

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA PERUANA



**UNAP**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Escuela de Formación Profesional de

Acuicultura.

**“USO DEL FERTILIZANTE FOLIAR 11N8P6K EN EL AISLAMIENTO Y CULTIVO DE *Scenedesmus sp.* (MEYEN, 1829) (CHLOROPHYTA: SCENEDESMACEAE) EN CONDICIONES DE LABORATORIO”**

**TESIS**

Requisito para optar el título profesional de:

**BIÓLOGO ACUICULTOR**

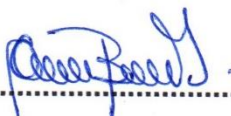
**AUTOR**

**HERMINIO MANUEL SOPLÍN BOSMEDIANO**

**Iquitos – Perú**

**2015**

**JURADO CALIFICADOR Y DICTAMINADOR**



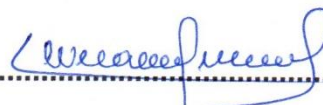
.....  
Blga. Adriana del Pilar Burga Cabrera, M.Sc.

**Presidente**



.....  
Blga. Rosana Cubas Guerra, M.Sc.


**Miembro**



.....  
Blga. Luz Esther Vela Guerra, M.Sc.

**Miembro**

## ASESORES



.....

Blgo. Enrique Ríos Isern, Dr.



.....

Blga. Rosa Ismiño Orbe, M.Sc.



**UNAP**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**Dirección de Escuela de Formación**  
**Profesional de Acuicultura**

**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS**

Iquitos, 17 de abril de 2015



En la ciudad de Iquitos, a los diecisiete (17) días del mes de abril de 2015 y, siendo las 11:00 horas; se reunió en el Auditorio de las Direcciones de Escuelas de la Facultad de Ciencias Biológicas-UNAP, el Jurado Calificador y Dictaminador de Tesis que suscribe, designado con RESOLUCIÓN DIRECTORAL N° 043-2014-DEFP-A-UNAP, presidido e integrado por: **Blga. ADRIANA DEL PILAR BURGA CABRERA, MS.c., Presidente; Blga. ROSSANA CUBAS GUERRA, MS.c., Miembro; y Blga. LUZ ESTHER VELA GUERRA, Mgr., Miembro;** para escuchar, examinar y calificar la sustentación y defensa de la tesis titulada: **"USO DEL FERTILIZANTE FOLIAR 11N8P6K EN EL AISLAMIENTO Y CULTIVO DE *Scenedesmus sp.* (Chlorophyta: Scenedesmaceae) EN CONDICIONES DE LABORATORIO"**, realizado por el bachiller de la Facultad de Ciencias Biológicas-Escuela de Formación Profesional de Acuicultura: **Herminio Manuel Sepúlveda Bosmediano** de la Promoción II-2008, graduado de Bachiller con R.R. N° 1522-2009-UNAP de fecha 27 de julio de 2009; reconociendo como asesores: **Blgo. ENRIQUE RIOS ISERN, Dr. y Blga. ROSA ISARINO ORBE, MS.c.**



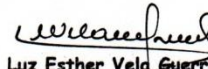
Durante todo el desarrollo de la sustentación y defensa de la tesis, el Jurado Calificador y Dictaminador, considerando lo establecido en el nuevo Reglamento de Grados y Títulos, aprobado y puesto en vigencia mediante RESOLUCIÓN DECANAL N° 206-2012-FCB-UNAP; realizó la evaluación del desempeño del bachiller, considerando los criterios y el puntaje consignados en la tabla de valoración.

Culminado el acto, el Jurado Calificador y Dictaminador, con el puntaje alcanzado por el bachiller y, aplicando los términos establecidos en la tabla de calificación; dio como veredicto: APROBAR LA SUSTENTACIÓN DE LA TESIS, **CALIFICADA COMO BUENA**; quedando en consecuencia el candidato apto para ejercer la profesión de Biólogo Acuicultor, previo otorgamiento del Título Profesional por la autoridad universitaria competente y, su correspondiente inscripción al Colegio de Biólogos del Perú.

Finalmente, el Presidente del Jurado Calificador y Dictaminador levantó la sesión siendo las 12:50 horas y en fe de lo cual, todos los integrantes suscriben la presente Acta de Sustentación por triplicado.

  
**Adriana del Pilar Burga Cabrera**  
PRESIDENTE

  
**Rossana Cubas Guerra**  
MIEMBRO

  
**Luz Esther Vela Guerra**  
MIEMBRO

Dirección: Plaza Serafín Filomeno S/N, Iquitos, Perú  
Teléfono: 236121

[www.unapiquitos.edu.pe](http://www.unapiquitos.edu.pe)  
e-mail: [fccbb@unapiquitos.edu.pe](mailto:fccbb@unapiquitos.edu.pe)



ACTA DE SUBSTANTIACIÓN DE TESIS  
Fecha: 17 de abril de 2015



*Javier Souza Tecco*  
**Bigo. Javier Souza Tecco M.Sc.**  
**SECRETARIO ACADEMICO**



*Rosana Céspedes*  
**Rosana Céspedes**  
**MEMBRAS**



En la ciudad de Quito, a los diecisiete (17) días del mes de abril de 2015, se reunió en la Auditorio de las Escuelas de Formación Profesional de Acuicultura, la Junta Calificadora de Tesis que se conforma con los señores: **Bigo. Javier Souza Tecco M.Sc.** Secretario Académico y **Rosana Céspedes** Miembro. Se examinó y calificó la sustentación y defensa de la tesis de grado de **LA SUSTENTACIÓN DE LA TESIS CALIFICADA COMO: "EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE LOS PRODUCTOS ANTIBIÓTICOS EN CONDICIONES DE LABORATORIO"**, realizada por el bachiller **YANISER VILLALBA** de la Escuela de Formación Profesional de Acuicultura. El resultado de la sustentación y defensa de la tesis es el siguiente: **APROBADO**. Durante todo el desarrollo de la sustentación y defensa de la tesis, el Jurado Calificador y el Dictaminador, considerando lo establecido en el nuevo Reglamento de la Ley Orgánica de Educación Superior, se procedió a la evolución del desarrollo del bachiller, considerando los criterios y el puntaje asignados en la tabla de valoración.

Quinto el acto, el Jurado Calificador y Dictaminador, con el puntaje alcanzado por el bachiller y de acuerdo a los términos establecidos en la tabla de calificación, se le otorga el título de **LA SUSTENTACIÓN DE LA TESIS CALIFICADA COMO: "EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE LOS PRODUCTOS ANTIBIÓTICOS EN CONDICIONES DE LABORATORIO"**, quedando en consecuencia el candidato apto para optar al título de **Bachiller en Acuicultura**, previo otorgamiento del Título Profesional por la universidad competente y su correspondiente inscripción al Colegio de Biólogos del Perú.

Finalmente, el Presidente del Jurado Calificador y Dictaminador levanta la sesión a las **12:00** horas y en fe de lo cual, todas las integrantes suscriben la presente Acta de Substanciación por triplicado.

*Javier Souza Tecco*  
**Javier Souza Tecco**  
**Presidente del Jurado Calificador**

*Rosana Céspedes*  
**Rosana Céspedes**  
**Miembro**

*Rosana Céspedes*  
**Rosana Céspedes**  
**Miembro**

## **DEDICATORIA**

### **A mi madre Pilar.**

Por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos y la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor.

### **A mi padre Herminio.**

Por los ejemplos de perseverancia y constancia que lo caracterizan y que me ha infundado siempre, por el valor mostrado para salir adelante y por su amor.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP) por el apoyo recibido a través del Programa de Conservación y Uso del Agua y sus Recursos (AQUAREC).

A mi asesora, Blga. Rosa Angélica Ismiño Orbe, M.Sc. Investigadora del IIAP, por brindarme su amistad y los conocimientos que fueron la base para el desarrollo de la presente tesis, mil gracias.

A mi asesor, Blgo. Enrique Ríos Isern, Dr. catedrático de la Universidad de la Amazonía Peruana (UNAP), por brindarme su amistad y su valiosa contribución en la elaboración del presente informe.

Al Blgo. Fred Willian Choo Koo Dr. Jefe del Laboratorio de Bromatología y Limnología, por brindarme los equipos para la medición de los parámetros de la calidad de los medios de cultivo.

A todas las personas que me brindaron su apoyo en las diferentes etapas de la presente Tesis, mis más sinceros agradecimientos, mil gracias.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

PORTADA.....	i
JURADO CALIFICADOR Y DICTAMINADOR .....	ii
ASESORES .....	iii
ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS .....	iv
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTOS .....	vi
ÍNDICE DE CONTENIDOS .....	vii
ÍNDICE DE TABLAS .....	x
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xi
ÍNDICE DE FOTOS.....	xiii
RESUMEN .....	xiv
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA .....	3
2.1. Generalidades de las microalgas .....	3
2.2. Generalidades del género <i>Scenedesmus</i> .....	4
2.3. Técnicas de aislamiento y cultivo de microalgas .....	7
2.4. Sistemas de cultivo de microalgas .....	7
2.5. Medios alternativos para el cultivo de microalgas .....	8
2.6. Condiciones de cultivo de microalgas .....	9
2.6.1. Intensidad de luz .....	10
2.6.2. Temperatura.....	10
2.6.3. Potencial de hidrógeno (pH).....	10
2.7. Variación morfológica de <i>Scenedesmus</i> .....	11
2.8. Experiencias en el cultivo de <i>Scenedesmus</i> .....	12
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
3.1. Área de trabajo .....	13
3.2. Aislamiento de la microalga.....	13
3.2.1. Colecta de muestras .....	13
3.2.2. Selección y adaptación de muestras.....	14
3.2.3. Determinación taxonómica.....	15



3.2.4.	Establecimiento de las condiciones de cultivo .....	15
3.2.5.	Medios cultivo .....	16
3.2.6.	Desinfección y esterilización de los materiales de laboratorio .....	17
3.2.7.	Aislamiento y obtención de cepas .....	17
3.2.7.1.	Técnica de la pipeta Capilar .....	17
3.2.7.2.	Técnica siembra en medio sólido.....	18
3.2.7.3.	Obtención y mantenimiento de cepas .....	19
3.3.	Medición de la densidad celular .....	20
3.3.1.	Diseño experimental .....	20
3.3.2.	Medición del crecimiento celular .....	22
3.3.2.1.	Conteo celular.....	22
3.3.2.2.	Cálculo de la densidad celular .....	23
3.3.2.3.	Cálculo de las tasas de crecimiento celular .....	23
3.4.	Evaluación de la variación morfológica.....	24
3.4.1.	Evaluación del polimorfismo.....	24
3.4.2.	Medición del tamaño de la microalga.....	25
3.5.	Medición de los parámetros físicos y químicos .....	25
3.6.	Análisis estadístico .....	27
IV.	RESULTADOS .....	28
4.1.	Características de la muestra colectada.....	28
4.2.	Características de la microalga aislada .....	28
4.3.	Eficiencia del fertilizante en el aislamiento .....	29
4.4.	Primer experimento .....	30
4.4.1.	Crecimiento celular de la microalga .....	30
4.4.1.1.	Densidad de la microalga .....	30
4.4.1.2.	Tasas de crecimiento celular .....	33
4.4.2.	Formas de la microalga.....	37
4.4.2.1.	Polimorfismo de la microalga .....	37
4.4.2.2.	Tamaño de la microalga .....	38
4.4.3.	Parámetros fisicoquímicos del medio.....	39
4.4.3.1.	Temperatura .....	39

4.4.3.2. Potencial de hidrógeno (pH) .....	39
4.4.3.3. Oxígeno disuelto, alcalinidad y nitrito.....	40
4.4.4. Pérdida del medio de cultivo .....	41
4.4.5. Segundo experimento .....	41
4.4.5.1. Densidad de la microalga .....	41
4.4.6. Parámetros físicos y químicos del medio de cultivo .....	42
4.4.6.1. Temperatura .....	42
4.4.6.2. Potencial de Hidrógeno (pH).....	43
4.4.6.3. Oxígeno Disuelto (OD).....	44
4.4.7. Relación entre la densidad celular y parámetros fisicoquímicos ....	46
4.4.7.1. Relación densidad poblacional – pH.....	46
4.4.7.2. Relación densidad celular – concentración de oxígeno disuelto	47
4.4.8. Costo del fertilizante foliar en el cultivo de la microalga.....	49
V. DISCUSIÓN.....	50
VI. CONCLUSIONES .....	54
VII. RECOMENDACIONES.....	55
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	56

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Esquema de clasificación de los diferentes grupos algales .....	3
<b>Tabla 2.</b> Composición del medio modificado Chu #10.....	16
<b>Tabla 3.</b> Composición del fertilizante foliar 11N8P6K.....	17
<b>Tabla 4.</b> Concentraciones de nitrógeno, fósforo y potasio de los cuatro tratamientos del fertilizante foliar 11N8P6K. ....	21
<b>Tabla 5.</b> Densidad de <i>Scenedesmus acutus</i> en los cuatro tratamientos del fertilizante foliar 11N8P6K, primer experimento. ....	31
<b>Tabla 6.</b> Análisis de varianza de la densidad de <i>Scenedesmus acutus</i> en la fase de crecimiento exponencial, primer experimento .....	33
<b>Tabla 7.</b> Análisis de varianza de la tasa de crecimiento específico de <i>Scenedesmus acutus</i> en la fase exponencial de crecimiento, primer experimento. ....	33
<b>Tabla 8.</b> Análisis de varianza de la tasa de duplicación de <i>Scenedesmus acutus</i> en la fase exponencial de crecimiento, primer experimento.....	33
<b>Tabla 9.</b> Análisis de varianza del tiempo de duplicación de <i>Scenedesmus acutus</i> en la fase exponencial de crecimiento, primer experimento.....	34
<b>Tabla 10.</b> Media y desviación estándar (S) del largo (TL) y ancho (TA) de las células de <i>Scenedesmus acutus</i> en los tratamientos del fertilizante foliar 11N8P6K, primer experimento.....	38
<b>Tabla 11.</b> Registros del potencial hidrógeno (pH) en los tratamientos del fertilizante foliar 11N8P6K, primer experimento.....	39
<b>Tabla 12.</b> Parámetros físicos y químicos de los tratamientos del fertilizante foliar 11N8P6K, primer experimento. ....	41
<b>Tabla 13.</b> Densidad de <i>Scenedesmus acutus</i> en los cuatro tratamientos del fertilizante foliar 11N8P6K, segundo experimento. ....	42
<b>Tabla 14.</b> Potencial de hidrógeno (pH) en los cuatro tratamientos del fertilizante foliar 11N8P6K, segundo experimento. ....	44
<b>Tabla 15.</b> Concentraciones de oxígeno disuelto ( $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) en los tratamientos del fertilizante foliar 11N8P6K, segundo experimento.....	45

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Distribución de las unidades experimentales según el diseño completamente al azar (DCA).....	20
<b>Figura 2.</b> Curvas de densidad celular de <i>Scenedesmus acutus</i> (células·ml <sup>-1</sup> ) en los cuatro tratamientos del fertilizante foliar 11N8P6K.....	31
<b>Figura 3.</b> Relación entre densidad celular y los tratamientos del fertilizante foliar 11N8P6K, primer experimento .....	32
<b>Figura 4.</b> Relación entre la densidad celular y los tratamientos del fertilizante foliar 11N8P6K, primer experimento .....	32
<b>Figura 5.</b> Tasa de crecimiento específico de <i>Scenedesmus acutus</i> en los tratamientos del fertilizante foliar 11N8P6K, primer experimento.....	34
<b>Figura 6.</b> Relación entre la tasa de crecimiento específico y los tratamientos del fertilizante foliar 11N8P6K, primer experimento. ....	35
<b>Figura 7.</b> Tasa de duplicación de <i>Scenedesmus acutus</i> en los tratamientos del fertilizante foliar 11N8P6K, primer experimento. ....	36
<b>Figura 8.</b> Relación entre la tasa diaria de duplicación y los tratamientos del fertilizante foliar 11N8P6K, primer experimento.....	36
<b>Figura 9.</b> Tiempo de duplicación de <i>Scenedesmus acutus</i> en los tratamientos del fertilizante foliar 11N8P6K, primer experimento.....	36
<b>Figura 10.</b> Relación entre el tiempo de duplicación de <i>Scenedesmus acutus</i> y los tratamientos del fertilizante foliar 11N8P6K, primer experimento. ....	37
<b>Figura 11.</b> Variación del largo (TL) y ancho (TA) de <i>Scenedesmus acutus</i> en los cuatro tratamientos del fertilizante foliar 11N8P6K, segundo experimento. ....	38
<b>Figura 12.</b> Media y desviación estándar del pH en horas de la mañana (TA) y tarde (TB) en los tratamientos del fertilizante foliar, primer experimento. .	40
<b>Figura 13.</b> Curvas de densidad de <i>Scenedesmus acutus</i> en los cuatro tratamientos del fertilizante foliar 11N8P6K, segundo experimento.....	42
<b>Figura 14.</b> Registros medios de temperatura utilizados en el cultivo de la microalga <i>Scenedesmus acutus</i> , segundo experimento.....	43

