

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOLOGÍA EN ACUICULTURA



Crecimiento poblacional y contenido de lípidos de la microalga *Scenedesmus acutus* cultivada con diferentes concentraciones de aguas residuales municipales en condiciones de laboratorio

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE BIÓLOGO ACUICULTOR

AUTORES:

Bach. Elizabeth Dolores Vásquez de la Cruz

Bach. Tatiana Helen Zavaleta Gámez

ASESOR:

Blgo. Pesq. Juan Fernando Merino Moya Dr.

NUEVO CHIMBOTE - PERÚ

2017

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOLOGÍA EN ACUICULTURA



Crecimiento poblacional y contenido de lípidos de la microalga *Scenedesmus acutus* cultivada con diferentes concentraciones de aguas residuales municipales en condiciones de laboratorio

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE BIÓLOGO ACUICULTOR

AUTORES:

Bach. Elizabeth Dolores Vásquez de la Cruz

Bach. Tatiana Helen Zavaleta Gámez

Revisado y Aprobado por el Asesor

Blgo. Pesq. Juan Fernando Merino Moya Dr.

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



Crecimiento poblacional y contenido de lípidos de la microalga *Scenedesmus acutus* cultivada con diferentes concentraciones de aguas residuales municipales en condiciones de laboratorio

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE BIÓLOGO ACUICULTOR

AUTORES:

Bach. Elizabeth Dolores Vásquez de la Cruz

Bach. Tatiana Helen Zavaleta Gámez

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

M.SC. WILLIAN ROBERT CAPA ROBLES
Presidente

Dr. JUAN FERNANDO MERINO MOYA
Integrante del Jurado

Blga. Acui. SORAYDA MENDOZA ESPINOZA
Integrante del Jurado

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS	i
DEDICATORIA	iii
DEDICATORIA	iv
A Dios, por estar presente y ayudarme en cada momento de mi vida. A mis padres Octavio y Marilú por su apoyo, consejos, valores, motivación constante y por los ejemplos de perseverancia y constancia.	iv
A mis hermanos Renzo, Román y Fátima que están conmigo siempre que los necesito brindándome su apoyo incondicional.	iv
A Willy por ser mi apoyo incondicional, mi compañero de vida y por darme mi mayor tesoro, mi hijo Mateo que es mi fuerza para alcanzar mis sueños.....	iv
TATIANA	iv
AGRADECIMIENTO	v
Tabla 1. Composición química del medio HM.....	vi
6	vi
Tabla 2. Composición de las ARM	vi
7	vi
Tabla 3. Diseño experimental utilizado en el cultivo de <i>Sc. acutus</i> con diferentes concentraciones de aguas residuales municipales (ARM)	vi
8	vi
Tabla 4. Aporte de nitrógeno y fósforo de las aguas residuales municipales (ARM) según los tratamientos	vi
9	vi
Tabla 5. Densidad Poblacional ($\times 10^6$ cél. mL ⁻¹) de <i>Sc. acutus</i> cultivados con ARM y control (HM).....	vi
16	vi
Tabla 6. Tasa de crecimiento (μ) y Tiempo de duplicación poblacional (TD) de <i>Sc. acutus</i> en los cultivados con ARM y control (HM).....	vi
19	vi
Tabla 7. Contenido de lípidos como porcentaje (%) y biomasa (mg L ⁻¹) en el quinto día de cultivo de <i>Sc. acutus</i> en los tratamientos con ARM y control (HM)	vi

20	vi
Fig. 1. Unidades experimentales al inicio del experimento, en los cultivos microalgales de <i>Sc. acutus</i> utilizando diferentes concentraciones de ARM y Control con HM.....	vii
9	vii
Fig. 2. Flujograma para determinar el contenido de los lípidos <i>Sc. acutus</i> en los cultivos microalgales con ARM y control HM	vii
11	vii
Fig. 3. Variación de la temperatura (°C) en los cultivos de <i>Sc. acutus</i> con ARM y control (HM)	vii
14	vii
Fig. 4. Variación del pH promedio de los cultivos de <i>Sc. acutus</i> con ARM y control (HM)	vii
15	vii
Fig. 5. Variación de la densidad poblacional de <i>Sc. acutus</i> cultivados con medio ARM y control (HM).....	vii
16	vii
Fig. 6. Unidades experimentales al quinto día de cultivo de <i>Sc. acutus</i> con ARM y control (HM)	vii
17	vii
Fig. 7. Variación de la tasa de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación poblacional (TD) de <i>Sc. acutus</i> con ARM y control (HM).....	vii
19	vii
Fig. 8. Contenido de lípidos como porcentaje de <i>Sc. acutus</i> en los tratamientos con ARM y control (HM)	vii
21	vii
Fig. 9. Contenido de lípidos como biomasa de <i>Sc. acutus</i> en los tratamientos con ARM y control (HM)	vii
22	vii
ABSTRACT	ix

DEDICATORIA

La presente está dedicada **a Dios** ya que gracias a él, he logrado concluir con mi carrera profesional; a mis padres **Jaime Vásquez y Isabel De La Cruz** porque ellos siempre estuvieron a mi lado brindándome su apoyo y consejos para hacer de mí, una persona de bien; a mis hermanos; a mi **esposo José** por motivarme a seguir y a mis hijos **Marian e Ibrahim** por ser la razón de mi ser; a mis amigas que de alguna manera u otra contribuyeron en el logro de mi objetivo.

ELIZABETH

DEDICATORIA

A Dios, por estar presente y ayudarme en cada momento de mi vida. A mis padres **Octavio y Marilú** por su apoyo, consejos, valores, motivación constante y por los ejemplos de perseverancia y constancia.

A mis hermanos Renzo, Román y Fátima que están conmigo siempre que los necesito brindándome su apoyo incondicional.

A Willy por ser mi apoyo incondicional, mi compañero de vida y por darme mi mayor tesoro, mi hijo Mateo que es mi fuerza para alcanzar mis sueños.

TATIANA

AGRADECIMIENTO

A nuestra alma mater, la Universidad Nacional Del Santa que nos permitió formarnos en lo personal y profesional.

A nuestros docentes de la E.A.P. de Biología en Acuicultura por sus sabias enseñanzas, por su paciencia y por brindarnos una formación humanística, ética, tecnológica y científica.

Al Dr. Juan Fernando Merino Moya por su apoyo incondicional durante el desarrollo y culminación del proyecto.

ELIZABETH y TATIANA

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición química del medio HM	6
Tabla 2. Composición de las ARM	7
Tabla 3. Diseño experimental utilizado en el cultivo de <i>Sc. acutus</i> con diferentes concentraciones de aguas residuales municipales (ARM)	8
Tabla 4. Aporte de nitrógeno y fósforo de las aguas residuales municipales (ARM) según los tratamientos	9
Tabla 5. Densidad Poblacional ($\times 10^6$ cél. mL ⁻¹) de <i>Sc. acutus</i> cultivados con ARM y control (HM)	16
Tabla 6. Tasa de crecimiento (μ) y Tiempo de duplicación poblacional (TD) de <i>Sc. acutus</i> en los cultivados con ARM y control (HM)	19
Tabla 7. Contenido de lípidos como porcentaje (%) y biomasa (mg L ⁻¹) en el quinto día de cultivo de <i>Sc. acutus</i> en los tratamientos con ARM y control (HM)	20

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Unidades experimentales al inicio del experimento, en los cultivos microalgales de <i>Sc. acutus</i> utilizando diferentes concentraciones de ARM y Control con HM	9
Fig. 2. Flujograma para determinar el contenido de los lípidos <i>Sc. acutus</i> en los cultivos microalgales con ARM y control HM	11
Fig. 3. Variación de la temperatura (°C) en los cultivos de <i>Sc. acutus</i> con ARM y control (HM)	14
Fig. 4 . Variación del pH promedio de los cultivos de <i>Sc. acutus</i> con ARM y control (HM)	15
Fig. 5. Variación de la densidad poblacional de <i>Sc. acutus</i> cultivados con medio ARM y control (HM)	16
Fig. 6. Unidades experimentales al quinto día de cultivo de <i>Sc. acutus</i> con ARM y control (HM)	17
Fig. 7. Variación de la tasa de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación poblacional (TD) de <i>Sc. acutus</i> con ARM y control (HM)	19
Fig. 8. Contenido de lípidos como porcentaje de <i>Sc. acutus</i> en los tratamientos con ARM y control (HM)	21
Fig. 9. Contenido de lípidos como biomasa de <i>Sc. acutus</i> en los tratamientos con ARM y control (HM)	22

RESUMEN

Se estudió el crecimiento poblacional y el contenido de lípidos de la microalga *Scenedesmus acutus* cultivada con diferentes concentraciones de aguas residuales municipales (ARM) en condiciones de laboratorio, en concentraciones de 25, 50, 75 y 90 % de ARM. Las mayores densidades poblacionales de *Sc. acutus* al quinto día estuvieron con 50, 75 y 90 % de ARM con $20,56 \times 10^6$ cél. mL⁻¹, $21,19 \times 10^6$ cél. mL⁻¹ y $22,47 \times 10^6$ cél. mL⁻¹, respectivamente; mientras, el menor se encontró con 25 % de ARM con $13,95 \times 10^6$ cél. mL⁻¹. Las mayores tasas de crecimiento poblacional de *Sc. acutus* al quinto día estuvieron con 50, 75 y 90 % de ARM con $0,461 \text{ día}^{-1}$, $0,467 \text{ día}^{-1}$ y $0,479 \text{ día}^{-1}$, respectivamente; mientras, la menor se encontró con 25 % de ARM con $0,383 \text{ día}^{-1}$; asimismo, el mayor tiempo de duplicación poblacional de *Sc. acutus* al quinto día estuvieron con 25 % de ARM con 1,809 d; mientras, los menores se encontraron con 50, 75 y 90 % de ARM con 1,504 d, 1,485 d y 1,448 d, respectivamente. El mayor porcentaje de lípidos en *Sc. acutus* al quinto día estuvo con 25 % de ARM con 27,98 %; mientras, los menores se encontraron con 50, 75 y 90 % de ARM con 24,47 %, 23,94 % y 23,64 %, respectivamente.

Palabras Clave: Microalga, *Scenedesmus acutus*, agua residual municipal, crecimiento poblacional, lípidos.

ABSTRACT

Was studied, population growth and lipid content of microalgae *Scenedesmus acutus* cultured with different concentrations of municipal wastewater (MW) under laboratory conditions, in concentrations of 25, 50, 75 and 90 % of MW. The highest population densities *Sc. acutus* on the fifth day were 50, 75 and 90 % MW with $20,56 \times 10^6$ cel. mL⁻¹, $21,19 \times 10^6$ cel. mL⁻¹ and $22,47 \times 10^6$ cel. mL⁻¹, respectively; while the lowest was found with 25 % of MW with $13,95 \times 10^6$ cel. mL⁻¹. The highest rates of population growth on the fifth day *Sc. acutus* were 50, 75 and 90 % MW with $0,461 \text{ day}^{-1}$, $0,467 \text{ day}^{-1}$ and $0,479 \text{ day}^{-1}$, respectively; while the lowest was found with 25 % of MW with $0,383 \text{ day}^{-1}$; also, longer population doubling *Sc. acutus* on the fifth day were 25 % of MW with 1,809 d; while the lowest were found with 50, 75 and 90 % MW with 1,504 d, 1,485 d and 1,448 d, respectively. The highest percentage of lipids *Sc. acutus* was the fifth day with 25 % of MW with 27,98 %; while the lowest were found with 50, 75 and 90 % MW with 24,47 %, 23,94 % and 23,64 %, respectively.

Key Words: Microalgae, *Scenedesmus acutus*, municipal wastewater, population growth, lipids.

I. INTRODUCCIÓN

Las microalgas son microorganismos que requieren adecuados factores ambientales para su crecimiento como la luz, temperatura CO₂, pH, fotoperiodo y nutrientes, usando moléculas orgánicas y micronutrientes como catalizadores (Becker, 1994; Hu *et al.*, 2008), a fin de producir lípidos, proteínas y carbohidratos en grandes cantidades en tiempos cortos (Palomino *et al.*, 2010). Estas pueden ser consideradas alimento funcional, ya que elevan el contenido nutricional de los alimentos tradicionales y tienen efecto positivo en la salud de animales y humanos (Quevedo *et al.*, 2008), aportan oxígeno al ambiente, tienen contenidos nutritivos importantes, como son los polisacáridos, aminoácidos, enzimas y otras proteínas (Quevedo *et al.*, 2008; Capa, 2010).

La microalga del género *Scenedesmus* pertenece a la División Chlorophyta, Clase Chlorophyceae, Orden Chlorococcales, Familia Scenedesmaceae, habita los cuerpos de agua dulce en forma solitaria o en colonias formando cenobios (Garibay *et al.*, 2009). *Scenedesmus* sp. es una microalga muy común en aguas dulces y salobres con suficiente cantidades de nutrientes que le permiten crecer aceleradamente (Ruíz, 2011), y por su gran capacidad de adaptación ecofisiológica y plasticidad bioquímica son consideradas maquinarias fotosintéticas (Escudero, 2012); además, este género de microalga se caracteriza por su capacidad de soportar elevadas concentraciones de nutrientes contenidos en aguas residuales, poseer actividad metabólica elevada y de resistir variaciones ambientales que la hacen sobrevivir en ambientes extremos (Andrade *et al.*, 2009).

