

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



EFFECTO DE CUATRO CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO DEL ENSILADO DE PARTES BLANDAS DE *Argopecten purpuratus* "CONCHA DE ABANICO", EN EL CRECIMIENTO POBLACIONAL Y CONTENIDO DE LIPIDOS TOTALES DE *Scenedesmus sp.* CULTIVADA EN CONDICIONES DE LABORATORIO

TESIS PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE BIOLOGIO ACUICULTOR

AUTORES: **Bach. Jiménez Arteaga Marylin Lisvet**
 Bach. Rojas Salvador Irwin Gustavo

ASESOR: **M.S.C. Willian Capa Robles**

Nuevo Chimbote, 2015

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

PROYECTO DE TESIS



EFFECTO DE CUATRO CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO DEL ENSILADO DE PARTES BLANDAS DE *Argopecten purpuratus* "CONCHA DE ABANICO", EN EL CRECIMIENTO POBLACIONAL Y CONTENIDO DE LIPIDOS TOTALES DE *Scenedesmus sp.* CULTIVADA EN CONDICIONES DE LABORATORIO

TESIS PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE BIOLOGIO ACUICULTOR

AUTORES: Bach. Jiménez Arteaga Marylin Lisvet
 Bach. Rojas Salvador Irwin Gustavo

REVISADO Y APROBADO:

Dr. Fernando Merino Moya
Presidente

Blgo. Acui. Juan Carhuapoma Garay
Secretario

M.Sc. Willian Capa Robles
Miembro

Nuevo Chimbote, Diciembre 2015

DEDICATORIA

A Dios porque a sido mi escudo y mi fortaleza para emprender cada paso que doy, cuidándome y brindándome sabiduría para continuar en este largo camino.

A mis dos grandes orgullos a mis padres Magda y Rodolfo quienes han sido mi motor ,mi empuje en este largo camino profesional , ellos que en mis caídas me supieron levantar y darme siempre motivación a seguir adelante siempre velando por mi bienestar y educación siendo mi apoyo en todo momento. Depositando su entera confianza en cada reto que se me presentaba.

A mis abuelitos Lidia y Pablo quienes desde el cielo guían mi camino

A mi hermano Brolin porque me ha brindado su apoyo en todo momento.

Marylin

A Dios pro la oportunidad d ela vida, a mi madre y hermana que son los dos luceros que giluminan cada uno de mis pasos y la motivación para querer eguir siempre adelante, a mis viejitos Juan y Balvina que desde el cielo guian mi sendero por la vida protegiendo y cuidándome ante el temor d ela duda,

A ellos todos y cada uno d e mis logros en esta vida

Gustavo

AGRADECIMIENTO

Aprendimos, que no se puede dar marcha atrás, que la esencia de la vida es ir hacia adelante. En realidad, la vida es una calle de sentido único. Gracias Dios mío por esa gran elección.

Una gran persona que desde el primer momento que acudimos a él no dudo en brindarnos su ayuda a nuestro querido profesor , amigo y asesor M.Sc. Willian Capa Robles , que gracias a sus valiosos conocimientos , a su tiempo y dedicación nos ayudó a siempre y seguir adelante para poder culminar con gran satisfacción nuestra tesis.

De manera especial a: Oscar Chauca por su generosa colaboración desinteresada.

A los docentes de la Escuela Académica Profesional de Biología en Acuicultura , quienes nos han brindado sus conocimientos para que así podamos superarnos en lo largo de nuestra carrera profesional , gracias por saber escuchar y ser más que docentes y convertirse en amigos .

A nuestra amiga: Susan Salyrosas Castillejos que nos brindó su apoyo incondicional

INDICE

DEDICATORIA.....	I
AGRADECIMIENTOS.....	II
INDICE DE FIGURAS.....	III
INDICE DE TABLAS.....	IV
RESUMEN.....	V
ABSTRACT.....	VI
I. INTRODUCCION.....	01
II. MATERIALES Y METODOS.....	04
2.1. Localización del experimento.....	04
2.2. Material Experimental.....	04
2.2.1.- Microalga <i>Scenedesmus</i> sp.....	04
2.3. Obtención del inóculo algal.....	05
2.4. Acondicionamiento de las unidades experimentales.....	06
2.5. Medios de cultivo.....	08
2.5.1. Medio HM.....	08
2.5.2. Medio ensilado de parte blandas de concha de abanico (EPBCA)	
2.5.2.1. Preparación del EPBCA.....	08
2.5.2.2.-Obtención del extracto acuoso del EPBCA.....	10
2.6. Registros de parámetros ambientales.....	11
2.7. Determinación de crecimiento poblacional.....	12
2.8. Determinación de lípidos totales.....	12
2.9. Determinación de biomasa.....	15
2.10. Análisis Estadístico de los datos.....	15
III. RESULTADOS.....	16
3.1. Parámetros ambientales del cultivo de <i>Scenedesmus</i> sp.....	16
3.1.1. Temperatura.....	17
3.1.2. Ph.....	17
3.2. Crecimiento poblacional de <i>Scenedesmus</i> sp.....	18

3.3. Tasa de crecimiento y tiempo de duplicación de <i>Scenedesmus</i> sp.....	21
3.4. Contenido de lípidos en <i>Scenedesmus</i> sp.....	22
IV. DISCUSION.....	25
V. CONCLUSIONES.....	29
VI. RECOMENDACIONES.....	30
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	31
ANEXOS.....	

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diseño experimental utilizado en la investigación para evaluar el efecto del EDBCA en el crecimiento poblacional y contenido de lípidos de <i>Scenedesmus sp.</i>	7
Tabla 2. Composición química del medio de cultivo H&M.....	8
Tabla 3. Composición química del EPBCA utilizado en el experimento.....	11
Tabla 4. Contenido de nitrógeno de los cultivos de <i>Scenedesmus sp</i> dosificados con EPBCA y H&M.....	11
Tabla 5. Crecimiento poblacional ($\times 10^6$ cél. mL ⁻¹) de <i>Scenedesmus sp.</i> en los tratamientos cultivados con EPBCA y HM.....	18
Tabla 6. Tasa de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (TD) poblacional en los cultivos de <i>Scenedesmus sp.</i> con EPBCA y HM.....	21
Tabla 7. Contenido de lípidos en porcentaje (%) y en biomasa (mg L ⁻¹) al quinto día de cultivo de <i>Scenedesmus sp.</i> con EPBCA y HM.....	24

INDICE DE FIGURAS

Fig.1 Células de <i>Scenedesmus sp.</i> visto por microscopia óptica al 40 x.....	04
Fig. 2 Colonias de <i>Scenedesmus sp.</i> en medio de cultivo sólidos.....	05
Fig. 3. Cultivo de <i>Scenedesmus Sp.</i> Con medio HM.....	06
Fig.4. Matracas con medio HM con contenido de antibióticos (Tetraciclina 100 mg.L ⁻¹) y con cultivo de <i>Scenedesmus sp</i>	06
Fig.5. Flujograma de la preparación del inóculo de bacterias de yogurt.....	07
Fig. 6 Protocolo para la determinación de lípidos totales de microalgas (Bligh & Dyer , 1959 ; Marsh & Weinstein , 1966).....	09
Fig. 7. Variación de la temperatura promedio (°C) en los cultivos de <i>Scenedesmus sp.</i> con EPBCA y HM.....	10
Fig. 8. Comportamiento del pH promedio en los cultivos de <i>Scenedesmus sp.</i> con EPBCA y HM.....	14
Fig. 9. Variación del crecimiento poblacional en los cultivos de <i>Scenedesmus sp.</i> con EPBCA y HM.....	16
Fig. 10. Unidades experimentales al quinto día de cultivo de <i>Scenedesmus sp.</i> con EPBCA y HM.....	17
Fig. 11. Porcentaje de lípidos en <i>Scenedesmus sp.</i> en los dosificados con EPBCA y HM.....	20
Fig. 12. Contenido de lípidos en biomasa de <i>Scenedesmus sp.</i> en los dosificados con EPBCA y grupo control (HM).....	2

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivos, evaluar el efecto del extracto del ensilado de los partes blandos de *Argopecten purpuratus* "concha de abanico" en el crecimiento poblacional y contenido de lípidos totales de *Scenedesmus sp.* en condiciones de laboratorio, suministrado en concentraciones de 40 ml.l⁻¹, 60 ml.l⁻¹, 80 ml.l⁻¹ y 100 ml.l⁻¹. Los mayores crecimientos poblacionales de *Scenedesmus sp.* fueron encontrados al quinto día de cultivo, en los dosificados con 60 mL L⁻¹, 80 mL L⁻¹ y 100 mL L⁻¹ de EPBCA con promedios significativos ($p < 0,05$) de 24,17 x10⁶ cél. mL⁻¹, 24,50 x10⁶ cél. mL⁻¹ y 22,83 x10⁶ cél. mL⁻¹, respectivamente. Los cultivos presentaron los mayores valores de μ para *Scenedesmus sp.* al quinto día de cultivo en los tratamientos dosificados con 60 ml.L⁻¹ y 80 ml.L⁻¹ de EPBCA, con 0,518 y 0,518 día⁻¹ respectivamente; y el menor valor se presentó en el tratamiento dosificado con 40 ml.L⁻¹, con 0,45 día⁻¹. Asimismo, el mayor valor de TD para *Scenedesmus sp.* en el quinto día de cultivo, se obtuvo en el tratamiento dosificado con 40 mL L⁻¹ de EPBCA con 1,534 día; y fueron significativamente menores en los dosificados con 60 mL L⁻¹, 80 mL L⁻¹ y 100 mL L⁻¹ de EPBCA con promedios de 1,338 día, 1,340 día y 1,402 día, respectivamente. El mayor contenido en porcentaje de lípidos para *Scenedesmus sp.* al quinto día de cultivo, se obtuvo en el tratamiento dosificado con 40 mL L⁻¹ de EPBCA (25,09 %) y el menor en el dosificado con 100 mL L⁻¹ de EPBCA (23,05 %). Se concluye que el mejor tratamiento en la experiencia realizada fue el tratamiento con 60 ml.L⁻¹ que alcanzo valores estadísticos significativos iguales a los del tratamiento control con H&M, afirmando el uso de este como medio de cultivo alternativo de bajo costo para el cultivo de microalgas.

PALABRAS CLAVE: ensilado, crecimiento poblacional, *Scenedesmus sp.*, cultivo heterotrófico.

I. INTRODUCCION

Las microalgas son organismos unicelulares eucariotas fotosintéticos capaces de transformar la energía luminosa en energía química concentrada con eficiencia cuatro veces superior a las plantas y su principal importancia radica en ser productores primarios constituyéndose en las primeras formadoras de materia orgánica y que debido a su tamaño microscópico (5–50 μm) son de fácil captura y digestión por gran número de organismos acuáticos fitoplanctívoros sometidos a cultivo (Bertoldi *et al.*, 2008).

También son consideradas alimentos funcionales, capaces de afectar positivamente la salud de animales y humanos por su contenido de cantidades apreciables de proteínas, vitaminas y ácidos grasos poliinsaturados; en tal sentido, el contenido de aminoácidos de algunas microalgas puede superar al de los alimentos convencionales, así tenemos que *Scenedesmus sp.*, presenta niveles de lisina superiores al patrón FAO con 25 a 35 % de proteína convirtiéndose en una atractiva fuente de proteína (Quevedo *et al.*, 2007).

El crecimiento de los cultivo algales están influenciados por diversos parámetros destacando la temperatura, intensidad luminosa, salinidad, nutrientes y pH cuyos valores o rangos óptimos varían ampliamente de una especie a otra; asimismo, estos parámetros tienen gran influencia en la composición química de la biomasa algal. El interés que actualmente tienen las microalgas ha permitido el desarrollo de metodologías o sistemas de cultivos masivos al aire libre o en fotobiorreactores con la finalidad de producir compuestos químicos de interés económico tales como biocombustibles, biofertilizantes, intercambiadores iónicos y carotenos, así como para el tratamiento de aguas residuales, obtención de compuestos terapéuticos y alimento humano y animal (Contreras-Flores *et al.*, 2003).