<b>Figura 15.</b> Potencial de hidrógeno (pH) de los cuatro tratamientos del fertilizante foliar 11N8P6K, segundo experimento. ....	44
<b>Figura 16.</b> Concentraciones de oxígeno disuelto en los tratamientos del fertilizante foliar 11N8P6K, segundo experimento. ....	45
<b>Figura 17.</b> Relación densidad celular - pH del primer tratamiento, segundo experimento. ....	46
<b>Figura 18.</b> Relación densidad celular - pH del segundo tratamiento, segundo experimento. ....	46
<b>Figura 19.</b> Relación densidad celular - pH del tercer tratamiento, segundo experimento. ....	47
<b>Figura 20.</b> Relación densidad celular - pH del cuarto tratamiento, segundo experimento. ....	47
<b>Figura 21.</b> Relación densidad celular - oxígeno disuelto del primer tratamiento, segundo experimento.....	48
<b>Figura 22.</b> Relación densidad celular - oxígeno disuelto del segundo tratamiento, segundo experimento.....	48
<b>Figura 23.</b> Relación densidad celular - oxígeno disuelto del tercer tratamiento, segundo experimento.....	49
<b>Figura 24.</b> Relación densidad celular - oxígeno disuelto del cuarto tratamiento, segundo experimento.....	49

## ÍNDICE DE FOTOS

<b>Foto 1.</b> Cenobios de algunas especies del género <i>Scenedesmus</i> (400x) en ambientes naturales.....	5
<b>Foto 2.</b> Vista frontal de las instalaciones del Centro de Investigaciones Fernando Alcántara Bocanegra – IIAP.....	13
<b>Foto 3.</b> Colecta de muestra de un estanque piscícola del IIAP – Quistococha.....	14
<b>Foto 4.</b> Tubos de ensayo conteniendo 10 ml de cultivo.....	19
<b>Foto 5.</b> Cultivo experimental de la microalga <i>Scenedesmus acutus</i> .....	22
<b>Foto 6.</b> Medición de los parámetros físicos y químicos en el primer experimento.....	26
<b>Foto 7.</b> Medición de los parámetros físicos y químicos en el segundo experimento.....	26
<b>Foto 8.</b> <i>Scenedesmus acutus</i> de una muestra natural.....	29
<b>Foto 9.</b> <i>Scenedesmus acutus</i> expuesto a las condiciones de cultivo en el presente estudio.....	29
<b>Foto 10.</b> Células libres de <i>Scenedesmus acutus</i> en cultivo experimental. ..	37

## RESUMEN

El objetivo del estudio fue evaluar el uso del fertilizante foliar 11N8P6K en el aislamiento y cultivo de *Scenedesmus sp.* (Meyen, 1829) (Chlorophyta: Scenedesmaceae) en condiciones de laboratorio. Los experimentos se realizaron en el laboratorio de cultivos auxiliares del IIAP. Para aislar a la microalga presente en una muestra de agua natural se utilizó una pipeta capilar y como fuente de nutrientes al medio Chu #10 y el fertilizante foliar en las concentraciones de 0.5, 1, 1.5 y 2 ml·l<sup>-1</sup>. Luego, cada concentración del fertilizante fue asignado a un tratamiento de 100 ml con tres repeticiones, los cuales fueron asignados aleatoriamente a doce matraces de 125 ml utilizados como unidades experimentales. Se determinó que la segunda concentración del fertilizante permitió el aislamiento de *Scenedesmus acutus*, que cambió de forma colonial a unicelular en respuesta al medio y las condiciones de cultivo. Luego, se estimó que el mayor crecimiento poblacional ( $46.56 \times 10^4$  células·ml<sup>-1</sup>) fue obtenido con la menor concentración. Los resultados nos muestran que el fertilizante foliar puede ser utilizado en el aislamiento y cultivo de *Scenedesmus acutus*, para producir alimento vivo de peces tropicales.

**Palabras claves:** aislamiento, alimento vivo, medio de cultivo, microalgas, *Scenedesmus acutus*.

## I. INTRODUCCIÓN

Las microalgas cumplen un rol importante en la alimentación de los primeros estadíos de peces, crustaceos y moluscos producidos en acuicultura (1). Sin embargo, este proceso es una etapa crítica en el ciclo de producción de peces amazónicos, debido a la baja sobrevivencia de las postlarvas de especies como *Colossoma macropomum* (gamitana), *Piaractus brachypomus* (paco) y *Prochilodus nigricans* (boquichico) (2).

La baja sobrevivencia de las postlavas ha sido asociada con la producción de microalgas en estanques abiertos, una práctica común en los centros de producción de peces tropicales, debido a la ausencia de control sobre las especies, las condiciones ambientales, la presencia de predadores y organismos infecciosos (1,3). Sin embargo, éstos factores pueden ser controlados en condiciones de laboratorio, donde la producción mejora significativamente, pero con una dependencia por los medios inorgánicos que están compuestos de sales minerales que tienen alto costo (4), limitando su uso en los procesos de aislamiento y cultivo de pequeño volumen.

Ante la dependencia por los medios inorgánicos, se han desarrollado diferentes medios alternativos que han sido utilizados en el cultivo masivo de microalgas. Entre éstos se encuentran los fertilizantes agrícolas, diversas harinas, fermentos, ensilados y subproductos de otras industrias (5–10).

Entre los fertilizantes agrícolas más importantes se encuentran los fertilizantes foliares, debido a su composición definida de nutrientes y vitaminas del complejo B, de fácil absorción y pH moderado. Asimismo,



existen antecedentes de su uso en el cultivo masivo de las microalgas *Ankistrodesmus gracilis* (11) y *Monoraphidium sp.* (12).

La eficiencia de los fertilizantes foliares puede ser mayor si es utilizada en el cultivo de microalgas con una gran adaptabilidad e importancia económica. Las microalgas del género *Scenedesmus* pueden incluirse a este grupo, debido a su alto contenido de nutrientes (13), rápido crecimiento, resistencia a los procedimientos de aislamiento (5,14) y capacidad para colonizar casi cualquier cuerpo de agua, como el río Amazonas y ambientes donde otras microalgas no pueden crecer (15).

La gran adaptabilidad de las especies de *Scenedesmus* para crecer en un amplio rango de gradientes ambientales, suele relacionarse con la forma de sus células y cenobios, el cual varía en respuesta a la composición del medio de cultivo, los factores ambientales y la presencia de predadores (16).

Ante lo expuesto, el presente estudio tuvo como objetivo general evaluar el uso del fertilizante foliar 11N8P6K en el aislamiento y cultivo de *Scenedesmus sp.* (Meyen, 1829) (Chlorophyta: Scenedesmacea) en condiciones de laboratorio, y como objetivos específicos a) evaluar cuatro concentraciones del fertilizante foliar 11N8P6K: 0,5; 1; 1,5 y 2·ml·l<sup>-1</sup>, en el aislamiento de una microalga del género *Scenedesmus* a partir de una muestra natural, b) determinar la concentración más eficiente del fertilizante foliar que promueva las mayores densidades celulares de la microalga y c) evaluar las variaciones morfológicas de la microalga en respuesta a los factores físicos y químicos de los cuatro concentraciones del fertilizante foliar.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Generalidades de las microalgas

Las microalgas son un grupo diverso de organismos con poca o ausente diferenciación celular, de tamaño variado (de 5 a 50  $\mu$ ) y diversos niveles de organización unicelular y colonial. Asimismo, la mayoría son eucariotas, con cromoplastos que varían en forma, número y posición, mientras que un pequeño grupo son procariotas, desprovistos de cromoplastos (15,17,18).

Las microalgas procariotas incluyen a las divisiones Cyanophyta y Prochlorophyta, mientras que las eucariotas incluyen a la división Rhodophyta, Heterokontophyta, Haptophyta, Cryptophyta, Dinophyta, Euglenophyta, Chlorarachniophyta y Chlorophyta (15,17).

**Tabla 1.** Esquema de clasificación de los diferentes grupos algales.

Reino	División	Clase
Eubacteria procariota	Cyanophyta	Cyanophyceae
	Prochlorophyta	Prochlorophyceae
Eukaryota	Glaucophyta	Glaucophyceae
	Rhodophyta	Bangiophyceae
		Florideophyceae
	Heterokotophyta	Chrysophyceae
		Xanthophyceae
		Eustigmatophyceae
		Bacillariophyceae
		Raphidophyceae
		Dictyochophyceae
	Phaeophyceae	
	Haptophyta	Haptophyceae
	Cryptophyta	Cryptophyceae
	Dinophyta	Dinophyceae
Euglenophyta	Euglenophyceae	
Chlorarachniophyta	Chlorarachniophyceae	
Chlorophyta	Prasinophyceae	

Reino	División	Clase
		Chlorophyceae
		Ulvophyceae
		Cladophorophyceae
		Bryopsidophyceae
		Zygnematophyceae
		Trentepohliophyceae
		Klebsormidiophyceae
		Charophyceae
		Dasycladophyceae

Fuente: Algae: anatomy, biochemistry and biotechnology (19)

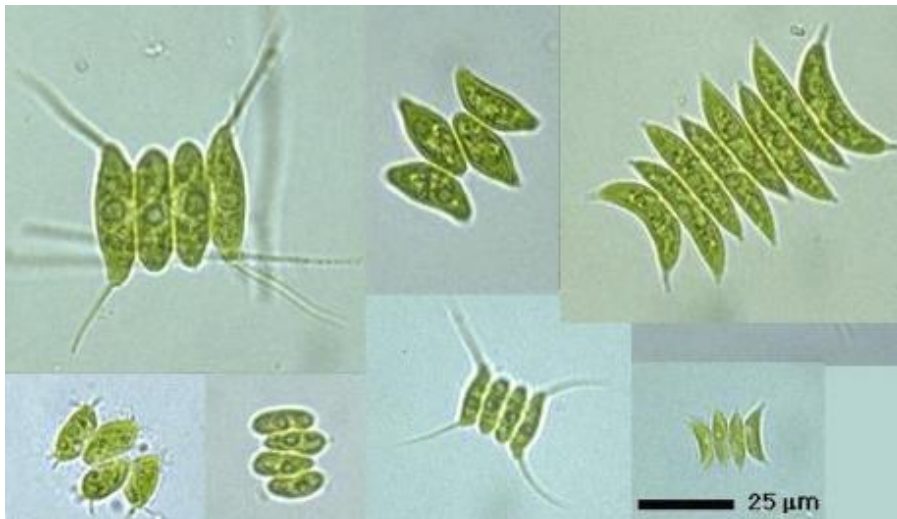
Las microalgas han colonizado casi todos los ambientes acuáticos y terrestres del planeta, sean estos dulceacuícolas o salinos, con un amplio rango de pH, temperatura, turbidez, concentración de oxígeno y dióxido de carbono (19,20). Sin embargo, en condiciones normales estos organismos presentan rápido crecimiento, el cual puede ser hasta tres veces mayor que la presentada por las plantas superiores, debido a su alta capacidad fotosintética y producción homogénea de biomasa (21).

La división Chlorophyta comúnmente conocidas como algas verdes, es el grupo con la mayor diversidad de especies (aproximadamente 4,500), teniendo la mayoría tamaño microscópico y alta diversidad morfológica que ha sido asociada a su gran plasticidad metabólica (18).

## 2.2. Generalidades del género *Scenedesmus*

Las especies de *Scenedesmus* son microalgas verdes que se caracterizan por tener células en forma de uso, esférica y elipsoide, cuyo tamaño varía de 3 a 78  $\mu\text{m}$  de largo y de 2 a 10  $\mu\text{m}$  de ancho. En ambientes naturales, sus

células suelen estar libres o agrupadas en cenobios de 2 a 32 células, siendo común los cenobios de 4 a 8 células dispuestas linealmente o alternadas hasta en tres filas (15,22) (**Foto 1**).



Fuente: <http://protist.i.hosei.ac.jp/taxonomy/Chlorophyta/Genus/Scenedesmus/index.html>

**Foto 1.** Cenobios de algunas especies del género *Scenedesmus* (400x) en ambientes naturales.

La mayoría de especies se reproducen a través de la formación de autocenobios. Es decir, mediante la división de una célula madre en un número definido de células hijas no flageladas, las cuales quedan libres después de la ruptura de la pared celular. Posteriormente, las células hijas crecen y adquieren la forma típica y la ornamentación de la célula madre. Esta modalidad de reproducción ha otorgado a las especies de este género la gran capacidad para colonizar diferentes ambientes de agua dulce, donde han sido descritas más de 100 especies (15).

En el río Amazonas y sus tributarios han sido descritas las especies *Scenedesmus ellipsopideus*, *Sc. inigsis*, *Sc. javanensis*, *Sc. longispana*, *Sc. obliquus*, *Sc. serratus*, y *Sc. westii*, *Sc. maximus*, *Sc. perforatus*, *Sc. acuminatus*, *Sc. aldavei*, *Sc. arcuatus*, *Sc. bijuga*, *Sc. bijuga* var. *alternans*, *Sc. opoliensis*, *Sc. quadricauda* y *Sc. ecornis* (23–27).

Clasificación taxonómica del género *Scenedesmus* (15).

---

Reino: *Plantae*

División: *Chlorophyta*

Clase: *Chlorophyceae*

Orden: *Chlorococcales*

Familia: *Scenedesmaceae*

Género: *Scenedesmus*

---

La mayoría de especies cultivadas tienen concentraciones apreciables de proteína bruta (25% a 35%), vitaminas, antioxidantes y ácidos grasos (omega 3 y 6), por ello han sido utilizadas en la alimentación de las postlarvas de peces o como insumo para mejorar la calidad nutricional de los alimentos convencionales (13). También han sido utilizados en la producción de hidrógeno molecular (28), sustancias bioactivas (29) y energía, debido a que pueden producir lípidos en cantidades similares a las plantas superiores utilizadas en la producción biocombustible (5).

### **2.3. Técnicas de aislamiento y cultivo de microalgas**

Son muchas las técnicas que han sido desarrolladas para el aislamiento de diferentes especies de microalgas. Existen técnicas de fácil aplicación para el aislamiento de especies resistentes y técnicas específicas para aislar especies provenientes de ambientes extremos, los cuales, en muchos casos son incapaces de crecer en condiciones ambientales normales (30,31).

Entre las técnicas más usadas para el aislamiento de microalgas se encuentran la pipeta capilar y siembra en medio sólido. La primera ha sido utilizada en el aislamiento de una gran variedad de especies (14,32). Entre las que se encuentran *Scenedesmus quadricauda*, *Scenedesmus dimorphus*, *Ankistrodesmus falcatus*, *Ankistrodesmus spiralis*, *Selenastrum sp.* (14), *Thalassiosira subtilis*, *Skeletonema costatum*, *Chaetoceros affinis* (33) y *Dunaliella salina* (34). Sin embargo, el éxito de esta técnica depende de la habilidad del operador, la adaptabilidad de la microalga a las condiciones del cultivo (35), el conocimiento taxonómico de la especie y los factores ambientales del medio natural (32).

### **2.4. Sistemas de cultivo de microalgas**

Las microalgas son indispensables en la nutrición de las postlarvas de peces y los primeros estadíos de moluscos y camarones producidos en ambientes controlados (36). También han sido utilizadas en la alimentación de estadíos adultos de peces planctófagos (1).

