

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



**EFFECTO DE TRES CONCENTRACIONES DE MELAZA COMO
FUENTE DE CARBONO ORGÁNICO EN EL CRECIMIENTO
POBLACIONAL Y CONTENIDO DE LÍPIDOS EN *Chlorella*
Vulgaris, EN CONDICIONES DE LABORATORIO.**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE BIÓLOGO ACUICULTOR

AUTORES:

Bach. URIARTE CONCEPCION BRANDER ROBERTO

Bach. VERGARAY CAPRISTANO JORGE LUIS

ASESOR:

Dr. MERINO MOYA JUAN FERNANDO

NUEVO CHIMBOTE - PERÚ

2019

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



**EFECTO DE TRES CONCENTRACIONES DE MELAZA COMO
FUENTE DE CARBONO ORGÁNICO EN EL CRECIMIENTO
POBLACIONAL Y CONTENIDO DE LÍPIDOS EN *Chlorella
Vulgaris*, EN CONDICIONES DE LABORATORIO.**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE BIÓLOGO ACUICULTOR

AUTORES:

BACH. URIARTE CONCEPCION BRANDER ROBERTO

BACH. VERGARAY CAPRISTANO JORGE LUIS

DR. Merino Moya Juan Fernando

ASESOR

NUEVO CHIMBOTE - PERÚ

2019

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



EFEECTO DE TRES CONCENTRACIONES DE MELAZA COMO FUENTE DE CARBONO ORGÁNICO EN EL CRECIMIENTO POBLACIONAL Y CONTENIDO DE LÍPIDOS EN *Chlorella Vulgaris*, EN CONDICIONES DE LABORATORIO.

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE BIÓLOGO ACUICULTOR

AUTORES:

BACH. URIARTE CONCEPCION BRANDER ROBERTO

BACH. VERGARAY CAPRISTANO JORGE LUIS

APROBADO POR EL JURADO CALIFICADOR INTEGRADO POR LOS SEÑORES MIEMBROS:

Dr. Azañero Diaz Carlos Alberto

Presidente

M.Sc. Mendoza Espinoza Sorayda
Integrante del Jurado

Dr. Merino Moya Juan Fernando
Integrante del Jurado

ACTA DE CALIFICACIÓN DE LA SUTENTACIÓN DE LA TESIS

En el Distrito de Nuevo Chimbote, en la Universidad Nacional de Santa, en el Laboratorio de Cultivos de Especies Auxiliares, siendo las 18:00 horas del día 01 de Octubre del 2019, dando cumplimiento a la Resolución N°

185-2019-UNS-FC, se reunió el Jurado Evaluador presidido por Carlos Azañero Diaz, teniendo como miembros a Sorayda Mendoza Espinoza (secretario) (a), y Fernando Merino Moya (integrante), para la sustentación de tesis a fin de optar el título de Biologo Acuicultor, realizado por el, (la), (los) tesista (as)

Brander Roberto Uriarte Concepcion y Jorge Luis Vergaray Capristano, quien (es) sustentó (aron) la tesis intitulada: Efecto de tres concentraciones de melaza como fuente de carbono orgánico en el crecimiento poblacional y contenido de lípidos en *Chlorella Vulgaris* en condiciones de laboratorio

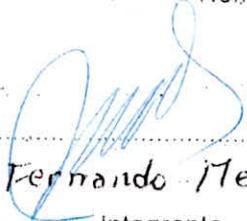
Terminada la sustentación, el (la), (los) tesista (as)s respondió (ieron) a las preguntas formuladas por los miembros del jurado.

El Jurado después de deliberar sobre aspectos relacionados con el trabajo, contenido y sustentación del mismo y con las sugerencias pertinentes, declara la sustentación como Muy Bueno asignándole un calificativo de 18 puntos, según artículo 103° del Reglamento General de Grados y Títulos de la Universidad Nacional del Santa, vigente (Resolución N° 492-2017-CU-R-UNS)

Siendo las 19:00 horas del mismo día se dio por terminado el acto de sustentación firmando los miembros del Jurado en señal de conformidad


Nombre: Carlos Azañero Diaz
Presidente


Nombre: Sorayda Mendoza Espinoza
Secretario


Nombre: Fernando Merino Moya
Integrante

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





Recibo digital

Este recibo confirma que su trabajo ha sido recibido por Turnitin. A continuación podrá ver la información del recibo con respecto a su entrega.

La primera página de tus entregas se muestra abajo.

Autor de la entrega: **Jorge Vergaray**
Título del ejercicio: **TESIS PRE**
Título de la entrega: **TESIS PRE**
Nombre del archivo: **TESIS.docx**
Tamaño del archivo: **880.24K**
Total páginas: **29**
Total de palabras: **5,481**
Total de caracteres: **28,756**
Fecha de entrega: **21-nov-2019 07:07p.m. (UTC-0500)**
Identificador de la entrega: **1219053241**

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



Efecto de tres concentraciones de melaza como fuente de carbono orgánico en el crecimiento poblacional y contenido de lípidos en *Chironia vulgaris*, en condiciones de laboratorio.

PRESENTADO POR:

Bach. URIARTE CONCEPCION Brander Roberto

Bach. VERGARAY CAPRISTANO Jorge Luis

ASESOR:

Dr. MERINO MOYA Juan Fernando

NUEVO CHIMBOTE - PERÚ
2019

DEDICATORIA

Agradecer hoy y siempre a Dios sobre todas las cosas, a mi familia por el esfuerzo realizado y el apoyo brindado en mis estudios,

*A mis padres **Teodoro Uriarte Rojas** y **Mercedes Concepción Pirgo**, por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad; mucho de mis logros se los debo a ellos, así mismo me dieron la motivación para seguir adelante y alcanzar mis anhelos.*

*A mis padres **Victor Vergaray Bazan** y **Delia Capristano Chavarria**, que por su interminable apoyo en todo momento de mi vida, por sus enseñanzas, consejos y por su eterna paciencia y perdón ante mis constantes errores. Ellos me dan la fortaleza necesaria para seguir adelante.*

*A mi asesor **Juan Fernando Merino Moya** por transmitirme sus conocimientos y dedicación, mediante el cual he podido lograr un objetivo importante el cual es la culminación de mi tesis con éxito.*

A mis profesores de la Escuela de Biología en Acuicultura, que me transmitieron sus diversos conocimientos y temas de la profesión, para poder encaminarme en el camino correcto y así lograr mis metas y todo lo que me proponga.

AGRADECIMIENTO

A los docentes de la Escuela Académica Profesional de Biología en Acuicultura quienes con sus experiencias y enseñanzas contribuyeron a mi formación institucional.

