

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



**EFFECTO DEL “CHILCANO” DE RESIDUOS SÓLIDOS DE
PESCADO EN EL CRECIMIENTO POBLACIONAL Y CONTENIDO
DE CLOROFILA α Y β DE LA MICROALGA *Scenedesmus
acutus* EN LABORATORIO**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE BIÓLOGO ACUICULTOR

AUTORES:

Bach. MÓNICA CLOTILDE HUERTAS GUTIÉRREZ

Bach. WENDY FIORELLA MAZZA CALLIRGOS

ASESOR:

Blga. Acui. SORAYDA MENDOZA ESPINOZA

NUEVO CHIMBOTE – PERÚ

2014

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOLOGÍA EN ACUICULTURA



**EFFECTO DEL “CHILCANO” DE RESIDUOS SÓLIDOS DE
PESCADO EN EL CRECIMIENTO POBLACIONAL Y CONTENIDO
DE CLOROFILA α Y β DE LA MICROALGA *Scenedesmus
acutus* EN LABORATORIO**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE BIÓLOGO ACUICULTOR

AUTORES:

Bach. MÓNICA CLOTILDE HUERTAS GUTIÉRREZ

Bach. WENDY FIORELLA MAZZA CALLIRGOS

Revisado y Aprobado por el Asesor.

Blga. Acui. SORAYDA MENDOZA ESPINOZA

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



**EFFECTO DEL "CHILCANO" DE RESIDUOS SÓLIDOS DE
PESCADO EN EL CRECIMIENTO POBLACIONAL Y CONTENIDO
DE CLOROFILA α Y β DE LA MICROALGA *Scenedesmus
acutus* EN LABORATORIO**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE BIÓLOGO ACUICULTOR

AUTORES:

Bach. MÓNICA CLOTILDE HUERTAS GUTIÉRREZ

Bach. WENDY FIORELLA MAZZA CALLIRGOS

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

Dr. Juan Fernando Merino Moya
Presidente

Blgo. Acuic. Juan Carhuapoma Garay
Integrante del Jurado

Blga. Acuic. Sorayda Mendoza Espinoza
Integrante del Jurado

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS	i
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS	5
OBJETIVOS GENERAL	5
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
II. MATERIALES Y MÉTODOS	6
2.1. LOCALIZACIÓN DEL EXPERIMENTO	6
2.2. MATERIAL EXPERIMENTAL	6
2.2.1. Material biológico	6
2.2.2. Tratamiento del agua de cultivo	6
2.2.3. Preparación de los inóculos de <i>Sc. acutus</i>	6
2.3. PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO	7
2.3.1. Medio de cultivo HM	7
2.3.2. Preparación del "chilcano" de residuos de pescado (CRP) como medio de cultivo	7
2.4. ACONDICIONAMIENTO DE LAS UNIDADES EXPERIMENTALES	9
2.5. DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO POBLACIONAL DE <i>Sc. acutus</i>	10
2.6. DETERMINACIÓN DE LA BIOMASA MICROALGAL DE <i>Sc. acutus</i>	11
2.7. DETERMINACIÓN DE LAS CLOROFILAS DE <i>Sc. acutus</i>	11
2.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	13
III. RESULTADOS	14
3.1. PARÁMETROS AMBIENTALES DEL CULTIVO DE <i>Sc. acutus</i>	14
3.1.1. Temperatura	14
3.1.2. pH de los cultivos	15
3.2. CRECIMIENTO POBLACIONAL DE <i>Sc. acutus</i>	16
3.2.1. Curvas de crecimiento poblacional	16

3.2.2. Tasa de crecimiento y tiempo de duplicación poblacional	18
3.3. CONTENIDO DE CLOROFILAS α y β EN <i>Sc. acutus</i>	20
IV. DISCUSIÓN.....	23
V. CONCLUSIONES	28
VI. RECOMENDACIONES.....	29
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
VIII. ANEXOS.....	38

DEDICATORIA

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

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

A mi **abuelita Clotilde**, por estar siempre pendiente de mí y llevarme en sus oraciones siempre.

A mis adorados **hermanos Lorenzo, Percy, Germán y Evelyn** por el afecto y apoyo incondicional.

Con Amor.....

Huertas Gutiérrez Mónica Clotilde

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

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

A mi **esposo, Oscar Rivera**, que con su apoyo y amor incondicional ha sido amigo y compañero inseparable en el transcurso de mi carrera universitaria y demostrarme que siempre podré contar con él.

A mi **hija, Antonella Rivera Mazza**, que con su luz ha iluminado mi vida y hace mi camino más claro, ella es la razón de seguir mejorando día a día.

A mis **hermanos Shirley, Gino, Julio y Giovanni** por brindarme siempre su apoyo. A mis **sobrinos Renato y Thiago**.

Mazza Callirgos, Wendy Fiorella

AGRADECIMIENTOS

A nuestra querida **Universidad Nacional del Santa** por permitirnos ser parte de ella y brindarnos la preparación sobre nuestra carrera.

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

A nuestra asesora la **Blga. Acui. Sorayda Mendoza Espinoza** quien nos transmitió la orientación académica y sugerencias en el desarrollo del presente informe de tesis.

Un agradecimiento especial al **Dr. Fernando Merino Moya** por haber guiado la realización y culminación de este trabajo. Gracias por la amistad, colaboración, paciencia y tiempo para que saliera de manera exitosa.

Además a todas las personas que de alguna manera contribuyeron a la realización de este trabajo, muchas gracias.

Mónica Clotilde Huertas Gutiérrez

&

Wendy Fiorella Mazza Callirgos

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición química del medio de cultivo HM.....	7
Tabla 2. Tratamientos en los cultivos microalgales de la investigación	9
Tabla 3. Densidad poblacional ($\times 10^6$ cél. mL ⁻¹) de <i>Sc. acutus</i> en los tratamientos cultivados con CRP y grupo control (HM).....	16
Tabla 4. Tasa de crecimiento (μ) y Tiempo de duplicación diaria (TD) poblacional de <i>Sc. acutus</i> en los tratamientos cultivados con CRP y grupo control (HM).	19
Tabla 5. Contenido de clorofilas α y β en porcentaje (%) y biomasa (mg L ⁻¹) de los cultivos de <i>Sc. acutus</i>	20

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Flujograma de la preparación de la solución stock del CRP para el cultivo de <i>Sc. acutus</i>	8
Fig. 2. Distribución de las unidades experimentales en los cultivos microalgales de <i>Sc. acutus</i> ..	8
Fig. 3. Flujograma para determinar las clorofilas α y β de <i>Sc. acutus</i> en los cultivos microalgales.....	11
Fig. 4. Variación de la temperatura promedio ($^{\circ}\text{C}$) en los cultivos de <i>Sc. acutus</i> con CRP y grupo control (HM).	14
Fig. 5. Variación del pH promedio en los cultivos de <i>Sc. acutus</i> con CRP y grupo control (HM)	15
Fig. 6. Crecimiento poblacional de los cultivos de <i>Sc. acutus</i> dosificados con diferentes concentraciones del CRP.....	16
Fig. 7. Color de los cultivos experimentales al quinto día de crecimiento... ..	17
Fig. 8. Variación de la tasa de crecimiento (μ) y Tiempo de duplicación (TD) al quinto día de los cultivos de <i>Sc. acutus</i> dosificados con CRP.....	19
Fig. 9. Concentración (%) de la clorofila α y β en <i>Sc. acutus</i> dosificados con CRP	21
Fig. 10. Concentración de la clorofila α y β en mg L^{-1} de los cultivos de <i>Sc. acutus</i> dosificados con CRP.	22

RESUMEN

El estudio tuvo como objetivos determinar el crecimiento poblacional, tasa de crecimiento (μ), tiempo de duplicación (TD) poblacional y contenido de clorofila α y β de la microalga *Scenedesmus acutus* cultivada en diferentes concentraciones (5,0; 7,5 y 10,0 mL L⁻¹) de “chilcano” de residuos sólidos de pescado (CRP) en condiciones de laboratorio. El mayor y menor número de células de *Sc. acutus* fueron obtenidas al quinto día de cultivo en los tratamientos con 7,5 mL L⁻¹ (27,31 x10⁶ cél. mL⁻¹) y 5,0 mL L⁻¹ (19,55 x10⁶ cél. mL⁻¹), respectivamente, correspondiendo a valores de μ de 0,508 día⁻¹ y 0,441 día⁻¹. Asimismo, los valores del TD al quinto día de cultivo fueron de 1,571 día y 1,364 día para los cultivos dosificados con 5,0 mL L⁻¹ y 7,5 mL L⁻¹ de CRP, respectivamente. Los más altos porcentajes de clorofila α y β se obtuvieron en cultivo dosificados con 7,5 mL L⁻¹ de CRP con valores de 0,85 % y 0,29 %, respectivamente, y los mayores contenidos de clorofila α y β (mg L⁻¹) fueron con 7,5 mL L⁻¹ de CRP con 9,07 mg L⁻¹ y 3,13 mg L⁻¹, respectivamente, concluyéndose que el mejor tratamiento para obtener mayores crecimientos poblacionales y contenido de clorofilas α y β es el tratamiento dosificado con 7,5 mL L⁻¹ de CRP.

Palabras Clave: Microalga, *Scenedesmus acutus*, “chilcano”, residuos de pescado, crecimiento poblacional, clorofila.

ABSTRACT

The study aimed to determine the population growth, growth rate (μ), doubling time (TD), population and content of chlorophyll α and β *Scenedesmus acutus* the microalgae grown in different concentrations (5.0, 7.5 and 10, 0 mL L⁻¹) "chilcano" solid fish waste (CRP) under laboratory conditions. The highest and lowest cell number *Sc. Acutus* were obtained on the fifth day of culture on treatment with 7.5 mL L⁻¹ (27, 31 x10⁶ cél. ML⁻¹) and 5.0 mL L⁻¹ (19, 55 x 10⁶ cel . mL⁻¹), respectively, corresponding to values of 0.508 μ day⁻¹ and 0.441 days⁻¹. Likewise, the values of TD on the fifth day of culture were 1.571 days and 1.364 days for the cultures dosed with 5.0 mL L⁻¹ and 7.5 mL L⁻¹ of CRP, respectively. The highest percentages of chlorophyll α and β were obtained in culture dosed with 7.5 mL L⁻¹ with CRP values of 0.85 % and 0.29 %, respectively, and higher contents of chlorophyll α and β (mg L⁻¹) were 7.5 mL L⁻¹ of CRP with 9.07 mg L⁻¹ and 3.13 mg L⁻¹, respectively, and concluded that the best treatment for major population growth and chlorophyll content of α and β treatment is dosed with 7.5 mL L⁻¹ of CRP.

Key Words: Microalgae, *Scenedesmus acutus*, "chilcano", fish wastes, population growth, chlorophyll.

I. INTRODUCCIÓN

Las microalgas están representadas por una gran variedad de organismos, que además de aportar oxígeno, tienen contenidos nutritivos importantes tales como polisacáridos, aminoácidos, enzimas y proteínas (Capa, 2010). Las microalgas son utilizadas desde hace mucho tiempo en la alimentación humana y animal; así como en investigaciones genéticas, morfológicas, fisiológicas, nutricionales y bioquímicas (Blanco, 1991; Alveal *et al.*, 1995; Bertoldo *et al.*, 2006). Estos microorganismos fotosintéticos requieren del acondicionamiento de diferentes factores ambientales para su crecimiento como la luz, temperatura, CO₂, pH, fotoperiodo y nutrientes, usando moléculas orgánicas y micronutrientes como catalizadores (Becker, 1994; Hu *et al.*, 2008), a fin de producir lípidos, proteínas y carbohidratos en grandes cantidades en tiempos cortos (Palomino *et al.*, 2010).

En los últimos años, se ha mostrado un gran interés por el cultivo de microalgas de forma intensiva, debido a la necesidad de obtener alimento vivo considerando su alto valor alimenticio, su tamaño, digestibilidad y fácil captura para las crías de larvas y estadios juveniles de moluscos, crustáceos y peces (Rodríguez *et al.*, 2007), motivando la atención mundial hacia el uso, como medio de cultivo, de materiales orgánicos de diversos orígenes (Benedetti *et al.*, 1998). Según Knud-Hansen (1998) el uso de desechos animales tienen una larga historia como fuente de fósforo, nitrógeno y carbono para el crecimiento y la producción de alimento natural, en consecuencia, el cultivo de microalgas con desechos animales ricos en N y P es una alternativa al uso de medios de cultivo inorgánicos costosos (Guillard f/2).

Taxonómicamente el género *Scenedesmus* pertenece a la División Chlorophyta, Clase Chlorophyceae, Orden Chlorococcales, Familia Scenedesmaceae, caracterizadas por habitar cuerpos de agua dulce en forma solitaria o en colonias formando cenobios (Andrade, 2009). *Scenedesmus acutus* es una especie ampliamente estudiada y cultivada principalmente como fuente de alimento en la industria de la piscicultura (González, 2010).