La eficiencia nutricional de las microalgas depende de la calidad del medio y las condiciones de cultivo (37), las cuales se relacionan con el tipo de sistema (5). Por ejemplo, en un sistema abierto, el cultivo se encuentra expuesto tanto al ingreso de microalgas competidoras, organismos infecciosos y predadores, como a la variación de los factores ambientales como la temperatura, la composición heterogénea del medio y la limitación de luz en los estratos inferiores (11,38,39). Cabe mencionar que en este sistema existe una baja sobrevivencia de las postlarvas, pero debido a su fácil implementación es la más practicada en los centros de producción de peces amazónicos como “gamitana”, *Colossoma macropomum*; “paco”, *Piaractus brachypomus*; “boquichico”, *Prochilodus nigricans* y “doncella”, *Pseudoplatystoma fasciatum* (2).

Las deficiencias de los sistemas abiertos suelen corregirse con los sistemas cerrados, ya que en estos se suele aislar al cultivo y se tiene control sobre los factores biológicos, ambientales y nutricionales del medio, permitiendo desarrollar niveles de producción intensiva y masiva (11,38).

## **2.5. Medios alternativos para el cultivo de microalgas**

Los medios utilizados para el aislamiento y cultivo de las microalgas de agua dulce derivan de fórmulas previas, las cuales fueron establecidas después de conocer los requerimientos nutricionales de las microalgas (40). Por lo general, estos medios tienen naturaleza inorgánica y su uso incrementa el costo de producción en los sistemas cerrados (5).

Para disminuir los costos de producción se han evaluado otras fuentes nutritivas, como los medios elaborados con harina de pescado, melaza de caña, azúcar rubia (7), aceite de oliva (Alpechín) (6), bioabono líquido (8), ensilado biológico de pescado (9), EM-Bokashi (10) y fertilizantes agrícolas (12).

Entre los fertilizantes agrícolas, los utilizados para la nutrición foliar tienen mayor potencial, debido a su composición definida de macronutrientes, micronutrientes y vitaminas del complejo B, que proporcionan pH moderado al medio y son de fácil absorción por las plantas. Estos fertilizantes son conocidos como fertilizantes foliares NPK, y vienen en presentaciones de fácil transporte y almacenamiento (41).

Los fertilizantes foliares han sido utilizados para estimular el incremento de la producción primaria en los centros de producción de peces, ya sea en la producción masiva de *Ankistrodesmus gracilis* en tanques y recipientes de polietileno en condiciones de laboratorio (4,11), como en tanques expuestos al ambiente para el cultivo masivo de *Monoraphidium sp.* (12).

## **2.6. Condiciones de cultivo de microalgas**

Un cultivo puede ser definido como un ambiente artificial donde las algas crecen. En teoría, las condiciones de cultivo deben ser similares al ambiente natural, pero en realidad existen diferencias significativas, debido a la



variación de los factores ambientales, como la temperatura, intensidad lumínica y potencial de hidrógeno (11).

### **2.6.1. Intensidad de luz**

Es la energía indispensable para la fotosíntesis y el crecimiento poblacional de las microalgas, y es requerida a una intensidad lumínica similar al ambiente natural (42). En condiciones de laboratorio especies como *Scenedesmus obliquus* requiere de una intensidad lumínica en el rango de 200 a 400  $\mu\text{W}/\text{m}^2$ . Si la intensidad es mayor a este rango se inhibe la producción de oxígeno, y si es menor se reduce el crecimiento (5).

### **2.6.2. Temperatura**

La temperatura es un elemento ambiental de importancia para el crecimiento y composición química de las microalgas del género *Scenedesmus*, las cuales, están adaptadas para desarrollarse en un rango de temperatura que varía de 20 a 40°C (9) y 15 a 36°C (43).

### **2.6.3. Potencial de hidrógeno (pH)**

El pH del medio depende de la concentración de  $\text{CO}_2$  y la actividad fotosintética de la microalga. Sin embargo, el incremento del pH inhibe la capacidad asimilación del  $\text{CO}_2$  ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ), minerales y las moléculas de amonio. Asimismo, el nivel óptimo de pH para el crecimiento

de las microalgas del género *Scenedesmus* varia de 5.5 a 8, pero pueden crecer fuera de este rango, cuando el nivel suele ser letal para otras especies de microalgas (44).

## **2.7. Variación morfológica de *Scenedesmus***

Bajo condiciones ambientales fluctuantes tanto al interior como al exterior de las células, las especies de *Scenedesmus sp.* cambian su forma buscando una manera de adaptarse a las condiciones de cultivo, como la temperatura o intensidad lumínica (45). En especial, especies como *Scenedesmus acutus* suelen adoptar forma unicelular ante la ausencia de predadores zooplanctónicos (Cladóceros, Copépodos y Rotíferos) en el medio de cultivo, mientras que su inclusión influye en la formación de cenobios en el periodo de 48 horas (16).

La morfología de *Scenedesmus sp.* varía de acuerdo a la composición del medio de cultivo. Así, las células cultivadas en el medio Estándar 1 son alargadas o redondas, y se agrupan para formar cenobios de 1 y 4 células. En el medio Estándar 2, las células son redondas y presentan lados puntiagudos, y cuando forman cenobios las células están separadas. Por otro lado, las células en el medio Algal son semiesféricas y no tienen apéndices, pero forman cenobios a partir de la unión del extremo de sus células (13).

El medio y condiciones de cultivo también tienen influencia sobre la variación del tamaño de las microalgas. Especies como *Scenedesmus acutus var.*

*globosus* presentó células que variaron de tamaño cuando fueron expuestas a temperaturas de 30 a 40 °C e intensidad luminosa de 27.05 a 44.09  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$  (45).

## **2.8. Experiencias en el cultivo de *Scenedesmus***

El uso del Medio Bold Basal (BBM) estimuló el mayor crecimiento de *Scenedesmus acutus* ( $5,000\ 000\ \text{células}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), respecto a lo obtenido en el mismo medio cuando fue modificado. En este último, el crecimiento de la microalga fue mayor cuando el medio tuvo una concentración de 0.4% de nitrógeno y fue menor cuando su concentración fue mayor (1 y 3%) o estuvo ausente (44).

Otro estudio determinó que la producción de *Scenedesmus sp.* en tres medios de cultivo (Estándar 1, Estándar 2 y Algal) presentó diferencias tanto cuantitativas como cualitativas. Es decir, la mayor producción de biomasa ( $0.41\ \text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) fue mayor en el medio Estándar 2, mientras que la mayor concentración de proteína total (35.18%) estuvo presente en la biomasa producida con el medio Algal (13).

Otro estudio determinó que la producción de *Scenedesmus obliquus* en un medio de cultivo de naturaleza orgánica (agar extracto de suelo) presentó biomásas de 24.7 a 72.7  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , los cuales fueron menores a las 34.6 y 85  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  obtenidos con un medio de cultivo inorgánico (albañal sintético) (46).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS.**

#### **3.1. Área de trabajo**

Las actividades fueron realizadas en el laboratorio de Cultivos Auxiliares del Centro de Investigación Fernando Alcántara Bocanegra (CIFAB), del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP). Ubicada geográficamente en las coordenadas zona 18M 068650 – 9577845, Km. 4.5 de la carretera Iquitos – Nauta, distrito de San Juan Bautista, provincia de Maynas – Loreto. Entre el 7 de julio del 2010 al 16 marzo del 2011 (**Foto 2**).



**Foto 2.** Vista frontal de las instalaciones del Centro de Investigaciones Fernando Alcántara Bocanegra – IIAP.

#### **3.2. Aislamiento de la microalga**

##### **3.2.1. Colecta de muestras**

Las muestras fueron colectadas de estanques piscícolas con agua verde, el cual, es un indicador de alta productividad fitoplanctónica. La colecta

consistió en el tamizado de 20 l de agua con las mallas planctónicas de 75  $\mu\text{m}$  y 45  $\mu\text{m}$ , para retirar a los organismos zooplanctónicos. Posteriormente, 100 ml de esta muestra fue vertida en un recipiente colector de 200 ml, para transportarlas al laboratorio de cultivos auxiliares del IIAP (32).



**Foto 3.** Colecta de muestra de un estanque piscícola del IIAP – Quistococha.

### **3.2.2. Selección y adaptación de muestras**

En el laboratorio de cultivos auxiliares se vertió una gota de cada muestra sobre una lámina portaobjetos, y luego de cubrirla con una lámina cubreobjetos se procedió a observarla a través de un microscopio binocular de marca Nikon, modelo Alphaphot YS2-T (ML), con un aumento de 100 veces su tamaño natural. Al confirmarse la presencia de *Scenedesmus* se procedió a tamizar 30 ml de la muestra con una red planctónica de 20  $\mu\text{m}$ . La muestra resultante fue vertida en un matraz de 100 ml con 20 ml del fertilizante foliar a una concentración de 1  $\text{ml}\cdot\text{l}^{-1}$ . Por último, a cada matraz

se le colocó tapa de algodón y se la expuso a las condiciones de cultivo, como parte del proceso de adaptación.

### **3.2.3. Determinación taxonómica**

La determinación de la especie de *Scenedesmus* se hizo a través de la clasificación artificial, el cual consistió en la diferenciación de las características morfológicas externas. Ésta descripción se hizo a partir de las células presentes tanto en las muestras colectadas, como en los medios de cultivos. La descripción se hizo a través de observaciones realizadas con un microscopio binocular de marca Nikon, modelo Alphaphot YS2-T (ML), con aumentos de 100 a 400 veces, mientras que el reconocimiento del taxón se hizo con las claves taxonómicas de Komárek y Fott (47), Streble & Dieter (48) y Godinho (49).

### **3.2.4. Establecimiento de las condiciones de cultivo**

Las condiciones de cultivo corresponden al ambiente generado en el interior del laboratorio de cultivos auxiliares, donde la temperatura fue proporcionada por dos proyectores de luz, cada una equipada con dos lámparas fluorescentes de 20 Watts. Ambos proyectores emitieron una intensidad lumínica de 3,110 lux durante 12 horas diarias. Para mantener la intensidad lumínica, se realizaron mediciones diarias con un luxómetro DBM 1 300 – WELLEMAN, y para mejorar la exposición homogénea de las células a los rayos de luz se agitó manualmente el cultivo.

### 3.2.5. Medios cultivo

El medio de cultivo Chu #10 fue preparado con soluciones stock de sales minerales en 950 ml de agua destilada (**Tabla 2**). El fertilizante foliar utilizado como medio de cultivo, fue adquirido en solución comercial de un litro, y presenta concentraciones fijas de los macronutrientes nitrógeno, fosforo y potasio (11-8-6), micronutrientes, aminoácidos y vitaminas del complejo B (**Tabla 3**). Éste producto fue fabricado por Agroindustria Grow More, una empresa certificada con Resolución de la SUNAT N° 000-ADS0DT-2013-147702-7.

**Tabla 2.** Composición del medio modificado Chu #10.

Componentes	Solución stock (g · l <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> O)	Cantidad usada	Concentración media (M) final
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	20.0	1 ml	1.22 x 10 <sup>-4</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.5	1 ml	1.44 x 10 <sup>-5</sup>
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	12.5	1 ml	5.07 x 10 <sup>-5</sup>
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	10.0	1 ml	9.43 x 10 <sup>-5</sup>
FeCl <sub>3</sub>	0.4	1 ml	2.47 x 10 <sup>-6</sup>
<b>Solución de metales traza</b>		1 ml	-
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.48	1 ml	4.01 x 10 <sup>-4</sup>
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	1.47	1 ml	8.70 x 10 <sup>-9</sup>
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.23	1 ml	8.00 x 10 <sup>-10</sup>
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.10	1 ml	4.01 x 10 <sup>-10</sup>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.07	1 ml	5.66 x 10 <sup>-11</sup>
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.14	1 ml	4.81 x 10 <sup>-10</sup>
<b>Solución de complejo B</b>		1 ml	-
Complejo B	50 mg		1.48 x 10 <sup>-7</sup>

Fuente: Watanabe (40).

**Tabla 3.** Composición del fertilizante foliar 11N8P6K.

<b>Componente</b>	<b>Concentración</b>	<b>Componente</b>	<b>Concentración</b>
<b>Macroelementos</b>		Manganeso	0.05%
Nitrógeno total	11%	Molibdeno	0.0005%
Fosfato disponible P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	8%	Zinc	0.05%
Potasio soluble K <sub>2</sub> O	6%	<b>Aminoácidos</b>	1.08 mg·kg <sup>-1</sup>
<b>Microelementos</b>		<b>Vitamina B</b>	1.4% mg·kg <sup>-1</sup>
Boro	0.01%	<b>Fitohormonas</b>	
Cobalto	0.0005%	Giberelinas	0.88 mg·kg <sup>-1</sup>
Cobre	0.05%	Auxina	0.56 mg·kg <sup>-1</sup>
Hierro	0.10%	Citoquinina	0.4 mg·kg <sup>-1</sup>

Fuente: Etiqueta del producto, por Grow More, Marzo del 2009.

### **3.2.6. Desinfección y esterilización de los materiales de laboratorio**

Los materiales de vidrio y los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave, por un periodo de 15 minutos, a 121 °C y 15 libras de presión, mientras que los materiales de plástico fueron desinfectados con lejía comercial (hipoclorito de sodio al 5%). Algunos procedimientos se hicieron en la proximidad de la llama de un mechero de Bunsen, para evitar la contaminación durante la siembra de las cepas y medio de cultivo.

### **3.2.7. Aislamiento y obtención de cepas**

#### **3.2.7.1. Técnica de la pipeta Capilar**

Con una pipeta Pasteur de vidrio se vertió una gota de la muestra adaptada sobre una lámina portaobjetos, para observarlas a través del microscopio a



un aumento de 100X. Si *Scenedesmus* estuvo presente en la muestra se colocó sobre la lámina dos gotas del medio de cultivo ( $1 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Luego, con una pipeta capilar se capturó a una de las células y se la colocó en la gota del medio de cultivo. Este procedimiento se repitió hasta obtener una célula en una gota del medio de cultivo, la misma que posteriormente fue vertida en los vasos de una placa con 0.5 mL del medio Chu #10 y cuatro concentraciones del Fertilizante Foliar 11N8P6K: 0.5, 1.0, 1.5 y  $2 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ .

La placa con las células aisladas fue expuesta a las condiciones de cultivo, para luego ser monitoreada cada 24 horas, durante los siguientes siete días. En este periodo se trató de diferenciar si el medio de cultivo se tornó verde como resultado del crecimiento del número de células de la microalga.

Los medios de cultivo de aquellos vasos que presentaron un incremento en el número de células fueron extraídos con una pipeta de Pasteur, para luego verterlos en un tubo de ensayo conteniendo 10 ml del mismo medio cultivo fresco.

### **3.2.7.2. Técnica siembra en medio sólido**

El medio preparado con  $1 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$  de fertilizante foliar fue solidificado con 20 g de agar-agar en tubos de ensayo inclinados. Luego, en la proximidad de la llama del mechero Bunsen se utilizó un aza de siembra para extraer las células de *Scenedesmus* presentes en los cultivos realizados en tubos de ensayo de 10 ml, para luego esparcirlos en la superficie sólida del medio agarizado en tubos de ensayo de 10 ml, al cual se le colocó una tapa de

algodón y se la expuso a las condiciones de cultivo. Por último, se hizo el monitoreo diario de los tubos de ensayo hasta la aparición de colonias.



**Foto 4.** Tubos de ensayo conteniendo 10 ml de cultivo.

### **3.2.7.3. Obtención y mantenimiento de cepas**

En la proximidad de un mechero de Bunsen se usó un aza de siembra para extraer a las colonias de *Scenedesmus* crecieron en la superficie sólida del medio sólido, para colocarlas en tres tubos de ensayo de 10 ml conteniendo 5 ml de medio de cultivo ( $1 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$  de fertilizante foliar). A los cinco días se vertió 0.5 ml del cultivo a un nuevo tubo de ensayo conteniendo medio de cultivo fresco. Asimismo, este procedimiento se repitió durante todo el experimento.