Uno de los factores importantes para la producción de microalgas son los medios de cultivo, los cuales pueden clasificarse en definidos y naturales. Los primeros son aquellos que se les conoce la naturaleza y la concentración de cada uno de sus componentes y son usados a escala de laboratorio, y por lo tanto, permiten determinar requerimientos específicos para el crecimiento algal (Running *et al.*, 1994). El medio definido más utilizado es el medio Guillard f/2 que ha demostrado ser eficiente para un gran número de microalgas (Torretera & Tacon, 1989); no obstante dentro de las desventajas, estos medios resultan poco factibles en la producción de microalgas a gran escala debido a su alto costo por el uso de reactivos químicos de grado analítico de pureza que se necesitan para enriquecer el agua usada en los cultivos algales

(Gómez & Rosas, 1996; Martínez, 2003). En consecuencia, es necesario elaborar medio de cultivo alternativo que permitan disminuir los costos de la producción masiva de microalgas, destacando aquellos que utilizan agua fertilizada y crecen heterotróficamente y que según Borowitzka (1997), son una buena alternativa para la producción intensiva de biomasa algal. Actualmente, existe la tendencia de realizar cultivos heterotróficos utilizando diversos aminoácidos y vitaminas presentes en sustancias orgánicas de desechos o residuos industriales capaces de propiciar adecuados incrementos en el crecimiento y composición bioquímica (Fábregas *et al.*, 1997).

Por otro lado, con fines de disminuir costos se recurre a los medios naturales preparados con fertilizantes agrícolas de uso convencional (urea, cloruro de potasio, fosfato diamónico, etc.) como aportadores de macronutrientes (N, P, K) y/o a subproductos agrícolas (melazas), extractos orgánicos y biodigeridos provenientes de las industrias avícola, pesquera, acuícola, entre otras (Hernández *et al.*, 2003).

En la bahía de Samanco (Nuevo Chimbote, Perú) se ubican varias empresas de crianza de *Argopecten purpuratus*, “concha de abanico”, cuyo producto final está constituido por el musculo aductor o talo y las gónadas, originando esta actividad residuos industriales (manto, tubo digestivo, etc.); que constituyen el 50% del peso del animal y que pueden ser aprovechados debido a su importante contenido en proteínas y lípidos (Encomendero & Uchpa, 2001); asimismo, los desechos provenientes del proceso de congelado de “concha de abanico” pueden, mediante el ensilaje biológico, ser utilizados como medio alternativo para el cultivo de microalgas (Uribe *et al.*, 2001).

Debido a la degradación bacteriana del material orgánico durante el ensilado biológico se presenta una reducción del pH, habiendo demostrado Encomendero & Uchpa (2001) que inóculos bacterianos de *Lactobacillus vulgaris* y *Streptococcus termophilus* en concentraciones de 10, 20, y 30 ml, redujeron el pH después de 48 horas a 4,38 - 4,09 sin presentar diferencias significativas entre los tratamientos y obtuvieron 45,12% de proteína total en el ensilado seco de los desechos de concha de abanico. El uso de estos ensilados, por su contenido de sustancias orgánicas e inorgánicas, en el cultivo de microalgas favorecen el crecimiento como lo demostraron Jiménez & Prada (2012) en el cultivo de *Tetraselmis suecica*, quienes dosificando concentraciones de 40, 60, 80 y 100 ml L⁻¹ determinaron que 80 ml L⁻¹ permite los mejores crecimientos poblacionales (3 943,67 cel.ml⁻¹) en comparación a las dosificaciones de 40, 60 y 100 y el control (Guillard f/2) con valores de 2 561,00 cel.ml⁻¹, 3 272,67 cel.ml⁻¹, 1 646,00 cel.ml⁻¹ y 2 636,00 cel.ml⁻¹ respectivamente.

Asimismo, los resultados de Reyes, (2014) demuestran la capacidad de *T. suecica*, de crecer heterotróficamente utilizando melaza como fuente de carbono orgánico, obteniendo para las concentraciones de 0,5 1,0 y 2,0 g l⁻¹ densidades poblacionales de 19.58 x 10⁵, 22.07 x 10⁵ y 11.84 x 10⁵ respectivamente.

En consecuencia, aprovechando la capacidad de nutrición heterotrófica, es posible elaborar un medio de cultivo alternativo más económico que los medios de cultivo tradicionales (H&M), por lo que se plantea el siguiente problema:

¿Cuál es el efecto de cuatro concentraciones del medio de cultivo elaborado del extracto de ensilado de las partes blandas de *A. purpuratus*, “concha de abanico”, en el crecimiento poblacional y contenido de lípidos totales de la microalga *Scenedesmus sp* en condiciones de laboratorio?

El objetivo general del presente trabajo fue evaluar el efecto del extracto del ensilado de los desechos blandos de *A. purpuratus*, “concha de abanico”, en el crecimiento poblacional y contenido de lípidos totales de *Scenedesmus sp* en condiciones de laboratorio, y los objetivos específicos fueron los siguientes:

- Determinar la concentración óptima (40, 60, 80 y 100 ml. L⁻¹) del extracto de ensilado de los residuos blandos de *A. purpuratus* que permita el mejor crecimiento poblacional de *Scenedesmus sp*
- Determinar la tasa de crecimiento poblacional (μ) y tiempo de duplicación (TD) óptimos de *Scenedesmus sp* utilizando varias concentraciones (40, 60 , 80 y 100 ml. L⁻¹).del extracto de ensilado de los desechos blandos de *A. purpuratus*
- Determinar el porcentaje de lípidos totales de *Scenedesmus sp*, utilizando varias concentraciones (40, 60 , 80 y 100 ml. L⁻¹) del extracto de ensilado de los desechos blandos de *A. purpuratus*.

La hipótesis propuesta consiste en que si utilizamos el extracto del ensilado de los desechos blandos de “concha de abanico” *A. purpuratus* a concentraciones 40, 60, 80 ,100 ml. L⁻¹ para el cultivo de *Scenedesmus sp*, se obtendrá mejor crecimiento poblacional y mayor contenido de lípidos con la concentración de 60 ml L⁻¹.

II. MATERIALES Y METODOS

2.1.- Localización del experimento

El presente proyecto de tesis se desarrolló en el laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional del Santa, localizada en el distrito de Nuevo Chimbote, provincia del Santa. Región Ancash (Perú), entre el 03 de Agosto hasta el 30 de Octubre de 2015.

2.2.- Material Experimental :

2.2.1.- Microalga *Scenedesmus sp*

La cepa de *Scenedesmus sp.* (fig.1) fue aislada de las pozas de oxidación "Las Gaviotas", ubicada en las inmediaciones del balneario Atahualpa del distrito de Nuevo Chimbote.

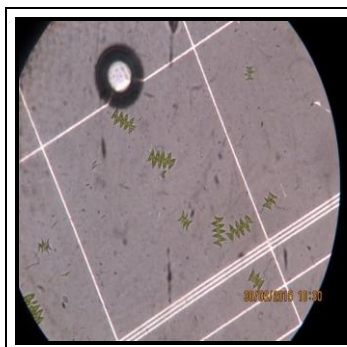


Fig.1 Células de *Scenedesmus sp.* visto por microscopia óptica al 40 x.

El aislamiento de la referida cepa fue realizada utilizando placas petri agarizadas y enriquecida con medio Guillard siguiendo al metodología microbiológica, que consiste en esterilizar a 120°C y 1,1kg m⁻² de presión durante 15 minutos. Después de la esterilización, se procede a verter en las placas petri con el medio de cultivo que luego de solidificarse a temperatura ambiente se realiza la siembra de la muestra mediante su esparcimiento o "spray" con una jeringa. El proceso de sembrado requiere el uso de un mechero para asegurar la asepsia del aislamiento.

Las placas petri (Fig. 2) son incubadas a temperatura ambiente y luz constante durante 4 a 8 días, para luego proceder al aislamiento de aquellas colonias conformadas por *Scenedesmus sp* mediante repiques sucesivos que aseguren la presencia de una sola cepa algal.

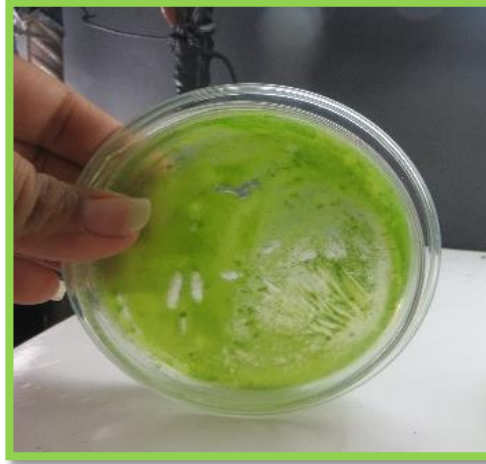


Fig. 2. Colonias de *Scenedesmus sp*.en medio de cultivo solidos

2.3.- Obtención del inóculo algal:

La cepa de *Scenedesmus sp* aislada fueron colocados en tubos de ensayo conteniendo medio de cultivo HM (Merino, 2002) durante 14 días para luego ser transferidos a matraces de 250 ml (Fig.4) conteniendo 100 ml de la suspensión algal a los que se les agregó 100 mg L^{-1} del antibiótico tetraciclina para evitar el desarrollo de bacterias y protozoarios y asegurar el crecimiento unialgal.

El inóculo de *Scenedesmus sp* fueron mantenidas con iluminación y agitación constantes, con agitador eléctrico (Fig. 03), con durante cuatro dias para luego ser diluidos a 1000 ml como volumen requerido para iniciar los ensayos de la presente investigación.

El agua de caño utilizada en los ensayos fue tratada con hipoclorito de sodio (1 ml L^{-1}) y aireación constante durante 24 horas para luego ser neutralizado con tiosulfato de sodio (1 ml L^{-1}), con la finalidad de eliminar la presencia de bacterias u otros micororganismos que puedan interferir en el crecimiento algal.



Fig. 3. Cultivo de *Scenedesmus Sp.*

Con medio HM



Fig. 4. Matraces con medio HM con contenido de antibióticos (Tetraciclina 100 mg.L^{-1}) y con cultivo de *Scenedesmus sp.*

2.4.- Acondicionamiento de los unidades experimentales

Los ensayos fueron realizados en 15 botellas plásticas de 1 L conteniendo 250 ml de inculo de *Scenedesmus sp* alcanzando $2,75 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$. de densidad poblacional inicial.

Todos los cultivos fueron iluminados constantemente mediante 2 fluorescentes de 200 watts colocados a una distancia de 10 cm de los cultivos proporcionando 500 lux medidos con luxómetro marca Exttech Instruments. La agitación constante de los cultivos fue mediante la inyección de aire (200 ml. min^{-1}) proveniente de un blower de 1/4 HP y regulada mediante mangueras y llaves de paso (Fig. 5).

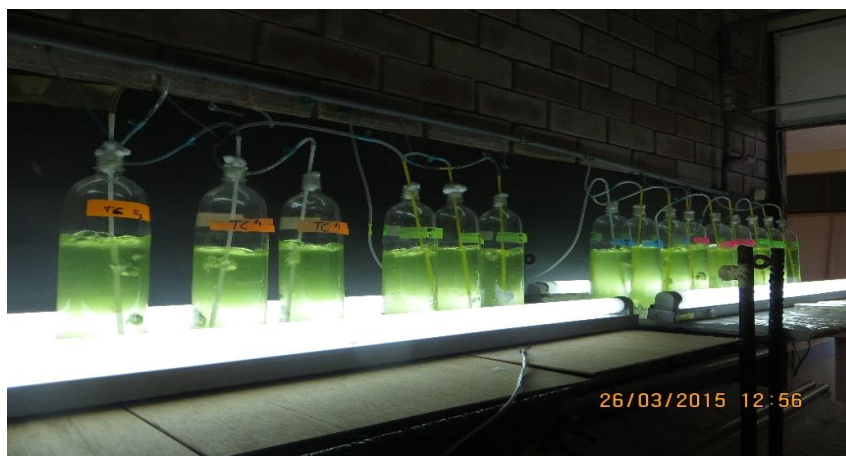


Fig. 5. Unidades experimentales del cultivo de *Scenedesmus sp.*

Se empleó el diseño estímulo creciente (Steel & Torrie, 1988), con cuatro tratamientos y un grupo control (HM), con tres repeticiones cada uno (Tabla 1), siendo estos los siguientes:

Tabla 1. Diseño experimental utilizado en la investigación para evaluar el efecto del EDBCA en el crecimiento poblacional y contenido de lípidos totales de *Scenedesmus sp.*

TRATAMIENTOS	ESPECIFICACIONES
CONTROL	Cultivo de <i>Scenedesmus sp</i> con medio HM
T1	Cultivo de <i>Scenedesmus sp</i> con 40 ml. L ⁻¹ de EPBCA
T2	Cultivo de <i>Scenedesmus sp</i> con 60 ml. L ⁻¹ de EPBCA
T3	Cultivo de <i>Scenedesmus sp</i> con 80 ml. L ⁻¹ de EPBCA
T4	Cultivo de <i>Scenedesmus sp</i> con 100 ml. L ⁻¹ de EPBCA

2.5.- Medios de cultivo

2.5.1.-Medio HM

Este medio de cultivo (Merino, 2002), fue desarrollado para el cultivo masivo de *Scenedesmus acutus* para consumo humano utilizando fertilizantes agrícolas en la que la presencia de “impurezas”, constituidas por pequeñas cantidades de diversos elementos minerales, se constituían en micronutrientes para el crecimiento algal (Tabla 4).

