acuoso fue analizado en el Laboratorio COLECBI S.A.C., determinándose la cantidad de almidón, humedad, proteínas, calcio, fosforo (Tabla 2)

Tabla 2: Análisis químico del extracto acuoso del subproducto de *M. esculenta* (EAM).

Componentes	Porcentaje (%)
Almidón	20
Humedad	34
Proteínas	18
Calcio	12
Fósforo	16

Fuente: Laboratorio COLECBI (2017)

2.4. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizó el diseño experimental estímulo creciente (Steel & Torrie, 1992) con tres tratamientos experimentales y un tratamiento control. Cada tratamiento con tres repeticiones respectivamente. Los cultivos microalgales iniciaron con un promedio de 0.12×10^6 cél mL⁻¹.

Tabla 3: Preparación de las unidades experimentales.

Diseño experimental

Tratamientos	Repeticiones	Medio de cultivo
TC	r ₁ - r ₂ - r ₃	1 mL L ⁻¹ Guillard f/2
T1	r ₁ - r ₂ - r ₃	1 gmL ⁻¹ de EAM
T2	r ₁ - r ₂ - r ₃	1.5 gmL ⁻¹ de EAM
T3	r ₁ - r ₂ - r ₃	2 gmL ⁻¹ de EAM

2.5. ACONDICIONAMIENTO DE LAS UNIDADES EXPERIMENTALES

Se utilizaron 12 botellas plásticas de 1000 mL. de capacidad, las cuales contenían 700 mL de agua de mar esterilizada y 300 mL de inóculo microalgal, se inició los cultivos con 0.12×10^6 cél mL⁻¹ determinados por conteos microscópicos mediante una cámara Neubauer. El tratamiento control y sus repeticiones fueron dosificados con medio f/2 de Guillard y los tratamientos experimentales junto a sus repeticiones dosificados con 1,0; 1.5 y 2,0 g mL⁻¹ de la solución patrón EAM (Tabla 3, fig. 2).

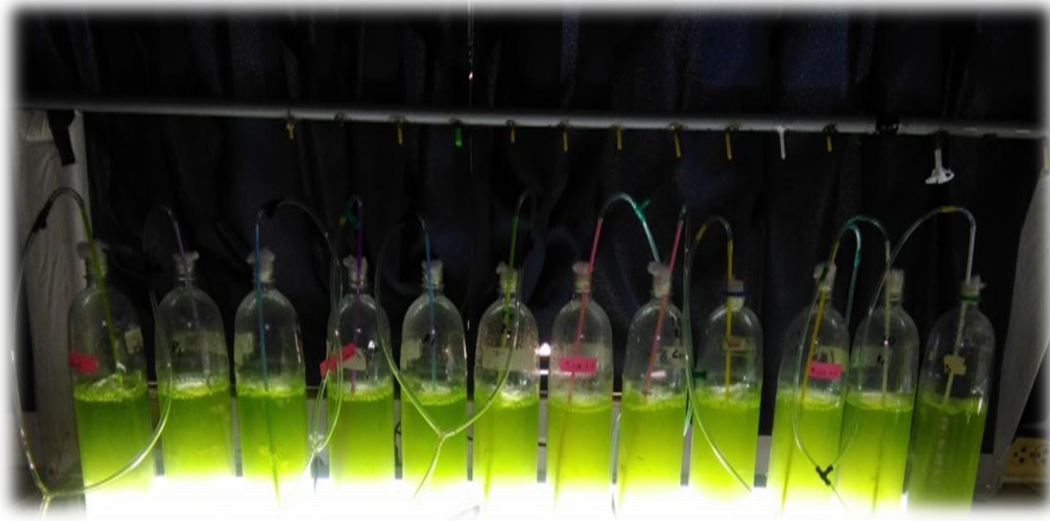


Fig. 2. Distribución de las unidades experimentales en los cultivos microalgales de *T. suecica*.

2.6. DETERMINACIÓN DEN CLOROFILA α y β DE *T. suecica*

La determinación de clorofila α y β de *T. suecica*, se realizó al final de la fase logarítmica del crecimiento de los cultivos según la metodología de Ritchie (2008), y siguiendo el siguiente flujograma (Fig. 3).

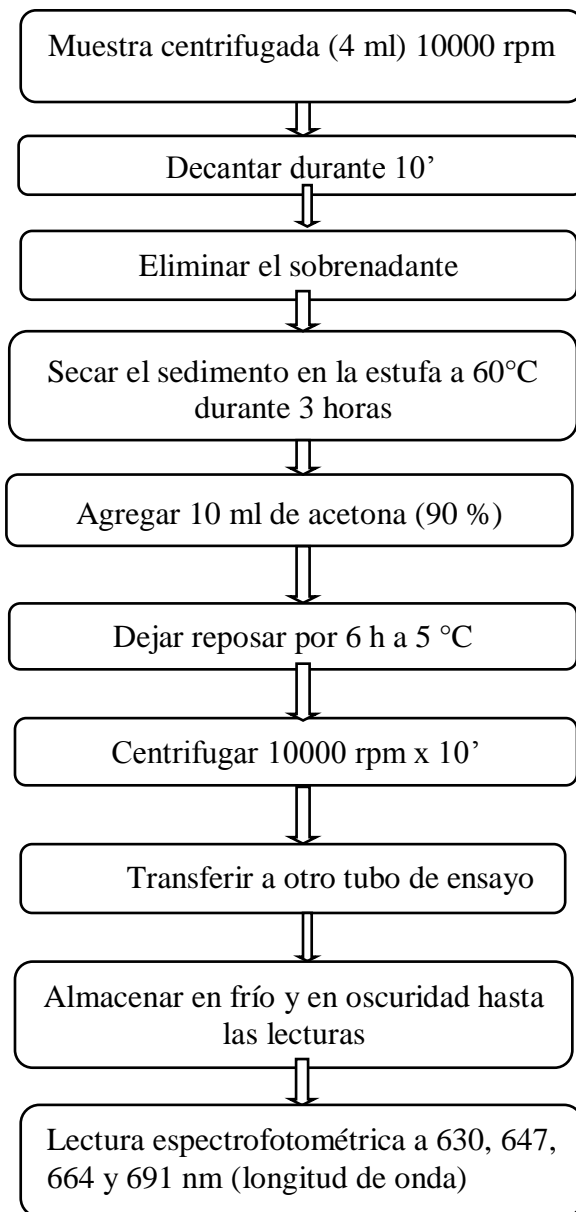


Fig. 3: Flujograma para determinar clorofila α y β de *T. suecica* en los cultivos microalgales.

El procedimiento consistió en retirar 4 ml de suspensión algal de cada cultivo y luego de centrifugarlos a 10000 rpm por 10 min se eliminó el sobrenadante y el sedimento fue secado mediante la estufa a 60 °C durante de 3 h. Para la extracción de clorofila, el siguiente paso consistió en añadir 10 ml de acetona al 90 % a cada una de las muestras que luego de ser agitadas vigorosamente fueron mantenidas en refrigeración a 5 °C por 6 h, finalmente se realizó un segundo centrifugado a 10000 rpm x 10 min, y el sobrenadante fue transferido a tubos de ensayo y mantenido en oscuridad a 5 °C hasta sus lecturas espectrofotométricas.