Las microalgas crecen exitosamente en diferentes medios de cultivo por su capacidad de metabolizar eficientemente diversas fuentes nitrogenadas orgánicas e inorgánicas, en tal sentido se han desarrollado diferentes medios de cultivo que van desde las fórmulas para enriquecer el agua de mar natural hasta el uso de medios artificiales, considerándose su adecuada selección o formulación como el paso más importante para el éxito del cultivo (Paniagua *et al.*, 1989); sin embargo, el uso de medios de cultivo sintéticos incrementan sustancialmente el valor económico para la producción de la biomasa de estos microorganismos (González, 2006), lo que ha obligado a desarrollar o buscar alternativas económicamente viables para el cultivo masivo de microalgas (Paniagua *et al.*, 1989; Rosales *et al.*, 2007).

Las investigaciones para elaborar medios de cultivo están orientadas a la formulación de una solución acuosa conteniendo nutrientes que satisfagan o concuerden con los requerimientos nutricionales de las microalgas, considerando que un medio de cultivo les debe proveer de sales minerales, fuentes de energía y materiales para la síntesis celular (Merino *et al.*, 2003), en tal sentido, los subproductos artesanales e industriales del procesamiento de pescado, langostinos y de concha de abanico pueden aprovecharse por su contenido de proteínas y otros nutrientes (Encomendero & Uchpa, 2002). Estos residuos tienen poco valor comercial y generan contaminación, es recomendable hallar nuevas formas de utilización (Berenz, 1996; Encomendero & Uchpa, 2002), siendo una excelente alternativa su utilización como medio de cultivo para microalgas.

En la región Ancash, la industria pesquera es una de las principales actividades que genera rs cantidades de desechos sólidos y líquidos cuya deposición en el ambiente marino origina serias alteraciones de las normales condiciones de salubridad; sin embargo, la presencia de sustancias orgánicas e inorgánicas en estos residuos posibilitan su aprovechamiento en el cultivo y producción masiva de biomasa microalgal. Obviamente, la utilización de tales desechos permitiría la producción económica de biomasa microalgal aunada a la reducción de los impactos ambientales negativos (Fábregas *et al.*, 1984; Cano

& Pisfil, 2007; Gómez *et al.*, 2008), y la generación de sustancias químicas (proteínas, lípidos, clorofilas, etc.) de interés económico y gran demanda.

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

La velocidad de crecimiento de las microalgas, altas productividades y su composición química son parámetros relevantes para su selección (Chisti, 2007; Rosenberg *et al.*, 2008), presentando grandes posibilidades de utilizar diversos residuos pesqueros, de “concha de abanico”, harina de pescado en el cultivo de microalgas (Fernández & Paredes, 2006; Ipanaqué & Paredes, 2009; Capa, 2000) propiciando el desarrollo de una nueva metodología. La preparación del “chilcano” de pescado mediante el cocinado de residuos de pescado (branquias, cabeza, vísceras) permite la obtención de un concentrado acuoso de nutrientes susceptibles de ser aprovechado como una excelente alternativa como medio de cultivo algal dado al bajo costo del insumo y se estaría dando uso a residuos que impactarían de manera negativa el ambiente terrestre y marino.

En nuestro medio existen algunas experiencias respecto al uso de residuos como medio de cultivo, así tenemos los de Merino *et al.* (2003) que cultivando *Tetraselmis suecica* obtuvieron mejores crecimientos (50×10^5 cél. mL⁻¹) con 0,5 g L⁻¹ de ensilado biológico de pescado; Fernández & Paredes (2006), utilizaron extracto de ensilado de pescado y urea en el crecimiento poblacional y contenido de carbohidratos y lípidos de la microalga *T. suecica*, obteniendo incrementos del 85,8 % y 154 % con respecto al grupo control (medio Guillard

f/2) para carbohidratos y lípidos, respectivamente en cultivos dosificados con 40 mL L⁻¹ de extracto de ensilado de pescado. De igual manera, Sánchez *et al.* (2008), utilizaron ensilado biológico de pescado el cual puede suplir a los medios de cultivo masivo basados en fertilizantes agrícolas para la producción de microalgas. Ellos cultivaron a *Nannochloris oculata* en lotes durante 12 días hasta alcanzar la fase estacionaria del crecimiento poblacional manteniendo la temperatura e iluminación constante las 24 h del día, comparando 7 diferentes medios de cultivo con ensilado de pescado y harina de pescado. Los máximos rendimientos fueron obtenidos con medio Yashima (3,50 g L⁻¹ día⁻¹), Yashima + Ensilado (3,19 g L⁻¹ día⁻¹) y Ensilado (2,85 g L⁻¹ día⁻¹), entre los cuales no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$), concluyendo que el medio de cultivo basado en ensilado de pescado presentó una alta producción, bajo costo y buena calidad nutricional para la producción de microalgas.

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

La producción y acumulación de pigmentos está influenciada por las condiciones de cultivo o el medio de cultivo utilizado, siendo muy conocida la acumulación de metabolitos primarios y secundarios en *Dunaliella*, que pueden enmascarar la presencia de clorofila en las células (Serpa & Calderón, 2006), así mismo, se ha demostrado que aquellos medios de cultivo que contienen altas concentraciones de nitrógeno orgánico, provenientes de residuos de la maricultura, favorecen la acumulación de pigmentos (Ipanaqué & Paredes, 2009) en consecuencia, es posible que el “chilcano” de pescado, incremente el crecimiento y contenido de pigmentos de los cultivos de *Scenedesmus acutus*.

Teniendo en consideración la presencia de nitrógeno orgánico (aminoácidos) en los residuos sólidos del procesamiento pesquero que persisten en el chilcano de pescado, es factible su aprovechamiento por *Sc. acutus* en el crecimiento y contenido de pigmentos clorofilianos y en este trabajo se pretende demostrar la capacidad de *Sc. acutus* para metabolizar los nutrientes presentes en este medio de cultivo, por lo que nos planteamos el siguiente problema de investigación: ¿Cuál es el efecto del “chilcano” de residuos sólidos de pescado en el crecimiento poblacional y contenido de clorofila α y β de la microalga *Scenedesmus acutus* en laboratorio?

La presente investigación tuvo como hipótesis: Si utilizamos concentraciones de 5,0; 7,5 y 10,0 mL L⁻¹ del “chilcano” de residuos sólidos de pescado (CRP) se obtendrá la mayor tasa de crecimiento y contenido de clorofila α y β de *Sc. acutus* con la concentración de 7,5 mL L⁻¹ del CRP.

El objetivo general fue: Determinar el efecto del “chilcano” de residuos sólidos de pescado en el crecimiento poblacional y contenido de clorofila α y β de la microalga *Sc. acutus* en laboratorio, y se plantearon los siguientes objetivos específicos: Determinar la densidad, tasa de crecimiento y tiempo de duplicación poblacional de la microalga *Sc. acutus* cultivada a concentraciones de 5,0; 7,5 y 10,0 mL L⁻¹ del “chilcano” de residuos sólidos de pescado y determinar el contenido de clorofila α y β de la microalga *Sc. acutus* cultivada a concentraciones de 5,0; 7,5 y 10,0 mL L⁻¹ del “chilcano” de residuos sólidos de pescado en laboratorio.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. LOCALIZACIÓN DEL EXPERIMENTO

El trabajo experimental se realizó en el Laboratorio de Tesis de la Facultad de Ciencias en la Universidad Nacional del Santa, Nuevo Chimbote, Perú, durante los meses de Julio y Agosto del 2014.

2.2. MATERIAL EXPERIMENTAL

2.2.1. Material biológico

La microalga *Sc. acutus* fue obtenida del Laboratorio de Evaluación de Recursos Acuáticos y Cultivos de Especies Auxiliares de la Facultad de Ciencias en la Universidad Nacional del Santa, los que se mantuvieron en medio HM en tubos de ensayo de 20 mL e iluminados con un fluorescente de 40 w, agitación manual diaria, hasta su utilización en el experimento.

2.2.2. Tratamiento del agua de cultivo

El agua potable utilizada en el cultivo procedió del sistema de abastecimiento de Seda Chimbote, fue almacenado en un recipiente de 100 L para su posterior tratamiento que consistió en dejarlo sedimentar por 48 h para luego ser filtrado con malla Nyltal de 10 μm . Posteriormente se agregó 0,5 mL de hipoclorito de sodio (5,25 %) por cada litro aireándola durante 24 h para luego ser neutralizado con 0,5 mL L⁻¹ de tiosulfato de sodio (15 %) durante 1 h con abundante aireación (2 L min⁻¹) a fin de eliminar el cloro residual.

2.2.3. Preparación de los inóculos de *Sc. acutus*

Los inóculos microalgales se iniciaron en 4 matraces de 250 mL (100 mL volumen efectivo de cultivo), utilizando agua potable esterilizada para el medio HM. Estos inóculos de *Sc. acutus* se mantuvieron por 4 días con iluminación constante (2000 lux) y agitados manualmente dos veces al día. Luego se llevaron a 2 botellas de plástico de 3 L de capacidad con 2

L de volumen efectivo, con iluminación (2000 lux) y aireación constante (100 mL min⁻¹) los que sirvieron como inóculos para iniciar la experiencia.

El escalamiento se realizó en la fase de crecimiento exponencial (quinto día de cultivo) para asegurar una alta concentración de células de microalgas (>20 x10⁶ cél. mL⁻¹).

2.3. PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

2.3.1. Medio de cultivo HM

El medio de cultivo HM (Tabla 1) utilizado para el mantenimiento de los inóculos de *Sc. acutus* y el control durante la experiencia, se preparó según lo propuesto por Merino (1999).

Tabla 1. Composición química del medio de cultivo HM.

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

2.3.2. Preparación del “chilcano” de residuos de pescado (CRP) como medio de cultivo

El CRP fue preparado utilizando residuos de pescado (vísceras, cabeza y aletas) de la planta de congelados Pesquera Hayduk S.A.C. ubicada en el distrito de Coishco, recolectados en un balde de 4 L y transportado al laboratorio, procediéndose a la cocción de 500 g de residuos a 80 °C por 1 hora. Luego de enfriado a temperatura ambiente, fue homogenizado en una bandeja de porcelana con ayuda de una espátula.

Con la finalidad de precisar la cantidad del CRP en el crecimiento y contenido de pigmentos de los cultivos de *Sc. acutus*, se preparó una solución stock licuando por 10 min. 200 g del homogenizado para luego ser aforado a 2000 mL con agua potable. La solución stock se obtuvo luego del filtrado con un tamiz de 100 μm y transferido a botellas de vidrio con tapa y autoclavada a 121 °C durante 15 min (fig.1).

Es necesario regular el pH de la solución stock a valores neutrales (pH 7) utilizando hidróxido de sodio (10 %) o ácido clorhídrico (1 %) antes de ser almacenada en refrigeración hasta su utilización. A esta solución se le consideró como solución Stock de CRP para iniciar las dosificaciones a los cultivos microalgales (Fig. 1). La concentración del “chilcano” en la solución stock fue de 0,1 g L⁻¹.