Tabla 4. Composición química del medio de cultivo HM

Sustancia	mg L ⁻¹	N	P	K	Fe	Na	Ca	Mg	S	Cl
Urea	172	80.9	-	-	-	0.1	-	-	-	-
(NH ₄) ₂ PO ₄	96	16.3	19.2	0.8	-	1.3	0.4	0.3	-	10.2
KCl	19	-	-	10.4	-	10.5	1.9	1.3	0.2	0.8
Solución Fe (x)	2.5	-	-	-	2.5	-	-	-	-	2.4
TOTAL		97.2	19.2	11.2	2.5	11.9	2.3	1.6	0.2	13.4

(x): la solución de Hierro se prepara disolviendo 2.5 g. de clavos en HCl comercial

2.5.2.- Medio ensilado de parte blandas de concha de abanico (EPBCA)

2.5.2.1.- Preparación del EPBCA

Las partes blandas de *A. purpuratus* (manto, tubo digestivo, branquias) para realizar el ensilado biológico fueron obtenidas de la Empresa Intercold SAC, requiriéndose de suficiente inóculo de lactobacilos; en tal sentido, se procedió a pasteurizar 1000 ml de leche de vaca a 85 °C por 30 minutos que después de enfriado se le agregó *Lactobacillus vulgaris* y *Streptococcus termophilus* liofilizados disponibles en el mercado local como cultivos lácticos Sacco- Lyofast (Fig. 7). La solución láctea inoculada con bacilos fue incubada en una estufa a 45 °C por 4 horas (Berenz, 1996).

Para la preparación del EPBCA se procedió a hervir 4101,6 g de tales residuos durante 20 minutos para luego de enfriado a temperatura ambiental y drenado el agua de cocción se obtuvo 2,161 g de materia cocida que fue licuada hasta obtener una masa homogénea de color marrón oscuro, y mezclada con 42,22 g de melaza (2%) y 21,61 g de la solución láctea conteniendo lactobacilos del yogurt (1%). El ensilaje biológico es realizado por los lactobacilos presentes en el yogurt aprovechando la melaza como fuente de energía, en un proceso de incubación que duró 48 horas a 40 °C de temperatura (Fig. 6). Según Ipanaqué & Paredes (2009), este ensilado húmedo contiene 13,12% de proteína y 13,00% de carbohidratos.

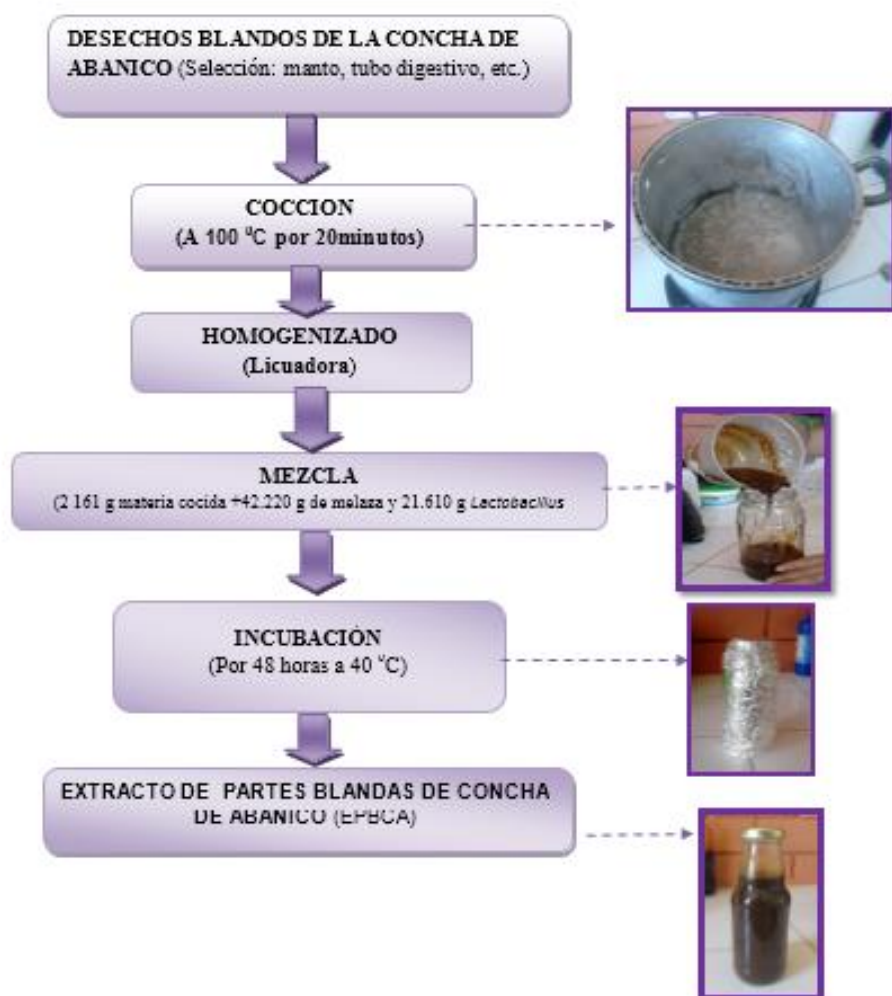


Fig. 6 Diagrama de la preparación de EPBCA (Berenz, Z. 1996.)

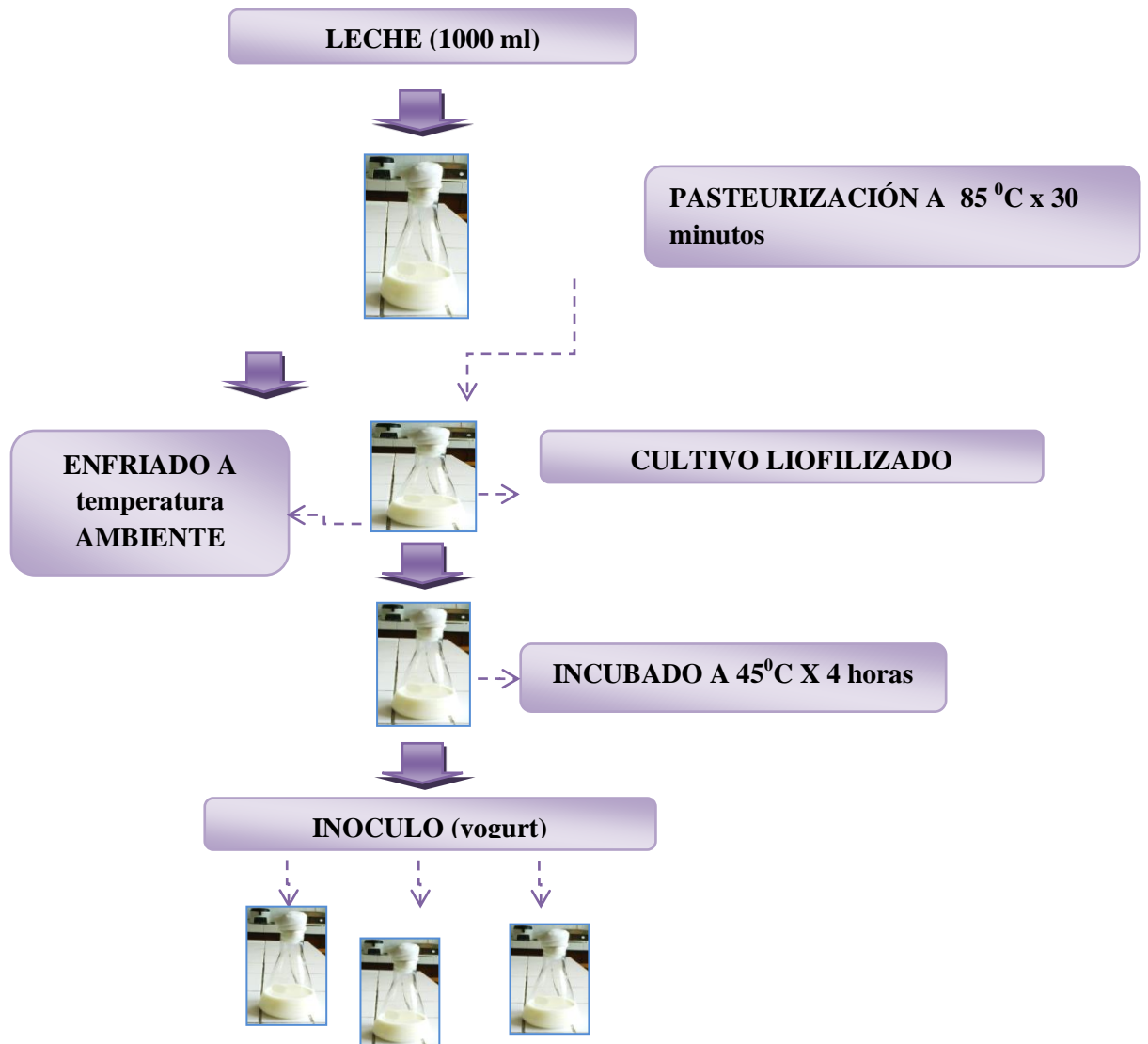


Fig. 7. Flujograma de la preparación del inoculo de bacterias de yogurt. (Berenz, Z. 1996.)

2.5.2.2.-Obtención del extracto acuoso del EPBCA

A fin de obtener una solución patrón del EPBCA, se procedió a hervir 200 g del ensilado en 1000 ml de agua de caño durante 10 minutos, con la finalidad de extraer los nutrientes, orgánicos e inorgánicos, consignándose en la tabla 3 la concentración de las sustancias más importantes.

Las dosificaciones del EPBCA (40, 60 ,80 y 100 ml. L⁻¹) utilizadas en la presente experiencia fueron determinadas en ensayos previos en laboratorio.

Tabla 3. Composición química del EPBCA utilizado en el experimento.

Parámetro	Concentración (%)
Proteína	1,003
Nitrógeno total	2,041
Nitrógeno amoniacal	1,01
Humedad	99,98
Grasa	0,89
Carbohidratos	0,13
Ceniza	0,02

Fuente: Laboratorio COLECBI

En la siguiente tabla se presenta el contenido de nitrógeno de los cultivos de *Scenedesmus sp* dosificados con EPBCA y HM como responsable del crecimiento y contenido de lípidos algales.

Tabla 4. Contenido de nitrógeno de los cultivos de *Scenedesmus sp* dosificados con EPBCA y HM.

Nutriente	EPBCA (ml L ⁻¹)				
	HM	40	60	80	100
Nitrógeno (mg L ⁻¹)	97,2	0,8	1,2	1,6	2,00

2.6.- Registros de parámetros ambientales:

Se registró diariamente el pH, utilizando un pH-metro digital marca Oakton con 0,01 de sensibilidad. También se registró la temperatura tanto del ambiente como de la suspensión algal, utilizando para ello termómetro digital marca Hanna con una sensibilidad de +/- 0.1 °C.

2.7. Determinación de crecimiento poblacional:

El crecimiento poblacional de los cultivos se determinó por conteos diarios del número de células durante siete días. Para ello se extrajo una muestra de la suspensión algal con ayuda de la micropipeta Pasteur. Las células extraídas se contaron utilizando una cámara de Neubauer y microscopio binocular Olympus corporation 40x, el conteo se realizó en 16 campos.

Para determinar la tasa de crecimiento poblacional por día (μ) y Tiempo de duplicación poblacional diaria (TD) al quinto día de cultivo se usaron las siguientes formulas:

$$U = \frac{\ln(N_f / N_0)}{t_f - t_0}$$

N_f y N_0 : Número de células, final e inicial.
 t_f y t_0 : Tiempo (d), final e inicial.