### 3.3. Medición de la densidad celular

#### 3.3.1. Diseño experimental

A la proximidad de la llama de un mechero de Bunsen se vertió el contenido de un tubo de ensayo conteniendo cultivo stock en un matraz de Erlenmeyer de 150 ml, conteniendo 100 ml de medio de cultivo. A los cinco días de ser expuesta a las condiciones de cultivo, cuando el medio se tornó verde, se extrajo doce muestras de 5 ml, para ser utilizadas como inóculos en los cultivos experimentales.

Los cultivos experimentales fueron realizados en doce matraces de Erlenmeyer de 150 ml, los cuales fueron distribuidos en cuatro tratamientos, con sus respectivas tres réplicas. Cada tratamiento ( $T_n$ ) consistió de 95 ml de cada concentraciones del fertilizante foliar ( $T_1$ :  $0.5 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $T_2$ :  $1 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $T_3$ :  $1.5 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$  y  $T_4$ :  $2 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ ).

Los experimentos fueron realizados aplicándose el diseño completamente al azar (DCA) de las repeticiones o unidades experimentales, dentro de tres columnas con cuatro filas (**Figura 1**).



**Figura 1.** Distribución de las unidades experimentales según el diseño completamente al azar (DCA).

En la **Tabla 4** se muestran las concentraciones de nitrógeno, fósforo y potasio en los cuatro tratamientos del fertilizante foliar NPK, utilizados como medio de cultivo de la microalga aislada.

**Tabla 4.** Concentraciones de nitrógeno, fósforo y potasio de los cuatro tratamientos del fertilizante foliar 11N8P6K.

<b>Tratamiento (T<sub>n</sub>)</b>	<b>Nitrógeno (g·100 ml<sup>-1</sup>)</b>	<b>Fósforo (g·100 ml<sup>-1</sup>)</b>	<b>Potasio (g·100 ml<sup>-1</sup>)</b>
T <sub>1</sub> : 0.5 ml·l <sup>-1</sup>	0.5 x 10 <sup>-4</sup>	0.4 x 10 <sup>-4</sup>	0.3 x 10 <sup>-3</sup>
T <sub>2</sub> : 1.0 ml·l <sup>-1</sup>	1.1 x 10 <sup>-4</sup>	0.8 x 10 <sup>-4</sup>	0.6 x 10 <sup>-3</sup>
T <sub>3</sub> : 1.5 ml·l <sup>-1</sup>	1.65 x 10 <sup>-4</sup>	1.2 x 10 <sup>-4</sup>	0.9 x 10 <sup>-3</sup>
T <sub>4</sub> : 2.0 ml·l <sup>-1</sup>	2.2 x 10 <sup>-4</sup>	1.6 x 10 <sup>-4</sup>	1.2 x 10 <sup>-3</sup>

Fuente: elaboración propia

El cultivo experimental se realizó en dos oportunidades. En el primer experimento se midió el crecimiento poblacional de la microalga (densidad y tasas de crecimiento celular), las variaciones morfológicas, los parámetros fisicoquímicos del medio, la pérdida de medio de cultivo, el tamaño de sus células y la pérdida del medio de cultivo. En el segundo experimento, se midió el crecimiento poblacional (densidad y tasas de crecimiento celular), los parámetros fisicoquímicos del medio, la relación entre la densidad poblacional y los costos del fertilizante foliar en el cultivo experimental de la microalga.



**Foto 5.** Cultivo experimental de la microalga *Scenedesmus acutus*

### **3.3.2. Medición del crecimiento celular**

#### **3.3.2.1. Conteo celular**

Con una pipeta de vidrio se extrajo tres muestras de 0.2 ml de cada unidad experimental, para luego colocarlas en cubetas de 1.5 ml, conteniendo solución formol al 5% de concentración. Posteriormente, se usó una pipeta Pasteur para extraer cuatro muestras de 0.1 ml de cada cubeta, para colocarlas en las dos celdas de la cámara de Neubauer de 0.1 mm de profundidad. Por último, la cámara de conteo fue puesta en el campo de observación de un microscopio compuesto Nikon, modelo YS2-T (ML), para contar las células de *Scenedesmus* presentes en el cuadrante central de la cámara (32,33).

El conteo de las células presentes en cada muestra fueron realizadas en cuatro oportunidades, haciendo un total de 12 conteos por unidad

experimental. Los datos de cada conteo fueron almacenados en una base de datos diseñada en la hoja de cálculo Excel versión 2010.

### 3.3.2.2. Cálculo de la densidad celular

Con los registros de conteo se calculó la densidad celular de la microalga en un mililitro de medio (células·ml<sup>-1</sup>), mediante la siguiente fórmula:

$$D = C \cdot 10^{-4} \cdot \text{ml}^{-1}$$

Dónde: **D** = densidad de cultivo en células·ml<sup>-1</sup> y **C** = Número promedio de células.

### 3.3.2.3. Cálculo de las tasas de crecimiento celular

#### 3.3.2.3.1. Tasa de crecimiento específico ( $\mu$ )

La tasa de crecimiento específico mide el número de generaciones (duplicaciones) que se producen por unidad de tiempo, y representa el balance entre adición por reproducción y pérdidas por mortalidad, siendo calculado mediante la ecuación siguiente:

$$r = \frac{\text{Ln} (N_t/N_0)}{\Delta t}$$

Donde  $\Delta t$  es el espacio del intervalo de tiempo ( $t_t - t_0$ ), **N<sub>0</sub>** es el tamaño de la población al inicio del intervalo de tiempo, y **N<sub>t</sub>** es el tamaño poblacional al final del intervalo de tiempo.

### **3.3.2.3.2. Duplicación diaria (K)**

Se calcula cuando  $r$  es igual a la tasa de crecimiento específico ( $\mu$ ) y la mortalidad ( $m$ ) es cero, y el tiempo ( $t$ ) es expresado en días. Entonces la tasa de crecimiento ( $r$ ) puede ser convertida a duplicaciones por día ( $k$ ), por  $r$  división del logaritmo natural de 2, según la ecuación:

$$k = \mu / 0.6931$$

Dónde  $r$  es la tasa de crecimiento específico y **0.6931** se obtiene del logaritmo natural de 2.

### **3.3.2.3.3. Tiempo de duplicación (T2)**

Es la fracción de tiempo requerido para que la población algal crezca al doble de la cantidad del período precedente, y se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$T2 = 0.6931 / \mu$$

## **3.4. Evaluación de la variación morfológica**

### **3.4.1. Evaluación del polimorfismo**

La evaluación del polimorfismo se realizó según lo descrito por Quevedo *et al.* (13), el cual consiste en la descripción del número y disposición de las células para formar los cenobios. Luego, se cuantifico a cada forma con la cámara de Neubauer y observaciones a través del microscopio.

### **3.4.2. Medición del tamaño de la microalga**

Cuando los cultivos experimentales presentaron microalgas en la fase exponencial de crecimiento, se utilizó una pipeta Pasteur para extraer 0.2 ml de una réplica de cada tratamiento, para luego colocarla en una cubeta de 1 ml con 0.8 ml de medio de cultivo fresco. Posteriormente, se extrajo una gota de cada cubeta, se la colocó sobre una lámina portaobjetos y se la cubrió con una lámina cubre objetos. Por último, la lámina con la gota fue colocada en el campo de observación de un microscopio, para medir el largo y ancho de 30 células de *Scenedesmus*, utilizando una regla micrométrica incorporada al lente ocular del microscopio (51).

### **3.5. Medición de los parámetros físicos y químicos**

El potencial de hidrógeno (pH) y la temperatura fueron medidos con un pH-metro digital - WWT (pH330i) de 0.01 de sensibilidad, mientras que el oxígeno disuelto se midió con un Oxímetro digital (Ysi 55) de 0.01 ppm de sensibilidad. Por otro lado, parámetros como la alcalinidad cálcica y el nitrito fueron medidos con el Kit colorimétrico La Motte.

La medición de los parámetros en el primer cultivo experimental se hizo de una pseudo-replica de 200 ml de cada tratamiento, las cuales compartieron las mismas condiciones de cultivo. La medición consistió en la introducción de los electrodos (pH-metro y Oxímetro) en el interior del matraz (**Foto 6**). En el segundo cultivo experimental se utilizó una jeringa de 20 ml para extraer una muestra 10 ml de la pseudo-repetición, para colocarla en un tubo



de ensayo de 50 ml, evitando la formación de burbujas. Luego, se introdujo los electrodos del pH-metro u Oxímetro en el interior del tubo de ensayo y se colocó una tapa de algodón para evitar el ingreso de aire (**Foto 7**).



**Foto 6.** Medición de los parámetros físicos y químicos en el primer experimento.



**Foto 7.** Medición de los parámetros físicos y químicos en el segundo experimento.

### **3.6. Análisis estadístico**

Los registros de densidad celular, tasas de crecimiento celular y parámetros fisicoquímicos fueron tabulados de cálculo Excel (Microsoft Office 2010). Luego, se utilizó el programa estadístico BioEstat (versión 5.0), para estimar la distribución de los datos.

Si los datos presentaron distribución normal el análisis descriptivo consistió de la estimación de la media y la desviación estándar, pero si presentaron distribución no normal, se procedió a estimar la media y el rango total. En ambos casos, los datos fueron resumidos en tablas y figuras, para una mejor presentación y análisis.

Si los registros de densidad poblacional y las tasas de crecimiento presentaron distribución normal, se procedió a calcular la diferencia entre sus medias con la prueba de análisis de varianza (ANOVA,  $P < 0.05$ ) de una vía para muestras independientes, pero si los datos presentaron distribución no normal, se procedió a estimar la prueba de Kruskal Wallis ( $P < 0.05$ ).

El grado de asociación que pudo presentar la densidad poblacional con los cuatro tratamientos del fertilizante foliar y los parámetros fisicoquímicos, fue estimado a través del índice de correlación de Pearson ( $r$ ), si variables presentaron distribución normal, pero si la distribución no fue normal se estimó el índice de correlación de Spearman ( $r_s$ ).

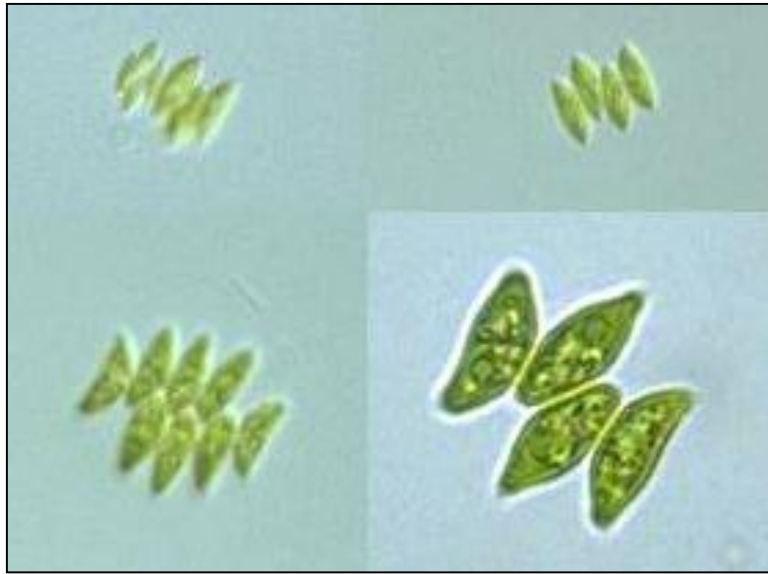
## IV. RESULTADOS

### 4.1. Características de la muestra colectada

La muestra de agua de donde se aisló a la microalga fue extraída del estanque de cultivo de paiche, *Arapaima gigas*. Esta muestra tuvo como población predominante a una microalga del género *Scenedesmus*, y como flora acompañante a *Scenedesmus quadricauda*, *Chlorella sp.*, *Palmella sp.*, *Crucigenia sp.*, *Cosmarium sp.*, y *Ankistrodemus falcatus*.

### 4.2. Características de la microalga aislada

La microalga aislada pertenece a la especie *Scenedesmus acutus* (Meyen, 1829) (**Foto 8 y 9**), el cual se caracterizó por presentar células adultas en forma de uso, no agrupadas en cenobios, y cuya reproducción se dio por división de la célula madre en dos o más células hijas de forma típica y atípica. Las células atípicas fueron de menor tamaño y presentaron de forma variada. Éstas formas fueron el resultado de la división acelerada de las células, el cual inició antes concluir la separación entre células hermanas.



Fuente:<http://protist.i.hosei.ac.jp/taxonomy/Chlorophyta/Genus/Scenedesmus/index.html>

**Foto 8.** *Scenedesmus acutus* de una muestra natural.



**Foto 9.** *Scenedesmus acutus* expuesto a las condiciones de cultivo en el presente estudio.

#### **4.3. Eficiencia del fertilizante en el aislamiento**

El segundo tratamiento del fertilizante foliar ( $1 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ ) promovió un mayor crecimiento de la microalga, el cual se evidenció por la apariencia verde que

adquirió el medio de cultivo y la formación de colonias en el fondo de los vasos de la placa. Éstos cambios fueron poco perceptibles en el menor tratamiento ( $0.5 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ ) e imperceptible en el tercer ( $1.5 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ ) y cuarto tratamiento ( $2 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ ), mientras que en el medio Chu #10 fue perceptible a partir del décimo día.

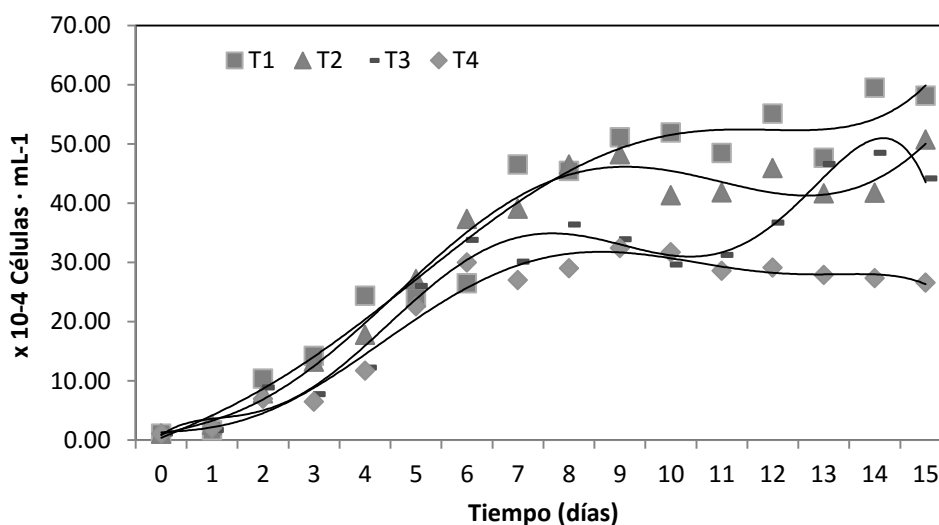
A los cinco días de cultivo, la microalga pudo crecer y formar colonias sobre la superficie del medio sólido ( $1 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Luego, las colonias continuaron dividiéndose hasta formar cultivos en los tubos de ensayo y matraces.

#### **4.4. Primer experimento**

##### **4.4.1. Crecimiento celular de la microalga**

###### **4.4.1.1. Densidad de la microalga**

Las densidades de la microalga acortaron y aumentaron sus diferencias a lo largo de la curva de crecimiento. Por ejemplo, las densidades en los menores tratamientos ( $T_1$  y  $T_2$ ) acortaron sus diferencias en la fase exponencial, a tal punto que coincidieron con un registro de  $46.56 \times 10^{-4}$  células· $\text{ml}^{-1}$ , mientras que los mayores tratamientos ( $T_3$  y  $T_4$ ) presentaron densidades que pudieron diferenciarse entre sí y con los menores tratamientos, al presentar valores de  $33.78 \times 10^{-4}$  y  $30 \times 10^{-4}$  células· $\text{ml}^{-1}$ . Posteriormente, en la fase estacionaria de crecimiento ocurrió una mayor diferenciación entre las densidad de los cuatro tratamientos (**Figura 2, Tabla 5**).