RESUMEN

Se investigó el efecto de la melaza de caña como fuente de carbono orgánico en el crecimiento y contenido de lípidos de *Chlorella vulgaris*, la investigación se realizó en el laboratorio de Cultivos de Especies Auxiliares de la Escuela de Biología en Acuicultura de la Universidad Nacional del Santa, el cultivo de *C. vulgaris* tuvo una duración de 5 días. Para el tratamiento control se usó el medio de cultivo HM y para los tratamientos experimentales se trabajó con dosis de 0.5, 1.0 y 2.0 g.L⁻¹ de melaza. Obteniéndose como resultado una densidad algal de 20.86 x10⁵, 10.93 x10⁵ y 11.01 x10⁵ cel.ml⁻¹ respectivamente. Determinándose así que el tratamiento control y la dosis con 0.5 g.L⁻¹ de melaza no tuvieron diferencia significativa, sin embargo éstos difieren con el tratamiento 1.0 y 2.0 g.L⁻¹. Respecto al contenido de lípidos se determinó que la dosis de 2.0 g.L⁻¹ presenta diferencia significativa (p<0.05) con respecto a los otros tratamientos. Por consiguiente se determinó que se obtiene un mejor contenido de lípidos con 2.0 g.L⁻¹ de melaza.

Palabras claves: *Chlorella vulgaris*, carbono orgánico, melaza, crecimiento, contenido de lípidos.

ABSTRACT

The effect of cane molasses as a source of organic carbon on the growth and lipid content of *Chlorella vulgaris* was investigated, the research was conducted in the Auxiliary Species Crops Laboratory of the School of Biology in Aquaculture of the National University of Santa , the culture of *C. vulgaris* lasted 5 days. For the control treatment, the HM culture medium was used and for the experimental treatments the dose was 0.5, 1.0 and 2.0 g.L⁻¹ of molasses. Obtaining as a result an algal density of 20.86 x10⁵, 10.93 x10⁵ and 11.01 x10⁵ cel.ml⁻¹ respectively. Thus determining that the control treatment and the dose with 0.5 g.L⁻¹ of molasses had no significant difference, however these differ with the treatment 1.0 and 2.0 g.L⁻¹. Regarding the lipid content, it was determined that the dose of 2.0 g.L⁻¹ presents a significant difference (p <0.05) with respect to the other treatments. Therefore, it was determined that a better lipid content is obtained with 2.0 g.L⁻¹ of molasses.

Keywords: *Chlorella vulgaris*, organic carbon, molasses, increase, lipid content.

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTO.....	ii
RESUMEN.....	iii
ABSTRACT.....	iv
ÍNDICE.....	v
ÍNDICE DE TABLAS	vii
INDICE DE FIGURAS	viii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Hipótesis.....	4
1.2. Objetivos	4
1.2.1. Objetivo general	4
1.2.2. Objetivos específicos	4
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	5
2.1. Localidad e institución donde se desarrolló el proyecto.....	5
2.2. Diseño experimental	5
2.3. Universo o población	5
2.4. Acondicionamiento de las unidades experimentales.....	7
2.5. Preparacion de los medios de cultivo	7
2.5.1. Medio de cultivo HM.....	7
2.5.2. Preparación solución patrón melaza.....	7
2.6. Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	7
2.6.1. Evaluacion de los parametros de cultivos	8
2.6.2. Determinacion del crecimiento poblacional de <i>C. vulgaris</i>	8
2.6.3. Determinacion de lipidos totales	9
2.7. Técnicas de procesamiento y análisis de datos.....	10
III. RESULTADOS.....	11
3.1. Influencia de la melaza como fuente de carbono en el crecimiento poblacional de <i>C. vulgaris</i>	11
3.2. Tasa de crecimiento específico (μ) y tiempo de duplicación diaria (TD) de <i>C. vulgaris</i>	12
3.3. Cuantificación de lípidos totales en masa seca de <i>C. vulgaris</i>	122
3.4. Determinación del porcentaje de lípidos totales en la masa seca de <i>C. vulgaris</i>	13
3.5. pH.....	14

3.6. Temperatura.....	15
IV. DISCUSIÓN.....	16
V. CONCLUSIONES.....	20
VI. RECOMENDACIONES.....	21
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22
VIII. ANEXOS.....	26

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos en los cultivos microalgales de la investigación.	5
Tabla 2. Composición química del medio HM.	7
Tabla 3. Crecimiento poblacional, tasa de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (TD) poblacional (\pm desviación estándar) de los cultivos de <i>C. vulgaris</i> utilizando diferentes concentraciones de melaza	12
Tabla 4. Contenido de masa seca (mg L^{-1}) al quinto día de cultivo de <i>C. vulgaris</i> cultivado con diferentes concentraciones de melaza	13
Tabla 5. Contenido de lípidos totales (%) al quinto día de cultivo de <i>C. vulgaris</i> cultivado con diferentes concentraciones de melaza	14

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Escalamiento de <i>C. vulgaris</i> . a. Cultivo de 20 ml; b. cultivo de 500 ml; c. Cultivo de 2 L.....	6
Figura 2. Cultivo experimental de <i>C. vulgaris</i> en condiciones de laboratorio.	6
Figura 3. Crecimiento poblacional de <i>C. vulgaris</i> con distintas concentraciones de melaza como fuente de carbono orgánico. Las barras de error representan la desviación estándar.	11
Figura 4. Masa seca de <i>C. vulgaris</i> cultivado con diferentes concentraciones de melaza. Las barras de error representan la desviación estándar. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencia estadísticamente significativa.	13
Figura 5. Porcentaje de lípidos totales en la masa seca de <i>C. vulgaris</i> cultivado con diferentes concentraciones de melaza. Las barras de error representan la desviación estándar. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencia estadísticamente significativa.	14
Figura 6. Fluctuación del pH de los tratamientos experimentales de <i>C. vulgaris</i> durante los 5 días de cultivo.....	15
Figura 7. Variación de la temperatura por días de cada tratamiento del cultivo experimental de <i>C. vulgaris</i> con melaza.....	15

I. INTRODUCCIÓN

Las microalgas constituyen un grupo heterogéneo de microorganismos eucariotas, fotosintéticos, caracterizados por tener un rápido crecimiento, debido a su simplicidad estructural (Li *et al.*, 2008), convierten el dióxido de carbono atmosférico en biomasa y clorofilas y numerosos metabolitos (proteínas y lípidos), a través de diversas rutas metabólicas (Boyle & Morgan, 2009) y son los vegetales inferiores productores de compuestos de gran importancia nutricional, farmacéutica e industrial (Deng *et al.*, 2009), son susceptibles a utilizarse en la elaboración de productos químicos o como una fuente de lípidos y almidón que luego pueden ser convertidos en biocombustibles (Boyle & Morgan, 2009).

Tienen la capacidad crecer en condiciones autotróficas con diferentes fuentes de nutrientes inorgánicos (sales minerales), y en condiciones mixotróficas, utilizando sustancias orgánicas (aguas residuales, glucosa, glicerol) (Hu *et al.*, 2008), representando una muy buena fuente de vitaminas, debido al elevado contenido de vitamina C, niacina, riboflavina, tiamina, ácido pantoténico, cianocobalamina, piridoxina y biotina, variando su contenido debido a los diversos factores de cultivo como (temperatura, salinidad, nutrientes) (Xiong *et al.*, 2010); también poseen pigmentos como la astaxantina, el β -caroteno, luteína, cantaxantina y clorofila (Quin *et al.*, 2008). En tal sentido, las microalgas son una fuente de varios productos útiles para los seres humanos, que van de los carbohidratos, ácidos grasos esenciales, pigmentos, complementos alimenticios, fertilizantes, productos farmacéuticos, y los biocombustibles (Hemaiswarya *et al.*, 2011).