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

2.8.- Determinación de lípidos totales:

La determinación de lípidos totales se realizó según el método de Bligh & Dyer (1959); Marsh & Weinstein (1966). Se pesó 5 mg de la muestra seca y se añadió 3 ml de solvente metanol: cloroformo (2:1) para cada tratamiento; se agitó y se protegió de la luz, dejándolo en refrigeración por 24 horas. Después de transcurrido el tiempo indicado, a las muestras se les adicionó 3 ml de agua destilada por cada tratamiento, luego se centrifugó a 13 500 rpm durante 20 minutos, seguidamente se sacó una capa superior o el sobrenadante y se realizó la evaporación de gases y secado con calor.

A este producto se agregó 2 ml de ácido sulfúrico concentrado y se llevó a una temperatura de 200 °C por 30 minutos, luego se dejó enfriar en agua con hielo. Posteriormente se realizó las lecturas en el espectrofotómetro, marca Tuner Barstead Internacional, con longitud de onda de 375 nm.

Las curvas de calibración se efectuaron con Dipalmitina, Triestearina y Colesterol

El promedio de las tres ecuaciones se reemplaza en la ecuación general para determinar los lípidos (Blight & Dyer, 1959 ; Marsh & Weinstein , 1966) es :

$$\text{Lípidos (\%)} = (113,443 \times (A - 0,006)) / B$$

Dónde:

A = Absorbancia

B = Biomasa en mg

Lípidos en porcentaje, fórmula utiliza el promedio de las dos pendientes de la curva de calibración

$$L (\%) = \frac{\left(\left(\frac{\text{Absorbancia}}{4,5938} \right) \times V \right)}{M} \times 100$$

Donde: V: Volumen final de muestra analizada (10 mL); y M: Peso seco (mg) en 10 mL de cultivo microalgal en cada unidad experimental.

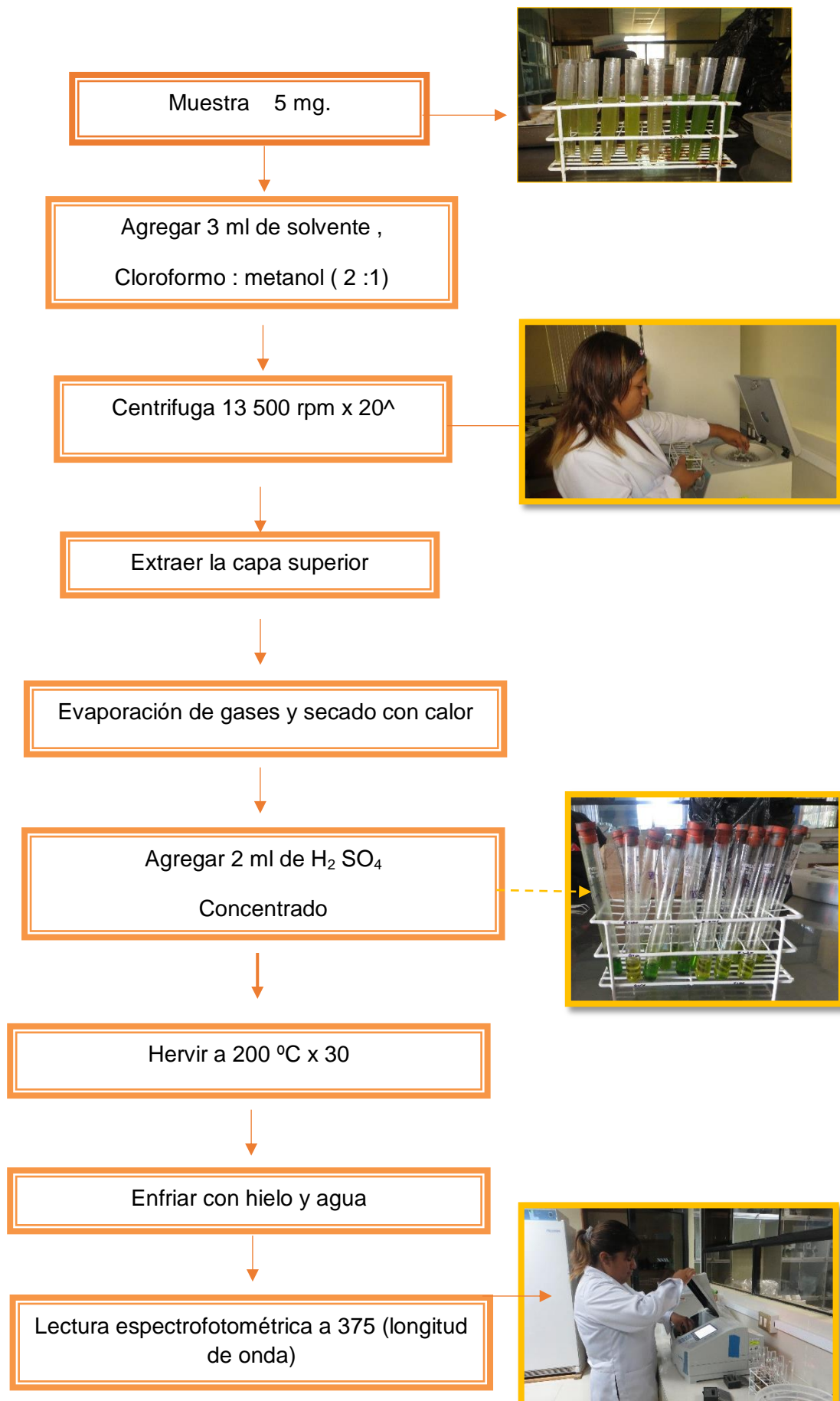


Fig. 8 Protocolo para la determinación de lípidos totales de microalgas (Bligh & Dyer , 1959 ; Marsh & Weinstein , 1966).

2.9.- Determinación de biomasa:

Para la determinación de la biomasa se pesó en vasos de porcelana más el papel filtro whatman , luego cada luna de reloj se enumeró por tratamiento . Se colocó cada papel filtro en el sistema de filtración la bomba de vacío y se filtró 20 ml de suspensión algal por cada tratamiento, durante los 7 días que duró la experiencia , posteriormente se llevó a la estufa a 70°C por 12 horas . Transcurriendo el tiempo se volvió a pesar y los datos obtenidos se reemplazaron en la siguiente fórmula.

$$\text{Biomasa (mg)} = (P1 - P2) \times 1\,000$$

Donde:

P1 = Peso inicial

P2 = Peso final

Biomasa de lípidos (BL):

$$BL (mg L^{-1}) = \frac{L \times B}{100}$$

Donde: L: Porcentaje de lípidos (%); y B: Biomasa seca total por litro (mg).

2.10.- Análisis Estadístico de los datos:

Para los datos de crecimiento poblacional y contenidos de lípidos, se aplicó el análisis de varianza (ANOVA) para establecer diferencias entre los promedios. Luego se empleó la prueba de Tukey HSD para establecer el mejor promedio. Para todos los casos se utilizó un nivel de significancia de 0,05. Todo el proceso estadístico se desarrolló utilizando los programas, Microsoft Office Excel 2010 y SPSS 15.0 para Microsoft Windows.

III. RESULTADOS

3.1. Parámetros ambientales del cultivo de *Scenedesmus sp.*

3.1.1. Temperatura

El comportamiento de la temperatura promedio en los cultivos de *Scenedesmus sp.* se muestra en la fig. 07.

La temperatura de los cultivos microalgales varió entre 25,3 a 26,4 °C durante el experimento. Estos fueron estadísticamente similares en cada día ($p>0,05$) durante los 06 días de cultivo.

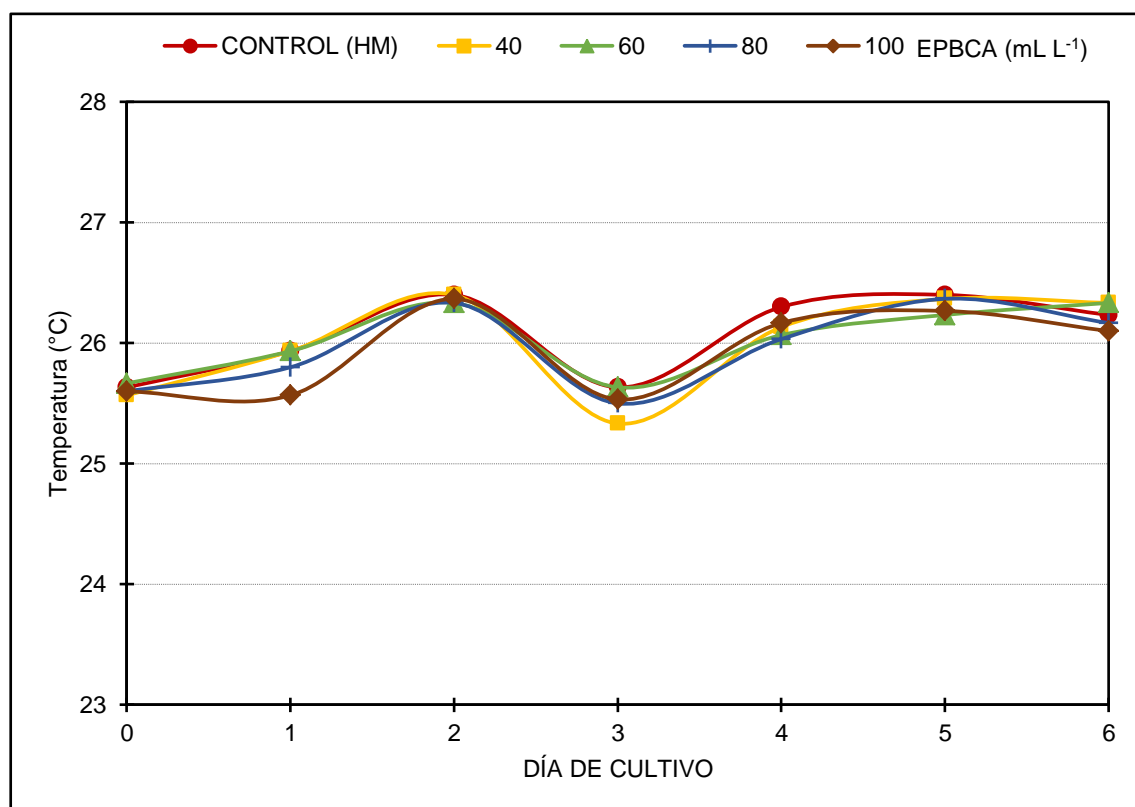


Fig. 9. Variación de la temperatura promedio (°C) en los cultivos de *Scenedesmus sp.* con EPBCA y HM.

3.1.2. pH

El comportamiento del pH promedio en los cultivos de *Scenedesmus* sp. se presenta en la Fig. 10, Encontrándose que el pH en los cultivos de *Scenedesmus* sp. con EPBCA fueron desde 7,80 unid. a 8,87 unid.