Las lecturas de las absorbancias de cada muestra se realizaron mediante un espectrofotómetro marca Turner Barstearnd Internacional a longitudes de onda de 630, 647, 664 y 691 nm necesarias para calcular los contenidos de la clorofila α y β ($\mu\text{g mL}^{-1}$), además se utilizó las siguientes fórmulas (Ritchie, 2008).

$$CL \alpha (\mu\text{g mL}^{-1}) = -0,3319 A_{630} - 1,7485 A_{647} + 11,9442 A_{664} - 1,4306 A_{691}$$

$$CL \beta (\mu\text{g mL}^{-1}) = -1,2825 A_{630} + 19,8839 A_{647} - 4,8860 A_{664} - 2,3416 A_{691}$$

El porcentaje (Pc) de clorofila α y β fue calculado según la fórmula propuesta por Ritchie (2008):

$$PC (\%) = \frac{(CL \times V)/1000}{M} \times 100$$

Donde:

CL: Contenido de clorofilas en la muestra ($\mu\text{g ml}^{-1}$).

V: Volumen de extracción (10 ml).

M: Peso de muestra microalgal (mg x 4 ml)

2.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos del crecimiento y el contenido de clorofila fueron sometidos al análisis de varianza (ANOVA) para establecer diferencias entre sus promedios, luego se utilizó la prueba de Tukey HSD para establecer el mejor promedio, en todos los casos se aplicó un nivel de significancia de 0,05.

El tratamiento estadístico se desarrolló utilizando los programas, Microsoft Office Excel 2010 y SPSS 20.0 para Microsoft Windows 7.

III. RESULTADOS

3.1. CRECIMIENTO POBLACIONAL DE *T. suecica*

Los incrementos poblacionales diarios de *T. suecica* son presentados en la tabla 4 y fig. 4, observándose un crecimiento lineal, en los dos primeros días no hubo diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento control y tratamientos experimentales dosificados con EAM.

En el tercer día se pudo observar diferencias significativas entre el tratamiento experimental dosificado con 1,5 g mL⁻¹ de EAM y los demás tratamientos incluido el tratamiento control, estas diferencias se mantuvieron hasta el final del experimento, alcanzando los más altos valores del crecimiento poblacional (131.133 x 10⁶ cel mL⁻¹) en el día 5, seguido del tratamiento control (118,633 x 10⁶ cel mL⁻¹), luego del tratamiento dosificado con 1 g mL⁻¹ (117,867 x 10⁶ cel mL⁻¹), y finalmente del tratamiento dosificado con 2 g mL⁻¹ (111,367 x 10⁶ cel mL⁻¹) (Tabla 4).

Tabla 4: Crecimiento poblacional (cel. mL⁻¹) de la microalga *T. suecica*, cultivada con diferentes concentraciones de extracto acuoso de yuca *Manihot esculenta* en condiciones de laboratorio.

Días	Tratamientos			
	Control (Guillard f/2)	1 gmL ⁻¹ de EAM	1,5 gmL ⁻¹ de EAM	2,0 gmL ⁻¹ de EAM
1	0.120 ± 0,000 ^a	0.120 ± 0,000 ^a	0.120 ± 0,000 ^a	0.120 ± 0,000 ^a
2	34,720 ± 6,420 ^a	47,367 ± 8,003 ^b	53,167 ± 6,673 ^b	41,867 ± 3,235 ^b
3	72,233 ± 3,625 ^a	67,500 ± 3,148 ^a	88,833 ± 10,001 ^b	62,567 ± 5,529 ^a
4	87,367 ± 6,700 ^{ab}	73,967 ± 7,077 ^a	98,200 ± 12,401 ^b	78,300 ± 9,554 ^{ab}
5	118,633 ± 3,600 ^{ab}	117,867 ± 7,047 ^{ab}	131,133 ± 7,507 ^b	111,367 ± 0,737 ^a

Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas, con un nivel de 0.05.

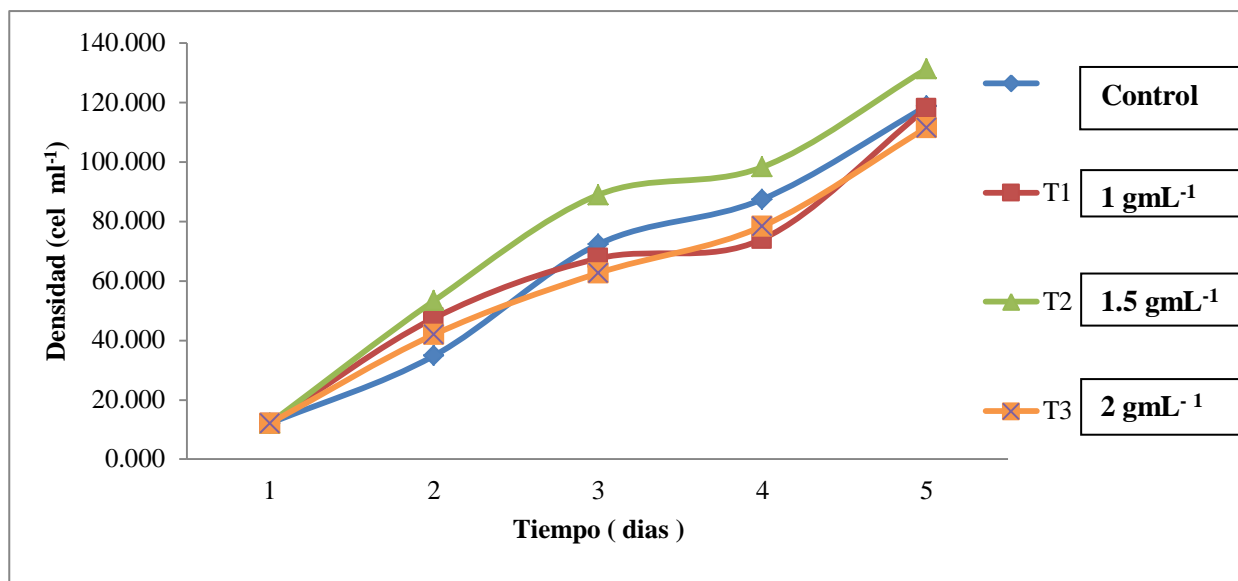


Fig. 4: Crecimiento poblacional (cel. mL⁻¹) de la microalga *T. suecica*, cultivada con diferentes concentraciones de extracto acuoso de *M. esculenta* “yuca” en laboratorio.

3.2. TASA DE CRECIMIENTO Y TIEMPO DE DUPLICACIÓN POBLACIONAL

La tasa de crecimiento (μ) de *T. suecica* en los tratamientos experimentales dosificados con EAM y en el control dosificado con Guillard f/2 demostró que al quinto día de cultivo, los tratamientos dosificados con 1 y 1.5 g mL⁻¹ de EAM fueron los que presentaron las tasas más altas de crecimiento con 0,458 día⁻¹ y 0,478 día⁻¹, respectivamente, y el menor promedio significativo ($p < 0,05$) se pudo apreciar en el tratamiento dosificado con 2 g mL⁻¹ de EAM (0,446 día⁻¹); asimismo, el tiempo de duplicación poblacional (TD) fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en el tratamiento experimental dosificado con 1.5 g mL⁻¹ de EAM (0,478 día) y menores en los tratamientos dosificados con 1 g mL⁻¹ y 2 g mL⁻¹ de EAM con promedios significativos ($p < 0,05$) de 1.513 día y 1.554 día, respectivamente (Tabla 5, fig. 5).

