

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

**ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN ACUICULTURA**



**"UTILIZACIÓN DE RESIDUOS SÓLIDOS Y LÍQUIDOS DE UN
SISTEMA BIOFLOC COMO MEDIO DE CULTIVO PARA LA
PRODUCCIÓN DE *Scenedesmus sp.*"**

Presentada por:

BRUNO LEITE ARROYO SOSA

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAGISTER SCIENTIAE EN ACUICULTURA

Lima - Perú

2016

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

ESCUELA DE POSGRADO

MAESTRÍA EN ACUICULTURA

**UTILIZACIÓN DE RESIDUOS SÓLIDOS Y LÍQUIDOS DE UN
SISTEMA BIOFLOC COMO MEDIO DE CULTIVO PARA LA
PRODUCCIÓN DE *Scenedesmus sp.***

Presentado por:

BRUNO LEITE ARROYO SOSA

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAGISTER SCIENTIAE EN ACUICULTURA**

**Dr. Patricia Gil Kodaka
PRESIDENTE**

**M.Eng. María Cristina Miglio Toledo
PATROCINADOR**

**Dr. Alfredo Olivera Gálvez
CO-PATROCINADOR**

**Mg.Sc. Jessie Vargar Cardenas
MIEMBRO**

**Mg.Sc. Beatriz Ángeles Escobar
MIEMBRO**

AGRADECIMIENTOS

La realización del presente trabajo de investigación fue posible gracias a la asesoría y guía de la Magister María Miglio Toledo y al Dr. Alfredo Olivera Gálvez quienes me guiaron y corrigieron durante la realización de esta investigación. También agradezco a Laenne Moraes, Ana Paula Dos Santos, Yllana Marinho y Jéssika Abreu, excelentes personas que conocí durante mi estadía en la Universidad Federal Rural de Pernambuco y me dieron su apoyo durante la realización de los experimentos. A mi compañera Katherine Zapata Lovera, quien me facilitó el efluente a ser usado durante los experimentos. A la coordinadora de la maestría en acuicultura, Mg.Sc. Beatriz Angeles por desarrollar un excelente programa de estudios durante la maestría y brindarme todas las facilidades para la realización de estadía en Brasil. A la Dr. Patricia Gil y la Mg.Sc. Jessie Vargas por la revisión y aportes realizados para el enriquecimiento del presente trabajo.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC) por el apoyo económico recibido como participante del Proyecto de la Maestría de Acuicultura (Convenio de Gestión N°017-2013-FONDECYT) y al Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por el financiamiento brindado para la realización de esta investigación.

Finalmente, agradezco a mi familia el apoyo brindado durante todos los años de formación; ya que sin ellos nada de esto hubiera sido posible.

ÍNDICE

Página

ÍNDICE DE TABLAS	
ÍNDICE DE FIGURAS	
ÍNDICE DE ANEXOS	
RESUMEN	
ABSTRACT	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. Tecnología Biofloc	4
2.2. Microalgas	6
2.2.1. Aspectos generales	6
2.2.2. Producción de microalgas	8
2.2.3. Sistemas de cultivo	18
2.3. <i>Scenedesmus sp.</i>	20
III. MATERIALES Y MÉTODOS	23
3.1. Tipo de investigación	23
3.2. Diseño de la investigación	23
3.3. Evaluación de los residuos líquidos del sistema biofloc como medio de cultivo para la producción de la microalga <i>Scenedesmus sp.</i>	25
3.4. Evaluación de los residuos sólidos del sistema biofloc como medio de cultivo para la producción de la microalga <i>Scenedesmus sp.</i>	28
3.5. Procesamiento de datos	31
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
4.1. Obtención de residuos líquidos y sólidos del cultivo de tilapia en biofloc	33
4.2. Concentración de nitrógeno y fósforo	35
4.2.1. Residuo líquido	35
4.2.2. Residuo Sólido	36
4.3. Medios formulados con el residuo líquido de biofloc	38
4.3.1. Bioensayo I - Dilución	38
4.3.2. Bioensayo II - Sustitución	41
4.3.3. Bioensayo III - Enriquecimiento	44

	Página
4.4. Medios formulados con el residuo líquido de biofloc	47
4.4.1. Bioensayo I - Dilución	47
4.4.2. Bioensayo II - Sustitución	51
4.4.3. Bioensayo III - Enriquecimiento	54
V. CONCLUSIONES	64
VI. RECOMENDACIONES	65
VII. COLABORADORES	66
VIII. BIBLIOGRAFÍA	67
IX. ANEXOS	79

ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Velocidad de crecimiento (μ) reportada para el género <i>Scenedesmus</i>	22
Tabla 2	Preparación de los tratamientos para el bioensayo I, dilución del medio de residuo líquido (RL).	26
Tabla 3	Preparación de los tratamientos para el bioensayo II, sustitución del medio de residuo líquido (RL).	26
Tabla 4	Preparación de los tratamientos para el bioensayo III, enriquecimiento del medio de residuo líquido (RL).	27
Tabla 5	Composición de los tratamientos para el bioensayo I, dilución del medio de residuo sólido (RS).	29
Tabla 6	Preparación de los tratamientos para el bioensayo II, sustitución del medio de residuo sólido (RS).	30
Tabla 7	Diseño de los tratamientos para el bioensayo III, enriquecimiento del medio de residuo sólido (RS).	31
Tabla 8	Concentración estimada de nitrógeno y fósforo inorgánicos (mg/mL) en cada tratamiento durante los bioensayos con el medio formulado con el residuo líquido (RL) de biofloc.	35
Tabla 9	Relación nitrógeno:fósforo (molécula de N/molécula de P) presente en cada tratamiento durante los bioensayos con el medio formulado con el residuo líquido (RL) de biofloc.	36
Tabla 10	Concentración estimada de nitrógeno y fósforo en cada tratamiento durante los bioensayos con el medio formulado con el residuo sólido (RS) de biofloc.	37
Tabla 11	Relación nitrógeno:fósforo (molécula de N/molécula de P) presente en cada tratamiento durante los bioensayos con el medio formulado con el residuo sólido (RS) de biofloc.	37
Tabla 12	Velocidad de crecimiento (μ), tiempo de duplicación (TD) y densidad celular máxima (DCM) de la microalga <i>Scenedesmus sp.</i> cultivada en el bioensayo I, dilución del medio formulado con el residuo líquido de biofloc (RL).	39

Tabla 13	Velocidad de crecimiento (μ), tiempo de duplicación (TD) y densidad celular máxima (DCM) de la microalga <i>Scenedesmus sp.</i> cultivada en el bioensayo II, sustitución del medio Guillard f/2 por el medio formulado con el residuo líquido de biofloc (RL).	42
Tabla 14	Velocidad de crecimiento (μ), tiempo de duplicación (TD) y densidad celular máxima (DCM) de la microalga <i>Scenedesmus sp.</i> cultivada en el bioensayo III, sustitución del medio Guillard f/2 por el medio formulado con el residuo líquido (RL) de biofloc enriquecido con metales y vitaminas.	45
Tabla 15	Velocidad de crecimiento (μ), tiempo de duplicación (TD) y densidad celular máxima (DCM) de la microalga <i>Scenedesmus sp.</i> cultivada en el bioensayo III, sustitución del medio Guillard f/2 por el medio formulado con el residuo sólido (RS) de biofloc.	49
Tabla 16	Velocidad de crecimiento (μ), tiempo de duplicación (TD) y densidad celular máxima (DCM) de la microalga <i>Scenedesmus sp.</i> cultivada en el bioensayo II, sustitución del medio Guillard f/2 por el medio formulado con el residuo sólido (RS) de biofloc.	52
Tabla 17	Velocidad de crecimiento (μ), tiempo de duplicación (TD) y densidad celular máxima (DCM) de la microalga <i>Scenedesmus sp.</i> cultivada en el bioensayo III, sustitución del medio Guillard f/2 por el medio formulado con el residuo sólido de biofloc enriquecido con metales y vitaminas.	56

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1	Fases del crecimiento típico en microalgas. 16
Figura 2	(A)Residuo sólido de biofloc. (B)Residuo sólido seco. 33
Figura 3	(A)Residuo líquido del sistema biofloc. (B)Unidades experimentales con las diluciones del residuo líquido de biofloc. 34
Figura 4	Unidades experimentales con las diluciones del medio de residuos sólidos de biofloc. 34
Figura 5	Curvas de crecimiento promedio de la microalga <i>Scenedesmus sp.</i> cultivada en el bioensayo I, dilución del medio formulado con el residuo líquido (RL) de biofloc. 38
Figura 6	Promedio de las velocidades de crecimiento (μ) de la microalga <i>Scenedesmus sp.</i> cultivada en el bioensayo I, dilución del medio formulado con el residuo líquido (RL) de biofloc. 39
Figura 7	Promedio de los tiempos de duplicación (TD) de la microalga <i>Scenedesmus sp.</i> cultivada en el bioensayo I, dilución del medio formulado con el residuo líquido (RL) de biofloc. 40
Figura 8	Promedio de las densidades celulares máximas (DCM) de la microalga <i>Scenedesmus sp.</i> cultivada en el bioensayo I, dilución del medio formulado con el residuo líquido (RL) de biofloc. 40
Figura 9	Curvas de crecimiento promedio de la microalga <i>Scenedesmus sp.</i> cultivada en el bioensayo II, sustitución del medio Guillard f/2 por el medio formulado con el residuo líquido (RL) de biofloc. 43
Figura 10	Promedio de las velocidades de crecimiento (μ) de la microalga <i>Scenedesmus sp.</i> cultivada en el bioensayo II, sustitución del medio Guillard f/2 por el medio formulado con el residuo líquido (RL) de biofloc. 43
Figura 11	Promedio de los tiempos de duplicación (TD) de la microalga <i>Scenedesmus sp.</i> cultivada en el bioensayo II, sustitución del medio Guillard f/2 por el medio formulado con el residuo líquido (RL) de biofloc. 43

Figura 12	Promedio de las densidades celulares máximas (DCM) de la microalga <i>Scenedesmus sp.</i> cultivada en el bioensayo II, sustitución del medio Guillard f/2 por el medio formulado con el residuo líquido (RL) de biofloc.	44
Figura 13	Curvas de crecimiento promedio de la microalga <i>Scenedesmus sp.</i> cultivada en el bioensayo III, sustitución del medio Guillard f/2 por el medio formulado con el residuo líquido (RL) de biofloc enriquecido con metales y vitaminas.	44
Figura 14	Promedio de las velocidades de crecimiento (μ) de la microalga <i>Scenedesmus sp.</i> cultivada en el bioensayo III, sustitución del medio Guillard f/2 por el medio formulado con el residuo líquido (RL) de biofloc enriquecido con metales y vitaminas.	46
Figura 15	Promedio de los tiempos de duplicación (TD) de la microalga <i>Scenedesmus sp.</i> cultivada en el bioensayo III, sustitución del medio Guillard f/2 por el medio formulado con el residuo líquido (RL) de biofloc enriquecido con metales y vitaminas.	46
Figura 16	Promedio de las densidades celulares máximas (DCM) de la microalga <i>Scenedesmus sp.</i> cultivada en el bioensayo III, sustitución del medio Guillard f/2 por el medio formulado con el residuo líquido (RL) de biofloc enriquecido con metales y vitaminas.	47
Figura 17	Curvas de crecimiento promedio de la microalga <i>Scenedesmus sp.</i> cultivada en el bioensayo I, dilución del medio formulado con el residuo sólido (RS) de biofloc.	48
Figura 18	Promedio de las velocidades de crecimiento (μ) de la microalga <i>Scenedesmus sp.</i> cultivada en el bioensayo I, dilución del medio formulado con el residuo sólido (RS) de biofloc.	49
Figura 19	Promedio de los tiempos de duplicación (TD) de la microalga <i>Scenedesmus sp.</i> cultivada en el bioensayo I, dilución del medio formulado con el residuo sólido (RS) de biofloc.	50
Figura 20	Promedio de las densidades celulares máximas (DCM) de la microalga <i>Scenedesmus sp.</i> cultivada en el bioensayo I, dilución del medio formulado con el residuo sólido (RS) de biofloc.	50

Figura 21	Curvas de crecimiento promedio de la microalga <i>Scenedesmus sp.</i> cultivada en el bioensayo II, sustitución del medio Guillard f/2 por el medio formulado con el residuo sólido (RS) de biofloc.	51
Figura 22	Promedio de las velocidades de crecimiento(μ) de la microalga <i>Scenedesmus sp.</i> cultivada en el bioensayo II, sustitución del medio Guillard f/2 por el medio formulado con el residuo sólido (RS) de biofloc.	53
Figura 23	Promedio de los tiempos de duplicación (TD) de la microalga <i>Scenedesmus sp.</i> cultivada en el bioensayo II, sustitución del medio Guillard f/2 por el medio formulado con el residuo sólido (RS) de biofloc.	53
Figura 24	Promedio de las densidades celulares máximas (DCM) de la microalga <i>Scenedesmus sp.</i> cultivada en el bioensayo II, sustitución del medio Guillard f/2 por el medio formulado con el residuo sólido de biofloc.	54
Figura 25	Curvas de crecimiento promedio de la microalga <i>Scenedesmus sp.</i> cultivada en el bioensayo III, sustitución del medio Guillard f/2 por el medio formulado con el residuo sólido (RS) de biofloc enriquecido con metales y vitaminas.	55
Figura 26	Promedio de las velocidades de crecimiento (μ) de la microalga <i>Scenedesmus sp.</i> cultivada en el bioensayo III, sustitución del medio Guillard f/2 por el medio formulado con el residuo sólido (RS) de biofloc enriquecido con metales y vitaminas.	56
Figura 27	Promedio de los tiempos de duplicación (TD) de la microalga <i>Scenedesmus sp.</i> cultivada en el bioensayo III, sustitución del medio Guillard f/2 por el medio formulado con el residuo sólido (RS) de biofloc enriquecido con metales y vitaminas.	57
Figura 28	Promedio de las densidades celulares máximas (DCM) de la microalga <i>Scenedesmus sp.</i> cultivada en el bioensayo III, sustitución del medio Guillard f/2 por el medio formulado con el residuo sólido (RS) de biofloc enriquecido con metales y vitaminas.	57

ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
Anexo 1 Preparación del medio Guillard f/2	79
Anexo 2 Densidad celular (células $\times 10^4$ /mL) de la microalga <i>Scenedesmus</i> sp.cultivada en el medio formulado con el residuo líquido de biofloc en el bioensayo I.	81
Anexo 3 Densidad celular (células $\times 10^4$ /mL) de la microalga <i>Scenedesmus</i> sp.cultivada en el medio formulado con el residuo sólido de biofloc en el bioensayo I.	81
Anexo 4 Densidad celular (células $\times 10^4$ /mL) de la microalga <i>Scenedesmus</i> sp.cultivada en el medio formulado con el residuo líquido de biofloc en el bioensayo II.	82
Anexo 5 Densidad celular (células $\times 10^4$ /mL) de la microalga <i>Scenedesmus</i> sp.cultivada en el medio formulado con el residuo sólido de biofloc durante el bioensayo II.	83
Anexo 6 Densidad celular (células $\times 10^4$ /mL) de la microalga <i>Scenedesmus</i> sp.cultivada en el medio formulado con el residuo líquido de biofloc en el bioensayo III.	84
Anexo 7 Densidad celular (células $\times 10^4$ /mL) de la microalga <i>Scenedesmus</i> sp.cultivada en el medio formulado con el residuo sólido de biofloc en el bioensayo III.	85
Anexo 8 Procesamiento estadístico de los resultados de crecimiento de la microalga <i>Scenedesmus</i> sp.cultivada en el medio formulado con el residuo líquido de biofloc. Nivel de confianza del 95%($\alpha = 0.05$)	86
Anexo 9 Procesamiento estadístico de los resultados de crecimiento de la microalga <i>Scenedesmus</i> sp..cultivada en el medio formulado con el residuo sólido de biofloc. Nivel de confianza del 95%($\alpha = 0.05$)	86
Anexo 10 Concentración de nutrientes en el medio formulado con el residuo sólido de biofloc	87
Anexo 11 Preparación y composición de nutrientes del medio formulado con el residuo líquido de biofloc.	87

RESUMEN

La presente investigación evaluó el uso del efluente del cultivo de tilapias en sistemas biofloc como medio de cultivo para la producción de la microalga *Scenedesmus sp.* El efluente fue separado en residuo sólido (RS) y residuo líquido (RL); y con ambos se prepararon los medios de cultivo. Se realizaron 3 bioensayos: bioensayo I, dilución en agua estéril; bioensayo II, sustitución por un medio de cultivo comercial; y bioensayo III, sustitución por un medio comercial y enriquecimiento con metales y vitaminas. Los tratamientos para los medios con RL consistieron en 3 niveles de inclusión: T1 (50% RL), T2 (75% RL) y T3 (100% RL); mientras que para los medios con RS fueron 4 niveles de inclusión T1 (25% RS), T2 (50% RS), T3 (75% RS) y T4 (100% RS); empleando como control al medio f/2 Guillard (f/2). La velocidad de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (TD) mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los medios de RL y el control f/2 en todos los bioensayos, observándose que las mayores μ y menores TD estuvieron presentes en los medios de RL durante el bioensayo III. En cambio, en los medios de RS solo se observaron diferencias durante el bioensayo I ($p < 0.05$), entre el tratamiento control f/2 y los tratamientos T1 y T2; en los bioensayos II y III, no se reportaron diferencias ($p > 0.05$). La densidad celular máxima (DCM) en los medios de RS mostraron diferencias ($p < 0.05$) entre el tratamiento T4 y el control f/2 en todos los bioensayos; mientras que en los medios de RL; solo durante el bioensayo II se encontraron diferencias ($p < 0.05$) entre T1 y el control f/2. Por lo que se puede concluir que solo el RL del efluente de biofloc puede ser utilizado para la producción de la microalga *Scenedesmus sp.*

Palabras clave: efluente, biofloc, medio de cultivo, *Scenedesmus*

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the use of effluent of tilapia culture in biofloc systems as culture medium for production of *Scenedesmus sp.* The effluent was separated into solid waste (RS) and liquid waste (RL); and with both culture media were prepared. 3 bioassays were performed: bioassay I, dilution in sterile water; bioassay II, replacement of a commercial culture medium; and bioassay III, replacement of a commercial culture medium and enrichment with metals and vitamins. Treatments for RL media consisted of 3 levels of inclusion: T1 (50% RL), T2 (75% RL) and T3 (100% RL); while for RS media were four T1 (25% RS), T2 (50% RS), T3 (75% RS) and T4 (RS 100%); using as a control f/2 medium Guillard (f/2). The growth rate (μ) and doubling time (TD) showed significant differences ($p < 0.05$) between the RL media and control f/2 in all bioassays, noting that the largest μ and lower TD were present in the RL medium in the bioassay III. While, in RS media only were observed differences during the bioassay I ($p < 0.05$) between control f/2 and treatments T1 and T2; in bioassays II and III, no differences ($p > 0.05$) were reported. The maximum cell density (DCM) in RS media showed differences ($p < 0.05$) between treatment T4 and f/2 control in all bioassays; while for RL media; only weew fund differences during the bioassay II ($p < 0.05$) between T1 and control f/2. It can be concluded that only the RL media from biofloc effluent can be used for the production of microalgae *Scenedesmus sp.*

Keywords: effluent, biofloc, culture medium, Scenedesmus

I. INTRODUCCIÓN

La acuicultura a nivel mundial, ha presentado una de las evoluciones más dinámicas en las últimas décadas llegando a registrarse un crecimiento medio anual de 8.9% entre 1980 y el 2012. En el año 2012, los peces comestibles procedentes de la acuicultura contribuyeron con el 42.2 % del total de 158 millones de toneladas del pescado producido (FAO, 2014).

La expansión e intensificación de la industria acuícola ha sido acompañada por un incremento en la preocupación sobre los impactos que se pueden generar por la descarga directa de sus efluentes al medio ambiente (Marinho-Soriano *et al.*, 2011). Los principales impactos generados están relacionados a la contribución de material orgánico, sólidos suspendidos y nutrientes (nitrógeno, fósforo, etc.) (Crab *et al.*, 2007).

En respuesta a estos problemas es que se han venido desarrollando diferentes tecnologías para alcanzar una producción acuícola sustentable. Entre estas podemos encontrar alternativas como los sistemas de recirculación para acuicultura (RAS), los cuales permiten incrementar la carga de los cultivos, gracias a que transforman los compuestos nitrogenados nocivos, Amonio (NH_4^+) y Amoniacó (NH_3), en un compuesto menos tóxico como el Nitrato (NO_3^-) a través de un proceso autotrófico de nitrificación generado por bacterias nitrificantes (Timmons y Ebeling, 2007; Steicke *et al.* 2008). El exceso de nitrato debe ser controlado mediante recambios diarios, como mínimo, del 10% del volumen total de agua.

Otra de las tecnologías que ha resaltado por la capacidad que presenta para reducir el impacto de la acuicultura es la tecnología biofloc. Esta tecnología se destaca por la reducción al mínimo de la demanda de agua requerida para su funcionamiento, al ser llamada también tecnología de cero recambio de agua. Se basa en la formación de comunidades bacterianas heterotróficas, capaces de asimilar el Amonio (NH_4^+) y Amoniacó (NH_3). El crecimiento de estos organismos es estimulado manteniendo

relaciones Carbono:Nitrógeno (C:N) elevadas, mediante la adición de fuentes de carbono orgánico, como melaza, azúcar, entre otros (Avnimelech, 2009; Crab *et al.*, 2012; Scheryver *et al.*, 2008). Otra de las características de esta tecnología es la producción de biomasa bacteriana, la cual representa una fuente de proteínas que puede ser aprovechada por algunos organismos; esto puede generar mejoras en el crecimiento y reducción de la cantidad de ración que se requiere durante el cultivo (Ekasari *et al.*, 2014).

Si bien, la tecnología biofloc permite el mantenimiento de la calidad de agua y reduce al mínimo el recambio de esta en el sistema; uno de los aspectos que se deben considerar es la alta concentración de sólidos suspendidos que presenta. El crecimiento de la comunidad heterotrófica del biofloc se ve representado por el incremento de la concentración de sólidos suspendidos en el agua; la cual puede traer consecuencias negativas para los organismos del cultivo si no se mantienen controladas (Azim y Little, 2008; Rakocy *et al.*, 2008; Avnimelech, 2009).

Para realizar el control de los sólidos suspendidos totales de los sistemas biofloc, se han desarrollado técnicas y mecanismos que permiten mantenerlos en concentraciones tolerables, retirando el exceso de sólidos por decantación (Ray *et al.*, 2010; Ray *et al.*, 2012). Sin embargo, esto genera un volumen mínimo de efluente altamente cargado en materia orgánica y compuestos nitrogenados (Avnimelech, 2009).

Se han investigado diferentes técnicas para minimizar los posibles impactos que generan los efluentes de la actividad acuícola. Entre las técnicas más utilizadas están: utilización de tanques de sedimentación (Teichert-Coddington *et al.*, 1999; Nunes, 2002), uso de filtros de plantas macrofitas *wetland* (Tilley *et al.*, 2002; Sousa, 2003), remoción de nutrientes por microalgas (Guerrero-Cabrera *et al.*, 2014; Magnotti *et al.*, 2015), remoción de nutrientes por macroalgas (Pagand *et al.*, 2000; Marinho-Soriano *et al.*, 2009; Marinho-Soriano *et al.*, 2011) y tratamientos combinados de sedimentación, cultivo de moluscos y macroalgas (Jones *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 2002; Preston *et al.*, 2003; Ramos *et al.*, 2006).

Las microalgas poseen un elevado potencial biotecnológico, ya sea por su potencial para la bioremediación de efluentes, secuestro de carbono o para la producción de biocombustibles, entre otros (Mata *et al.*, 2010; Krishna *et al.*, 2012).

Entre los substitutos de combustibles fósiles, las microalgas son consideradas como una de las alternativas más prometedoras, debido a su alto contenido lipídico y rápido crecimiento (Wu *et al.*, 2012). Sin embargo, aún se requiere más investigación para lograr solucionar algunos retos como: selección de especies, mejoramiento de los medios de cultivo, tecnología de cultivo y extracción de los componentes deseados (Harman-ware *et al.*, 2013; Soratana *et al.*, 2013).

El elevado costo en la formulación de los medios de cultivo convencionales es uno de los principales problemas que limitan la producción de microalgas con fines comerciales (Coutteau, 1996). Como alternativa, se viene estudiando el uso de aguas residuales de la acuicultura y/o centros urbanos como medios ricos en nutrientes. Algunas investigaciones han encontrado la eficiente remoción de compuestos nitrogenados, fósforo y metales tóxicos de aguas residuales (Pellón *et al.*, 2003; Pittman *et al.*, 2011).

Bajo estas consideraciones, la presente investigación tuvo como objetivo general evaluar los residuos sólidos y líquidos del cultivo de tilapia en sistemas biofloc en su utilización como medio de cultivo para la producción de la microalga *Scenedesmus sp.*

Mientras que los objetivos específicos fueron:

- Evaluar la tasa de crecimiento y tiempo de duplicación de la microalga *Scenedesmus sp.* en medios de cultivo con diferentes proporciones de residuos sólidos y líquidos de los sistemas biofloc.
- Evaluar el efecto de la relación N:P presente en los residuos sólidos y líquidos de los sistemas biofloc, sobre el crecimiento de la microalga *Scenedesmus sp.*

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Tecnología biofloc

Los sistemas de cultivo con tecnología biofloc han surgido como una alternativa para alcanzar una producción sustentable y biosegura. Esta tecnología funciona bajo el principio de la asimilación de los compuestos nitrogenados disueltos en el agua por parte de bacterias heterotróficas. Para promover el crecimiento de estas bacterias es necesaria la adición de fuentes de carbono orgánico, procurando mantener una relación constante entre el carbono y nitrógeno (C:N) por encima de 10. Si esta relación es bien controlada, los compuestos nitrogenados pasaran a convertirse rápidamente en biomasa bacteriana. Cuando estas bacterias se encuentran en altas densidades, tienden a formar conglomerados bacterianos llamados flóculos o flocs (Schryver *et al.*, 2008; Avnimelech, 2009; Crab *et al.*, 2012).

Estos flóculos están compuestos por una gran variedad de microorganismos (algas, bacterias, microalgas, zooplancton), alimento no consumido, heces y detrito; y se pueden presentar en diferentes formas y dimensiones (Schryver *et al.*, 2008; Avnimelech, 2009; Crab *et al.*, 2012; Ekasari *et al.*, 2014).

Existen diferentes mecanismos que permiten la aglomeración de las células que forman el floc. Uno de ellos es el recubrimiento de las células por polímeros extracelulares hechos de polisacáridos, proteínas, compuestos húmicos, entre otros. Estos polímeros actúan como un pegamento, enlazando células y otras partículas juntas. Otro mecanismo para la formación del floc es el balance entre las fuerzas de atracción (interacciones moleculares, enlaces dipolo, enlaces hidrógeno) y las fuerzas de repulsión electrostáticas. Muchos organismos poseen una carga negativa e inducen una repulsión electrostática. Si está repulsión es disminuida, entonces las intensas fuerzas de atracción pueden tener lugar. Otro de los posibles mecanismos es la presencia de organismos filamentosos como algas, hongos y bacterias (Schryver *et al.*, 2008; Avnimelech, 2009).

Los flóculos, al ser analizados microscópicamente, presentan una estructura abierta; esto permite el flujo de agua y compuestos químicos a través de ellos. Esta característica también permite que las bacterias tengan una mayor área sobre la cual fijarse (Avnimelech, 2009).

La tecnología biofloc no sólo es adecuada para el mantenimiento de la calidad de agua, sino que también genera biomasa bacteriana que puede contribuir como una fuente de proteínas para los organismos cultivados (Crab *et al.*, 2012; Ekasari *et al.*, 2014).

El uso de la tecnología biofloc para la producción de especies como la tilapia ha demostrado el aprovechamiento que se puede generar de la proteína microbiana producida, al ser consumida por los peces. Obteniéndose iguales niveles de crecimiento que en sistemas de cultivo tradicionales, utilizando un menor contenido de proteína en el alimento (Azim y Little, 2008; Crab *et al.*, 2010).

Una de las actividades de manejo que requiere la tecnología biofloc es la remoción del exceso de sólidos que se pueden generar por el rápido crecimiento de las comunidades microbianas heterotróficas (Schryver *et al.*, 2008; Avnimelech, 2009). Si bien este crecimiento representa la eliminación de compuestos nitrogenados tóxicos, una alta acumulación de sólidos suspendidos en el agua también puede traer consecuencias negativas para los organismos cultivados (Azim y Little, 2008; Ray *et al.*, 2010).

Investigaciones han demostrado que mantener los sólidos suspendidos en una concentración determinada puede conservar mejores niveles de calidad de agua y generar mejoras en el crecimiento (Ray *et al.*, 2010; Ray *et al.*, 2012).