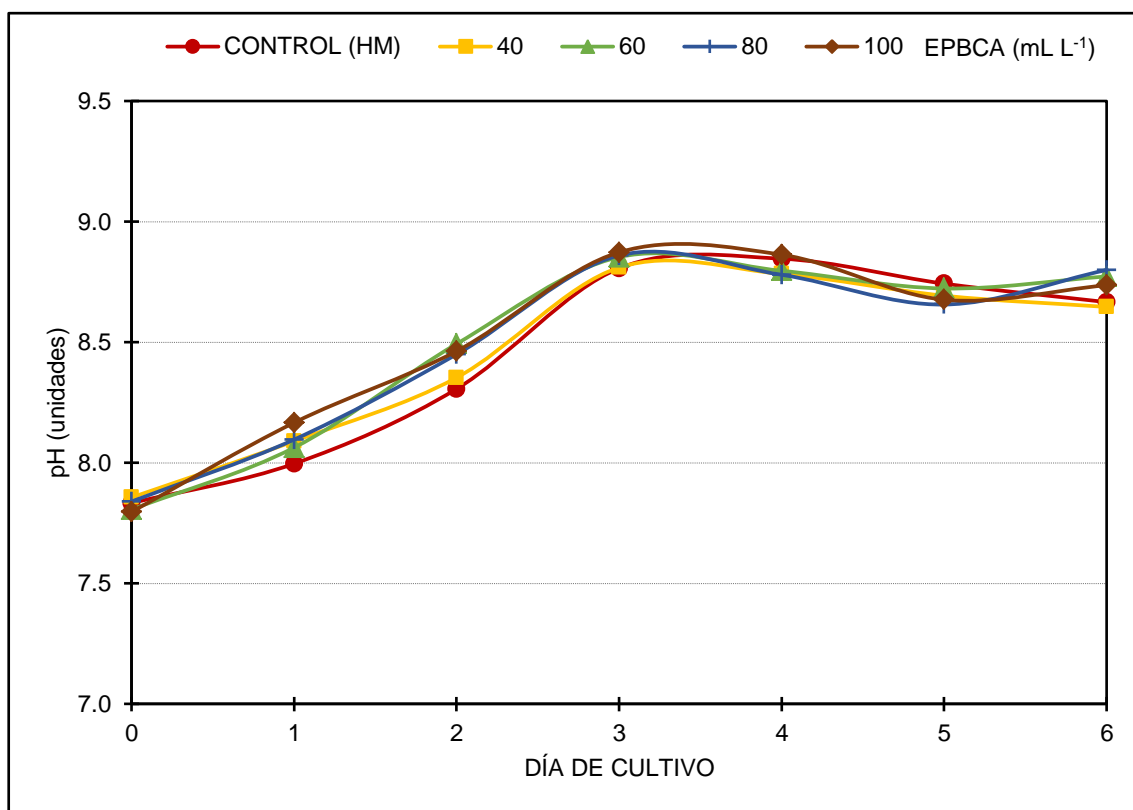


Fig. 10. Comportamiento del pH promedio en los cultivos de *Scenedesmus* sp. con EPBCA y HM.

Los cultivos con EPBCA se iniciaron con valores de pH promedio entre 7,80 unid. y 7,86 unid., presentando una tendencia al incremento durante los días en cultivo, siendo estadísticamente similares ($p > 0,05$) en todo el experimento.

Al sexto día de cultivo, los valores de pH promedio fueron numéricamente mayores en los dosificados con 60 mL L⁻¹ y 80 mL L⁻¹ de EPBCA con 8,77 unid. y 8,80 unid., respectivamente; mientras el menor fue el dosificado con 40 mL L⁻¹ de EPBCA con 8,65 unid.

3.2. Crecimiento poblacional de *Scenedesmus* sp.

En la tabla 5, figs. 11 y 12, se observan los crecimientos poblacionales diarios promedio en los cultivos de *Scenedesmus* sp dosificados con EPBCA y grupo control (HM).

Tabla 5. Crecimiento poblacional ($\times 10^6$ cél. mL^{-1}) de *Scenedesmus* sp. en los tratamientos cultivados con EPBCA y HM.

DÍA DE CULTIVO	EPBCA (mL L^{-1})				
	CONTROL (HM)	40	60	80	100
0	2,75 \pm 0,00a	2,75 \pm 0,00a	2,75 \pm 0,00a	2,75 \pm 0,00a	2,75 \pm 0,00a
1	4,08 \pm 0,38a	4,75 \pm 0,25a	4,83 \pm 0,38a	4,17 \pm 0,52a	4,58 \pm 0,63a
2	7,25 \pm 0,66c	7,83 \pm 0,52bc	8,58 \pm 0,38abc	9,58 \pm 0,76ab	9,75 \pm 1,00a
3	12,83 \pm 1,04ab	12,58 \pm 1,77b	13,00 \pm 0,90ab	15,25 \pm 1,75ab	16,50 \pm 1,15a
4	21,17 \pm 0,76a	16,83 \pm 1,26b	21,92 \pm 1,42a	21,83 \pm 1,01a	19,92 \pm 1,38ab
5	24,42 \pm 1,13a	20,83 \pm 1,13b	24,17 \pm 1,13ab	24,50 \pm 1,56a	22,83 \pm 1,51ab
6	25,17 \pm 1,53a	21,42 \pm 1,38b	24,67 \pm 1,61ab	24,92 \pm 1,04ab	24,75 \pm 0,90ab

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

El crecimiento poblacional en los tratamientos con EPBCA, se iniciaron con valores promedio significativamente similares ($p>0,05$) de $2,75 \times 10^6$ cél. mL^{-1} , las cuales se incrementaron durante el experimento.

En el día 1 de cultivo (tabla 5), el crecimiento microalgal de *Scenedesmus* sp. fueron similares ($p>0,05$) en todos los tratamientos, con valores de $4,75 \times 10^6$ cél. mL^{-1} , $4,83 \times 10^6$ cél. mL^{-1} , $4,17 \times 10^6$ cél. mL^{-1} y $4,58 \times 10^6$ cél. mL^{-1} , en los tratamientos con 40; 60; 80 y 100 mL L^{-1} de EPBCA, respectivamente.

Para los días de cultivo 2, 3 y 4 se obtuvieron diferentes comportamientos de los crecimientos poblacionales en los tratamientos con 60 mL L^{-1} , 80 mL L^{-1} y 100 mL L^{-1} de EPBCA; así, al cuarto día de cultivo, los mayores crecimientos poblacionales significativos ($p<0,05$) de *Scenedesmus* sp se encontraron en los dosificados con 60 mL L^{-1} , 80 mL L^{-1} y 100 mL L^{-1} de EPBCA con $21,92 \times 10^6$ cél. mL^{-1} , $21,83 \times 10^6$ cél. mL^{-1} y $19,92 \times 10^6$ cél. mL^{-1} , respectivamente; y el menor crecimiento poblacional se obtuvo en el dosificado 40 mL L^{-1} de EPBCA con $16,83 \times 10^6$ cél. mL^{-1} .

Al quinto día de cultivo, los mayores crecimientos poblacionales de *Scenedesmus* sp fueron encontrados en los dosificados con 60 mL L⁻¹, 80 mL L⁻¹ y 100 mL L⁻¹ de EPBCA con promedios significativos ($p < 0,05$) de $24,17 \times 10^6$ cél. mL⁻¹, $24,50 \times 10^6$ cél. mL⁻¹ y $22,83 \times 10^6$ cél. mL⁻¹, respectivamente, es decir no presentaron una mayor diferencia significativa con respecto a los promedios de crecimiento encontrados en el tratamiento control cultivado con HM, que presento valores de $24,42 \times 10^6$ cél. mL⁻¹; y el menor promedio significativo ($p < 0,05$) del crecimiento poblacional se obtuvo en el dosificado con 40 mL L⁻¹ de EPBCA con $20,83 \times 10^6$ cél. mL⁻¹.

En el final del cultivo (día 6), los crecimientos poblacionales en los tratamientos con EPBCA fueron significativamente similares ($p > 0,05$) con promedios de $21,42 \times 10^6$ cél. mL⁻¹, $24,67 \times 10^6$ cél. mL⁻¹, $24,92 \times 10^6$ cél. mL⁻¹ y $24,75 \times 10^6$ cél. mL⁻¹, en los tratamientos con 40 mL L⁻¹, 60 mL L⁻¹, 80 mL L⁻¹ y 100 mL L⁻¹ de EPBCA, respectivamente.

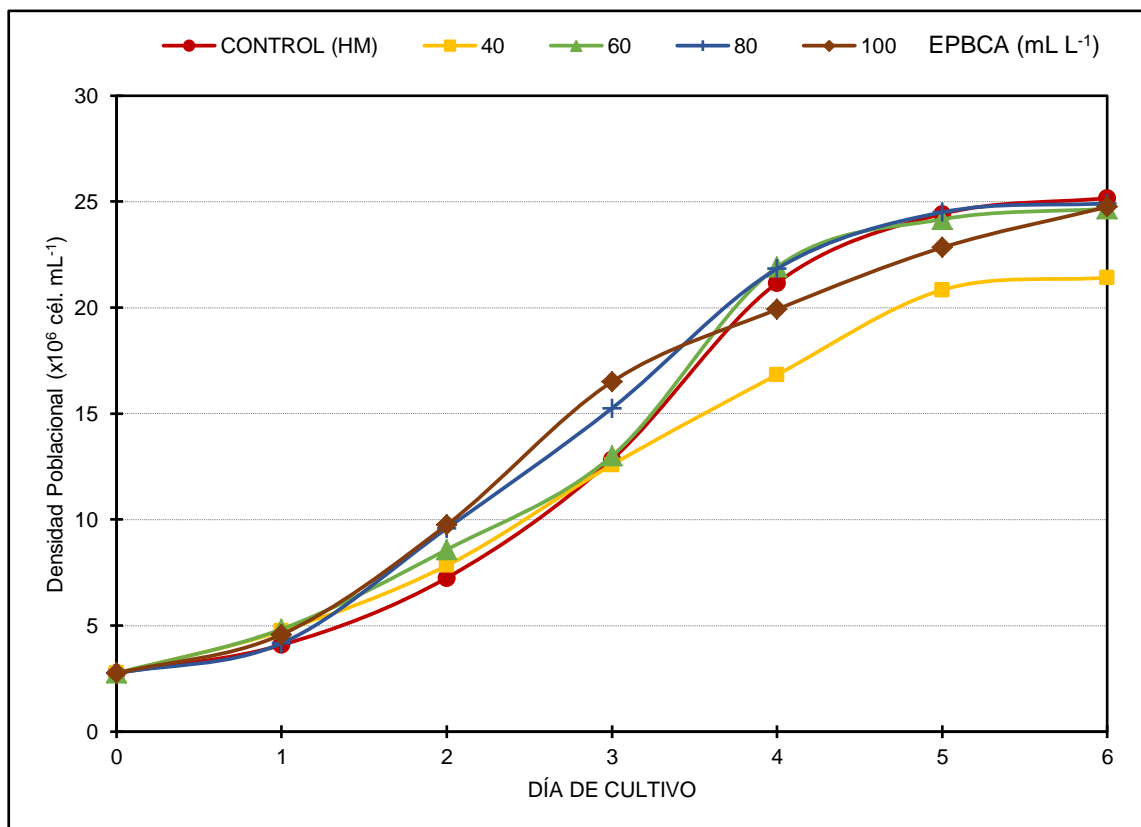


Fig. 11. Variación del crecimiento poblacional en los cultivos de *Scenedesmus* sp. con EPBCA y HM.



Fig. 12. Unidades experimentales al quinto día de cultivo de *Scenedesmus* sp. con EPBCA y HM.

3.3. Tasa de crecimiento y tiempo de duplicación de *Scenedesmus* sp.

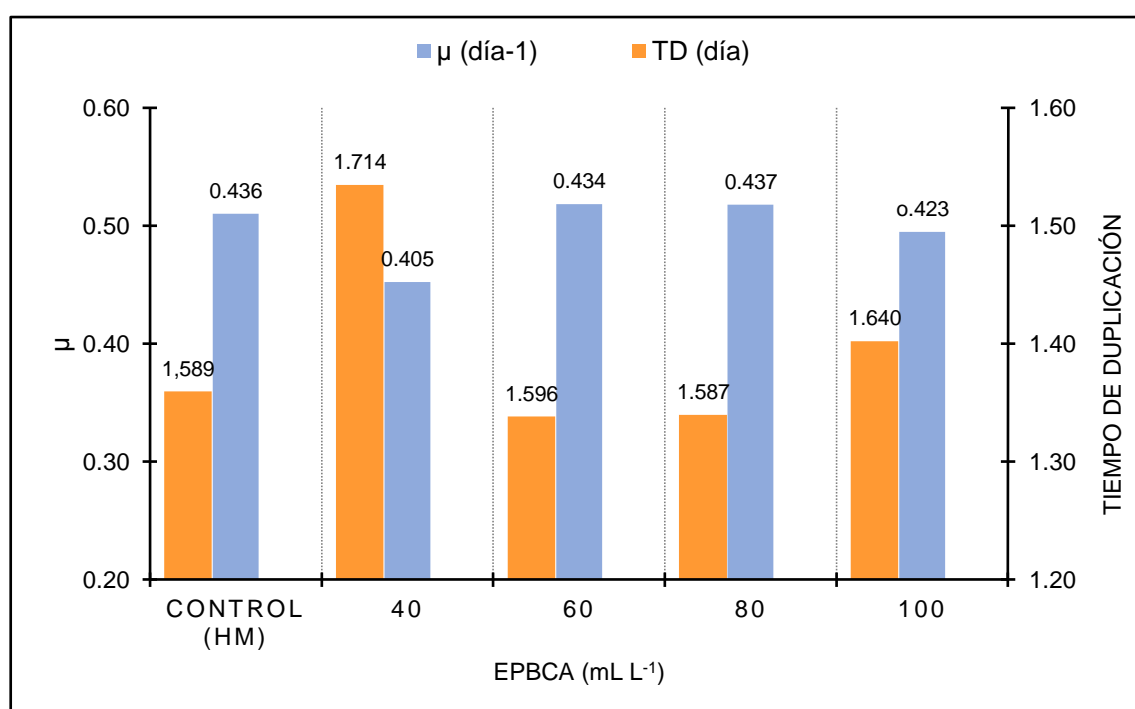
En la Tabla 6 y fig. 13, se muestra la tasa de crecimiento (μ) y el tiempo de duplicación (TD) poblacional en los cultivos de *Scenedesmus* sp dosificados con EPBCA y grupo control (HM), que fueron calculados entre el inicio y el quinto día de cultivo.