Tabla 5: Tasa de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación diaria (TD) de los cultivos de *T. suecica*, dosificados con EAM durante 5 días

Parámetro	Tratamientos			
	Control	1 g mL ⁻¹ de EAM	1.5 g mL ⁻¹ de EAM	2 g mL ⁻¹ de EAM
N _o	0.120 ± 0,000 ^a	0.120 ± 0,00 ^a	0.120 ± 0,000 ^a	0.120 ± 0,000 ^a
N _f	118,633 ± 3,600 ^{ab}	117,867 ± 7,047 ^{ab}	131,133 ± 7,507 ^b	111,367 ± 0,737 ^a
μ (día ⁻¹)	0.453 ± 0.006 ^a	0.458 ± 0.008 ^a	0.478 ± 0.011 ^a	0.446 ± 0.001 ^b
TD (día)	1.530 ± 0.097 ^a	1.513 ± 0.037 ^a	1.450 ± 0.034 ^a	1.554 ± 0.059 ^b

Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas, con un nivel de 0.05.

Donde N_o y N_f corresponden al número de células por ml.

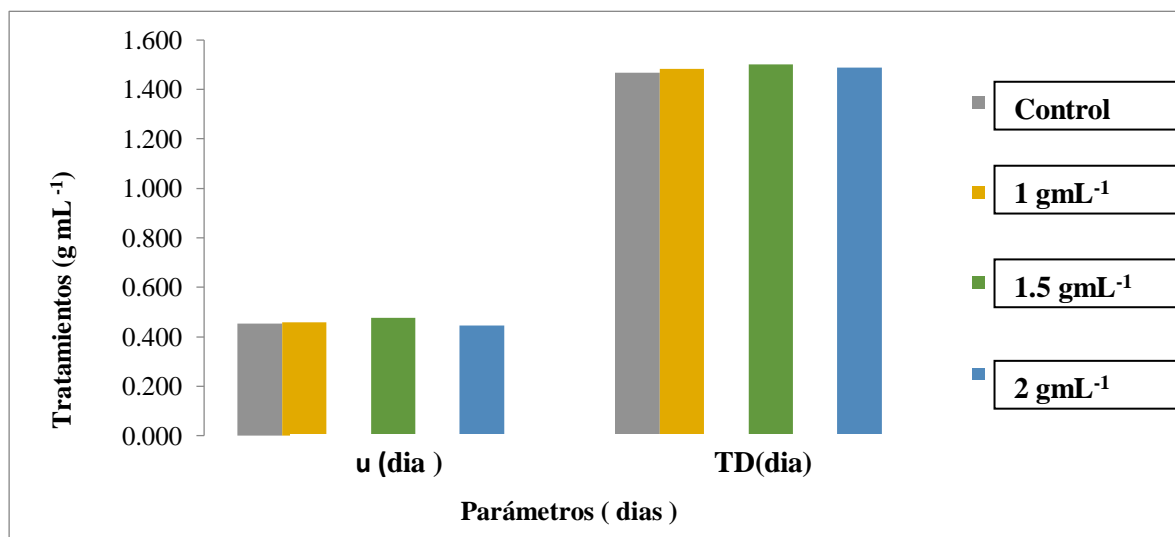


Fig. 5. Variación de la tasa de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación diaria (TD) del cultivo de *T. suecica*, dosificados con EAM durante 5 día.

3.3 CONTENIDO DE CLOROFILA α y β EN *T. suecica*

La tabla 6 y fig. 6 muestran los contenidos de clorofila “ α ” y “ β ” de la microalga *T. suecica* por efecto de las diferentes concentraciones de E.A.M.

Tabla 6: Contenido de clorofila α y β de *T. suecica* en cultivos dosificados con diferentes concentraciones de EAM.

Pigmentos	Tratamientos			
	Control	1,0 gmL^{-1} de EAM	1,5 gmL^{-1} de EAM	2,0 gmL^{-1} de EAM
α (ug mL^{-1})	1,202 \pm 0,992 ^a	4,763 \pm 0,904 ^b	5,087 \pm 0,679 ^b	2,460 \pm 0,719 ^a
β (ug mL^{-1})	0,407 \pm 0,140 ^a	2,503 \pm 0,553 ^{bc}	3,160 \pm 0,416 ^c	1,463 \pm 0,384 ^b
Total	1.609	7,266	8,247	3,923
Porcentaje (%)	100,00	451,58	512,55	243,81

Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas, con un nivel de 0.05.

Se ha determinado la existencia de diferencia significativa ($p < 0.05$) en el contenido de clorofila “ α ” en al menos uno de los tratamientos dosificados con EAM y en el tratamiento control, siendo el tratamiento experimental dosificado con 1,5 g mL^{-1} de EAM el que posee mayor contenido de clorofila (5,087 ug mL^{-1}).

Asimismo, el contenido de clorofila “ β ” tiene diferencia significativa ($p < 0.05$) entre al menos uno de los tratamientos dosificados con EAM y en el tratamiento

control, siendo el tratamiento experimental dosificado con $1,5 \text{ g mL}^{-1}$ el que posee mayor contenido de clorofila ($3,160 \text{ ug mL}^{-1}$), por tanto el mejor promedio obtenido es el tratamiento dosificado con 1.5 g mL^{-1} de EAM ya que es 5 veces mejor que el tratamiento control ($T_1 < T_2 > T_3 < T_c$).

En cuanto a las comparaciones porcentuales de los pigmentos clorofilianos, la clorofila α y la clorofila β presentan valores bastante elevados considerando como 100% a los controles (fig. 6).

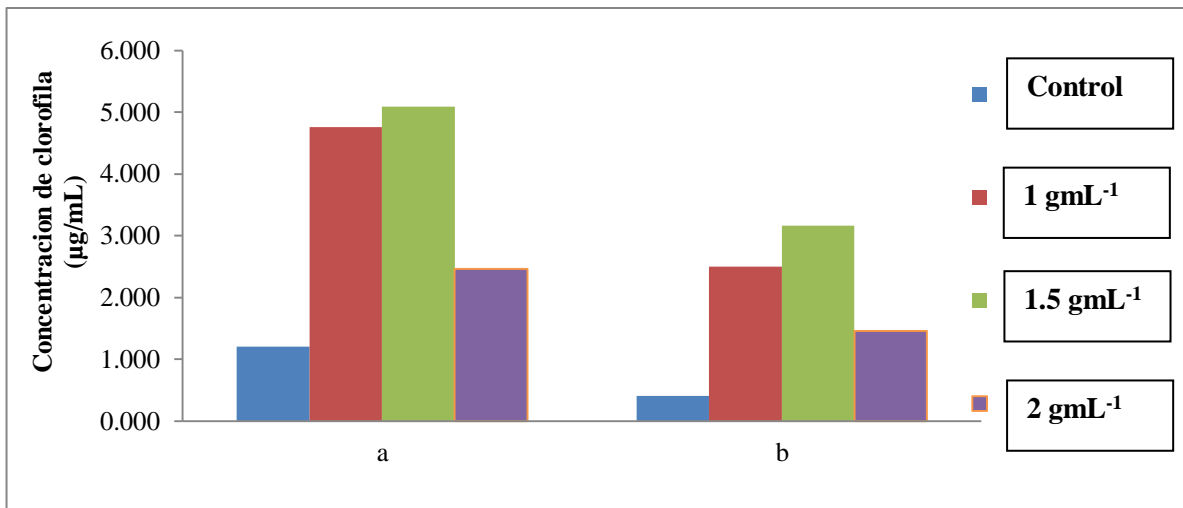


Fig. 6. Contenido de clorofila α y clorofila β en *T. suecica*, dosificados con diferentes concentraciones de E.A.M en el 5 día.