Chlorella es un género de algas verdes unicelulares, tiene forma esférica de 2-10 μm de diámetro (Song *et al.*, 2008), sin flagelo. Tiene un ciclo de vida simple que le permite adaptarse a diferentes condiciones ambientales (Brennan & Owende, 2010) y se caracteriza por crecer tanto autotróficamente como heterotróficamente y por eso es un alga mixotrófica (Richmond, 2004), que puede acumular cantidades significativas de valiosos metabolitos finos como lípidos, proteínas, carotenoides y vitaminas, con una amplia aplicación de su materia prima como biodiesel y aditivos alimentarios (Lam & Lee, 2012; Sun *et al.*, 2015).

Una forma de aumentar la densidad celular y el contenido de lípidos es cultivarlo en condiciones heterotróficas o mixotróficas en la que compuestos orgánicos, tales como

azúcares y ácidos orgánicos son utilizados como fuentes de carbono (Abedini *et al.*, 2012). En condiciones heterotróficas o mixotróficas, algunas especies de microalgas pueden metabolizar carbonatos a partir de una variedad de compuestos orgánicos, incluyendo glucosa, como el caso de *Chlorella protothecoides* (Xiong *et al.*, 2010), melaza y ácido acético, así como los compuestos presentes en las aguas residuales y el petróleo (Lee, 2004; Kumar *et al.*, 2010).

Bhatnagar *et al.* (2011) estudiando el cultivo mixotrófico en diferentes especies de microalgas, concluyó que el crecimiento mixotrófico de estas resultó en la producción de biomasa de 3-10 veces más que un cultivo autotrófico; asimismo, Heredia-Arroyo *et al.* (2011) demostraron que la tasa de crecimiento y el contenido de lípidos de *Chlorella vulgaris* en condiciones mixotróficas utilizando glucosa fue superior con respecto a los otros tratamientos (glicerol, acetato).

A pesar que el cultivo mixotrófico ofrece mayores productividades de biomasa y lípidos que bajo condiciones autotróficas, el costo del sustrato de carbono orgánico se estima en alrededor de 80% del costo total del medio de cultivo (Bhatnagar *et al.*, 2011), por otro lado, se considera que la reducción del costo de preparación de medios de cultivo, con efectos no deseados mínimos, es crucial para una potencial aplicación comercial (Li *et al.*, 2013).

Una de las dificultades en la producción de microalgas, es la formulación, preparación y selección de un medio de cultivo químico y económicamente apropiado (Abalde *et al.* 1998). Son numerosas las formulaciones para el enriquecimiento del agua a utilizar en los diferentes volúmenes del sistema de obtención masiva de microalgas. Tradicionalmente, se han utilizado los medios nutritivos convencionales como Provasoli, Walne, Guillard entre otros. Sin embargo, éstos tienen costos elevados, lo que constituye un límite de la capacidad productiva en laboratorios (Acién *et al.*, 2012), creando la necesidad de evaluar otros medios que brinden buena calidad nutricional, permitan mejorar el rendimiento microalgal y a la vez disminuyan los costos de producción en cultivos masivos (Day *et al.*., 2009). En este contexto, el glicerol, el acetato y los hidratos de carbono obtenidos a partir de residuos agrícolas e industriales, como la melaza, ofrecen una gran promesa como sustratos orgánicos de bajo costo para el cultivo mixotrófico de microalgas (Bhatnagar *et al.*, 2011; Heredia-Arroyo *et al.*, 2011).

La melaza es un subproducto de la industria azucarera y es considerada como fuente de carbono orgánico de bajo costo que puede utilizarse para crecimiento y bioproducción de lípidos en las algas (Fajardo & Sarmiento, 2007), conteniendo aproximadamente 14% de glucosa libre, 60% de sacarosa, 16% de agua, 9% de ceniza, 3% de proteínas y 0.4% de lípidos, además de otros nutrientes incluyendo vitaminas y oligoelementos (Téllez, 2004), que mediante tratamiento físico es una fuente de carbono orgánico para el cultivo de una serie de microorganismos.

El uso de la melaza de caña de azúcar ha sido evaluada ampliamente en el cultivo de microalgas, así tenemos lo realizado por Kshipra *et al.* (2013) que trabajando con diferentes fuentes de carbono (glucosa, glicerol, succinato y melaza) obtuvo un mayor contenido de lípidos (3.07 g) usando melaza en *Chlorella minutissima* utilizando 2 g.L⁻¹ de melaza; Dubey *et al.* (2015) en *Chlorella minutissima* obtuvo un 36 % de contenido de lípidos con el tratamiento de 1 g.L⁻¹ de glucosa, así mismo Reyes, J. (2014) obtuvo 16.17%, 10.33% y 11.20% de lípidos usando 0.5 g.L⁻¹, 1 g.L⁻¹ y 2 g.L⁻¹ de melaza en el cultivo experimental de *T. suecica*. En base a lo anteriormente mencionado consideramos pertinente plantearnos el siguiente problema: ¿Cuál es el efecto de tres concentraciones de melaza en el crecimiento poblacional y contenido de lípidos en *Chlorella vulgaris*, en condiciones de laboratorio?

1.1. Hipótesis

Si en condiciones de laboratorio, se usan tres concentraciones de (0.5, 1.0 y 2.0 g L⁻¹) de melaza de caña de azúcar como fuente de carbono orgánico en *C. vulgaris*, se obtendrá un mayor crecimiento y una mayor producción de lípidos con la dosis de 1.0 g L⁻¹.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

- Determinar el efecto de tres concentraciones de melaza como fuente de carbono orgánico en el crecimiento y contenido de lípidos de *C. vulgaris* en condiciones de laboratorio.

1.2.2. Objetivos específicos

- Determinar el efecto de tres concentraciones (0.5, 1.0 y 2.0 g L⁻¹) de la melaza como fuente de carbono orgánico en el crecimiento poblacional de *C. vulgaris*.
- Determinar el efecto de tres concentraciones (0.5, 1.0 y 2.0 g L⁻¹) de melaza como fuente de carbono orgánico en el contenido de lípidos en *C. vulgaris*

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Localidad e institución donde se desarrolló el proyecto.

El presente proyecto se realizó en el laboratorio de cultivos de especies auxiliares de la Universidad Nacional del Santa, ubicada en el distrito de Nuevo Chimbote, Provincia del Santa, Departamento de Ancash - Perú.

2.2. Diseño experimental

En la investigación se empleó el diseño estímulo creciente, con tres tratamientos y un grupo control HM (Merino, 1999) y tres repeticiones cada uno (Tabla 1).