Se puede clasificar a las aguas residuales en dos tipos: industriales y municipales, aquellas requieren tratamiento antes de ser descargadas en el sistema de alcantarillado municipal, cuyas características cambian de una a otra industria, y los procesos de tratamiento son también muy variables (Valdez & Vázquez, 2003). El agua colectada en los sistemas de alcantarillado municipal corresponde a una amplia variedad de usos haciendo que su composición varíe en los sólidos suspendidos, compuestos orgánicos biodegradables y microorganismos patógenos (Valdez & Vázquez, 2003). Seoáñez (1999),

capaces de producir tifus, cólera, desintería, etc., o virus (hepatitis A), adenovirus, enterovirus, reovirus, rotavirus, y hasta otros organismos como protozoarios tipo amebas, huevos de oxiuros (Tufferry, 1979). Adicionalmente, las aguas que llegan a estos “estanques de oxidación”, contienen importantes cantidades de detergentes u otras sustancias químicas como resultado del uso doméstico de limpiadores de diversas fórmulas.

El manejo inadecuado de aguas residuales causan serios problemas al ambiente, la salud humana y el desarrollo económico (PNUMA, 2004), cuya problemática se ha incrementado en relación al tratamiento de aguas residuales y su posible reuso (Méndez *et al.*, 2010). Ante ello, la aplicación de tecnologías sostenibles es indispensable desde la captación de aguas, su tratamiento y su reuso (Morató *et al.*, 2006). Siendo las microalgas, una alternativa para el tratamiento de aguas residuales por su capacidad de remoción de nutrientes debido a las características del crecimiento y nutrición (Andrade *et al.*, 2009). Asimismo, pueden ser utilizadas como indicadores ecológicos indicando la calidad del agua y su sensibilidad a los efluentes industriales (Gómez & Ramírez, 2004).

Las fuentes de abastecimiento y administración del agua y desagüe de Chimbote y Nuevo Chimbote son manejadas por la empresa SEDACHIMBOTE S.A. En Nuevo Chimbote, el sistema de alcantarillado está compuesto por 481,18 km de tuberías que recolecta el agua de 54115 conexiones de alcantarillado; cuyas aguas residuales municipales de Nuevo Chimbote, llegan a ser tratadas (573164,80 m³) en las lagunas de oxidación Las Gaviotas, Villa María y Laguna Centro Sur A., siendo el índice de tratamiento de aguas residuales de 37 % (SUNASS, 2005).

En las lagunas de reducción “Las Gaviotas” se reciben todas las aguas residuales de Nuevo Chimbote, y se están generando afloramientos de aguas subterráneas y son arrojados directamente al arenal, deteriorando el suelo y subsuelo y provocando la salinización de los terrenos aledaños, y por supuesto, quedando inservibles para cualquier actividad agrícola (Loayza, 2002). BCEOM & OIST (1998), consideran que un mal tratamiento de las aguas residuales

municipales contamina diversas especies marinas utilizadas en la alimentación humana. En consecuencia, el tratamiento de las aguas residuales es una cuestión prioritaria por la necesidad de disponer de agua de calidad y en cantidad suficiente que permitirá una mejora del ambiente, la salud y la calidad de vida (Romero *et al.*, 2009).

La remoción de nutrientes de estas aguas residuales municipales puede realizarse utilizando métodos biológicos, físicos y químicos (Blackall *et al.*, 2002; Malick, 2002). Las microalgas también se emplean en la detoxificación biológica y control de metales pesados en aguas naturales o aguas industrialmente contaminadas, siendo una opción viable para los sistemas de tratamiento de estas aguas residuales (Gómez, 2007; Hernández *et al.*, 2012), y que por su capacidad de utilizar sustancias o elementos químicos presentes, posibilitan el crecimiento y generación de biomasa microalgal útil, convirtiéndolos en organismos muy importantes en la depuración del ambiente (Herbas *et al.*, 2006).

Existen varias metodologías de remediación de las aguas residuales, así tenemos a Reyes *et al.* (2011), que estudiaron la remoción de fósforo en cuatro reactores biológicos empacados con escoria volcánica (tezontle) y plantaron brotes de *Phragmites australis*, “carrizo”, demostrando que en todos los reactores hubo remoción del 93% de fósforo, y la disminución de la DQO por la presencia de la planta hidrofita utilizada, es decir su efecto depurador.

González & Saldarriaga (2008), trabajaron procesos biológicos unitarios para la remoción conjunta de materia orgánica (MO), nitrógeno (N) y fósforo (P), empleando un sustrato sintético similar al agua residual doméstica de concentración media; lográndose eficiencias promedio de remoción de 92,5 % en MO, 87,7 % en N y 83,5 % en P.

El uso de microalgas en la remoción de nutrientes en aguas residuales, se presenta con buena eficiencia, así Ji *et al.* (2014), utilizaron aguas residuales de la industria porcina con el método de la digestión anaeróbica y posterior utilización de la microalga *Desmodesmus* sp., esta agua residual presenta una alta concentración de amoníaco, y se obtuvo la máxima tasa de remoción con el

10 % de dilución, con el 100 % para el amoníaco y el fósforo soluble; mientras, que el nitrógeno total fue removido en un 75 %, produciendo 0,412 g L⁻¹ de biomasa seca a los 14 días del tratamiento. Asimismo, Rasoul *et al.* (2014), seleccionaron 5 cepas de dos especies de microalgas para remover nitratos, fosfatos y nitrógeno amoniacal de aguas residuales urbanas en cultivos batch. La más alta tasa de remoción de nitrógeno lo realizó *Chlorella* sp (84,11 %), y para fosfato la microalga *Chlamydomonas* sp. (100 %), que en su mayor parte ocurrió durante los primeros cuatro días de cultivo.

Entonces, consideramos que los cultivos de *Sc. acutus* utilizando aguas residuales municipales, y que contienen N, P, K y otros nutrientes, permitirían la obtención de biomasa microalgal para la obtención de fertilizantes de uso agrícola y reciclando el nitrógeno y fósforo en forma de biomasa a bajo costo, tornándose en una actividad sustentable por reciclar alrededor del 90 % de dichos nutrientes sin entrar en competencia con la agricultura (González *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2011). Adicionalmente, la conversión del N y P en biomasa y el uso del CO₂ en este proceso, se estaría contribuyendo a la reducción de las emisiones de gases del efecto invernadero (Sawayama *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2010; Pittman *et al.*, 2011), sin generar poluciones adicionales haciendo más eficiente la remoción de nutrientes que los métodos convencionales.

Por ello, la creciente preocupación por la constante agresión sobre el ambiente que provoca la actividad industrial y urbana (Gómez, 2007) urge la aplicación de medidas de remediación que permitan preservar o recuperar las naturales condiciones del ambiente; además, posibilita la bioconversión de diversos residuos en biomasa (proteínas, lípidos, pigmentos, etc.). En tal sentido, la utilización de microalgas ha demostrado una posible solución a este problema, y consideramos que la utilización de las aguas residuales municipales mediante microalgas podría otorgar valor económico derivado de la generación de biomasa, por tanto, nos planteamos la siguiente interrogante: ¿Cuál será el crecimiento poblacional y contenido de lípidos de la microalga *Scenedesmus acutus* cultivada con diferentes concentraciones de aguas residuales municipales en condiciones de laboratorio?

El objetivo general del estudio fue: Evaluar el crecimiento poblacional y contenido de lípidos de la microalga *Sc. acutus* cultivada con diferentes concentraciones de aguas residuales municipales en condiciones de laboratorio; y los objetivos específicos fueron:

-) Determinar el crecimiento poblacional, tasa de crecimiento y tiempo de duplicación diaria en concentraciones de 25; 50; 75 y 90 % de aguas residuales municipales utilizando la microalga *Sc. acutus* en laboratorio.

-) Determinar el contenido de lípidos de la microalga *Sc. acutus* cultivada en concentraciones de 25; 50; 75 y 90 % de aguas residuales municipales en laboratorio.

La hipótesis planteada para el crecimiento poblacional y contenido de lípidos de la microalga *Sc. acutus* fue la siguiente: Si utilizamos concentraciones de 25; 50; 75 y 90 % de aguas residuales municipales para el cultivo de la microalga *Sc. acutus* en laboratorio, se obtendrá el mejor crecimiento poblacional y contenido de lípidos en la concentración al 50 % de aguas residuales municipales.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Localización del experimento

El experimento fue desarrollado en el Laboratorio de Cultivos de Especies Auxiliares de la Facultad de Ciencias en la Universidad Nacional del Santa, Chimbote, Perú.

2.2. Material experimental

2.2.1. Material biológico

La microalga *Sc. acutus* procedió del stock del Laboratorio de Cultivos de Especies Auxiliares de la E.A.P. Biología en Acuicultura. El stock fue mantenido con medio de cultivo HM en tubos de ensayo con iluminación (2000 lux) y agitación constante (Merino, 1999). Estos cultivos de *Sc. acutus* se mantuvieron por 4 días y fueron llevados a dos botellas con un volumen efectivo de 2000 mL con iluminación (2000 lux) y aireación constante (1000 mL min⁻¹) durante 5 días. Estos cultivos fueron utilizados como inóculos para iniciar la experiencia.

2.3. Preparación de los medios de cultivo

2.3.1. Medio de cultivo HM

El medio de cultivo HM (tabla 2) que se utilizó para los inóculos de *Sc. acutus* y el control durante la experiencia, fue preparado según lo propuesto por Merino (1999).

Tabla 1. Composición química del medio HM.

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN (mg L ⁻¹)
Urea	206,0
H ₃ PO ₄	19,0
KCl	30,0
FeCl ₃	2,5

Fuente: Merino, 1999

2.3.2. Preparación del medio de cultivo con aguas residuales municipales (ARM)

El agua residual municipal procedió de la laguna de estabilización secundaria “Las Gaviotas”, ubicada en el humedal de “Villa María” en Nuevo Chimbote, Ancash - Perú. Los efluentes de la laguna de estabilización se colectaron, utilizando guantes y mascarilla, con una jarra de plástico de 1 L y fueron depositados en dos baldes de plástico de 20 L con tapa hermética con un volumen efectivo de 10 L cada uno, y se llevaron con el cuidado de no derramarla y mantener el sellado del balde, hasta su tratamiento en el laboratorio de Microbiología en la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional del Santa, siguiendo la metodología y recomendaciones de seguridad del Protocolo de monitoreo de plantas de tratamiento de aguas residuales y domésticas del Ministerio de Vivienda, Construcción y Saneamiento del Perú (2013).

El tratamiento del ARM consistió en una cocción a 100 °C aproximadamente por 30 min. Se dejó enfriar y se filtró con una malla de Nyltal de 5 μ m. Luego se llevó a la autoclave por 15 min a 121 °C, para eliminar microorganismos patógenos, y fue utilizado como medio base para los cultivos con *Sc. acutus*. En laboratorio se analizaron los parámetros de humedad, salinidad, pH, sólidos totales, nitratos, nitritos, amonio y fosfatos del ARM (APHA, 2005) (tabla 2).

Tabla 2. Composición de las ARM.

PARÁMETROS	CONCENTRACIÓN
Humedad (%)	86,39
Salinidad (ups)	2,73
pH (unid.)	7,14
Sólidos Totales (mg L ⁻¹)	136,12
Nitratos (mg L ⁻¹)	19,15
Nitritos (mg L ⁻¹)	0,28
Amonio (mg L ⁻¹)	5,14
Fosfatos (mg L ⁻¹)	4,03

2.4. Preparación de las unidades experimentales

Se utilizaron 15 botellas plásticas de 2200 mL de volumen total, con 1000 mL de volumen efectivo de cultivo. Los inóculos fueron agregados a cada unidad experimental en la proporción de 1:10 v/v, tomando 100 mL de inóculo microalgal y aforado a 1 L de cultivo final. Se aseguró que los cultivos estuvieran en la fase de crecimiento exponencial, y que se obtenga una densidad poblacional inicial promedio de $2,05 \times 10^6$ cél. mL⁻¹ en cada unidad experimental.

Las unidades experimentales fueron iluminadas constantemente (2000 lux) con dos fluorescentes de luz blanca de 40 w, que fueron medidos con un luxómetro digital Hanna ($\pm 0,1$ lux), y aireados.

Tabla 3. Diseño experimental utilizado en el cultivo de *Sc. acutus* con diferentes concentraciones de aguas residuales municipales (ARM).