Tabla 6. Tasa de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (TD) poblacional en los cultivos de *Scenedesmus* sp con EPBCA y HM.

PARÁMETRO	EDBCA (mL L ⁻¹)				
	CONTROL (HM)	40	60	80	100
N ₀	2,75 ±0,00	2,75 ±0,00	2,75 ±0,00	2,75 ±0,00	2,75 ±0,00
N _f	24,42 ±1,13	20,83 ±1,13	24,17 ±1,13	24,50 ±1,56	22,83 ±1,51
Día	5	5	5	5	5
μ (día ⁻¹)	0,436 ±0,009a	0,405 ±0,011b	0,434 ±0,009ab	0,437 ±0,012a	0,423 ±0,013ab
TD (día)	1,589 ±0,033a	1,714 ±0,047b	1,596 ±0,033a	1,587 ±0,045a	1,640 ±0,052ab

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

La tasa de crecimiento poblacional (μ) de *Scenedesmus* sp. al quinto día de cultivo (Tabla 06, Fig. 13) en los dosificados con EPBCA fueron significativamente mayores ($p < 0,05$) con 60 mL L⁻¹ y 80 mL L⁻¹ de EPBCA con promedios de La tasa de crecimiento poblacional (μ) de *Scenedesmus* sp al quinto día de cultivo (Tabla 06, Fig. 13) con EPBCA fueron mayores con 60 mL L⁻¹, 80 mL L⁻¹ y 100 mL L⁻¹ de EPBCA con promedios significativos ($p < 0,05$) de 0,434 día⁻¹, 0,437 día⁻¹ y 0,423 día⁻¹, respectivamente; y el menor promedio significativo ($p < 0,05$) de μ se obtuvo en el dosificado con 40 mL L⁻¹ de EPBCA con 0,405 día⁻¹.



Letras diferentes en un mismo grupo indica diferencia significativa ($\alpha = 0,05$).

Fig. 13. Variación de la tasa de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (TD) poblacional en los cultivos de *Scenedesmus* sp. con EPBCA y HM.

El tiempo de duplicación poblacional (TD) de *Scenedesmus* sp. al quinto día de cultivo (Tabla 06, Fig. 13) con EPBCA fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en el dosificado con 40 mL L⁻¹ de EPBCA con 1,714 día; y fueron significativamente menores en los dosificados con 60 mL L⁻¹, 80 mL L⁻¹ y 100 mL L⁻¹ de EPBCA con promedios significativos ($p < 0,05$) de 1,596 día, 1,587 día y 1,640 día, respectivamente;

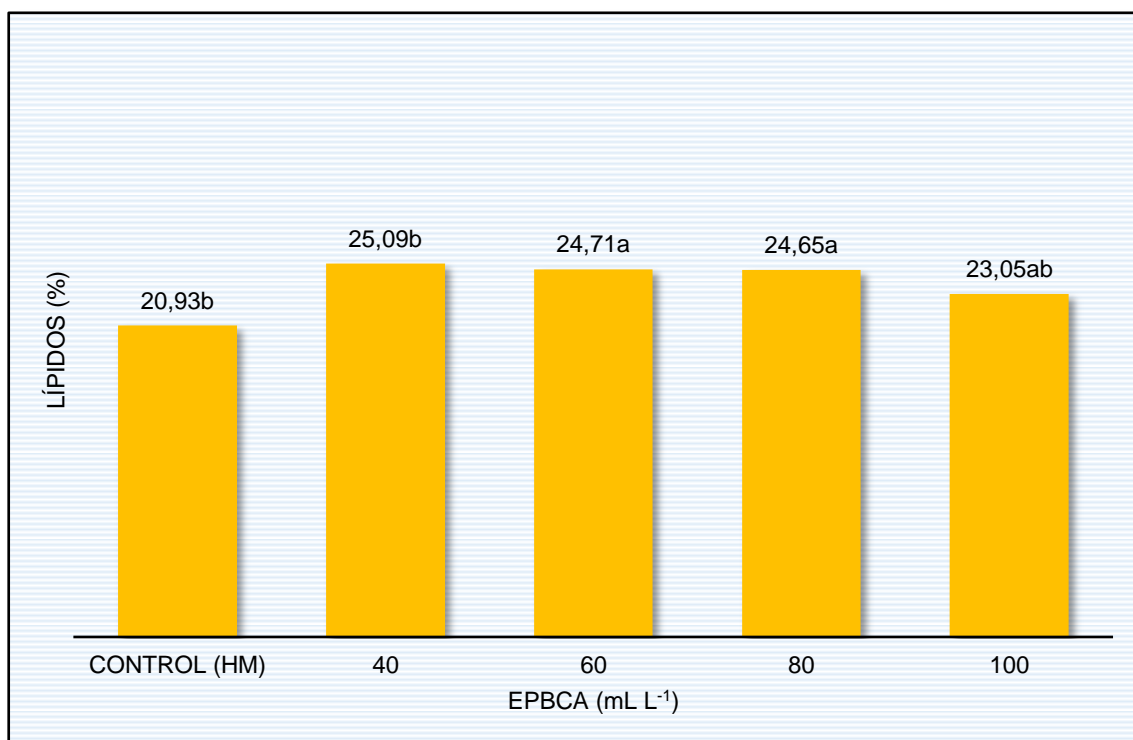
3.4. Contenido de lípidos en *Scenedesmus* sp.

En la Tabla 07, y Fig. 14 y 15, son mostradas los promedios del contenido de lípidos en porcentaje (%) y en biomasa (mg L^{-1}) de *Scenedesmus* sp. al quinto día de cultivo en los dosificados con EPBCA y grupo control (HM).

Tabla 7. Contenido de lípidos en porcentaje (%) y en biomasa (mg L^{-1}) al quinto día de cultivo de *Scenedesmus* sp. con EPBCA y HM.

PARÁMETROS	EPBCA (mL L^{-1})				
	CONTROL (HM)	40	60	80	100
Biomasa (mg L^{-1})	443,7 \pm 40,8 ^a	404,0 \pm 62,1 ^a	531,7 \pm 63,1 ^a	539,7 \pm 41,6 ^a	472,3 \pm 51,4 ^a
Lípidos (%)	20,93 \pm 0,74 ^b	25,09 \pm 1,47 ^a	24,71 \pm 0,50 ^a	24,65 \pm 0,52 ^a	23,05 \pm 0,90 ^{ab}
Lípidos (mg L^{-1})	92,6 \pm 5,2 ^b	133,04 \pm 17,8 ^{ab}	131,5 \pm 17,0 ^a	133,00 \pm 12,3 ^a	123,6 \pm 8,3 ^{ab}

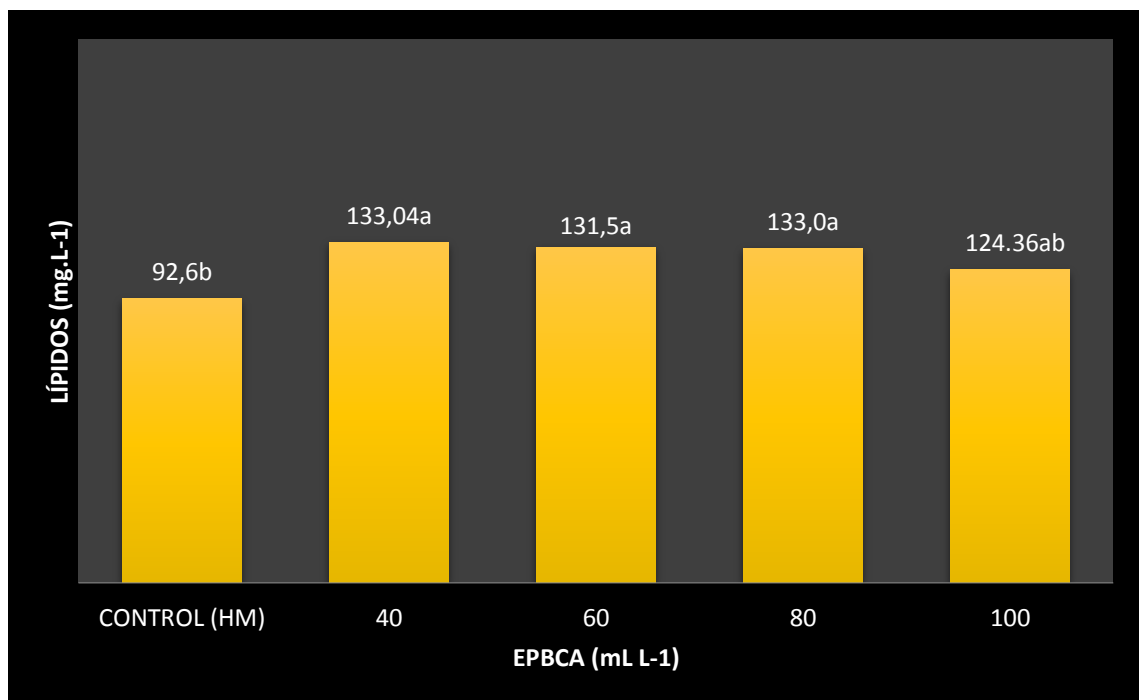
Letras diferentes en una misma fila indica diferencia significativa ($\alpha=0,05$).



Letras diferentes en un mismo grupo indica diferencia significativa ($\alpha=0,05$).

Fig. 14. Porcentaje de lípidos en *Scenedesmus* sp. en los dosificados con EPBCA y HM.

El contenido de lípidos en porcentaje (Tabla 07 y Fig. 14) al quinto día de cultivo de *Scenedesmus* sp. presentaron promedios significativos similares ($p>0,05$) en los dosificados con 40 mL L^{-1} , 60 mL L^{-1} , 80 mL L^{-1} y 100 mL L^{-1} de EPBCA con 25,09 %, 24,71 %, 24,65 % y 23,05 %, respectivamente, siendo ligeramente superiores al presentado por el tratamiento control con HM que alcanzo un porcentaje de 20,93 %; aunque se denota que numéricamente es mayor en el dosificado con 40 mL L^{-1} de EPBCA (25,09 %) y numéricamente menor en el dosificado con 100 mL L^{-1} de EPBCA (23,05 %).



Letras diferentes en un mismo grupo indica diferencia significativa ($\alpha=0,05$).

Fig. 15. Contenido de lípidos en biomasa de *Scenedesmus* sp. en los dosificados con EPBCA y grupo control (HM).

Respecto al contenido de lípidos en biomasa (mg L^{-1}) de *Scenedesmus* sp. (Tabla 07, Fig. 15) al quinto día de cultivo, fueron significativamente iguales ($p>0,05$) en los dosificados con 40 mL L^{-1} , 60 mL L^{-1} , 80 mL L^{-1} y 100 mL L^{-1} de EPBCA con $101,5 \text{ mg L}^{-1}$, $131,5 \text{ mg L}^{-1}$, $133,1 \text{ mg L}^{-1}$ y $108,6 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente. Aunque es posible observar que numéricamente la mayor producción se dio dosificando los cultivos con 60 mL L^{-1} y 80 mL L^{-1} de EPBCA con $131,5 \text{ mg L}^{-1}$ y $133,1 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente, y el menor promedio numérico se encontró en el dosificado con 40 mL L^{-1} ($101,5 \text{ mg L}^{-1}$).