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

TRATAMIENTOS	ESPECIFICACIONES
C	Medio HM
T1	Medio HM + 0.5 g. L ⁻¹ de melaza
T2	Medio HM + 1.0 g. L ⁻¹ de melaza
T3	Medio HM + 2.0 g. L ⁻¹ de melaza

2.3. Universo o población

El cultivo de *C. vulgaris* se obtuvo del Laboratorio de Cultivos de Especies Auxiliares de la Universidad Nacional del Santa a partir de la cual se realizó escalamiento (Fig. 1), la misma que se mantuvo en medio HM en tubos de ensayo de 20 mL e iluminados con un fluorescente de 40 w, hasta su utilización en el experimento. Posteriormente, los tubos de ensayo con *C. vulgaris* se desdoblaron a 2 matraces de 500 mL, estos cultivos se mantuvieron por 4 días con iluminación constante y fueron agitados manualmente dos veces al día. Luego se llevaron a dos botellas con un volumen de 2000 mL con iluminación y aireación constante durante 4 o 5 días, para luego ser utilizados como inóculos para las experiencias.

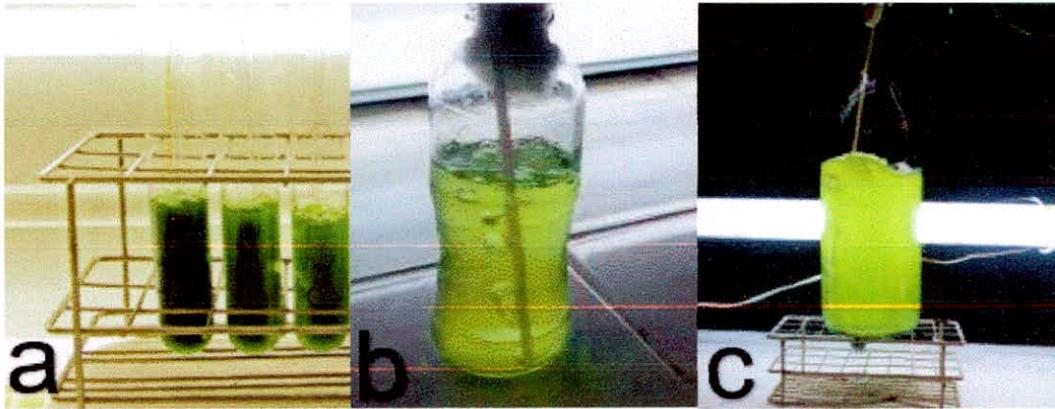


Figura 1. Escalamiento de *C. vulgaris*. a. Cultivo de 20 ml; b. cultivo de 500 ml; c. Cultivo de 2 L.

2.4. Acondicionamiento de las unidades experimentales

Para el cultivo experimental de *C. vulgaris* se utilizó 10 botellas plásticas de 3 L. de capacidad, utilizando potable, se dosificó con medio HM en condiciones de laboratorio, en cada botella se trabajó con un volumen efectivo de un litro (Fig. 2)



Figura 2. Cultivo experimental de *C. vulgaris* en condiciones de laboratorio.

2.5. Preparación de los medios de cultivo.

2.5.1. Medio de cultivo HM.

El medio de cultivo HM (Tabla 2) que se utilizó para los inóculos de *C. vulgaris* durante la experiencia, se preparó según lo propuesto por Merino (1999).

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

2.5.2. Preparación solución patrón melaza.

Se pesó 100 g de melaza y se agregó a una probeta con capacidad de 1000 ml, y enrazará con agua potable hasta 500 ml. Posteriormente se mezclará hasta homogenizarla. Después se vertirá en un matraz de vidrio y con la ayuda de una cocina eléctrica se hervirá hasta que el homogenizado llegue a una temperatura de 80 °C aproximadamente, por 15 min. Luego se retirará el homogenizado y se enfriará a temperatura ambiente, según Encomendero & Uchpa, (2001). La dosificación será de 0.5, 1.0 y 2.0 g. L⁻¹ de melaza para los tres tratamientos respectivamente.

2.6. Técnicas e instrumentos de recolección de datos.

El cultivo para todos los tratamientos será de 1000 ml. de agua, y se cultivarán en botellas plásticas de capacidad 1500 ml, diariamente a una determinada hora (4 horas) se realizará el conteo celular respectivo con la ayuda de una cámara de Neubauer mejorada de 0.1 mm de profundidad modelo Manienfeld y un microscopio óptico Olympus modelo CX31RBSFA. Se medirá la irradiación lumínica con un

luxómetro EXTECH 401025. Se determinará el contenido de lípidos según Bligh et al., (1959).

2.6.1. Evaluación de los parámetros de cultivos.

Se registraron diariamente las variaciones de la temperatura con un termómetro digital marca BOECO ($\pm 0,1$ °C) de sensibilidad y el pH con un pH-metro digital marca OAKCTO ($\pm 0,01$) de sensibilidad.

2.6.2. Determinación del crecimiento poblacional de *C. vulgaris*

El crecimiento poblacional se determinó durante 5 días por conteos diarios del número de células por cada unidad experimental. Para ello se colocó 1 mL de la suspensión microalgal en la cámara Neubauer con una micropipeta Pasteur y se observó en un microscopio binocular marca Olympus a un aumento de 40 X.

En base al conteo diario del número de células, se graficó las curvas de crecimiento poblacional, y se determinó la tasa de crecimiento poblacional diaria (μ) y el tiempo de duplicación diaria (TD), según Guillard (1975) mediante las fórmulas:

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

Dónde:

N_b: Número de células por mL⁻¹ (cel/ml)

$\Sigma \text{cel. } C_b$: Suma de células en 4 cuadrantes externos de la cámara Neubauer.

$$\mu = \frac{\ln(N_f/N_0)}{T_f - T_0} \qquad TD = \frac{\ln(2)}{\mu}$$

Dónde:

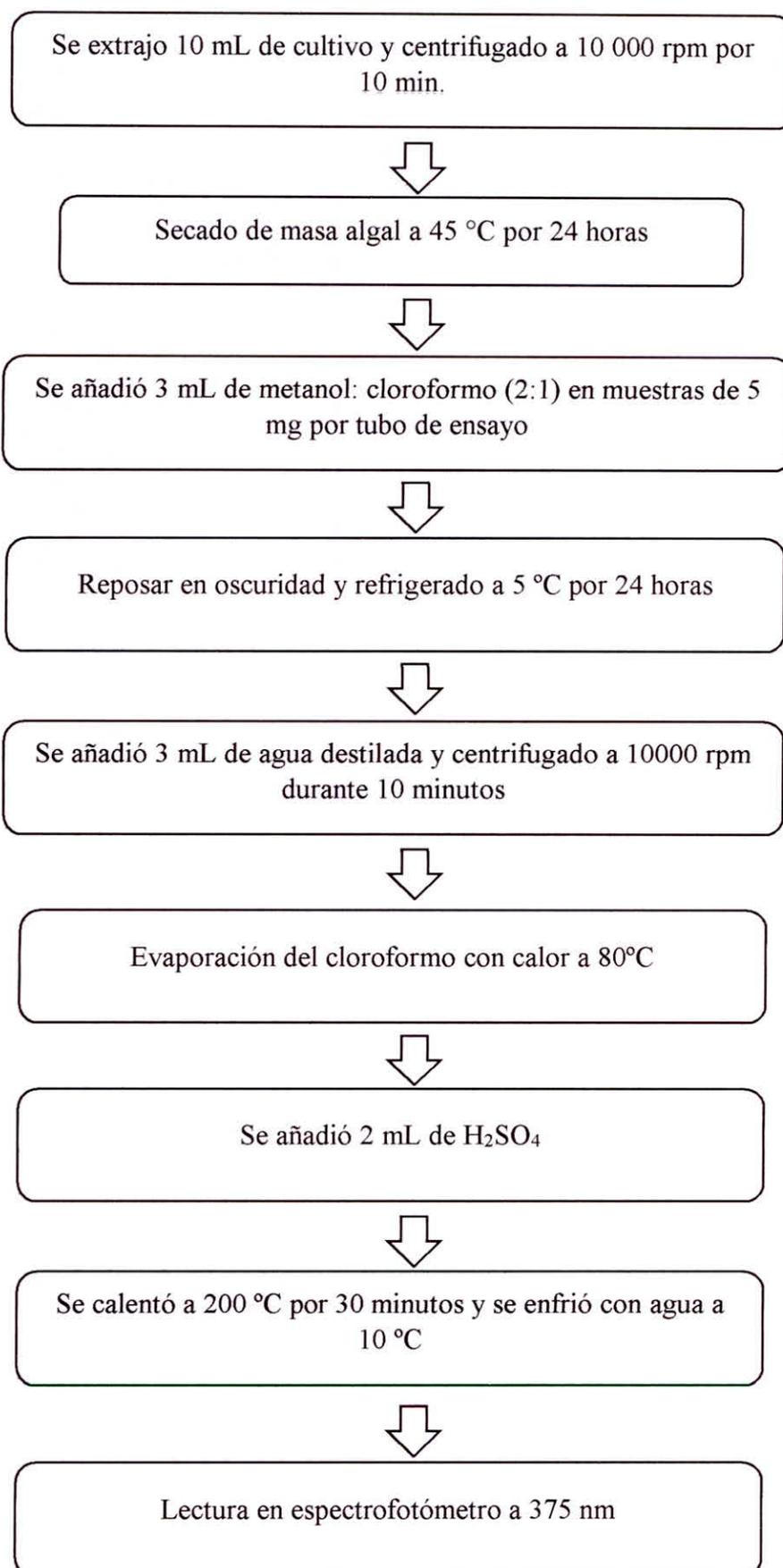
N₀: Número inicial de células

N_f: Número final de células

T₀: Tiempo inicial

T_f: Tiempo final

2.6.3. Determinación de lípidos totales



La ecuación general para determinar el contenido, en % y en mg L⁻¹, de los lípidos son las siguientes:

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

Dónde:

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

M: Peso de muestra seca (mg)

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

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

Dónde:

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

M: Pesos de muestra seca (mg)

B: Biomasa seca total por litro (mg)

2.7. Técnicas de procesamiento y análisis de datos.

Los resultados obtenidos durante el muestreo se sometieron al análisis de varianza (ANOVA) de una vía para establecer diferencias entre sus promedios y seguido se utilizó la prueba de Tukey con un nivel de significancia de 5% a fin de establecer diferencias significativas entre los promedios de los tratamientos a través del programa estadístico IBM SPSS Statistics versión 25.

III. RESULTADOS

3.1. Influencia de la melaza como fuente de carbono en el crecimiento poblacional de *C. vulgaris*.

Los tratamientos iniciaron con un promedio de biomasa de *C. vulgaris* de 1.64×10^5 cel/mL⁻¹, el cual se incrementaron con el tiempo. En el primer día de cultivo el menor valor promedio de biomasa de *C. vulgaris* fue con el tratamiento de 1.0 g.L⁻¹ de melaza obteniendo 2.16×10^5 cel/mL⁻¹ y el mayor valor se obtuvo con el tratamiento de 0.5 g.L⁻¹ de melaza correspondiendo 3.17×10^5 cel/mL⁻¹.

En el segundo día se obtuvieron menores valores de biomasa en los tratamientos dosificados con 0.5 g.L⁻¹ y 2.0 g.L⁻¹ con valores de 5.95×10^5 cel/mL⁻¹ y 5.31×10^5 cel/mL⁻¹ respectivamente mientras que los valores más altos de 7.63×10^5 cel/mL⁻¹ y 7.16×10^5 cel/mL⁻¹ se determinaron con el tratamiento control y con 1.0 g.L⁻¹ respectivamente.

En el tercer día se presentaron menores valores en los cultivos dosificados con 1.0 g.L⁻¹ y 2 g.L⁻¹ (10.98×10^5 cel/mL⁻¹ y 11.2×10^5 cel/mL⁻¹ respectivamente) por otro lado los mayores valores fueron con los tratamientos 0.5 g.L⁻¹ y control con valores de 20.4×10^5 cel/mL⁻¹ y 19.75×10^5 cel/mL⁻¹ respectivamente. A partir del cuarto día se evidencio disminución de la población algal y comenzó la fase de muerte.(fig.3)