PARÁMETROS	TRATAMIENTOS (ARM)				
	T0 (HM) (0 %)	T1 (25 %)	T2 (50 %)	T3 (75 %)	T4 (90 %)
Agua Residual (mL)	0	250	500	750	900
Agua Potable (mL)	900	750	400	150	0
Inóculo (mL)	100	100	100	100	100
TOTAL (mL)	1000	1000	1000	1000	1000

Estas dosificaciones fueron determinadas por ensayos previos en laboratorio, encontrándose que en todas las concentraciones se obtuvieron buenos crecimientos poblacionales con el medio ARM. Asimismo, de acuerdo a la concentración del N y P en las aguas residuales y los volúmenes utilizados en los ensayos, se calcula el aporte de los nutrientes para el crecimiento microalgal (tabla 4) y la coloración inicial de los cultivos de *Sc. acutus* (fig. 1).

Tabla 4. Aporte de nitrógeno y fósforo de las aguas residuales municipales (ARM) según los tratamientos.

PARÁMETROS	TRATAMIENTOS (ARM)				
	T0 (HM) (0 %)	T1 (25 %)	T2 (50 %)	T3 (75 %)	T4 (90 %)
Agua Residual (mL)	0	250	500	750	900
Nitrógeno (mg L ⁻¹)	100	2,22	4,44	6,66	7,99
Fósforo (mg L ⁻¹)	6,14	1,01	2,02	3,02	3,63



Fig. 1. Unidades experimentales al inicio del experimento, en los cultivos microalgales de *Sc. acutus* utilizando diferentes concentraciones de ARM y Control con HM.

2.5. Registro de los parámetros ambientales del cultivo

Durante los 7 días del cultivo, se registraron el pH y la temperatura, haciendo uso de un pHmetro digital ($\pm 0,01$) incorporado con termómetro ($\pm 0,1$ °C) marca Oakton.

La aireación fue constante y provista por un blower de 1/2 HP, con un flujo de aire de 500 mL min⁻¹ por cada unidad experimental, el cual se midió con un flujómetro Cole Parmer (± 10 mL min⁻¹).

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

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

El crecimiento poblacional se determinó durante 7 días. Para ello se colocaron dos muestras de cada unidad experimental de la suspensión microalgal en la cámara Neubauer con una micropipeta Pasteur y fueron contados las células utilizando un microscopio binocular marca Olympus a un aumento de 400 X del número de células y un volumen $0,5 \times 10^{-3}$ mL.

Luego con las densidades poblacionales se graficaron las curvas de crecimiento poblacional, y se determinaron la tasa de crecimiento poblacional diaria (μ) y el tiempo de duplicación diaria (TD) al quinto día de cultivo, según Guillard (1975) mediante las fórmulas:

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

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

También se determinó la biomasa microalgal al final del cultivo, según metodología modificada de Cobos *et al.* (2016), para lo cual se pesó el papel filtro Whatman N° 42, se colocó en un embudo Büchner con matraz Kitasato y con ayuda de una bomba de vacío se filtró 50 mL de suspensión microalgal y se colocaron en placas de Petri para llevarlo a estufa a 60 °C por 12 h, seguido se aumentó a una temperatura de 105 °C por 10 min. Se dejó enfriar en un secador de campana por 1 h y se pesó cada papel filtro, y estos datos se reemplazarán en la siguiente fórmula:

$$\text{Biomasa (mg L}^{-1}\text{)} = ((\text{P2} - \text{P1}) / 50) \times 1000$$

Donde:

P1: Peso inicial papel (mg)

P2: Peso final (papel + muestra) (mg)

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

Las muestras de lípidos se obtuvieron cuando los cultivos de *Sc. acutus* alcanzaron la fase exponencial (día 5).

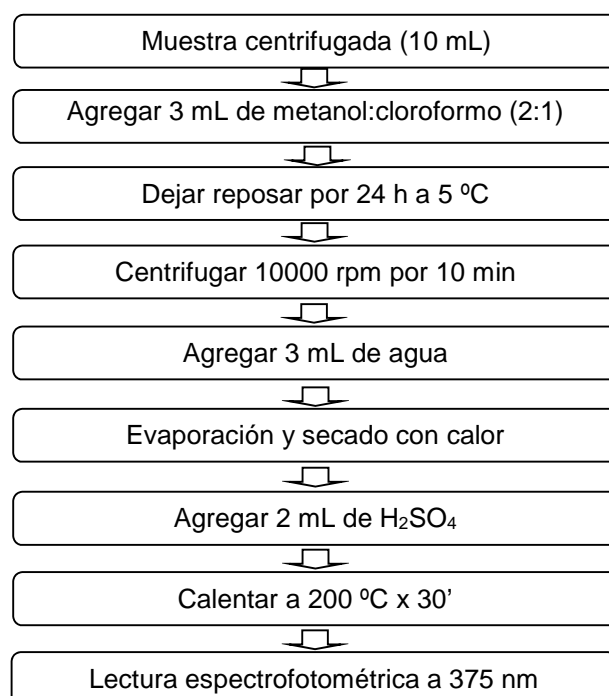


Fig. 2. Flujograma para determinar el contenido de los lípidos *Sc. acutus* en los cultivos microalgales con ARM y control HM. (Blight & Dyer, 1959; Marsh & Weinsteinn, 1966).

La extracción de lípidos de microalgas se realizó con la metodología modificada de Blight & Dyer (1959) y la determinación de su contenido según metodología modificada de Marsh & Weinsteinn (1966) (fig. 2).

De cada unidad experimental, fueron centrifugados 10 mL del cultivo microalgal a 10000 rpm por 10 min, seguido se eliminó el sobrenadante y se dejó la pasta de microalga, para ser secadas en estufa a 60 °C por espacio de 6 h.

A cada una de las muestras secadas, se añadió 3 mL de una solución de metanol:cloroformo (2:1) en tubos de ensayo rotulados; se agitó y se mantuvieron en refrigeración a 5 °C por 24 h protegidos de la luz. Seguido se adicionó 3 mL de agua destilada a cada tubo de ensayo y se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min, y se extrajo la capa superior y se evaporó lo restante a 80 °C.

Luego se agregó 2 mL de H₂SO₄ concentrado (98 %) y se calentó a una temperatura de 200 °C por 1 h; se enfrió con agua potable a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron las lecturas en un espectrofotómetro Turner Barstearnd Internacional con celdas de cuarzo a una longitud de onda de 375 nm. Las curvas de calibración se efectuaron previamente con aceite de Oliva y colesterol, promediándose las dos pendientes de las curvas de regresión lineal, dando como ecuación general para determinar los lípidos en porcentaje (L) (Blight & Dyer, 1959; Marsh & Weinsteinn, 1966) la siguiente:

$$L (\%) = \frac{\left(\left(\frac{A}{P} \right) \times V \right)}{M} \times 100$$

Donde:

V: Volumen final de muestra analizada (15 mL).

M: Peso seco (mg) en 10 mL de cultivo.

P: Promedio de las pendientes de las curvas de calibración con aceite de Oliva y colesterol (4,4714).

También se determinó el contenido de lípidos en biomasa (LB) de cada tratamiento, utilizando la siguiente fórmula:

$$LB (m L^{-1}) = \frac{L \times B}{100}$$

Donde:

L: Porcentaje de lípidos (%).

B: Biomasa seca por litro (mg).

2.8. Análisis estadístico de los datos

Los datos del crecimiento celular, tasa de crecimiento y tiempo de duplicación poblacional, y contenido de lípidos, fueron sometidos al análisis de varianza (ANOVA) para establecer diferencias entre sus promedios y se utilizó la prueba de Tukey HSD para establecer el mejor promedio, con un nivel de significancia de 0,05, para ambos casos. El tratamiento estadístico fue desarrollado utilizando los programas, Office Excel 2013 y SPSS 20.0 para Microsoft Windows 8.

III. RESULTADOS

3.1. Componentes ambientales del cultivo

3.1.1. Temperatura

La variación de la temperatura en los tratamientos de *Sc. acutus* cultivados con medio ARM y control (HM), son mostrados en la fig. 3.

La temperatura en las unidades experimentales con *Sc. acutus* varió entre los 23,4 y 25,1 °C durante los siete días del cultivo, siendo estadísticamente similares ($p > 0,05$).

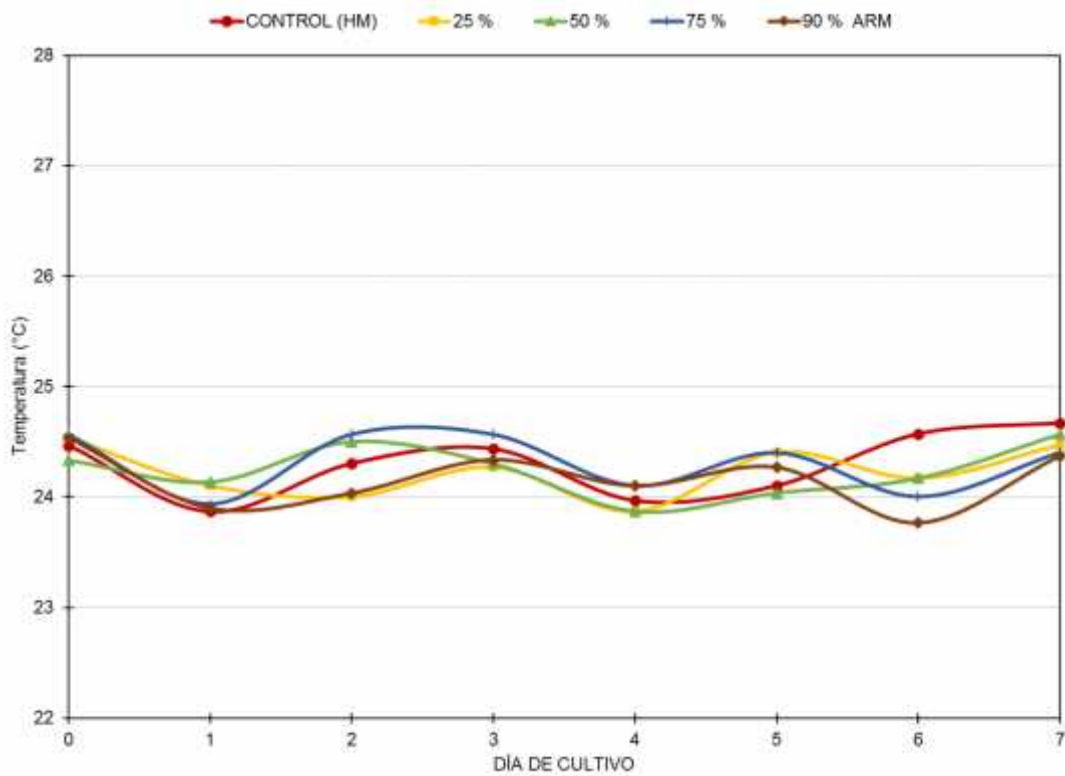


Fig. 3. Variación de la temperatura (°C) en los cultivos de *Sc. acutus* con ARM y control (HM).

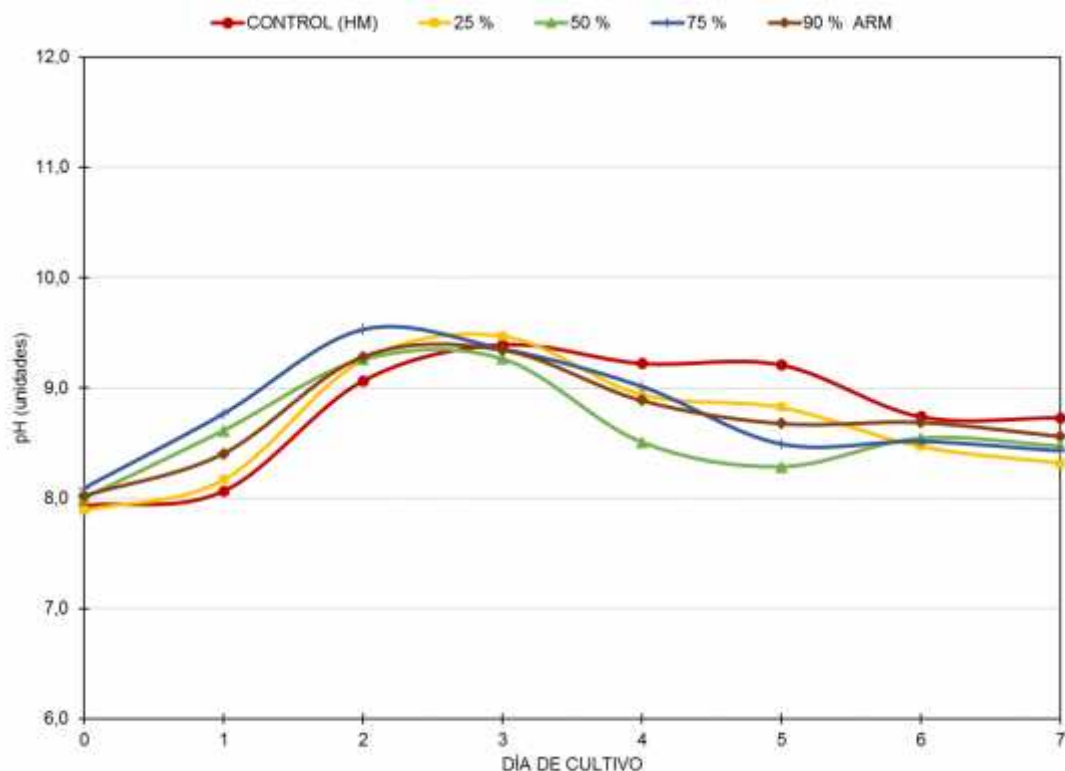


Fig. 4. Variación del pH promedio de los cultivos de *Sc. acutus* con ARM y control (HM).