Este control sobre los sólidos genera un efluente altamente cargado en sólidos y nutrientes disueltos, los cuales poseen un gran potencial para eutrofizar los cuerpos de agua receptores (Magnotti *et al.*, 2015). Los sólidos del efluente presentan elevados niveles de nitrógeno, entre 4 a 8%; así como de fósforo y ácidos grasos polinsaturados (Ju *et al.*, 2008; Hargreaves, 2013; Ekasari *et al.*, 2014; Long *et al.*, 2015). Mientras que la parte líquida, presenta principalmente formas de nitrógeno inorgánico (NH_4^+ , NO_3^- , NO_2^-) y fósforo; siendo reportado que sus concentraciones pueden variar mucho, entre 19 a 80 mg/L de NO_3^- (Schweitzer *et al.* 2013; Magnotti *et al.*, 2015), y desde 2.53 a 79.4 mg/L de

P-PO₄⁻³ (Ray *et al.*, 2011; Magnotti *et al.*, 2015) siendo estos valores influenciados por el tiempo de cultivo, composición de la comunidad microbiana del biofloc, densidad y talla de los organismos cultivados, fuentes de carbono, entre otros (Ebeling *et al.*, 2006; Crab *et al.*, 2010; Ray *et al.*, 2010).

2.2. Microalgas

2.2.1. Aspectos generales

El término microalgas hace referencia a organismos de diferentes reinos taxonómicos y por esto es considerado un agrupamiento artificial. Son organismos unicelulares fotoautótrofos microscópicos, es decir, tienen la capacidad captar la energía proveniente de la luz para producir compuestos energéticos a través de la fotosíntesis (Raven *et al.*, 2001). En la actualidad, se sabe que el término microalga engloba a una gran cantidad de algas eucariontes, como algas verdes (*Chlorophytas*), pardas (*Phaeophyceae*), diatomeas (*Bacillariophyceae*), entre otras; así como también a organismos procariontes como las cianobacterias (*Cyanophyceae*), todos ellos capaces de realizar fotosíntesis (Mata *et al.*, 2010)

La gran mayoría de las especies de microalgas se encuentran en el medio acuático; pero debido a su gran diversidad también han sido encontradas en ambientes terrestres, como por ejemplo en la superficie de nieve, troncos de árboles y en asociación simbiótica con los hongos (líquenes) (Lourenço, 2006).

En los hábitats que ocupan, presentan como función principal ser productores primarios de la cadena alimentaria, gracias a que poseen diferentes rutas metabólicas que les permiten sintetizar los compuestos que requieren para su crecimiento; siendo la fotosíntesis la más estudiada (Grobbelaar, citado en Richmond, 2004).

La fotosíntesis se divide en dos etapas: fase luminosa y fase oscura. Se conoce como fase luminosa debido a que se requiere de una fuente de luz para dar lugar a las reacciones. Este proceso se da en las tilacoides, las cuales realizan la captación de energía lumínica gracias a la presencia de pigmentos fotosintéticos, como la clorofila *a* y clorofila *b* que permiten la activación de la cadena transportadora de electrones; obteniéndose como producto final

energía bioquímica, almacenada en forma de moléculas de ATP y NADPH; y liberación de oxígeno (O₂) a la atmósfera. En la fase oscura, tiene lugar con o sin la presencia de una fuente de luz. El CO₂ atmosférico es captado y transportado al estroma; en donde el carbono inorgánico es transformado en carbono orgánico a través de un ciclo metabólico conocido como ciclo de Calvin, el cual requiere energía en forma de ATP y NADPH (moléculas obtenidas durante la fase luminosa) y nutrientes (nitrógeno, fósforo, azufre, entre otros) captados del medio (Andersen, 2005; Perez-Garcia *et al.*, 2011; MAGRAMA, 2013).

Las algas marinas son los únicos productores primarios en el océano –el cual cubre el 71% de la superficie terrestre. Gracias a este proceso contribuyen con entre 40 a 50% del oxígeno presente en la atmósfera. Son también la fuente original de los combustibles fósiles (petróleo y gas natural) que se extraen del subsuelo (Andersen, 2005; MAGRAMA, 2013).

Los cultivos de microalgas vienen siendo estudiados alrededor del mundo desde el siglo XIX. Estas pueden ser cultivadas en ambientes controlados para fines comerciales, como la extracción de compuestos bioquímicos, producción de alimento vivo en acuicultura, producción de enzimas, ácidos grasos polinsaturados, colorantes, etc. (Derner, 2006; Qin *et al.*, 2008; Harman-Ware *et al.*, 2013).

La composición de las microalgas (contenido de lípidos, carbohidratos y proteínas) es variable y puede ser controlada mediante la manipulación de diferentes parámetros durante su proceso de cultivo, dependiendo además de la especie considerada (MAGRAMA, 2013).

Entre las investigaciones más resaltantes realizadas con microalgas se puede mencionar aquellas enfocadas a la producción de biodiesel (biocombustible) y la biorremediación de efluentes.

El término biodiesel o biocombustible se refiere a los combustibles líquidos o gaseosos, que son predominantemente producidos a partir de materias primas orgánicas, como la caña de azúcar, trigo, palma aceitera, entre otras (Demirbas, 2008). Las microalgas son consideradas como productoras de biocombustibles de tercera generación; ya que, pueden

almacenar productos lipídicos que pueden transformarse en biocombustibles, se cultivan en cualquier lugar del mundo, no demandan grandes hectáreas y generan una mayor energía por combustión, sin emisiones de azufre (MAGRAMA, 2013).

La biorremediación es el uso de organismos vivos, de cualquier reino, para depurar ambientes contaminados. El uso de estos permite la eliminación de sustancias contaminantes presentes en todo tipo de aguas residuales, que para las plantas son considerados como nutrientes, obteniéndose como resultado final un efluente menos contaminado y una biomasa de algas. Cultivos de microalgas se han empleado con éxito para remover nutrientes de aguas residuales ricas en compuestos de nitrógeno y fósforo (Kwangyong y Choul-Gyun, 2002; Chacón *et al.*, 2004), y en la absorción de metales (Devars *et al.*, 2000; Tam *et al.*, 2001; Abdel-Raouf *et al.*, 2012).

El uso de microalgas para el tratamiento de diversos tipos de aguas residuales contaminadas, ha sido objeto de estudios en los últimos años (Grönlund, 2002; Olguínet *al.*, 2003; Hu y Sommerfeld, 2004; Bécares, 2006; Asplund, 2008) y recientemente combinando la depuración de las aguas con la producción de biomasa algal para la producción de biocombustibles (Johnson y Wen, 2010; Li *et al.*, 2010, Ebrahimian *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2015).

2.2.2. Producción de microalgas

a. Requerimientos nutricionales

Las microalgas necesitan para su crecimiento nutrientes como el nitrógeno, fósforo, silicio, potasio y magnesio; además de fuentes de carbono, minerales y; trazas de metales como Fe, Co y Zn, y vitaminas. En función de las cantidades requeridas estos compuestos se agrupan en macronutrientes y micronutrientes (Sánchez, 2001). Estos inciden en la velocidad de crecimiento y en la composición bioquímica de las células en cultivo; igualmente, los requerimientos nutricionales varían en las especies y dependen de las condiciones ambientales (luz, temperatura, y pH), en las que se desarrolle el cultivo (MAGRAMA, 2013).

Los principales factores que determinan la productividad de las microalgas son los siguientes:

Carbono

Es la principal molécula en la cual están basados los seres vivos, constituyendo aproximadamente el 50% de la biomasa en base seca libre de cenizas de las microalgas. Se utilizan como estructura básica para la incorporación de elementos primordiales, como nitrógeno, fósforo y azufre; generando monómeros orgánicos simples como aminoácidos, nucleótidos, ácidos grasos y otros carbohidratos más complejos que se ensamblan para formar proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y polisacáridos (Lehninger *et al.*, 1995).

Los cultivos de microalgas pueden ser clasificados en función de la fuente de carbono empleada como: autotróficos, heterotróficos o mixotróficos.

- **Autotróficos:** Todas las microalgas son capaces de crecer en este tipo de medios. Están preparados de tal forma que contienen fuentes de carbono inorgánico, como el CO_2 o HCO_3^- . En estos medios las microalgas utilizan la luz como fuente de energía, mediante la fotosíntesis, y estas fuentes de carbono como base para la síntesis de moléculas orgánicas (Andersen, 2005).
- **Heterotróficos:** Solo algunas microalgas son capaces de ser cultivadas en este tipo de medios. Son aquellos medios que utilizan como fuente de carbono compuestos orgánicos, tales como acetatos, azúcares y ácidos orgánicos. Estos ingresan a la célula gracias a la presencia de enzimas específicas desarrolladas para su transporte y una vez dentro de ella, son degradados y utilizados tanto como fuente de energía, como de carbono para la síntesis de otras moléculas orgánicas. En este tipo de cultivos se puede eliminar la fuente de luz; aminorando los costos de producción (Miao y Wu, 2006; Zhang *et al.*, 2013).
- **Mixotróficos:** Son aquellos en los que se encuentran tanto fuentes de carbono orgánico como inorgánico. En estos medios las microalgas son capaces de crecer bajo procesos tanto autotróficos como heterotróficos. Es así que, la fuente de energía puede ser tanto la luz como la materia orgánica y también puede obtener el carbono de los compuestos orgánicos y CO_2 (Ebrahimian, *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2014).

Algunas investigaciones reportan que las microalgas cultivadas bajo estas condiciones presentan ventajas sobre las cultivadas en medios autotróficos como: mayor velocidad de

crecimiento, disminución de los costos generados por iluminación o mayor contenido lipídico (Miao y Wu, 2006; Xu *et al.*, 2006).

Nitrógeno

El contenido en nitrógeno de la biomasa algal puede suponer desde un 1% hasta más del 10%, en función de la disponibilidad y el tipo de fuente de nitrógeno. Las microalgas pueden tomar nitrógeno del medio generalmente en forma de ión amonio (NH_4^+), nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-) y urea ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$), así como también en forma de peptonas, amino ácidos y purinas. (Perez-Garcia *et al.*, 2011) .

En medios de cultivo sintéticos, el nitrógeno es usualmente adicionado en la forma de sales de amonio o nitratos; ya que, estas son las principales formas de nitrógeno que utilizan las microalgas. El nitrógeno es aceptado en las vías metabólicas de las microalgas en forma de amonio, mientras que la asimilación de nitrato requiere de la transformación de nitrato a nitrito y luego a amonio mediante cuatro pasos de reducción que requieren energía, resultando más favorable para las microalgas utilizar el amonio cuando éste está disponible (Sze, 1998; Perez-Garcia *et al.*, 2011).

Un incremento en la disponibilidad de nitrógeno inorgánico generalmente deriva en un incremento de la abundancia de productores primarios. Sin embargo, altos niveles de nitrógeno inorgánico no siempre genera una mayor abundancia; al contrario, puede causar efectos adversos en los organismos menos tolerantes (Camargo y Alonso, 2006).

La tolerancia al amonio depende de la especie cultivada: por ejemplo, *Spirulina platensis* se ve prácticamente inhibida ante concentraciones de 200 mg NH_4^+ /L mientras que *Chlorella sorokiniana* no muestra inhibición ante concentraciones de 400 mg NH_4^+ /L (MAGRAMA, 2013).

Fósforo

El fósforo juega un papel importante en la mayoría de procesos celulares, especialmente en los procesos metabólicos implicados en la generación y transformación de la energía (Andersen, 2005).

El fósforo total que se presenta en el medio acuático consiste en fósforo inorgánico disuelto, compuestos orgánicos de fósforo disuelto y fósforo orgánico en partículas suspendidas (Sze, 1998). Sin embargo, mientras que el nitrógeno puede ser utilizado por las microalgas bajo sus diferentes formas; el fósforo debe ser asimilado casi exclusivamente en forma de ortofosfatos ($P-PO_4^{-3}$), y es la concentración de este compuesto la que determina la velocidad de crecimiento y la máxima biomasa que podrán alcanzar las microalgas.

La disponibilidad del ortofosfato depende mucho del pH, ya que este factor le permite mantenerse en equilibrio con las otras formas de fosfato (H_3PO_4 , $H_2PO_4^-$ y HPO_4^{2-}). Factores como un pH excesivamente alto o bajo, o la ausencia de iones como potasio, sodio o magnesio, ralentizan la toma de fosfatos por parte de las microalgas (Perez-Garcia *et al.*, 2011).

Metales traza

Andersen (2005) menciona la importancia de los metales trazas en el metabolismo de las microalgas; tal es el caso del hierro (Fe) el cual es importante como transportador de electrones en el metabolismo fotosintético y en la reducción de nitrito y nitrato. El manganeso (Mn) funciona como un componente esencial de los centros de oxidación de agua durante la fotosíntesis.

Raven *et al.* (1999) mencionan la importancia del cobre (Cu) para todas las microalgas; ya que forma parte de la proteína citocromo oxidasa, la cual tiene un rol esencial en la cadena transportadora de electrones.

Vitaminas

Las vitaminas son importantes cofactores en el metabolismo de la microalgas. En los cultivos de microalgas, generalmente tres vitaminas son adicionadas a los medios de cultivo, Cianocobalamina (vitamina B12), Tiamina (vitamina B1) y Biotina (vitamina B7); pero existe la posibilidad de omitir una o dos de estas vitaminas, ya que son muy pocas las microalgas que requieren la presencia de las tres vitaminas (Andersen, 2005).

Entre las tres vitaminas utilizadas en los medios de cultivo, la cianocobalamina es la que presenta mayor importancia; ya que, puede ser utilizada como cofactor del cobalto (Co) para la formación de anhidrasa carbónica, la cual cataliza la conversión del CO_2 y H_2O en HCO_3^- y H^+ (Sunda y Huntsman, 1995).

b. Requerimientos físicos

Los factores que influyen en el crecimiento de las microalgas son comunes, sin embargo, cada especie y sub-especie de microalga presenta sus características propias respecto a las condiciones óptimas de crecimiento, así como productividades máximas alcanzadas en diferentes configuraciones de sistemas de cultivo (MAGRAMA, 2013).

Luz

Los organismos fotosintéticos sólo emplean la fracción del espectro de luz solar que es fotosintéticamente activa, es decir entre 400 y 700 nm, lo que supone un 40% de la radiación total del sol. La mayor parte de los ecosistemas naturales vegetales presentan una eficiencia de conversión de energía lumínica en biomasa de alrededor del 1%. Sin embargo, en el caso de las microalgas se han demostrado eficiencias de conversión luz-biomasa entre 1 y 4 % en sistemas abiertos como estanques y aún mayores en fotobioreactores cerrados (Stephens *et al.*, 2010).

Temperatura

Afecta las reacciones celulares, la naturaleza del metabolismo, los requerimientos nutricionales y la composición química, así como la producción y composición bioquímica de las algas.

El rango óptimo para el crecimiento de la mayoría de las microalgas se sitúa entre los 16 y 24 °C (Sze, 1998); sin embargo la tolerancia a la temperatura varía según la especie, es así como especies sensibles como *Isochrysis*, no soportan temperaturas superiores a los 25 °C, mientras que formas más resistentes como *Chlorella* crecen bien hasta los 36 °C (Stevenson, 1996).

pH

Las microalgas en cultivo dependen del pH del medio, siendo que cada especie requiere un pH óptimo para su cultivo, valor que generalmente se encuentra en el rango de 7-9. Un descenso de pH suele ser letal, en cambio suelen soportar mejor los incrementos del pH hasta cierto límite (Andrade, 2008; MAGRAMA, 2013).

El pH del medio influye tanto en la proporción de las especies del equilibrio químico del CO₂, y por tanto, en la alcalinidad del medio, como en la forma química en que se encuentran algunos nutrientes y micronutrientes necesarios. El proceso fotosintético de fijación de CO₂ provoca un aumento gradual de pH en el medio debido a la acumulación de OH⁻, lo que puede promover la eliminación de nitrógeno en forma de amoníaco por difusión a la atmósfera y la eliminación de fósforo por precipitación de ortofosfatos (Seoáñez, 2005).

c. Factores que afectan el crecimiento de las microalgas

Relación nitrógeno:fósforo (N:P)

Diversas investigaciones han demostrado que además de la disponibilidad de los nutrientes, la relación en la que estos se encuentran influye en el correcto crecimiento de las microalgas, siendo la relación entre el nitrógeno y el fósforo (N:P) la más importante (Stevenson *et al.*, 1996; Andersen, 2005).

Las microalgas utilizan el nitrógeno y fósforo para producir incrementos de biomasa. Debido a que ambos compuestos son esenciales para esto, la remoción de un nutriente depende de la disponibilidad del otro; en otras palabras, las microalgas no pueden absorber nitrógeno sin la presencia de fósforo, o viceversa (Andersen, 2005; Beuckels *et al.*, 2015).

La relación de Redfield es uno de los parámetros más utilizados en el campo de la ecología acuática; ya que explica que, en grandes rasgos, una proporción molar de carbono, nitrógeno y fósforo de 106:16:1 brinda el balance necesario para que ninguno de estos nutrientes se encuentre de forma limitante y su asimilación sea máxima (Andersen, 2005; Beuckelset *al.*, 2015). Pero, se ha demostrado que esta relación no es fija para todas las

microalgas, especialmente en las especies de agua dulce (Beuckelset *al.*, 2015). Por ejemplo, Rhee (1978) investigó el efecto de la relación N:P sobre el crecimiento de la microalga *Scenedesmus sp.*, determinando como óptima la relación de 30:1. Esto indica relaciones N:P por debajo de 30:1 tendrán como limitante al nitrógeno; mientras que en relaciones mayores a 30:1, el limitante será el fósforo.

Fotolimitación y Fotoinhibición

La disponibilidad de luz es el principal factor limitante de los cultivos fotoautótrofos de microalgas. Los nutrientes inorgánicos e incluso el CO₂ pueden ser incorporados al medio de cultivo en exceso, de forma que nunca sean limitantes al crecimiento. Por el contrario, la luz debe ser continuamente suministrada al cultivo, ya que la energía radiante no se puede acumular (Molina-Grima *et al.*, 1996).

El crecimiento de los microorganismos fotosintéticos es proporcional a la intensidad de la luz recibida siempre que ésta se sitúe por debajo de un cierto valor máximo. A partir de éste valor máximo, el crecimiento se ve fotolimitado; ya que, los sistemas fotosintéticos receptores se ven dañados, lo cual inhibe la fotosíntesis. Por lo tanto, las células en condiciones limitadas de luz crecerán lentamente mientras que a intensidades de luz muy elevadas se inhibirá su crecimiento, por lo que la intensidad luminosa se debe mantener en el rango óptimo correspondiente a cada especie (Andrade, 2008).

En la mayoría de las microalgas la fotosíntesis se ve saturada a niveles lumínicos que representan más del 30% de la radiación total solar, lo que supone unos 1.700 a 2.000 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ (91800 a 108000 LUX). Las microalgas se adaptan a los cambios de luz variando el contenido de clorofila *a* de sus células, de modo que las microalgas adaptadas a bajos niveles de luminosidad tienen una respuesta más rápida a cambios en la intensidad luminosa, ya que tienen más clorofila que las que están adaptadas a intensidades de luz altas (MAGRAMA, 2013).

Agitación

La agitación permite asegurar la distribución homogénea de las células y los nutrientes de la suspensión del cultivo; impide la sedimentación de las algas y su adherencia a las paredes

del reactor, homogeniza el pH y mejora la distribución de la luz a las células, de modo que cada célula esté expuesta a la misma intensidad de radiación y evita la sedimentación de las células y la estratificación térmica (Raven *et al.*, 2001).

d. Cinética del crecimiento

En microbiología, el crecimiento se define como un incremento en el número de células o de la masa celular de una población. De la misma manera que en bacterias y levaduras, las microalgas se reproducen principalmente por división celular binaria; en la cual, una célula duplica su carga genética y posteriormente se divide, dando lugar a dos células hijas (Madigan *et al.*, 1999). Debido a esto, la gran mayoría de análisis sobre el crecimiento de microalgas utilizan el modelo de crecimiento exponencial, como se muestra a continuación:

$$N_t = N_0 \times e^{rt}$$

En donde

N_t = es la densidad celular (cél/mL) en el tiempo t (h).

N_0 = es la densidad celular (cél/mL) inicial.

r = es la velocidad de intrínseca de crecimiento (día^{-1}).

t = es el intervalo tiempo (h).

Siguiendo este modelo, la velocidad de crecimiento es definida como el cambio en el número de células o de la masa celular por intervalo de tiempo (Δt). Andersen (2005) menciona que, la velocidad intrínseca de crecimiento (r) es igual a la velocidad específica de crecimiento (μ) cuando la mortalidad es 0, como se observa en la siguiente ecuación:

$$r = \mu = \frac{\ln(N_t) - \ln(N_0)}{\Delta t}$$

Sin embargo, el crecimiento poblacional se encuentra limitado por los nutrientes presentes en el ambiente y factores que limitan el crecimiento, como la luz o el pH (Lampert y Sommer, 2007).

Arredondo y Voltolina(1998) describen que la función que representa el crecimiento de las microalgas en ambientes limitantes, se ve representada en un curva logística, de la siguiente forma:

$$N_t = \frac{K}{1 + e^{a-rt}}$$

En donde

N_t = es la densidad celular (cél/mL) en el tiempo t (h).

K = capacidad de carga o densidad celular máxima alcanzada (cél/mL).

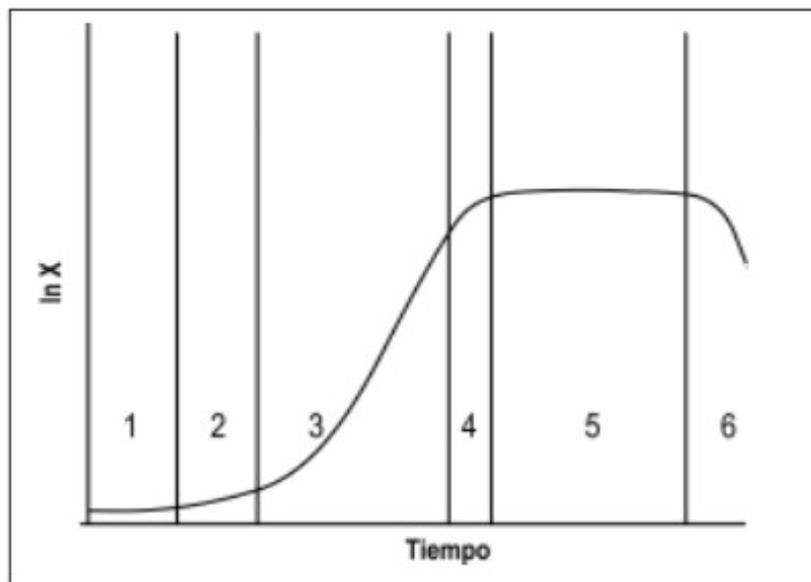
r = es la velocidad de crecimiento intrínseco (h^{-1}).

t = es el tiempo (h)

a = es una constante del modelo logístico que indica la posición relativa al origen.

Fases de crecimiento

En un cultivo de microalgas del tipo discontinuo (batch), donde hay crecimiento celular por un tiempo limitado, se pueden diferenciar las siguientes fases:



Fuente:Arredondo y Voltolina, 1998

Figura 1 - Fases de crecimiento de un cultivo de microalgas. (1)Fase lag, (2)Fase de aceleramiento, (3)Fase exponencial, (4)Fase de desaceleración, (5)Fase estacionaria y (6)Fase de muerte.

- **Fase lag** :También conocida como fase de adaptación, es la primera de las fases que puede observarse en el crecimiento de las microalgas (Ver Figura1). Esta fase representa un retardo en el crecimiento del número de células, debido al proceso de adaptación de las condiciones fisiológicas y metabólicas de la microalga para aprovechar las nuevas condiciones de cultivo en las que se encuentra (cantidad de luz, temperatura, nutrientes, agitación, etc.) (Arredondo y Voltolina, 1998).

La duración de esta fase depende mucho de dos factores: adaptación de la microalga al medio y la densidad del inóculo. Diferentes investigaciones han demostrado que si la microalga inoculada ha sido adaptada al medio de cultivo, ya no se registra una fase de crecimiento lag (Martinez *et al.*, 2000; Andersen, 2005). Otro factor influyente es la densidad del inóculo inicial, siendo que a mayor densidad de inóculo menor es el tiempo de adaptación (Yang *et al.*, 2014).

- **Fase de aceleramiento:** En esta fase, las microalgas ya se encuentra adaptadas al medio y los diferentes componentes estructurales se incrementan secuencialmente, iniciando con el ARN, seguido de las proteínas y del peso individual(Arredondo y Voltolina, 1998).

- **Fase exponencial:** Durante este periodo la velocidad de crecimiento adquiere su valor máximo y, en vista de la falta de factores limitantes, permanece aproximadamente constante. Por este motivo, la concentración celular aumenta rápidamente. En promedio, las microalgas doblan su biomasa en 24 horas. Sin embargo, algunas pueden doblar su biomasa en tiempos tan cortos como 3,5 horas (Brennan y Owende, 2010).

- **Fase de desaceleración:**Se empieza a notar el efecto de una menor disponibilidad de uno de los factores que regulan el crecimiento, por lo cual las condiciones de cultivo son sub-óptimas. En consecuencia, la tasa de duplicación disminuye aunque, en vista del alto número de células, la concentración celular alcanza su máximo valor (Andersen, 2005).

- **Fase estacionaria:** las condiciones de cultivo son limitantes y la natalidad es igual a la mortalidad, por lo cual la concentración celular y los componentes de la biomasa permanecen sin cambios relevantes. Este comportamiento puede ser ocasionado por la baja concentración de algún nutriente esencial, alto valor del pH (por consiguiente, poca

disponibilidad de sustrato fotosintético CO₂), o también por la baja penetración de la luz causada por la alta concentración celular (efecto de autosombreado) (Arredondo y Voltolina, 1998; Andersen, 2005).

- **Fase de muerte:** La tasa de mortalidad es superior a la de natalidad, por lo cual la concentración disminuye. Además se registra una disminución de la biomasa unitaria como resultado de un incremento en la proporción entre respiración y fotosíntesis y a la ausencia de nutrientes, que conlleva a la muerte o lisis celular (Arredondo y Voltolina, 1998).

2.2.3. Sistemas de cultivo

a. Tipo de Cultivos

Existen tres tipos de métodos a escala comercial de cultivo masivo de microalgas, dependiendo de cómo opere el sistema: cultivo discontinuo (batch), cultivo semi-continuo y cultivo continuo.

- **Cultivos Discontinuos:** También llamadas cultivos batch. En estos cultivos, la población va pasando por las distintas fases de crecimiento (lag, exponencial, estacionaria), ajustándose generalmente a una función logarítmica. Estos cultivos tienen la ventaja de ser fáciles de manejar y son adecuados para estudiar las cinéticas de crecimiento y los parámetros que inciden en el crecimiento celular (Andrade, 2008).
- **Cultivo Semi-continuo:** En este tipo de cultivo se recoge un pequeño volumen de un cultivo de microalgas que se encuentren en la fase exponencial de crecimiento, y se transfiere a un tubo o recipiente que contenga medio de cultivo recién formulado. De esta forma se provee a las microalgas con los nutrientes que necesita y no se registra una fase de adaptación pronunciada (Andersen, 2005).
- **Cultivo Continuo:** Es aquel en el que se requiere añadir continuamente nutrientes en la misma medida en que son retirados del medio por las microalgas, para así mantener los parámetros de crecimiento y la población celular en un nivel constante (Raven *et al.*, 2001).

b. Medios de cultivo

En su hábitat natural, las microalgas obtienen todos los nutrientes que requieren del agua en la que viven. Pero, en los cultivos en laboratorio es necesaria la adición de nutrientes que permitan su crecimiento. Los tipos de nutrientes y la proporción en la que se adicionan se conocen como medios de cultivo (Lourenço, 2006).

Existe una gran variedad de medios de cultivo; siendo la mayoría basadas en la composición de los nutrientes presentes en los cuerpos de agua naturales (océanos, lagos), así como de la composición de nutrientes presentes en las microalgas (Andersen, 2005).

Los medios de cultivo utilizados para algas se pueden agrupar en las siguientes categorías:

- **Medios enriquecidos usando aguas naturales:** Estos medios se basan en la adición de nutrientes a fuentes de agua naturales, provenientes de lagos, lagunas, agua marina, entre otros. El enriquecimiento con diferentes nutrientes químicos aumenta enormemente la velocidad de crecimiento y biomasa máxima de los cultivos de microalgas. Pero, se tiene como desventaja que no se conoce la composición exacta de estos medios, ya que las fuentes naturales tienen una gran cantidad de compuestos desconocidos (Andrade, 2008).
- **Medios de cultivo sintéticos:** Son preparados con agua destilada y sales minerales como la fuente de los nutrientes requeridos por las microalgas. Son utilizados para el mantenimiento de las cepas de microalgas y para experimentación. Entre los medios sintéticos más conocidos se puede mencionar : Chu #10, BG-11, Guillard f/2, Bold basal, entre otros (Andersen, 2005).
- **Medios orgánicos:** Estos medios se basan en la adición de suplementos orgánicos como la harina de pescado, de soya, humus de lombrices, ensilado de pescado, entre otros. En los últimos años también se están utilizando efluentes domésticos tratados y otras formas de aguas residuales, como efluentes de granjas de peces, de cerdos, entre otras. Según algunas investigaciones, estos medios de cultivo pueden producir en mayor o menor medida las mismas tasas de crecimiento que los medio de cultivo sintéticos de laboratorio (Andrade, 2008; Guerra, 2011; Magnotti et al., 2015)

2.3. *Scenedesmus sp.*

La microalga *Scenedesmus sp.* pertenece a la división *Chlorophyta*, Clase *Chlorophyceae*, Orden *Chlorococcales*, familia *Scenedesmaceae*. Puede encontrarse solitaria o en parejas formando cenobios, sus células son elípticas de color verde, de forma más larga que ancha, con un diámetro aproximado de 5 μm y una longitud de 6 μm (Andrade, 2008). Es una microalga dulceacuícola que se adapta muy fácilmente a diferentes condiciones ambientales, es por esto que frecuentemente se encuentra cómo una de las microalgas dominantes en lagunas y lagos (Mata, 2012).