3.4. PARÁMETROS AMBIENTALES DEL CULTIVO DE *T. suecica*

3.4.1. pH de los cultivos

El rango de las variaciones del pH en los cultivos de *T. suecica* durante el experimento fluctuaron entre 6,93 y 8,0 unidades sin presentar diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre el control y los tratamientos, sin embargo, en el cuarto día el tratamiento experimental dosificado con 1.5 g mL^{-1} de EAM presentó el valor de pH más alto (Tabla 7, fig. 7), debido a la captación de nutrientes y fijación fotosintética de CO_2 en el cultivo de microalgal como consecuencia del aumento de la densidad celular. (Franchino et al. 2013).

Tabla 7. Valores del pH de los cultivos de *T. suecica*, dosificados con diferentes concentraciones de EAM.

Días	Tratamientos			
	Control	1 g mL^{-1} de EAM	1.5 g mL^{-1} de EAM	2 g mL^{-1} de EAM
1	$7,540 \pm 0,399^{\text{ab}}$	$7,177 \pm 0,045^{\text{a}}$	$7,867 \pm 0,058^{\text{b}}$	$7,367 \pm 0,208^{\text{a}}$
2	$7,500 \pm 0,173^{\text{a}}$	$7,233 \pm 0,586^{\text{a}}$	$7,733 \pm 0,208^{\text{a}}$	$6,900 \pm 0,000^{\text{a}}$
3	$7,533 \pm 0,551^{\text{a}}$	$6,973 \pm 0,219^{\text{a}}$	$7,667 \pm 0,666^{\text{a}}$	$6,933 \pm 0,115^{\text{a}}$
4	$7,173 \pm 0,951^{\text{a}}$	$7,300 \pm 1,127^{\text{a}}$	$8,000 \pm 0,265^{\text{a}}$	$7,100 \pm 0,854^{\text{a}}$
5	$7,233 \pm 0,945^{\text{a}}$	$7,157 \pm 0,225^{\text{a}}$	$7,703 \pm 0,525^{\text{a}}$	$7,000 \pm 0,200^{\text{a}}$

Letras diferentes en la misma fila indica que existe diferencia significativa ($p < 0.05$).

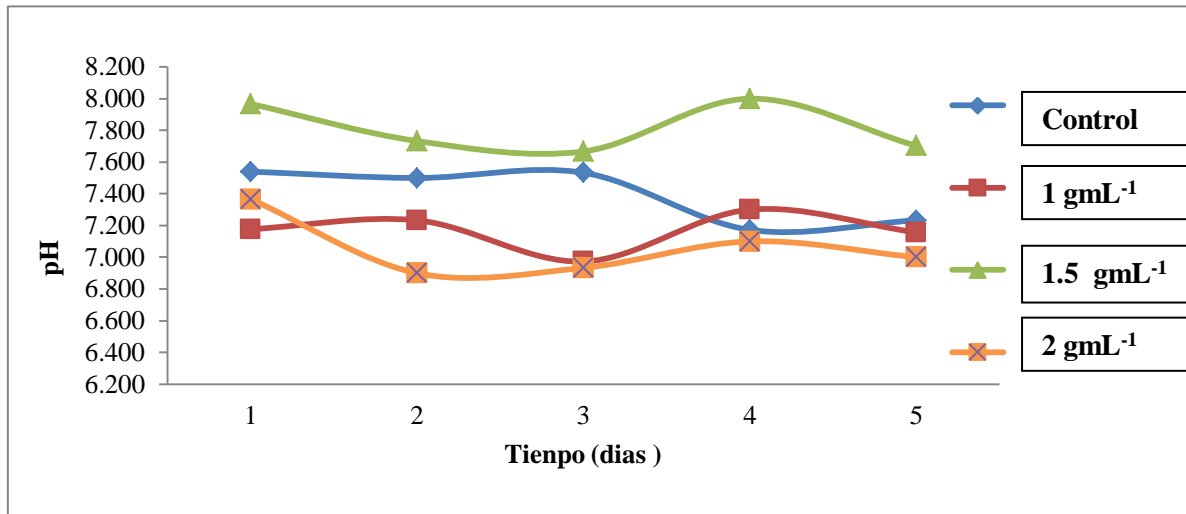


Fig. 7. Variaciones del pH de los cultivos *T. suecica* en condiciones de laboratorio.

3.4.2. Temperatura

La temperatura en los cultivos de *T. suecica* variaron de 23,7 a 25,5 °C durante el experimento sin mostrar diferencias estadísticamente similares ($p > 0,05$), sin embargo, se observa ligera tendencia a incrementarse con el tiempo en los tratamientos experimentales dosificados con 1, 1.5 mg L⁻¹, debido a la disponibilidad de temperatura y nutrientes constantes siendo factores que determinan la producción celular (Tabla 8, fig. 8).

Tabla 8: Valores de la temperatura de los cultivos de *T. suecica* dosificados con diferentes concentraciones de EAM.

Días	Tratamientos			
	Control	1 g mL ⁻¹ de EAM	1.5 g mL ⁻¹ de EAM	2 g mL ⁻¹ de EAM
1	23,833 ± 1,607 ^{ab}	23,800 ± 0,458 ^a	23,730 ± 0,100 ^b	23,801 ± 0,058 ^b
2	24,350 ± 0,917 ^a	24,567 ± 0,493 ^a	24,466 ± 0,586 ^a	24,233 ± 0,416 ^a
3	24,589 ± 0,458 ^a	25,167 ± 0,306 ^a	25,233 ± 0,751 ^a	24,706 ± 0,058 ^a
4	24,767 ± 0,265 ^a	25,269 ± 0,643 ^b	25, 245 ± 0,200 ^b	24,613 ± 0,208 ^b
5	24,689 ± 0,721 ^a	25,300 ± 0,346 ^a	25,540 ± 0,265 ^a	24,667 ± 0,907 ^a

Letras diferentes en la misma fila indica que existe diferencia significativa ($p < 0.05$).