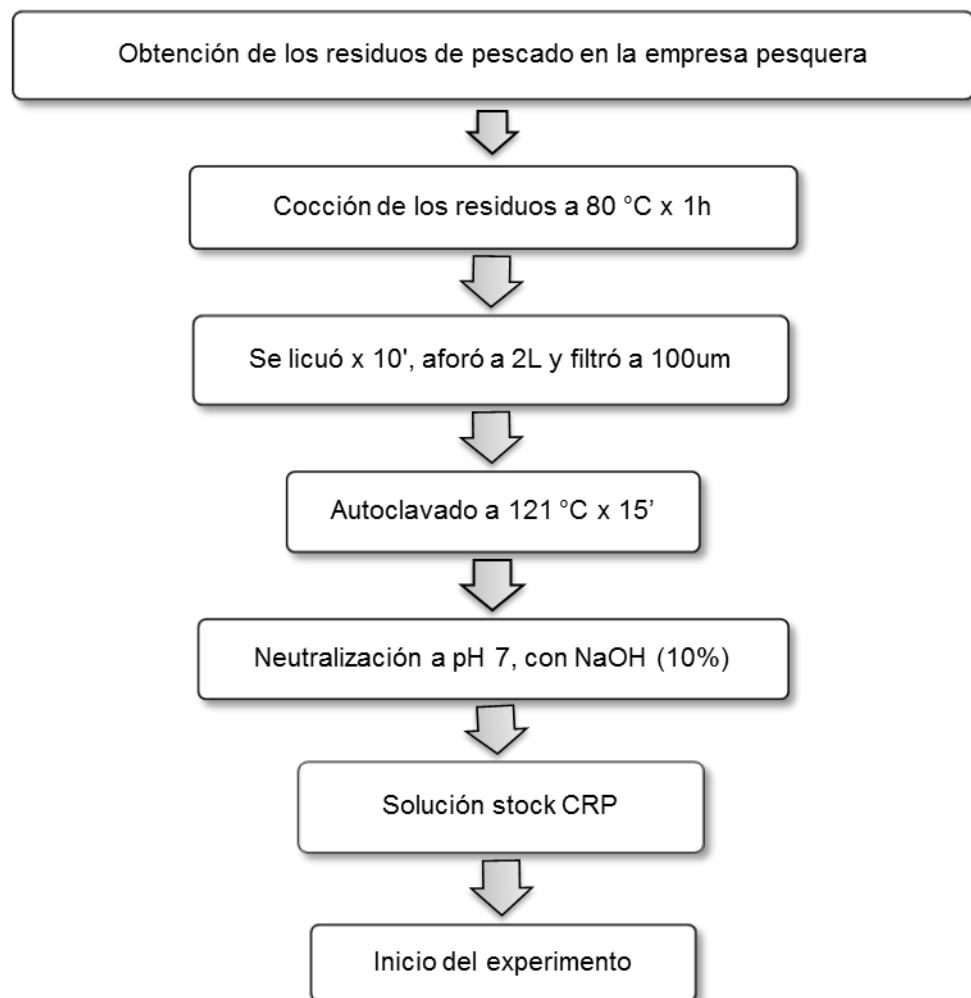


Fig. 1. Flujograma de la preparación de la solución stock del CRP para el cultivo de *Sc. acutus*

2.4. ACONDICIONAMIENTO DE LAS UNIDADES EXPERIMENTALES

En el experimento se utilizaron 12 botellas plásticas de 3000 mL conteniendo 1500 mL de volumen efectivo de cultivo (Fig. 2), los que se iniciaron con una densidad poblacional promedio de $2,15 \times 10^6$ cél. mL⁻¹ de *Sc. acutus*. Para el trabajo de investigación fue empleado el diseño estímulo creciente (Steel & Torrie, 1988), con tres tratamientos y un grupo control (HM), y tres repeticiones cada uno (Tabla 2):

Tabla 2. Tratamientos en los cultivos microalgales de la investigación.

TRATAMIENTOS	ESPECIFICACIONES
T0	Cultivo de <i>Sc. acutus</i> con medio de cultivo HM (Control).
T1	Cultivo de <i>Sc. acutus</i> con residuos sólidos de pescado utilizando 5,0 mL L ⁻¹ de CRP.
T2	Cultivo de <i>Sc. acutus</i> con residuos sólidos de pescado utilizando 7,5 mL L ⁻¹ de CRP.
T3	Cultivo de <i>Sc. acutus</i> con residuos sólidos de pescado utilizando 10,0 mL L ⁻¹ de CRP.

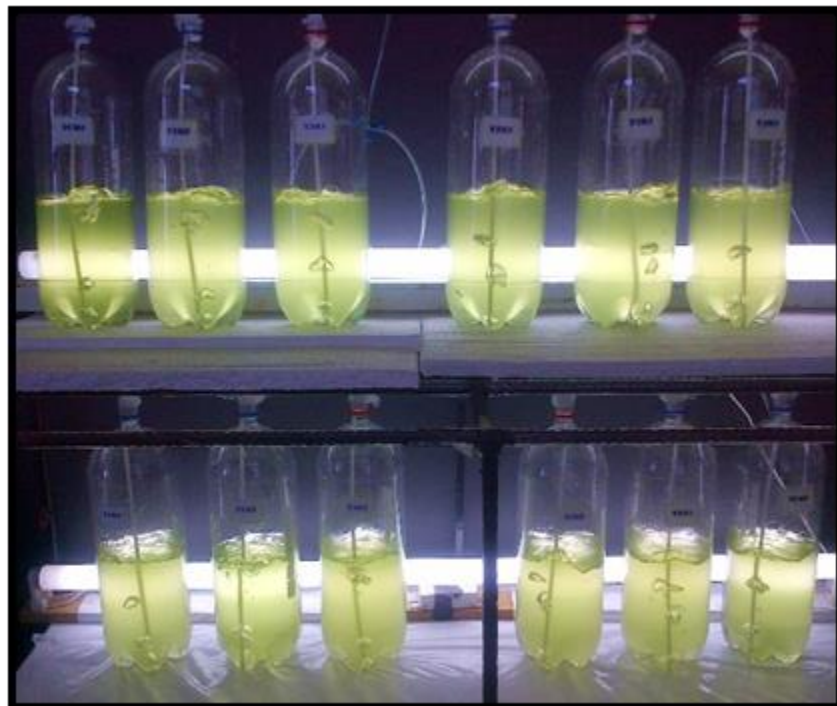


Fig. 2. Distribución de las unidades experimentales en los cultivos microalgales de *Sc. acutus*.

Las concentraciones del stock del CRP utilizadas en los tratamientos fueron determinadas de acuerdo a ensayos previos de cultivo en laboratorio, además, se analizaron el contenido de los algunos parámetros de la solución stock mediante métodos propuestos por la AOAC (2007) para humedad, cenizas y sólidos totales, Lowry *et al.* (1951) para proteínas, y según APHA (2005) para lípidos, nitratos, nitritos, fosfatos y nitrógeno amoniacal utilizando reactivos para espectrofotometría de CHEMetrics VVR2 con viales Vacu-vials® (Anexo 1).

Se registraron diariamente el pH y la temperatura de los cultivos utilizando pH-metro digital marca Hanna ($\pm 0,01$) y termómetro ($\pm 0,1$ ° C), respectivamente.

La aireación fue constante y provista por un Blower de 1/2 HP, con un flujo de aire de 300 mL min^{-1} determinado con flujómetro Cole Parmer ($\pm 10 \text{ mL min}^{-1}$), y la iluminación continua fue suministrada con dos fluorescentes de luz blanca de 40 w colocados a 10 cm de las botellas de cultivos microalgales, proporcionando 8000 lux de intensidad luminosa promedio medidos con un luxómetro digital Hanna ($\pm 0,1$ lux).

2.5. DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO POBLACIONAL

El crecimiento poblacional de los cultivos de *Sc. acutus* se determinó mediante conteos diarios del número de células utilizando la cámara Neubauer y microscopio binocular marca Olympus; las observaciones microscópicas fueron realizadas a 40 X de aumento. Con los datos obtenidos se graficaron las curvas de crecimiento poblacional para precisar el final de la fase logarítmica, que nos permitió determinar la tasa de crecimiento poblacional por día (μ) y el tiempo de duplicación diaria (TD) aplicando las fórmulas siguientes (Guillard, 1975):

$$\mu = \frac{\ln(N_f/N_0)}{T_f - T_0} \quad \dots (1) \qquad \mathbf{TD} = \frac{\ln(2)}{\mu} \quad \dots (2)$$

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

2.6. DETERMINACIÓN DE LA BIOMASA MICROALGAL DE *Sc. acutus*

La biomasa microalgal al quinto día de cultivo se determinó gravimétricamente según metodología modificada de Sorokin (1973), para lo cual fueron centrifugadas 4 mL de muestras microalgales por cada unidad experimental en tubos Eppendorf de 2,0 mL de capacidad, y se llevó a la estufa a 60 ° C por 6 h, seguido se sometió a una temperatura de 105 ° C por 15 min. Se dejó enfriar en un desecador de campana por 1 h y se pesaron cada uno de ellos, los datos obtenidos se reemplazaron en la siguiente fórmula:

$$\text{Biomasa total (mg L}^{-1}\text{)} = \frac{(P2 - P1)}{4} \times 1000 \quad \dots (3)$$

Donde:

P1: Peso inicial (tubo) (mg)

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

2.7. DETERMINACIÓN DE LAS CLOROFILAS DE *Sc. acutus*

Las determinaciones de la clorofilas α y β de *Sc. acutus*, se realizaron al final de la fase logarítmica de los cultivos siguiendo la metodología de Ritchie (2008).

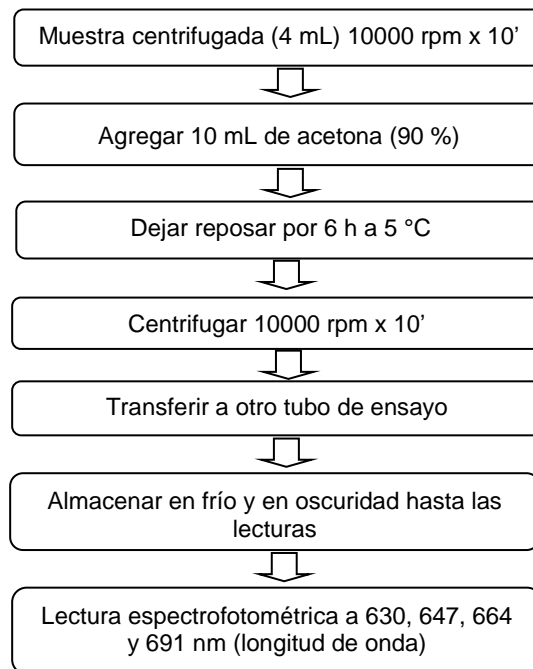


Fig. 3. Flujograma para determinar las clorofilas α y β de *Sc. acutus* en los cultivos microalgales.

De cada unidad experimental se centrifugó 4 mL del cultivo microalgal a 10000 rpm x 10 min, eliminándose el sobrenadante y dejando la pasta de microalga, luego fueron secadas en estufa a 60 ° C por espacio de 3 h.

Para la extracción de clorofilas, a cada una de las muestras se añadió 10 mL de acetona al 90 % en tubos de ensayo debidamente rotulados de cada unidad experimental; se agitó y se protegió de la luz, manteniéndolo en refrigeración a 5 ° C por 6 h. Luego se centrifugó a 10000 rpm x 10 min y se transfirió la capa superior a otro tubo de ensayo rotulado, almacenándose en oscuridad y a 5 ° C hasta la realización de las lecturas espectrofotométricas (Fig. 3).

Las lecturas de las Absorbancias fueron realizadas en el espectrofotómetro Turner Barstearnd Internacional en celdas de cuarzo de 1cm de espesor a diferentes longitudes de onda (630, 647, 664 y 691 nm).

Para los cálculos de los contenidos ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de las clorofilas α y β se recurre al uso de las siguientes fórmulas, según Ritchie (2008).

$$CL \alpha (\mu\text{g mL}^{-1}) = -0,3319 A_{630} - 1,7485 A_{647} + 11,9442 A_{664} - 1,4306 A_{691}$$
$$CL \beta (\mu\text{g mL}^{-1}) = -1,2825 A_{630} + 19,8839 A_{647} - 4,8860 A_{664} - 2,3416 A_{691}$$

Para determinar el porcentaje (%) de clorofila α y β se utiliza la siguiente fórmula, propuesta por Ritchie (2008):

$$PC (\%) = \frac{(CL \times V)/1000}{M} \times 100 \quad \dots (4)$$

Donde:

- CL : Contenido de clorofilas en la muestra ($\mu\text{g mL}^{-1}$).
- V : Volumen de extracción (10 mL).
- M : Peso de muestra microalgal (mg x 4 mL).

Adicionalmente, se determinó la biomasa de clorofila por cada litro de cultivo (BC) según la siguiente fórmula (Ritchie, 2008):

$$BC \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = \frac{PC \times B}{100} \dots (5)$$

Donde:

PC: Porcentaje de clorofila (%) y B: Biomasa seca (mg L⁻¹)

2.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Los datos obtenidos del crecimiento y el contenido de clorofilas fueron sometidos al análisis de varianza (ANOVA) para establecer diferencias entre sus promedios. Luego se utilizó la prueba de Tukey HSD para establecer el mejor promedio. En todos los casos fue aplicado un nivel de significancia de 0,05. El tratamiento estadístico se desarrolló utilizando los programas, Microsoft Office Excel 2010 y SPSS 20.0 para Microsoft Windows 7.

III. RESULTADOS

3.1. PARÁMETROS AMBIENTALES DEL CULTIVO DE *Sc. acutus*

3.1.1. Temperatura

La variación de la temperatura en los cultivos de *Sc. acutus* se muestra en la Fig. 4, y Anexos 2 y 3.

La temperatura de los cultivos varió entre los 22,6 y 23,6 °C durante el experimento. Estos fueron estadísticamente similares ($p>0,05$) en cada día de cultivo.