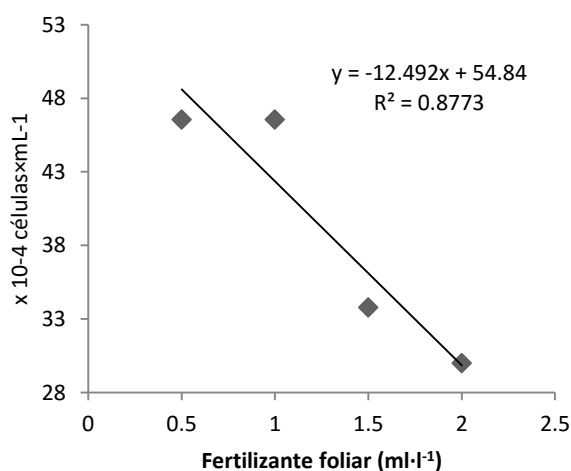
**Figura 2.** Curvas de densidad celular de *Scenedesmus acutus* (células·ml<sup>-1</sup>) en los cuatro tratamientos del fertilizante foliar 11N8P6K

**Tabla 5.** Densidad de *Scenedesmus acutus* en los cuatro tratamientos del fertilizante foliar 11N8P6K, primer experimento.

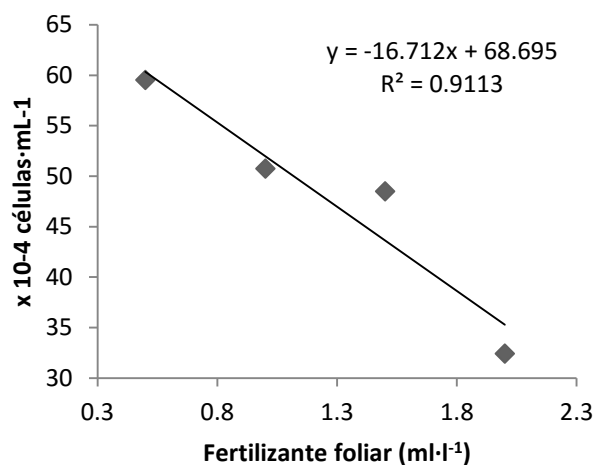
Día	T1: 0.5 ml·l <sup>-1</sup>		T2: 1 ml·l <sup>-1</sup>		T3: 1.5 ml·l <sup>-1</sup>		T4: 2 ml·l <sup>-1</sup>	
	X	S	X	S	X	S	X	S
0	1.09	±0.00	1.09	±0.00	1.09	±0.00	1.09	±0
1	1.70	±0.22	2.60	±0.72	1.70	±0.42	2.05	±0.52
2	10.38	±0.94	7.88	±0.69	8.85	±2.13	6.98	±2.55
3	14.20	±0.43	13.23	±2.80	7.74	±1.09	6.49	±0.33
4	24.41	±2.34	17.81	±1.93	12.21	±1.53	11.72	±3.86
5	24.06	±6.24	27.19	±3.58	26.01	±4.32	22.60	±3.70
6	26.49	±1.05	37.36	±3.31	33.78	±4.67	30.00	±3.33
7	46.56	±25.46	39.08	±3.41	30.14	±5.99	27.01	±1.61
8	45.45	±12.21	46.56	±8.51	36.39	±4.06	29.03	±3.56
9	51.13	±12.94	48.27	±0.74	33.89	±3.84	32.43	±4.55
10	51.93	±19.71	41.35	±2.81	29.62	±8.57	31.74	±5.63
11	48.51	±16.38	41.85	±3.71	31.24	±9.09	28.58	±2.38
12	55.14	±21.80	45.95	±8.94	36.70	±15.43	29.13	±3.46
13	47.70	±15.64	41.67	±12.03	46.62	±9.47	27.90	±4.80
14	59.53	±26.94	41.78	±6.58	48.50	±3.10	27.34	±4.40
15	58.16	±27.99	50.76	±7.03	44.16	±6.65	26.59	±4.75

Media (X) y Desviación estándar (S)

Las mayores densidades de la microalga estuvieron relacionados con el incremento del tratamiento del fertilizante foliar en la fase de crecimiento exponencial ( $r = -0.9366$ ) y estacionaria ( $r = -0.9546$ ) (**Figuras 3 y 4**). Por otro lado, los registros medios de densidad en la fase de crecimiento exponencial en los cuatro tratamientos no presentaron diferencias ( $P > 0.05$ ) (**Tabla 6**).



**Figura 3.** Relación entre densidad celular y los tratamientos del fertilizante foliar 11N8P6K, primer experimento



**Figura 4.** Relación entre la densidad celular y los tratamientos del fertilizante foliar 11N8P6K, primer experimento

**Tabla 6.** Análisis de varianza de la densidad de *Scenedesmus acutus* en la fase de crecimiento exponencial, primer experimento

Fuentes de variación	de	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio
Tratamientos		3	815.96	271.99
Error experimental		8	15.3 e+02	191.86
F calculado		1.4176		
(p) =		0.3072		

#### 4.4.1.2. Tasas de crecimiento celular

Los registros medios de la tasa de crecimiento específico ( $\mu$ ), tasa de duplicación (K) y tiempo de duplicación (T2) de *Scenedesmus acutus* en la fase de crecimiento exponencial, no presentaron diferencias significativas entre los cuatro tratamientos ( $P > 0.58$ ) (Tabla 7 - 9).

**Tabla 7.** Análisis de varianza de la tasa de crecimiento específico de *Scenedesmus acutus* en la fase exponencial de crecimiento, primer experimento.

Fuentes de variación	de	Grados de libertad	de	Suma de cuadrados	Cuadrado medio
Tratamientos		3		0,183	0,061
Error experimental		8		0,711	0,089
F calculado		0,6873			
(p) =		0,5868			

**Tabla 8.** Análisis de varianza de la tasa de duplicación de *Scenedesmus acutus* en la fase exponencial de crecimiento, primer experimento.

Fuentes variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio
Tratamientos	3	0.182	0.061
Error experimental	8	0.713	0.089
F calculado	0.6795		
(p) =	0.5910		

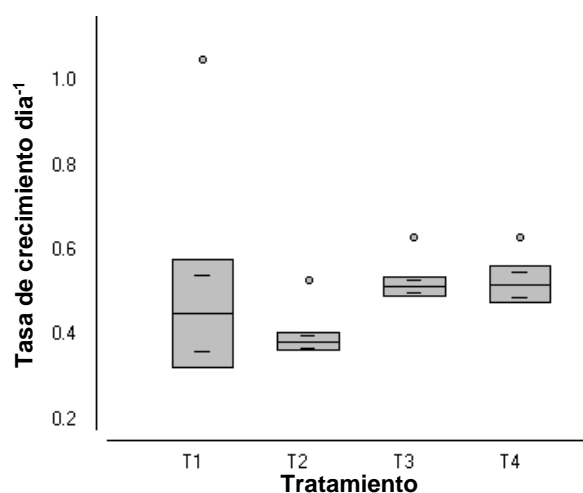


**Tabla 9.** Análisis de varianza del tiempo de duplicación de *Scenedesmus acutus* en la fase exponencial de crecimiento, primer experimento.

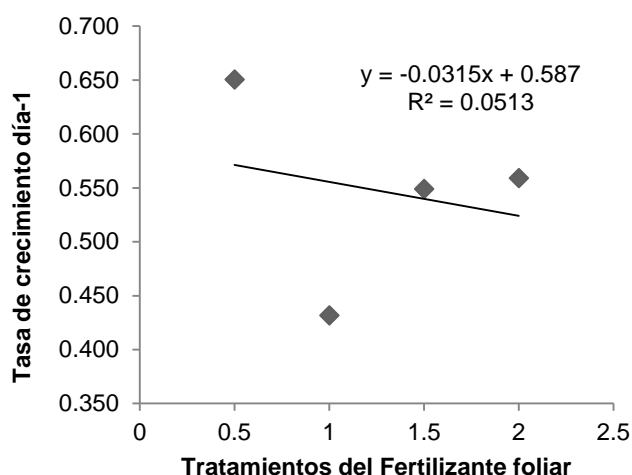
Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medio
Tratamientos	3	0.182	0.061
Error experimental	8	0.713	0.089
F calculado	0.6822		
(p) =	0.5896		

#### 4.4.1.2.1. Tasa de crecimiento específico ( $\mu$ )

En la **Figura 5** se observa que el menor tratamiento ( $T_1$ ) del fertilizante tuvo la mayor tasa de crecimiento específico ( $\mu$ ) ( $0.65 \text{ día}^{-1} \pm 0.36 \text{ S}$ ), seguida del cuarto y tercer tratamiento, con registros de  $0.56 \text{ día}^{-1} \pm 0.07 \text{ S}$  y  $0.55 \text{ día}^{-1} \pm 0.07 \text{ S}$ , respectivamente. Por último, el menor registro de  $0.43 \text{ día}^{-1}$  corresponde al segundo tratamiento ( $1 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Asimismo, la **Figura 6** muestra la relación débil presente entre las tasas de crecimiento específico y los tratamientos del fertilizante ( $r = -0.2268$ ).



**Figura 5.** Tasa de crecimiento específico de *Scenedesmus acutus* en los tratamientos del fertilizante foliar 11N8P6K, primer experimento.



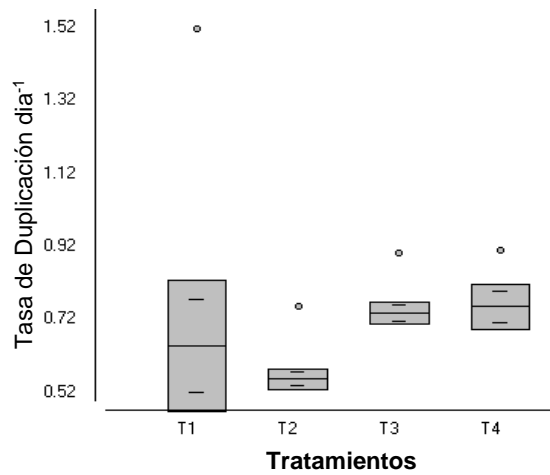
**Figura 6.** Relación entre la tasa de crecimiento específico y los tratamientos del fertilizante foliar 11N8P6K, primer experimento.

#### 4.4.1.2.2. Tasa de duplicación diaria (K)

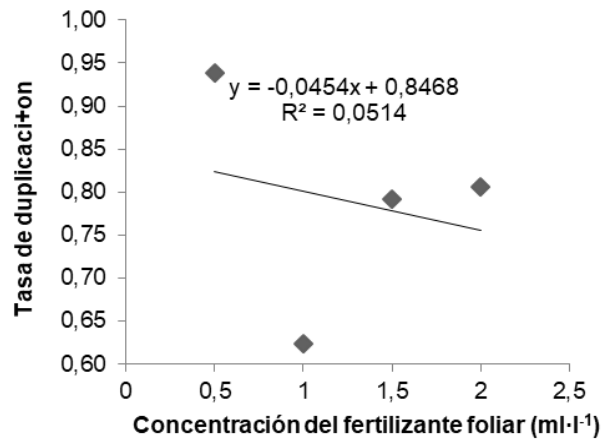
La microalga no duplicó su densidad en los cuatro tratamientos (**Figura 7**), y su mayor registro fue obtenido en el menor tratamiento ( $0.94 \text{ día}^{-1} \pm 0.52 \text{ S}$ ), seguido de los  $0.81 \text{ día}^{-1} \pm 0.1 \text{ S}$  y  $0.79 \text{ día}^{-1} \pm 0.1 \text{ S}$  del cuarto y tercer tratamiento, respectivamente. Por último, el menor registro ( $0.62 \text{ día}^{-1} \pm 0.12 \text{ S}$ ) corresponde al menor tratamiento ( $1 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Éstos registros no estuvieron asociados con los tratamientos el fertilizante ( $r = -0,0227$ ) (**Figura 8**).

#### 4.4.1.2.3. Tiempo de duplicación (T2)

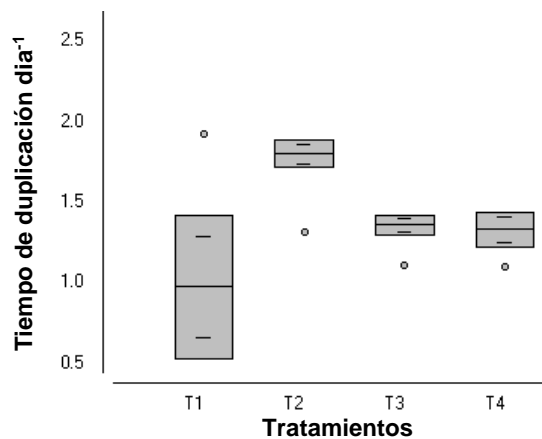
La microalga duplicó su densidad en  $1.64 \text{ día}^{-1} \pm 0.29 \text{ S}$  en el T<sub>2</sub>, seguida del T<sub>4</sub> con  $1.25 \text{ día}^{-1} \pm 0.15 \text{ S}$ , T<sub>3</sub> y T<sub>1</sub> con  $1.28 \text{ día}^{-1} \pm 0.15 \text{ S}$  y  $1.29 \text{ día}^{-1} \pm 0.63 \text{ S}$ , respectivamente (**Figura 9**). Asimismo, estos registros no estuvieron asociados con los tratamientos del fertilizante ( $r = -0.3323$ ) (**Figura 10**).



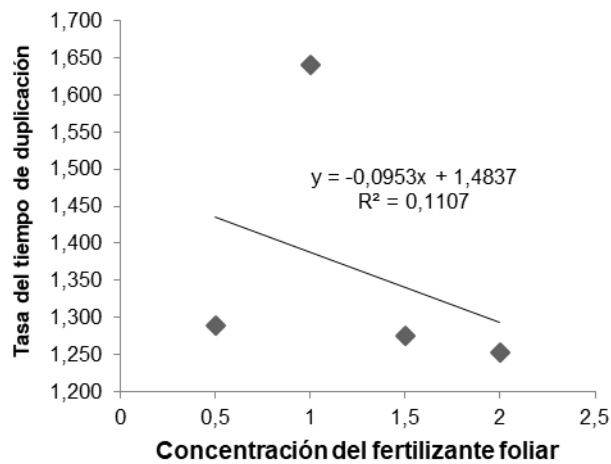
**Figura 7.** Tasa de duplicación de *Scenedesmus acutus* en los tratamientos del fertilizante foliar 11N8P6K, primer experimento.



**Figura 8.** Relación entre la tasa diaria de duplicación y los tratamientos del fertilizante foliar 11N8P6K, primer experimento.



**Figura 9.** Tiempo de duplicación de *Scenedesmus acutus* en los tratamientos del fertilizante foliar 11N8P6K, primer experimento.

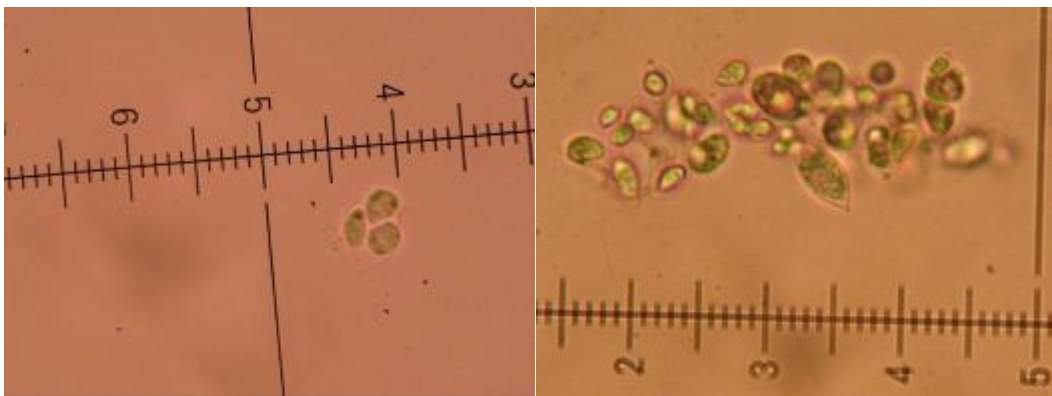


**Figura 10.** Relación entre el tiempo de duplicación de *Scenedesmus acutus* y los tratamientos del fertilizante foliar 11N8P6K, primer experimento.