En la actualidad esta microalga viene siendo muy estudiada gracias a las características que presenta como: alta capacidad de resistencia a condiciones extremas de cultivo (Nagase *et al.*, 1998; Ho *et al.*, 2010), elevada velocidad de crecimiento (Quevedo *et al.*, 2008; González-Garcinuño *et al.*, 2014), producción de compuestos bioactivos (Carotenoides, Luteína, Astaxantina) (Kim *et al.*, 2007; Qin *et al.*, 2008; Aburai *et al.*, 2015; Pancha *et al.*, 2015) y alta producción de lípidos y ácidos grasos (Abd El Bakyet *et al.*, 2012; Chu *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2015)

Las microalgas de este género pueden crecer en un amplio rango de temperaturas; siendo capaces de crecer en un rango desde 15 hasta 40 °C. Li *et al.* (2011) y Ruiz-Martinez *et al.* (2015) observaron que la temperatura óptima para el crecimiento de *Scenedesmus sp.* es alrededor de los 30 °C. Mientras Cabello *et al.* (2015) mencionan que la temperatura en la cual se obtiene la máxima actividad fotosintética para *Scenedesmus obtusiusculus* es a 35°C.

En un estudio realizado por Li *et al.* (2011) se demostró que la microalga *Scenedesmus sp.*, crece más rápidamente cuando la fuente de nitrógeno se encuentra en forma de amonio (NH_4^+), seguido de urea ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) y finalmente de nitrato (NO_3^-); sin embargo, la asimilación de fósforo y nitrógeno fue mayor en los cultivos en donde el nitrógeno estaba presente en forma de nitrato y urea que en el cultivo realizado con amonio.

Perez-García *et al.* (2011) estudiaron el metabolismo de las microalgas cultivadas en medios heterotróficos y señalaron que la mejor fuente de nitrógeno bajo condiciones tanto heterotróficas como autotróficas es el amonio (NH_4^+) debido a que es transportado a través

de la membrana por un grupo de proteínas pertenecientes a la familia transportadora de amonio (AMT), las cuales requieren poca energía para el transporte de estos compuestos. En cambio, las fuentes de nitrógeno en forma de nitrito (NO_2^-) y nitrato (NO_3^-) son transportadas a través de proteínas transportadoras de nitrito/nitrato (Nar1) y luego deben ser transformadas a NH_4^+ por las enzimas nitrato reductasa (NR) o nitrito reductasa (NiR), lo cual representa un mayor gasto energético para la asimilación del nitrógeno del medio. Gonzales-Garcinuño *et al.* (2014) mencionan que en medios heterotróficos bajo la presencia NH_4^+ y NO_3^- , las proteínas transportadoras AMT y Nar1 trabajan sinérgicamente, generando mejoras en el crecimiento de la microalga *Scenedesmus abundans*.

En los últimos años se vienen realizando muchas investigaciones en torno al uso de esta microalga para el tratamiento de aguas residuales, demostrándose con éxito la gran capacidad para la asimilación de compuestos de gran potencial de eutrofización (Martinez *et al.*, 2000; Nuñez *et al.*, 2001; Chacón *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2007; Andrade, 2008; Wu *et al.*, 2012; Guerrero-Cabrera *et al.*, 2014).

En la Tabla 1 se pueden apreciar velocidades de crecimiento registradas en diferentes especies del género *Scenedesmus* estudiadas durante los últimos años.

Tabla 1 - Velocidad de crecimiento (μ) reportada para el género *Scenedesmus*

Especie	Velocidad de crecimiento (μ) d ⁻¹	Condiciones de cultivo	Autor
<i>Scenedesmus sp.</i>	0.23	Condiciones mixotróficas, medio BG-11 efecto de diferentes fuentes de carbono orgánico.	Pancha <i>et al.</i> , 2015
<i>Scenedesmus spp.</i>	0.12	Condiciones autotróficas, medio Bold Basal combinado con efluente fermentado de cerdos.	Kim <i>et al.</i> , 2007
<i>Scenedesmus sp.</i>	0.27	Condiciones autotróficas, medio Bold Basal, evaluación del efecto de la luminosidad y salinidad	Aburai <i>et al.</i> , 2015
<i>Scenedesmus obtusiusculus.</i>	1.27	Condiciones autotróficas, medio BG-11, evaluación de la temperatura, pH y luminosidad sobre la fotosíntesis	Cabello <i>et al.</i> , 2015
<i>Scenedesmus sp.</i> LX1	0.76	Condiciones autotróficas, medio BG-11, efecto de la concentración de nitrógeno y fósforo sobre el crecimiento	Liet <i>et al.</i> , 2011
<i>Scenedesmus obliquus</i>	0.22	Condiciones autotróficas, medio MC, biofijación de CO ₂ en fotobioreactores.	Greque y Vieira, 2007
<i>Scenedesmus obliquus</i>	1.416	Condiciones autotróficas, 3 medios de cultivo sintéticos con la misma relación C:N:P.	Quevedo <i>et al.</i> , 2008
<i>Scenedesmus obliquus</i>	0.30	Condiciones mixotróficas, medio BG-11, efecto de Xylosa como fuente de carbono.	Yang <i>et al.</i> , 2014
<i>Scenedesmus sp.</i>	0.009	Condiciones autotróficas, medio formulado con el efluente del cultivo de tilapias.	Guerrero-cabrera <i>et al.</i> , 2014
<i>Scenedesmus abundans</i>	1.37	Condiciones heterotróficas, medio de cultivo Waris-H, evaluación del tipo de fuente de nitrógeno en el medio de cultivo.	González-Garcinuño <i>et al.</i> , 2014
<i>Scenedesmus obliquus</i>	0.56	Condiciones autotróficas, medio de cultivo BG-11, evaluación del uso de biogás como fuente de CO ₂	Thiansathit <i>et al.</i> , 2015

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Tipo de investigación

El presente trabajo de investigación sigue la metodología de una investigación de tipo experimental; en la cual, se realizaron bioensayos para determinar la velocidad de crecimiento, tiempo de duplicación y densidad celular máxima de la microalga *Scenedesmus sp.* en medios de cultivo formulados con los residuos sólidos y líquidos de un cultivo experimental de juveniles de Tilapia en sistemas biofloc.

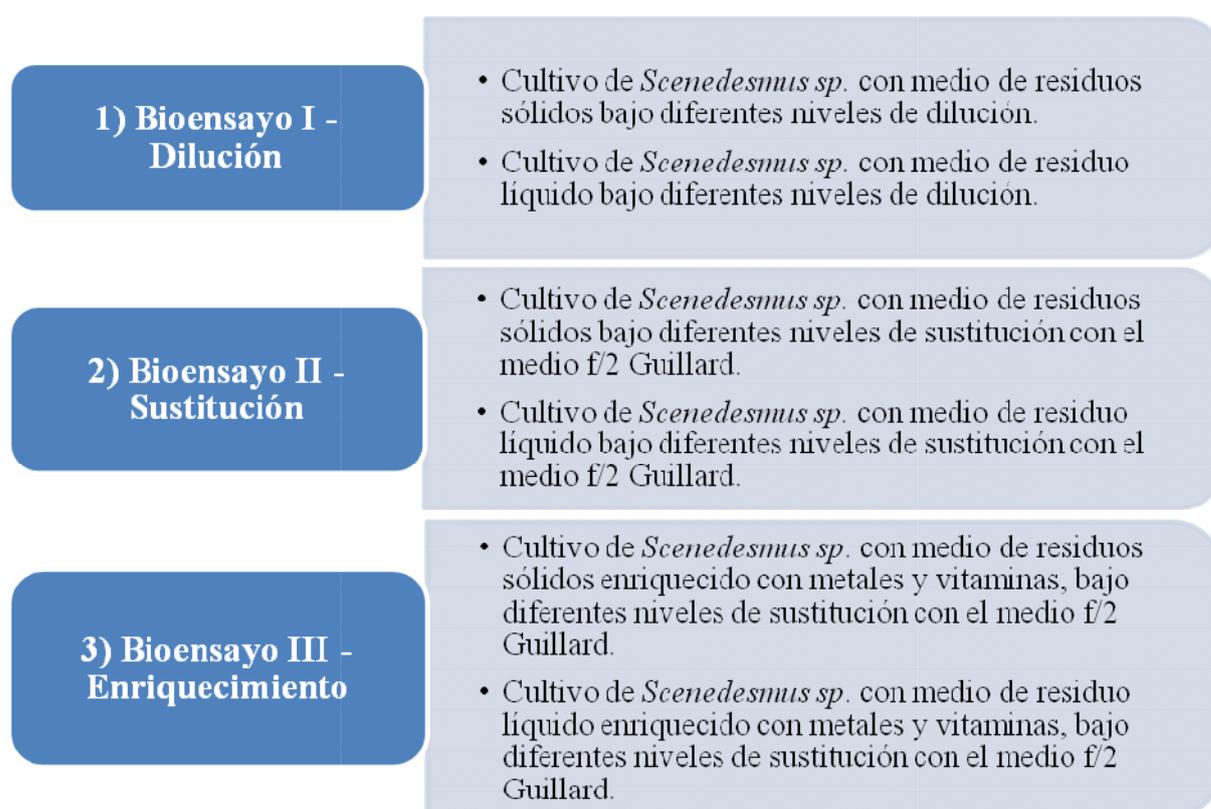
3.2. Diseño de la investigación

Los experimentos fueron realizados en los laboratorios de Maricultura Sustentable (LAMARSU) y laboratorio de Producción de Alimento Vivo (LAPAVI), mientras que los análisis de calidad de agua se realizaron en el laboratorio de Limnología (LALIMNO) de la Universidad Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) en Pernambuco – Brasil, en el marco del convenio establecido con esta Universidad y la Universidad Nacional Agraria La Molina en el Proyecto de Cooperación Bilateral Perú – Brasil – CONCYTEC – CNPQ.

La investigación se llevó a cabo con 3 bioensayos (Esquema 1). En el primer bioensayo (bioensayo I), se evaluaron los medios de cultivo formulados únicamente con el residuo sólido o líquido del sistema biofloc. Los tratamientos para este bioensayo consistieron en diferentes niveles de dilución en agua dulce. En el segundo bioensayo (bioensayo II), fueron evaluados diferentes niveles de sustitución de un medio de cultivo formulado sintéticamente, con los medios de cultivo de residuos sólidos y residuo líquido. Se utilizó como medio base el medio Guillard f/2 (Guillard, 1975). En el tercer bioensayo (bioensayo III), se evaluó el enriquecimiento de los medios de cultivo de residuos sólidos y líquidos con metales trazas y vitaminas. Los tratamientos para este bioensayo fueron diferentes niveles de sustitución con el medio base Guillard f/2, manteniendo la misma concentración de metales trazas y vitaminas en todos los tratamientos.

Control de sólidos en el sistema experimental de crianza de tilapias

El efluente fue colectado de un cultivo experimental de juveniles de tilapia gris (*Oreochromis niloticus*) en sistemas biofloc ubicado en el Laboratorio de Maricultura Sustentable (LAMARSU). Este experimento se realizó en tanques de cultivo de 40 L de capacidad; en donde, se evaluó el crecimiento de las tilapias bajo diferentes relaciones Carbono:Nitrógeno (C:N). Durante este experimento, no se realizaron recambios de agua; pero, si un control de la máxima concentración de sólidos suspendidos en el agua de cultivo.



Esquema 1 - Etapas de la investigación

Para controlar los sólidos, se determinó su concentración utilizando conos Imhoff. En estos, se colocó 1 litro del agua de los sistemas biofloc y se permitió la precipitación de los sólidos durante 15 minutos (Avnimelech, 2009). Una vez terminado el tiempo, se realizó la lectura, en mL/L, como volumen de flocs. Una vez determinada la concentración de sólidos se calculó el volumen de agua que se necesitó retirar para remover el exceso de sólidos en el cultivo experimental. Se utilizaron baldes de 20 litros para retirar el volumen determinado y se permitió la precipitación de los sólidos. El sobrenadante y los sólidos obtenidos se almacenaron para su uso como medios de cultivo.

3.3. Evaluación de los residuos líquidos del sistema biofloc como medio de cultivo para la producción de la microalga *Scenedesmus sp.*

i. Preparación del medio de cultivo con el efluente

El sobrenadante fue filtrado por gravedad a través de un embudo con un filtro de celulosa de 35 μm . Los sólidos retenidos en el filtro se colectaron para ser incorporados a los sólidos sedimentados provenientes de la precipitación del efluente. El sobrenadante filtrado, desde ahora conocido como residuo líquido, se colocó en matraces y fueron puestos en una autoclave vertical de la marca PHOENIX para su esterilización, a una temperatura de 120 °C y una presión de 1 Kgf/cm^2 (15 Psi) durante 20 minutos.

ii. Condiciones de cultivo

Se utilizó una cepa de la microalga *Scenedesmus sp.* proveniente del cepario del laboratorio de Producción de Alimento Vivo (LAPAVI). Antes del inicio de los experimentos, la microalga fue adaptada durante 3 días a los diferentes medios de cultivo. Se utilizó un inóculo inicial de 10×10^4 cel/mL para cada unidad experimental.

Los cultivos se llevaron a cabo en erlenmeyers de 1 litro. El sistema de cultivo fue semi-continuo, con fotoperiodo integral (24 horas de luz) e intensidad lumínica de 3200 LUX mediante lámparas fluorescentes de 40W (General Electric, Brazil), bajo aireación constante. La temperatura se mantuvo constante en 18 °C con la ayuda de un aire acondicionado. El pH inicial fue ajustado en 7 con soluciones 0.1N HCl o 0.1N NaOH.

a) Bioensayo I – Dilución

Durante este bioensayo, se evaluó la capacidad del medio preparado con el residuo líquido del cultivo de tilapias como medio de cultivo para la microalga *Scenedesmus sp.* La dilución se realizó utilizando agua dulce previamente clorada (200 ppm de hipoclorito de sodio) y filtrada por gravedad a través de un embudo con un filtro de celulosa de 35 μm . De esta manera se evaluó si el medio preparado con el efluente tuvo por sí solo la capacidad de ser utilizado como medio de cultivo para la producción de esta microalga.

Fueron utilizados 3 tratamientos y un control, cada uno con 3 repeticiones. Los tratamientos utilizados durante este bioensayo fueron: T1 (50% de medio de residuo líquido y 50% de agua dulce), T2 (75% de medio de residuo líquido y 25% de agua dulce) y T3 (100% de medio de residuo líquido). Adicionalmente, se tuvo como tratamiento control el medio Guillard f/2 (ver tabla 2).

Tabla 2 - Preparación de los tratamientos para el bioensayo I, dilución del medio de residuo líquido (RL).

Tratamiento	Soluciones adicionadas
T1(50% RL)	0.5 L de RL + 0.5 L de agua dulce filtrada y clorada
T2(75% RL)	0.75 L de RL + 0.25 litro de agua dulce filtrada y clorada
T3(100% RL)	1 L de RL
T4 (Guillard f/2)	1 mL de NO_3^- + 1 mL PO_4^{-2} + 1 mL metales traza + 0.2 mL vitaminas

b) Bioensayo II – Sustitución

Durante este bioensayo, fue evaluada la capacidad del medio generado de residuo líquido para ser utilizado como sustituto del medio de cultivo medio Guillard f/2.

Fueron utilizados 3 tratamientos y un control, cada uno con 3 repeticiones. Los tratamientos utilizados durante este bioensayo fueron: T1 (50% de medio de residuo líquido y 50% del medio Guillard f/2), T2 (75% de medio de residuo líquido y 25% del medio Guillard f/2) y T3 (100% de medio de residuo líquido). Adicionalmente, se tuvo como tratamiento control el medio Guillard f/2 (ver tabla 3).

Tabla 3 - Preparación de los tratamientos para el bioensayo II, sustitución del medio de residuo líquido (RL).

Tratamiento	Soluciones adicionadas
T1 (50% RL)	0.5 L de RL + 0.5 mL de NO_3^- + 0.5 mL PO_4^{-2} + 0.5 mL metales traza + 0.1 mL vitaminas
T2 (75% RL)	0.75 L de RL + 0.25 mL de NO_3^- + 0.25 mL PO_4^{-2} + 0.25 mL metales traza + 0.05 mL vitaminas
T3 (100% RL)	1 L de RL
T4 (Guillard f/2)	1 mL de NO_3^- + 1 mL PO_4^{-2} + 1 mL metales traza + 0.2 mL vitaminas

c) Bioensayo III – Enriquecimiento del medio de residuo líquido

Durante este bioensayo, fue evaluado el efecto del enriquecimiento del medio de residuo líquido, con metales trazas y vitaminas. De esta manera, se analizó si estos compuestos fueron limitantes para el crecimiento de la microalga *Scenedesmus sp.* en un medio de cultivo preparado con el residuo líquido de biofloc.

El enriquecimiento fue realizado adicionando al medio de residuo líquido, 1 mL/L y 0.2 mL/L, respectivamente, de las soluciones de metales traza y vitaminas que fueron preparadas para la formulación del medio Guillard f/2 (ver anexo 01).

Fueron utilizados 3 tratamientos y un control, cada uno con 3 repeticiones. Los tratamientos utilizados durante este bioensayo fueron: T1 (50% de medio de residuo líquido enriquecido y 50% del medio Guillard f/2), T2 (75% de medio de residuo líquido enriquecido y 25% del medio Guillard f/2) y T3(100% de medio de residuo líquido enriquecido). Adicionalmente, se tuvo como tratamiento control el medio Guillard f/2 (ver tabla 4).

Tabla 4 - Preparación de los tratamientos para el bioensayo III, enriquecimiento del medio de residuo líquido (RL).

Tratamiento	Soluciones adicionadas
T1(50% RL)	0.5 L de RL + 0.5 mL de NO_3^- + 0.5 mL PO_4^{-2} + 1 mL metales traza + 0.2 mL vitaminas
T2(75% RL)	0.75 L de RL + 0.25 mL de NO_3^- + 0.25 mL PO_4^{-2} + 1 mL metales traza + 0.2 mL vitaminas
T3(100% RL)	1 L de RL + 1 mL metales traza + 0.2 mL vitaminas
T4 (Guillard f/2)	1 mL de NO_3^- + 1 mL PO_4^{-2} + 1 mL metales traza + 0.2 mL vitaminas

iii. Evaluación de los tratamientos

El tiempo de cultivo de los bioensayos fue de entre 10 y 14 días; durante los cuales, se realizaron diariamente conteos de la densidad celular con ayuda de una cámara Neubauer y microscopio óptico binocular (OLYMPUS CH30), con un aumento de 400 veces la imagen total.

3.4. Evaluación de los residuos sólidos del sistema biofloc como medio de cultivo para la producción de la microalga *Scenedesmus sp.*

i. Preparación del medio de cultivo con el residuo sólido

El residuo sólido colectado por el filtrado fue sometido a un proceso de secado en estufa de la marca MARCONI modelo MA035/1/C, a una temperatura de 60 °C durante 24 horas.

Para la preparación de este medio de cultivo se modificó la metodología descrita por Guerra (2011), para la preparación de biofertilizantes líquidos a partir de humus de lombriz para el cultivo de *Tetraselmis tetrathele* y *Chaetoceros muelleri*. De esta manera, fueron disueltos 87.51 gramos de sólidos seco de biofloc en 1 litro de agua destilada (igual peso total que el disuelto para la preparación del medio Guillard f/2). Una vez disuelto, se procedió a esterilizar la solución en una autoclave vertical de la marca PHOENIX, a una temperatura de 120 °C y una presión de 1 Kgf/cm² (15 Psi) durante 20 minutos. La solución esterilizada fue filtrada por gravedad a través de un embudo con un filtro de celulosa de 35 µm y almacenada para la preparación de los bioensayos. Adicionalmente, fue tomada una muestra para determinar la cantidad de nitrógeno total, fósforo total y sulfato disuelto, en el laboratorio de Limnología (LALIMNO).

Con la solución concentrada de residuos sólidos, se prepararon las unidades experimentales en erlenmeyers de 2 litros. En estas, fueron añadidas alícuotas del medio preparado con los sólidos de biofloc de tal manera que se obtuvieron las relaciones planteadas para cada tratamiento. Finalmente, se enrazaron los erlenmeyers con agua dulce previamente clorada (200 ppm de hipoclorito de sodio) y filtrada por gravedad a través de un embudo con un filtro de celulosa de 35 µm.

iv. Condiciones de cultivo

Se utilizó una cepa de la microalga *Scenedesmus sp.* proveniente del cepario del laboratorio de Producción de Alimento Vivo (LAPAVI). Antes del inicio de los experimentos, la microalga fue adaptada durante 3 días a los diferentes medios de cultivo. Se utilizó un inóculo inicial de 10×10^4 cel/mL para cada unidad experimental.

Los cultivos se llevaron a cabo en erlenmeyers de 1 litro. El sistema de cultivo fue semi-continuo, con fotoperiodo integral (24 horas de luz) e intensidad lumínica de 3200 LUX mediante lámparas fluorescentes de 40W (General Electric, Brazil), bajo aireación constante. La temperatura se mantuvo constante en 18 °C con la ayuda de un aire acondicionado. El pH inicial fue ajustado en 7 con soluciones 0.1N HCl o 0.1N NaOH.

a) Bioensayo I – Dilución

Durante este bioensayo, se evaluó la capacidad que presentó el medio generado con el residuo sólido de biofloc como medio de cultivo para la microalga *Scenedesmus sp.* La dilución se realizó utilizando agua dulce previamente clorada (200 ppm de hipoclorito de sodio) y filtrada por gravedad a través de un embudo con un filtro de celulosa de 35 µm. De esta manera se experimentó si el medio preparado con residuo sólido tenía por si solo la capacidad de ser utilizado como medio de cultivo.

Tabla 5 - Composición de los tratamientos para el bioensayo I, dilución del medio de residuo sólido (RS).

Tratamiento	Soluciones adicionadas
T1(25%RS)	0.5 mL de RS
T2(50%RS)	1 mL de RS
T3(75%RS)	1.5 mL de RS
T4(100%RS)	2 mL de RS
T5 (Guillard f/2)	2 mL de NO ₃ ⁻ + 2 mL PO ₄ ⁻² + 2 mL metales traza + 0.4 mL vitaminas

Se utilizaron 4 tratamientos y un control, cada uno con 3 repeticiones. Los tratamientos utilizados durante este bioensayo fueron: T1 (25% de medio de residuo sólido y 75% de agua dulce), T2 (50% de medio de residuo sólido y 50% de agua dulce), T3 (75% de medio de residuo sólido y 25% de agua dulce) y T4 (100% de medio de residuo sólido). Adicionalmente, se tuvo como tratamiento control el medio Guillard f/2 (ver tabla 5).

b) Bioensayo II – Sustitución

Durante este bioensayo, se evaluó la capacidad que presentó el medio generado con el residuo sólido de biofloc para ser utilizado como sustituto del medio Guillard f/2.

Se utilizaron 4 tratamientos y un control, cada uno con 3 repeticiones. Los tratamientos utilizados durante este bioensayo fueron: T1 (25% de medio de residuo sólido y 75% del medio Guillard f/2), T2 (50% de medio de residuo sólido y 50% del medio Guillard f/2), T3 (75% de medio de residuo sólido y 25% del medio Guillard f/2) y T4 (100% de medio de residuo sólido). Adicionalmente, se tuvo como tratamiento control el medio Guillard f/2 (ver tabla 6).

Tabla 6– Preparación de los tratamientos para el bioensayo II, sustitución del medio de residuo sólido (RS).

Tratamiento	Soluciones adicionadas
T1(25%RS)	0.5 mL deRS + 1.5 mL de NO_3^- + 1.5 mL PO_4^{-2} + 1.5 mL metales traza + 0.3 mL Vitaminas
T2(50%RS)	1.0 mL deRS + 1.0 mL de NO_3^- + 1.0 mL PO_4^{-2} + 1.0 mL metales traza + 0.2 mL Vitaminas
T3(75%RS)	1.5 mL deRS + 0.5 mL de NO_3^- + 0.5 mL PO_4^{-2} + 0.5 mL metales traza + 0.1 mL Vitaminas
T4(100%RS)	2 mL deRS
T5 (Guillard f/2)	2 mL de NO_3^- + 2 mL PO_4^{-2} + 2 mL metales traza + 0.4 mL vitaminas

c) Bioensayo III – Enriquecimiento del medio de residuo sólido

Durante este bioensayo, se evaluó el efecto del enriquecimiento del medio de cultivo con residuo sólido, con metales trazas y vitaminas. De esta manera se analizó si estos compuestos eran limitantes en medios de cultivo preparados con el residuo sólido de biofloc.

El enriquecimiento fue realizado adicionando al medio formulado con el residuo sólido, 1 mL/L y 0.2 mL/L, respectivamente, de las soluciones de metales traza y vitaminas que fueron preparadas para la formulación del medio Guillard f/2 (ver anexo 01).

Se utilizaron 4 tratamientos y un control, cada uno con 3 repeticiones. Los tratamientos utilizados durante este bioensayo fueron: T1 (25% de medio de residuo sólido, con metales traza y vitaminas; y 75% del medio Guillard f/2), T2 (50% de medio de residuo sólido, con metales traza y vitaminas; y 50% del medio Guillard f/2), T3 (75% de medio de residuo sólido, con metales traza y vitaminas; y 25% del medio Guillard f/2) y T4 (100% de medio de residuo sólido, con metales traza y vitaminas). Adicionalmente, se tuvo como tratamiento control el medio Guillard f/2 (ver tabla 7).

Tabla 7 - Diseño de los tratamientos para el bioensayo III, enriquecimiento del medio de residuo sólido (RS).

Tratamiento	Soluciones adicionadas
T1(25%RS)	0.5 mL de RS + 1.5 mL de NO_3^- + 1.5 mL PO_4^{-2} + 2.0 mL metales traza + 0.4 mL vitaminas
T2(50%RS)	1.0 mL de RS + 1.0 mL de NO_3^- + 1.0 mL PO_4^{-2} + 2.0 mL metales traza + 0.4 mL vitaminas
T3(75%RS)	1.5 mL de RS + 0.5 mL de NO_3^- + 0.5 mL PO_4^{-2} + 2.0 mL metales traza + 0.4 mL vitaminas
T4(100%RS)	2 mL de RS + 2.0 mL metales traza + 0.4 mL vitaminas
T5 (Guillard f/2)	2 mL de NO_3^- + 2 mL PO_4^{-2} + 2 mL metales traza + 0.4 mL vitaminas

ii. Evaluación de las unidades experimentales

El tiempo de cultivo algal fue de entre 10 a 14 días; durante los cuales, se realizaron diariamente conteos de la densidad celular con ayuda de una cámara Neubauer y microscopio óptico binocular (OLYMPUS CH30), con un aumento de 400 veces la imagen total.

3.5. Procesamiento de datos

Con la información recolectada diariamente de los conteos de densidad celular, se construyeron las curvas de crecimiento de la microalga para cada uno de los tratamientos, de esta manera se determinaron las fases en las que se encontraba el cultivo.

Se determinó la velocidad de crecimiento (μ), durante la fase de crecimiento exponencial para cada una de las repeticiones, utilizando la ecuación 1. Para lo cual, se determinó el

inicio y final de la fase de crecimiento exponencial mediante el ajuste de la curva de crecimiento a una curva exponencial; determinando de esta manera que el final de la etapa exponencial se alcanzaba cuando el coeficiente de determinación (r^2) era mayor a 0.90 y se alcanzaba como mínimo la duplicación celular. También se determinó el tiempo de duplicación (TD) utilizando la ecuación 2.

La densidad celular máxima (DCM) fue determinada como el máximo valor registrado durante los conteos realizados diariamente con la cámara Neubauer.

$$\mu = \frac{\ln C2 - \ln C1}{\Delta T} \quad (\text{Ecuación 1}) \text{ (Arredondo y Voltolina, 1998)}$$

$$TD = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (\text{Ecuación 2}) \text{ (Arredondo y Voltolina, 1998)}$$

Donde:

C1: Concentración inicial de microalgas en la fase exponencial (Células/mL).

C2: Concentración final de microalgas en la fase exponencial (Células/mL).

ΔT : Variación de tiempo desde el inicio hasta el final de la fase de crecimiento exponencial.

El procesamiento de los datos se realizó mediante el paquete estadístico Minitab 16. Se realizó análisis de normalidad para las variables velocidad de crecimiento (K), tiempo de duplicación (TD) y densidad celular máxima (DCM) para cada tratamiento mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov con un nivel de significación del 95%. Si se cumplía el supuesto de normalidad, se realizó el análisis de varianza (ANOVA) y posteriormente la comparación de medias entre los tratamientos mediante la prueba de Tukey. Sino se cumplía el supuesto de normalidad los datos fueron analizados mediante la prueba de Kruskal-Wallis y se determinó si existió o no diferencia entre los tratamientos.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Obtención de residuos líquidos y sólidos del cultivo de tilapia en biofloc.

La colecta del efluente se realizó en función a la concentración de sólidos que presentaron cada una de las tanques del cultivo de tilapias en sistema biofloc. La mayor parte del efluente fue colectado del tratamiento que mantuvo la relación C:N de 20:1; ya que presentó la mayor concentración de sólidos suspendidos, del cual se extrajo el 50% del total de volumen utilizado. Los otros dos tratamientos (C:N de 15:1 y C:N de 10:1) aportaron el 30% y 20%, respectivamente, del volumen total utilizado para la formulación de los medios de cultivo. Una vez colectados se procedió a homogeneizarlos. La concentración de sólidos suspendidos final, fue alrededor de 800 mL/L de volumen de sólidos medidos en cono Imhoff.