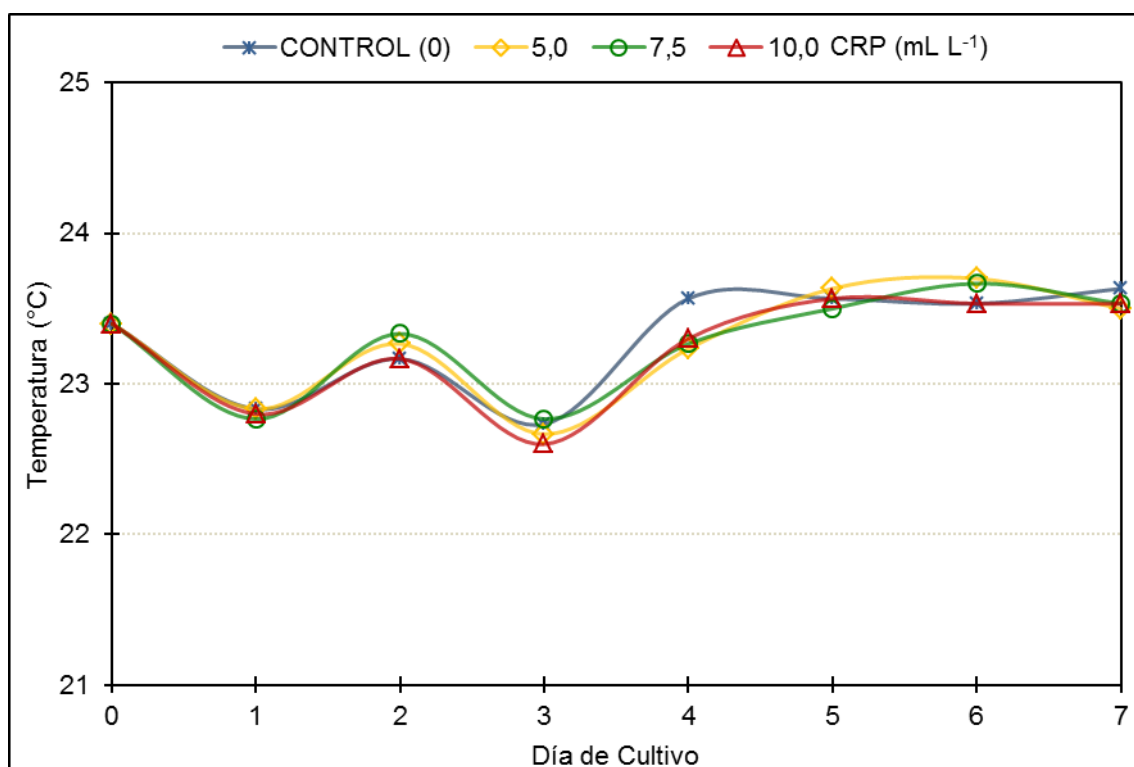


Fig. 4. Variación de la temperatura promedio (°C) en los cultivos de *Sc. acutus* con CRP y grupo control (HM).

3.1.2. pH

Las variaciones del pH en los cultivos son mostrados en la Fig. 5, y los Anexos 4 y 5 encontrándose la variación del pH en los cultivos de *Sc. acutus* entre los 8,12 y 9,11 durante el experimento.

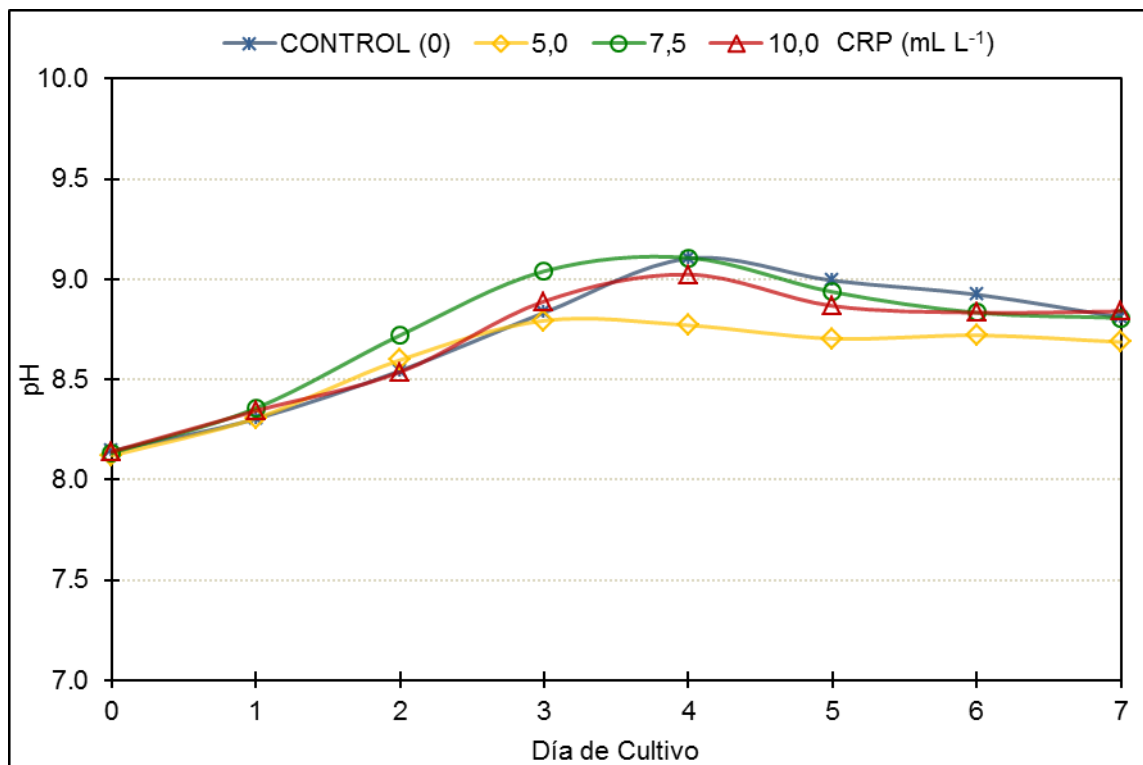


Fig. 5. Variación del pH promedio en los cultivos de *Sc. acutus* con CRP y grupo control (HM).

Al primer día de cultivo, los valores de pH fueron estadísticamente similares ($p > 0,05$). Esta tendencia continuó hasta el tercer día, aunque al cuarto día, y teniendo en cuenta la variación con respecto al día inicial, todos los tratamientos incrementaron los valores de pH.

Al quinto día de cultivo, los valores de pH se presentaron con mayores valores ($p < 0,05$) en los tratamientos con 7,5; 10,0 mL L⁻¹ de CRP y el control (HM), con 8,94; 8,70 y 8,99 unidades, respectivamente; mientras el menor ($p < 0,05$) fue el dosificado con 5,0 mL L⁻¹ de CRP, con 8,70 unidades. El sexto y séptimo día de cultivo los valores de pH fueron similares entre sí ($p > 0,05$).

3.2. CRECIMIENTO POBLACIONAL DE *Sc. acutus*

3.2.1. Curvas de crecimiento poblacional

En la Tabla 3, Fig. 6-7 y Anexo 6, se muestran las densidades poblacionales en los cultivos de *Sc. acutus* para todos los tratamientos.

Tabla 3. Densidad poblacional ($\times 10^6$ cél. mL⁻¹) de *Sc. acutus* en los tratamientos cultivados con CRP y grupo control (HM).

DÍA DE CULTIVO	CRP (mL L ⁻¹)			
	CONTROL (0)	5,0	7,5	10,0
0	2,15 ±0,00a	2,15 ±0,00a	2,15 ±0,00a	2,15 ±0,00a
1	3,68 ±0,03 ^a	3,73 ±0,05a	3,69 ±0,16a	3,76 ±0,12a
2	6,83 ±0,26 ^a	7,16 ±0,51a	6,95 ±0,61a	7,13 ±0,33a
3	12,82 ±1,28 ^b	10,45 ±0,53 ^c	14,26 ±0,65a	15,22 ±0,97 ^{ab}
4	18,93 ±0,35 ^b	14,74 ±0,82 ^c	21,13 ±0,65a	19,79 ±0,53 ^{ab}
5	23,25 ±0,60 ^b	19,55 ±0,71 ^c	27,31 ±0,82a	23,85 ±1,02 ^b
6	23,76 ±0,35 ^b	18,69 ±1,61 ^c	28,46 ±1,17a	26,18 ±0,84 ^{ab}
7	23,48 ±0,47 ^b	18,47 ±1,42 ^c	27,58 ±0,99a	25,89 ±0,65 ^{ab}

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

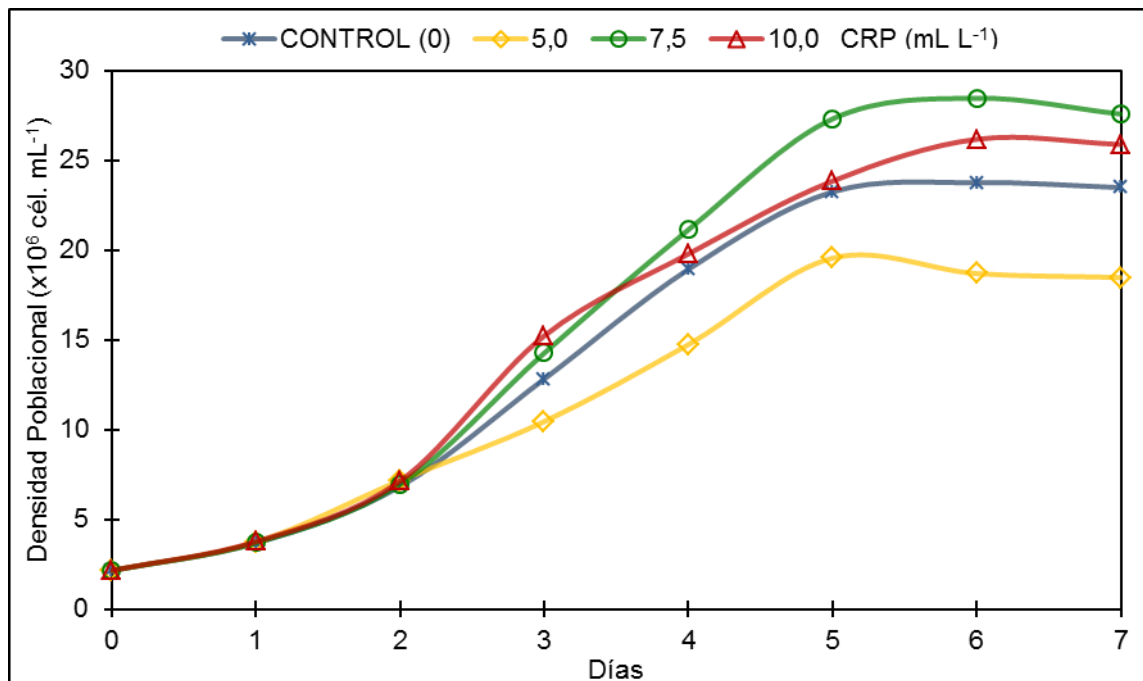


Fig. 6. Crecimiento poblacional de los cultivos de *Sc. acutus* dosificados con diferentes concentraciones del CRP.

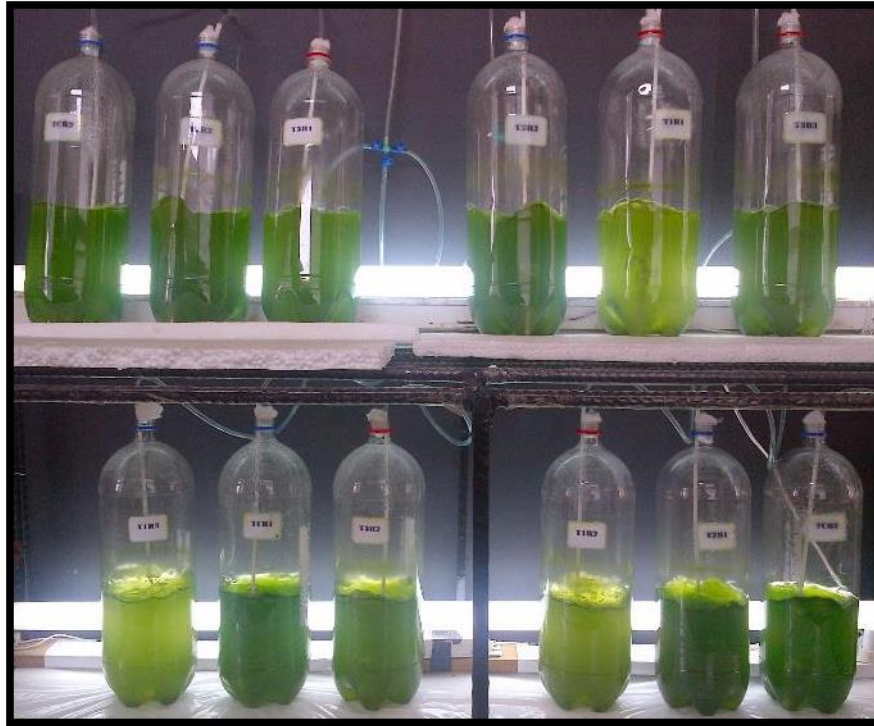


Fig. 7. Color de los cultivos experimentales al quinto día de crecimiento.