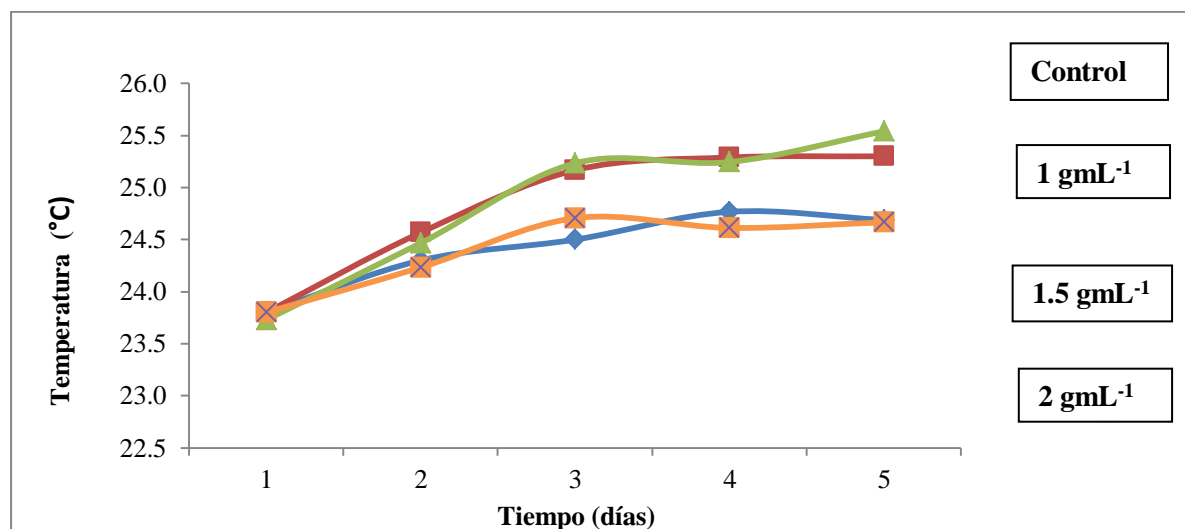


Fig. 8. Variación de la temperatura de los cultivos de *T. suecica*, durante 5 día.

IV. DISCUSIÓN

Para una producción económica de biomasa algal es necesario explorar posibilidades de utilizar fuentes de carbono orgánico de bajo costo, como las melazas, sustancias amiláceas, etc., cuyo contenido de azúcares, especialmente glucosa, permitan la realización de cultivos heterotróficos o mixotróficos, en tal sentido, Shamala *et al.* (1982) consideran que la glucosa es el sustrato azucarado más apropiado para aportar crecimiento mixotrófico debido al mejoramiento de la tasa de evolución del oxígeno fotosintético, la reutilización de sustratos y la máxima producción de biomasa algal que se obtiene con abastecimiento de CO₂ indicando a su vez que la mayor utilización de la glucosa ocurre en el primer día.

El uso de glucosa como insumo barato debe ser obtenida por hidrólisis enzimática de materiales que posean lignocelulosa (Rattanapoltee *et al.*, 2014), o tratamiento térmico de sustancias amiláceas, como por ejemplo los residuos del procesamiento de *M. esculenta* “yuca” para obtener glucosa por hidrólisis térmica del almidón y ser directamente utilizados por microorganismos (Palma, 2000).

Diversos estudios han demostrado la capacidad de *T. suecica* de aprovechar residuos orgánicos de variada procedencia (Merino *et al.*, 2003; Fernández & Paredes, 2007; Ipanaqué & Paredes, 2009) por el contenido de nutrientes, especialmente carbono y nitrógeno orgánicos, asimismo Chen *et al.* (2011) consideran que las microalgas pueden asimilar una gran variedad de fuentes de carbono orgánicos para su crecimiento, como glucosa y sacarosa, en la actualidad se está incidiendo más en la búsqueda de nuevas

fuentes carbonadas más económicas como melaza, hidrolizado de harina de maíz, yuca, soja, etc.

La cáscara de yuca es un subproducto que se obtiene de la utilización de la raíz de yuca, tanto en alimentación humana directa como en la industrialización (obtención de almidón), Buitrago (1990) afirma que la cáscara de yuca representa entre el 15 a 20% del peso total de la raíz y su calidad es bastante uniforme, conteniendo proteína, grasa, fibra y minerales es un insumo energético que puede ser empleado en la alimentación de cerdos. Ríos (1973) afirma que el afrecho de yuca, debido a su bajo costo y buen sabor, se puede usar como fuente energética para la alimentación de vacunos, cerdos, y aves; como suplemento proteico, graso y mineral.

La melaza como fuente de carbono orgánico ha sido utilizada para cultivar microalgas, como *Scenedesmus obliquus* con efectos positivos en la tasa de crecimiento, contenido de pigmentos y lípidos en condiciones mixotróficas, mientras que en condiciones heterotróficas disminuyen notablemente su crecimiento lo cual se hace notorio por coloración amarilla que toman los cultivos Mostafa *et al.* (2014), asimismo Reyes (2015) logró altos valores de crecimiento en el cultivo de *Scenedesmus acutus* (0.810 ml L⁻¹) utilizando tres tipos de azúcares (glucosa, fructuosa y sacarosa) eficientemente aprovechados por las microalgas, mientras que Pancha *et al.* (2014) .Sustentan que *Scenedesmus sp*, crece mejor en glucosa que en fructosa o galactosa con tasa de crecimiento de 0.23 d⁻¹ debido a la facilidad de su asimilación, mediante transportadores selectivos dentro de la célula para ser utilizada en la fosforilación oxidativa mitocondrial y generar ATP, mientras que otros azúcares requieren complejas vías metabólicas y enzimas

celulares para su rompimiento en azúcares simples para ser metabolizados en las células algales (Stadler *et al.*, 1995).

La utilización del EAM en los cultivos de *T. suecica* aportan fuentes de carbono y nitrógeno orgánicos, que favorecen en el crecimiento de los cultivos, el nitrógeno ha sido demostrado como el principal regulador en el crecimiento microalgal, cuando un cultivo es expuesto a una limitación o excedente de nutrientes, se disminuye la tasa de división celular, entonces se desvía el flujo de carbono fijado por la fotosíntesis a síntesis de lípidos o carbohidratos (Arias *et al.*, 2011). La síntesis de proteínas normalmente depende de un adecuado suministro de nitrógeno (Sze, 1998). Sin embargo, altos niveles de nitrógeno que no pueden ser asimilados por los cultivos microalgales pueden causar efectos adversos en los organismos menos tolerantes (Camargo & Alonso, 2006).

En tal sentido, el contenido proteico de la yuca (18%) equivale a 2,88 mg de nitrógeno de acuerdo al factor de conversión (6.25) por el método de kjeldahl (NTP, 1999) como compuesto orgánico, por tanto, las dosificaciones aplicadas en el experimento, 1; 1,5 y 2 mg mL⁻¹, aportan respectivamente, 28,8; 43,2 y 57,6 mg mL⁻¹ de nitrógeno como compuesto orgánico. Estos valores son mayores a los valores de nitrógeno que aporta el medio Guillard (22.31 mg mL⁻¹), lo que explicaría los óptimos crecimientos poblacionales y contenidos de los pigmentos clorofilianos en aquellos cultivos.

Los tratamientos experimentales dosificados con $1,5 \text{ g mL}^{-1}$ del EAM presentaron, a partir del día 3 crecimientos significativamente ($p < 0,05$) mayores que el tratamiento control y los otros tratamientos experimentales debido al aporte de glucosa ($0,091 \text{ g mL}^{-1}$) y de nitrógeno ($43,2 \text{ mg mL}^{-1}$). El consumo los nutrientes depende de la disponibilidad de estos, así como de la habilidad misma del organismo para consumirlos. Aún si un nutriente es muy abundante, existen límites en la tasa a la cual una microalga puede consumirlos (Lampert & Sommer, 2007). Demostrando que las células microalgales requieren nutrientes en proporciones relativamente fijas para el crecimiento y reproducción de las microalgas.