3.1.2. pH

Los valores del pH en los cultivos de *Sc. acutus* son mostrados en la fig. 4 y varían entre los 7,81 unid. al inicio y 9,64 unid. al segundo día de cultivo.

Al inicio del experimento, los valores de pH en los cultivos de *Sc. acutus* fueron estadísticamente similares ($p > 0,05$). En el día 1 de cultivo fueron similares ($p > 0,05$) entre los tratamientos con 50, 75 y 90 % de ARM; mientras fue menor ($p < 0,05$) con 25 % de ARM y control (HM). De igual manera, en los días 2, 3 y 4 de cultivo de *Sc. acutus* los valores de pH fueron estadísticamente similares ($p > 0,05$). Al quinto día de cultivo, los valores de pH fueron similares entre los tratamientos con ARM, siendo mayor ($p < 0,05$); siendo menor en el control con HM. En los días finales de cultivo, 6 y 7, fueron similares ($p > 0,05$) entre todos los tratamientos.

3.2. Crecimiento poblacional de *Sc. acutus*

3.2.1. Crecimiento celular de *Sc. acutus*

En la tabla 5, fig. 5 y 6, se observan las variaciones en las densidades poblacionales de *Sc. acutus* cultivados con medio ARM y Control (HM).

Tabla 5. Densidad Poblacional ($\times 10^6$ cél. mL⁻¹) de *Sc. acutus* cultivados con ARM y control (HM).

DÍA DE CULTIVO	ARM (%)				
	CONTROL	25	50	75	90
0	2,05 ± 0,00 ^a	2,05 ± 0,00 ^a	2,05 ± 0,00 ^a	2,05 ± 0,00 ^a	2,05 ± 0,00 ^a
1	2,93 ± 0,28 ^a	3,04 ± 0,16 ^a	3,10 ± 0,14 ^a	2,95 ± 0,25 ^a	3,32 ± 0,44 ^a
2	4,84 ± 0,85 ^a	5,56 ± 0,54 ^a	5,82 ± 0,59 ^a	5,45 ± 0,51 ^a	5,45 ± 0,53 ^a
3	9,17 ± 0,76 ^b	9,86 ± 0,89 ^{ab}	11,50 ± 0,58 ^a	10,75 ± 0,28 ^{ab}	10,46 ± 0,68 ^{ab}
4	15,45 ± 0,71 ^a	12,58 ± 0,72 ^b	15,97 ± 0,78 ^a	15,99 ± 0,86 ^a	16,55 ± 0,93 ^a
5	19,74 ± 1,38 ^b	13,95 ± 0,57 ^c	20,56 ± 0,67 ^{ab}	21,19 ± 1,13 ^{ab}	22,47 ± 0,85 ^a
6	21,21 ± 0,95 ^b	13,87 ± 1,33 ^c	22,32 ± 0,89 ^{ab}	23,65 ± 0,64 ^{ab}	24,04 ± 1,05 ^a
7	23,83 ± 0,67 ^a	14,06 ± 0,63 ^b	22,92 ± 1,04 ^a	24,51 ± 0,73 ^a	24,93 ± 0,86 ^a

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

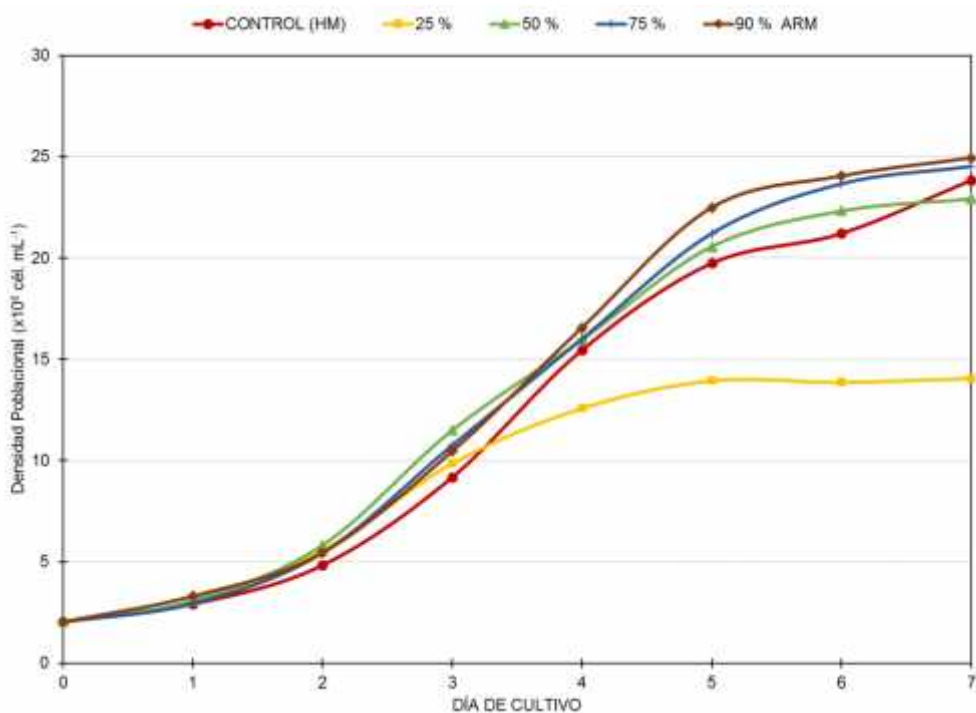


Fig. 5. Comportamiento del crecimiento poblacional de *Sc. acutus* cultivados con medio ARM y control (HM).



Fig. 6. Unidades experimentales al quinto día de cultivo de *Sc. acutus* con ARM y control (HM).

Los cultivos de *Sc. acutus* se iniciaron con densidades celulares significativamente similares ($p > 0,05$) de $2,05 \times 10^6$ cél. mL^{-1} , y se incrementaron al transcurrir los días del experimento, con tendencias similares ($p > 0,05$) hasta el segundo día de cultivo microalgal.

Para el tercer día de cultivo, se observa que los mayores promedios significativos ($p < 0,05$) del crecimiento poblacional de *Sc. acutus* en los tratamientos con 50, 75 y 90 % de ARM con $11,50 \times 10^6$ cél. mL^{-1} , $10,75 \times 10^6$ cél. mL^{-1} y $10,46 \times 10^6$ cél. mL^{-1} , respectivamente.

Al cuarto día de cultivo, se observa que los mayores promedios significativos ($p < 0,05$) del crecimiento poblacional de *Sc. acutus* en los tratamientos con 50, 75 y 90 % de ARM con $15,97 \times 10^6$ cél. mL^{-1} , $15,99 \times 10^6$ cél. mL^{-1} y $16,55 \times 10^6$ cél. mL^{-1} , respectivamente. mostrándose una menor densidad significativa ($p < 0,05$) en el dosificado con 25 % de ARM con $12,58 \times 10^6$ cél. mL^{-1} .

En el quinto día de cultivo, se observan similares tendencias al cuarto día, en donde los mayores promedios significativos ($p < 0,05$) del crecimiento poblacional de *Sc. acutus* en los tratamientos con 50, 75 y 90 % de ARM con $20,56 \times 10^6$ cél. mL⁻¹, $21,19 \times 10^6$ cél. mL⁻¹ y $22,47 \times 10^6$ cél. mL⁻¹, respectivamente. Mostrándose una menor densidad significativa ($p < 0,05$) en el dosificado con 25 % de ARM con $13,95 \times 10^6$ cél. mL⁻¹.

Para el sexto día de cultivo microalgal, se observan similares tendencias al cuarto y quinto día, siendo los mayores promedios significativos ($p < 0,05$) del crecimiento poblacional de *Sc. acutus* en los tratamientos con 50, 75 y 90 % de ARM con $22,32 \times 10^6$ cél. mL⁻¹, $23,65 \times 10^6$ cél. mL⁻¹ y $24,04 \times 10^6$ cél. mL⁻¹, respectivamente. Estando la menor densidad significativa ($p < 0,05$) en el dosificado con 25 % de ARM con $13,95 \times 10^6$ cél. mL⁻¹.

En el último día (7) de cultivo microalgal, se observan los mayores promedios significativos ($p < 0,05$) del crecimiento poblacional de *Sc. acutus* en los tratamientos con 50, 75 y 90 % de ARM con $22,92 \times 10^6$ cél. mL⁻¹, $24,51 \times 10^6$ cél. mL⁻¹ y $24,93 \times 10^6$ cél. mL⁻¹, respectivamente. Mostrándose una menor densidad significativa ($p < 0,05$) en el dosificado con 25 % de ARM con $14,06 \times 10^6$ cél. mL⁻¹.

3.2.2. Tasa de crecimiento y tiempo de duplicación poblacional

En la tabla 6, fig. 7, se observan la tasa de crecimiento (μ) y el tiempo de duplicación poblacional (TD) de *Sc. acutus* cultivada con ARM y control (HM), que fueron determinados en la fase exponencial para el quinto día de cultivo en todos los tratamientos.

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

PARÁMETRO	ARM (%)				
	CONTROL	25	50	75	90
N_0	2,05±0,00	2,05±0,00	2,05±0,00	2,05±0,00	2,05±0,00
N_f	19,74±1,38	13,95±0,57	20,56±0,67	21,19±1,13	22,47±0,85
Día (d)	5	5	5	5	5
μ (d ⁻¹)	0,453±0,013 ^b	0,383±0,008 ^c	0,461±0,007 ^{ab}	0,467±0,011 ^{ab}	0,479±0,007 ^a
TD (d)	1,532±0,045 ^a	1,809±0,039 ^b	1,504±0,021 ^a	1,485±0,034 ^a	1,448±0,022 ^a

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

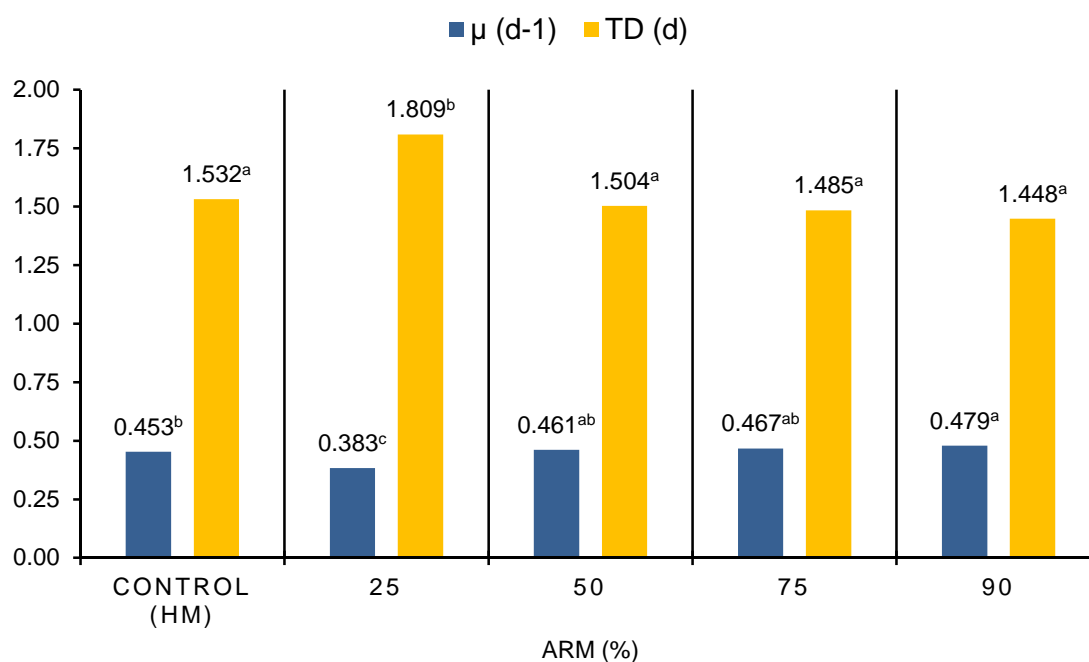


Fig. 7. Variación de la tasa de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación poblacional (TD) de *Sc. acutus* con ARM y control (HM).

La tasa de crecimiento poblacional (μ) para el quinto día de cultivo de *Sc. acutus*, muestra los mayores valores significativos ($p < 0,05$) en los tratamientos con 50, 75 y 90 % de ARM con 0,461, 0,467 y 0,479 d⁻¹, respectivamente. Mientras, la menor tasa de crecimiento se encontró en el tratamiento con 25 % de ARM con 0,383 d⁻¹.

El tiempo de duplicación poblacional diaria (TD) para el quinto día de cultivo de *Sc. acutus* fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en el tratamiento con 25 % de ARM con 1,809 d. Mientras, que los menores valores significativos del TD ($p < 0,05$) se obtuvieron en los tratamientos con 50, 75 y 90 % de ARM con 1,504, 1,485 y 1,448 d, respectivamente.