Las densidades poblacionales en los tratamientos con *Sc. acutus*, se iniciaron con valores promedio significativamente similares ($p > 0,05$) de $2,15 \times 10^6$ cél. mL^{-1} , los cuales fueron incrementándose al transcurrir los días de cultivo.

En el día 1 de cultivo, se aprecia que las densidades microalgales fueron similares ($p > 0,05$) con valores de $3,73$; $3,69$; $3,76$ y $3,68 \times 10^6$ cél. mL^{-1} , para los tratamientos con $5,0$; $7,5$ y $10,0 \text{ mL L}^{-1}$ de CRP y el grupo control, respectivamente. De igual manera para los días 2 y 3 de cultivo se encontraron valores similares ($p > 0,05$) en el cultivo de *S. acutus*.

Al cuarto día de cultivo, las mayores densidades poblacionales de *Sc. acutus* se presentaron en los tratamientos dosificados con $7,5$ y $10,0 \text{ mL L}^{-1}$ de CRP con valores significativos ($p < 0,05$) de $21,13$ y $19,79 \times 10^6$ cél. mL^{-1} , respectivamente; seguido del grupo control (HM) con $18,93 \times 10^6$ cél. mL^{-1} ; y el menor valor significativo ($p < 0,05$) se obtuvo en el tratamiento dosificado con $5,0 \text{ mL L}^{-1}$ de CRP con $14,74 \times 10^6$ cél. mL^{-1} .

En el quinto día de cultivo, la mayor densidad poblacional ($p < 0,05$) de *Sc. acutus* se presentó en el tratamiento dosificado con 7,5 mL L⁻¹ de CRP con 27,31 x10⁶ cél. mL⁻¹; seguido del tratamiento dosificado con 10,0 mL L⁻¹ de CRP y el grupo control (HM) con 23,85 y 23,25 x10⁶ cél. mL⁻¹, respectivamente; y el menor valor significativo ($p < 0,05$) se obtuvo en el tratamiento dosificado con 5,0 mL L⁻¹ de CRP con 19,55 x10⁶ cél. mL⁻¹.

Para el sexto día de cultivo, las mayores densidades poblacionales se presentaron en los tratamientos dosificados con 7,5 y 10,0 mL L⁻¹ de CRP con valores significativos ($p < 0,05$) de 28,46 y 26,18 x10⁶ cél. mL⁻¹, respectivamente; seguido del grupo control con 23,76 x10⁶ cél. mL⁻¹; y el menor valor significativo ($p < 0,05$) se obtuvo en el tratamiento dosificado con 5,0 mL L⁻¹ de CRP con 18,69 x10⁶ cél. mL⁻¹.

En día de cultivo 7, las mayores densidades poblacionales de *Sc. acutus* se presentaron en los tratamientos dosificados con 7,5 y 10,0 mL L⁻¹ de CRP con valores significativos ($p < 0,05$) de 27,58 y 25,89 x10⁶ cél. mL⁻¹, respectivamente; seguido del control (HM) con 23,48 x10⁶ cél. mL⁻¹; y el menor valor significativo ($p < 0,05$) se obtuvo en el tratamiento dosificado con 5,0 mL L⁻¹ de CRP con 18,47 x10⁶ cél. mL⁻¹. Luego del día de cultivo 5, los cultivos microalgales tienden a la estabilidad en el crecimiento.

3.2.2. Tasa de crecimiento y tiempo de duplicación poblacional

En la Tabla 4, Fig. 8 y Anexo 7, se observan la tasa de crecimiento (μ) y el tiempo de duplicación diaria (TD) poblacional en los cultivos de *Sc. acutus* con CRP y grupo control (HM), los cuales fueron determinados al quinto día de cultivo.

Tabla 4. Tasa de crecimiento (μ) y Tiempo de duplicación diaria (TD) poblacional de *Sc. acutus* en los tratamientos cultivados con CRP y grupo control (HM).

PARÁMETRO	CRP (mL L ⁻¹)			
	CONTROL (0)	5,0	7,5	10,0
μ (día ⁻¹)	0,476 ±0,005b	0,441 ±0,007c	0,508 ±0,006a	0,481 ±0,009b
TD (día)	1,456 ±0,016b	1,571 ±0,026c	1,364 ±0,018a	1,440 ±0,025b

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

La tasa de crecimiento (μ) en la fase exponencial de crecimiento de cultivo de *S. acutus* (Tabla 4, Fig. 8) presentó el mayor valor significativo ($p<0,05$) en el tratamiento dosificado con 7,5 mL L⁻¹ de CRP con 0,508 día⁻¹; seguido de los tratamientos dosificados con 10,0 mL L⁻¹ de CRP y el grupo control (HM) con 0,481 y 0,476 día⁻¹, respectivamente; y la menor tasa de crecimiento significativa ($p<0,05$) de *S. acutus* se obtuvo en el tratamiento con 5,0 mL L⁻¹ de CRP con 0,441 día⁻¹.

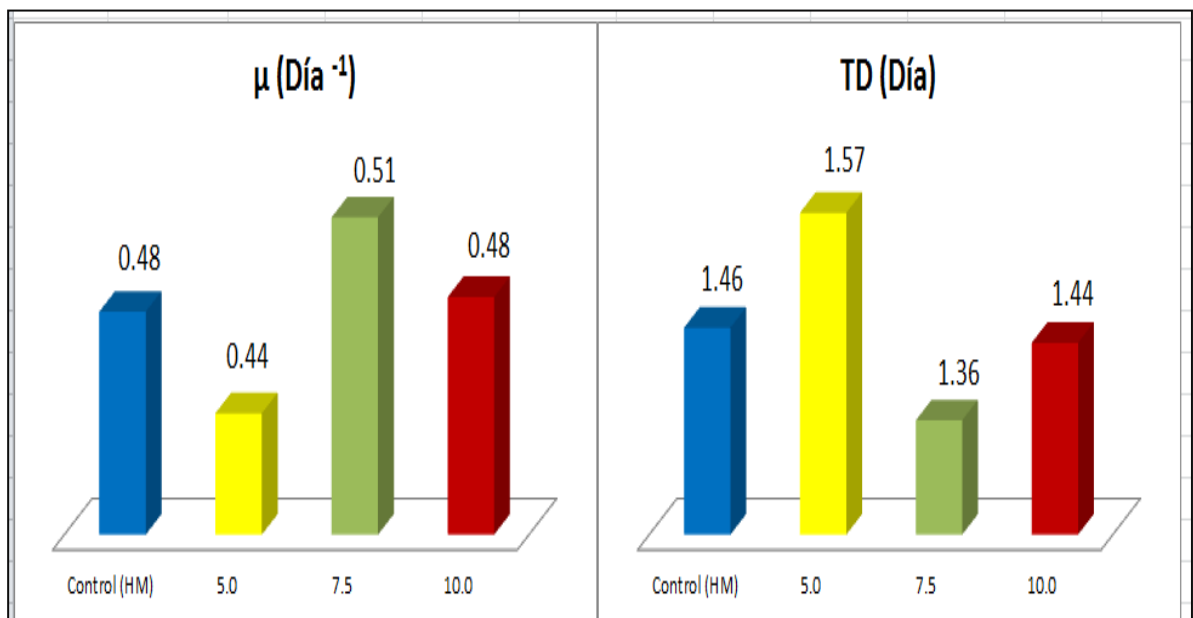


Fig. 8. Variación de la tasa de crecimiento (μ) y Tiempo de duplicación (TD) al quinto día de los cultivos de *Sc. acutus* dosificados con CRP.

Respecto al tiempo de duplicación diaria (TD) en la fase exponencial de crecimiento de cultivo de *Sc. acutus* (Tabla 4, Fig. 8) el mayor valor significativo ($p < 0,05$) se presentó en el tratamiento dosificado con 5,0 mL L⁻¹ de CRP con 1,571 día; seguido del tratamiento dosificado con 10,0 mL L⁻¹ de CRP y el grupo control (HM) con valores de 1,440 y 1,456 día, respectivamente; y el menor valor se obtuvo dosificando 7,5 mL L⁻¹ de CRP con 1,364 día.

3.3. CONTENIDO DE CLOROFILAS α y β EN *Sc. acutus*

En la Tabla 5, y Fig. 9 y 10, se observan los valores del contenido de clorofilas α y β en porcentaje (%) y biomasa (mg L⁻¹) de los cultivos de *Sc. acutus* al quinto día de crecimiento.

Tabla 5. Contenido de clorofilas α y β en porcentaje (%) y biomasa (mg L⁻¹) de los cultivos de *Sc. acutus*.

PARÁMETROS	CRP (mL L ⁻¹)			
	CONTROL (0)	5,0	7,5	10,0
Clorofila α (%)	0,74 \pm 0,04a	0,61 \pm 0,08b	0,85 \pm 0,02a	0,53 \pm 0,03b
Clorofila β (%)	0,27 \pm 0,01ab	0,20 \pm 0,04bc	0,29 \pm 0,04a	0,16 \pm 0,02c
Clorofila α (mg L ⁻¹)	6,53 \pm 0,48b	4,56 \pm 0,64c	9,07 \pm 0,32a	4,92 \pm 0,15c
Clorofila β (mg L ⁻¹)	2,39 \pm 0,14a	1,50 \pm 0,35b	3,14 \pm 0,38a	1,53 \pm 0,24b

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

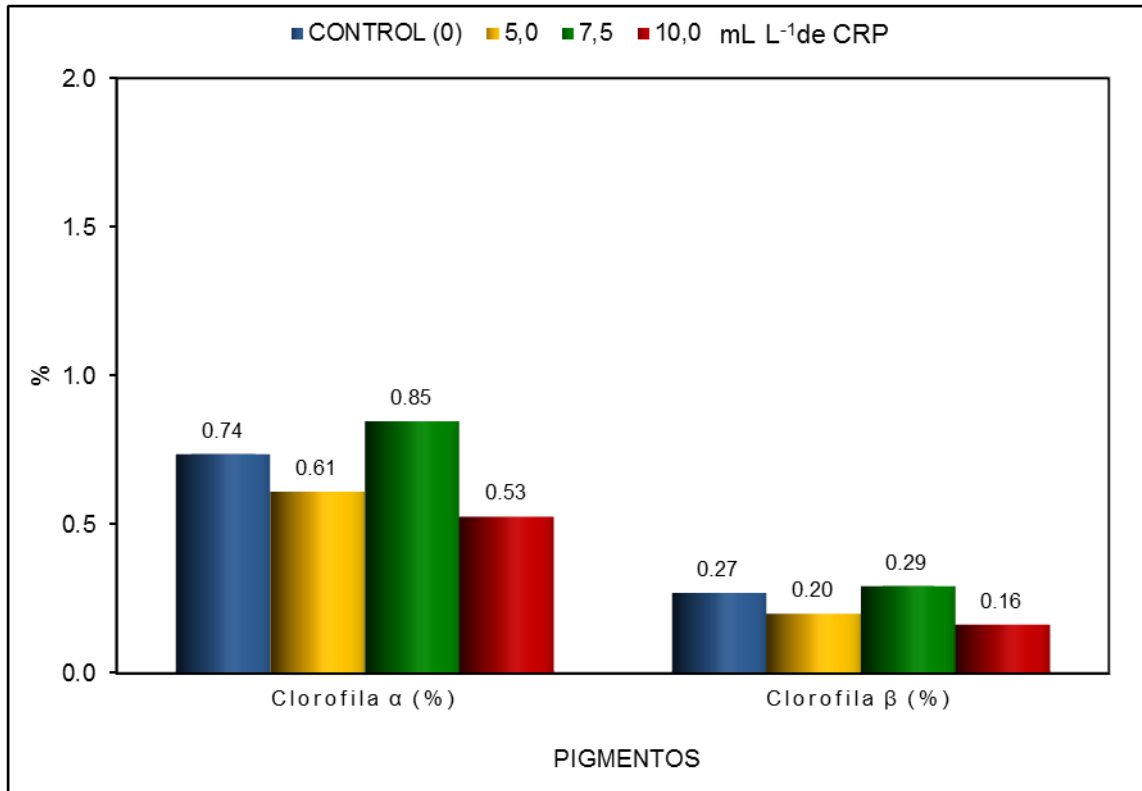


Fig. 9. Concentración (%) de la clorofila α y β en cultivos de *Sc. acutus* dosificados con CRP.

El contenido de clorofila α expresado en porcentaje (Tabla 5 y Fig. 9) al quinto día de cultivo, presentaron los mayores valores significativos ($p < 0,05$) en los tratamientos dosificados con 7,5 mL L⁻¹ de CRP y el grupo control (HM) con 0,85 y 0,74 %, respectivamente; siendo los menores valores significativos ($p < 0,05$) obtenidos en los tratamientos dosificados con 5,0 y 10,0 mL L⁻¹ de CRP con 0,61 y 0,53 %, respectivamente.