El contenido de humedad de los residuos sólidos fue de $93.02 \pm 0.13\%$ (ver figura 2). Este valor guarda relación con las características de los flocs, los cuales son altamente porosos (Schryver, 2008).

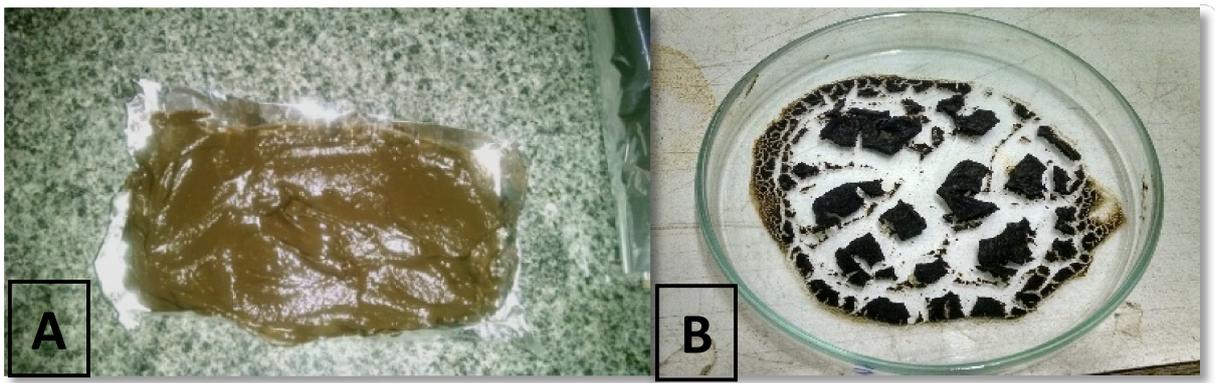


Figura 2 – (A) Residuo sólido de biofloc (B) Residuo sólido seco

Para la preparación del medio de cultivo con residuos sólidos, el residuo sólido seco fue vertido en agua destilada, pero estos sólidos presentaron una baja solubilidad en el agua; ya que se pudo observar que no todos los sólidos se lograron disolver. Esta solución fue

llevada al autoclave y una vez finalizada la esterilización, los residuos no disueltos se encontraron en el fondo del recipiente. Cuidadosamente, se filtró por gravedad a través de un embudo con un filtro de celulosa de 35 μm y finalmente se almacenó para la preparación de los bioensayos.

Otra observación que se registró fue la diferencia en la coloración inicial de los experimentos con residuo sólido y residuo líquido. Los medios generados con el residuo líquido presentaron una coloración parda-amarilliza, disminuyendo su intensidad en función al porcentaje de dilución del residuo líquido (ver figura 3). En el caso de los medios generados con el residuo sólido, no se observó que se generara coloración alguna en ninguno de los tratamientos. (ver figura 4). Esta característica pudo ser un factor de influencia durante los experimentos, debido a la dificultad que se podría generar para el paso de luz.



Figura 3 - (A) Residuo líquido del sistema biofloc. (B) unidades experimentales con las diluciones del residuo líquido de biofloc.



Figura 4 - Unidades experimentales con las diluciones del medio de residuos sólidos de biofloc.

4.2. Concentración de nitrógeno y fósforo

4.2.1. Residuo líquido

Se estimó la concentración de nitrógeno y fósforo inorgánicos en el residuo líquido a partir de la concentración estos nutrientes en el agua del cultivo de tilapia en sistemas biofloc, como se puede apreciar en el anexo 11. El nitrógeno se determinó a partir de la cantidad de este compuesto en el nitrito (NO_2), nitrato (NO_3) y nitrógeno amoniacal total (NAT); mientras que el fósforo se determinó a partir del contenido de ortofosfato disuelto (PO_4). En la tabla 8 se observan las concentraciones estimadas de nitrógeno y fósforo inorgánicos presentes en los medios formulados con residuo líquido para cada tratamiento durante los 3 bioensayos.

Tabla 8 – Concentración estimada de nitrógeno y fósforo inorgánicos (mg/mL) en cada tratamiento durante los bioensayos con el medio formulado con el residuo líquido (RL) de biofloc.

Tratamientos	Nitrógeno inorgánico (mg/L)			Fósforo inorgánico (mg/L)		
	Bioensayo I (Dilución)	Bioensayo II (Sustitución)	Bioensayo III (Enriquecimiento)	Bioensayo I (Dilución)	Bioensayo II (Sustitución)	Bioensayo III (Enriquecimiento)
T1 (50%RL)	0.422	6.598	6.598	0.261	0.822	0.822
T2 (75%RL)	0.633	3.721	3.721	0.391	0.672	0.672
T3 (100%RL)	0.844	0.844	0.844	0.522	0.522	0.522
T4 (Guillard f/2)	12.353	12.353	12.353	1.123	1.123	1.123

*La concentración de nutrientes presentes en esta tabla fue estimada a partir de fuentes de nitrógeno y fósforo inorgánicos.

En todos los tratamientos se verifica que las concentraciones de nitrógeno y fósforo inorgánicos contenidos en el medio de residuo líquido de biofloc son menores a las presentes en el medio Guillard f/2 (tratamiento T4).

Durante los bioensayos II y III, se puede observar el incremento de la concentración de estos nutrientes, gracias a la mezcla entre el medio de residuo líquido y Guillard f/2; sin embargo estas no logran alcanzar las concentraciones presentes en el medio Guillard f/2 puro.

En la tabla 9 se puede observar las relaciones N:P presentes en los diferentes tratamientos con el residuo líquido durante los 3 bioensayos. Se logra observar que durante el bioensayo I, todos los tratamientos con residuo líquido presentan una relación de 4:1, mientras que en los bioensayos II y III, la relación varía en función al porcentaje de sustitución con el medio Guillard f/2. En todos los casos, la relación N:P fue mayor en el medio Guillard f/2 (24:1).

Tabla 9 –Relación nitrógeno:fósforo(molécula de N/molécula de P) presente en cada tratamientos durante los bioensayos con el medio formulado con el residuo líquido (RL) de biofloc.

Tratamientos	Nitrógeno:Fósforo(molécula/molécula)		
	Bioensayo I (Dilución)	Bioensayo II (Sustitución)	Bioensayo III (Enriquecimiento)
T1 (50% RL)	3.6:1	17.8:1	17.8:1
T2 (75% RL)	3.6:1	12.3:1	12.3:1
T3 (100% RL)	3.6:1	3.6:1	3.6:1
T4 (Guillard f/2)	24.4:1	24.4:1	24.4:1

4.2.2. Residuo Sólido

En el anexo 10 se presentan los resultados de la caracterización de nutrientes realizada al medio formulado con el residuo sólido de biofloc. Los nutrientes fueron determinados como nitrógeno orgánico (Kjeldahl) y fósforo total (fósforo orgánico y inorgánico).

En la tabla 10 se logra observar la concentración de nitrógeno y fósforo de los medios formulados con residuo sólido para cada tratamiento durante los 3 bioensayos. Los tratamientos en donde se incluyó el medio formulado con residuo sólido presentaron elevadas concentraciones de nitrógeno y fósforo orgánicos. El tratamiento T4 del bioensayo I, muestra las concentraciones de nitrógeno y fósforo contenidos en el medio preparado 100% con residuo sólido de biofloc, las cuales son mucho mayores a las presentes en el medio Guillard f/2 (tratamiento T5).

Tabla 10 - Concentración estimada de nitrógeno y fósforo en cada tratamiento durante los bioensayos con el medio formulado con el residuo sólido(RS) de biofloc.

Tratamientos	Nitrógeno (mg/L)*			Fósforo (mg/L)**		
	Bioensayo I (Dilución)	Bioensayo II (Sustitución)	Bioensayo III (Enriquecimiento)	Bioensayo I (Dilución)	Bioensayo II (Sustitución)	Bioensayo III (Enriquecimiento)
T1 (25%RS)	200	209.26	209.26	252.50	253.34	253.34
T2 (50%RS)	400	406.18	406.18	505	505.56	505.56
T3 (75%RS)	600	603.09	603.09	757.50	757.78	757.78
T4 (100%RS)	800	800	800	1010	1010	1010
T5 (Guillard f/2)	12.35	12.35	12.35	1.12	1.12	1.12

* Concentración de nitrógeno orgánico.

**Concentración de fósforo total (orgánico e inorgánico).

Durante los bioensayos II y III, se puede observar que la mezcla entre el medio de residuo sólido y Guillard f/2 no representan un incremento significativo en la concentración de nutrientes; ya que la concentración de nitrógeno y fósforo encontrada en el medio de residuo sólido es mucho mayor (aproximadamente 65 veces mayor).

En la tabla 11 se puede observar las relaciones N:P presentes en los diferentes tratamientos con el residuo sólido durante los 3 bioensayos. Se logra observar que en todos los bioensayos la relación N:P se mantuvo alrededor de 2:1, esto se debió a la poca variación en la concentración de nutrientes generada por la mezcla del medio de residuo sólido y el medio Guillard f/2. En todos los casos, la relación N:P fue mayor en el medio Guillard f/2 (24:1).

Tabla 11 - Relación nitrógeno:fósforo (molécula de N/molécula de P) presente en cada tratamientos durante los bioensayos con el medio formulado con el residuo sólido (RS) de biofloc.

Tratamientos	Nitrógeno:Fósforo(molécula/molécula)		
	Bioensayo I (Dilución)	Bioensayo II (Sustitución)	Bioensayo III (Enriquecimiento)
T1 (25% RS)	1.8:1	1.8:1	1.8:1
T2 (50% RS)	1.8:1	1.8:1	1.8:1
T3 (75% RS)	1.8:1	1.8:1	1.8:1
T4 (100% RS)	1.8:1	1.8:1	1.8:1
T5 (Guillard f/2)	24.4:1	24.4:1	24.4:1

4.3. Medios formulados con el residuo líquido de biofloc

4.3.1. Bioensayo I – Dilución

En la figura 5 se pueden observar las curvas de crecimiento promedio de la microalga *Scenedesmus sp.* cultivada en los medios formulados con el residuo líquido de biofloc. Es posible apreciar el rápido crecimiento de la microalga en todos los tratamientos, desde el primer día de experimentación; lo cual pudo ser provocado gracias a la adaptación previa de la microalga a los medios utilizados. Se puede observar que en el cuarto día de experimentación, el tratamiento T1 (50% de residuo líquido) registró una disminución de la pendiente de la curva de crecimiento; mientras que en los tratamientos T2 (75% de residuo líquido), T3 (100% de residuo líquido) y el control T4 (Guillard f/2) sucedió el quinto día. Esta es una característica que indica la desaceleración del crecimiento y inicio de la fase de estabilidad (Andersen, 2005). A partir del día 10 se puede apreciar que empieza la disminución de la densidad celular, indicador del final de la fase de estabilidad e inicio de la fase de muerte (Arredondo y Voltolina, 1998).

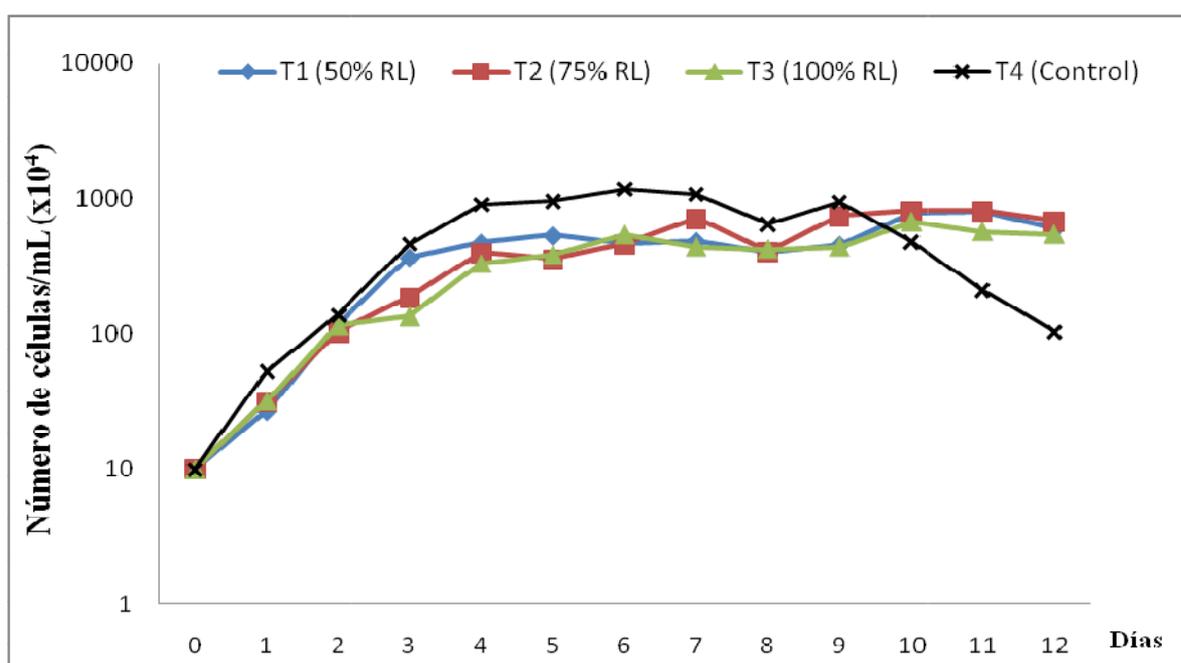


Figura 5 - Curvas de crecimiento promedio de la microalga *Scenedesmus sp.* cultivada en el bioensayo I, dilución del medio formulado con el residuo líquido (RL) de biofloc.

En la tabla 12 se observa que se encontraron diferencias significativas en la velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación ($p < 0.05$) entre el tratamiento T1 (50% residuo líquido) y los tratamientos T2 (75% residuo líquido) y T3 (100% residuo líquido).

Tabla 12 - Velocidad de crecimiento (μ), tiempo de duplicación (TD) y densidad celular máxima (DCM) de la microalga *Scenedesmus sp.* cultivada en el bioensayo I, dilución del medio formulado con el residuo líquido de biofloc (RL).

	μ (día ⁻¹)	TD (día)	DCM (cel/mL x10 ⁴)
T1 (50% Residuo Líquido)	1.199 ± 0.069 a	0.579 ± 0.033 a	969.7 ± 390.3 a
T2 (75% Residuo Líquido)	0.947 ± 0.096 b	0.737 ± 0.075 b	978.0 ± 680.7 a
T3 (100% Residuo Líquido)	0.944 ± 0.024 b	0.735 ± 0.019 b	780.8 ± 265.1 a
T4 (Guillard f/2)	1.122 ± 0.064 ab	0.619 ± 0.034 ab	1283.3 ± 202.3 a

*Los valores representan los promedios ± desviación estándar de las variables. Valores que comparten al menos una letra no mostraron diferencias estadísticas ($p < 0.05$)

La figura 6 muestra que se encontraron diferencias significativas entre el tratamiento T1 (50% residuo líquido) y los tratamientos T2 (75% residuo líquido) y T3 (100% residuo líquido). El tratamiento T4 (Guillard f/2) no mostró diferencias significativas con ninguno de los tratamientos formulados con el residuo líquido. La mayor velocidad de crecimiento se registró en T1 (50% RL), $1.199 \pm 0.069 \text{ día}^{-1}$, seguido de T4 (Guillard f/2), $1.122 \pm 0.064 \text{ día}^{-1}$.

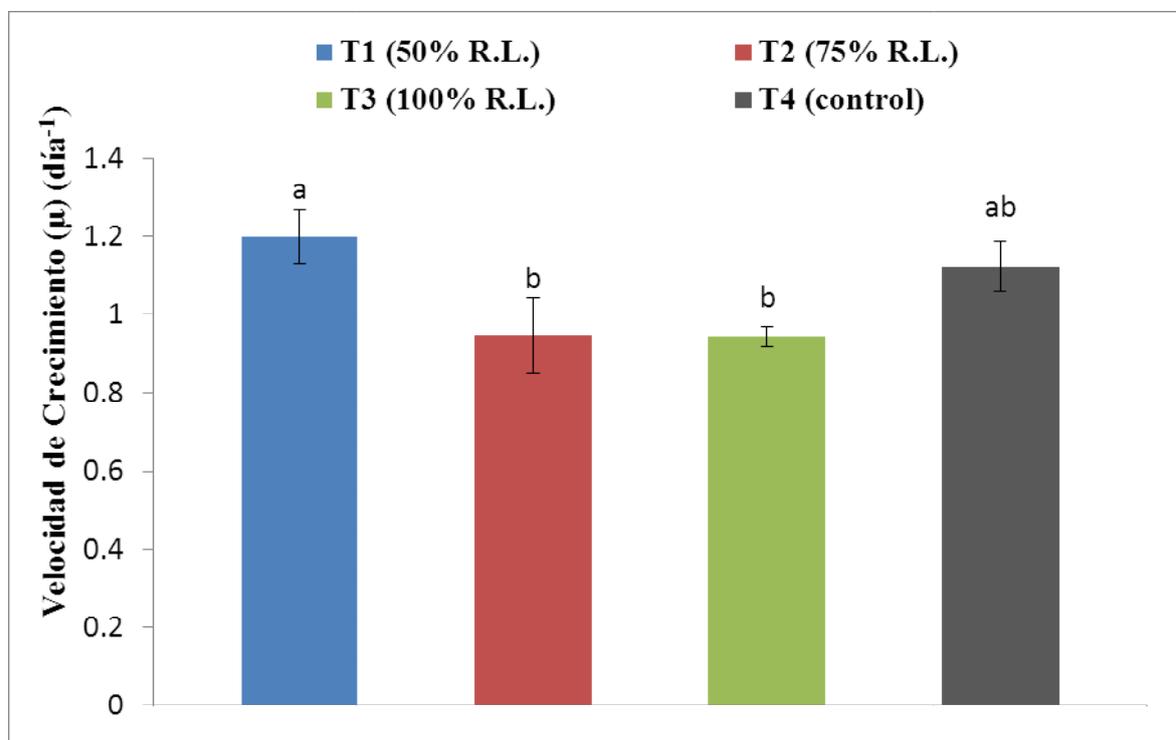


Figura6 – Promedio de las velocidades de crecimiento (μ) de la microalga *Scenedesmus sp.* cultivada en el bioensayo I, dilución del medio formulado con el residuo líquido (RL) de biofloc.

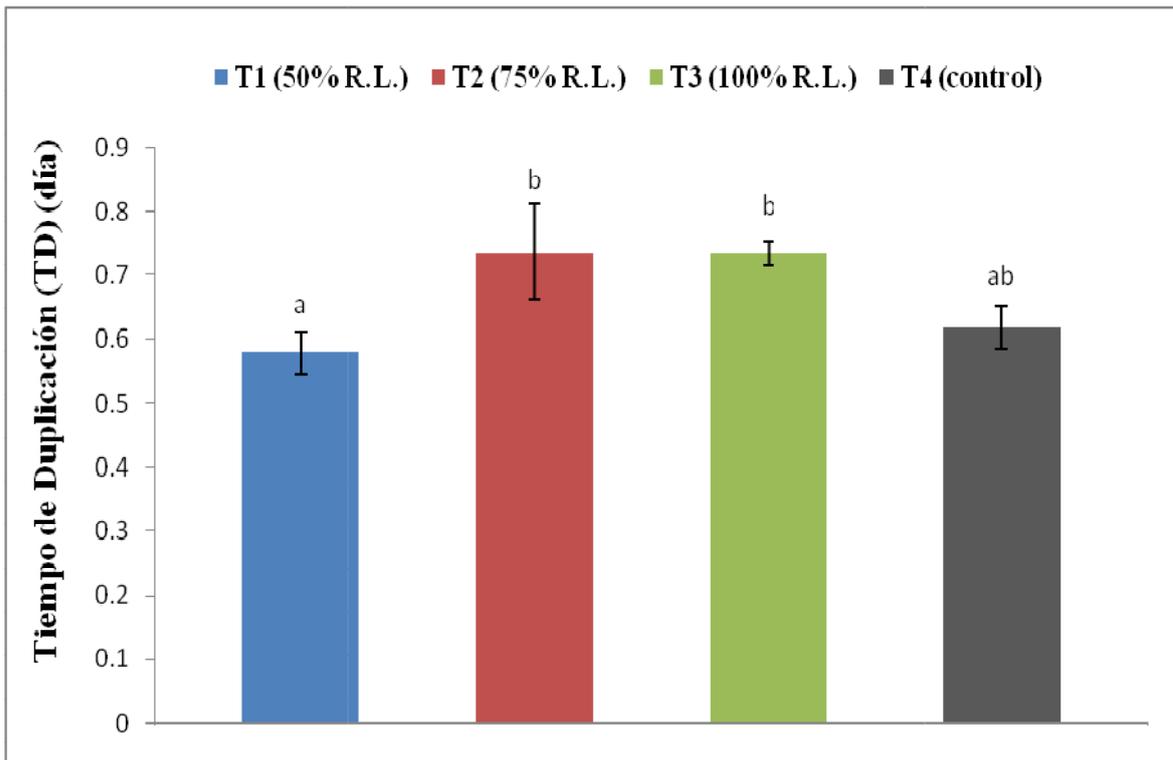


Figura 7 – Promedio de los tiempos de duplicación (TD) de la microalga *Scenedesmus sp.* cultivada en el bioensayo I, dilución del medio formulado con el residuo líquido (RL) de biofloc.

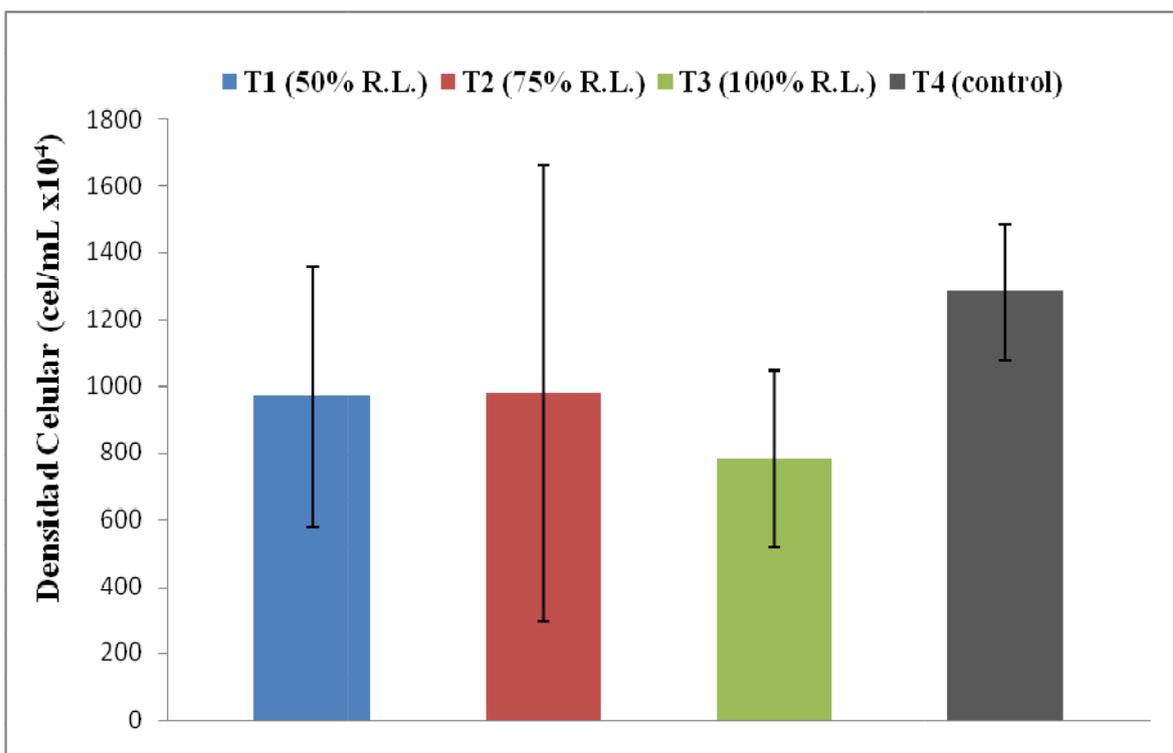


Figura 8 – Promedio de las densidades celulares máximas (DCM) de la microalga *Scenedesmus sp.* cultivada en el bioensayo I, dilución del medio formulado con el residuo líquido (RL) de biofloc.

En la figura 7 se observa que se encontraron diferencias significativas entre el tratamiento T1 (50% residuo líquido) y los tratamientos T2 (75% residuo líquido) y T3 (100% residuo líquido). El tratamiento T4 (Guillard f/2) no mostró diferencias significativas con ninguno de los tratamientos formulados con el residuo líquido. El menor tiempo de duplicación fue encontrado en T1 (50% residuo líquido), 0.579 ± 0.033 día, seguido de T4 (Guillard f/2), 0.619 ± 0.034 día.

En la figura 8 se observa que no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos para la densidad celular máxima (DCM) ($p > 0.05$). El tratamiento T4 (Guillard f/2) presenta la mayor densidad celular promedio, $1283.3 \pm 202.3 \times 10^4$ cel/mL

4.3.2. Bioensayo II – Sustitución

En la figura 9 se observa las curvas de crecimiento de la microalga *Scenedesmus sp.* cultivada en el bioensayo II - sustitución del medio Guillard f/2 con el medio formulado con el residuo líquido de biofloc.

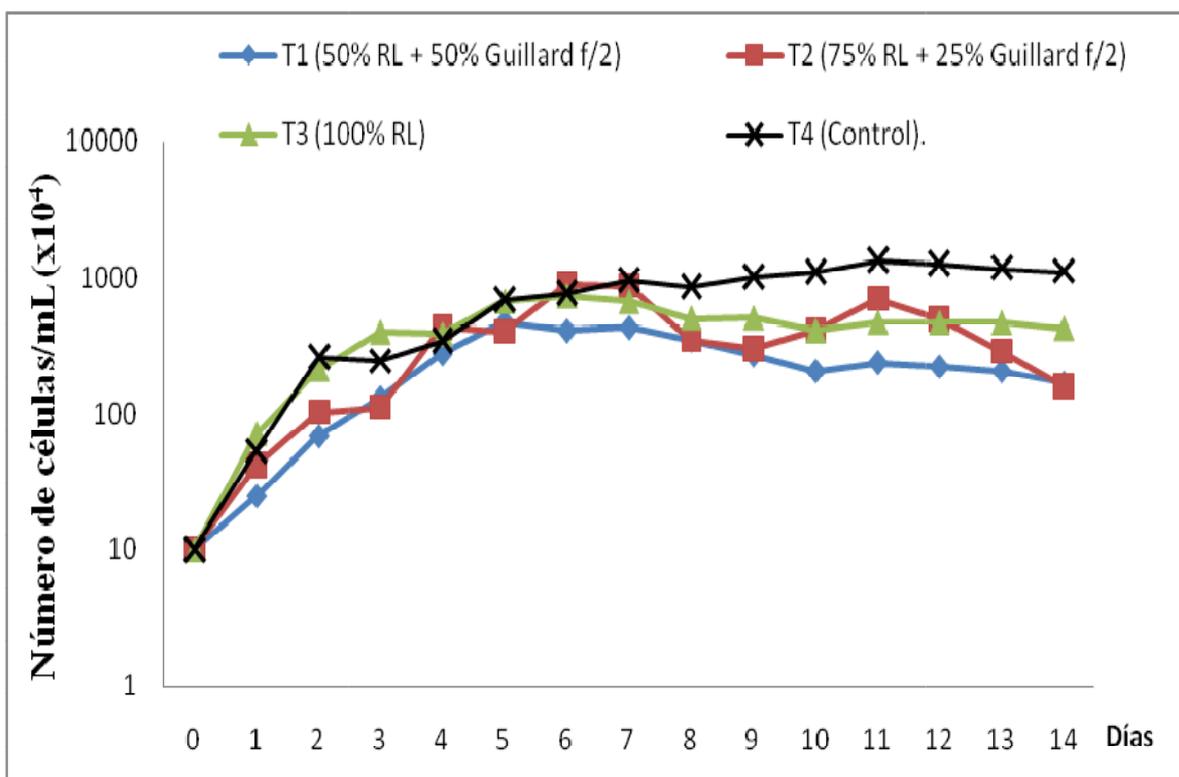


Figura 9 -Curvas de crecimiento promedio de la microalga *Scenedesmus sp.* cultivada en el bioensayo II, sustitución del medio Guillard f/2 por el medio formulado con el residuo líquido (RL) de biofloc.

Se puede observar que luego del quinto día de experimentación, los tratamientos T1 (50% RL + 50% Guillard), T3 (100% RL) y T4 (Guillard f/2) registraron una disminución en la pendiente sus curvas de crecimiento; mientras que para el tratamiento T2 (75% RL) la disminución ocurrió pasado el sexto día. Lo que estaría indicando el final de la fase exponencial e inicio de la fase de estabilidad (Andersen, 2005). A partir del día 10 se puede apreciar el inicio en la disminución de las densidades celulares, lo que indicaría el final de la fase de estabilidad e inicio de la fase de muerte (Arredondo y Voltolina, 1998).