#### 4.4.2. Formas de la microalga

##### 4.4.2.1. Polimorfismo de la microalga

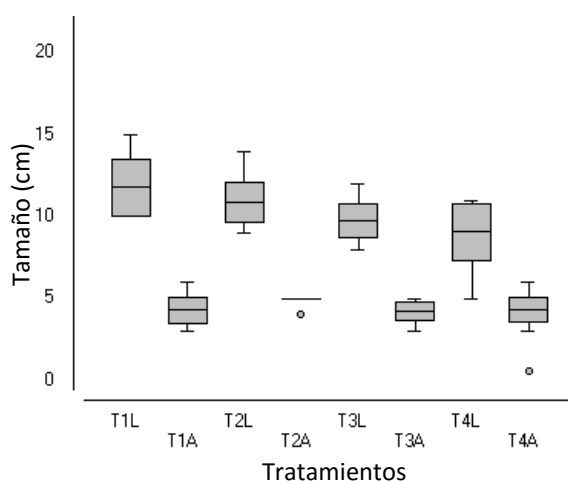
En la muestra natural, *Scenedesmus acutus* presentó cenobios de 4, 6, 8 y 12 células, pero cuando fue expuesta al medio y condiciones de cultivo, adoptó la forma unicelular. Ésta forma fue la única que estuvo presente en los cultivos experimentales.



**Foto 10.** Células libres de *Scenedesmus acutus* en cultivo experimental.

#### 4.4.2.2. Tamaño de la microalga

La microalga fue más pequeña cuando se utilizó mayores concentraciones del fertilizante (**Figura 11**). El menor tratamiento ( $T_1$ ) tuvo células de 11.77  $\mu\text{m}$  de largo, el cual, fue menor a los 10.87  $\mu\text{m}$  y 9.73  $\mu\text{m}$  observadas en el segundo y tercer tratamiento, respectivamente. Asimismo, el menor registro (9.05  $\mu\text{m}$ ) fue obtenido con el mayor tratamiento ( $T_4$ ) (**Tabla 10**). Por otro lado, el ancho de las células fue similar en los cuatro tratamientos, con registros medios de 4.19  $\mu\text{m}$  a 4.97  $\mu\text{m}$ .



**Figura 11.** Variación del largo (TL) y ancho (TA) de *Scenedesmus acutus* en los cuatro tratamientos del fertilizante foliar 11N8P6K, segundo experimento.

**Tabla 10.** Media y desviación estándar (S) del largo (TL) y ancho (TA) de las células de *Scenedesmus acutus* en los tratamientos del fertilizante foliar 11N8P6K, primer experimento.

Tratamiento	Largo (cm)		Ancho (cm)	
	Media	S	Media	S
$T_1$ . 0,5 ml·l <sup>-1</sup>	11.77	±1,72	4.27	±0,83
$T_2$ . 1 ml·l <sup>-1</sup>	10.87	±1,25	4.97	±0.18
$T_3$ . 1,5 ml·l <sup>-1</sup>	9.73	±1,01	4.23	±0.57
$T_4$ . 2 ml·l <sup>-1</sup>	9.05	±1.74	4.19	±0.97

### 4.4.3. Parámetros fisicoquímicos del medio

#### 4.4.3.1. Temperatura

El laboratorio tuvo una temperatura media de 30.9 °C, con fluctuaciones entre 29.8 °C y 31.6 °C en la mañana y tarde, respectivamente. Estos registros fueron similares a las tomadas en las unidades experimentales, los cuales presentaron una media de 30.6 °C, con variaciones en el rango de 29.7 °C y 31.9 °C en la mañana y tarde, respectivamente.

#### 4.4.3.2. Potencial de hidrógeno (pH)

Los cuatro tratamientos presentaron un pH mayor al valor neutro, con registros que se encontraron entre 7.39 (T<sub>1</sub>) y 7.45 (T<sub>4</sub>). Asimismo, el pH incrementó levemente cuando lo hizo la densidad de la microalga y el tiempo de iluminación (6:00 h - 18:00 h) (**Tabla 11**).

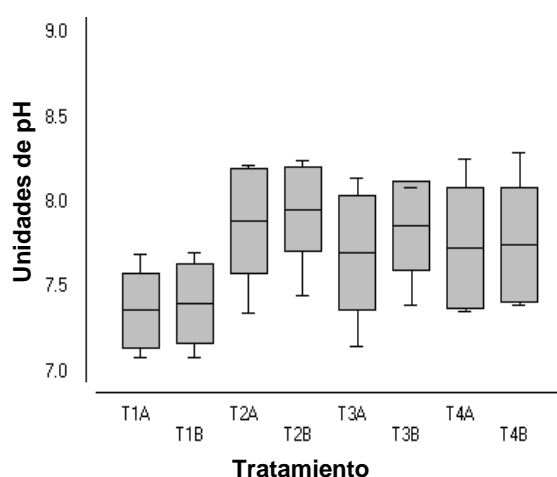
**Tabla 11.** Registros del potencial hidrógeno (pH) en los tratamientos del fertilizante foliar 11N8P6K, primer experimento.

DÍA	T <sub>1</sub> : 0.5 ml·l <sup>-1</sup>		T <sub>2</sub> : 1 ml·l <sup>-1</sup>		T <sub>3</sub> : 1.5 ml·l <sup>-1</sup>		T <sub>4</sub> : 2 ml·l <sup>-1</sup>	
	Mañana	Tarde	Mañana	Tarde	Mañana	Tarde	Mañana	Tarde
1	7.14	7.08	7.35	7.45	7.37	7.39	7.36	7.39
2	7.08	7.30	7.40	7.90	7.35	7.50	7.37	7.46
3	7.45	7.52	8.01	8.01	7.77	8.08	7.42	7.60
4	7.58	7.63	7.67	7.63	8.13	8.09	7.52	7.55
5	7.18	7.09	8.16	7.95	8.14	8.05	7.91	7.55
6	7.30	7.37	8.03	7.99	8.01	8.05	8.06	7.80
7	7.48	7.55	7.95	8.25	7.80	7.76	7.90	7.49
8	7.69	7.7	8.12	8.09	7.70	7.70	7.38	8.29
9	-	-	8.02	8.10	7.63	7.94	8.26	8.21
10	-	-	8.22	8.20	7.15	8.09	8.15	8.13
15	7.70	0.00	7.81	0.00	7.98	0.00	7.69	0.00

La ausencia de registros está asociada con la suspensión de los mediciones, debió a la contaminación de las pseudo-replicas al final del experimento. Sin embargo, mediciones realizadas a las réplicas de cada tratamiento el día 15 de cultivo, se observó que el pH fue similar a las obtenidas en la pseudo-repetición de cada tratamiento.

#### 4.4.3.3. Oxígeno disuelto, alcalinidad y nitrito

La contaminación de la seudoréplica con otros microorganismos afectó la concentración de oxígeno. Estos organismos ingresaron al medio a través de los electrodos del pH-metro y oxímetro, haciendo que el medio adquiriera apariencia blanquecina, el cual fue más pronunciada en el menor de los tratamientos (T<sub>1</sub>) (**Figura 12**). Por otro lado, la alcalinidad cálcica presentó concentraciones entre 16 mg·ml<sup>-1</sup> (T<sub>1</sub>) a 124 mg·ml<sup>-1</sup> (T<sub>4</sub>), siendo importante la ausencia de nitrito en todos los tratamientos (**Tabla 12**).



**Figura 12.** Media y desviación estándar del pH en horas de la mañana (TA) y tarde (TB) en los tratamientos del fertilizante foliar, primer experimento.

**Tabla 12.** Parámetros físicos y químicos de los tratamientos del fertilizante foliar 11N8P6K, primer experimento.

Parámetro	T <sub>1</sub> : 0.5 ml·l <sup>-1</sup>	T <sub>2</sub> : 0.5 ml·l <sup>-1</sup>	T <sub>3</sub> : 0.5 ml·l <sup>-1</sup>	T <sub>4</sub> : 0.5 ml·l <sup>-1</sup>
Nitrato (mg·l <sup>-1</sup> )	-	-	-	-
Alcalinidad (mg·l <sup>-1</sup> )	16	64	92	124

(-) Ausente

#### 4.4.4. Pérdida del medio de cultivo

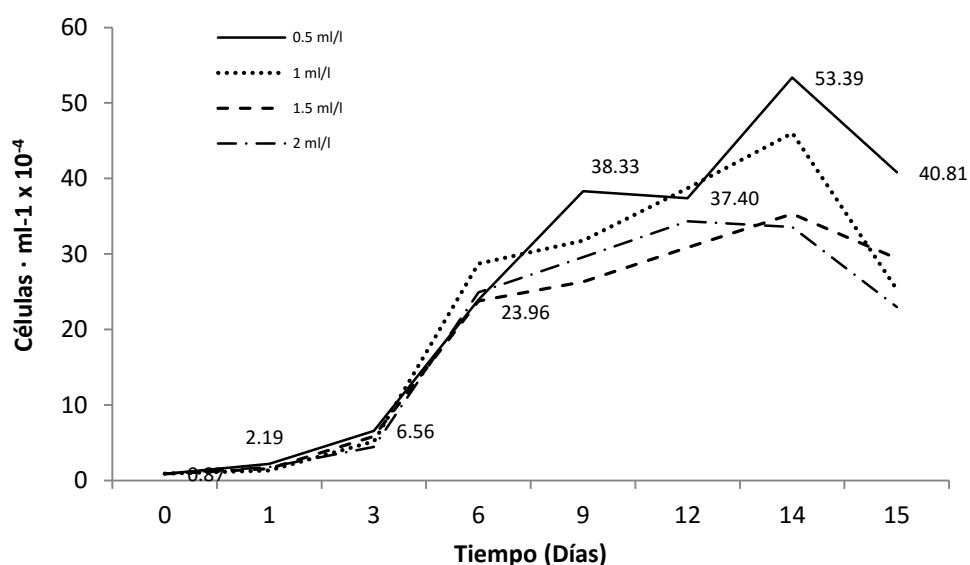
La pérdida de medio de cultivo en los cuatro tratamientos fue aproximadamente 17.9 ml (17.9%). Asimismo, éste no incluye al volumen de las muestras extraídas para la evaluación del crecimiento celular de la microalga.

#### 4.4.5. Segundo experimento

##### 4.4.5.1. Densidad de la microalga

La densidad de la microalga *Scenedesmus acutus* fue similar a la observada en el primer experimento. Sin embargo, el menor tratamiento (T<sub>1</sub>) se diferenció del segundo al presentar una mayor densidad ( $53.39 \times 10^{-4}$  células·ml<sup>-1</sup>), seguida del segundo ( $46.02 \times 10^{-4}$  células·ml<sup>-1</sup>) y tercer tratamiento ( $35.29 \times 10^{-4}$  células·ml<sup>-1</sup>). Por último, el mayor tratamiento (T<sub>4</sub>) presentó el menor la densidad celular ( $33.58 \times 10^{-4}$  células·ml<sup>-1</sup>) (**Figura 13, Tabla 13**).





**Figura 13.** Curvas de densidad de *Scenedesmus acutus* en los cuatro tratamientos del fertilizante foliar 11N8P6K, segundo experimento.

**Tabla 13.** Densidad de *Scenedesmus acutus* en los cuatro tratamientos del fertilizante foliar 11N8P6K, segundo experimento.

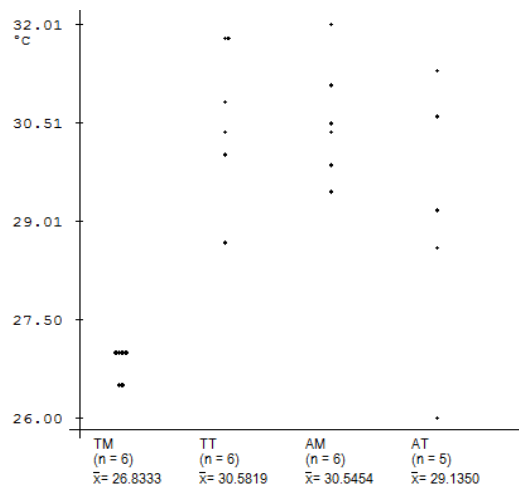
Días	T <sub>1</sub> : 0.5 ml·l <sup>-1</sup>		T <sub>2</sub> : 1 ml·l <sup>-1</sup>		T <sub>3</sub> : 1.5 ml·l <sup>-1</sup>		T <sub>3</sub> : 2 ml·l <sup>-1</sup>	
	Media	S	Media	S	Media	S	Media	S
1	2.19	±0.98	1.30	±0.48	1.56	±0.78	1.72	±0.27
3	6.56	±2.98	5.16	±0.47	5.83	±0.50	7.35	±2.05
6	23.96	±1.74	28.70	±6.82	23.75	±4.35	24.90	±3.62
9	38.33	±6.41	31.77	±1.88	40.28	±4.98	29.58	±3.07
12	37.40	±0.24	38.73	±8.96	30.83	±7.80	34.32	±5.32
14	53.39	±10.92	45.05	±5.35	35.29	±13.74	33.58	±4.98
15	40.81	±10.85	25.31	±3.33	29.43	±1.94	27.46	±3.92

#### 4.4.6. Parámetros físicos y químicos del medio de cultivo

##### 4.4.6.1. Temperatura

Los cuatro tratamientos presentaron una temperatura media de 28.71 °C, y temperaturas que oscilaron de 26.8 a 30.6 °C en horas de la mañana y tarde, respectivamente. Esta fluctuación fue similar a la presentada en el

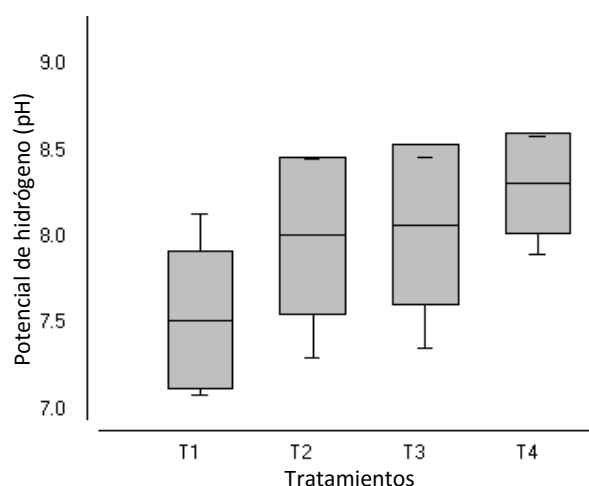
interior del laboratorio, donde la temperatura fluctuó de 30.5 a 29.1 °C en horas de la mañana y tarde, respectivamente (**Figura 14**).



**Figura 14.** Registros medios de temperatura utilizados en el cultivo de la microalga *Scenedesmus acutus*, segundo experimento.

#### 4.4.6.2. Potencial de Hidrógeno (pH)

El nivel de pH de los cuatro tratamientos fue mayor al neutro, y su incremento estuvo directamente relacionado con el aumento de la concentración del fertilizante ( $R^2= 0.8995$ ) (**Figura 15**), presentando registros que se encontraron entre los  $7.52 \pm 0.40$  ( $T_1$ ) y  $8.31 \pm 0.29$  ( $T_4$ ) (**Tabla 14**).



**Figura 15.** Potencial de hidrógeno (pH) de los cuatro tratamientos del fertilizante foliar 11N8P6K, segundo experimento.

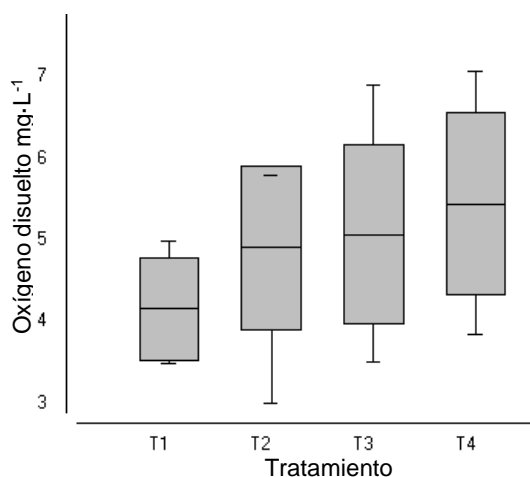
**Tabla 14.** Potencial de hidrógeno (pH) en los cuatro tratamientos del fertilizante foliar 11N8P6K, segundo experimento.