Del mismo modo, la clorofila β expresada en porcentaje (Tabla 5 y Fig. 9) al quinto día de cultivo, se presentaron los mayores valores significativos ($p < 0,05$) en los tratamientos dosificados con 7,5 mL L⁻¹ de CRP y el grupo control (HM) con 0,29 y 0,27 %, respectivamente; siendo los menores valores significativos ($p < 0,05$) obtenidos en los tratamientos dosificados con 5,0 y 10,0 mL L⁻¹ de CRP con 0,20 y 0,16 %, respectivamente.

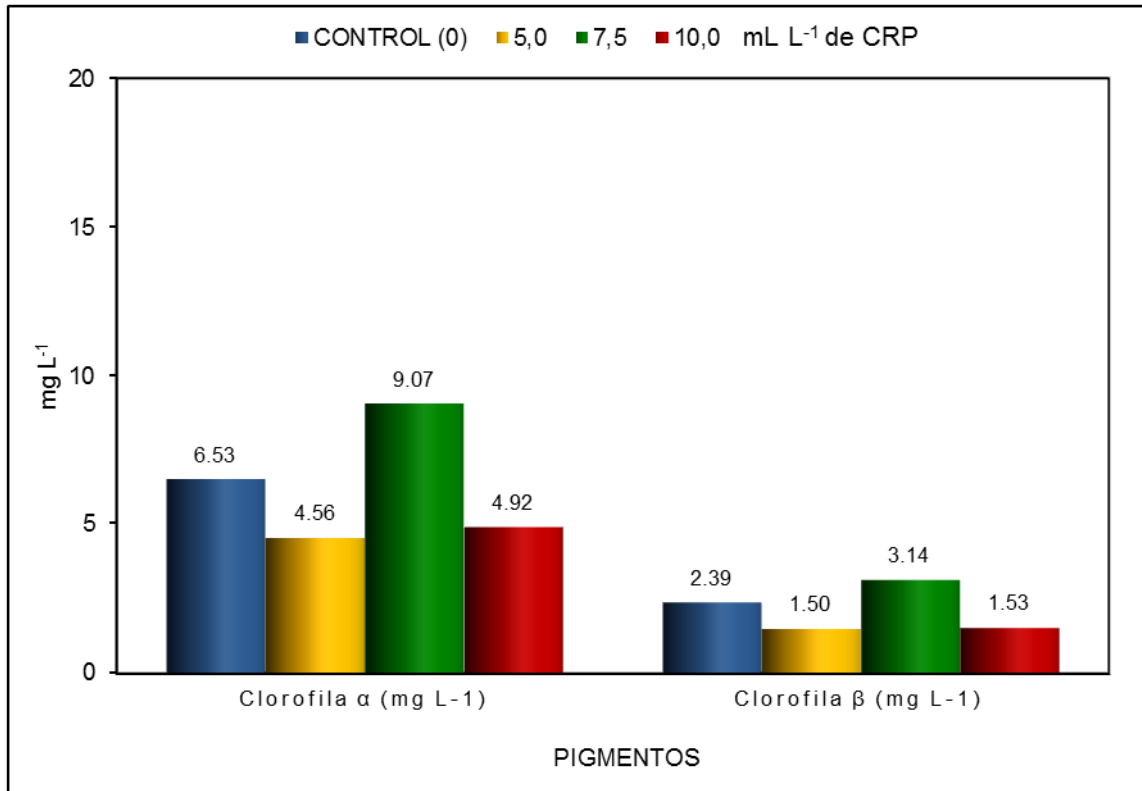


Fig. 10. Concentración de la clorofila α y β (mg L^{-1}) de los cultivos de *Sc. acutus* dosificados con CRP.

En cuanto al contenido de clorofila α en biomasa (mg L^{-1}) de *Sc. acutus* (Tabla 5, Fig. 10) al quinto día de cultivo, fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en el tratamiento dosificado con $7,5 \text{ mL L}^{-1}$ de CRP con $9,07 \text{ mg L}^{-1}$; seguido del grupo control (HM) con $6,53 \text{ mg L}^{-1}$; y los menores valores significativos ($p < 0,05$) se obtuvieron con $7,5$ y $5,0 \text{ mL L}^{-1}$ de CRP con $4,92$ y $4,56 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente.

Asimismo, el contenido de clorofila β en biomasa (mg L^{-1}) de *Sc. acutus* (Tabla 5, Fig. 10) al quinto día de cultivo, se presentaron con los mayores valores significativos ($p < 0,05$) en los tratamientos dosificados con $7,5 \text{ mL L}^{-1}$ de CRP y el grupo control (HM) con $3,14$ y $2,39 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente; y los menores valores significativos ($p < 0,05$) se obtuvieron con $10,0$ y $5,0 \text{ mL L}^{-1}$ de CRP con $1,53$ y $1,50 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente.

IV. DISCUSIÓN

Los parámetros ambientales en los cultivos microalgales tienden a condicionar su crecimiento y bioquímica, por lo que sus rangos adecuados deben ser evaluados para no interferir en los resultados experimentales; en tal sentido, se considera que la temperatura y el pH son los parámetros de mayor importancia en los cultivos algales. Según Abalde *et al.* (1995), el rango de temperatura varía según la especie, existiendo algunas especies que no soportan temperaturas superiores a los 25 ° C y otras crecen bien hasta los 36 ° C.

En el presente estudio, la temperatura de los cultivos de *Sc. acutus* variaron de 22,6 a 23,6 °C coincidiendo con lo mencionado por Abalde *et al.* (1995); por otro lado, Garibay *et al.* (2009), consideran en 28 ° C la temperatura óptima para el crecimiento de *Scenedesmus*, en consecuencia las variaciones de temperatura no afectaron la dinámica del crecimiento de los cultivos de *Sc. acutus*.

Respecto al pH, los cultivos de microalgas requieren un rango entre 7 y 8, aunque pueden presentar pequeñas variaciones sin afectar su crecimiento siendo muy sensibles a los cambios bruscos, soportando mejor un aumento que la disminución del mismo, en un rango que varía según la especie (Richmond & Becker, 1986); por otro lado, Garibay *et al.* (2009), consideran mayor rango del pH (6,5 a 9,5), sin embargo, es recomendable evitar cambios bruscos que afectarían el crecimiento y composición química de los cultivos algales.

Las variaciones del pH observados en nuestros cultivos (8,12 a 9,11) están dentro de los rangos mencionados anteriormente y mostraron cierta tendencia en su incremento con el aumento de la densidad celular debido a que las microalgas al crecer y reproducirse usan el CO₂ disponible en el medio, ésta reducción eleva los niveles de pH por la disminución de carbonatos. Este parámetro no es limitante en la interpretación de nuestros resultados.

Desde el punto de vista de crecimiento, *Scenedesmus* puede soportar elevadas concentraciones de nutrientes de las aguas residuales por su elevada capacidad metabólica que le permite resistir amplias variaciones ambientales (Andrade, 2009) y crecer en condiciones heterotróficas. La capacidad de crecer en condiciones heterotrófica metabolizando residuos orgánicos, ha posibilitado el cultivo exitoso de la clorofita marina *Tetraselmis suecica* utilizando residuos de la pesquería y maricultura; así tenemos que Merino *et al.* (2003) hallaron los mejores crecimientos de *T. suecica* cultivados con $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ($5,0 \times 10^6 \text{ cél. mL}^{-1}$) de ensilado de pescado, e Ipanaqué & Paredes (2009), obtuvieron las mayores densidades poblacionales con 60 y 80 mL L^{-1} ($6,38$ y $6,88 \times 10^6 \text{ cél. mL}^{-1}$) de extracto de ensilado de residuos de “concha de abanico” comparados con los obtenidos con el medio de cultivo f/2 de Guillard ($3,67 \times 10^6 \text{ cél. mL}^{-1}$). De igual forma Toyub *et al.* (2008), demostraron la facilidad de *Scenedesmus obliquus* de metabolizar nutrientes orgánicos, evaluando el crecimiento durante 14 días con cuatro concentraciones ($1,5$; $2,0$; $2,5$ y $3,0$ %) de residuos de una fábrica de dulces frente al medio control Bold; alcanzando sus máximos valores con el medio control ($13,63 \times 10^6 \text{ cél. mL}^{-1}$), seguido de las concentraciones de $2,5$; $3,0$; $2,0$ y $1,5$ % con $9,71$; $8,32$; $6,52$ y $5,12 \times 10^6 \text{ cél. mL}^{-1}$, respectivamente.

Lo mencionado por Toyub *et al.* (2008) se ve reflejado en nuestros resultados, con la dosificación de $7,5 \text{ mL L}^{-1}$ de CRP se obtuvo las poblaciones más altas ($27,31 \times 10^6 \text{ cél. mL}^{-1}$) de *Sc. acutus* seguido de la dosificación con $10,0 \text{ mL L}^{-1}$ y el grupo control (HM) con $23,85$ y $23,25 \times 10^6 \text{ cél. mL}^{-1}$, mientras que el menor valor se obtuvo con $5,0 \text{ mL L}^{-1}$ de CRP ($19,55 \times 10^6 \text{ cél. mL}^{-1}$), por lo que los mejores crecimiento de *Sc. acutus* utilizando CRP posiblemente sea consecuencia de su mejor contenido y balance de nutrientes (macronutrientes y micronutrientes) y sales minerales.

Griffiths *et al.* (2012) y Roleda *et al.* (2013), mencionan que la tasa máxima de crecimiento específico (μ_{max}) da una indicación del potencial biológico con respecto al tiempo de duplicación de la especie en un entorno de crecimiento particular y que esto ocurre muy temprano en la curva de crecimiento cuando la concentración de biomasa es baja y antes de cualquier deficiencia de nutrientes o de la luz sea limitante; así Roleda *et al.* (2013), menciona que trabajando microalgas con medio Guillard f/2, encontraron que los μ más altos a los 5 días lo presentaron *Thalassiosira pseudonana* (0,564 día⁻¹), *Nannochloropsis oculata* (0,481 día⁻¹), *Isochrysis galbana* (0,451 día⁻¹); mientras la μ más baja la presentó *Odontella aurita* (0,131 día⁻¹). En *Tetraselmis* sp., Montoya & Acosta (2011), hallaron que la tasa de crecimiento fue de 0,65 día⁻¹ en cultivos con el fertilizante comercial Crezilizer (N, P₂O₅, K₂O) enriquecidos con bicarbonato.

Comparativamente, los cultivos de *Sc. acutus* dosificados con CRP el mayor valor de μ se obtuvo con 7,5 mL L⁻¹ (0,508 día⁻¹) similares y mayores a los reportados tanto por Montoya & Acosta (2011) y Roleda *et al.* (2013) en sus investigaciones. En base a los valores de μ reportado por Martínez *et al.* (2000) y Hodaifa *et al.* (2007) de 1,08 día⁻¹ y 1,056 día⁻¹, respectivamente, mediante la inyección de CO₂; es posible que los cultivos de *Sc. acutus* dosificados con CRP, aportador de nitrógeno y carbono orgánico, y CO₂ propicien su crecimiento mixotrófico y permitan superar las tasas de crecimiento mencionados anteriormente.

Respecto al tiempo de duplicación poblacional (TD), Fábregas *et al.* (1985), afirma que la deficiencia de nitrógeno en el medio de cultivo incrementa el tiempo de duplicación en las células de *Isochrysis galbana*, dado que la velocidad en la cual se multiplican disminuye, pero a su vez dependería de un adecuado balance de nutrientes como nitrógeno y fósforo, lo que explicaría los valores encontrados en el presente trabajo, puesto que el menor TD se encontró en el tratamiento con 7,5 mL L⁻¹ (1,364 día) y el mayor TD con 5,0 mL L⁻¹ (1,571 día). Comparando con los valores del TD de 1,500 día hallados para *T. suecica* por Sheehan *et al.* (1998) cultivada con medio Guillard f/2 es mayor a los determinados para nuestro control (HM) y tratamientos con 7,5 y 10,0 mL

L⁻¹ de CRP, demostrando que *Sc. acutus* es una especie capaz de crecer bien en medios de cultivos orgánicos alternativos.

Respecto al contenido de los pigmentos, Serpa & Calderón (2006), evidenciaron que la cantidad de clorofila se correlaciona positivamente con la densidad o biomasa celular y que las fuentes de nitrógeno promueven la acumulación de clorofila, considerándose como un indicador del crecimiento poblacional debido a que mayores niveles de clorofila promueven la mayor producción de oxígeno y radicales oxidantes, y según Becker (1994), el contenido de pigmentos clorofilianos en las microalgas varían de 0,5 a 1,5% de su peso seco total coincidiendo con nuestros resultados en los que los mayores valores de clorofila α (%) en los cultivos de *Sc. acutus* dosificados con CRP se hallaron con 7,5 mL L⁻¹ (0,85 %) y el control (0,74%), y los menores con 5,0 mL L⁻¹ (0,61%) y 10,0 mL L⁻¹ (0,53 %); mientras que los mayores porcentajes de clorofila β se hallaron con 7,5 mL L⁻¹ (0,29%) y el control (0,27%); y los menores con 5,0 mL L⁻¹ (0,20%) y 10,0 mL L⁻¹ (0,16%).