3.3. Contenido de lípidos en *Sc. acutus*

En la tabla 7, fig. 8 y 9, se observan los promedios del contenido de lípidos como porcentaje (%) y biomasa (mg L^{-1}) de *Sc. acutus* analizados en el quinto día de cultivo en todos los tratamientos del experimento.

Tabla 7. Contenido de lípidos como porcentaje (%) y biomasa (mg L^{-1}) en el quinto día de cultivo de *Sc. acutus* en los tratamientos con ARM y control (HM).

PARÁMETROS	ARM (%)				
	CONTROL (HM)	25	50	75	90
Biomasa (mg L^{-1})	680,0 \pm 47,3	510,0 \pm 20,9	752,0 \pm 24,2	775,3 \pm 41,1	821,3 \pm 30,6
Lípidos (%)	21,78 \pm 0,49 ^c	27,98 \pm 0,65 ^a	24,47 \pm 0,44 ^b	23,94 \pm 0,46 ^b	23,64 \pm 0,51 ^b
Lípidos (mg L^{-1})	148,3 \pm 13,7 ^b	142,8 \pm 9,1 ^b	184,1 \pm 9,2 ^a	185,7 \pm 13,3 ^a	194,3 \pm 11,3 ^a

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

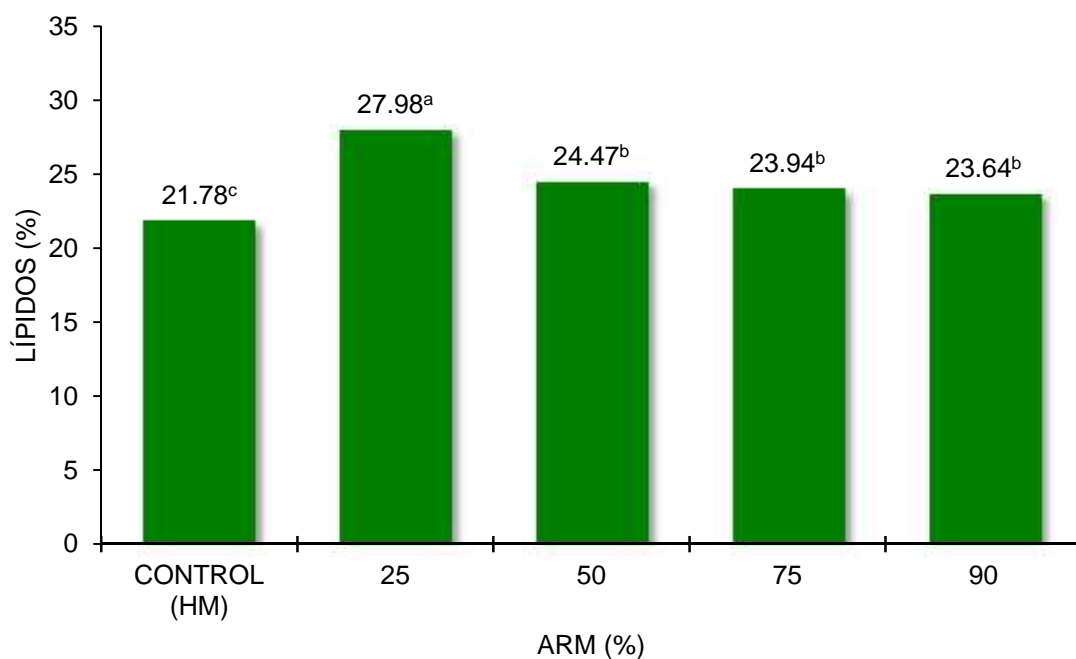


Fig. 8. Contenido de lípidos como porcentaje de *Sc. acutus* en los tratamientos con ARM y control (HM).

El contenido de lípidos como porcentaje de *Sc. acutus* en el quinto día de cultivo, presentó el mayor promedio significativo ($p < 0,05$) en el tratamiento con 25 % de ARM con 27,98 %. Mientras, que los menores promedios significativos ($p < 0,05$) se obtuvieron con 50, 75 y 90 % de ARM con 24,47, 23,94 y 23,64 %, respectivamente. Todos estos fueron significativamente mayores al tratamiento control con HM que presentó un porcentaje de lípidos de 21,78 %.

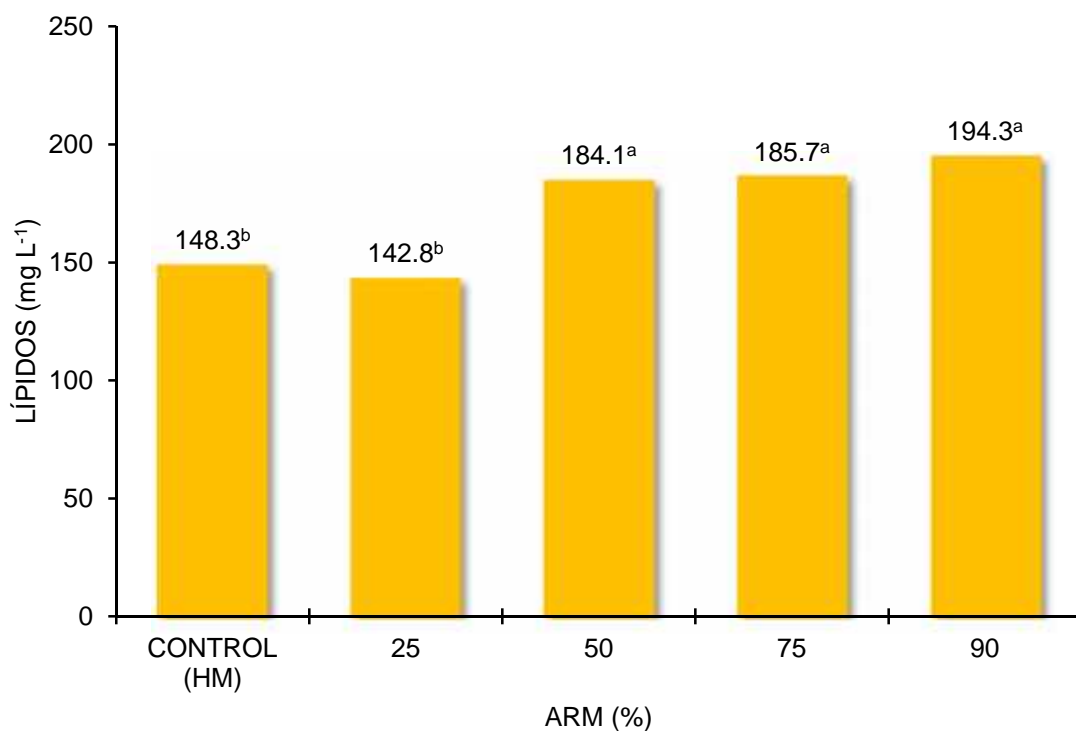


Fig. 9. Contenido de lípidos como biomasa de *Sc. acutus* en los tratamientos con ARM y control (HM).

El contenido de lípidos como biomasa (mg L⁻¹) de *Sc. acutus* en el quinto día de cultivo, fueron significativamente mayores ($p < 0,05$) en los tratamientos con 50, 75 y 90 % de ARM con 184,1, 185,7 y 194,3 mg L⁻¹, respectivamente. Mientras, que se obtuvo un menor promedio significativo de biomasa de lípidos ($p < 0,05$) en el tratamiento con 25 % de ARM con 142,8 mg L⁻¹., lo mismo que el tratamiento control que obtuvo 148,3 mg L⁻¹ lípidos en biomasa.

IV. DISCUSIÓN

Los cultivos microalgales dependen de las condiciones de cultivo, principalmente temperatura, pH, intensidad de luz, salinidad, nutrientes, entre otros (Richmond & Becker; 1986; Abalde *et al.*, 1995; Garibay *et al.*, 2009), de tal manera que la obtención de los resultados de un trabajo de investigación no contenga interferencias, estos cultivos, deben llevarse o estar en los rangos óptimos de cada especie microalgal.

En general, las microalgas toleran rangos de temperatura variable, dependiendo la especie, así, algunas especies suelen estar por debajo de los 25 °C, mientras, que otras especies soportan hasta los 36 °C (Abalde *et al.*; 1995), para *Scenedesmus*, Garibay *et al.* (2009), menciona, que la temperatura óptima del cultivo para un crecimiento adecuado debe estar en 28 ±2 °C. En el experimento con ARM se registraron temperaturas en el rango de 23,4 °C y 25,1 °C, las mismas que son cercanas a las mencionadas por Garibay *et al.* (2009), y estarían en el rango mencionado por Abalde *et al.* (1995).

En el caso del pH de los cultivos microalgales, Richmond & Becker (1986), consideran que deberían variar entre 7 y 8 unid., pero que se puede incrementar en algunas unidades sin afectar su crecimiento, ya que la mayor sensibilidad estaría en una disminución brusca de ellos, afectando su supervivencia, asimismo, Garibay *et al.* (2009), consideran que las condiciones adecuadas de pH en los cultivos microalgales están entre las 6,5 y 9,5 unidades, por lo tanto, en nuestra experiencia los valores de pH fluctuaron entre 7,81 al inicio y 9,64 al segundo día de cultivo, cercanos a los valores considerados por Garibay *et al.* (2009). Por lo tanto, las variables de temperatura y pH de los cultivos microalgales son importantes en el crecimiento y composición química, por encontrarse en los rangos expuestos, no tendrían efecto en la obtención de los resultados del presente experimento con ARM.

El crecimiento poblacional de *Sc. acutus* se debe a que estarían utilizando los nutrientes presentes en el medio de cultivo ARM (nitratos, nitritos, amonio y fosfatos) y apoyado por la presencia de N y C orgánicos derivados de la

degradación de la materia orgánica proporcionando condiciones de crecimiento heterotróficas, lo que hace imperar el aprovechamiento nutricional de los nutrientes por su organismo. Se ha demostrado la capacidad de las microalgas de crecer en altas concentraciones de azúcares como lo demostraron Toyub *et al.* (2008), en cultivos de *Sc. obliquus* con diferentes concentraciones de residuos de una fábrica de dulces (1,5; 2,0; 2,5 y 3,0 %), durante 14 días bajo condiciones de laboratorio, iniciándose con una densidad poblacional de $0,21 \times 10^6$ cél. mL⁻¹, encontrando al décimo día densidades de $9,71$; $8,32$; $6,52$ y $5,12 \times 10^6$ cél. mL⁻¹, utilizando 2,5; 3,0; 2,0 y 1,5 % de los residuos, respectivamente. También Wang *et al.* (2013), utilizando aguas residuales, en el cultivo de *Chlorella sp.* para remover el nitrógeno y fósforo del efluente de aguas residuales a distintas proporciones, encontraron que la microalga tuvo los mayores crecimientos con la proporción del 50 % del efluente con una densidad poblacional de $3,54 \times 10^6$ cél. mL⁻¹, haciendo notar que los altos niveles de nitrógeno ($38,03$ mg L⁻¹) y fósforo ($1,83$ mg L⁻¹) favorecieron el crecimiento microalgal. En el presente experimento los niveles de fósforo ($4,03$ mg L⁻¹) y nitrógeno ($24,57$ mg L⁻¹) del agua residual posibilitaron el crecimiento microalgal de *Sc. acutus*.

Experiencias realizadas por Chacón *et al.* (2004), evidenciaron la posibilidad de utilizar aguas residuales como medio de cultivo, encontraron que el mayor crecimiento de *Chlorella sp.* y *Scenedesmus sp.* fue utilizando agua residual filtrada y esterilizada comparado con el medio sintético; siendo *Scenedesmus sp.* el que creció 2 veces más con el agua residual filtrada ($9,35 \times 10^6$ cél. mL⁻¹) que con el medio algal ($4,69 \times 10^6$ cél. mL⁻¹), seguido del agua esterilizada ($5,09 \times 10^6$ cél. mL⁻¹). En el presente estudio, los valores del crecimiento poblacional de *Sc. acutus* en los tratamientos con 50 %, 75 % y 90 % de ARM ($20,56 \times 10^6$ cél. mL⁻¹, $21,19 \times 10^6$ cél. mL⁻¹ y $22,47 \times 10^6$ cél. mL⁻¹, respectivamente) fueron mayores a los reportados por Chacón *et al.* (2004), Toyub *et al.* (2008) y Ma *et al.* (2012), cultivando *Scenedesmus sp.* en aguas residuales domésticas. La utilización de nutrientes de aguas residuales por microalgas, también es corroborado por Wang & Lan (2011), quienes ensayaron con agua residual urbana tras su tratamiento secundario mediante el cultivo de *Neochloris oleoabundans*, obteniendo biomasa de 2100 mg L⁻¹, producción de 233 mg L⁻¹ d⁻¹ y eliminación total de 218 mg N-NO₃ L⁻¹ y 47 mg PO₄ L⁻¹.