IV. DISCUSION

El crecimiento poblacional es un parámetro que indica la asimilación de los nutrientes que en cultivos autotróficos, *Scenedesmus* sp puede utilizar diferentes fuentes nitrogenadas como urea, fosfato diamónico, nitratos y nitritos, y en cultivos heterotróficos ensilado de pescado y/o de EPBCA, asimismo puede metabolizar aminoácidos y vitaminas que le permiten sintetizar ácidos grasos poliinsaturados (Bold & Wynne, 1985). En nuestros ensayos, todos los cultivos dosificados con EPBCA presentaron adecuados crecimientos debido a la presencia de los nutrientes, orgánicos e inorgánicos, presentes en el ensilado. En tal sentido, los cultivos dosificados con 60 y 80 ml L⁻¹ de EPBCA alcanzaron similares crecimientos que los controles, con densidades poblacionales en el día 5 de 24,17 x10⁶ cél. mL⁻¹ y 24,50 x10⁶ cél. mL⁻¹, respectivamente. Las menores densidades poblacionales observadas en las dosificaciones de 40 y 100 ml L⁻¹ de EPBCA (20,83 x10⁶ y 22,83 x10⁶, respectivamente) podrían deberse a la presencia de desbalance nutricional o deficiencia de algún nutriente, considerándose que las dosificaciones de 60 y 80 ml L⁻¹ de EPBCA son las más adecuadas para sostener el crecimiento algal. Los menores crecimientos pueden deberse al rápido agotamiento de los nutrientes.

Es importante destacar que las similitudes de estos crecimientos demuestran el adecuado balance de nutrientes del EPBCA en comparación al HM (Fig. 11), especialmente formulada para la producción masiva de *Scenedesmus acutus*, es decir los compuestos nitrogenados del EPBCA pueden alcanzar similares niveles que el HM, ya que teóricamente cualquier compuesto nitrogenado que pasa a la membrana plasmática y entra en la vía bioquímica de las microalgas podría ser considerado como una fuente de nitrógeno; sin embargo, los procesos de ingresar a la célula y ser incorporado deben ser con la mayor rapidez para ser asimilables (Flynn & Butler, 1986).

Por otro lado, la eficacia del EPBCA como medio de cultivo fue demostrada por Jiménez & Prada (2012) con la microalga marina *Tetraselmis suecica* obteniendo los mejores crecimientos en cultivos dosificados con 80ml L⁻¹ (0,765 g L⁻¹) cuyos valores son similares a los obtenidos por nosotros. Estas similitudes o diferencias podrían deberse a los tamaños diferentes, siendo *T. suecica* (20 um) más grande que *Scenedesmus* sp (10 um); asimismo,

Ipanaqué & paredes (2010), determinaron que *T. suecica* obtuvieron mayores densidades poblacionales en cultivos dosificados con 60 y 80 ml.L⁻¹ de EPBCA con valores de 6,38 y 6,88 x10⁶ cél. ml L⁻¹, respectivamente, y fueron mayores que aquellos obtenidos con medio de cultivo f/2 de Guillard (3,67 x10⁶ cél.mL⁻¹) reconocido medio estandarizado para el cultivo de la mayoría de microalgas. Indudablemente el EPBCA, pese al bajo contenido de nitrógeno (Tabla 04), permite obtener buenos crecimientos microalgales debido a las sustancias orgánicas derivadas de la actividad bacteriana de la demolición metabólica de la materia orgánica durante el ensilado. Por otro lado, la nutrición heterotrófica de *Scenedesmus* sp favorece su crecimiento por la poca dependencia de la iluminación y el nulo o poco efecto del auto sombreado.

La compleja composición de los ensilados biológicos aporta diversas sustancias orgánicas (proteínas, carbohidratos, lípidos, etc.) así como sustancias inorgánicas (amonio, fosfatos, etc) que además de favorecer el crecimiento de las algas pueden vincularse con la variaciones del pH cuyas tenores se relacionan con la fotosíntesis (Voltolina et al, 2005)

Al considerar la tasa de crecimiento (u) se debe tener en cuenta su relación inversa con el tiempo de duplicación diaria (TD), de tal manera que el incremento de u significa mayor densidad microalgal (cel mL⁻¹). Nuestros resultados demuestran que los mejores valores de u se han determinado en los cultivos dosificados con 60 y 80 ml L⁻¹ de EPBCA (0,434 y 0,437, respectivamente) y similares al control (0,436), correspondiendo los valores de TD de 1,596, 1,587 y 1,589 día⁻¹ para las dosificaciones y control antes mencionado, demostrando la asimilación de los nutrientes presentes en el EPBCA y hace suponer la existencia de una adecuada relación N/P como indicador de un buen balance de nutrientes (Molina et al., 1991).

Respecto al contenido de lípidos, los cultivos dosificados con 40 ml l⁻¹ de EPBCA presentan los mayores valores de lípidos (25,09%) mientras que las dosificaciones de 60, 80 y 100 ml L⁻¹ de EPBCA presentan valores menores (24,71; 24,65 y 23,05%, respectivamente). La acumulación de lípidos en las células microalgales están asociadas con el crecimiento poblacional y el contenido de lípidos está relacionado con el contenido de nitrógeno; en tal sentido Chiu et al. (2009), hallaron el contenido de lípidos en células de

Nannochloropsis oculata creciendo en un medio limitado en nitrógeno durante las fases de crecimiento logarítmica, estacionaria temprana y estacionaria final, valores de 30,8, 39,7, y 50,4 %, respectivamente, observándose que los mayores porcentajes de lípidos se relaciona con la fase de cultivo. Esta situación fue corroborado por Beopoulos et al. (2009), quienes consideran que el agotamiento de nitrógeno puede detener la división celular y continuando el metabolismo del carbono que conlleva a una mayor producción de lípidos. Estos resultados apoyan lo determinado por nosotros, ya que los cultivos de *Scenedesmus sp* dosificados con 40 ml L⁻¹ de EPBCA presentan mayor porcentaje de lípidos.

Para el caso de exceso de nitrógeno, Fábregas et al. (1996), mencionan que los cultivos saturados de nitrógeno disminuyen la concentración celular y producen un aumento del peso de cada célula, con inhibición del crecimiento celular y aumento del porcentaje de proteína ya que se sigue incorporando nitrógeno aun presentándose el bloqueo de la división celular. Es probable que esto sucediera al quinto día de cultivo en el tratamiento con 60 ml de EPCBA (24,17x10⁶ cél mL⁻¹), presentando valores cercanos a los encontrados con el tratamiento con 80 ml de EPBCA (24,50 x10⁶ cél mL⁻¹), debido probablemente a que ya se ha saturado el medio con nutrientes (N, P) por lo que el aumentar dichas concentraciones ya no significa un incremento significativo de la densidad poblacional y el rendimiento en biomasa y de lípidos. Fernández & paredes (2007), obtuvieron incrementos del 85,8 % y 154 % de carbohidratos y lípidos, respectivamente en cultivos dosificados con 40 mL L⁻¹ de extracto de ensilado de pescado. Entonces puede ser una tendencia que los medios de cultivo de origen orgánico (residuos de pescado y concha de abanico) incrementen el contenido de lípidos en microalgas, en las concentraciones mencionadas.

Lo que en el experimento queda demostrado es que en el cultivo de microalgas al aumentar la concentración de nutrientes (EPBCA) la densidad poblacional de las microalgas y la producción de biomasa aumenta, pero también a menor concentración de nutrientes (EPBCA) se ha producido un mayor porcentaje de lípidos. Cohen (1999), menciona que cuando el crecimiento poblacional se retarda en respuesta a un factor limitante como la luz, consumo de nutrientes, pH, temperatura o salinidad, la mayor síntesis de lípidos y carbohidratos, estos son incrementados a expensas de la síntesis de proteínas. Entonces por todo

lo mencionado, los mejores resultados se obtuvieron en los tratamientos con 60 ml y 80 ml de EPBCA. El tratamiento con 40 ml de EPBCA no aseguraría la producción óptima de biomasa y lípidos, mientras que con 100 ml de EPBCA se estaría sobre dosificando a los cultivos, por lo que el tratamiento con el 60 ml de EPBCA se encontraría en un punto óptimo entre la concentración de nutrientes y la producción de biomasa y lípidos; y que de acuerdo a Alsull & Wan (2012), el principal factor limitante es el contenido de nitrógeno (nitratos, nitritos, proteínas) en el medio de cultivo de microalgas, por lo que se convierte como el macronutriente más importante; y su menor concentración daría lugar a un menor rendimiento de biomasa total o lipídico.

Las variaciones del pH (8-9) y la temperatura (27- 31) presentan similitudes en todos los cultivos por lo que consideramos que estos parámetros no han alterado o enmascarado el efecto del EPBCA en el crecimiento y contenido de lípidos de los cultivos de *Scenedesmus sp* en nuestras experiencias. Respecto a la temperatura, Chacón et al., (2004) demostraron que *Scenedesmus sp* se adapta muy bien a condiciones ambientales no controladas de temperatura ($26\pm 6^{\circ}\text{C}$) e iluminación natural.

V. CONCLUSIONES

1. Los mayores valores de μ para *Scenedesmus* sp al quinto de cultivo se presentaron en los tratamientos dosificados con 60 mL.L⁻¹ y 80 mL.L⁻¹ de EPBCA, con 0,518 y 0,518 día⁻¹ respectivamente; y el menor valor se presentó en el tratamiento dosificado con 40 mL.L⁻¹, con 0,45 día⁻¹.
2. El mayor valor de TD para *Scenedesmus* sp en el quinto día de cultivo, se obtuvo en el tratamiento dosificado con 40 mL L⁻¹ de EPBCA con 1,534 día; y fueron significativamente menores en los dosificados con 60 mL L⁻¹, 80 mL L⁻¹ y 100 mL L⁻¹ de EPBCA con promedios de 1,338 día, 1,340 día y 1,402 día, respectivamente.
3. El mayor contenido en porcentaje de lípidos para *Scenedesmus* sp al quinto día de cultivo, se obtuvo en el tratamiento dosificado con 40 mL L⁻¹ de EPBCA (25,09 %) y el menor en el dosificado con 100 mL L⁻¹ de EPBCA (23,05 %).

RECOMENDACIONES

- Evaluar las variaciones diarias del contenido de carbohidratos, proteínas y lípidos de los cultivos de *Scenedesmus sp* dosificados con EPBCA con la finalidad de establecer la predominancia de una de ellas en función a la dosificación y días de cultivo; asimismo, evaluar el efecto de la dosificación continua del EPBCA en el crecimiento y concentración de lípidos.
- 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 el aprovechamiento de los residuos de la pectinicultura, y evaluar económicamente la producción industrial de la biomasa de *Scenedesmus sp*.

VII . REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Alsull, M. & W. Wan. 2012. Responses of *Tetraselmis* sp. and *Nannochloropsis* sp. isolated from Penang National Park coastal waters, Malaysia, to the combined influences of salinity, light and nitrogen limitation. International Conference on Chemical, Ecology and Environmental Sciences (ICEES'2012) 17-18 de marzo, 2012. Bangkok, Tailandia. 142-145pp
- Beopoulos, A.; T. Chardot & J. Nicaud. 2009. *Yarrowia lipolytica*: a model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation. *Biochimie*. 91(6):692-696.
- Bertoldi, F., E. Sant'Anna, M. Villela & J. Barcelos. 2008. Lípidos, composición de ácidos grasos y carotenos en *Chlorella vulgaris* cultivadas en solución hidropónica residual. *Grasas y Aceites*. 57(3): 270-274. 35
- Berenz, Z. 1996. Ensilado de Residuos de Pescado. XI Curso Internacional de Procesamiento de Productos Pesqueros. Instituto Tecnológico Pesquero del Perú. Callao, Perú. 41
- Bold, H. & M. Wynne. 1985. Introduction to the Algae. New Jersey: Prentice Hall Inc. Englewood Cliffs, N. J. USA. 720p. Cabrera, C.F.
- Borowitzka, M., (1997), *Microalgae for aquaculture: Opportunities and constraints*, *Journal of Applied Phycology*, 9, pages 393 - 401.
- Contreras-Flores C, J Peña-Castro, L Flores-Cotera & R Cañizares-Villanueva. 2003. Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. *Interciencia* 28(8): 450-456
- Chacón, C., Andrade, C y Morales, E. 2004. "Producción de Biomasa de la Microalga *Scenedesmus* sp. en Cultivo Masivo y a Cielo Abierto". X Jornadas Nacionales de Investigación Científica. Maracaibo, Estado Zulia. Venezuela, 115pp.
- Chiu, S.; C. Kao; M. Tsai; S. Ong; C. Chen & C. Lin. 2009. Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration. *Bioresource Technol*. 100(2):833-838
- Encomendero, E. y F. Uchpa. (2001). Variación espacial y estacional de la biodiversidad del fouling adherido a las linternas de cultivo de concha de

abanico, *Argopecten purpuratus*, de la Empresa Inversiones del Pacífico SAC. Samanco. (No publicado)

Fábregas, J. Arán, J., Morales, E.D., Lamela, T., Otero, A. 1997. Modification of sterol concentration in marine microalgae. *Phytochemistry* 46:1189-1191.