Se ha demostrado que el contenido de clorofila α y en general los pigmentos fotosintéticos de células de microalgas cambian cuando son expuestas a condiciones de estrés, limitación de luz o nutrientes (Goericke & Montoya, 1998; Descy *et al.*, 2000; Henriksen *et al.*, 2002), por lo que la baja concentración de nutrientes (5,0 mL L⁻¹ de CRP) explicaría la disminución del porcentaje y biomasa de las clorofilas y que en alto contenido de nutrientes (10,0 mL L⁻¹ de CRP) los pigmentos dejarían de ser indispensables propiciando el comportamiento heterotrófico del alga por la composición básicamente orgánica del CRP. Varios autores (Kaplan *et al.*, 1986); Vieira & Klaveness, 1986); Vonshak, 1986); Henriksen *et al.* 2002) mencionan la importancia de la fuente y concentración de nitrógeno en el crecimiento y composición bioquímica de las microalgas; asimismo el agotamiento de nitrógeno en el medio puede causar el cese de la división celular, aunque el metabolismo del carbono continua (Beopoulos *et al.*, 2009).

La presencia de N, P, K y otros nutrientes orgánicos en el CRP serían los responsables del crecimiento de *Sc. acutus* así como de la formación y acumulación de las clorofilas α y β , que según Raven (1988) y Liotenberg *et al.* (1996), son reserva de nitrógeno debido a la estructura química básica de las porfirinas (Raven, 1988; Liotenberg *et al.*, 1996) de vital importancia en el crecimiento microalgal (Raven, 1988). Así mismo las microalgas tienen la capacidad de crecer y hacer fotosíntesis con diferentes nutrientes como las sales minerales en condiciones autotróficas y sustancias orgánicas en condiciones mixotróficas (Ortiz *et al.* 2010). Un balance de sales minerales y otros nutrientes presentes en el cultivo de 7.5 mL L^{-1} de CRP posiblemente estimulen el crecimiento de *Sc. acutus* y la producción de clorofila, mientras que en limitación ($5,0 \text{ mL L}^{-1}$ de CRP), principalmente de nitrógeno, los procesos enzimáticos son más lentos que la fotosíntesis y al alcanzar el límite en la concentración de nutrientes ($10,0 \text{ mL L}^{-1}$), se produce una disminución de las clorofilas y la saturación hace disminuir la densidad microalgal aumentando el peso celular y porcentaje de proteína ya que se sigue incorporando nitrógeno pese al bloqueo de la división celular (Fábregas *et al.*, 1996).

En el litoral de nuestra región están establecidas varias empresas dedicadas al procesamiento pesquero, industrial y artesanal, generando grandes cantidades de residuos con posibilidades de ser aprovechados en el cultivo masivo de microalgas que debido, principalmente, a su contenido de nutrientes orgánicos e inorgánicos pueden ser transformadas en biomasa y/o pigmentos clorofilianos. En tal sentido, consideramos que el aprovechamiento del CRP en el cultivo de microalgas permitirá reducir los actuales impactos negativos que estos residuos causan en el ambiente acuático y la producción de pigmentos clorofilianos de gran demanda en el mercado local e internacional.

V. CONCLUSIONES

- La mayor densidad poblacional al quinto día de cultivo de *Sc. acutus* fue obtenido con el tratamiento dosificado con 7,5 mL L⁻¹ del CRP (27,31 x10⁶ cél. mL⁻¹) seguido del tratamiento con 10,0 mL L⁻¹ (23,85 x10⁶ cél. mL⁻¹) y la menor concentración se obtuvo en el tratamiento con 5,0 mL L⁻¹ del CRP (19,55 x10⁶ cél. mL⁻¹).
- En la fase exponencial del cultivo con CRP, la tasa de crecimiento (μ) es máxima y el tiempo de duplicación (TD) se acorta; donde el mayor valor de μ al quinto día de cultivo para *Sc. acutus*, se presentó en el tratamiento dosificado con 7,5 mL L⁻¹ del CRP con 0,508 día⁻¹ en un menor TD de 1,364 día.
- Los mayores porcentajes de clorofila α y β en *Sc. acutus* al quinto día de cultivo se presentaron en el tratamiento dosificado con 7,5 mL L⁻¹ del CRP con valores de 0,85 y 0,29 %, respectivamente.
- Los mayores contenidos en biomasa (mg L⁻¹) de clorofila α y β en *Sc. acutus* al quinto día de cultivo, se presentaron en el tratamiento dosificado con 7,5 mL L⁻¹ del CRP con valores de 9,07 y 3,13 mg L⁻¹, respectivamente.

VI. RECOMENDACIONES

- Evaluar la influencia en la composición bioquímica y las características del perfil lipídico y la composición de aminoácidos de la microalga *Sc. acutus*, cultivada en las concentraciones de 5,0; 7,5 y 10,0 mL L⁻¹ CRP.
- Realizar un estudio del perfil bioquímico y bromatológico del CRP.
- Escalar los resultados obtenidos a fin de biotransformar las ingentes cantidades de residuos pesqueros propiciando la producción masiva de pigmentos clorofilianos en cultivos masivos al aire libre.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alveal, K.; M.E. Ferreiro; E.C. Oliveira & E. Sar. 1995. *Manual de métodos ficológicos*. Universidad de Concepción. Concepción, Chile. 298-309pp.
- 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.
- AOAC. 2007. *Official methods of analysis*, 18th edic. edn. 2005. Current through revision 2, 2007. AOAC International. Gaithersburg, MD.
- 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.
- 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.
- Berenz, Z. 1996. XII Curso internacional tecnología de procesamiento de productos pesqueros, del 15 de Enero al 01 de Marzo de 1996. Instituto Tecnológico Pesquero del Perú. Callao, Perú.

- Benedetti, A.; S. Canali & F. Lianello. 1998. La fertilizzazione organica dei suoli. En I Fertilizzanti Organici. Paolo Sequi (Ed.). Italia. Edizioni L'Informatore Agrario. 1-12pp.
- Bertoldo, F.; E. Sant'anna; M. Villela & J. Barcelos. 2006. Lípidos, composición de ácidos grasos y carotenos en *Chlorella vulgaris* cultivadas en solución hidropónica residual. *Grasas y Aceites*. **57**(3):270-274.
- Blanco, J. 1991. El Fitoplancton: Su cultivo. Tema 2. Xunta de Galicia. 588p.
- Cano, J. & J. Pisfil. 2007. Cultivo de *Tetraselmis suecica* utilizando CO₂ obtenido a partir de valvas de *Argopecten purpuratus* en condiciones de laboratorio. En: Libro de resúmenes del V Congreso Internacional de Estudiantes en Ciencias Biológicas, VIII Congreso Nacional de Estudiantes de Biología, del 4 al 9 de noviembre del 2007. Tacna, Perú.
- Capa, W. 2000. Efecto de la salinidad y concentración de harina de pescado en el crecimiento de *Dunaliella salina*. Tesis para optar el título de Biólogo Acuicultor. Universidad Nacional del Santa. Nuevo Chimbote, Perú. 81p.
- Capa, W. 2010. Biología y Biotecnología de Microalgas. 1era. edic. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC). Lima, Perú. 181p.
- Chernomorsky, S. & A. Segelman. 1988. Biological activities of chlorophyll derivatives. *J. J. Med.* **85**:669-673.
- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*. **25**:294-306.
- Descy, J.P.; H.W. Higgins; D.J. Mackey; J.P. Hurley & T.M. Frost. 2000. Pigments ratios and phytoplankton assessment in northern Wisconsin lakes. *J. Phycol.* **36**:274-286.

- Encomendero, E. & F. Uchpa. 2002. Producción de ensilado biológico de subproductos de “concha de abanico” (*Argopecten purpuratus*). Comunicación Científica - CIVA 2002. <<http://www.revistaaquatic.com/civa2002>>. Accesado: 21 de Julio del 2014.
- Fábregas, J.; J. Abalde; C. Herrero; B. Cabezas & M. Veiga. 1984. Growth of marine microalgae *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities y nutrient concentration. *Aquaculture*. **42**:207-215.
- Fábregas J.; A. Otero; E. Morales; B. Cordero & M. Patiño. 1996. *Tetraselmis suecica* cultured in different nutrient concentrations varies in nutritional value to *Artemia*. *Aquaculture*. **83**:17-37.
- 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. 2006. 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.
- Goericke, R. & J.P. Montoya. 1998. Estimation the contribution of microalgal taxa to chlorophyll a in the field-variations of pigment ratios under nutrient and light limited growth. *Marine Ecology Progress series*. **169**:97-112.
- Gómez, C.; S. Mendoza & C. Yzásiga. 2008. Efecto del extracto de valvas de *Argopecten purpuratus* “concha de abanico” en el crecimiento de *Tetraselmis suecica* en condiciones de laboratorio. *En*: Libro de

resúmenes del VI Congreso Internacional de Estudiantes en Ciencias Biológicas, IX Congreso Nacional de Estudiantes de Biología, del 5 al 10 de noviembre del 2008. Piura, Perú.

González, M. 2006. Aplicación e importancia de las microalgas en el tratamiento de aguas residuales. *Contactos*. **59**:64-70.

González, M. 2010. Influencia de la deficiencia de nitrógeno y fósforo en las interacciones competitivas entre *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus*. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias.

Griffiths, M.; R. Van Hille & S. Harrison. 2012. Lipid productivity, settling potential and fatty acid profile of 11 microalgal species grown under nitrogen replete and limited conditions. *J. Appl. Phycol.* **24**:989-1001.

Guillard, R. 1975. Culture of Phytoplankton for feeding marine invertebrates. *In*: W.L. Smith and M. H. Chanley, eds., Culture of marine invertebrate animals. Plenum Book Publ. Corp., New York, U.S.A. 29-60pp.

Henriksen, P.; B. Riemann; H. Kaas; H. Munk & H. Lang. 2002. Effects of nutrient limitation and irradiance on marine phytoplankton Pigments. *J. Plank. Res.* **24**(9):835-858.

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

Hu, Q.; M. Sommerfeld; E. Jarvis; M. Ghirardi; M. Posewitz; M. Seibert & A. Darzins. 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstock for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J.* **54**(4):621-639.

Ipanaqué, J. & I. Paredes. 2009. Efecto del ensilado de los desechos blandos de *Argopecten purpuratus* “concha de abanico”, en el crecimiento poblacional y contenido de lípidos totales de *Tetraselmis suecica*, en condiciones de laboratorio. Tesis para optar el Título de Biólogo

- Acuicultor. Universidad Nacional del Santa. Nuevo Chimbote, Perú. 65p.
- Kaplan, D.; A. Richmond; Z. Dubinsky & S. Aaronson. 1986. *Algal nutrition*. In: Handbook of Microalgal Mass Culture. Richmond, A. (ed.), CRC Press, Boca Raton. Florida, U.S.A. 147-198pp.
- Knud-Hansen, C. 1998. Pond fertilization: ecological approach and practical applications. Pond dyn MICS/Aquaculture collaborative research support program. Oregon State University, Corvallis, Or. 125p.
- Liotenberg, S.; D. Campell; R. Rippka; J. Houmard & N. Tandeau de Marsac. 1996. Effect of the nitrogen source on phycobiliprotein synthesis and cell reserves in a chromatically adapting filamentous cyanobacterium. *Microbiology*. **142**:611-622.
- Lowry, O.; N. Rosebrough.; A. Farr & R. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265-275.
- Martínez, M.; S. Sánchez; J. Jiménez; F. El Yousfi & L. Muñoz. 2000. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technol.* **73**:263–272.
- Merino, F. 1999. Efecto del ácido acético con sustrato limitante en el crecimiento de *Scenedesmus acutus* usando cultivos batch. Informe de Investigación. Universidad Nacional del Santa. Nuevo Chimbote, Perú.
- Merino, F.; W. Capa & G. Alayo. 2003. Efecto combinado de la fuente nitrogenada y la concentración de silicato en el crecimiento y contenido de lípidos y carbohidratos de *Chaetoceros gracilis* en laboratorio. Informe de investigación. Universidad Nacional del Santa. Chimbote - Perú. 32p.