La tasa de crecimiento en microalgas muestra el potencial biológico relacionado con el tiempo de duplicación, es decir el número de veces que divide al día, de una especie en particular, desde el inicio de un cultivo, que es cuando la concentración de biomasa es baja y no existe deficiencia de nutrientes o la luz no es limitante hasta un máximo cuando las condiciones de incremento poblacional se ven limitadas sobre todo por la deficiencia de nutrientes y el autosombreado (Griffiths *et al.*, 2012; Roleda *et al.*, 2013).

En relación a la tasa de crecimiento, Martínez *et al.* (2000), determinó tasa de $1,08 \text{ d}^{-1}$ y $4,56 \text{ d}^{-1}$ en *Sc. obliquus* utilizando aguas residuales procedente del tratamiento secundario y suministración continua de CO_2 ; asimismo, Ma *et al.* (2012), determinaron tasas de crecimiento de $0,44 \text{ d}^{-1}$ y tiempo de duplicación de 1,58 en cultivos de la cepa de *Scenedesmus* sp. LX1 en aguas residuales, mientras, que las tasas de crecimiento halladas por Durvasula *et al.* (2015), en *Scenedesmus* sp. cultivadas en laboratorio con aguas residuales domésticas enriquecidas con 1 % de Tris-Acetato-fosfato fueron de $0,24 \text{ d}^{-1}$ al noveno día y el mismo valor ($0,24 \text{ d}^{-1}$) fue hallado al cuarto día en cultivos al aire libre. Comparativamente, nuestros resultados al quinto día son más altos, correspondiendo $0,461$, $0,467$ y $0,479 \text{ d}^{-1}$ a los dosificados 50, 75 y 90 % de ARM, respectivamente, y el menor valor fue al de 25 % ($0,383 \text{ d}^{-1}$). En vista que el tiempo de duplicación (TD) es un valor inverso a la tasa de crecimiento o de división (μ), ya que a mayor tasa de crecimiento menor tiempo de duplicación microalgal, el mayor valor correspondió al de 25 % de ARM (1,809 d) y los menores a 50, 75 y 90 % de ARM con 1,504, 1,485 y 1,448 d, respectivamente.

En consecuencia, los valores de μ correspondientes a los tratamientos con 50 %, 75 % y 90 % de ARM fueron mayores a los reportados por Ma *et al.* (2012) y Durvasula *et al.* (2015); y menores a los reportados por Martínez *et al.* (2000), suplementado con CO_2 , considerándose a este gas como importante fuente de carbono inorgánico que mejora las condiciones del crecimiento microalgal.

El menor crecimiento poblacional obtenido con 25 % de ARM, puede ser explicado, porque la deficiencia de nitrógeno en el cultivo incrementa el tiempo

de duplicación de las células disminuyendo la velocidad de multiplicación celular (Fábregas *et al.*, 1985), y por la presentación de desbalances o menores concentraciones de importantes nutrientes como nitrógeno y fósforo. Por lo tanto, en condiciones limitadas de nitrógeno, los procesos enzimáticos se hacen más lentos que la fotosíntesis, afectando la tasa de crecimiento y el tiempo de duplicación, estableciéndose una relación inversa entre la tasa de crecimiento y la cantidad de nitrógeno celular con la reducción de la tasa de crecimiento (González-Rodríguez & Maestrini, 1984; Fábregas *et al.*, 1985); sin embargo, a partir de 50 % de ARM el crecimiento de *Sc. acutus* mejora, al parecer, por el aporte de N, P y quizás C orgánico derivados de la muerte y desintegración bacteriana como consecuencia de las condiciones altamente aeróbicas de los cultivos microalgales creciendo vigorosamente.

Se ha reportado que la calidad y cantidad de nutrientes influyen en la composición química de las microalgas propiciando cambios en su crecimiento y composición química, de tal manera que su composición química dependerá de la composición de nutrientes en el medio de cultivo (Kaplan *et al.*, 1986; Vieira & Klaveness, 1986; Vonshak, 1986; Henriksen *et al.*, 2002; Beopoulos *et al.*, 2009). Es así que, las microalgas pueden contener de 1 hasta 90 % de lípidos en peso seco, que depende de la especie y las condiciones ambientales del cultivo (Spolaore *et al.*, 2006; Beopoulos *et al.*, 2009; Gouveia & Oliveira, 2009); además, la acumulación de lípidos en las células microalgales está asociada con el crecimiento poblacional y la edad del cultivo, así tenemos que *Nannochloropsis oculata*, cultivada en un medio limitado en nitrógeno presentan diferentes porcentajes de lípidos, correspondiendo 30,8 %, 39,7 % y 50,4 % para la fases logarítmica, estacionaria temprana, y estacionaria final, respectivamente (Chiu *et al.*, 2009). También se ha demostrado el efecto del estrés ambiental, como un iniciador, en la acumulación de lípidos (Hong *et al.*, 2008), por lo tanto, la composición química de las microalgas puede ser manipulada mediante el cambio de los parámetros físicos y químicos del medio de cultivo (Huang *et al.*, 2003).

En el presente estudio, el mayor porcentaje de lípidos estuvo con 25 % de ARM (27,98 %), y los menores en los dosificados con 50, 75 y 90 % de ARM (24,47,

23,94 y 23,64 %, respectivamente). Estos resultados concuerdan con lo anteriormente mencionado, que a menor concentración de nitrógeno mayor contenido de lípidos; sin embargo, las tasas de crecimiento en los cultivos controles que contienen mayor concentración de nitrógeno, obtienen menor concentración de lípidos (21,78 %) y menor tasa de crecimiento ($0,453 \text{ d}^{-1}$) que los cultivos dosificados con ARM, lo que podría explicarse por la mayor variedad y complejidad de sustancias químicas, orgánicas e inorgánicas, presentes en las aguas residuales. Adicionalmente, cabe la posibilidad de la existencia de algún estrés colateral derivado de la presencia de bacterias anaeróbicas, al inicio de los cultivos, y/o la muerte posterior de tales microorganismos.

Respecto al contenido de lípidos y la eliminación del amonio, Ruiz-Marín & Mendoza-Espinosa (2010), lograron reducciones de amonio del 100 % y 60 % en cultivos batch de *Sc. obliquus* y *Chlorella vulgaris*, respectivamente, así como rendimientos de lípidos de 20,37% para *Chlorella* y 20,10 % para *Sc. obliquus*; estos porcentajes de lípidos son menores a los obtenidos en el presente estudio.

La formulación de medios de cultivo microalgales implica la adecuada dosificación de nitrógeno para la síntesis principalmente de proteínas importantes para mantener el crecimiento y la división celular, sin embargo, en condiciones limitadas de nitrógeno, el metabolismo celular se orienta a la formación y acumulación de las sustancias de reserva (hidratos de carbono y lípidos), como respuesta a una condición severa de estrés ya que el nitrógeno es constituyente principal de proteínas y ácidos nucleicos que son altamente abundante en las células vivas (Sukenik *et al.*, 1993; Jiang, 2002; Huang *et al.*, 2003). En tal sentido, Gordillo *et al.* (1998), reportó que la limitación del nitrógeno con 1 % de CO_2 en *Dunaliella sp*, los lípidos aumentan del 1 % a 22 %, considerando que dicha deficiencia resulta beneficiosa en la producción de lípidos de interés comercial.

Así, la obtención de altos porcentajes de lípidos permitirá incrementar el valor comercial de las microalgas; sobre todo, si utilizamos insumos como las aguas residuales, que permitirán resolver un problema ecológico al disminuir la concentración de nutrientes y producir biomasa microalgal de lípidos de muy bajo

costo. Es muy interesante la natural remoción de sustancias nitrogenadas por las microalgas, que generalmente perturban el ambiente acuático, así tenemos que Ma *et al.* (2012), lograron remociones del 95,5 %, 96,3 %, 85,8 % y 98,8 %, de amonio, nitrito, nitrato y fosfatos, respectivamente y obteniendo 0,38 g L⁻¹ (masa seca) conteniendo 0,12 g L⁻¹ y 31,6 % de lípidos. Comparativamente, en nuestro trabajo utilizando ARM en el cultivo de *Sc. acutus* se obtuvieron mayores valores de lípidos en biomasa correspondiendo 184,1, 185,7 y 194,3 mg L⁻¹ a los cultivos dosificados con 50, 75 y 90 % de ARM, respectivamente.

Otros investigadores han realizado ensayos relacionados a la producción de biomasa microalgal y lípidos mediante la remoción de los nutrientes de las aguas residuales, así tenemos a Shin *et al.* (2015), quienes cultivaron *Sc. bijuga* con aguas residuales de una planta de alimentos y aguas residuales domésticas primarias diluidas obteniendo biomasa de 1,24 g L⁻¹ en 28 días y 1,33 g L⁻¹ en el día 26, mientras que las concentraciones de lípidos de 30 % en día 3 y valores máximos de 35 %, 30,8 % y 33,8 % de lípidos en el día 28 en diluciones de 1/10, 1/20 y 1/30 de los efluentes, respectivamente, mayores a los determinados en medio sintético (18%).

Wong *et al.* (2015), trataron aguas residuales domésticas primarias y filtradas con *Sc. quadricauda*, encontrando las mayores concentraciones de microalgas aclimatadas y no aclimatadas de 0,995 g L⁻¹ y 0,940 g L⁻¹, respectivamente, y al quinto día fue removido el 90 % de ortofosfato y 95 % de nitrógeno amoniacal, en cultivos aclimatados y no aclimatados, respectivamente; con niveles de lípidos mayores al 13 % para todos los tratamientos, siendo el más alto a una concentración del 50 % de aguas residuales con 18,1 % de lípidos, y 80 % de los fosfatos fue removido en concentraciones de aguas residuales de 25 y 50 % a seis días de cultivo; asimismo el 90 % del nitrógeno amoniacal fue removido, en ambos casos. Quedando evidencia que *Scenedesmus* puede utilizar nutrientes en las aguas residuales y convertirlas en biomasa como lípidos, como lo encontrado por Durvasula *et al.* (2015), que en cultivos de *Scenedesmus* sp. con aguas residuales domésticas, obtuvieron de 0,64 g L⁻¹ a 0,96 g L⁻¹ de lípidos, aunque estos valores son más altos a las obtenidos con ARM en nuestros ensayos, debido probablemente a una mayor concentración de nutrientes y a

una posible mejor variedad en los mismos, pero que no deja de ser importante y satisfactorio, la posibilidad de cultivar microalgas con medios de cultivo basados en aguas residuales como el ARM.

En base a nuestros resultados y a los obtenidos por otros investigadores es posible realizar cultivos masivos de microalgas utilizando aguas residuales o efluentes industriales, a nivel piloto, para la obtención de biomasa algal y generar recursos económicos luego de remediar aquellos efluentes que actualmente no son tratados. En tal sentido, Chacón *et al.* (2004), afirma que el crecimiento algal en aguas residuales, por contener alta disponibilidad de nutrientes constituyen substratos alternativos para el desarrollo de microalgas como *Chlorella sp.* y *Scenedesmus sp.*; por lo tanto, las aguas residuales, ricas en compuestos químicos, permiten sostener el metabolismo de ciertos microorganismos fotosintéticos y la generación del oxígeno producido oxidará los compuestos residuales propiciando la depuración eficiente de las aguas residuales (Khowaja, 2000; Chacón *et al.*, 2004; Shin *et al.*, 2015). Por todo ello se hace factible utilizar las aguas residuales como el ARM para producir biomasa microalgal y lípidos de gran valor comercial, y a su vez mitigando posibles impactos negativos al ambiente.

V. CONCLUSIONES

- El mayor crecimiento poblacional ($p < 0,05$) de *Scenedesmus acutus* se obtuvo en el quinto día en los tratamientos de 50, 75 y 90% con $20,56 \times 10^6$ cél. mL⁻¹, $21,19 \times 10^6$ cél. mL⁻¹ y $22,47 \times 10^6$ cél. mL⁻¹, respectivamente; y la menor densidad poblacional ($p < 0,05$) se encontró en el tratamiento con el 25 % con $13,95 \times 10^6$ cél. mL⁻¹.
- Las mayores tasas de crecimiento poblacional ($p < 0,05$) de *Scenedesmus acutus* se obtuvieron con los tratamientos de 75 y 90% con $0,467$ día⁻¹ y $0,479$ día⁻¹ respectivamente; y la menor tasa de crecimiento poblacional ($p < 0,05$) se encontró en el tratamiento con el 25 % con $0,383$ día⁻¹.
- El mayor tiempo de duplicación poblacional ($p < 0,05$) de *Scenedesmus acutus* se obtuvieron en el quinto día con el tratamiento de 25 % con 1,809 d; y los de menores tiempo de duplicación poblacional ($p < 0,05$) se encontraron en los tratamientos con 50, 75 y 90% con 1,504, 1,485 y 1,448d respectivamente.
- El mayor porcentaje de lípidos ($p < 0,05$) en *Scenedesmus acutus* se obtuvo en el tratamiento con 25 % con 27,98 %; y los menores porcentajes de lípidos ($p < 0,05$) se encontraron en los tratamientos con 50% con 24,47%, respectivamente.