En la tabla 13 se puede observar que se encontraron diferencias significativas para la velocidad de crecimiento, tiempo de duplicación y densidad celular máxima ($p < 0.05$)

Tabla 13 - Velocidad de crecimiento (μ), tiempo de duplicación (TD) y densidad celular máxima (DCM) de la microalga *Scenedesmus sp.* cultivada en el bioensayo II, sustitución del medio Guillard f/2 por el medio formulado con el residuo líquido de biofloc (RL).

	μ (día ⁻¹)	TD (día)	DCM (cel/mL x10 ⁴)
T1 (50% RL + 50% Guillard f/2)	0.808± 0.174 a	0.884± 0.182 a	580.0± 103.3 a
T2 (75% RL+ 25% Guillard f/2)	0.748 ± 0.008 a	0.927± 0.010 a	1020.8± 268.6 ab
T3 (100% RL)	1.324± 0.017 b	0.524± 0.007 b	908.3± 335.2 ab
T4 (Guillard f/2)	0.829± 0.084 a	0.842± 0.090 a	1521.7± 219.6 b

*Los valores representan los promedios ± desviación estándar de las variables. Valores que comparten al menos una letra no mostraron diferencias estadísticas ($p < 0.05$)

En la figura 10 se puede apreciar que existen diferencias significativas entre el tratamiento T3 (100% RL) y los tratamientos T4 (Guillard f/2), T1 (50% RL + 50% Guillard f/2) y T2 (75% RL + 25% Guillard f/2) para la velocidad de crecimiento. La mayor velocidad de crecimiento se registró en el tratamiento T3, 1.324± 0.017 día⁻¹.

En la figura 11 se puede apreciar que existen diferencias significativas entre el tratamiento T3 (100% RL) y los tratamientos T4 (Guillard f/2), T1 (50% RL + 50% Guillard f/2) y T2 (75% RL + 25% Guillard f/2) para el tiempo de duplicación. Siendo el tratamiento T3 (100% RL) en donde se registró el menor tiempo de duplicación, 0.524± 0.007 día.

En la figura 12 se observa que se encontraron diferencias significativas entre el tratamiento T1 (50% RL + 50% Guillard f/2) y el tratamiento T4 (Guillard f/2) para la densidad

celular máxima. La mayor densidad celular fue encontrada en el tratamiento T4 (Guillard f/2), $1521.7 \pm 219.6 \text{ cel/mL} \times 10^4$, seguida por el tratamiento T2 (75% RL + 25% Guillard f/2), $1020.8 \pm 268.6 \text{ cel/mL} \times 10^4$.

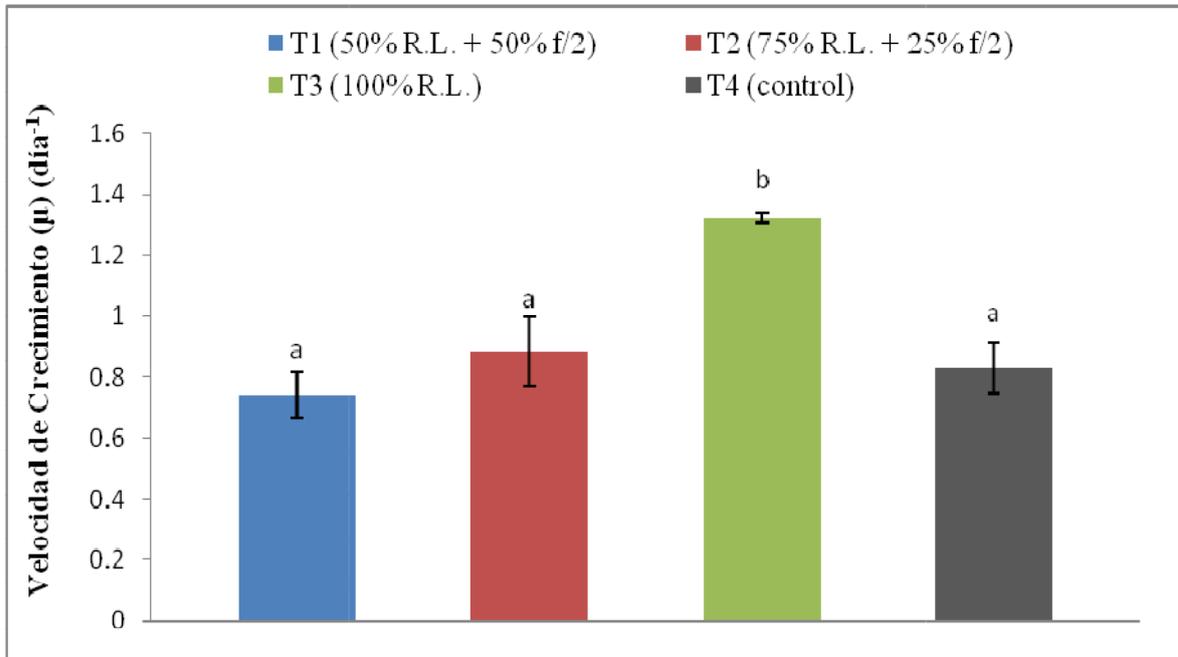


Figura10 - Promedio de las velocidades de crecimiento (μ) de la microalga *Scenedesmus sp.* cultivada en el bioensayo II, sustitución del medio Guillard f/2 por el medio formulado con el residuo líquido (RL) de biofloc.

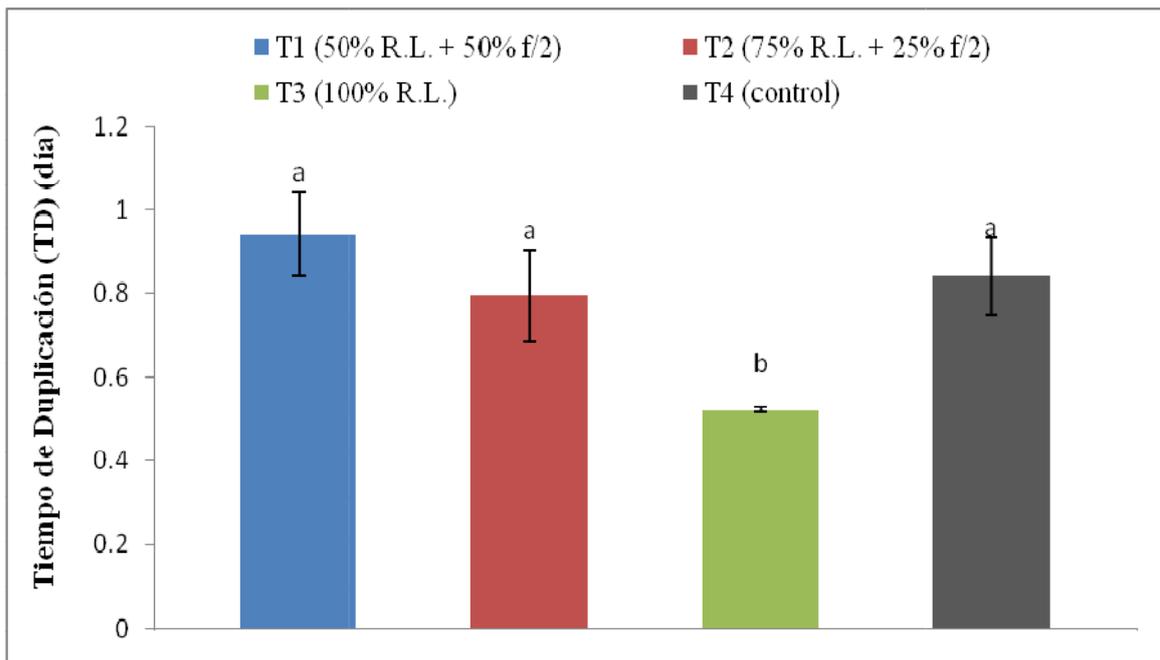


Figura11 - Promedio de los tiempos de duplicación (TD) de la microalga *Scenedesmus sp.* cultivada en el bioensayo II, sustitución del medio Guillard f/2 por el medio formulado con el residuo líquido (RL) de biofloc.

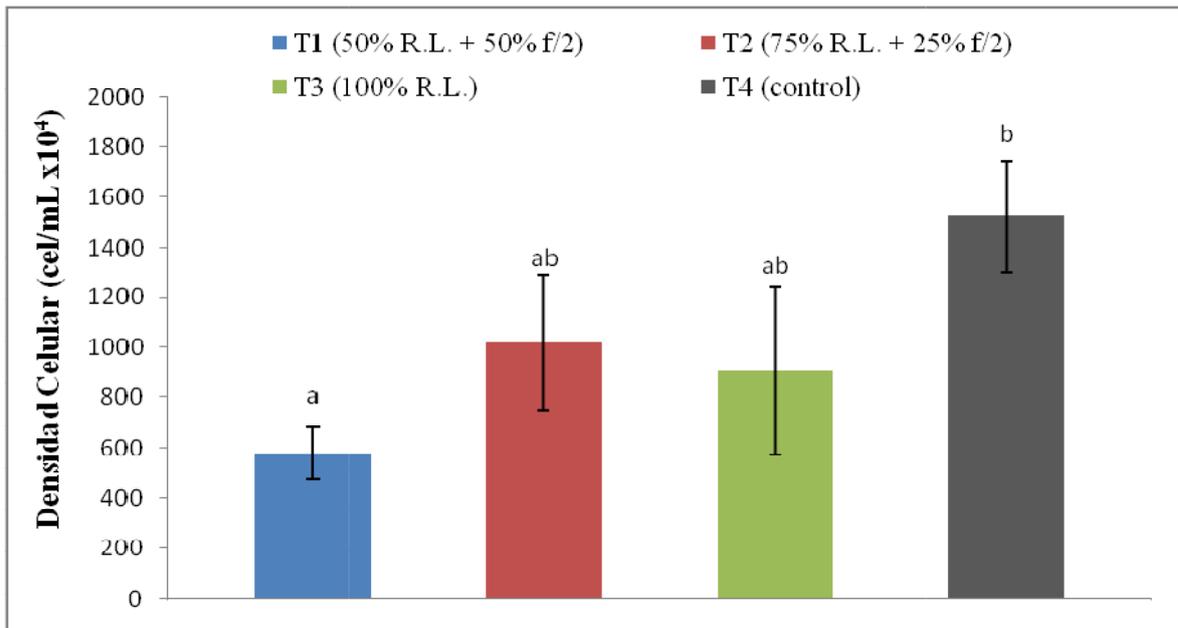


Figura12 - Promedio de las densidades celulares máximas (DCM) de la microalga *Scenedesmus sp.* cultivada en el bioensayo II, sustitución del medio Guillard f/2 por el medio formulado con el residuo líquido (RL) de biofloc.

4.3.3. Bioensayo III - Enriquecimiento

En la figura 13 se pueden observar las curvas de crecimiento de la microalga *Scenedesmus sp.* cultivada en el bioensayo III - sustitución del medio Guillard f/2 con el medio formulado con el residuo líquido de biofloc enriquecido con metales trazas y vitaminas. Se

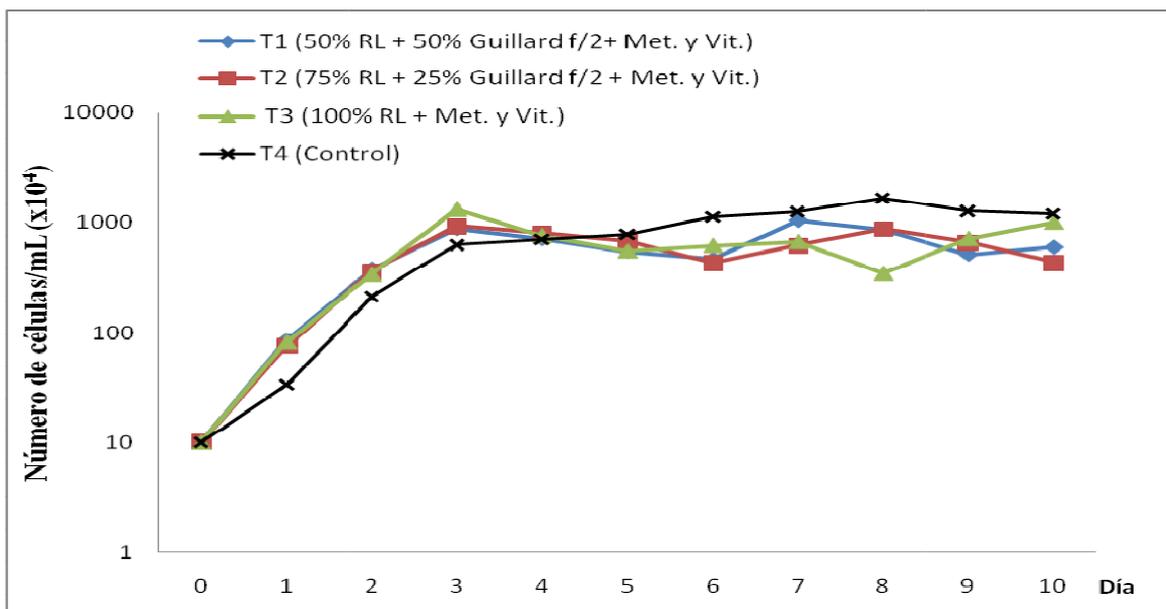


Figura 13 - Curvas de crecimiento promedio de la microalga *Scenedesmus sp.* cultivada en el bioensayo III, sustitución del medio Guillard f/2 por el medio formulado con el residuo líquido (RL) de biofloc enriquecido con metales y vitaminas.

puede apreciar que luego del tercer día de experimentación, se registró en todos los tratamientos una caída en las pendientes de sus curvas de crecimiento. Esta disminución indicaría el final de la fase exponencial e inicio de la fase de estabilidad (Andersen, 2005).

En la tabla 14 se puede observar que se encontraron diferencias significativas para las variables velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación ($p < 0.05$) entre los tratamientos T3 (100% RL + Metales y Vit.) y T4 (Guillard f/2).

Tabla 14 - Velocidad de crecimiento (μ), tiempo de duplicación (TD) y densidad celular máxima (DCM) de la microalga *Scenedesmus sp.* cultivada en el bioensayo III, sustitución del medio Guillard f/2 por el medio formulado con el residuo líquido (RL) de biofloc enriquecido con metales y vitaminas.

	μ (día ⁻¹)	TD (día)	DCM (cel/mL x10 ⁴)
T1 (50% RL + 50% Guillard f/2+ Met y Vit.)	1.492 ± 0.070 ab	0.465 ± 0.022 ab	1111.7 ± 460.5 a
T2 (75% RL+ 25% Guillard f/2+ Met y Vit.)	1.504 ± 0.093 ab	0.462 ± 0.028 ab	1271.7 ± 450.6 a
T3 (100% RL + Met y Vit.)	1.628 ± 0.059 a	0.426 ± 0.016 a	1410.0 ± 105.4 a
T4 (Guillard f/2)	1.367 ± 0.100 b	0.509 ± 0.036 b	1685.0 ± 141.1 a

*Los valores representan los promedios ± desviación estándar de las variables. Valores que compartan al menos una letra no mostraron diferencias estadísticas ($p < 0.05$)

En la figura 14 se puede observar que se registraron diferencias significativas entre el tratamiento T3 (100% RL + Metales y Vit.) y el tratamiento T4 (Guillard f/2) para la variable velocidad de crecimiento. En T3 se registró la mayor velocidad de crecimiento 1.628 ± 0.059 día⁻¹, mientras en el control se encontró la menor velocidad, 1.367 ± 0.100 día⁻¹.

En la figura 15 se puede observar que se registraron diferencias significativas entre el tratamiento T3 (100% RL + Metales y Vit.) y el tratamiento T4 (Guillard f/2) para la variable tiempo de duplicación. En T3 se obtuvo el menor tiempo de duplicación 0.426 ± 0.016 día, mientras en el control se encontró el mayor tiempo, 0.509 ± 0.036 día.

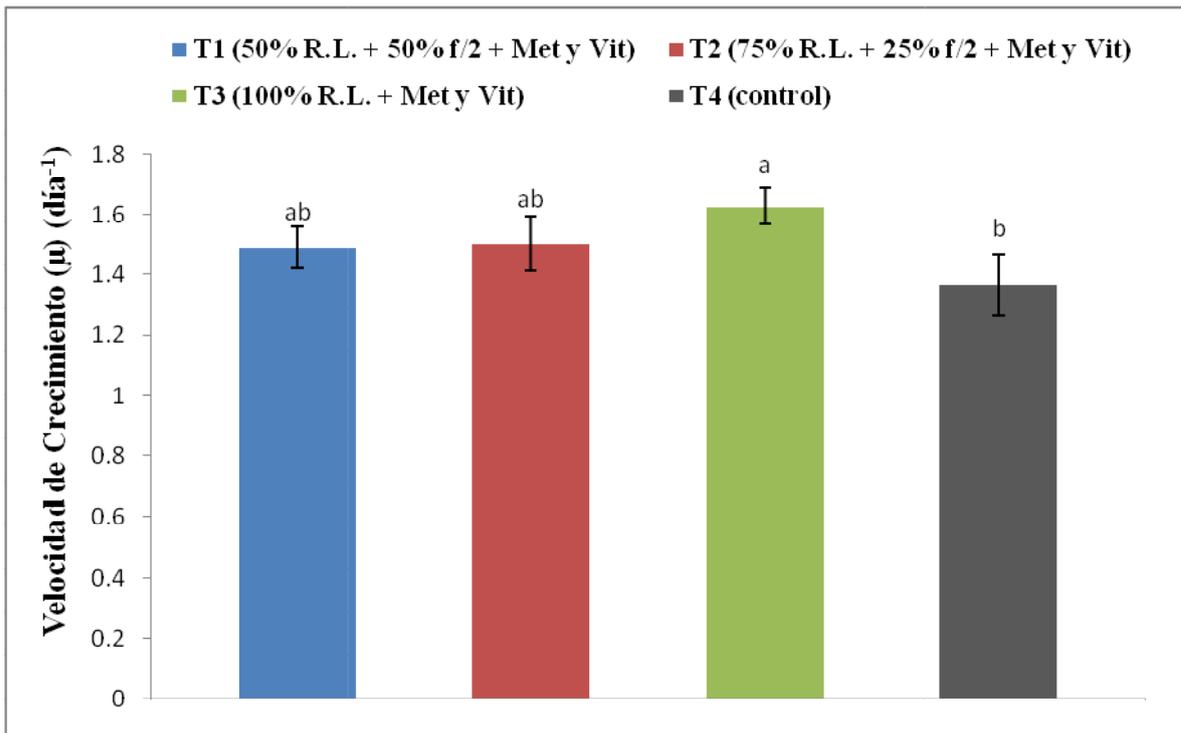


Figura 14 - Promedio de las velocidades de crecimiento (μ) de la microalga *Scenedesmus sp.* cultivada en el bioensayo III, sustitución del medio Guillard f/2 por el medio formulado con el residuo líquido (RL) de biofloc enriquecido con metales y vitaminas.

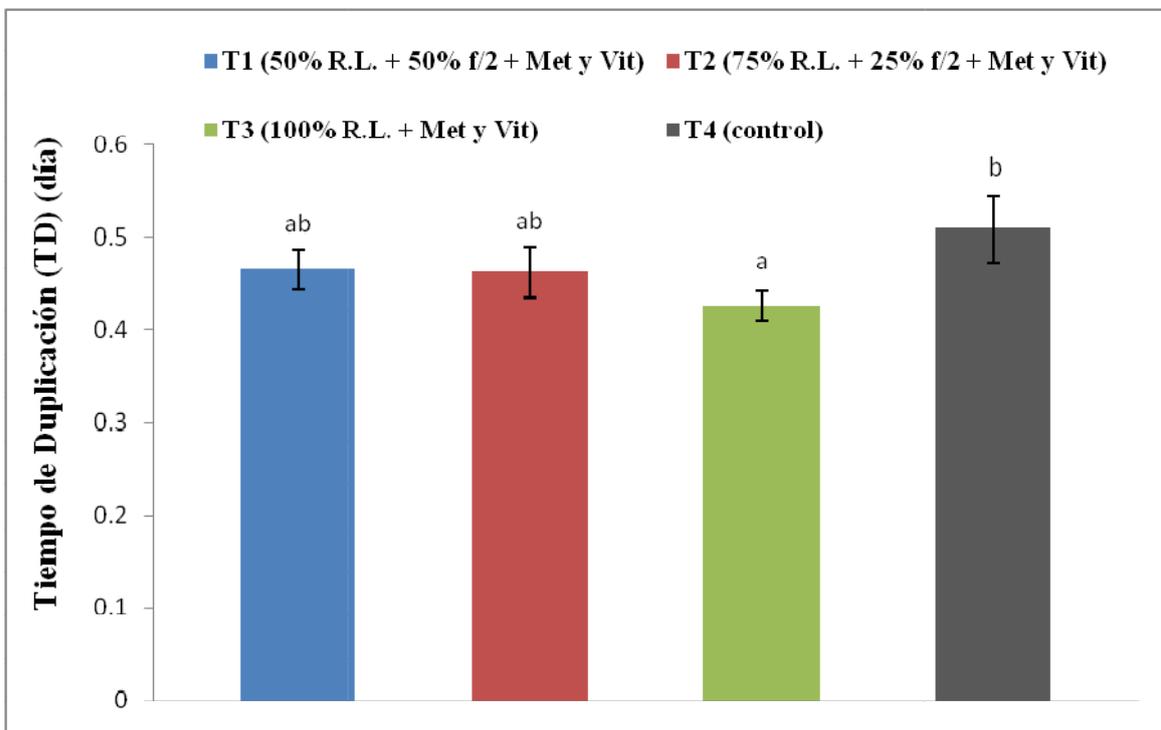


Figura15 - Promedio de los tiempos de duplicación (TD) de la microalga *Scenedesmus sp.* cultivada en el bioensayo III, sustitución del medio Guillard f/2 por el medio formulado con el residuo líquido (RL) de biofloc enriquecido con metales y vitaminas.

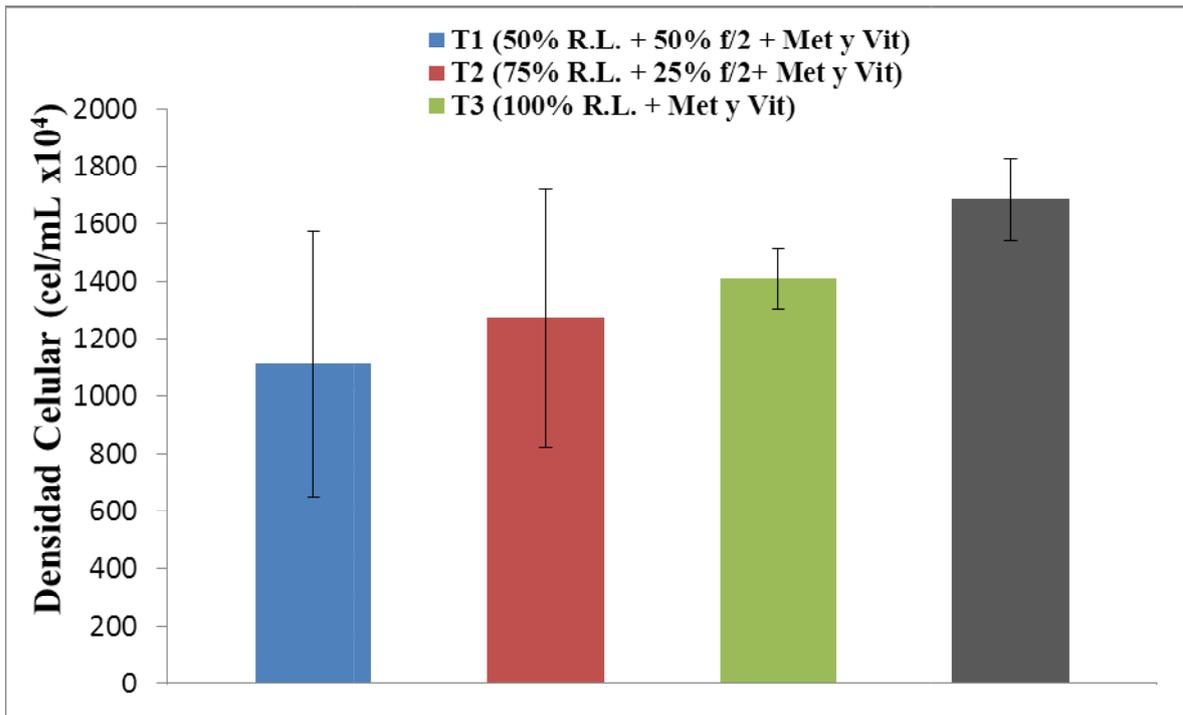


Figura16 - Promedio de las densidades celulares máximas (DCM) de la microalga *Scenedesmus sp.* cultivada en el bioensayo III, sustitución del medio Guillard f/2 por el medio formulado con el residuo líquido (RL) de biofloc enriquecido con metales y vitaminas.

En la figura 16 se logra apreciar que no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos para la variable densidad celular máxima (DCM). La mayor densidad celular promedio se observó en el tratamiento T4 (Guillard f/2), $1685 \pm 141.1 \times 10^4$ cel./mL, seguido por el tratamiento T3 (100% RL + Metales y Vit.) $1410.0 \pm 105.4 \times 10^4$ cel./mL. También se observa que el tratamiento T1 (50% RL + 50% Guillard + Metales y Vit.) y el tratamiento T2 (75% RL + 25% Guillard f/2 + Metales y Vit.) presentan coeficiente de variabilidad, 41.4% y 35.4% respectivamente, los cuales podrían explicar la falta de diferencias significativas.

4.4. Medio formulado con el residuo sólido de biofloc

4.4.1. Bioensayo I – Dilución

En la figura 17 se observan las curvas de crecimiento de la microalga *Scenedesmus sp.* cultivada en los medios formulados con el residuo sólido de biofloc. Se puede apreciar que para todos los tratamientos, excepto el tratamiento T1 (25% de residuo sólido) se registró una caída de la densidad celular durante el primer día de experimentación; esto

podría indicar la presencia de la fase de adaptación (fase lag). En los días posteriores la microalga muestra un aumento de la densidad celular.

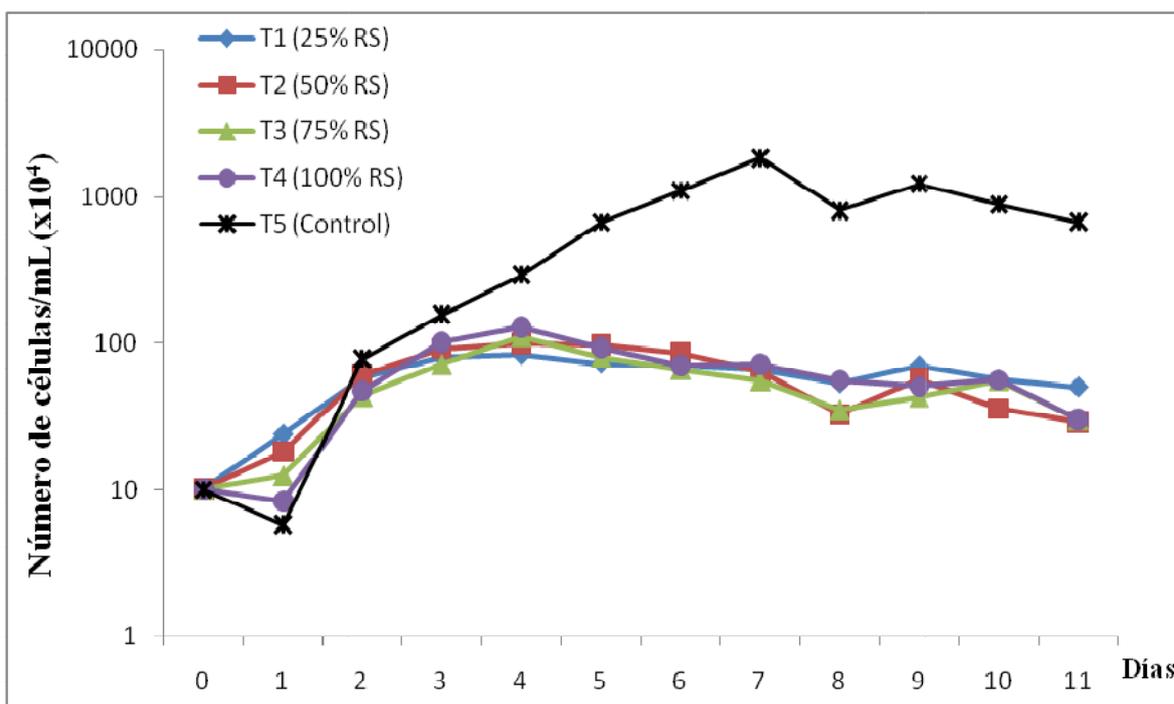


Figura 17 - Curvas de crecimiento promedio de la microalga *Scenedesmus sp.* cultivada en el bioensayo I, dilución del medio formulado con el residuo sólido (RS) de biofloc.

En los tratamientos T1 (25% de residuo sólido) y T2 (50% de residuo sólido) se aprecia que luego del tercer día empiezan a disminuir las pendientes de las curvas de crecimiento; mientras que en los tratamientos T3 (75% de residuo sólido) y T4 (100% de residuo sólido) la disminución se registró luego del cuarto día. En el tratamiento T5 (Guillard f/2) la disminución inicia pasado el séptimo día. Esta disminución nos indica el inicio de la fase estacionaria (Andersen, 2005).

A partir del día siete se puede apreciar que, para los tratamientos con residuo sólido, inicia la caída de la densidad celular mientras que para el tratamiento T5 (Guillard f/2) la caída se registra luego del día 10. Este comportamiento es indicador del final de la fase de estabilidad e inicio de la fase de muerte (Arredondo y Voltolina, 1998).