Gómez; Rosas, J. C., & J. Martínez . 2003. Efecto de la dieta en el crecimiento poblacional del rotífero, *Brachionus plicatilis* M. 1786 Cepa Us. 50 Proceedings of the Fiftieth-Annual Gulf and Caribbean Fisheries Institute. November, 1997, Mérida, pp. 634-639.

González L., Cañizales R y Baena S. "Efficiency of Ammonia and Phosphorus Removal from a Colombial Agroindustrial Wastewater by the Microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*". *Bioresource Technology*, 60 (1997) 259-262.

Hernández, Sampieri Roberto, Fernández C. Baptista L. P. (2003): "Metodología de la Investigación". Ed. Mc Graw Hill. Chile

Huang X.; Z. Huang; W. Wen & J. Yan. 2012. Effects of nitrogen supplementation of the culture medium on the growth, total lipid content and fatty acid profiles of three microalgae (*Tetraselmis subcordiformis*, *Nannochloropsis oculata* and *Pavlova viridis*). *J. Appl. Phycol.* DOI 10.1007/s10811-012- 9846-9.

Ipanaqué, J. & I. Paredes. 2010. 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 Profesional. Universidad Nacional del Santa. Nuevo Chimbote - Perú. 65p

Loera-Quezada, M. & E. Olgúin. 2010. Las microalgas oleaginosas como fuente de biodiesel: retos y oportunidades. *Rev. Latinoam. Biotecnol. Amb. Algal.* 1(1):91-116

Meng, X.; X. Yang; X. Xu; L. Zhang; Q. Nie & M. Xian. 2009. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy.* 34(1):1-5.

Quevedo E. Hodaifa G, Martínez M, & Sánchez S. 2007. Use of industrial wastewater from olive-oil extraction for biomass production of *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technol*; 99(5): 1111 – 1117.

- Torrentera, B. L. y A. G. J. Tacon. 1989. La producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura una diagnosis. FAO. Documento de campo 12. GCP/ RLA/075/ITA, Roma. 120 pp
- Thompson, G.A. 1996. Lipids and membrane function in green algae. *Biochim. Biophys. Acta.* 1302(1):17-45.
- 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.
- Running JA, Huss RJ, Olson PT. 1994. Heterotrophic production of ascorbic acid by microalgae. *Journal of Applied Phycology* 6, 99±104.
- Steel, R. & J. Torrie. 1988. Bioestadística: Principios y procedimientos. 2da. edic. Edit. McGraw-Hill. Traducción por Ricardo Martínez. México. 622p. Sukenik, A.; O. Zamora & Y. Carmeli. 1993
- Sukenik, A.; O. Zamora & Y. Carmeli. 1993. Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. II. *Nannochloropsis* sp. *Aquaculture.* 117:313-326
- Voltolina D., Gómez H. y Correa G. "Nitrogen removal and recycling by *Scenedesmus obliquus* in semicontinuous cultures using artificial wastewater and simulated light and temperature cycled". *Bioresource Technology*, 96 (3): (2005) 359-362.

ANEXOS

Anexo 1. Temperatura (°C) en las unidades experimentales de los cultivos de *Scenedesmus* sp. dosificados con EDBCA y HM.

DÍA DE CULTIVO	EDBCA (mL L ⁻¹)														
	CONTROL (HM)			40			60			80			100		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
1	25,9	25,6	25,4	25,4	25,7	25,6	25,6	25,7	25,7	25,7	25,4	25,7	25,6	25,7	25,5
2	25,9	26,1	25,8	25,7	25,9	26,2	26,4	25,8	25,6	25,8	25,7	25,9	25,6	25,9	25,2
3	26,8	26,1	26,3	26,9	26,2	26,1	26,0	26,8	26,2	26,9	26,0	26,1	26,7	26,3	26,1
4	25,7	25,9	25,3	25,3	25,6	25,1	25,7	25,4	25,8	25,9	25,7	24,9	25,7	25,8	25,1
5	26,7	26,2	26,0	25,8	26,2	26,4	25,9	26,2	26,1	26,0	25,8	26,3	26,2	26,4	25,9
6	26,9	25,8	26,5	26,4	26,7	26,0	26,3	25,9	26,5	26,4	26,0	26,7	25,9	26,6	26,3
7	26,2	26,4	26,1	26,3	26,3	26,4	26,5	26,4	26,1	26,2	25,9	26,4	25,9	26,4	26,0

Anexo 2. Temperatura promedio (°C) en los cultivos de *Scenedesmus* sp. dosificados con EDBCA y HM.

DÍA DE CULTIVO	EDBCA (mL L ⁻¹)				
	CONTROL (HM)	40	60	80	100
1	25,6 ±0,3a	25,6 ±0,2a	25,7 ±0,1a	25,6 ±0,2a	25,6 ±0,1a
2	25,9 ±0,2a	25,9 ±0,3a	25,9 ±0,4a	25,8 ±0,1a	25,6 ±0,4a
3	26,4 ±0,4a	26,4 ±0,4a	26,3 ±0,4a	26,3 ±0,5a	26,4 ±0,3a
4	25,6 ±0,3a	25,3 ±0,3a	25,6 ±0,2a	25,5 ±0,5a	25,5 ±0,4a
5	26,3 ±0,4a	26,1 ±0,3a	26,1 ±0,2a	26,0 ±0,3a	26,2 ±0,3a
6	26,4 ±0,6a	26,4 ±0,4a	26,2 ±0,3a	26,4 ±0,4a	26,3 ±0,4a
7	26,2 ±0,2a	26,3 ±0,1a	26,3 ±0,2a	26,2 ±0,3a	26,1 ±0,3a

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

Anexo 4. pH (unid.) en las unidades experimentales en los cultivos de *Scenedesmus* sp. dosificados con EDBCA y HM.

DÍA DE CULTIVO	EDBCA (mL L ⁻¹)														
	CONTROL (HM)			40			60			80			100		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
1	7,86	7,85	7,79	7,84	7,91	7,82	7,80	7,79	7,83	7,86	7,82	7,84	7,80	7,76	7,83
2	8,03	8,02	7,94	8,13	8,13	8,01	7,97	8,10	8,12	8,00	8,12	8,17	8,18	8,15	8,17
3	8,35	8,26	8,31	8,31	8,29	8,46	8,41	8,46	8,61	8,53	8,38	8,44	8,52	8,39	8,48
4	8,72	8,91	8,79	8,85	8,94	8,64	8,77	8,92	8,87	8,92	8,79	8,87	8,75	8,95	8,92
5	8,84	8,78	8,92	8,64	8,79	8,92	8,65	8,93	8,81	8,74	8,91	8,69	8,81	8,91	8,87
6	8,76	8,68	8,79	8,81	8,58	8,69	8,79	8,61	8,77	8,65	8,60	8,72	8,78	8,65	8,60
7	8,63	8,77	8,60	8,76	8,50	8,68	8,75	8,67	8,90	8,78	8,89	8,73	8,77	8,83	8,61

Anexo 5. Valores de pH promedio (unid.) en los cultivos de *Scenedesmus* sp. dosificados con EDBCA y HM.

DÍA DE CULTIVO	EDBCA (mL L ⁻¹)				
	CONTROL (HM)	40	60	80	100
1	7,83 ±0,04a	7,86 ±0,05a	7,81 ±0,02a	7,84 ±0,02a	7,80 ±0,04a
2	8,00 ±0,05a	8,09 ±0,07a	8,06 ±0,08a	8,10 ±0,09a	8,17 ±0,02a
3	8,31 ±0,05a	8,35 ±0,09a	8,49 ±0,10a	8,45 ±0,08a	8,46 ±0,07a
4	8,81 ±0,10a	8,81 ±0,15a	8,85 ±0,08a	8,86 ±0,07a	8,87 ±0,11a
5	8,85 ±0,07a	8,78 ±0,14a	8,80 ±0,14a	8,78 ±0,12a	8,86 ±0,05a
6	8,74 ±0,06a	8,69 ±0,12a	8,72 ±0,10a	8,66 ±0,06a	8,68 ±0,09a
7	8,67 ±0,09a	8,65 ±0,13a	8,77 ±0,12a	8,80 ±0,08a	8,74 ±0,11a

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

Anexo 6. Densidad poblacional ($\times 10^6$ cél. mL⁻¹) en los cultivos de *Scenedesmus* sp. dosificados con EDBCA y HM.

DÍA DE CULTIVO	EDBCA (mL L ⁻¹)														
	CONTROL (HM)			40			60			80			100		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
1	2,75	2,75	2,75	2,75	2,75	2,75	2,75	2,75	2,75	2,75	2,75	2,75	2,75	2,75	2,75
2	4,00	4,50	3,75	4,75	5,00	4,50	5,25	4,50	4,75	4,75	4,00	3,75	4,50	5,25	4,00
3	7,00	8,00	6,75	8,00	7,25	8,25	8,25	9,00	8,50	10,25	9,75	8,75	10,75	8,75	9,75
4	12,00	14,00	12,50	12,25	11,00	14,50	14,00	12,25	12,75	14,00	14,50	17,25	15,25	16,75	17,50
5	20,50	22,00	21,00	15,50	17,00	18,00	20,75	21,50	23,50	20,75	22,75	22,00	20,00	18,50	21,25
6	23,25	24,50	25,50	20,75	22,00	19,75	23,00	24,25	25,25	23,25	24,00	26,25	23,00	21,25	24,25
7	23,50	25,50	26,50	21,50	22,75	20,00	23,50	26,50	24,00	23,75	25,25	25,75	23,75	25,50	25,00

Anexo 7. Valores de la tasa de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (TD) poblacional diaria de *Scenedesmus* sp. en las unidades experimentales dosificadas con EDBCA y HM.

PARÁMETRO	EDBCA (mL L ⁻¹)														
	CONTROL (HM)			40			60			80			100		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
N₀	2,75	2,75	2,75	2,75	2,75	2,75	2,75	2,75	2,75	2,75	2,75	2,75	2,75	2,75	2,75
N_f	20,50	22,00	21,00	15,50	17,00	18,00	20,75	21,50	23,50	20,75	22,75	22,00	20,00	18,50	21,25
Δ Día	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
μ (día⁻¹)	0,502	0,520	0,508	0,432	0,455	0,470	0,505	0,514	0,536	0,505	0,528	0,520	0,496	0,477	0,511
TD (día)	1,381	1,333	1,364	1,605	1,523	1,475	1,373	1,349	1,293	1,373	1,313	1,333	1,397	1,453	1,356

Anexo 8. Valores de la biomasa total, absorbancia, y porcentaje y biomasa de lípidos de *Scenedesmus* sp. cultivada con EDBCA y HM.

PARÁMETROS	EDBCA (mL L ⁻¹)														
	CONTROL (HM)			40			60			80			100		
Biomasa (mg x10mL⁻¹)	4,89	4,32	4,10	3,40	4,08	4,64	4,80	5,13	6,02	5,69	5,58	4,92	5,31	4,35	4,51
Biomasa (mg L⁻¹)	489,00	432,00	410,00	340,00	408,00	464,00	480,00	513,00	602,00	569,00	558,00	492,00	531,00	435,00	451,00
Absorbancia	0,451	0,422	0,404	0,401	0,439	0,558	0,550	0,569	0,693	0,660	0,625	0,550	0,539	0,463	0,495
Lípidos (%)	20,08	21,26	21,45	25,67	23,42	26,18	24,94	24,14	25,06	25,25	24,38	24,33	22,10	23,17	23,89
Lípidos (mg L⁻¹)	98,2	91,8	87,9	87,3	95,6	121,5	119,7	123,8	150,9	143,7	136,0	119,7	117,4	100,8	107,7

Anexo 9. Curva de Calibración para la determinación de lípidos de *Scenedesmus* sp. cultivada con EDBCA y HM.

N°	Concentración	Oliva	Colesterol
1	0,000	0,000	0,000
2	0,050	0,197	0,176
3	0,100	0,471	0,492
4	0,200	0,932	0,905