VI. RECOMENDACIONES

- ❖ Determinar los elementos minerales de las aguas residuales municipales tales C, K, Fe y otros que influyan en el crecimiento poblacional de *Scenedesmus acutus*.
- ❖ Evaluar económicamente la producción de biomasa microalgal y lípidos totales de *Sc. acutus* utilizando como medio de cultivo las aguas residuales municipales en condiciones de aire libre en piletas y en fotobiorreactores.
- ❖ Evaluar el tratamiento de aguas residuales municipales como medio de cultivo sin previa cocción y valorar la biomasa obtenida con fines de producción de lípidos para biocombustibles.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abalde, J.; A. Cid; P. Fidalgo; E. Torres & C. Herrero. 1995. Microalgas: Cultivos y Aplicaciones. Monografía N° 26. Coruña: Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias, Universidad de Coruña. La Coruña, España. 181p.
- Andrade, C.; A. Vera; C. Cárdenas & E. Morales. 2009. Biomass production of microalgae *Scenedesmus* sp. with wastewater from fishery. Rev. Tec. Ing. Univ. Zulia. 32(2):126-134.
- APHA. 2005. Métodos estándares para el análisis de agua potable y agua residuales. Standard Methods for the examination of wastewater. 21 edit. American Public Health Association (APHA) - American Water Works Association (AWWA) - Water Environment Federation (WEF). 1082p.
- BCEOM & OIST (Asociados). 1998. Estudios definitivos de la primera etapa de ampliación de los sistemas de agua potable y alcantarillado de la localidad de Chimbote. Minist. Presid. Chimbote, Perú.
- Becker, E. 1994. Biotechnology and microbiology. Cambridge University Press, Cambridge. U.S.A. 293p.
- Beopoulos, A.; T. Chardot & J. Nicaud. 2009. *Yarrowia lipolytica*: a model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation. *Biochimie*. 91(6):692-696.
- Blackall, L.; G. Crocetti; A. Saunders & P. Bond. 2002. A review and update of the microbiology of enhanced biological phosphorus removal in wastewater treatment plants. *Antonie Leeuwenhoek*. 81:681-692.
- Bligh, E. & W. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 3:911-917.
- Capa, W. 2010. Biología y Biotecnología de Microalgas. Primera Edic. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC). Lima, Perú. 181p.

- Chacón, C.; C. Andrade; C. Cárdenas; I. Araujo & E. Morales. 2004. Uso de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. en la remoción de nitrógeno, fósforo y DQO de aguas residuales urbanas de Maracaibo, Venezuela. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela*. 38(2):94-108.
- 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.
- Cobos, M.; J. Paredes & J. Castro. 2016. Inducción de la producción de lípidos totales en microalgas sometidas a estrés nutritivo. *Acta Biol. Colomb.* 21(1):17-26.
- Durvasulaa, R.; I. Hurwitza; A. Fiecka & D.V. Raoa. 2015. Culture, growth, pigments and lipid content of *Scenedesmus* species, an extremophile microalga from Soda Dam, New Mexico in wastewater. *Algal Research*. 10:128-133.
- Escudero, R. 2012. Planta de producción de microalgas con fines energéticos. Proyecto fin de Carrera de Ingeniería Química. Universidad de Almería. Almería, España. 342p.
- Fábregas, J.; C. Herrero & C. Abalde. 1985. Growth, chlorophyll a and protein of the marine microalga *Isochrysis galbana* in batch cultures with different salinities and high nutrient concentrations. *Aquaculture*. 50:1-11.
- Fernández, M. & C. Paredes. 2007. Efecto del extracto de ensilado de pescado y urea en el crecimiento poblacional y contenido de carbohidratos y lípidos de la microalga *Tetraselmis suecica* cultivada en condiciones de laboratorio. Tesis para optar el Título de Biólogo Acuicultor. Universidad Nacional del Santa. Nuevo Chimbote, Perú. 62p.

- Garibay, A., R, Vázquez-Duhalt; M. Sánchez; L. Serrano & A. Martínez. 2009. Biodiesel a partir de microalgas. *BioTecnología*. 13(3):38-61.
- Garibay, A.; R, Vázquez-Duhalt; M. Sánchez; L. Serrano & A. Martínez. 2009. Biodiesel a partir de microalgas. *BioTecnología*. 13(3):38-61.
- Gómez, L. & Z. Ramírez. 2004. Microalgas como Biomonitores de Contaminación. *Revista Cubana de Química*. 16(2):34-48.
- Gómez, L. 2007. Microalgas: Aspectos ecológicos y biotecnológicos. *Revista Cubana de Química*. 19(2):14-16.
- González, L.; R. Cañizares & S. Baena. 1997. Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a Colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. *Biores. Technol.* 60:259-262.
- González, M. & J. Saldarriaga. 2008. Remoción biológica de materia orgánica, nitrógeno y fósforo en un sistema tipo anaerobio-anóxico-aerobio. *Revista EIA*. (10):45-53.
- González, M. 2006. Aplicación e importancia de las microalgas en el tratamiento de aguas residuales. *Contactos*. 59:64-70.
- González-Rodríguez, E. & S. Maestrini. 1984. The use of some agricultural fertilizers for the mass production of marine microalgae. *Aquaculture*. 36:245-256.
- Gordillo, F.; M. Goutx; F. Figueroa & F. Niell. 1998. Effects of light intensity, CO₂ and nitrogen supply on lipid class composition of *Dunaliella viridis*. *J. Appl. Phycol.* 10(2):135-144.
- Gouveia, L. & A. Oliveira. 2009. Microalgae as a raw material for biodiesel production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36(2):269-274.

- Griffiths, M.; R. Van Hille & S. Harrison. 2012. Lipid productivity, settling potential and fatty acid profile of 11 microalgal species grown under nitrogen replete and limited conditions. *J. Appl. Phycol.* 24:989-1001.
- Henriksen, P.; B. Riemann; H. Kaas; H. Munk & H. Lang. 2002. Effects of nutrient limitation and irradiance on marine phytoplankton Pigments. *J. Plank. Res.* 24(9):835-858.
- Herbas, R.; F. Rivero & A. Gonzales. 2006. Indicadores biológicos de calidad del agua. Tesis de Maestría en Ingeniería Ambiental. Universidad Mayor de San Simón. Cochabamba, Bolivia. 21p.
- Hernández, B.; M. Rodríguez; C. Lozano & P. Castilla. 2012. Remoción de nutrientes por tres cultivos de microalgas libres e inmovilizados. *Rev. Latinoam. Biotecnol. Amb. Algal.* 3(1):80-94.
- Hong, Y.; H. Hu & F. Li. 2008. Physiological and biochemical effects of allelochemical ethyl 2-methyl acetoacetate (EMA) on cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 71:527-534.
- Hu, Q.; M. Sommerfeld; E. Jarvis; M. Ghirardi; M. Posewitz; M. Seibert & A. Darzins. 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstock for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J.* 54(4):621-639.
- Huang, X.; H. Zhou; C. Yuan & M. Sun. 2003. The effects of nitrogen source and concentration on the nutritional value of *Nannochloropsis oculata*. *J. Shanghai Fish Univ.* 12:113-116.
- Ipanaqué, J. & I. Paredes. 2009. Efecto del ensilado de los desechos blandos de *Argopecten purpuratus* "concha de abanico", en el crecimiento poblacional y contenido de lípidos totales de *Tetraselmis suecica*, en condiciones de laboratorio. Tesis para optar el Título de Biólogo Acuicultor. Universidad Nacional del Santa. Nuevo Chimbote, Perú. 65p.

- Ji, F.; Y. Liu; R. Hao; G. Li; Y. Zhou & R. Dong. 2014. Biomass production and nutrients removal by a new microalgae strain *Desmodesmus* sp. in anaerobic digestion wastewater. *Bioresource Technology*. 161:200-207.
- Jiang, X.M. 2002. Effects of temperatures, light intensity and nitrogen concentrations on the growth and fatty acid composition of *Nannochloropsis oculata*. *Mar. Science*. 26:9-12.
- Kaplan, D.; A. Richmond; Z. Dubinsky & S. Aaronson. 1986. *Algal nutrition*. In: Handbook of Microalgal Mass Culture. Richmond, A. (ed.), CRC Press, Boca Raton. Florida, U.S.A. 147-198pp.
- Khowaja, M. 2000. Waste stabilization ponds-design guidelines for Southern Pakistan. *En: 26 th WEDC. Conference: water, sanitation and hygiene: challenges of the millennium*. Dhaka, Bangladesh. 282-286pp.
- Kim, J.; B. Lingaraju; R. Theaume; J. Lee & K. Siddiqui. 2010. Removal of ammonia from wastewater effluent by *Chlorella vulgaris*. *Tsinghua Sci. Technol.* 15:391-396.
- Loayza, A. 2002. *Diagnóstico del humedal de Villa María*. Instituto Ambientalista Natura. Chimbote, Ancash, Perú. 218p.
- Ma, H.F.; X. Li; H. Hu; Y. Yu & Y. Wu. 2012. Growth, removal of nitrogen and phosphorus, and lipid accumulation property of *Scenedesmus* sp. LX1 in aquaculture wastewater. *Huan Jing Ke Xue*. 33(6):1891-1896.
- Mallick, N. 2002. Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: A review. *Biometals*. 15:377-390.
- Marsh, J. & D. Weinstein. 1966. Simple charring method for determination of lipids. *J. Lipid Res*. 7:574-576.

- Martínez, M.; S. Sánchez; J. Jiménez; F. Yousfi & L. Muñoz. 2000. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology*. 73:263-272.
- Martínez, M.E.; S. Sánchez; J.M. Jiménez; F. El Yousfi & L. Muñoz. 2000. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technol.* 73:263-272.
- Méndez, L.; I. Albarracín; M. Cravero & R. Salomón. 2010. Crecimiento de *Scenedesmus quadricauda* en efluentes cloacales de la ciudad de Trelew, Chubut, Argentina. <<http://hdl.handle.net/1834/3639>>. Accesado: 17 de abril del 2014.
- Merino, F. 1999. Efecto del ácido acético con sustrato limitante en el crecimiento de *Scenedesmus acutus* usando cultivos batch. Informe de Investigación. Universidad Nacional del Santa. Nuevo Chimbote, Perú.
- Ministerio de Vivienda, Construcción y Saneamiento (MVCS). 2013. Protocolo de Monitoreo de la calidad de los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales domésticas o municipales. Ministerio de Vivienda, Construcción y Saneamiento (MVCS), Oficina de Medio Ambiente, RM N° 273-2013-Vivienda. Lima, Perú. 31p.
- Morató, J.; A. Subirana; A. Gris; A. Carneiro & R. Pastor. 2006. Tecnologías sostenibles para la potabilización y el tratamiento de aguas residuales. *Revista Lasallista de Investigación*. 3(1):19-29.
- Palomino, A.; C. Estrada & J. López. 2010. Microalgas: potencial para la producción de biodiesel. Congresso Brasileiro De Mamona, 4 & Simpósio Internacional De Oleaginosas Energéticas, 1, 2010. João Pessoa. Inclusão Social e Energia: Anais. Campina grande: Embrapa Algodão. Brasil. 149-157pp.

- Pittman, J.; A. Dean & O. Osundeko. 2011. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Biores. Technol.* 102:17-25.
- PNUMA. 2004. Lineamientos sobre el manejo de aguas residuales municipales. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA). La Haya, Países Bajos. 112p.
- Quevedo, C.; S. Morales & A. Acosta. 2008. Crecimiento de *Scenedesmus* sp. en diferentes medios de cultivo para la producción de proteína microalgal. *Vitae. Rev. Fac. Quím. Farm.* 15(1):25-31.
- Rasoul, S.; N. Montazeri; S. Shaker; A. Safari; A. Kazemi; P. Mousavi; M. Ali & Y. Ghasemi. 2014. Removal of nitrogen and phosphorus from wastewater using microalgae free cells in batch culture system. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.* 3:126-131.
- Reyes, M.; A. Guido; S. Carrillo & C. Durán. 2011. Remoción de fósforo en un sistema de humedales artificiales a escala de laboratorio. *Química Central.* 2(1):25-32.
- Richmond, A. & E.W. Becker. 1986. *Technological aspects of mass cultivation - A general outline.* In: Richmond A (ed.), CRC Handbook of microalgal mass culture. CRC Press Inc., Boca Raton. 245-264pp.
- Riquelme, C. & R. Avendaño. 2003. Interacción bacteria-microalga en el ambiente marino y uso potencial en acuicultura. *Revista Chilena de Historia Natural.* 76:725-736.
- Roleda, M.; S. Slocombe; R. Leakey; J. Day; E. Bell & M. Stanley. 2013. Effects of temperature and nutrient regimes on biomass and lipid production by six oleaginous microalgae in batch culture employing a two-phase cultivation strategy. *Bioresource Technology.* 129:439-449.