El aumento de glucosa influye positivamente en el incremento de la densidad poblacional de *T. suecica*, esto se pudo observar en el tratamiento control y los tratamientos experimentales dosificados con $1,0$ y $1,5 \text{ g mL}^{-1}$ de EAM equivalentes a $0,061$ y $0,091 \text{ g mL}^{-1}$ de glucosa, concordando con Ogawa & Aiba (1981), quienes consideran que el crecimiento algal es afectado por la concentración inicial de la glucosa observándose efectos adversos a mayores concentraciones de 0.5 g mL^{-1} , y que la producción de biomasa aumenta con el incremento de la glucosa hasta cierto valor límite fijada por las condiciones del cultivo.

Estos resultados son similares a los obtenidos por Martínez *et al.* (1987), en el cultivo de *Scenedesmus quadricauda* cuyo crecimiento óptimo fue con 0.2 g mL^{-1} de glucosa con tasas de crecimiento de 1.27 d^{-1} frente al control de 0.47 d^{-1} .

En relación a la tasa de crecimiento (μ) los valores de 0,458 y 0,478 de los tratamientos experimentales dosificados con 1 y 1.5 g mL⁻¹ de EAM, respectivamente, son estadísticamente similares ($p < 0,05$) al tratamiento control (0,453), y los valores del TD fueron mayores en los cultivos que crecen más lentamente (Tabla 5), demostrando que la asimilación de los nutrientes presentes en el EAM supone la existencia de una adecuada relación N/P como indicador de un buen balance de nutrientes (Molina *et al.*, 1991), mientras que ensayos realizados por Yauri (2015) utilizando ensilado biológico del biofouling del cultivo de *Argopecten purpuratus* “concha de abanico” determinaron tasas de crecimiento de 0,518 día⁻¹ mayor a los obtenidos con 1.5 g mL⁻¹ de EAM (0,478 día⁻¹), debido a la mayor riqueza de nutrientes de los ensilados biológicos.

El alto contenido de clorofila α y β en el día 5 de los cultivos de *T. suecica* dosificados con 1,5 g mL⁻¹ de EAM muestran resultados (5,087 y 3,160 ug mL⁻¹) estadísticamente diferentes ($p < 0,05$) al tratamiento control (1,202 y 0,407 ug mL⁻¹) exentos de glucosa, revelando la existencia de vías de asimilación de la glucosa y activación de sistemas metabólicos y enzimáticas para la formación y acumulación de pigmentos clorofilianos.

Por otro lado, al comparar los valores porcentuales de las clorofilas α y β , tomando como base los valores del tratamiento control, se concluye que el tratamiento experimental dosificado con 1.5 g mL⁻¹ de EAM presenta incremento de 512,55%, respectivamente (Tabla 6), mostrando relación entre la cantidad de clorofila y la densidad poblacional, concordando de este modo con (Serpa & Calderón, 2006) quienes indican que las fuentes de nitrógeno promueven la acumulación de clorofila, considerándose como un indicador

del crecimiento poblacional debido a que mayores niveles de clorofila promueven la mayor producción de oxígeno y radicales oxidantes

Una correlación positiva entre el contenido de pigmentos y la densidad poblacional de los cultivos demuestran que el aumento de pigmentos en cultivos suplementados con glucosa se refleja en el crecimiento poblacional.

Las variaciones de la temperatura y el pH de los cultivos influyen en las tasas del crecimiento algal condicionando la dinámica del crecimiento y bromatología de la biomasa producida. En nuestra experiencia, las variaciones de la temperatura (23,0 a 25,8 °C) están dentro del rango mencionado por Abalde *et al.* (1995), quienes sostienen que el rango de temperatura varía según la especie, existiendo algunas especies que no soportan temperaturas superiores a los 25 °C y otras crecen bien hasta los 36 °C.

El pH es un factor de decisiva participación en la dinámica del crecimiento microalgal y en el contenido de proteínas y pigmentos siendo el rango de 7,5 y 8,5 el más adecuado para *Tetraselmis suecica* (Khatoon *et al.*, 2014), observándose incremento del pH con el tiempo (Mohamed *et al.*, 2014) durante la captación de nutrientes, consumo de nitrógeno y mayor fijación de CO₂ (Pérez-García *et al.*, 2011, Garibay *et al.* 2009), reportan rangos de 6.5 a 9,5 en cultivos de *T. suecica* coincidiendo con nuestros resultados (6,93 a 8,00). El gradual incremento del pH observado es consecuencia del aumento de la densidad celular y el consecuente consumo del CO₂ disponible en el medio.

V. CONCLUSIONES

Los mayores valores de μ para *T. suecica* se presentaron en los tratamientos dosificados con 1.5 g mL^{-1} de EAM, con $0,478 \text{ día}^{-1}$; y el menor valor se presentó en el tratamiento dosificado con 2 g mL^{-1} de EAM, con $0,446 \text{ día}^{-1}$.

El mayor valor de TD para *T. suecica* fue obtenido en el tratamiento experimental dosificado con 1.5 g mL^{-1} de EAM ($1,551 \text{ día}^{-1}$), siendo significativamente menor los tratamientos experimentales dosificados con 1 g mL^{-1} y 2 g mL^{-1} de EAM con valores de $1,516 \text{ día}$ y $1,489 \text{ día}$, respectivamente.

El tratamiento experimental dosificado con $1,5 \text{ g mL}^{-1}$ de EAM presentó mayor contenido de clorofila α y β con valores de $5,087 \text{ ug mL}^{-1}$ y $3,160 \text{ ug mL}^{-1}$, respectivamente, mientras que los menores valores de tales pigmentos se vieron reflejados en el tratamiento experimental dosificado con $2,0 \text{ g L}^{-1}$ de EAM ya que sus valores fluctuaron entre $2,460 \text{ ug mL}^{-1}$ y $1,463 \text{ ug mL}^{-1}$, respectivamente.

La asimilación de nutrientes como el crecimiento celular pueden variar con factores como la luz, el pH y la temperatura. Por lo tanto, cualquier condición ambiental que limite la energía celular puede limitar la asimilación de nutrientes y como consecuencia el crecimiento celular. Demostrando que con una disponibilidad adecuada de nutrientes, variaciones de la temperatura y pH dentro de los rangos normales, no han afectado la dinámica del crecimiento de *T. suecica*.

VI. RECOMENDACIONES

Escalar estos resultados en cultivos masivos al aire libre en piletas someras y en fotobiorreactores a escala piloto tendiente a desarrollar una metodología que permita utilizar los residuos de *M. sculenta* “yuca”, previa hidrólisis, en los cultivos algales para la obtención de pigmentos clorofilianos y evaluar técnica y económicamente su producción masiva al aire libre de *T. suecica*.

Realizar estudios citológicos y bioquímicos con la finalidad de conocer las rutas metabólicas de la glucosa y la formación intracelular de los pigmentos clorofilianos de *T. suecica*.

Realizar estudios para aprovechar todos los componentes de la materia prima *M. sculenta* “yuca” para industrializar como harina las cascaras y afrecho generando mejores ingresos y mejor rentabilidad.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

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.

Alarcón, F., Dufour, D.1998. "Almidón agrario de yuca en Colombia" Cali Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical.

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.

Arias, M; Cristiani, E; Montes, M; Cañizares Ro .2011. Evaluación de la microalga *Scenedesmus incrassatulus* como posible fuente de lípidos para la obtención de biodiesel [Internet]. XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Queretaro, México.