En la tabla 15 se observa que se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos para la velocidad de crecimiento, tiempo de duplicación y densidad celular máxima ($p < 0.05$).

Tabla 15- Velocidad de crecimiento (μ), tiempo de duplicación (TD) y densidad celular máxima (DCM) de la microalga *Scenedesmus sp.* cultivada en el bioensayo I, dilución del medio formulado con el residuo sólido de biofloc.

	μ (día ⁻¹)	TD (día)	DCM (cel/mL x10 ⁴)
T1 (25% Residuo Sólido)	0.696± 0.003 a	0.996± 0.004 a	86.8± 10.0 a
T2 (50% Residuo Sólido)	0.738± 0.055 a	0.943± 0.073 a	109.8± 11.3 a
T3 (75% Residuo Sólido)	0.944± 0.191 ab	0.753± 0.143 ab	117.8± 11.3 a
T4 (100% Residuo Sólido)	1.200± 0.223 ab	0.593± 0.123 b	130.3± 38.1 a
T5 (Guillard f/2)	1.062± 0.100 b	0.656± 0.062 b	2176± 704.5 b

*Los valores representan los promedios ± desviación estándar de las variables. Valores que comparten al menos una letra no mostraron diferencias estadísticas(p<0.05)

En la figura 18 se logra observar que se encontraron diferencias significativas entre el tratamiento T5 (Guillard f/2) y los tratamientos T1 (25% residuo sólido) y T2 (50% residuo sólido). La mayor velocidad de crecimiento se registró en el tratamiento T4 (100% residuo sólido), 1.200 ± 0.223, seguido del tratamiento T5 (Guillard f/2) y T3 (75% residuo sólido), 1.062± 0.100 y 0.944± 0.191 respectivamente.

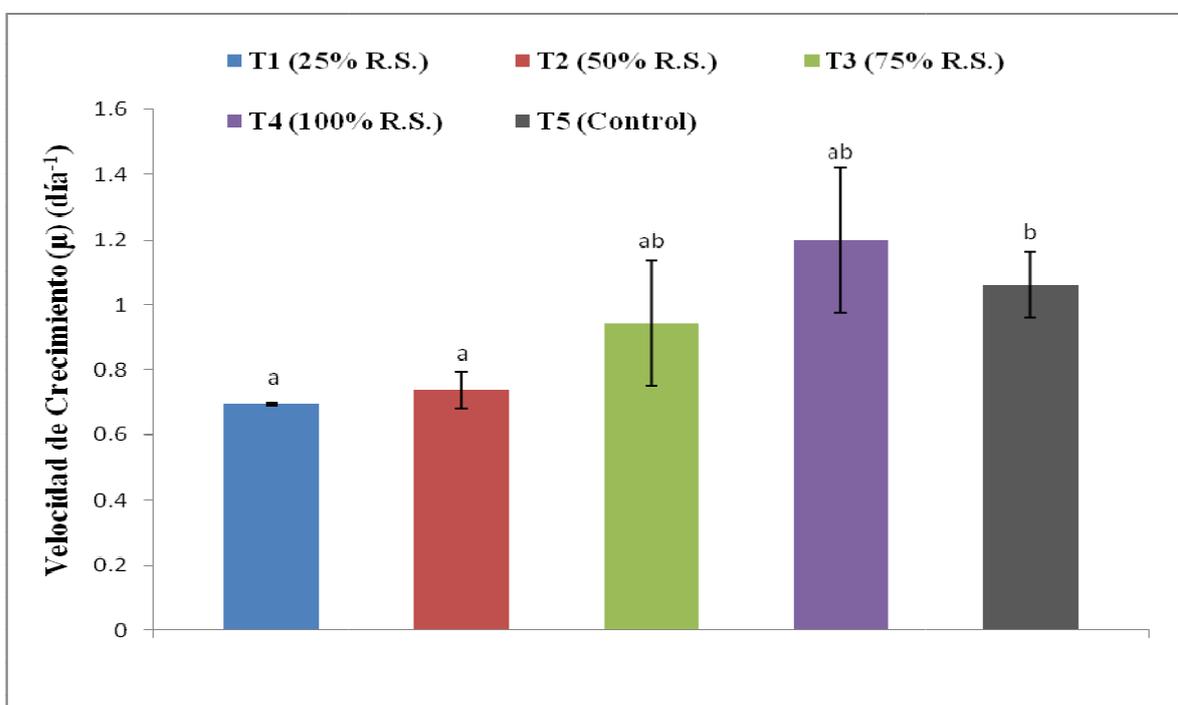


Figura 18 – Promedio de las velocidades de crecimiento (μ) de la microalga *Scenedesmus sp.* cultivada en el bioensayo I, dilución del medio formulado con el residuo sólido (RS) de biofloc.

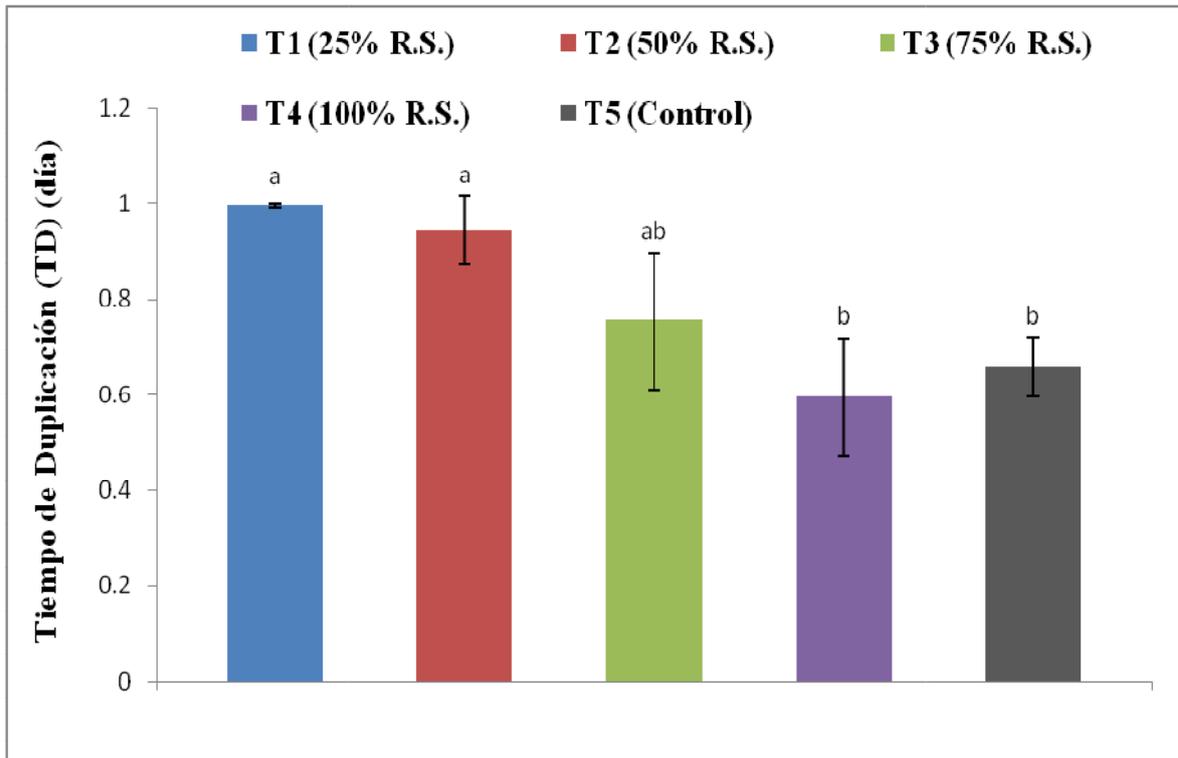


Figura 19 – Promedio de los tiempos de duplicación (TD) de la microalga *Scenedesmus sp.* cultivada en el bioensayo I, dilución del medio formulado con el residuo sólido (RS) de biofloc.

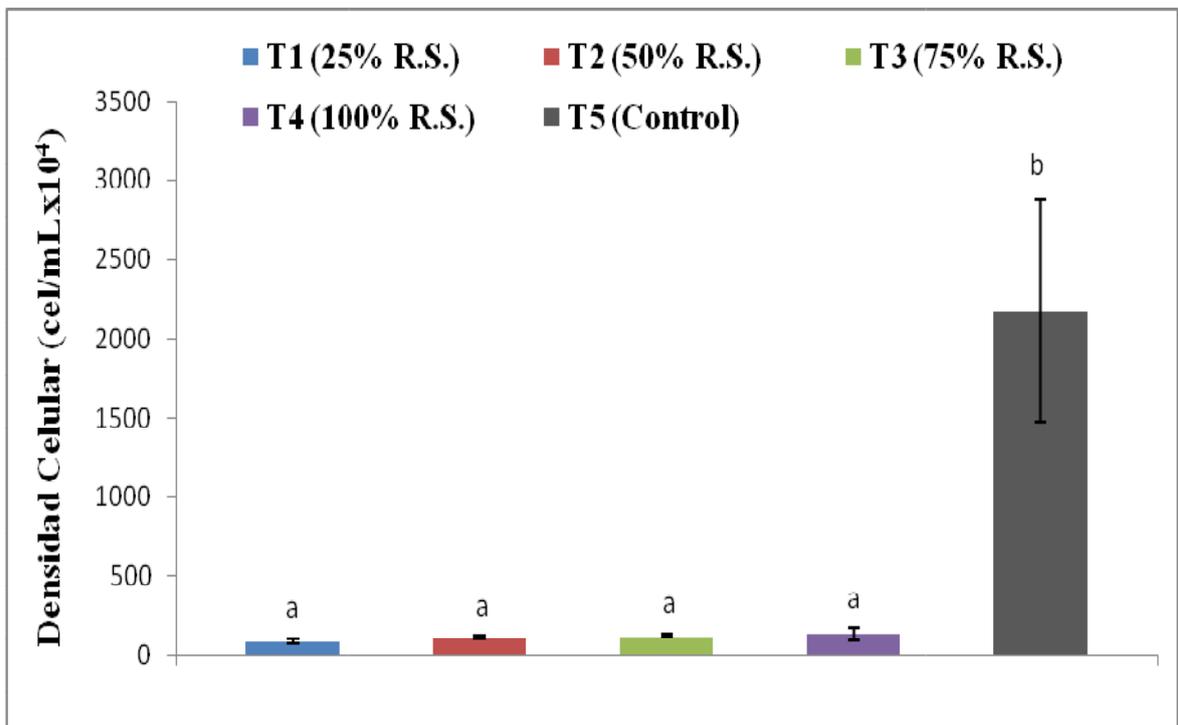


Figura 20 – Promedio de las densidades celulares máximas (DCM) de la microalga *Scenedesmus sp.* cultivada en el bioensayo I, dilución del medio formulado con el residuo sólido (RS) de biofloc.

En la figura 19 se puede observar que existen diferencias significativas entre los tratamientos T4 (100% residuo sólido) y T5 (Guillard f/2) y los tratamientos T1 (25% residuo sólido) y T2 (50% residuo sólido); siendo los tratamientos T4 (100% residuo sólido) y T5 (Guillard f/2) los que obtuvieron los menores tiempos de duplicación, 0.593 ± 0.123 y 0.656 ± 0.062 respectivamente.

Se encontraron diferencias significativas para la densidad celular máxima (DCM) ($p < 0.05$) entre el tratamiento T5 (Guillard f/2) y todos los tratamientos con residuo sólido de biofloc. En la figura 20 se puede observar como el tratamiento T5 (Guillard f/2) presenta la mayor densidad celular con un valor de $2176 \pm 704.5 \times 10^4$ cel./mL. Se puede observar también como en los tratamientos formulados con el medio de residuo sólido de biofloc la DCM alcanzada es bastante pequeña, no sobrepasando las 150×10^4 cel./mL.

4.4.2. Bioensayo II – Sustitución

En la figura 21 se pueden observar las curvas de crecimiento de la microalga *Scenedesmus sp.* cultivada en el bioensayo II - sustitución del medio Guillard f/2 con el medio formulado con el residuo sólido de biofloc.

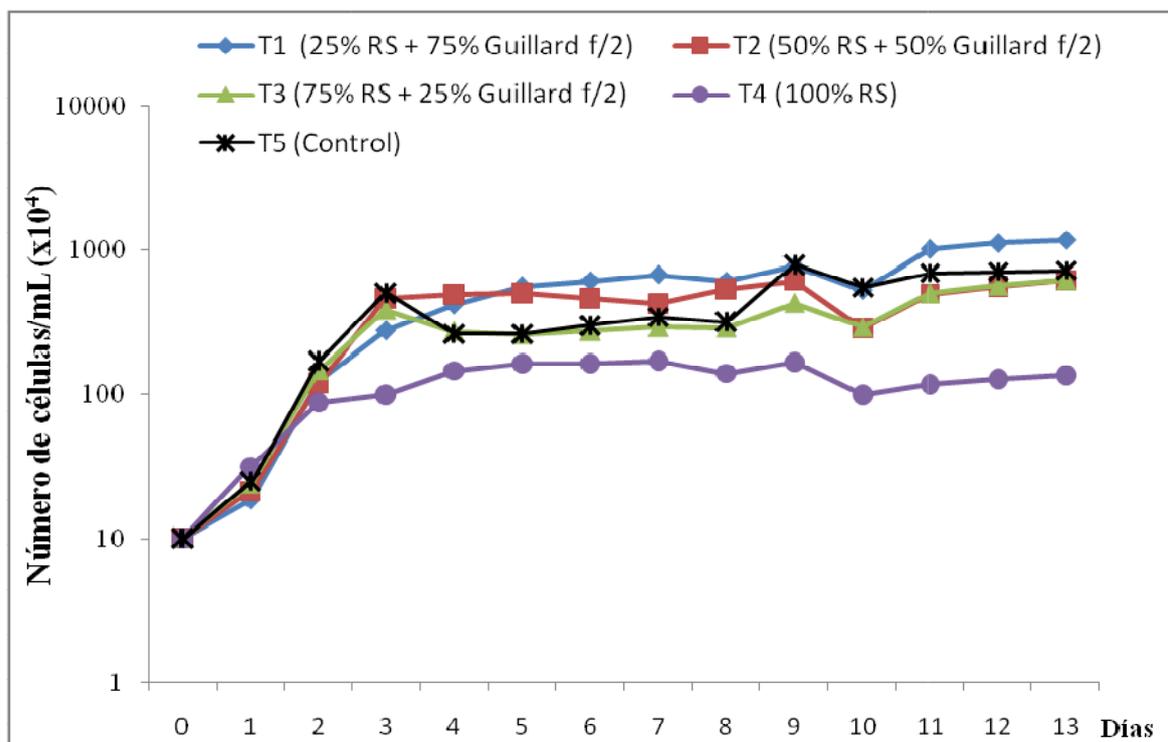


Figura 21 - Curvas de crecimiento promedio de la microalga *Scenedesmus sp.* cultivada en el bioensayo II, sustitución del medio Guillard f/2 por el medio formulado con el residuo sólido (RS) de biofloc.

Se puede apreciar que pasado el tercer día de experimentación, los tratamientos T2 (50% RS + 50% Guillard), T3 (75% RS + 25% Guillard f/2) y T5 (Guillard f/2) registraron una disminución en la pendientes de sus curvas de crecimiento; mientras que para los tratamientos T1 (25% RS + 75% Guillard f/2) y T4 (100% RS), la disminución se registró en el cuarto y segundo día respectivamente. Esta disminución indicaría el final de la fase exponencial e inicio de la fase de estabilidad (Andersen, 2005).

Los tratamientos T3 (75% RS + 25% Guillard f/2) y T5 (Guillard f/2) registraron una ligera disminución de la densidad celular durante el cuarto día de experimentación, estabilizándose nuevamente al día siguiente. No se registró una caída drástica de la densidad celular, manteniéndose en la fase de estabilidad hasta el final del experimento.

En la tabla 16 se puede observar que se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos para la variable densidad celular máxima; mientras que para las variables velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$).

Tabla 16 - Velocidad de crecimiento (μ), tiempo de duplicación (TD) y densidad celular máxima (DCM) de la microalga *Scenedesmus sp.* cultivada en el bioensayo II, sustitución del medio Guillard f/2 por el medio formulado con el residuo sólido (RS) de biofloc.

	μ (día ⁻¹)	TD (día)	DCM (cel/mL x10 ⁴)
T1(25% RS + 75% Guillard f/2)	1.038 ± 0.174 a	0.680 ± 0.109 a	1183.3 ± 337.2 a
T2 (50% RS+ 50% Guillard f/2)	1.273 ± 0.047 a	0.545 ± 0.20 a	686.7 ± 127.9 b
T3 (75% RS+ 25% Guillard f/2)	1.050 ± 0.369 a	0.574 ± 0.044 a	621.3 ± 30.1 b
T4 (100% RS)	0.928 ± 0.314 a	0.801 ± 0.243 a	195 ± 13.2 c
T5(Guillard f/2)	1.288 ± 0.141 a	0.542 ± 0.061 a	810.8 ± 113.1 ab

*Los valores representan los promedios ± desviación estándar de las variables. Valores que comparten al menos una letra no mostraron diferencias estadísticas ($p < 0.05$)

En la figura 22 podemos observar que las velocidades más elevadas se registraron en los tratamientos T2 (50% RS + 50% Guillard f/2) y T5 (Guillard f/2). Se puede observar también que el tratamiento T4 (100% RS) y el tratamiento T1 (25% RS + 75% Guillard f/2) presentan un coeficiente de variabilidad, 33.8% y 16.8% respectivamente, los cuales podrían explicar la falta de diferencias significativas.

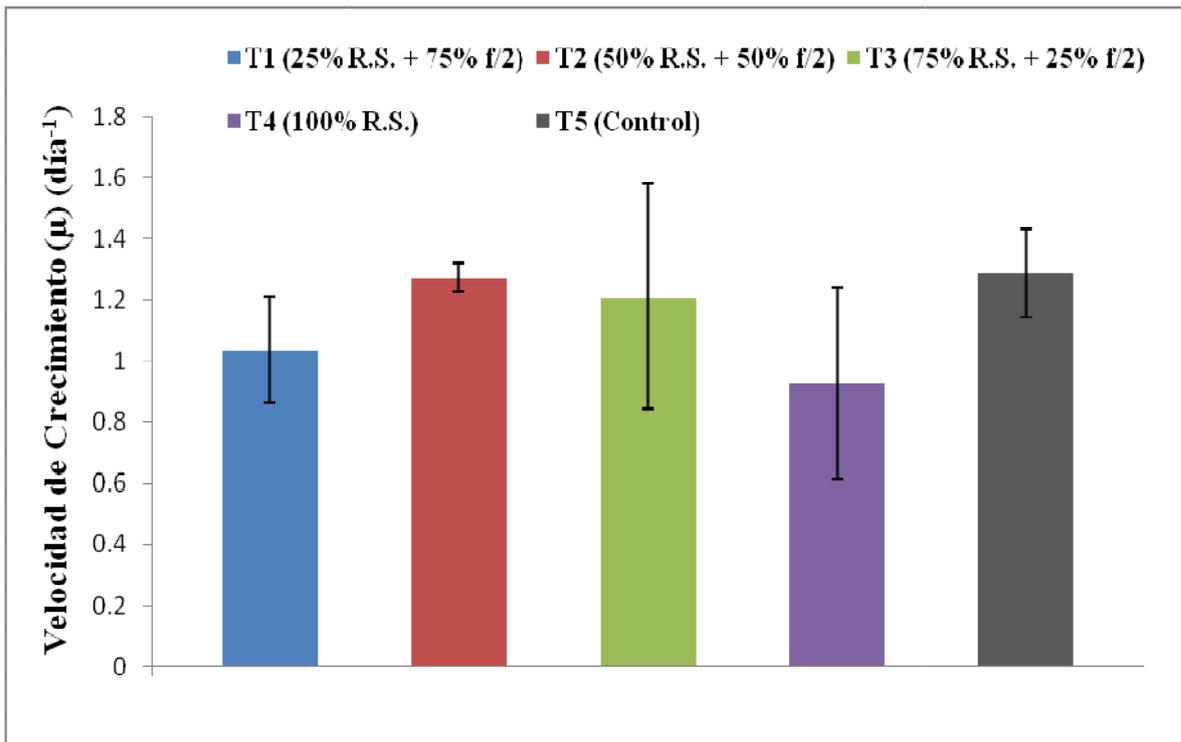


Figura22 - Promedio de las velocidades de crecimiento(μ) de la microalga *Scenedesmus sp.* cultivada en el bioensayo II, sustitución del medio Guillard f/2 por el medio formulado con el residuo sólido (RS) de biofloc.

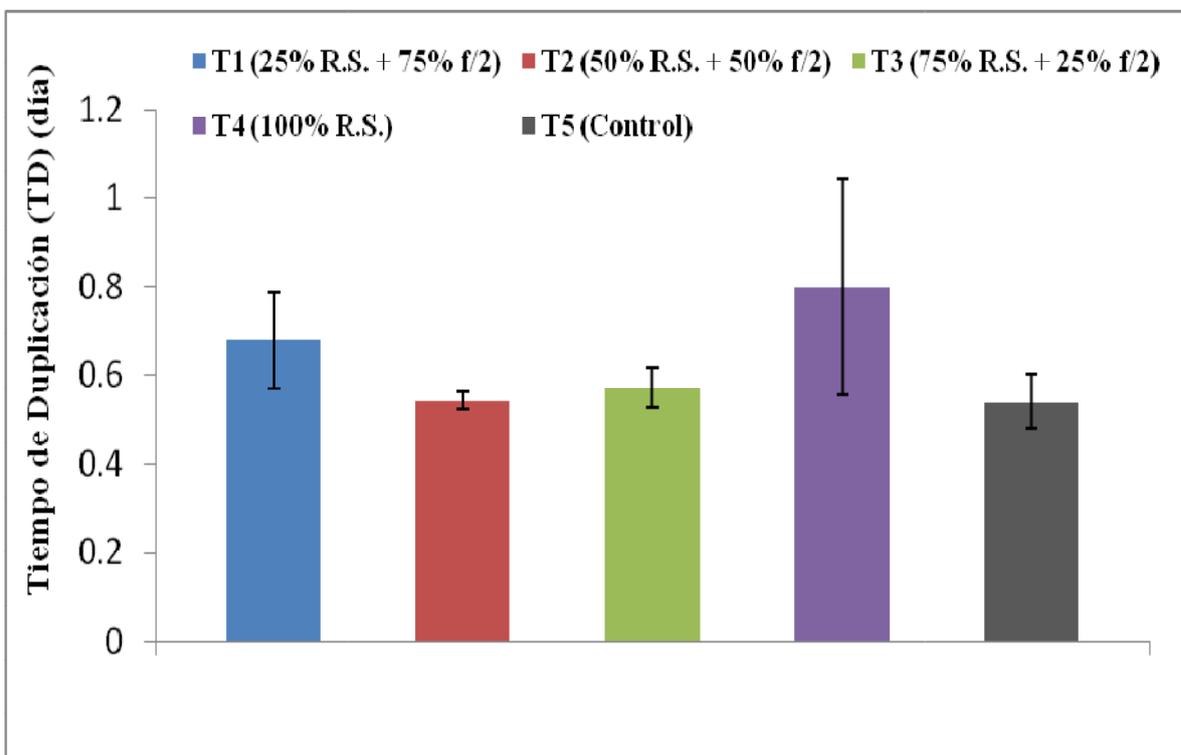


Figura 23 - Promedio de los tiempos de duplicación (TD) de la microalga *Scenedesmus sp.* cultivada en el bioensayo II, sustitución del medio Guillard f/2 por el medio formulado con el residuo sólido (RS) de biofloc.

En la figura 23 se puede apreciar que los tratamientos T2 (50% RS + 50% Guillard f/2), T3 (75% RS + 25% Guillard f/2) y T5 (Guillard f/2) presentaron los menores tiempos de duplicación, 0.545 ± 0.20 , 0.574 ± 0.044 y 0.542 ± 0.061 día respectivamente.

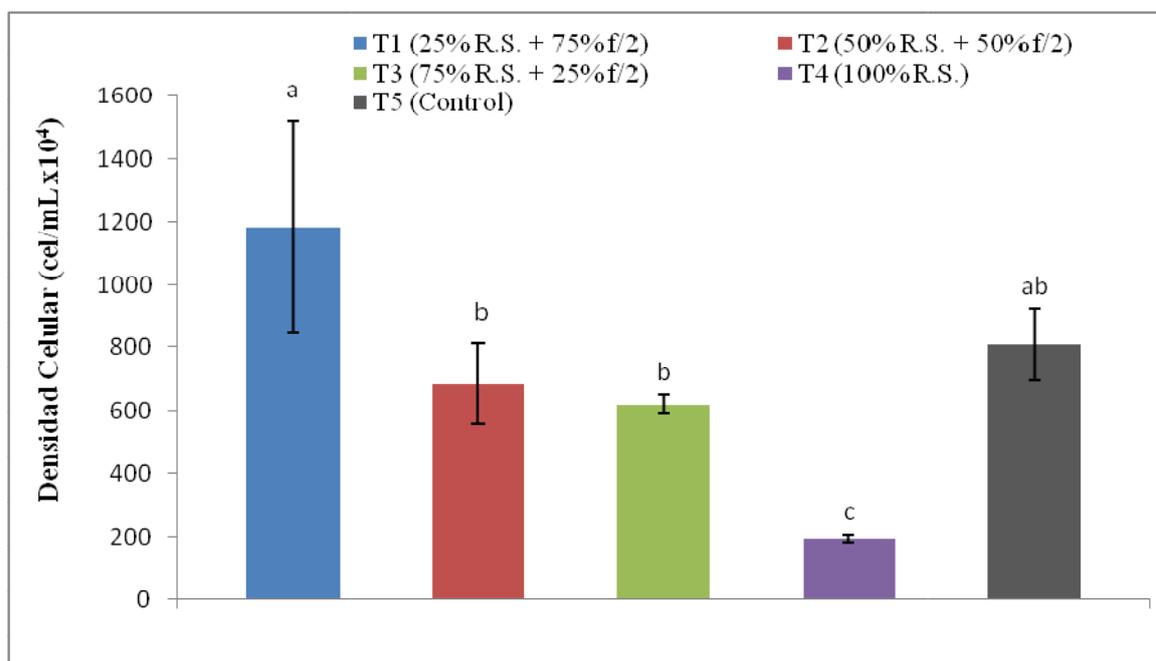


Figura 24 - Promedio de las densidades celulares máximas (DCM) de la microalga *Scenedesmus sp.* cultivada en el bioensayo II, sustitución del medio Guillard f/2 por el medio formulado con el residuo sólido de biofloc.

En la figura 24 se puede observar que existieron diferencias significativas en la densidad celular máxima (DCM) ($p < 0.05$) entre el tratamiento T1 (25% RS + 75% Guillard f/2) y los tratamientos T2 (50% RS + 50% Guillard f/2), T3 (75% RS + 25% Guillard f/2) y T4 (100% RS). Así mismo los tratamientos T2 (50% RS + 50% Guillard f/2) y T3 (75% RS + 25% Guillard f/2) presentan diferencias significativas con el tratamiento T4 (100% RS). El tratamiento control T5 solo presentó diferencias significativas con el tratamiento T4 (100% RS). La mayor densidad celular fue encontrada en el tratamiento T1, $1183.3 \pm 337.2 \times 10^4$ cel./mL, y la menor se encontró en el tratamiento T4 con $195 \pm 13.2 \times 10^4$ cel./mL.

4.4.3. Bioensayo III – Enriquecimiento

En la figura 25 se observan las curvas de crecimiento de la microalga *Scenedesmus sp.* cultivada en el bioensayo III - sustitución del medio Guillard f/2 con el medio formulado con el residuo sólido de biofloc enriquecido con metales y vitaminas.

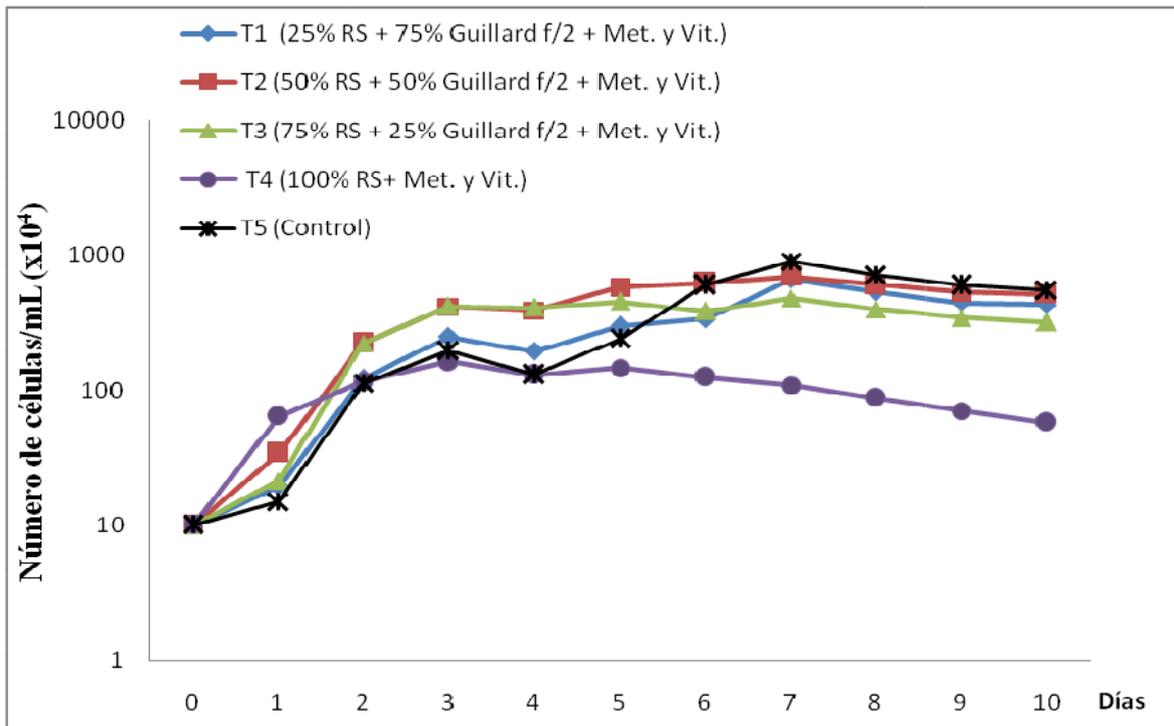


Figura25 - Curvas de crecimiento promedio de la microalga *Scenedesmus sp.* cultivada en el bioensayo III, sustitución del medio Guillard f/2 por el medio formulado con el residuo sólido (RS) de biofloc enriquecido con metales y vitaminas.