- Ruíz, A. 2011. Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente. Máster Universitario en Ingeniería Hidráulica y Medio Ambiente. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España. 102p.
- Ruiz-Marin, A. & L. Mendoza-Espinosa. 2010. Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. *Bioresource Technology*. 101:58-64.
- Sawayama, S.; T. Minowa & S. Yokoyama. 1999. Possibility of renewable energy production and CO₂ mitigation by thermochemical liquefaction of microalgae. *Biomass Bioenerg.* 17:33-39.
- Seoáñez, M. 1999. *Aguas residuales: tratamiento por humedales artificiales*. Fundamentos científicos. Tecnologías. Diseño. Edic. Mundi Prensa. Barcelona, España. 326p.
- Shin, D.; H. Cho; J. Utomo; Y. Choi; X. Xu & J. Park. 2015. Biodiesel production from *Scenedesmus bijuga* grown in anaerobically digested food wastewater effluent. *Bioresour Technol.* 184:215-221.
- Spolaore, P.; C. Joannis-Cassan; E. Duran & A. Isambert. 2006. Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* 101(2):87-96.
- Sukenik, A.; O. Zamora & Y. Carmeli. 1993. Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. II. *Nannochloropsis* sp. *Aquaculture*. 117:313-326.
- SUNASS. 2005. Informe de Supervisión a SEDACHIMBOTE S.A.: Supervisión y fiscalización desde la sede a SEDACHIMBOTE S.A. SUNASS INFORME N° 156-2005/SUNASS-120-F. 50p.

- Toyub, M.; M. Miah; M. Habib & M. Rahman. 2008. Growth performance and nutritional value of *Scenedesmus obliquus* cultured in different concentrations of sweetmeat factory waste media. *Bang. J. Anim. Sci.* 37(1):86-93.
- Tuffery, G. 1979. Incidencias ecológicas de la polución de las aguas corrientes. Reveladores biológicos de la polución. *En: P. Pesson (ed.), La contaminación de las aguas continentales: incidencias sobre las biocenosis acuáticas.* Edic. Mundi Prensa. Madrid, España. 215-255pp.
- Valdez, E. & A. Vázquez. 2003. Ingeniería de los Sistemas de Tratamiento y Disposición de Aguas Residuales. Fundación ICA, A.C. México D.F., México. 341p.
- Vieira, A. & D. Klaveness. 1986. The utilization of organic nitrogen compounds as sole nitrogen source by some freshwater phytoplankters. *Nord. J. Bot.* 6(1):93-97.
- Vonshak, J. 1986. Laboratory techniques for the culturing of microalgae. *In: Handbook of Microalgal Mass Culture.* Richmond, A. (ed.), CRC Press Inc. Boca Raton. Florida, U.S.A. 117-145pp.
- Wang, B. & C. Lan. 2011. Biomass production and nitrogen and phosphorus removal by the green alga *Neochloris oleoabundans* in simulated wastewater and secondary municipal wastewater effluent. *Bioresour Technol.* 102(10):5639-644.
- Wijffels, R. & M. Barbosa. 2010. An outlook on microalgal biofuels. *Science.* 329:796-799.
- Wong, Y.; K. Yung; Y. Tsang; Y. Xia; L. Wang & K. Ho. 2015. *Scenedesmus quadricauda* for nutrient removal and lipid production in wastewater. *Water Environ. Res.* 87(12):2037-2044.

Yang, J.; M. Xu; X. Zhang; Q. Hu; M. Sommerfeld & Y. Chen. 2011. Life-cycle analysis on biodiesel production from microalgae: Water footprint and nutrients balance. *Biores. Technol.* 102:159-165.

Zamani, N.; M. Noshadi; S. Amin; A. Niazi & Y. Ghasemi. 2011. Effect of alginate structure and microalgae immobilization method on orthophosphate removal from wastewater. *Journal of Applied Phycology.* 24:649-656.

VIII. ANEXOS

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

DÍA DE CULTIVO	ARM (%)														
	CONTROL			25			50			75			90		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
0	24,5	24,7	24,2	24,9	24,4	24,3	24,1	24,6	24,3	24,6	25,0	24,1	24,6	24,6	24,4
1	24,0	23,5	24,1	24,1	24,4	23,8	24,0	24,9	23,5	23,5	24,4	23,9	23,9	24,1	23,7
2	23,9	24,7	24,3	23,8	23,7	24,5	24,7	24,8	24,0	25,1	24,2	24,4	23,7	23,6	24,8
3	24,5	24,0	24,8	24,0	24,8	24,0	24,6	24,9	23,4	24,4	24,3	25,0	24,0	24,6	24,4
4	23,6	23,8	24,5	23,6	23,7	24,3	24,0	23,4	24,2	24,2	24,2	23,9	24,0	23,9	24,4
5	24,1	23,9	24,3	24,7	24,7	23,8	23,9	24,5	23,7	24,5	24,3	24,4	24,1	24,0	24,7
6	24,4	24,8	24,5	24,6	23,5	24,4	24,1	24,3	24,1	24,1	24,0	23,9	23,7	24,0	23,6
7	24,7	24,4	24,9	24,0	25,0	24,4	24,3	24,4	25,0	24,2	24,4	24,6	24,9	23,9	24,3

Anexo 2. Temperatura promedio (°C; \pm D.E.) en los cultivos de *Sc. acutus* con ARM y control (HM).

DÍA DE CULTIVO	ARM (%)				
	CONTROL	25	50	75	90
0	24,5 \pm 0,3 ^a	24,5 \pm 0,3 ^a	24,3 \pm 0,3 ^a	24,6 \pm 0,5 ^a	24,5 \pm 0,1 ^a
1	23,9 \pm 0,3 ^a	24,1 \pm 0,3 ^a	24,1 \pm 0,7 ^a	23,9 \pm 0,5 ^a	23,9 \pm 0,2 ^a
2	24,3 \pm 0,4 ^a	24,0 \pm 0,4 ^a	24,5 \pm 0,4 ^a	24,6 \pm 0,5 ^a	24,0 \pm 0,7 ^a
3	24,4 \pm 0,4 ^a	24,3 \pm 0,5 ^a	24,3 \pm 0,8 ^a	24,6 \pm 0,4 ^a	24,3 \pm 0,3 ^a
4	24,0 \pm 0,5 ^a	23,9 \pm 0,4 ^a	23,9 \pm 0,4 ^a	24,1 \pm 0,2 ^a	24,1 \pm 0,3 ^a
5	24,1 \pm 0,2 ^a	24,4 \pm 0,5 ^a	24,0 \pm 0,4 ^a	24,4 \pm 0,1 ^a	24,3 \pm 0,4 ^a
6	24,6 \pm 0,2 ^a	24,2 \pm 0,6 ^a	24,2 \pm 0,1 ^a	24,0 \pm 0,1 ^a	23,8 \pm 0,2 ^a
7	24,7 \pm 0,3 ^a	24,5 \pm 0,5 ^a	24,6 \pm 0,4 ^a	24,4 \pm 0,2 ^a	24,4 \pm 0,5 ^a

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

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

DÍA DE CULTIVO	ARM (%)														
	CONTROL			25			50			75			90		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
0	7,87	8,10	7,83	7,85	7,82	8,00	8,06	7,81	8,12	8,13	8,04	8,09	7,86	8,09	8,11
1	8,01	8,18	8,00	8,16	8,04	8,30	8,71	8,59	8,53	8,74	8,70	8,85	8,20	8,67	8,34
2	9,27	9,02	8,90	9,12	9,51	9,12	9,54	9,11	9,12	9,58	9,64	9,37	9,37	8,99	9,49
3	9,59	9,42	9,17	9,41	9,48	9,52	9,14	9,12	9,53	9,56	9,30	9,21	9,08	9,50	9,46
4	9,18	8,97	9,52	9,08	8,91	8,83	8,81	8,22	8,49	8,81	9,28	8,95	8,39	9,16	9,11
5	9,09	9,52	9,02	8,77	8,80	8,90	8,03	8,61	8,21	8,48	8,40	8,59	8,56	8,49	8,98
6	8,62	8,70	8,90	8,21	8,87	8,33	8,72	8,54	8,37	8,45	8,70	8,39	8,72	8,86	8,48
7	8,60	8,55	9,04	8,34	8,16	8,46	8,44	8,15	8,82	8,12	8,62	8,54	8,32	8,60	8,76

Anexo 4. Valores de pH promedio (\pm D.E.) en los cultivos de *Sc. acutus* con ARM y control (HM).

DÍA DE CULTIVO	ARM (%)				
	CONTROL	25	50	75	90
0	7,93 \pm 0,15 ^a	7,89 \pm 0,10 ^a	8,00 \pm 0,16 ^a	8,09 \pm 0,05 ^a	8,02 \pm 0,14 ^a
1	8,06 \pm 0,10 ^b	8,17 \pm 0,13 ^b	8,61 \pm 0,09 ^a	8,76 \pm 0,08 ^a	8,40 \pm 0,24 ^{ab}
2	9,06 \pm 0,19 ^a	9,25 \pm 0,23 ^a	9,26 \pm 0,25 ^a	9,53 \pm 0,14 ^a	9,28 \pm 0,26 ^a
3	9,39 \pm 0,21 ^a	9,47 \pm 0,06 ^a	9,26 \pm 0,23 ^a	9,36 \pm 0,18 ^a	9,35 \pm 0,23 ^a
4	9,22 \pm 0,28 ^a	8,94 \pm 0,13 ^a	8,51 \pm 0,30 ^a	9,01 \pm 0,24 ^a	8,89 \pm 0,43 ^a
5	9,21 \pm 0,27 ^a	8,82 \pm 0,07 ^{ab}	8,28 \pm 0,30 ^b	8,49 \pm 0,10 ^b	8,68 \pm 0,27 ^{ab}
6	8,74 \pm 0,14 ^a	8,47 \pm 0,35 ^a	8,54 \pm 0,18 ^a	8,51 \pm 0,16 ^a	8,69 \pm 0,19 ^a
7	8,73 \pm 0,27 ^a	8,32 \pm 0,15 ^a	8,47 \pm 0,34 ^a	8,43 \pm 0,27 ^a	8,56 \pm 0,22 ^a

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

Anexo 5. Densidad poblacional ($\times 10^6$ cél. mL⁻¹; \pm D.E.) de *Sc. acutus* con ARM y control (HM).

DÍA DE CULTIVO	ARM (%)														
	CONTROL			25			50			75			90		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
0	2,05	2,05	2,05	2,05	2,05	2,05	2,05	2,05	2,05	2,05	2,05	2,05	2,05	2,05	2,05
1	3,19	2,63	2,97	3,17	2,86	3,08	2,94	3,16	3,21	2,79	2,83	3,24	3,82	3,12	3,01
2	5,70	4,01	4,81	6,18	5,32	5,18	5,17	6,32	5,98	5,10	6,03	5,22	4,96	5,38	6,02
3	9,16	8,42	9,94	10,84	9,12	9,61	11,32	11,03	12,14	10,78	10,45	11,01	11,10	10,53	9,74
4	14,63	15,79	15,93	12,26	12,08	13,41	15,93	16,76	15,21	16,96	15,32	15,69	15,51	17,32	16,81
5	18,74	21,31	19,16	14,34	13,30	14,21	19,96	20,45	21,28	20,11	22,36	21,11	21,82	22,17	23,43
6	20,36	22,24	21,03	14,16	12,42	15,04	22,37	21,41	23,19	24,14	23,89	22,92	23,07	23,88	25,16
7	23,08	24,01	24,39	14,23	13,37	14,59	22,15	22,52	24,10	25,26	24,46	23,81	24,59	24,29	25,90

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

PARÁMETRO	ARM (%)														
	CONTROL (HM)			25			50			75			90		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
N_0	2,05	2,05	2,05	2,05	2,05	2,05	2,05	2,05	2,05	2,05	2,05	2,05	2,05	2,05	2,05
N_t	18,74	21,31	19,16	14,34	13,30	14,21	19,96	20,45	21,28	20,11	22,36	21,11	21,82	22,17	23,43
Día	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
μ (día ⁻¹)	0,443	0,468	0,447	0,389	0,374	0,387	0,455	0,460	0,468	0,457	0,478	0,466	0,473	0,476	0,487
TD (día)	1,565	1,481	1,551	1,782	1,853	1,791	1,523	1,507	1,481	1,517	1,450	1,487	1,465	1,456	1,423

Anexo 7. Biomasa, absorbancia, porcentaje y biomasa de lípidos de *Sc. acutus* cultivada con medio ARM y control (HM).

PARÁMETROS	ARM (%)														
	CONTROL (HM)			25			50			75			90		
Biomasa (mg x50mL⁻¹)	32,3	36,7	33,0	26,2	24,3	26,0	36,5	37,4	38,9	36,8	40,9	38,6	39,9	40,5	42,8
Biomasa (mg L⁻¹)	646,0	734,0	660,0	524,0	486,0	520,0	730,0	748,0	778,0	736,0	818,0	772,0	798,0	810,0	856,0
Absorbancia	0,414	0,489	0,423	0,446	0,395	0,436	0,526	0,541	0,579	0,514	0,593	0,554	0,557	0,562	0,618
Lípidos (%)	21,50	22,35	21,50	28,55	27,27	28,13	24,17	24,26	24,97	23,43	24,32	24,07	23,42	23,28	24,22
Lípidos (mg L⁻¹)	138,9	164,0	141,9	149,6	132,5	146,3	176,4	181,5	194,3	172,4	198,9	185,8	186,9	188,6	207,3