Becker, E. 1994. Biotechnology and microbiology. Cambridge University Press, Cambridge. U.S.A. 293p.

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.

Bertoldo, F.; E. Santana; M. Villela & J. Barcelos. 2006. Lípidos, composición de ácidos grasos y carotenos en *Chlorella vulgaris* cultivadas en solución hidropónica residual. *Grasas y Aceites*. 57(3):270-274.

Buitrago, A. 1990. La yuca en la Alimentación Animal. Centro Internacional Tropical (CIAT). Cali, Colombia. 446 p.

Capa, W. 2010. Biología y Biotecnología de Microalgas. 1era. edic. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC). Lima, Perú. 181p.

Chen C, Yeh K, Aisyah R, Lee D, Chang J. 2011. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresource Technology* 102: 71-81.

Chernomorsky, S. & A. Segelman. 1988. Biological activities of chlorophyll derivatives. *J. Med.* 85:669-673.

Chuzel G. 1989 Producción y utilización del almidón de yuca. V seminario anual de la yuca. INIAP. Porto viejo, Ecuador.

Chuzel G. Almidón de yuca, uso actual y potencialidades. *Cassava Newsletters*. 1990.

- Cohen, Z. 1999. Chemicals from Microalgae. Taylor and Francis Inc. Cohen Zvi Ed. London. 450p.
- Fábregas, J.; A. Otero; A. Domínguez & M. Patiño. 2001. Growth rate of the microalga *Tetraselmis suecica* changes the biochemical composition of *Artemia* species. *J. Mar Biotechnol.* 3:256-263.
- 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.
- Franchino M, E Comino, F Bona & VA Riggio. 2013. Growth of three microalgae strains and nutrient removal from an agro-zootechnical digestate. *Chemosphere* 92(6): 738-744.
- Garcia et al 2000. High rate algal pond operating strategies for urban wastewater nitrogen removal. *Journal of Applied Phycology* 12: 331-339.
- Garibay, A.; R, Vázquez-Duhalt; M. Sánchez; L. Serrano & A. Martínez. 2009. Biodiesel a partir de microalgas. *BioTecnología.* 13(3):38-61.

- 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. 29-60p.
- 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.
- 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.
- Khatoun, H., N. Rahman, S. Banerjee, N. Harun, S. Suleiman, N. Zakaria, F. Lananan, S. Abdul & A. Endut. 2014. Effects of different salinities and pH on the growth and proximate composition of *Nannochloropsis* sp. and *Tetraselmis* sp. isolated from South China Sea cultured under control and natural condition. *International Biodeterioration & Biodegradation.* 11-18p.
- 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.

- Lampert, W. & Sommer, U. 2007. Limnoecology. Second Edition. Oxford University Press Inc., New York.
- Loren, J.2010. Reactivo de fehling. Universidad Cardenal Herrera .Moncada, Valencia. España.
- Martínez F.; Avendaño M.; Marco E. & M. I. Orus. 1987. Algal population and auxotrophic adaptation in a sugar refinery wastewater environment. 1987. J. Gen. Appl. Microbial., 33: 331-341.
- 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.
- Montoya H.2004. Industrialización de la Yuca: Obtención de Almidón Nativo y sus Aplicaciones. Universidad del Valle. Canea-Colombia. 17-18p.
- Molina E., Acién F.G. & Robles M. 2013. Downstream Processing of Cell Mass and Products. en Handbook of Microalgal Culture:Applied Phycology and Biotechnology, Second Edition.

- Montoya H. 2007. Industrialización de la Yuca: Obtención de Almidón Nativo y sus Aplicaciones. Universidad del Valle. Canea-Colombia, 17 – 18 p.
- Mostafa M. El-Sheekh M. M.; Bedaiwy M. Y.; Osman M. E. & M. M. Ismail. 2014. Influence of Molasses on Growth, Biochemical Composition and Ethanol Production of the Green Algae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus*. Journal of Agricultural Engineering and Biotechnology. 2: 20-28.
- Manual Norma Técnica Peruana .1999. INACAL. Perú, 7° edición .17p.
- Ogawa T. & S. Aiba. 1981. Bioenergetic Analysis of Mixotrophic Growth in *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus*. Biotechnology and Bioengineering, Vol. XXIII: 1121-1 132.
- Palomino, A.; C. Estrada & J. López. 2010. Microalgas: potencial para la producción de biodiesel. Congreso Brasileiro De Mamona, 4 & Simpósio Internacional De Oleaginosas Energéticas, Brasil. 149-157pp.
- Palma H.2000. Posibilidades Funcionales en el uso de almidones, gomas, emulsificantes. Revista de Industria y Alimentos, diciembre. 27 :1-43p.

- Pancha I.; Chokshi K. & S. Mishra. 2014. Enhanced biofuel production potential with nutritional stress amelioration through optimization of carbon source and light intensity in *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. Bioresource technology. Bioresource Technology.146-154 p.
- Pérez-García, O.; F. Escalante; L. de-Bashan & Y. Bashan. 2011. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water Res.* 45(1):11-36 p.
- Rattanapoltee, P. & P. Kaewkannetra. 2014. Cultivation of microalga, *Chlorella vulgaris* under different auto-hetero-mixo trophic growths as a raw material during biodiesel production and cost evaluation energy. 78:4-8 p.
- Reyes, J. 2015.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. Tesis para optar el grado de biólogo acuicultor .Universidad nacional del santa .Chimbote-Perú.51p.
- 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.
- Rios, B. 1973. “Digestibilidad del afrecho de yuca en ovinos”. Tesis Ing. Zootecnista. Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo María. Peru.41 p.

- Ritchie, R.2008. Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls *a*, *b*, *c*, and *d* and total chlorophylls in natural assemblages of photosynthetic organisms using acetone, methanol, or ethanol solvents.115-126 p.
- Rodríguez, L; Juscamaita, J. Vargas, J. 2007. Efecto del medio EM-Bokashi en el cultivo de la microalga marina *Tetraselmis suecica* . *Ecología Aplicada* 6: 111-116.
- Serpa, R. & A. Calderón 2006. Efecto de diferentes fuentes de nitrógeno en el contenido de carotenoides y clorofila de cuatro cepas peruanas de *Dunaliella salina* TEOD. *Rev. Ecología aplicada*. 5(1, 2):93-99.
- Shamala T. R.; Drawert F & G. Leupold. 1982. Studies on *Scenedesmus acutus* growth. Effect of autotrophic and mixotrophic conditions on the growth of *Scenedesmus acutus*. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. XXIV: 1287-1299.
- Stadler RH, Richoz J, Turesky R, Welti D. 1995.Oxidación de cafeína y metilxantinas relacionadas en la oxidación tipo Fenton de ascorbato y polifenol. *Free Rad Res*. 24 : 225-235p.
- Steel, D. & Torrie J. 1992. *Bioestadística: Principios y procedimientos*. Mc. Graw Hill. México.132- 164; 458-461.
- Sze, P. 1998. *A Biology of the Algae*. Third edition.WCB/McGraw-Hill.boston .278p.

Torrentera, L. & A. Tacon. 1989. La producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura: Una Diagnósis. Programa Cooperativo Gubernamental. FAO-Italia. 90p.