Días	T1 0.5 ml·l <sup>-1</sup>	T2 1.0 ml·l <sup>-1</sup>	T3 1.5 ml·l <sup>-1</sup>	T4 2.0 ml·l <sup>-1</sup>
1	7.2	7.3	7.36	7.9
3	7.46	7.68	7.63	8.03
6	8.13	8.19	8.37	8.56
9	7.84	8.45	8.41	8.58
12	7.40	8.45	8.46	8.53
15	7.08	7.98	8.21	8.28
<b>Media</b>	7.5183	8.0083	8.0733	8.3133
<b>Desviación estándar</b>	0.3971	0.4546	0.4637	0.2936

#### 4.4.6.3. Oxígeno Disuelto (OD)

El aumento de la concentración de oxígeno disuelto estuvieron directamente relacionados con los tratamientos del fertilizante foliar y el crecimiento de la densidad celular en la fase exponencial. En esta etapa, los registros se encontraron en el rango de 4.02 mg·l<sup>-1</sup> y 5.19 mg·l<sup>-1</sup>, los cuales corresponden al menor y mayor tratamiento, respectivamente. En un sentido

contrario, la concentración de oxígeno disminuyó en la fase de crecimiento estacionario (**Figura 16, Tabla 15**).



**Figura 16.** Concentraciones de oxígeno disuelto en los tratamientos del fertilizante foliar 11N8P6K, segundo experimento.

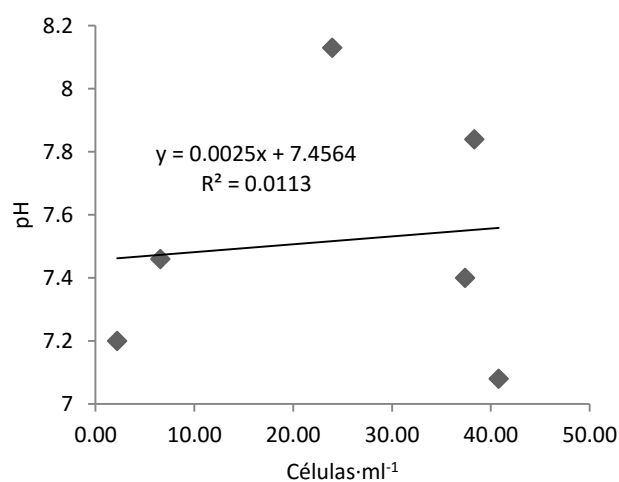
**Tabla 15.** Concentraciones de oxígeno disuelto ( $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) en los tratamientos del fertilizante foliar 11N8P6K, segundo experimento.

Días	T <sub>1</sub> 0.5 ml·l <sup>-1</sup>	T <sub>2</sub> 1.0 ml·l <sup>-1</sup>	T <sub>3</sub> 1.5 ml·l <sup>-1</sup>	T <sub>4</sub> 2.0 ml·l <sup>-1</sup>
1	3.05	3.13	3.25	3.45
3	3.55	5.4	4.88	5.68
6	4.99	5.14	5.36	5.84
9	4.45	5.8	6.9	7.06
12	4.67	5.44	4.69	5.7
15	3.38	3.36	3.08	3.4
<b>Media</b>	<b>4.0150</b>	<b>4.7117</b>	<b>4.6933</b>	<b>5.1883</b>
<b>Desviación estándar</b>	<b>0.7899</b>	<b>1.1577</b>	<b>1.4167</b>	<b>1.4595</b>

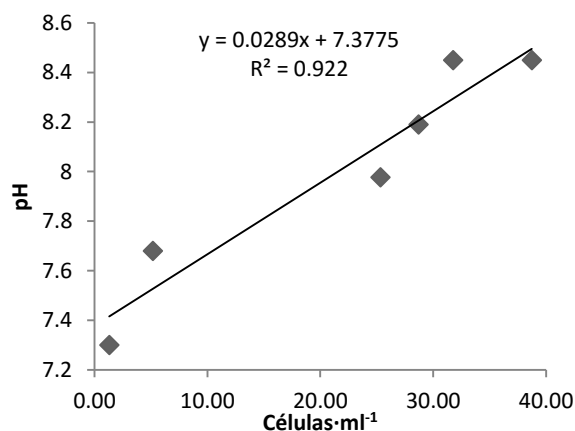
#### 4.4.7. Relación entre la densidad celular y parámetros fisicoquímicos

##### 4.4.7.1. Relación densidad poblacional – pH

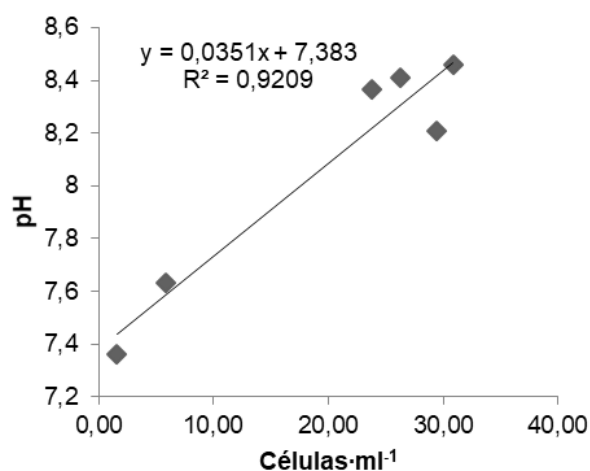
El nivel de pH en tres de los cuatro tratamientos del fertilizante foliar (T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>) estuvo asociado con el aumento de la densidad celular de la microalga. Sin embargo, ésta asociación estuvo ausente en el menor tratamiento (T<sub>1</sub>) (Figura 17 - 20).



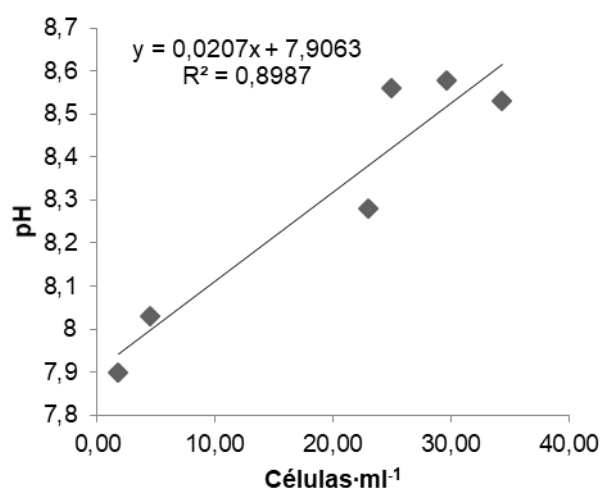
**Figura 17.** Relación densidad celular - pH del primer tratamiento, segundo experimento.



**Figura 18.** Relación densidad celular - pH del segundo tratamiento, segundo experimento.



**Figura 19.** Relación densidad celular - pH del tercer tratamiento, segundo experimento.

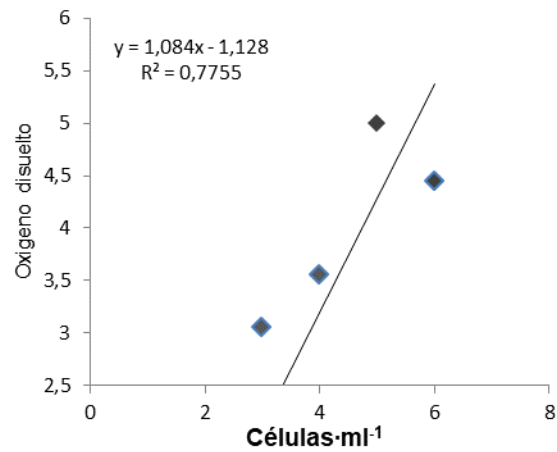


**Figura 20.** Relación densidad celular - pH del cuarto tratamiento, segundo experimento.

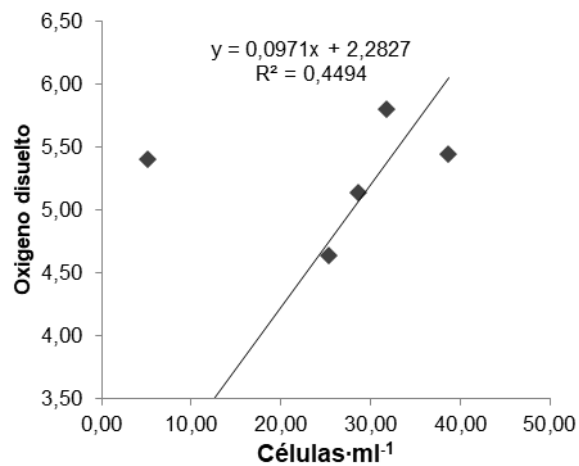
#### 4.4.7.2. Relación densidad celular – concentración de oxígeno disuelto

El incremento de la densidad celular de *Scenedesmus acutus* estuvo directamente asociado con la producción de oxígeno disuelto en el primer

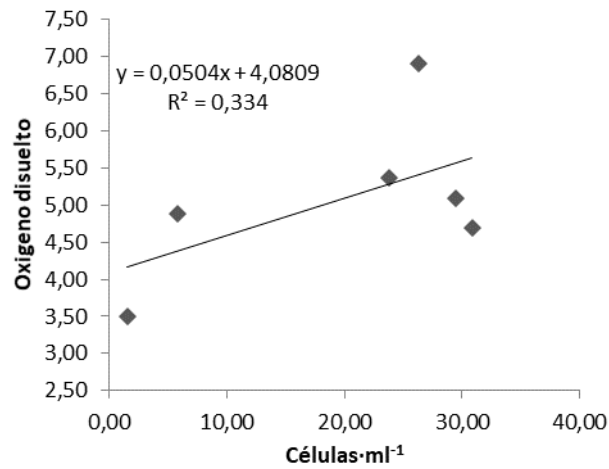
(T<sub>1</sub>) y segundo tratamiento (T<sub>2</sub>). Por otro lado, este parámetro no estuvo asociado con el tercer (T<sub>3</sub>) y cuarto tratamiento (T<sub>4</sub>) (**Figura 21 - 24**).



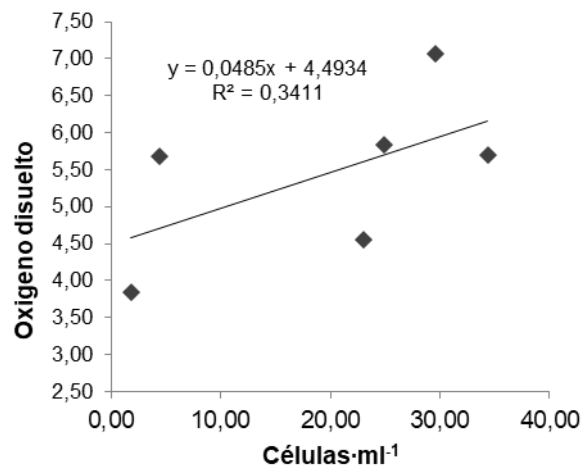
**Figura 21.** Relación densidad celular - oxígeno disuelto del primer tratamiento, segundo experimento.



**Figura 22.** Relación densidad celular - oxígeno disuelto del segundo tratamiento, segundo experimento.



**Figura 23.** Relación densidad celular - oxígeno disuelto del tercer tratamiento, segundo experimento.



**Figura 24.** Relación densidad celular - oxígeno disuelto del cuarto tratamiento, segundo experimento.

#### 4.4.8. Costo del fertilizante foliar en el cultivo de la microalga

El uso del fertilizante foliar (11N86PK) en la presentación de un litro de solución fue adquirido a un costo de 14 nuevos soles. Asimismo, en toda la fase experimental solo se utilizó 10 ml, lo que se traduce en términos monetarios a un costo de 2.8 nuevos soles.



## V. DISCUSIÓN

La microalga *Scenedesmus acutus* presenta confusión nomenclatural con *Scenedesmus Obliquus*, el cual tiene células de forma arqueada y ligeramente convexas, mientras que la microalga en estudio las tiene rectas y son de tamaño homogéneo (22,47). Sin embargo, algunos autores consideran que ambas especies son la misma y la nombran como *Scenedesmus acutus* (52).

Las técnicas de la pipeta capilar y el agar en tubo inclinado permitieron el aislamiento de la microalga *Scenedesmus acutus*. Otro estudio demostró la eficiencia de ambas técnicas en el aislamiento de *Scenedesmus quadricauda*, *Scenedesmus dimorphus*, *Ankistrodesmus falcatus*, *Ankistrodesmus spiralis* y *Selenastrum sp.* (14).

El crecimiento poblacional de *Scenedesmus acutus* en los cuatro tratamientos del fertilizante, evidencia la capacidad de adaptación de la especie a nuevos gradientes ambientales (32). Este comportamiento también fue observado en las especies *Scenedesmus quadricauda*, *Scenedesmus dimorphus*, *Ankistrodesmus falcatus*, *Ankistrodesmus spiralis* y *Selenastrum sp.* (14).

La microalga *Scenedesmus acutus* adoptó forma unicelular en los cuatro tratamientos del fertilizante foliar. Esto coincide con otro estudio, el cual atribuyó como causa a la ausencia de organismos predadores (rotíferos, cladóceros y copépodos) en el medio. Por el contrario, la presencia de estos organismos estimuló la formación de colonias en 48 h (16).

La mayor densidad de *Scenedesmus acutus* en la fase exponencial ( $59.53 \times 10^4$  células·ml<sup>-1</sup>) fue menor a lo reportado en otro estudio, donde la misma especie alcanzó los  $3 \times 10^6$  células·ml<sup>-1</sup> al ser cultivada con el Medio Bold Basal (BBM) (44).

Las menores concentraciones de nitrógeno ( $0.5 \times 10^{-4}$  g·l<sup>-1</sup>) y fósforo ( $0.3 \times 10^{-4}$  g·l<sup>-1</sup>) en el primer tratamiento, favorecieron a un mayor crecimiento de la microalga. Este crecimiento fue menor a la reportada en un estudio que utilizó concentraciones menores de Nitrógeno ( $4.12 \times 10^{-2}$  g·l<sup>-1</sup>) y Fosforo ( $5.34 \times 10^{-2}$  g·l<sup>-1</sup>), las cuales, fueron establecidas como las óptimas para la microalga *Scenedesmus acutus* (44).

La fase prolongada de crecimiento estacionario en el presente estudio, puede ser atribuida a la capacidad de *Scenedesmus acutus* para almacenar polifosfatos intracelulares en forma gránulos, los cuales son utilizados cuando su concentración disminuye en el medio circundante (44,53).

La baja densidad de *Scenedesmus acutus* respecto a otros reportes, puede ser atribuida a la falta de agitación del medio de cultivo, ya que su ausencia ha sido asociada con el bajo crecimiento poblacional de las microalgas. En un sentido contrario, la agitación homogeniza los nutrientes del medio y a las microalgas, permitiendo incrementar su exposición a la luz, evitando el auto-sombreado, la producción de altas concentraciones de oxígeno fotosintético y mejorar el uso del CO<sub>2</sub> (5).

La tasa de crecimiento específico ( $0.65 \text{ día}^{-1}$ ) y el tiempo de duplicación ( $1.25 \text{ día}^{-1}$ ) fueron mejores a las presentadas en otro estudio, cuando *Scenedesmus acutus* fue cultivada con el medio BBM, presentó una tasa de

crecimiento específico equivalente a  $0.3 \text{ día}^{-1}$  y un tiempo de duplicación de  $1.9 \text{ día}^{-1}$  (44).

Los registros de intensidad lumínica (3,110 lux) y temperatura ( $30.8 \text{ °C}$ ) en los dos experimentos, fueron mayores a las utilizadas en otro estudio (44), donde de *Scenedesmus acutus* fue cultivada a  $23 \text{ °C}$  y con una intensidad lumínica de 1,400 lux.

La capacidad de la microalga *Scenedesmus acutus* para dividirse y alcanzar la etapa de crecimiento exponencial (día 6 y 7), fue menor a lo reportado en otro estudio, donde la misma especie alcanzó esta etapa a los nueve días de cultivo (44).