En el primer día de experimentación, el tratamiento T5 (Guillard f/2) no registró un crecimiento exponencial; ya que, no se observó la duplicación completa de la densidad celular inicial. Esto podría indicar la presencia de una pequeña fase de adaptación.

Es posible apreciar que luego del tercer día de experimentación, los tratamientos T1 (25% RS+ 75% Guillard f/2 + Met y Vit), T2 (50% RS+ 50% Guillard f/2+ Met y Vit) y T3 (75% RS+ 25% Guillard f/2+ Met y Vit) registraron una caída en las pendientes de sus curvas de crecimiento; mientras que en los tratamiento T4 (100% RS + Met y Vit) y T5 (Guillard f/2) la caída se registró en el segundo y séptimo día respectivamente. Esta disminución indicaría el final de la fase exponencial e inicio de la fase de estabilidad (Andersen, 2005).

En la tabla 17 se logra observar que no se encontraron diferencias significativas para las variables velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación ($p > 0.05$), pero si en la densidad celular máxima ($p < 0.05$) entre los tratamientos T1 (25% RS+ 75% Guillard f/2 + Met y Vit), T2 (50% RS + 50% Guillard f/2 + Met y Vit) y T5 (Guillard f/2) con el tratamiento T4 (100% RS + Met y Vit)

Tabla 17 - Velocidad de crecimiento (μ), tiempo de duplicación (TD) y densidad celular máxima (DCM) de la microalga *Scenedesmus sp.* cultivada en el bioensayo III, sustitución del medio Guillard f/2 por el medio formulado con el residuo sólido de biofloc enriquecido con metales y vitaminas.

	μ (día ⁻¹)	TD (día)	DCM (cel/mL x10 ⁴)
T1 (25% RS+ 75% Guillard f/2+ Met y Vit)	1.024 ± 0.223 a	0.702 ± 0.171 a	673 ± 387.6 a
T2 (50% RS + 50% Guillard f/2+ Met y Vit)	1.234 ± 0.091 a	0.564 ± 0.042 a	696.7 ± 86.2 a
T3 (75% RS + 25% Guillard f/2+ Met y Vit)	1.241 ± 0.082 a	0.560 ± 0.037 a	535.0 ± 72.6 ab
T4 (100% RS + Met y Vit)	1.223 ± 0.063 a	0.568 ± 0.029 a	165.5 ± 27.7 b
T5 (Guillard f/2)	0.676 ± 0.033 a	1.026 ± 0.051 a	928.3 ± 280.6 a

*Los valores representan los promedios ± desviación estándar de las variables. Valores que comparten al menos una letra no mostraron diferencias estadísticas(p<0.05)

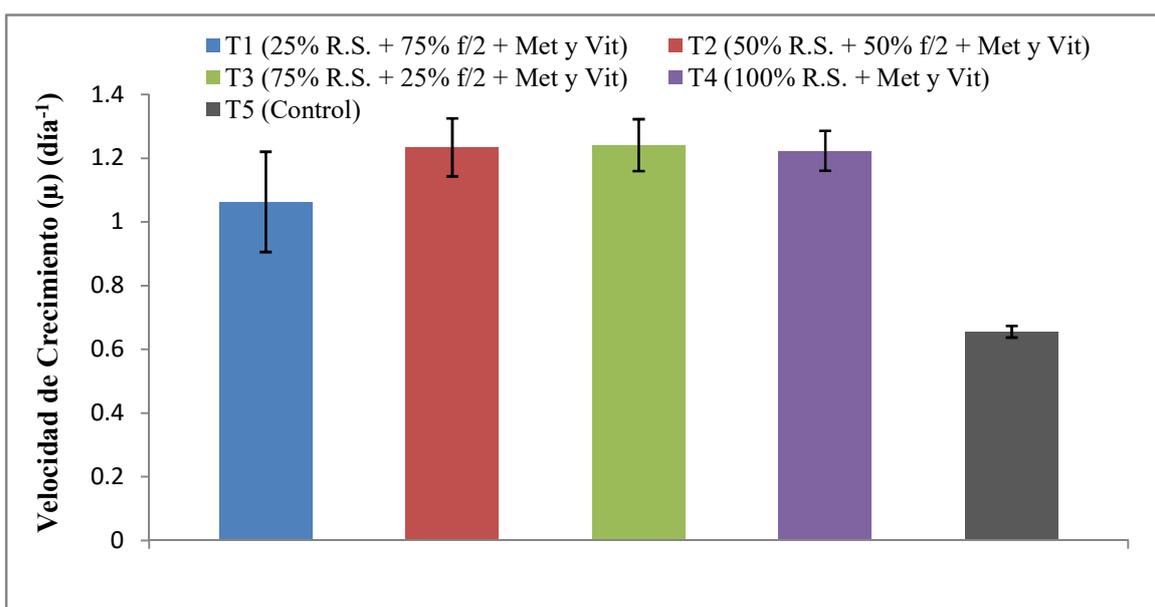


Figura26 - Promedio de las velocidades de crecimiento (μ) de la microalga *Scenedesmus sp.* cultivada en el bioensayo III, sustitución del medio Guillard f/2 por el medio formulado con el residuo sólido (RS) de biofloc enriquecido con metales y vitaminas.

En la figura 26 se puede observar que la mayor velocidad de crecimiento promedio se registró en los tratamientos T2 (50% RS + 50% Guillard f/2 + metales + Vit.), T3 (75% RS + 25% Guillard f/2 + metales + Vit.) y T4 (100% RS + metales + Vit.); 1.234 ± 0.091, 1.241 ± 0.082 y 1.223 ± 0.063 día⁻¹, respectivamente. La menor velocidad fue la del tratamiento T5 (Guillard f/2), 0.676 ± 0.033 día⁻¹.

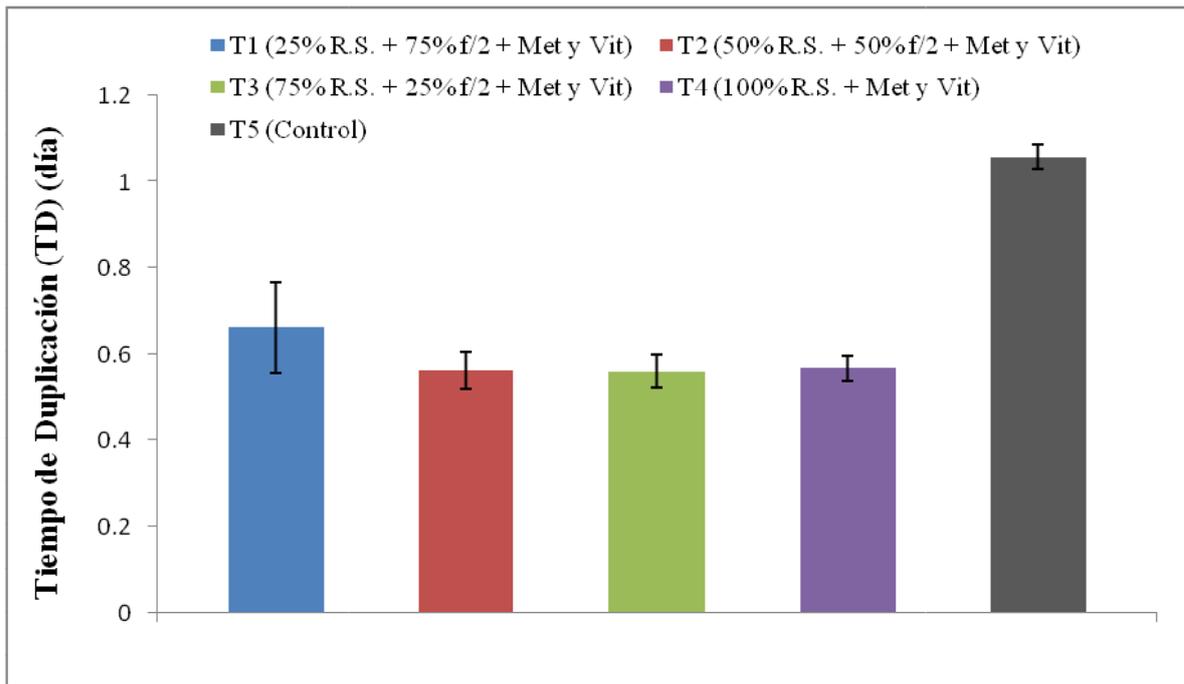


Figura27 - Promedio de los tiempos de duplicación (TD) de la microalga *Scenedesmus sp.* cultivada en el bioensayo III, sustitución del medio Guillard f/2 por el medio formulado con el residuo sólido (RS) de biofloc enriquecido con metales y vitaminas.

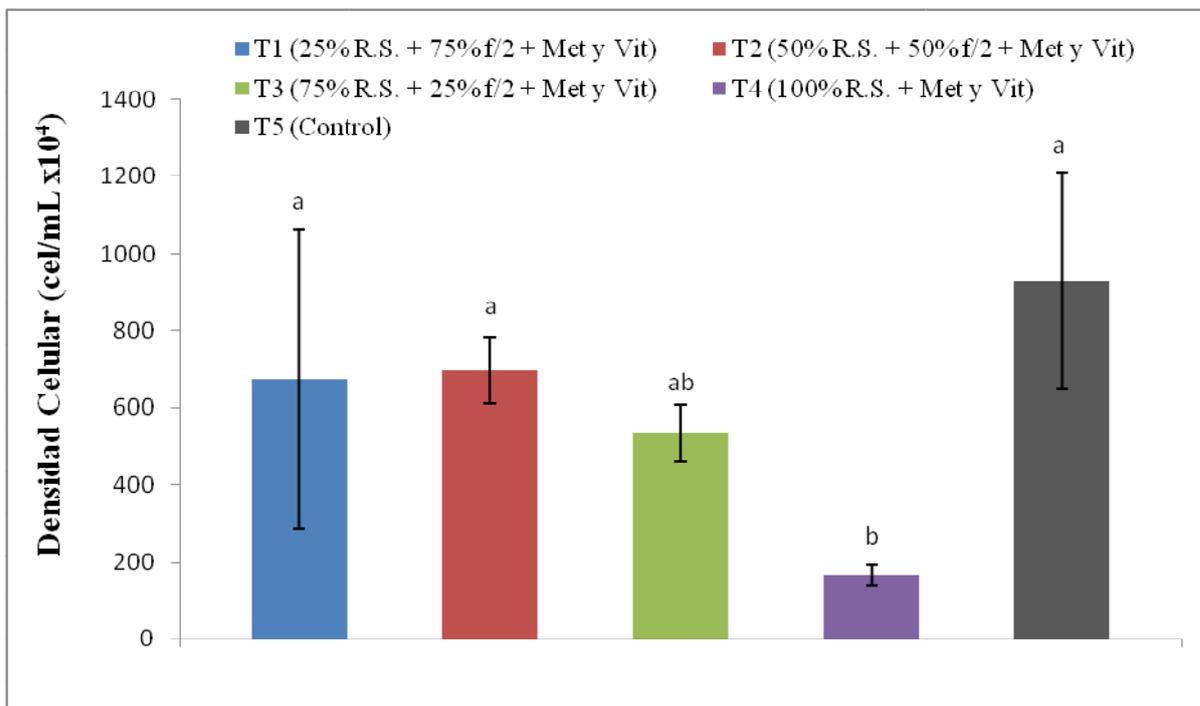


Figura 28 - Promedio de las densidades celulares máximas (DCM) de la microalga *Scenedesmus sp.* cultivada en el bioensayo III, sustitución del medio Guillard f/2 por el medio formulado con el residuo sólido (RS) de biofloc enriquecido con metales y vitaminas.

En la figura 27 se observa que el menor tiempo de duplicación fue registrado en los tratamientos T2 (50% RS + 50% Guillard f/2 + metales + Vit.), T3 (75% RS + 25% Guillard f/2 + metales + Vit.) y T4 (100% RS + metales + Vit.); 0.564 ± 0.042 , 0.560 ± 0.037 y 0.568 ± 0.029 día, respectivamente.

La figura 28 muestra las diferencias significativas encontradas para la variable densidad celular máxima (DCM) ($p < 0.05$) entre el tratamiento T4 (100% Residuo Sólido + Metales y Vit) y el tratamiento T5 (Guillard f/2). En la figura 24 se puede observar que la mayor densidad celular fue encontrada en el tratamiento T5, $928.3 \pm 280.6 \times 10^4$ cel./mL. Mientras que la menor densidad se presentó en el tratamiento T4, $165.5 \pm 27.7 \times 10^4$ cel./mL.

Los medios formulados con el residuo líquido de biofloc presentaron velocidades de crecimiento mayores o similares a las registradas en el medio Guillard f/2 en todos los bioensayos, siendo el bioensayo III el que registró las mayores velocidades de crecimiento promedio. En el caso de los medios formulados con el residuo sólido, solo en los bioensayos II y III no se registraron diferencias entre los valores de velocidad de crecimiento con el medio Guillard f/2; en el bioensayo I se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con medios formulados con el residuo sólido, mas no con el medio Guillard f/2. El bioensayo III registró las mayores velocidades de crecimiento para los medios con el residuo sólido.

En los medios formulados con residuo líquido, las mayores densidades celulares se presentaron durante el bioensayo III (enriquecimiento); lo cual podía indicar una deficiencia de metales trazas y vitaminas en el residuo líquido de biofloc. En cambio en los medios formulados con el residuo sólido las mayores densidades celulares se registraron en el bioensayo II (sustitución), lo cual indicaría una deficiencia de macronutrientes (N y P) en los medios formulados con el residuo sólido.

La concentración de macronutrientes entre los medios formulados con el residuo sólido y líquido de biofloc (tabla 8 y 10) muestra una gran diferencia en el contenido de nitrógeno y fósforo total; siendo el medio de residuos sólidos quien presentó las mayores concentraciones de ambos nutrientes. Sin embargo, los resultados obtenidos durante los bioensayos muestran que a pesar de la gran concentración de nutrientes, el medio de residuo líquido fue el que generó las mayores densidades celulares máximas (DCM).

Además de la concentración de nitrógeno y fósforo total observada en los medios de residuo sólido y líquido, la relación en la que estos se encuentran es importante. En la presente investigación se logró apreciar que durante el bioensayo I la relación N:P fue la misma para todos los tratamientos; mientras que en los bioensayos II y III esta relación varió en función al porcentaje de sustitución con el medio Guillard f/2.

En el caso de los medios con residuo líquido, la relación N:P para el bioensayo I fue de 3.6:1 (moléculas N/moléculas P); observándose diferencias significativas en la velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación entre los tratamientos formulados con este medio, a pesar de tener la misma relación N:P. En los bioensayos II y III, se observó que, pese a tener una menor relación de N:P, el medio de residuos líquidos presentó mayores velocidades de crecimiento que el medio Guillard f/2; sin embargo, las mayores densidades celulares máximas estuvieron presentes en estos últimos.

En los medios de residuos sólidos la relación N:P se mantuvo constante en todos los tratamientos, durante los 3 bioensayos (1.8:1); no observándose que los resultados de velocidad de crecimiento, tiempo de duplicación y DCM guarden relación con este parámetro, y podrían estar más bien relacionados con el tipo de nutrientes presentes en los medios.

Rhee (1978) observó que la relación óptima N:P para el crecimiento de la microalga *Scenedesmus sp.* fue de 30:1; por debajo de esta, tienen como nutriente limitante al nitrógeno y en relaciones superiores, el limitante es el fósforo. En la presente investigación, los medios formulados con el residuo sólido y líquido de biofloc presentaron relaciones N:P muy por debajo de este valor, indicando que el nitrógeno podría ser el factor limitante en este tipo de medios. Los resultados demostraron que al utilizar una mezcla de los medios de residuos sólidos o líquidos con el medio Guillard f/2, se alcanzaron las más elevadas velocidades de crecimiento y mayores densidades celulares.

Investigaciones más recientes como la de González (2010) y Li *et al.* (2011) observaron que la microalga *Scenedesmus sp.* presenta la capacidad de adaptarse a la concentración de nutrientes presentes en el medio, acumulando rápidamente nitrógeno o fósforo en cantidad excesiva si este se encuentra disponible en el medio. Esto podría explicar las elevadas

velocidades de crecimiento pero la corta etapa de crecimiento exponencial presente en los medios de cultivo formulados con el residuo sólido y líquido.

Arrendondo y Voltolina (2007) estiman que en la fase de adaptación (fase lag) el comportamiento inicial del cultivo depende de las condiciones metabólicas de las células del inóculo. Durante la presente investigación, se realizó la adaptación previa de la microalga a los medios a ser utilizados. Esto generó que en la mayoría de bioensayos no se registraran fases de adaptación (Martínez *et al.*, 2000; Andrade, 2008). Solo durante el bioensayo I con residuo sólido se registró una pequeña fase de adaptación en los tratamientos T2 (50% RS), T3 (75% RS), T4 (100 % RS) y T5 (Guillard f/2). Esta adaptación puede ser atribuida a que se podrían haber requerido algunos días más de aclimatación antes del inicio del experimento. Esta observación fue corregida extendiendo el tiempo de adaptación de la microalga a los diferentes medios de 3 a 5 días antes del inicio de los bioensayos II y III.

Las datos registrados en todos los experimentos muestran el rápido crecimiento de la microalga *Scenedesmus* en todos medios de cultivo formulados con los residuos, tanto sólidos como líquidos de biofloc, las cuales se encontraron en un rango de 0.696 a 1.628 día⁻¹. Algunos investigadores han reportado velocidades de crecimiento mucho menores a las de la presente investigación; tal es el caso de Pancha *et al.* (2015) quienes obtuvieron una velocidad de 0.23 día⁻¹ para *Scenedesmus sp.* cultivada en medio autotrófico BG-11; y también en la investigación de Greque y Vieira (2007), quienes reportaron una velocidad de 0.22 día⁻¹ durante la evaluación de la fijación de CO₂ de *Scenedesmus obliquus* cultivada en medio autotrófico MC en fotobioreactores.

También se han realizado investigaciones en las cuales se han evaluado el uso de efluentes como medio de cultivo para el crecimiento de microalgas del género *Scenedesmus*; como por ejemplo Guerrero-Cabrera *et al.* (2014) los cuales reportaron una velocidad de crecimiento de 0.009 día⁻¹ utilizando efluente del cultivo de tilapia para el cultivo de 3 especies del género *Scenedesmus*. Kim *et al.* (2007) registraron una velocidad de 0.12 día⁻¹ al utilizar como medio el efluente fermentado de cerdos. Estas velocidades son menores a las registradas en la presente investigación.

El efluente de biofloc utilizado contiene elevadas concentraciones de carbono orgánico; los cuales fueron añadidos para el correcto funcionamiento del sistema biofloc mediante el control de la relación carbono:nitrógeno. Esta característica hace que los medios formulados con estos residuos tengan una naturaleza heterotrófica. Sin embargo, al haber sometido los cultivos a aireación constante, también contaron con CO₂ como fuente de carbono inorgánico, transformando el medio a mixotrófico. Diferentes investigaciones han probado que las microalgas del género *Scenedesmus* presentan una gran capacidad para adaptarse; tanto a las condiciones heterotróficas, como a las mixotróficas. (Kim *et al.*, 2007; Gonzáles-Garcimuño *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2014).

El nitrógeno presente en los residuos líquidos de un sistema biofloc estable se encuentra principalmente bajo la forma de nitrato (NO₃), encontrándose también en menores concentraciones bajo la forma de amonio (NH₄⁺) (Azim y Little, 2008; Schryver *et al.*, 2008; Avnimelech, 2009). Gonzales-Garcinuño *et al.* (2014) estudiaron el efecto de diferentes fuentes de nitrógeno en el crecimiento de *Scenedesmus abundans* observando que la fuente de nitrógeno que genera las mayores velocidades de crecimiento bajo condiciones autotróficas es el NH₄⁺. En cambio, si las microalgas se encuentran en condiciones heterotróficas la presencia de NH₄⁺ y NO₃ son las que generan las mayores velocidades de crecimiento. Esto es similar a lo observado en la presente investigación; ya que, en los tratamientos en donde se combinó el residuo líquido biofloc (nitrógeno en forma de NH₄⁺ y NO₃) y el medio Guillard (solo NO₃) obtuvieron mayores velocidades de crecimiento.

Magnotti *et al.* (2015) observaron que al utilizar el residuo líquido del efluente del cultivo de camarones marinos (*Litopenaeus vannamei*) en sistemas biofloc, para la producción de biomasa de las microalgas *Nannochloropsis oculatay Tetraselmis chuii*, se registraron resultados similares a los producidos en el medio Guillard f/2. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en la presente investigación; en donde la densidad celular alcanzada con el residuo líquido no presentó diferencias significativas entre el medio Guillard f/2 y la mayoría de tratamientos utilizados.

Los medios de cultivo empleados en la producción y mantenimiento de los cultivos de microalgas deben estar formulados con nutrientes (nitrógeno, fósforo, metales y vitaminas) que se encuentren en formas asimilables para estas. Durante el bioensayo I, se observó que

los medios formulados con el residuo sólido no generaron incrementos significativos en la densidad celular de la microalga *Scenedesmus sp.*; pese a que tener una mayor concentración de nitrógeno y fósforo que el medio Guillard f/2. Esto podría indicar que los nutrientes contenidos en este medio no pueden ser fácilmente asimilados por esta microalga.

El medio de residuo sólido se encuentra compuesto por formas orgánicas de nutrientes, debido a la naturaleza de los flóculos (conglomerados de bacterias, microalgas, heces, entre otros). Hargreaves (1998) menciona que el material orgánico requiere atravesar por un proceso de mineralización para poder ser asimilado por las microalgas. Este proceso consiste en la descomposición de la materia orgánica por el accionar de bacterias heterotróficas. El material orgánico de baja relación C:N es descompuesto por bacterias aeróbicas, que lo transforman rápidamente en compuestos inorgánicos como el amonio; mientras que en relaciones C:N elevadas es degradado principalmente por bacterias anaeróbicas, las cuales producen compuestos oxidativos incompletos, como ácidos húmicos y fúlvicos.

Guerra (2011) utilizó el humus de lombriz como la base de un medio de cultivo orgánico para la producción de *T. tetrathele* y *C. muelleri*, observando que este medio registró mayores velocidades de crecimiento que las registradas en el medio Guillard f/2, pero una menor densidad celular máxima. Estos resultados se asemejan a los encontrados en la presente investigación con el medio de residuos sólidos; el cual presentó una menor densidad celular máxima a la alcanzada en el medio Guillard f/2, pero con menores velocidades de crecimiento. Esto puede indicar la baja capacidad de asimilación de la microalga *Scenedesmus sp.* sobre el tipo de nutrientes presentes en el medio formulado con residuo sólido.

La diferencia observada en la coloración de los medios preparados con el residuo líquido pudo haber influenciado en la capacidad de fotosintética de las microalgas. Yang *et al.* (2014) mencionan que algunas microalgas cultivadas en medio heterotróficos requieren la energía generada por la fotosíntesis para asimilar fuentes de carbono orgánico, como la xylosa. Con el pasar de los días y el aumento de la densidad celular, se podría haber generado la inhibición de la fotosíntesis debido a un efecto de auto-sombreado y la menor capacidad de transmisión de la luz por la coloración del medio; lo cual podría haber

generado disminución de la asimilación de las fuentes de carbono orgánico del medio. Este hecho explicaría la menor densidad celular máxima alcanzada en los medios de residuo líquido, comparados con el medio control (Guillard f/2).

Las microalgas del género *Scenedesmus* pueden crecer en un amplio rango de temperatura. Li *et al.* (2011) reportaron que la microalga *Scenedesmus sp.* LX1 puede crecer en un rango de temperatura de 10 a 30 °C, siendo la temperatura óptima 20 °C. Martínez *et al.* (2000) analizaron el crecimiento y remoción de nutrientes de *Scenedesmus obliquus* en efluentes municipales en un rango de temperaturas de 20 a 35 °C, obteniéndose que la temperatura óptima fue de 30 °C. Durante la presente investigación la temperatura en la que se mantuvo el cultivo fue de 20 °C, la cual se encuentra dentro de los rangos observados para las microalgas de este género.

Las velocidades de crecimiento observadas durante la experimentación muestran que las mayores velocidades fueron encontradas en el bioensayo III, en donde la concentración de metales traza y vitaminas en todos los tratamientos fue igual. Esto podría indicar que los residuos de biofloc pueden presentar deficiencias de estos compuestos. Maldonado y Price (1996) mencionan que los requerimientos de hierro (Fe) son mayores en medios que presentan nitrato como fuente de nitrógeno. El molibdeno (Mo) es esencial para la asimilación de NO₃; ya que, forma parte de las enzimas nitrato reductasa (NR) y nitrogenasa las cuales regulan la asimilación de nitrato y fijación del nitrógeno (Raven, 1999). La importancia metabólica de estos compuestos explicaría lo observado en los medios de residuo sólido y líquido de biofloc; en donde la principal fuente de nitrógeno se encuentra en forma de NO₃.

V. CONCLUSIONES

1. Los medios formulados con los residuos líquidos del efluente del cultivo de tilapias en sistemas biofloc demostraron ser una alternativa para la sustitución parcial de medios sintéticos, como el medio Guillard f/2, para la producción de la microalga *Scenedesmus sp.*
2. Los mejores resultados estuvieron presentes en el medio formulado con 100% de residuo líquido de bioflocenriquecido con metales traza y vitaminas (tratamiento 3) durante el bioensayo III; pudiendo observar que la velocidad de crecimiento, $1.628 \pm 0.059 \text{ día}^{-1}$, fue significativamente mayor a la registrada en el medio Guillard f/2. Mientras que densidad celular máxima, $1410 \pm 105.4 \times 10^4 \text{ cel/mL}$, no presentó diferencias significativas con la registrada en el medio Guillard f/2.
3. Los medios formulados con el residuo sólido no mostraron un adecuado crecimiento de la microalga *Scenedesmus sp.*; debido posiblemente a que los nutrientes presentes en este medio de cultivo no se encontraron en forma biodisponible para esta microalga.
4. Las relaciones N:P en los medios formulados con los residuos sólidos y líquidos de biofloc, fueron menores a las presentes en el medio guillard f/2; sin embargo la mayor influencia fue ejercida por la forma en la cual se encuentran presentes estos compuestos (orgánico o inorgánico), a pesar de su abundancia.

VI. RECOMENDACIONES

Se recomienda el uso del medio de cultivo formulado durante el bioensayo III (sustitución parcial + enriquecimiento) con el residuo líquido para el cultivo de tipo continuo de microalgas; ya que este genera un rápido crecimiento, a pesar que la concentración de nutrientes es menor a las de un medio sintético.

Se recomienda determinar composición proximal, solubilidad y bio-disponibilidad de los nutrientes que contienen los sólidos del biofloc, para evaluar cómo influyen estos factores en la capacidad de producción masiva de microalgas.

Se recomienda la identificación de la especie de microalgas del genero *Scenedesmus* utilizada durante los bioensayos, para así determinar si esta cepa solo puede ser encontrada en Pernambuco, Brasil o es posible encontrarla en otros lugares del mundo.

Se recomienda replicar el experimento y determinar el efecto del cultivo en los medios de residuos sólidos y líquido sobre la microalga *Scenedesmus sp.*, por ejemplo: mayor acumulación de lípidos, producción de compuestos bioactivos (luteína, carotenos, entre otros).

VII. COLABORADORES

La presente investigación agradece la colaboración de la Facultad de Pesca de la Universidad Federal Rural de Pernambuco (UFRP), a través del Profesor Alfredo Olivera Gálvez, quien realizó las coordinaciones para el uso de sus instalaciones, equipos y laboratorios.

También se agradece el apoyo brindado por los integrantes del laboratorio de alimento vivo (LAPAVI), laboratorio de maricultura sustentable (LAMARSU) y laboratorio de Limnología (LALIMNO) de la Universidad Federal Rural de Pernambuco (UFRP).