Webb, R. & G. Fernández-Baca. 2016. Anuario Estadístico. Perú en números .Instituto Cuanto. Lima, Perú. 200p.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1.

Densidad poblacional (10^6 cel. mL⁻¹) de *T. suecica* con medio de cultivo EAM.

Días	Control			1mg L ⁻¹			1.5mg L ⁻¹			2 mg L ⁻¹		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
1	12,0	12,0	12,0	12,0	12,0	12,0	12,0	12,0	12,0	12,0	12,0	12,0
2	41,6	39,8	42,5	45,3	56,2	40,6	48,0	50,8	60,7	45,6	40,1	39,9
3	70,5	69,8	76,4	70,1	68,4	64,0	78,9	88,7	98,9	68,9	58,7	60,1
4	93,3	88,7	80,1	65,8	78,3	77,8	85,7	98,4	110,5	78,0	88,0	68,9
5	122,2	118,7	115,0	123,6	110,0	120,0	125,7	128,0	139,7	110,8	112,2	111,1

ANEXO 2.

Valores de pH en los cultivos de *T. suecica* con medio de cultivo EAM y grupo Control.

Días	Control			Trat 01 (1mgL ⁻¹)			Trat 02 (1,5 mgL ⁻¹)			Trat 03 (2mgL ⁻¹)		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
1	8	7.34	7.28	7.22	7.18	7.13	8	7.9	8	7.6	7.2	7.3
2	7.6	7.6	7.3	7.9	7	6.8	7.5	7.8	7.9	6.9	6.9	6.9
3	7.5	7	8.1	6.8	6.9	7.22	8.1	8	6.9	7	7	6.8
4	6.2	8.1	7.22	6	7.9	8	7.8	8.3	7.9	8	6.3	7
5	8.3	6.5	6.9	7.25	7.32	6.9	8.3	7.31	7.5	6.8	7	7.2

ANEXO 3.

Temperatura (°C) en los cultivos de *T. Suecica* dosificados con EAM y grupo Control (Guillard f/2).

Días	CONTROL			Trat 01(1mgL ⁻¹)			Trat 02(1,5gmL ⁻¹)			Trat 03(2gmL ⁻¹)		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
1	25	22	24.5	22.9	22.6	23.5	25.8	25.7	25.6	25.3	25.3	25.2
2	24	23.4	25.2	24	24.8	24.9	24.9	26	25.8	25.1	25.7	24.9
3	24.5	25.4	24.8	25.5	25.3	24.9	25.3	26.1	24.6	24.9	24.8	24.8
4	23	23.4	22.9	23.7	24.9	23.9	24.9	25.3	25.1	25	24.7	25.1
5	25.3	24.9	23.9	25.1	25.1	25.7	26.1	25.7	25.6	25,5	24.8	23.7

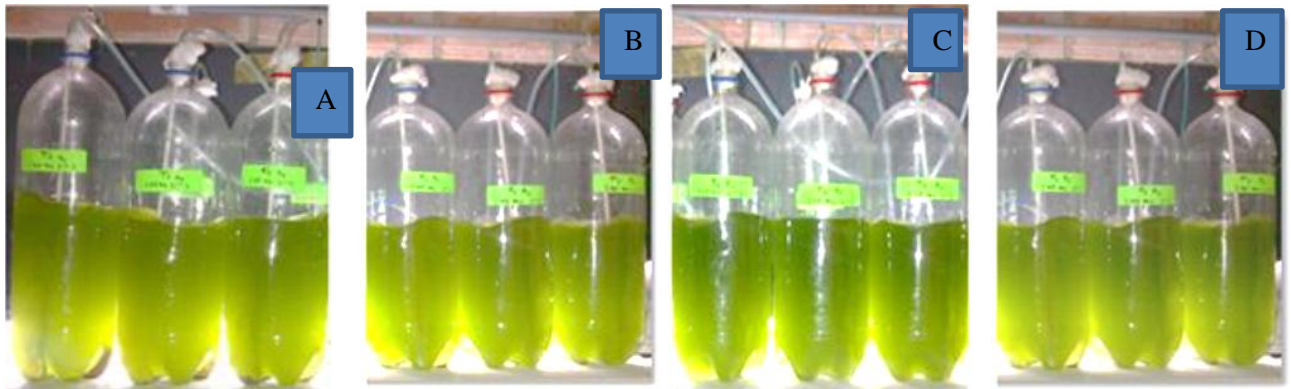
ANEXO 4.

Contenido de clorofila α y β al quinto día de cultivo de *T. suecica*.

Clorofila	Control			Trat 01 (1gml ⁻¹)			Trat 02 (1,5gml ⁻¹)			Trat 03 (2gml ⁻¹)		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
α ug/mL	1,79	0,057	1,76	3,91	5,71	4,67	4,66	5,87	4,73	2,98	2,76	1,64
β ug/mL	0,54	0,26	0,42	1,87	2,89	2,75	2,91	3,64	2,93	1,76	1,60	1,03

ANEXO 5.

Coloración de cada unidad experimental en el día 5 de cultivo de *T. suecica*: A) control, B) 1 mgL⁻¹, C) 1,5 mgL⁻¹, D) 2 mgL⁻¹ de EAM.



ANEXO 6.

Fotografía del análisis químico del extracto acuoso del subproducto de *M. esculenta*.



Pág.1 de 1

INFORME DE ENSAYO N°1921-14

SOLICITADO POR : ALVAREZ VELASQUEZ PATRICIA
Dirección : Mz I Lote 52 Cáceres Aramayo. Nuevo Chimbote.
PRODUCTO DECLARADO : EXTRACTO DE YUCA
CANTIDAD DE MUESTRA : 04 muestras de 30 ml c/u aproximadamente
PRESENTACIÓN DE LA MUESTRA : En frasco de vidrio transparente
FECHA DE RECEPCION : 2017 - 04 - 12
FECHA DE INICIO DEL ENSAYO : 2017 - 04 - 12
FECHA DE TERMINO DEL ENSAYO : 2017 - 04 - 15
CONDICION DE LA MUESTRA : En buen estado
ENSAYOS REALIZADOS EN : Laboratorio sub contratados
CÓDIGO COLECBI : SS000879-14

RESULTADOS

ENSAYOS	MUESTRA
	EXTRACTO (%)
Almidón	20
Humedad	34
Proteínas	18
Calcio	12
Fósforo	16

METODOLOGIA EMPLEADA:

ALMIDON : UNE-EN-ISO 10520:1997
HUMEDAD : UNE-EN-ISO 4052-2002
PROTEINAS : UNE-EN-ISO 20483-2006
CALCIO : EPA.200.7
FOSFORO : EPA.200.7

Observación: Este documento al ser emitido sin el símbolo de acreditación, no se encuentra dentro del marco de la acreditación otorgada por el indecopi SNA.

NOTA

- Muestra recepcionada en Laboratorios COLECBI S.A.C
- Los resultados presentados corresponden solo a una muestra ensayada
- Estos resultados de ensayo no deben ser como una certificación de conformidad con normas de producto como certificado de calidad de la entidad que lo produce.

Fecha De Emisión: Nuevo Chimbote, Abril 15 del 2017

PROHIBIDA LA REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL DE ESTE
INFORME SIN LA AUTORIZACIÓN ESCRITA DE COLECBI SAC.