El crecimiento celular de *Scenedesmus acutus* se vio favorecido por la temperatura de cultivo, el cual se encuentra muy cerca de la temperatura óptima ( $30 \text{ °C}$ ) establecida para esta especie en cultivos realizados con los medios M-8 y Urea (54).

La relación existente entre el incremento de pH en el medio de cultivo con el crecimiento de la densidad de *Scenedesmus acutus*, también fue observada en otro estudio que utilizó fotobioreactores en la producción de *Scenedesmus sp.* una microalga que además de adoptar forma unicelular, fue capaz de producir hidrógeno molecular ( $\text{H}_2$ ), que luego fue transferido al medio circundante (42).

El incremento de la concentración de oxígeno disuelto en los cuatro tratamientos, también fue reportado en otro estudio, donde *Scenedesmus* tuvo la facultad de incrementar la concentración de oxígeno en el medio de cultivo a causa de su eficiencia fotosintética, el cual depende de una

adecuada intensidad lumínica (55). En otro estudio, la producción de oxígeno en el medio de cultivo fue utilizado para estimar la densidad celular de *Scenedesmus sp.* (56).

En el presente estudio se estimó que en 1,000 l de cultivo con el fertilizante foliar 11N8P6K genera un gasto de 14 nuevos soles (\$ 4,4), el cual, es mayor a los 14.84 dólares (S/. 40,06) reportados en otro estudio, donde utilizaron un medio químicamente puro (medio F) (57). Sin embargo, la producción disminuye significativamente con el uso de medios análogos, como los fertilizantes agrícolas bayfolan, nikofan y triple 17 en 1,000 l, los cuales implican costos de 0.23, 0.14 y 0.05 dólares, respectivamente (12).

## VI. CONCLUSIONES

- Las técnicas de pipeta capilar y siembra en medio sólido permitieron aislar y obtener cultivos unialgal de *Scenedesmus acutus* en condiciones de laboratorio.
- La menor concentración del fertilizante foliar 11N8P6K (0.5 ml·l<sup>-1</sup>) fue la más eficiente, al promover un mayor crecimiento celular y la obtención del cultivo unialgal.
- *Scenedesmus acutus* fu capaz de crecer en las cuatro concentraciones del fertilizante foliar 11N8P6K (0.5, 1, 1.5 y 2 ml·l<sup>-1</sup>).
- La eficiencia del fertilizante foliar 11N8P6K para promover el incremento de la densidad celular de *Scenedesmus acutus* fue mayor conforme disminuyó su concentración.
- La densidad celular de *Scenedesmus acutus* en la fase de crecimiento exponencial y estacionaria no fueron diferentes (ANOVA, P>0.05) en las cuatro concentraciones del fertilizante foliar 11N8P6K.
- Las condiciones de cultivo tuvieron influencia sobre la forma unicelular y tamaño de las células de *Scenedesmus acutus*.
- El aumento de la concentración de oxígeno disuelto y el pH estuvo asociado con el crecimiento celular de *Scenedesmus acutus* cultivado con el fertilizante foliar 11N8P6K.
- El fertilizante foliar 11N8P6K es un medio alternativo de bajo costo para el cultivo de microalgas en condiciones de laboratorio.

## VII. RECOMENDACIONES.

- Aislar a otras especies de microalgas con potencial acuícola para obtención de cultivos unialgales que permitan la diversificación de las fuentes nutricionales en la acuicultura amazónica.
- Evaluar la eficiencia de menores concentraciones del fertilizante foliar 11N8P6K sobre crecimiento celular de *Scenedesmus acutus*.
- Evaluar la eficiencia del fertilizante foliar 11N8P6K en la producción masiva, composición nutricional y la digestibilidad de *Scenedesmus acutus*.
- Realizar estudios detallados sobre las causas que influyen sobre la variación morfológica de *Scenedesmus acutus* en cultivo unialgal desarrollado en condiciones de laboratorio.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Muller FA. Microalgae for Aquaculture: The Current Global Situation and Future Trends. En: Amos R, editor. Handbook of Microalgae Culture: Biotechnology and Phycology. 2004. p. 365-9.
2. Ismiño R. Cultivo masivo de alimento vivo para larvas de peces. En: Memorias: Manejo de fauna silvestre en amazonía y Latinoamérica. 2002. p. 12-3.
3. Prieto GM, Atencio V. Zooplancton en la larvicultura de peces neotropicales. 13. 2008; 2: 1415-25.
4. Sipaúba TRH. Use of alternative media and different types of recipients in a laboratory culture of *Ankistrodesmus gracilis* (Reinsch) Korshikov (Chlorophyceae). Acta Scientiarum Biological Sciences. 2011; 33(3): 247-53.
5. Olivares RE. Producción de aceite para usos industriales a partir de la microalga "*Scenedesmus Obliquus*" [Internet] [engd]. Universidad de El Salvador; 2010 [citado 20 de abril de 2018]. Disponible en: <http://ri.ues.edu.sv/2162/>
6. Sánchez, S. Mixotrophic culture of *Chlorella pyrenoidosa* with olive-mill wastewater as the nutrient medium. 13. 2001; 443–449.
7. Romero LT. Crecimiento de *Chlorella sp.* en medio inorgánico enriquecido con dos fuentes de carbono. En 2003. p. 320-4. Disponible en: <http://www.civa2003.org>
8. Basurto VE. Bioabono líquido como medio de cultivo para microalgas. Itzapla, México: Universidad Autósipanoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, Departamento de Hidrobiología; 1994 p. 16.

9. Torres HS, Juscamaita J, Vargas J. crecimiento mixotrófico de la microalga *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatales: Monodopsidaceae) en ensilado biológico de pescado. *The Biologist*. 2008; 6(2):94-100.
10. Rodríguez L, Juscamaita J, Vargas J. Efecto del medio EM-Bokashi en el cultivo de la microalga marina *Tetraselmis suecica* K. *Ecol Apl*. 31 de diciembre de 2007; 6(1-2):111-6.
11. Sipaúba TLE, Pereira AML. Large scale laboratory cultures of *Ankistrodesmus gracilis* (Reisch) Korsikov (Chlorophyta) and *Diaphanosoma biergei* Korinek, 1981 (Cladocera). *Braz J Biol Rev Brasleira Biol*. 2008; 68(4):875-83.
12. Soto NM, Cortés AR, Gutiérrez CC, Pacheco MM. Producción de fitoplancton a bajo costo. 1. Aislamiento y cultivo de *Monoraphidium sp.* (Chlorophyceae) en un sistema estático en medio F y cuatro a base de fertilizantes agrícolas. *An Inst Cienc Mar Limnol - UNAM*. 1994; 21(1-2): 119-27.
13. Quevedo OC, Morales V, Sonia PS, Acosta CA A. Crecimiento de *Scenedesmus sp.* En diferentes medios de cultivo para la producción de proteína microalgal. *Vitae*. 2008; 15(1): 25-31.
14. Padovan A. Isolation and culture of five species of freshwater algae from the Alligator Rivers Region, Northern Territory [Internet]. 1992. 37 p. (Supervising Scientist). Disponible en: <http://www.environment.gov.au/science/supervising-scientist/publications>
15. Hoek C, Mann D, Jahns HM. *Algae: An Introduction to Phycology*. Cambridge University Press; 1995. 644 p.



16. American Society of Limnology and Oceanography, Inc. Morphological changes in *Scenedesmus* induced by infochemicals released in situ from zooplankton grazers. *Limnol Oceanografía*. 1997; 24(4): 783 – 788.
17. Bold HC, Wynne MJ. Introduction to the algae: structure and reproduction. Prentice-Hall; 1978. 732 p.
18. Acleto A, Zuñiga R. División Chlorophyta: Introducción a las microalgas. Chorrillos – Perú: Escuela Nueva; 1998. 71-136 p.
19. Barsanti L, Gualtieri P. Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology, Second Edition. CRC Press; 2014. 364 p.
20. EcuRed. Alga [Internet]. [citado 17 de abril de 2018]. Disponible en: <https://www.ecured.cu/Alga>
21. Microalgas: definición y características [Internet]. [citado 17 de abril de 2018]. Disponible en: <https://w3.ual.es/~jfernand/ProcMicro70801207/tema-1---generalidades/1-1-microalgas.html>
22. Meyen FJF. Beobachtungen über einige niedere Algenformen. *Nova Acta Physico-Medica Academiae Caesareae Leopoldino-Carolinae Naturae*. XLIII. Vol. 14. 1829. 768-778 p.
23. Vela Gracia LE. Variación cualitativa y cuantitativa de cuatro estanque seminaturales de la piscigranja Quistococha - UNAP [Tesis para optar el título profesional de Biólogo]. [Iquitos, Perú]: Universidad Nacional de la Amazonia Peruana; 1984.

24. Ortiz S. R. Estudio del fitoplancton de la cuenca baja del río Marañón y algunos tributarios menores [Tesis para optar el título profesional de Biólogo]. [Iquitos, Perú]: Universidad Nacional de la Amazonía Peruana; 1991.
25. Del Águila EA. Flora algológica de la laguna Urococha Río Amazonas Loreto - Perú [Tesis para optar el título profesional de Biólogo]. [Iquitos, Perú]: Universidad Nacional de la Amazonía Peruana; 2000.
26. López S. R. Caracterización planctónica física y química de la cocha Llanchara en los periodos hidrológicos de creciente y media vaciante Loreto - Perú, 2007 [Tesis para optar el título profesional de Biólogo]. [Iquitos, Perú]: Universidad Nacional de la Amazonia Peruana; 2009.
27. Echenique RO, Núñez-Avellaneda M, Duque SR. Chorococcales de la Amazonía colombiana I: Chlorellaceae y Scenedesmaceae. *Caldasia*. 1 de enero de 2004; 26(1):37-51.
28. Xin L, Hong-Ying H, Yu-ping Z. Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. under different cultivation temperature. *Bioresour Technol*. 2011; 102(3):3098-102.
29. Olaizola M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. *Biomol Eng*. 2003; 20(4-6):459-66.
30. Miquel P. De la culture artificielle des diatomées. *Le Diatomiste* 1: Introduction, 73–75; Cultures ordinaires des diatomées. 1993; 73-5.
31. Beijerinck MW. Culturversuche mit Zoochlorellen, Lichengonidien und anderen niederen Algen. 48. 1890; 742-71.

32. Andersen R, Kawachi M. Traditional microalgae Isolation Techniques. En: Algal Culturing Techniques. San Diego, California, USA: Elsevier; 2005. p. 94-111.
33. Pérez CD. Cultivo experimental de diatomeas *Thalassiosira subtilis*, *Skelotonema costatum* y *Chaetoceros affinis* en condiciones de laboratorio para fines de acuicultura. [Tesis para obtener el Título de Maestro en Ciencias con Especialidad en Acuicultura]. [Manzanillo – Colombia]: Universidad de Colima, Facultad de Ciencias Marinas.; 1995.
34. Quesquén F., Villanueva C. Aislamiento y purificación de *Dunaliella salina* de la costa central del Perú. CIVA-2002. 2002; 836-57.
35. Alvares A. Cultivo de microalgas: Manual para la acuicultura tropical. Guayaquil, Ecuador; 2003 p. 46.
36. Muller FA, Robert R, Chantal C, Robin J, Divanach P. The microalgae of aquaculture. En: Live feeds in Marine aquaculture. Blackwell Science Publishers; 2003. p. 99-253.
37. Pedraza JMT, Arias JA, Muñoz F. Respuesta a la primera alimentación en larvas de barbilla *Rhamdia sebae* c.f. (Pisces: Siluriformes, Pimelodidae). Biotecnol En El Sect Agropecu Agroindustrial BSAA. 2007; 5(1):47-53.
38. Sipaúba TLE. Cultivo em massa de plancton de água doce utilizado na alimentacao de larvas de péixes: custo/benefício e dificuldades de manutencao. 2002.
39. Malgas. Aplicaciones de las microalgas: Estado de la Técnica, Oportunidad empresariales alrededor de las microalgas del en el litoral Cantábrico

- [Internet]. Gijón, España: AST – Ingeniería S.L.; 2014 p. 90. Disponible en:  
<http://www.ast-ingenieria.com>
40. Watanabe M. Freshwater Culture Media. En: Algal Culturing Techniques. San Diego, California, USA: Elsevier; 2005. p. 13-20.
  41. FAO. Los fertilizantes y su uso. 2002. 72 p.
  42. Beena BN, Sivakumar P. Influence of light, pH and various nutrient concentrations on hydrogen production by two Microalgae. Biosciences research. 2011; 2(4):166-70.
  43. Christov CP, Pouneva I, Bozhkova M, Toncheva T, Fournadzieva S, Zafirova T. Influence of temperature and metil jasmonate on *Scenedesmus incrassulatus*. Biologia Plantarum. Biologia Plantarum. 2001; 44(3):367-71.
  44. Gonzales GL. Influencia de la deficiencia de nitrógeno y fosforo en las relaciones competitivas entre *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus*. [Trabajo de Grado como requisito para optar al título de M.Sc.]. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Biología.; 2010.
  45. Acevedo JA, Ramírez JJ. Influencia de un gradiente cruzado de luz y temperatura en la morfología de *Scenedesmus acutus*, Meyen (1829). var *globosus hortobagyi* y sus aplicaciones taxonómicas. Actual Biol. 2003; 25(79):141 – 146.
  46. Martínez V, Pellón A, Pérez E, Correa O, Escobedo R, Madruga Y, et al. Producción de Biomasa de *Scenedesmus Obliquus* en diferentes medios de cultivo. Revista CENIC Ciencias Biológicas. 2005; 36:7.

47. Komárek J, Fott B. Chlorophyceae (Grünalgen). Ordnung: Chlorococcales. En: Das Phytoplankton des Süßwassers Systematik and Biologie, 7, Schweizerbart'ssche Verlagbuchhandlung, Stuttgart. 1983. p. 1044.
48. Streble H, Krauter D. Atlas de los microorganismos de agua dulce: la vida en una gota de agua. Editorial Omega; 1987.
49. Godiño RL. Família *Scenedesmaceae* (Chlorococcales, Chlorophyceae) no estado São Paulo: levantamento florístico [Tese apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, Área de Concentração Plantas Avasculares e Fungos em Análises Ambientais.]. [São Paulo, Brazil]: Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente; 2009.
50. Sánchez TH, Juscamaita J, Vargas JJ. crecimiento mixotrófico de la microalga *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatales: Monodopsidaceae) en ensilado biológico de pescado. The Biologist. 2008; 6 (2):94-100.
51. Romero G. Caracterización morfométrica y aspectos filogenéticos de cepas de rotíferos del grupo *Brachionus plicatilis* (Rotifera: Brachionidae) utilizados en la acuicultura peruana. [Tesis para optar el título profesional de Biólogo.]. [Lima, Perú]: Universidad Nacional Mayor de San Marcos Facultad de Ciencias Biológicas E.A.P de Ciencias Biológicas.; 2008.
52. Uherkovich G, Schimidt A, Ács É. A *Scenedesmus* zöldalga nemzetség (Chlorococcales, Chlorophyceae) különös tekintettel magyarországi előfordulású taxonjaira, Magyar algológiai társaság, Budapest. Busapest; 1995. 234 p.

53. Brönmark C, Hansson A. The Biology of Lakes and Ponds. 2ª ed. Oxford, United Kingdom: Oxford University Press; 2005. 304 p.
54. Owen CK. Evaluating algal growth at different temperatures. [Theses and Dissertations-Biosystems and Agricultural Engineering.]. University of Kentucky UKnowledge; 2011.
55. Ruíz M. Características fotosintéticas y crecimiento de *Scenedesmus obliquus* inmovilizada en alginato. Agrobiencia. 2011; 45: 303-14.
56. Lin Xin, Hu HY, Zhang YP. Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus sp.* under different cultivation temperature. Bioresource technology. 2011; 102: 3098 – 3102.
57. Soto N, Vega P. Tasas de crecimiento, biomasa y costos de producción de *Tetraselmis suecica* (Chlorophyceae) y *Chactoceros sp.* (Bacillariophyceae) cultivado con el medio F y tres medios alternativos. Rev Ciencias del Mar Universidad Autónoma. 1994; 13:39-53.