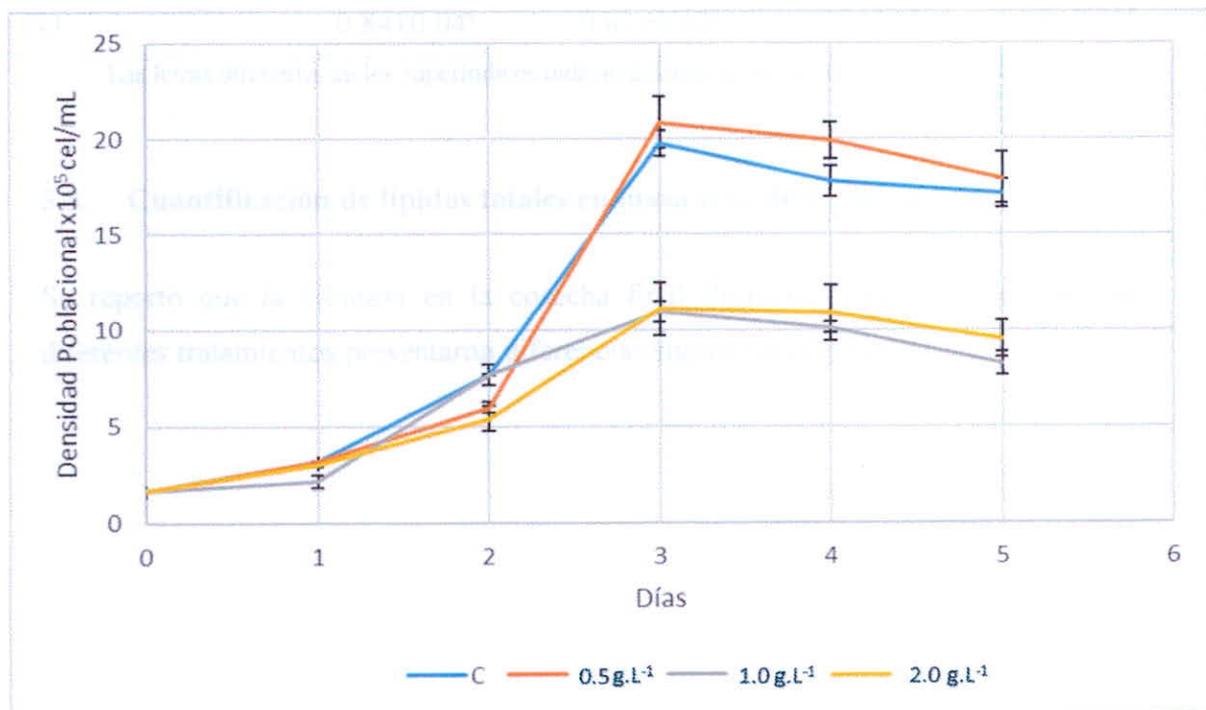


Figura 3. Crecimiento poblacional de *C. vulgaris* con diferentes concentraciones de melaza como fuente de carbono orgánico. Las barras de error representan la desviación estándar.

En la experiencia realizada por Liu *et al.* (2011) con *Chlorella zofingiensis* utilizando melaza, obtuvo una tasa de crecimiento de 0.56 día^{-1} mientras que Reyes, J. (2014) utilizando como medio orgánico una concentración de 1.0 g.L^{-1} de melaza, obtuvo 0.8103 día^{-1} , justificando que esto se debe a al valioso aporte de las sales minerales, azúcares y otras sustancias presentes en la melaza que permite incrementar la actividad fotosintética.

Si bien se ha demostrado que la adición de carbono favorece a los cultivos, algunos compuestos carbonados son asimilados más fácilmente debido a las rutas metabólicas que disponen las microalgas para su incorporación y la complejidad de estas moléculas (Bermúdez *et al.*, 2002). Los sustratos orgánicos, como la melaza, por ejemplo, pueden ser asimilados directamente por las microalgas (en presencia de luz), a diferencia del CO_2 que requiere de un rompimiento oxidativo para su asimilación (Yu *et al.*, 2011). Los sustratos de carbono orgánico, que reemplazan al CO_2 , tienen mayor facilidad para incorporarse en las células, a la vez que cumplen el mismo rol como fuente de carbono para componer el material celular. En este sentido, las microalgas son capaces de tomar carbohidratos, como glucosa directamente y transformarlos en biomoléculas (Miao & Wu, 2006).

En el contenido de lípidos totales se obtuvo 112.24 mg.L^{-1} en el tratamiento con 2.0 g.L^{-1} de melaza, siendo este tratamiento mayor con respecto al tratamiento control con 55.33 mg.L^{-1} , asimismo, posee diferencia significativa con respecto a los demás tratamientos; 0.5 g.L^{-1} y 1.0 g.L^{-1} de melaza. En tal sentido todos los tratamientos superaron al tratamiento control demostrando el valor potencial de la melaza como medio orgánico para el cultivo de microalgas. Reyes, J. (2014) Reporta resultados de 97.40 mg.L^{-1} en el tratamiento con 0.5 g.L^{-1} de melaza en cultivos de *T. suecica*, de igual modo Mostafá *et al.*, (2012) obtuvieron 121.5 mg L^{-1} , 135.8 mg.L^{-1} y 135.2 mg.L^{-1} de lípidos utilizando 1, 3 y 5 g.L^{-1} de melaza, mientras que Kshipra *et al.* (2013) con 2 g.L^{-1} de melaza obtuvo mayor contenido de lípidos (307 mg.L^{-1}) en *Chlorella minutissima*. En este contexto podemos inferir que la melaza al ser un compuesto orgánico influye positivamente en el contenido de lípidos en las microalgas, captando la fuente carbonada presentes en la melaza y favorecer el metabolismo y formación de lípidos.

En cuanto al porcentaje de lípidos fue de 24.36 % para el tratamiento con 0.5 g.L⁻¹ de melaza, 18.53 % en el tratamiento con 1.0 g.L⁻¹ de melaza y 25.22 % en el tratamiento con 2.0 g.L⁻¹ de melaza, mientras, que en el tratamiento control obtuvo 14.45 % de lípidos. Basándose en el análisis estadístico el tratamiento 0.5 g.L⁻¹ y 2.0 g.L⁻¹ de melaza no poseen diferencia significativa. Sin embargo estos se diferencian de los tratamientos control y 1.0 g.L⁻¹ de melaza. En los resultados obtenidos por Miao & Wu, (2006) quienes utilizaron 10 g L⁻¹ de melaza en el medio de cultivo para el crecimiento de *Chlorella protothecoides*, obtuvieron un porcentaje de lípidos de 55%, Dubey *et al.* (2015) en *Chlorella minutissima* obtuvo un 36 % de contenido de lípidos con el tratamiento de 1 g.L⁻¹ de glucosa, mientras que los resultados obtenidos fueron mayores a los obtenidos por mismo Reyes, J. (2014) quien obtuvo 16.17%, 10.33% y 11.20% de lípidos usando 0.5 g.L⁻¹, 1 g.L⁻¹ y 2 g.L⁻¹ de melaza con *T. suecica*. La falta o limitación de nitrógeno en los medios de cultivo de microalgas se considera como el principal estrés nutricional involucrado en la acumulación de lípidos y de metabolitos secundarios (Gouveia & Oliveira, 2009), en tal sentido es importante definir la influencia de factores que intervienen en el crecimiento y que favorecen la producción de lípidos Arias *et al.* (2013). Debido a la ausencia de nitrógeno en la melaza se facilita el proceso metabólico para la acumulación de lípidos en la microalga. Teniendo una composición de 14% de glucosa libre, 60% de sacarosa, 16% de agua, 9% de ceniza, 3% de proteínas y 0.4% de lípidos, además de otros nutrientes incluyendo vitaminas y oligoelementos (Téllez, 2004).

El crecimiento mixotrófico es un modo potencial para el cultivo masivo de microalgas y cianobacterias, particularmente adecuado para la producción de compuestos bioactivos de alto valor y productos químicos finos (Yu *et al.*, 2011), así mismo Yamane *et al.*, (2001) informaron que alrededor del 15% - 19% de lípidos se obtuvo en el cultivo mixotrófico. La característica del cultivo mixotrófico es el uso de fuentes de carbono orgánicas (glucosa, fructosa, sacarosa, glicerol, acetato de sodio, ácido acético) e inorgánicas (CO₂) en presencia de luz que son asimiladas mediante diferentes metabolismos, aumentando la producción de biomasa, otra ventaja es la productividad de lípidos y biomasa de 3 a 10 veces superior a la generada en cultivos fotoautótrofos. (Li, Y. *et al.*, 2014)

En tal sentido de acuerdo a nuestros resultados se evidenció que la producción de lípidos usando melaza como fuente de carbono con dosis de 0.5, 1.0 y 2.0 g.L⁻¹ fueron mejores que los controles por su influencia de carbono orgánico y nitrógeno.