- Montoya, C. & A. Acosta. 2011. Producción de biomasa microalgal de *Tetraselmis* sp. en fotobiorreactor tipo columna de burbujeo. V Simposio Internacional de Biofábricas y I Congreso Internacional de Flujos Reactivos. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de minas. Colombia. 157-158pp.
- Ortiz, M.; C. Cortés; J. Sánchez; J. Padilla & A. Otero. 2010. Evaluación del crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* en diferentes medios de cultivo en condiciones autotróficas y mixotróficas. Universidad de Los Llanos – Villavicencia Meta – Colombia. Vol. 16. N° 1. ORINOQUIA.
- 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.
- Paniagua, J.; F. Buckle; C. Granados & D. Loya. 1989. Manual de metodologías y alternativas para el cultivo de microalgas. Informe OC-89-01, CICESE. Ensenada Nuevo México, México. 67p.
- Raven, J. 1988. *Limits to growth*. In: Microalgal Biotechnology. Borowitzka, M. & Borowitzka, L. (eds). Cambridge University Press. 331-356pp.
- Ritchie, R. 2008. Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls a, b, c, and d and total chlorophylls in natural assemblages of photosynthetic organisms using acetone, methanol, or ethanol solvents. *Photosynthetica*. **46**(1):115-126.
- 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.

- Rodríguez, L.; J. Juscamaita & J. Vargas. 2007. Efecto del medio EM-Bokashi en el cultivo de la microalga marina *Tetraselmis suecica* K. *Ecología Aplicada*. **6**:111-116.
- Roleda, M.; S. Slocombe; R. Leakey; J. Day; E. Bell & M. Stanley. 2013. Effects of temperature and nutrient regimes on biomass and lipid production by six oleaginous microalgae in batch culture employing a two-phase cultivation strategy. *Bioresource Technology*. 129:439-449.
- Rosales, N.; J. Bermúdez; R. Moronta & E. Morales. 2007. Gallinaza: Un residual avícola como fuente alternativa de nutrientes para producción de biomasa microalgal. *Rev. Colomb. Biotechnol.* **9**(1):41-48.
- Rosenberg, J.; G. Oyler; L. Wilkinson & M. Betenbaugh. 2008. A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. *Curr. Opin. Biotechnol.* **19**:430-436.
- Sánchez, H.; J. Juscamaita; J. Vargas & R. Oliveros. 2008. Producción de la microalga *Nannochloropsis oculata* (Droop) Hibberd en medios enriquecidos con ensilado biológico de pescado. *Ecol. Aplic.* **7**:149-158.
- Serpa, R. & A. Calderón 2006. Efecto de diferentes fuentes de nitrógeno en el contenido de carotenoides y clorofila de cuatro cepas peruanas de *Dunaliella salina* TEOD. *Rev. Ecología aplicada*. **5**(1;2):93-99.
- Sheehan, J.; T. Dunahay; J. Benemann & P. Roessler. 1998. A look back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from algae. Close-Out report. National Renewable Energy Lab., Department of Energy, Golden. Colorado, U.S.A. Report number NREL/TP-580-24190.
- Sorokin, C. 1973. Dry weight, packed cell volume and optical density. *In*: Stein, J. R. (Ed.). Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements. Cambridge University Press. Cambridge, MA.USA. (321-343pp). 448p.

- Steel, R. & J. Torrie. 1988. Bioestadística: Principios y procedimientos. 2da. edic. Edit. McGraw-Hill. Traducción por Ricardo Martínez. México. 622p.
- Torrentera, L. & A. Tacon. 1989. La producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura: Una Diagnósis. Programa Cooperativo Gubernamental. FAO-Italia. 90p.
- 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.
- Vieira, A. & D. Klaveness. 1986. The utilization of organic nitrogen compounds as sole nitrogen source by some freshwater phytoplankters. *Nord. J. Bot.* **6**(1):93-97.
- Vonshak, J. 1986. Laboratory techniques for the culturing of microalgae. *In: Handbook of Microalgal Mass Culture*. Richmond, A. (ed.), CRC Press Inc. Boca Raton. Florida, U.S.A. 117-145pp.

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Valores proximales del contenido de los principales componentes del CRP utilizado en el cultivo de *Sc. acutus*.

PARÁMETROS	CONCENTRACIÓN
Humedad (%)	93,84
Proteínas (%)	3,82
Lípidos (%)	0,17
Cenizas (%)	0,91
Sólidos Totales (g L ⁻¹)	61,57
Nitratos (mg L ⁻¹)	1,06
Nitritos (mg L ⁻¹)	0,04
Fosfatos (mg L ⁻¹)	1,94
Nitrógeno Amoniacal (mg L ⁻¹)	4,61

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

DÍA DE CULTIVO	CRP (mL L ⁻¹)											
	CONTROL (0)			5,0			7,5			10,0		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
0	23,4	23,4	23,4	23,4	23,4	23,4	23,4	23,4	23,4	23,4	23,4	23,4
1	23,0	22,8	22,7	22,8	23,0	22,7	22,9	22,5	22,9	22,7	23,1	22,6
2	23,4	23,1	23,0	23,1	23,5	23,2	23,4	23,5	23,1	23,1	23,0	23,4
3	22,6	22,9	22,7	22,7	22,5	22,8	23,0	22,7	22,6	22,8	22,6	22,4
4	23,6	23,4	23,7	23,5	23,0	23,2	23,1	23,5	23,2	23,1	23,2	23,6
5	23,4	23,5	23,8	23,6	23,8	23,5	23,2	23,6	23,7	23,5	23,8	23,4
6	23,6	23,5	23,5	23,6	23,9	23,6	23,4	23,7	23,9	23,6	23,5	23,5
7	23,5	23,6	23,8	23,6	23,5	23,4	23,6	23,5	23,5	23,3	23,7	23,6

Anexo 3. Temperatura promedio (°C) en los cultivos de *Sc. acutus* con medio de cultivo CRP y grupo control (HM).

DÍA DE CULTIVO	CRP (mL L ⁻¹)			
	CONTROL (0)	5,0	7,5	10,0
0	23,4 ±0,0a	23,4 ±0,0a	23,4 ±0,0a	23,4 ±0,0a
1	22,8 ±0,2a	22,8 ±0,2a	22,8 ±0,2a	22,8 ±0,3a
2	23,2 ±0,2a	23,3 ±0,2a	23,3 ±0,2a	23,2 ±0,2a
3	22,7 ±0,2a	22,7 ±0,2a	22,8 ±0,2a	22,6 ±0,2a
4	23,6 ±0,2a	23,2 ±0,3a	23,3 ±0,2a	23,3 ±0,3a
5	23,6 ±0,2a	23,6 ±0,2a	23,5 ±0,3a	23,6 ±0,2a
6	23,5 ±0,1a	23,7 ±0,2a	23,7 ±0,3a	23,5 ±0,1a
7	23,6 ±0,2a	23,5 ±0,1a	23,5 ±0,1a	23,5 ±0,2a

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

Anexo 4. Valores de pH en los cultivos de *Sc. acutus* con medio de cultivo CRP y grupo control (HM).

DÍA DE CULTIVO	CRP (mL L ⁻¹)											
	CONTROL (0)			5,0			7,5			10,0		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
0	8,16	8,13	8,14	8,11	8,13	8,12	8,14	8,11	8,15	8,16	8,12	8,14
1	8,24	8,41	8,26	8,31	8,27	8,34	8,36	8,33	8,38	8,43	8,29	8,31
2	8,61	8,47	8,55	8,68	8,72	8,39	8,71	8,64	8,81	8,63	8,47	8,51
3	8,72	8,86	8,92	8,93	8,79	8,66	8,97	9,03	9,12	8,76	8,97	8,94
4	9,02	9,16	9,13	8,94	8,76	8,61	9,17	9,12	9,03	8,94	9,12	9,01
5	9,01	8,93	9,04	8,61	8,78	8,72	9,00	8,86	8,95	8,94	8,87	8,79
6	8,86	8,81	9,10	8,78	8,83	8,55	8,92	8,86	8,72	8,86	8,74	8,90
7	8,92	8,74	8,77	8,66	8,78	8,62	8,81	8,87	8,74	8,78	8,83	8,91

Anexo 5. Valores de pH promedio en los cultivos de *Sc. acutus* con medio de cultivo CRP y grupo control (HM).

DÍA DE CULTIVO	CRP (mL L ⁻¹)			
	CONTROL (0)	5,0	7,5	10,0
0	8,14 ±0,02a	8,12 ±0,01a	8,13 ±0,02a	8,14 ±0,02a
1	8,30 ±0,09a	8,31 ±0,04a	8,36 ±0,03a	8,34 ±0,08a
2	8,54 ±0,07a	8,60 ±0,18a	8,72 ±0,09a	8,54 ±0,08a
3	8,83 ±0,10a	8,79 ±0,14a	9,04 ±0,08a	8,89 ±0,11a
4	9,10 ±0,07a	8,77 ±0,17b	9,11 ±0,07a	9,02 ±0,09ab
5	8,99 ±0,06a	8,70 ±0,09b	8,94 ±0,07a	8,87 ±0,08ab
6	8,92 ±0,16a	8,72 ±0,15a	8,83 ±0,10a	8,83 ±0,08a
7	8,81 ±0,10a	8,69 ±0,08a	8,81 ±0,07a	8,84 ±0,07a

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

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

DÍA DE CULTIVO	CRP (mL L ⁻¹)											
	CONTROL (0)			5,0			7,5			10,0		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
0	2,15	2,15	2,15	2,15	2,15	2,15	2,15	2,15	2,15	2,15	2,15	2,15
1	3,67	3,71	3,65	3,78	3,69	3,73	3,63	3,87	3,58	3,81	3,62	3,84
2	6,78	7,12	6,60	6,93	7,74	6,81	7,62	6,81	6,43	6,87	7,51	7,02
3	11,43	13,94	13,09	11,02	10,35	9,97	14,35	14,86	13,57	15,11	14,32	16,24
4	18,61	19,30	18,87	15,63	14,02	14,56	21,86	20,93	20,61	19,78	19,26	20,32
5	23,93	22,78	23,03	18,76	19,78	20,12	27,61	26,38	27,94	23,12	25,01	23,41
6	24,14	23,46	23,68	17,13	20,34	18,61	29,21	27,11	29,07	27,08	26,03	25,42
7	24,01	23,33	23,11	17,02	19,86	18,54	27,83	26,49	28,42	26,61	25,68	25,37

Anexo 7. Valores de la Tasa de crecimiento (μ) y Tiempo de duplicación diaria (TD) poblacional de *Sc. acutus* con medio de cultivo CRP y grupo control (HM).

PARÁMETRO	CRP (mL L ⁻¹)											
	CONTROL (0)			5,0			7,5			10,0		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
N0	2,15	2,15	2,15	2,15	2,15	2,15	2,15	2,15	2,15	2,15	2,15	2,15
Nf	23,93	22,78	23,03	18,76	19,78	20,12	27,61	26,38	27,94	23,12	25,01	23,41
Día	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
μ (día⁻¹)	0,482	0,472	0,474	0,433	0,444	0,447	0,511	0,501	0,513	0,475	0,491	0,478
TD (día)	1,438	1,469	1,462	1,601	1,561	1,551	1,356	1,384	1,351	1,459	1,412	1,450

Anexo 8. Valores de la biomasa, absorbancia, y porcentaje y biomasa de clorofilas de *Sc. acutus* con medio de cultivo CRP y grupo control (HM).

PARÁMETROS	CRP (mL L ⁻¹)											
	CONTROL (0)			5,0			7,5			10,0		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Biomasa (mg L⁻¹)	912,21	868,37	877,90	716,07	755,00	767,98	1083,14	1034,89	1096,09	907,92	982,14	919,31
B Muestra (mg)	3,65	3,47	3,51	2,86	3,02	3,07	4,33	4,14	4,38	3,63	3,93	3,68
A630	0,111	0,104	0,105	0,063	0,087	0,067	0,131	0,145	0,166	0,077	0,080	0,069
A647	0,133	0,123	0,120	0,072	0,100	0,077	0,155	0,172	0,180	0,090	0,094	0,079
A664	0,267	0,248	0,232	0,153	0,201	0,162	0,338	0,336	0,359	0,193	0,189	0,178
A691	0,079	0,077	0,082	0,043	0,064	0,048	0,081	0,110	0,115	0,053	0,062	0,044
Clorofila α (ug mL⁻¹)	2,81	2,60	2,41	1,62	2,11	1,71	3,61	3,51	3,75	2,05	1,98	1,90
Clorofila β (ug mL⁻¹)	1,01	0,92	0,93	0,50	0,74	0,54	1,07	1,33	1,34	0,62	0,70	0,51
Clorofila α (%)	0,77	0,75	0,69	0,57	0,70	0,56	0,83	0,85	0,86	0,56	0,50	0,52
Clorofila β (%)	0,28	0,27	0,26	0,17	0,25	0,18	0,25	0,32	0,31	0,17	0,18	0,14
Clorofila α (mg L⁻¹)	7,02	6,51	6,06	4,08	5,29	4,30	8,99	8,80	9,43	5,08	4,91	4,78
Clorofila β (mg L⁻¹)	2,55	2,34	2,28	1,22	1,89	1,38	2,71	3,31	3,40	1,54	1,77	1,29