V. CONCLUSIONES

- Se observó mayor crecimiento poblacional en el tercer día del cultivo dosificado con 0.5 g.L^{-1} con un valor de $20.4 \times 10^5 \text{ ml.L}^{-1}$ y tasa de crecimiento específico (μ) de 0.84 d^{-1} , siendo estadísticamente igual al tratamiento control.
- Se observó mayor contenido de lípidos en el quinto día de cultivo con el tratamiento de 2.0 g.L^{-1} (25.22 %) mostrando diferencias significativas con el tratamiento control y el tratamiento con 1.0 g.L^{-1} de melaza.

VI. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios bioquímicos con la finalidad de precisar la ruta metabólica que sigue el carbono contenido en la melaza en la formación de lípidos en la microalga *Chlorella vulgaris*.
- Realizar estudios para determinar la influencia de las fuentes nitrogenadas y carbonadas de la melaza en la producción de proteínas y pigmentos en *Chlorella vulgaris*.
- Escalar resultados y posibilidades de producción masiva y económica.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abalde J., Cid A., Fidalgo P., Torres E., Herrero C. 1998. Microalgas, cultivo y aplicaciones. Editado por la Universidad de Coruña. Coruña, España. 210 pp.
- Abedini, H., M. Malekzadeh, M. Vossoughi & G. Pazuki. 2012. Effect of various carbon sources on biomass and lipid production of *Chlorella vulgaris* during nutrient sufficient and nitrogen starvation conditions. *Bioresource Technology*, 180: 311-317.
- Acién G., J. Fernández, J. Magán & E. Molina. 2012. Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it. *Biotechnology Advances* 30: 1344-1353.
- Andrade, M., & J. Costa. 2007. Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. *Aquaculture*, 264: 130-134.
- Arias M., Cañizares, R. & Martinez, A. 2013. Producción de biodisel a partir de microalgas: parámetros del cultivo que afectan a la producción de lípidos. *ACTA BIO COLOMB.* 18 (1): 43-68
- Attilio, C., A. Casazza, E. Ortiz, P. Perego & M. Del Borghi. 2009. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. 48: 1146-1151.
- Bermúdez, J., J. Lodeiros & M. Morales. 2002. Producción de biomasa de la microalga marina *Chroomonas* sp, en función del pH, intensidad luminosa y salinidad. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras* 31: 167-185.
- Bhatnagar, A., S. Chinnasamy, M. Singh & K.C. Das. 2011. Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters. *Applied Energy*, 88 (10): 3425-3431.
- Boyle, N., & J. Morgan. 2009. Flux balance analysis of primary metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *BMC System Biology*, 3(4): 1-14.

- Brennan L., Owende P. 2010. Biofuels from microalgae - A review of technologies for production processing, and extractions of biofuels and coproducts. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14: 557-577.
- Deng, X., Y. Li, X. Fei. 2009. Microalgae: a promising feedstock for biodiesel African. *Journal Microbiological Research*, 3: 1008–1014.
- Day AG, D Brinkmann, S Franklin, K Espina, G Rudenko, A Roberts & KS Howse. 2009. Safety evaluation of a high-lipid algal biomass from *Chlorella protothecoides*. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 55: 166-180.
- Dubey K., K. Kumar, S. Dixit, D. Kumar, P. Kumar, & D. Jawed. 2015. Implication of industrial waste for biomass and lipid production in *Chlorella minutissima* under autotrophic, heterotrophic, and mixotrophic grown conditions. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 176, 1581–1595.
- Encomendero, L & F. Uchpa. 2001. Evaluacion del ensilado biológico a partir de desechos de “Concha de abanico” *Argopecten purpuratus*, de la empresa ACUAPESCA S.A.C (Casma-Peru), Universidad Nacional del santa, Nuevo Chimbote.
- Fajardo, E. & Sarmiento, S. 2007. Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Pontifica Universidad Javeriana. Bogota.
- Gouveia, L. & Oliveira. A. 2009. Microalgae as a raw material for biofuels production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 36: 269-274.
- Hemaiswarya, S., R. Raja, R. Ravi Kumar, V. Ganesan, C. Anbazhagan. 2011. Microalgae: a sustainable feed source for aquaculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27: 1737-1746
- Heredia-Arroyo, T., W. Wei, R. Ruan & B. Hu. 2011. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials. *Biomass Bioenergy*, 35 (5): 2245-2253.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, Darzins, A.I. 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstock for biofuel production: perspectives and advances. *Plant Journal*, 54 (4): 621-639.

- Kumar, A., S. Ergas, X. Yuan, Ashish Sahu, Q. Zhang, J. Dewulf, F. X. Malcata, & H. van Langenhove, 2010. Enhanced CO₂ fixation and biofuel production via microalgae: recent developments and future directions. *Trends in Biotechnology*, 28 (7): 371-380.
- Kshipra, G., A. Pareek & D. Sharma. 2013. Biochemical composition of green alga *Chlorella minutissima* in mixotrophic cultures under the effect of different carbon sources. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 116 (5): 624-627.
- Lam, M.K., & K.T. Lee. 2012. Potential of using organic fertilizer to cultivate *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Applied Energy*, 94: 303-308.
- Lee, Y. K. 2004. Algal nutrition: heterotrophic carbon nutrition. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Ed. Amos Richmond. Blackwell Publishing, Ltd. 577 pp.
- Li, T., Y. Zheng, L. Yu, & S. Chen. 2013. High productivity cultivation of a heat-resistant microalga *Chlorella sorokiniana* for biofuel production. *Bioresource Technology*, 131: 60-67.
- Li, Y., C., Xie, & J. Chen. 2014. Comparison of Autotrophic and Mixotrophic Cultivation of Green Microalgal for Biodiesel Production. *Energy Procedia*. 52: 371–376.
- Li, Y., M. Horsman, N.Wu, C. Lan & N. Dubois-Calero. 2008. Biofuels from Microalgae. *Biotechnology Progress*, 24: 815-820.
- Liu, J. *et al.* 2011. Molasses-based growth and production of oil and astaxanthin by *Chlorella zofingiensis*. *Bioresource Technology*, 107: 393-398.
- Maldonado, C. 2011. Inducción lipídica por limitación de nutrientes en las microalgas *Scenedesmus dimorphus* y *Chlorella sorokiniana*. Tesis para obtener el grado de maestra en ciencia y tecnología ambiental. 183 pp.
- Mandal S. & N. Mallick. 2009. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. *Applied Microbiology Biotechnology*, 84:281-291.
- Merino F. 2000. Utilización de Melaza como Fuente Orgánica de Carbono en la Producción Masiva de Microalgas. Universidad Nacional del Santa. Nuevo Chimbote, Perú
- Miao, X., & W. Wu. 2006. Biodiesel production from heterotrophic microalgae oil. *Bioresource Technology*, 97, 841-846.

- Mostafa, M., Mohamed, Y., Mohamed, E., Osman, M. 2012. 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.
- Qin S., L. G and Z. Hua. 2008. The accumulation and metabolism of astaxanthin in *Scenedesmus obliquus* (*Chlorophyceae*). Biochemistry Process, 43: 795-802.
- Reyes, J. 2014. 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. 51 pp.
- Richmond, A. 2004. Microalgal Culture - Biotechnology and Applied Phycology. Blackwell Science, 4: 214-226.
- Song, D., Fu J., Shi D. 2008. Exploitation of oil-Bearing Microalgae for Biodiesel. Chin. Journal Biotechnology, 24: 341-348.
- Sun, Z., Z. Zhou, H. Gerken, F. Chen & J. Liu. 2015. Screening and characterization of oleaginous *Chlorella* strains and exploration of photoautotrophic *Chlorella* protothecoides for oil production. Bioresource Technology, 184: 53-62.
- Tellez, D. 2004. Caracterización de las melazas empleadas en el proceso fermentativo de la destilería San Martin. Universidad del Valle. Colombia.
- Xiong, W., C. Gao, D. Yan, C. Wu, Q. Wu, 2010. Double CO₂ fixation in photosynthesis-fermentation model enhances algal lipid synthesis for biodiesel production. Bioresource Technology, 101: 2287-2293
- Yamane, T., M. Watanabe & K. Sasaki. 2001. Biomass Production in Mixotrophic Culture of *Euglena gracilis* under Acidic Condition and Its Growth Energetic, Biotechnology Letters, 23 (15): 1223-1228.
- Yu G., D. Shi, Cai Z., W. Cong & F. Ouyang. 2011. Growth and Physiological Features of Cyanobacterium *Anabaena sp.* Strain PCC 7120 in a Glucose-Mixotrophic Culture. Biotechnology and Bioengineering Chinese Journal of Chemical Engineering, 191: 108-115.
- Wang, C., Li, H., Wang, Q & Wei P. 2010. Effect of pH on growth and lipid content of *Chlorella vulgaris* cultured in biogas slurry. College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, 26(8):1074-9.

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Densidades celulares ($\times 10^5$ cél.mL⁻¹) diarias en los cultivos de *C. vulgaris* utilizando diferentes concentraciones de melaza.

DIAS	TRATAMIENTO											
	CONTROL			T1			T2			T3		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
0	1.64	1.64	1.64	1.64	1.64	1.64	1.64	1.64	1.64	1.64	1.64	1.64
1	3.21	3.05	3.17	3.18	3.14	3.22	1.98	2	2.53	2.95	3.16	2.92
2	7.63	7.58	7.67	6.23	5.66	5.99	7.10	7.60	8.20	5.14	6.10	4.88
3	20.1	19	20.20	21	22.10	19.40	10.50	10.80	11.50	11.80	12	9.5
4	17.9	18.50	16.90	20.4	20.50	18.80	9.90	10	10.40	11.58	11.8	9.18
5	17.2	17.80	16.30	19.5	16.90	17.40	8.20	8.80	7.60	10.22	9.9	8.4

	N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error	95% del intervalo de confianza para la media	
					Límite inferior	Límite superior
Control	3	17,1000	,75498	,43589	15,2245	18,9755
T1	3	17,9333	1,37961	,79652	14,5062	21,3605
T2	3	8,2000	,60000	,34641	6,7095	9,6905
T3	3	9,5067	,97167	,56099	7,0929	11,9204
Total	12	13,1850	4,63502	1,33802	10,2400	16,1300

HSD Tukey

(I) T	(J) T	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Control	T1	-,83333	,79346	,727	-3,3743	1,7076
	T2	8,90000*	,79346	,000	6,3591	11,4409
	T3	7,59333*	,79346	,000	5,0524	10,1343
T1	Control	,83333	,79346	,727	-1,7076	3,3743
	T2	9,73333*	,79346	,000	7,1924	12,2743
	T3	8,42667*	,79346	,000	5,8857	10,9676
T2	Control	-8,90000*	,79346	,000	-11,4409	-6,3591
	T1	-9,73333*	,79346	,000	-12,2743	-7,1924
	T3	-1,30667	,79346	,408	-3,8476	1,2343
T3	Control	-7,59333*	,79346	,000	-10,1343	-5,0524
	T1	-8,42667*	,79346	,000	-10,9676	-5,8857
	T2	1,30667	,79346	,408	-1,2343	3,8476

Anexo 2. Contenido de lípidos de *C. vulgaris* en diferentes concentraciones de melaza.

Lípidos	TRATAMIENTO											
	CONTROL			T1			T2			T3		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Porcentaje %	13.84	14.76	14.75	24.48	22.60	26.00	18.68	18.28	18.64	25.25	24.6	25.82
Masa seca mg.L ⁻¹	54.86	54.66	56.48	105.4	105.1	105.14	66.7	64.9	68	112.43	112.6	111.68

	N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error	95% del intervalo de confianza para la media	
					Límite inferior	Límite superior
Control	3	14,4500	,52830	,30501	13,1376	15,7624
T1	3	24,3600	1,70317	,98333	20,1291	28,5909
T2	3	18,5333	,22030	,12719	17,9861	19,0806
T3	3	25,2233	,61044	,35244	23,7069	26,7397
Total	12	20,6417	4,67100	1,34840	17,6739	23,6095

HSD Tukey

(I) T	(J) T	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Control	T1	-9,91000*	,77471	,000	-12,3909	-7,4291
	T2	-4,08333*	,77471	,003	-6,5642	-1,6024
	T3	-10,77333*	,77471	,000	-13,2542	-8,2924
T1	Control	9,91000*	,77471	,000	7,4291	12,3909
	T2	5,82667*	,77471	,000	3,3458	8,3076
	T3	-,86333	,77471	,691	-3,3442	1,6176
T2	Control	4,08333*	,77471	,003	1,6024	6,5642
	T1	-5,82667*	,77471	,000	-8,3076	-3,3458
	T3	-6,69000*	,77471	,000	-9,1709	-4,2091
T3	Control	10,77333*	,77471	,000	8,2924	13,2542
	T1	,86333	,77471	,691	-1,6176	3,3442
	T2	6,69000*	,77471	,000	4,2091	9,1709

Anexo 3. Valores de la temperatura (°C) diaria en los cultivos de *C. vulgaris* utilizando diferentes concentraciones de melaza.

Días	TRATAMIENTO											
	CONTROL			T1			T2			T3		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
0	23.00	23.00	23.00	23.1	23.1	23	23.1	23	23.1	23.0	23.0	23.0
1	23.2	23.1	23.2	23.2	23.00	23.1	23.2	23.2	23	23.2	23.1	23.2
2	24.0	24.1	24.1	24.1	24.1	24.1	24.1	24	24	24.2	24.2	24.1
3	24.5	24.5	24.6	24.4	24.5	24.4	24.6	24.5	24.5	24.5	24.5	24.5
4	24.7	24.7	24.7	24.7	24.5	24.7	24.6	24.5	24.6	24.7	24.6	24.7
5	25.00	25.00	24.90	25.1	25.1	25.1	25.1	25	25	25.3	24.2	25.3