Agradecer al Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC) por el apoyo económico recibido como participante del Proyecto de la Maestría de Acuicultura (Convenio de Gestión N°017-2013-FONDECYT) y al Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por el financiamiento brindado para la realización de esta investigación.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abd El Baky, H.H.; El-Baroty, G.S.; Bouaid, A.; Martínez, M.; Aracil, J. 2012. Enhancement of lipid accumulation in *Scenedesmus obliquus* by Optimizing CO₂ and Fe³⁺ levels for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 119, 429–432.
- Abdel-Raouf, N.; Al-Homaidan, A.A.; Ibraheem, I.B.M. 2012. Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19(3), 257–275.
- Aburai, N.; Sumida, D.; Abe, K. 2015. Effect of light level and salinity on the composition and accumulation of free and ester-type carotenoids in the aerial microalga *Scenedesmus*. *ALGAL*, 8, 30–36.
- Andrade, C. E. 2008. Tratamiento terciario de aguas residuales mediante el uso de la microalga *Scenedesmus sp.* en cultivo discontinuo. Tesis Mag. Sc. Maracaibo, VN Universidad del Zulia. 183 p.
- Andersen R.A. 2005. Algal culturing techniques. Burlington: Elsevier Academic Press;. p. 8
- Arredondo, B.O. y Voltolina, D. 1998. Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal.
- Asplund, M. 2008. Algal biomass growth as a step in purification of leachate. Projekt Mikrobiell Bioteknik 7.5 hp. Linköpings University, Sweden.
- Avnimelech, Y. 2009. Biofloc Technology – A practical Guide Book. Louisiana, United States. 182 p.

Azim, M. E., y Little, D. C. 2008. The biofloc technology (BFT) in indoor tanks : Water quality, biofloc composition and growth and welfare of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), 283, 29–35.

Bécares, E. 2006. Limnology of natural systems for wastewater treatment. Ten years of experiences at the experimental field for low-cost sanitation in Mansilla de las Mulas (León, Spain). *Limnetica* 25(1-2):143-154.

Beuckels, A.; Smolders, E.; Muylaert, K. 2015. Nitrogen availability influences phosphorus removal in microalgae-based wastewater treatment. *Water Research*, 77, 98–106.

Brennan, L. y Owende, P. 2010. Biofuels from microalgae - A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14: 557–577.

Cabello, J.; Toledo-Cervantes, A.; Sánchez, L.; Revag, S.; Morales, M. 2015. Effect of the temperature, pH and irradiance on the photosynthetic activity by *Scenedesmus obtusiusculus* under nitrogen replete and deplete conditions. *Bioresource Technology*, 181: 128–135.

Camargo, J.A. y Alonso, A. 2006. Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. *Environmental International* 32: 831-849.

Chacón, C.; Andrade, C.; Cárdenas, C.; Araujo, I.; Morales, E. 2004. Uso de *Chlorella sp.* y *Scenedesmus sp.* en la remoción de nitrógeno, fósforo y DQO de aguas residuales urbanas de Maracaibo, Venezuela. *Bol. Centro Invest. Biol.*, 38 (2), 94-108.

Chu, F.; Chu, P.; Shen, X.; Lam, P. K. S.; Zeng, R. J. 2014. Effect of phosphorus on biodiesel production from *Scenedesmus obliquus* under nitrogen-deficiency stress. *BIORESOURCETECHNOLOGY*, 152, 241–246.

Coutteau, P., 1996. Micro Algae, in: Lavens, P., Sorgeloos, P. (Eds.), Manual on the production and use of live food for aquaculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, pp. 7-30.

Crab, R.; Avnimelech, Y.; Defoirdt, T. 2007. Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production, 270, 1–14.

Crab, R.; Chielens B.; Wille M.; Bossier, P.; Verstraete, W. 2010. The effect of different carbon sources on the nutritional value of bioflocs, a feed for *Macrobrachium rosenbergii* postlarvae.. Aquaculture Research, Mar2010, Vol. 41 Issue 4, p559-567

Crab, R.; Defoirdt, T.; Bossier, P.; Verstraete, W. 2012. Biofloc technology in aquaculture : Beneficial effects and future challenges. Aquaculture, 356-357, 351–356.

Demirbas, A., 2008. Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections. Energy Conversion and Management 49, 2106–2116

Derner, R B. 2006. Efeito de fontes de carbono no crescimento e na composição bioquímica das microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis*, com ênfase no teor de ácidos graxos poliinsaturados. Tesis doctoral. Universidad Federal de Santa Catarina, Florianópolis. BR 158p.

Devars, S.; Avilés, C.; Cervantes, C.; Moreno, R. 2000. Mercury Uptake and Removal by *Euglena gracilis*. Arch. Microbiol. 174, 175-180.

Ebeling, J.M.; Timmons, M.B.; Bisogni, J.J. 2006. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia–nitrogen in aquaculture systems. Aquaculture 257, 346–358.

Ebrahimian, A.; Kariminia, H.; Vosoughi, M. 2014. Lipid production in mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* in a mixture of primary and secondary municipal wastewater. *Renewable Energy*, 71, 502–508.

Ekasari, J.; Angela, D.; Waluyo, S. H.; Bachtiar, T.; Surawidjaja, E. H.; Bossier, P.; Schryver, P De. 2014. The size of biofloc determines the nutritional composition and the nitrogen recovery by aquaculture animals. *Aquaculture*, 426-427, 105–111.

FAO (Food and Agriculture Organization). 2014. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma.

González, L.M. 2010. Influencia de la deficiencia de nitrógeno y fósforo en las interacciones competitivas entre *Chlorella vulgaris* Y *Scenedesmus acutus*. Tesis de maestría. Universidad nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.

González-Garcinuño, Á.; Taberero, A.; Sánchez-álvarez, J. M.; Martin, E. M.; Galán, M. A. 2014. Effect of nitrogen source on growth and lipid accumulation in *Scenedesmus abundans* and *Chlorella ellipsoidea*, 173, 334–341.

Greque, M. y Vieira J.A..2007. Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina sp* .and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor, 129, 439–445.

Grobbelaar, J.U. Algal Nutrition Mineral Nutrition. En.: Richmond, A. 2004. Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. Blackwell Publishing Ltd.

Grönlund, E. 2002. Microalgae at wastewater treatment in cold climate. Licentiate Thesis. Division of Sanitary Department of Environmental Engineering, Luleå University of Technology, SE-971 87, Luleå, Sweden.

Guerra, M. 2011. Humus de lombriz *Eisenia foetida* para cultivar dos microalgas marinas como alimento de larvas de camarón. Tesis de maestría. Universidad de la Habana. La Habana, Cuba.

Guerrero-Cabrera, L.; Rueda, J. A.; García-lozano, H.; y Navarro, A. K. 2014. Cultivation of *Monoraphidium sp* ., *Chlorella sp* . and *Scenedesmus sp* . algae in Batch culture using Nile tilapia effluent. *Bioresource Technology*, 161, 455–460.

Hargreaves, J.A., 1998. Nitrogen biogeochemistry of aquaculture ponds. *Aquaculture*, 166 181–212

Hargreaves, J.A., 2013. Bioflocs production system for aquaculture. Southern Regional Aquaculture Center (SRAC) Publication No. 4503

Harman-Ware, A. E.; Morgan, T.; Wilson, M.; Crocker, M.; Zhang, J.; Liu, K.; Debolt, S. 2013. Microalgae as a renewable fuel source: Fast pyrolysis of *Scenedesmus sp.* *Renewable Energy*, 60, 625–632.

Hu, Q. y Sommerfeld, M. 2004. Selection of High performance microalgae for biorremediation of nitrate-contaminated groundwater. Technical report for grant number 01-HO-GR-0113. School of Life Sciences, Arizona State University. pp. 13

Johnson, M.B. y Wen, Z. 2010. Development of an attached microalgal growth system for biofuel production. *Appl Microbial Biotechnol.* 2010 Jan;85(3):525-34.

Jones, A.; Dennison, W.; Preston, N. 2001. Integrated treatment of shrimp effluent by sedimentation, oyster filtration and macroalgal absorption: a laboratory scale study. *Aquaculture*, 193, 155 –178.

Jones, A.; Preston, P.; Dennison, W. 2002. The efficiency and condition of oyster and macroalgae used as biological filters of shrimp pond effluent. *Aquaculture Research*, 33, 1-19.

Ju, Z.Y.; Forster, I.; Conquest, L.; Dominy, W.; Kuo, W.C.; Horgen, F.D. 2008. Determination of microbial community structures of shrimp floc cultures by biomarkers and analysis of floc amino acid profiles. *Aquac. Res.*, 39(2), 118–133.

Kim, M. K.; Chang, M. U.; Acreman, J. 2007. Enhanced production of *Scenedesmus spp.* (green microalgae) using a new medium containing fermented swine wastewater, 98, 2220–2228.

Krishna A.R., Dev L.; Thankamani V. 2012. An integrated process for Industrial effluent treatment and biodiesel production using Microalgae. *Research in Biotechnology* 3, 47-60.

Kwangyong, L. y Choul-Gyun, L. 2002 Nitrogen removal from wastewater by microalgae without consuming organic carbon sources. *J. Microbiol. Biotechnol.* 12 (6), 979-985.

Lampert, W. y Sommer, U. 2007. *Limnoecology*. Second Edition. Oxford University Press Inc., New York.

Lehninger, A. L.; Nelson, D. L.; Cox, M. M. 1995. *Principios de Bioquímica*. Segunda Edición. Worth Publishers, Inc. New York. USA.

Li, X.; Hu, H.-Y.; Yang, J. 2010. Lipid accumulation and nutrient removal properties of a newly isolated freshwater microalga, *Scenedesmus sp.* LX1, growing in secondary effluent. *N. Biotechnol.* 27, 59–63.

Li, X.; Hu, H.-Y.; Zhang, Y.-P. 2011. Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus sp.* under different cultivation temperature. *Bioresource Technology*, 102(3), 3098–3102.

Long, L.; Yang, J.; Li, Y.; Guan, C.; Wu, F. 2015. Effect of biofloc technology on growth, digestive enzyme activity, hematology, and immune response of genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*,

Lourenço, S. O. 2006. *Cultivo de microalgas marinhas- princípios e aplicações*. Rima: São Carlos.

Madigan, M.T.; Martinko, J.M.; Parker, J. 1999. *Brock Biología de los microorganismos*. Ed. Prentice Hall Iberia. 8° Ed. pp 149 – 177.

Magnotti, C.; Lopez, R.; Derner, R; Vinatea, L. 2015. Using residual water from a marine shrimp farming BFT system. Part I: nutrient removal and marine microalgae biomass production. *Aquaculture Research*, 1(9).

MAGRAMA (Ministerio de agricultura, alimentación y medio ambiente, ES). 2013. Aplicación de las microalgas: estado de la técnica. España. AST Ingeniería. 72 p.

Maldonado, M. T. y Price, N. M. 1996. Influence of N substrate on Fe requirements of marine centric diatoms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 141:161–72.

Marinho-Soriano, E., Panucci, R. A., Carneiro, M. A. A.; Pereira, D. C. 2009. Evaluation of *Gracilaria caudata* for bioremediation of nutrients from shrimp farming wastewater. *Bioresource Technology*, 100(24), 6192–6198.

Marinho-Soriano, E.; Azevedo, C. A. A.; Trigueiro, T. G.; Pereira, D. C.; Carneiro, M. A. A.; Camara, M. R. 2011. Bioremediation of aquaculture wastewater using macroalgae and *Artemia*. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 65(1), 253–257.

Martínez, M.E.; Sánchez, S.; Jiménez, J.M.; El Yousfi, F.; Muñoz, L. 2000. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology*, 73(3), 263–272.

Mata, T.M.; Martins, A.A.; Caetano, N.S. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew Sust Energ Rev* 14, 217-232.

Mata, T.M.; Melo, A.C.; Simões, M.; Caetano, N.S. 2012. Parametric study of a brewery effluent treatment by microalgae *Scenedesmus obliquus*. *Bioresour. Technol.* 107, 151–158.

Miao, X.L. y Wu, Q.Y. 2006. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresource Technology* 197, 841–846.

Molina-Grima, E.; Fernandez Sevilla, J.M.; Sanchez Perez, J.A.; Garcia Camacho, F., 1996. A study on simultaneous photolimitation and photoinhibition in dense microalgal cultures taking into account incident and averaged irradiances. *J. Biotechnol.* 45, 59–69.

Nagase, H.; Eguchi, K.; Yoshihara, K.I.; Hirata, K.; Miyamoto, K. 1998. Improvement of microalgal NO_x removal in bubble column and airlift reactors. *J Ferment Bioeng* 1998;86: 421–3.

Nunes, A. 2002. Tratamento de efluentes e recirculação de água na engorda de camarão marinho. *Panorama de Aqüicultura*, 71: 27-39.

Núñez V; Voltolina D; Nieves M; Piña P; Medina A; Guerrero M. 2001. Nitrogen budget in *Scenedesmus obliquus* cultures with artificial wastewater. *Bioresource Technol.* 78: 161-164.

Olguín, E.J.; Galicia, S.; Mercado, G.; Pérez, T. 2003. Annual productivity of *Spirulina (Arthrospira)* and nutrient removal in a pig wastewater recycling process under tropical conditions. *Journal of Applied Phycology* 15, 249–257.

Pagand, P.; Blancheton, J. Lemoalle, J.; Casellas. C. 2000. Low density fish farm including unit containing *Ulva lactuca* or *Gracilaria verrucosa*. *Aquaculture Research*, 31 (1), 729.

Pancha, I.; Chokshi, K.; Mishra, S. 2015. Production potential with nutritional stress amelioration through optimization of carbon source and light intensity in *Scenedesmus sp.* CCNM 1077. *Bioresource Technology*, 179, 565–572.

Pellón, A.; Benítez, F.; Frades, J.; García, L.; Cerpa, A.; Alguacil, F. J. 2003. Empleo de microalga *Scenedesmus obliquus* en la eliminación de cromo presente en aguas residuales galvánicas. *Revista de Metalurgia*, 39, 9–16.

Perez-Garcia, O.; Escalante, F. M. E.; Luz, E.; Bashan, Y. 2011. Heterotrophic cultures of microalgae : Metabolism and potential products. *Water Research*, 45(1), 11–36.

Pittman, J.K.; Dean, A.P.; Osundeko, O. 2011. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresource Technology* 102, 17-25.

Preston, N.; Christopher, J.; Buford, M. 2003. Recent advances towards minimizing and managing waste nutrients from intensive shrimp farms in Australia. In- Book of Abstracts, v. 2, World Aquaculture Meeting, May 19-23, 2003 Salvador, Brazil.

- Qin, S.; Liu, G.; Hu, Z. 2008. The accumulation and metabolism of astaxanthin in *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae), 43, 795–802.
- Quevedo, C.; Morales, S.; Acosta, A. 2008. *Scenedesmus sp* growth in different culture mediums for microalgal protein production. ISSN 0121-4004 , 25–31.
- Rakocy, J.E.; Danaher, J.J.; Bailey, D.S.; Shultz, R.C. 2008. Development of a Biofloc System for the Production of Tilapia. *Aquaculture*; 277: 138-145
- Ramos, R., Vinatea, L., Seiffert, W., Beltrame, E., Santos, J. y Da Costa, R. 2006. Treatment of shrimp effluent by sedimentation and oyster filtration using *Crassostrea gigas* and *C. rhizophorae*. *Brazilian archives of biology and technology*. 52(June), 775–784.
- Raven, J. A., Evans, M. C. W., y Korb, R. E. 1999. The role of trace metals in photosynthetic electron transport in O₂evolving organisms. *Photosynth. Res.* 60:111–49.
- Raven, P. H.; Evert, R. F.; Eichhorn, S. E. 2001. *Biologia Vegetal*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 906p..
- Ray, A. J., Lewis, B. L., Browdy, C. L., y Lef, J. W. 2010. Suspended solids removal to improve shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production and an evaluation of a plant-based feed in minimal-exchange , superintensive culture systems, 299, 89–98.
- Ray A.J., Dillon K.S. & Lotz J.M. 2011. Water quality dynamics and shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production in intensive, mesohaline culture systems with two levels of biofloc management. *Aquacultural Engineering* 45, 127–136
- Ray, A. J., Seaborn, G., Browdy, C. L., y Leffler, J. W. 2012. Effects of Biofloc Reduction on Microbial Dynamics in Minimal-exchange, Superintensive Shrimp, *Litopenaeus vannamei* , *Culture Systems*, 43(6), 790–801.
- Rhee, G. Y. 1978. Effects of N:P atomic ratios and nitrate limitation on algal growth, cell composition, and nitrate uptake. *Limnology and Oceanography*; 23: 10-25.

Sánchez, G. 2001. Parámetros de Cultivo. II Curso Microalgas y Cianobacterias: Aislamiento, Cultivo y Fisiología. Santa Marta, Colombia. 23-30.

Schryver, P. De, Crab, R., Defoirdt, T., Boon, N., y Verstraete, W. 2008. The basics of bioflocs technology: The added value for aquaculture. *Aquaculture*, 277(3-4), 125–137.

Schveitzer, R.; Arantes, R.; Baloi, M.F.; Costódio, P. F. S.; Vinatea, L.; Quadros, W.; Andreatta, E. R. 2013. Use of artificial substrates in the culture of *Litopenaeus vannamei* (Biofloc System) at different stocking densities: Effects on microbial activity, water quality and production rates. *Aquacultural Engineering*; 54: 93-103.

Seoáñez, M. 2005. Depuración de las aguas residuales por tecnologías ecológicas y de bajo costo. Ingeniería del medio ambiente. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España.

Soratana, K., Khanna, V., y Landis, A. E. 2013. Re-envisioning the renewable fuel standard to minimize unintended consequences: A comparison of microalgal diesel with other biodiesels. *Applied Energy*, 112, 194–204.

Sousa, W. T. 2003. Tratamento de efluentes de carcinicultura por dois wetlands artificiais pilotos, com e sem *Spartina alterniflora*. Perspectivas de aplicação.. Dissertação de Mestrado em Aqüicultura. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, BR.

Steicke, CR; Jegatheesan, V; Zeng, C. 2008. Water and wastewater treatment technologies: Recirculating Aquaculture Systems - A review. EOLSS (Encyclopedia of Life Support Systems). UNESCO. p. 14.

Stephens E, Ross IL, Mussnug JH, Wagner LD, Borowitzka MA, Posten C, Kruse O, Hankamer B. 2010. Future prospects of microalgal biofuel production systems. *Trends in plant science*, 15(10):554-564.

Stevenson, R.J., Bothwell, M.L., Lowe, R.L. 1996. Algal Ecology, Freshwater Benthic Ecosystems. Academic Press, USA.

Sunda, W. G. y Huntsman, S. A. 1995. Cobalt and zinc interreplacement in marine phytoplankton: Biological and geochemical implications. *Limnol. Oceanogr.* 40:1404–17.

Sze, P. 1998. *A Biology of the Algae*. Third edition. WCB/McGraw-Hill.

Tam, N.; Wong, J. y Wong, Y. 2001. Repeated Use of two *Chlorella* Species, *C. vulgaris* and WW1 for Cyclic Nickel Biosorption. *Environmental Pollution*, 114, 85-92

Teichert-Coddington, D., Rouse, D., Potts, A., Boyd, C. 1999. Treatment of harvest discharge from intensive shrimp pond by settling. *Aquacultural Engineering*, 19, 147 – 161.

Tilley, D., Badrinarayanan, H., Rosati, R., Son, J. 2002. Constructed wetlands as recirculation filters in large-scale shrimp aquaculture. *Aquacultural Engineering*, 26, 81-109.

Thiansathit, W., Keener, T. C., Khang, S.-J., Ratpukdi, T., y Hovichitr, P. 2015. The kinetics of *Scenedesmus obliquus* microalgae growth utilizing carbon dioxide gas from biogas. *Biomass and Bioenergy*, 76, 79–85.

Timmons M.B.y Ebeling J.M.. 2007. Biofiltration. p. 242-.En: Timmons MB y Ebeling JM(Eds). *Recirculating aquaculture*. 2da. Ed. USDA, 489p.

Wu, Y. H., Yu, Y., Li, X., Hu, H. Y., y Su, Z. F. 2012. Biomass production of a *Scenedesmus sp.* under phosphorous-starvation cultivation condition. *Bioresource Technology*, 112, 193–198.

Wu, Y.H., Li, X., Yu, Y., Hu, H.Y., Zhang, T.Y. y Li, F.M. 2013. An integrated microalgal growth model and its application to optimize the biomass production of *Scenedesmus sp.* LX1 in open pond under the nutrient level of domestic secondary effluent. *Bioresource Technology*, 144, 445-451.

Xu, H., Miao, X., Wu, Q., 2006. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *J. Biotechnol.* 126, 499-507.

Xu, X., Shen, Y., y Chen, J. 2015. Cultivation of *Scenedesmus dimorphus* for C/N/P removal and lipid production. *EJBT*, 18(1), 46–50.

Yang, S., Liu, G., Meng, Y., Wang, P., Zhou, S., y Shang, H. 2014. Utilization of xylose as a carbon source for mixotrophic growth of *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology*, 172, 180–185.

Zhang, T.Y.; Wu, Y.H., Zhu, S.F, Li, F.M., Hu, H.Y. 2013. Isolation and heterotrophic cultivation of mixotrophic microalgae strains for domestic wastewater treatment and lipid production under dark condition. *Bioresource Technology*, 149, 586–589.

IX. ANEXOS

ANEXO 1 - Preparación del medio Guillard f/2

El medio Guillard f/2 está compuesto por 3 soluciones principales: macronutrientes, metales traza y vitaminas. A continuación se describe el proceso de preparación de las soluciones stock para la preparación del medio Guillard f/2.

Preparar soluciones stock de cada compuesto con la concentración que se menciona en la tabla. Una vez obtenidas todas, se podrá adicionar la cantidad requerida de cada uno para formar el medio Guillard. La adición de Silicatos es opcional cuando se trata de microalgas de agua dulce.

Tabla 1 - Preparación del medio Guillard f/2

Compuesto	Concentración (g.L ⁻¹ de agua)	Cantidad requerida
NaNO ₃	75	1 mL
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	5	1 mL
Solución de metales traza		1 mL
Solución de vitaminas		0.2 mL

*Cantidades requeridas para producir 1 Litro de medio Guillard f/2

Solución de metales traza

Preparar soluciones stock de los siguientes compuestos, adicionar las cantidades requeridas en un matraz de 1 L y enrasar con agua destilada para formar la solución de metales traza.

Tabla 2 - Preparación de la solución de metales trazas

Compuesto	Concentración (g.L ⁻¹ de agua)	Cantidad requerida
FeCl ₃ ·6H ₂ O		3.15 g
Na ₂ EDTA·2 H ₂ O		4.36 g
MnCl ₂ ·4 H ₂ O	180	1 mL
ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	22	1 mL
CoCl ₂ ·6 H ₂ O	10	1 mL
CuSO ₄ ·5 H ₂ O	9.8	1 mL
Na ₂ MoO ₄ ·2 H ₂ O	6.3	1 mL

Solución de Vitaminas

Preparar soluciones stock de los siguientes compuestos, adicionar las cantidades requeridas en un matraz de 1 L y enrazar con agua destilada para formar la solución de metales traza.

Tabla 3 - Preparación de la solución de vitaminas.

Compuesto	Concentración (g.L ⁻¹ de agua)	Cantidad requerida
Tiamina.HCl (Vitamina B1)		200 mg
Biotina (Vitamina H)	1	1 mL
Cianocobalamina (Vitamina B12)	1	1 mL

ANEXO 2 – Densidad celular (células x10⁴/mL) de la microalga *Scenedesmus sp.* cultivada en el medio formulado con el residuo líquido de biofloc en el bioensayo I.

Días	T1 (50% RL)	T2 (75% RL)	T3 (100% RL)	T4 (Guillard f/2)
0	10	10	10	10
1	26.75 ± 7.77	31.58 ± 17.00	32.08 ± 19.88	54.00 ± 12.42
2	116.00 ± 43.77	103.33 ± 73.09	116.08 ± 53.20	137.58 ± 48.07
3	370.00 ± 75.00	184.08 ± 70.75	135.08 ± 110.68	465.00 ± 224.89
4	476.33 ± 175.00	399.67 ± 213.71	332.92 ± 186.06	910.00 ± 242.85
5	539.67 ± 30.75	361.67 ± 222.34	387.08 ± 212.44	961.67 ± 64.49
6	468.42 ± 371.49	467.08 ± 281.14	551.67 ± 260.78	1171.67 ± 395.61
7	489.58 ± 284.29	718.50 ± 545.52	446.67 ± 136.50	1083.33 ± 177.36
8	404.50 ± 327.63	408.67 ± 340.27	430.00 ± 125.30	651.67 ± 148.44
9	459.50 ± 310.22	746.42 ± 631.47	446.67 ± 68.25	948.33 ± 273.60
10	780.42 ± 601.53	819.50 ± 746.57	684.75 ± 447.26	481.67 ± 103.24
11	801.08 ± 630.82	811.17 ± 769.53	581.92 ± 406.60	207.83 ± 50.60
12	601.67 ± 490.42	689.58 ± 603.33	555.58 ± 436.91	103.75 ± 22.63

ANEXO 3 – Densidad celular (células x10⁴/mL) de la microalga *Scenedesmus sp.* cultivada en el medio formulado con el residuo sólido de biofloc en el bioensayo I.

Días	T1 (25% RS)	T2 (50% RS)	T3 (75% RS)	T4 (100% RS)	T5 (Guillard f/2)
0	10	10	10	10	10
1	24.00 ± 11.99	18.17 ± 11.34	12.42 ± 11.10	8.25 ± 1.56	5.75 ± 1.75
2	58.50 ± 4.75	60.92 ± 8.31	43.33 ± 24.02	46.92 ± 22.16	77.92 ± 16.19
3	80.75 ± 0.66	92.33 ± 14.57	71.33 ± 40.71	101.42 ± 13.50	155.08 ± 20.80
4	84.00 ± 12.67	100.08 ± 14.79	111.25 ± 22.17	128.33 ± 41.01	289.75 ± 44.86
5	72.92 ± 5.03	97.83 ± 22.06	80.42 ± 24.15	92.67 ± 19.38	665.00 ± 296.14
6	71.08 ± 2.84	85.67 ± 12.29	66.00 ± 29.24	70.08 ± 39.19	1095.00 ± 360.97
7	66.50 ± 10.58	64.17 ± 31.93	55.42 ± 15.40	71.42 ± 16.20	1825.00 ± 945.77
8	53.42 ± 3.76	32.83 ± 22.54	35.08 ± 12.53	55.83 ± 5.55	800.92 ± 446.95
9	70.25 ± 7.37	56.83 ± 30.92	43.17 ± 14.54	50.25 ± 12.05	1215.00 ± 794.69
10	56.42 ± 3.41	35.67 ± 19.40	55.67 ± 22.67	55.92 ± 24.36	878.33 ± 189.89
11	50.25 ± 12.39	29.08 ± 16.40	30.00 ± 15.77	30.17 ± 8.62	670.83 ± 369.12

ANEXO 4 – Densidad celular (células x10⁴/mL) de la microalga *Scenedesmus sp.* cultivada en el medio formulado con el residuo líquido de biofloc en el bioensayo II.

Días	T1 (50% RL+ 50% f/2)	T2 (75% RL + 25% f/2)	T3 (100% RL)	T4 (Guillard f/2)
0	10	10	10	10
1	25.00 ± 8.49	42.25 ± 3.18	71.67 ± 4.69	53.50 ± 25.59
2	68.63 ± 67.00	103.25 ± 20.51	210.08 ± 110.81	260.83 ± 82.77
3	130.00 ± 113.14	112.50 ± 10.61	396.67 ± 257.12	243.33 ± 78.48
4	276.00 ± 373.35	427.50 ± 38.89	383.33 ± 287.59	346.67 ± 140.03
5	470.00 ± 289.91	400.00 ± 106.07	665.00 ± 384.61	688.33 ± 204.59
6	405.00 ± 247.49	887.50 ± 60.10	730.00 ± 458.28	768.33 ± 189.36
7	427.50 ± 236.88	870.00 ± 473.76	663.33 ± 324.05	963.33 ± 87.37
8	347.50 ± 24.75	350.00 ± 261.63	501.67 ± 427.97	853.33 ± 110.72
9	270.00 ± 28.28	300.00 ± 282.84	503.33 ± 393.52	1005.00 ± 126.19
10	205.00 ± 183.85	410.00 ± 487.90	406.67 ± 186.44	1106.67 ± 280.01
11	237.50 ± 109.60	695.00 ± 898.03	468.33 ± 231.53	1338.33 ± 62.92
12	221.25 ± 26.52	491.25 ± 567.45	467.33 ± 340.79	1256.67 ± 88.93
13	205.00 ± 56.57	287.50 ± 236.88	466.67 ± 451.40	1175.00 ± 119.06
14	167.50 ± 95.46	160.00 ± 84.85	421.67 ± 442.28	1108.33 ± 154.46

ANEXO 5– Densidad celular (células x10⁴/mL) de la microalga *Scenedesmus sp.* cultivada con el medio formulado con el residuo sólido de biofloc durante el bioensayo II.

Días	T1 (25% RS.+ 75% f/2)	T2 (50% RS.+ 50% f/2)	T3 (75% RS.+ 25% f/2)	T4 (100% RS)	T5 (Guillard f/2)
0	10	10	10	10	10
1	18.42 ± 2.50	21.25 ± 10.19	24.08 ± 7.84	31.67 ± 26.71	25.00 ± 4.75
2	124.92 ± 14.65	120.33 ± 26.39	148.00 ± 10.40	88.25 ± 35.70	171.75 ± 19.00
3	276.17 ± 119.29	458.33 ± 65.06	388.33 ± 99.29	100.08 ± 28.34	505.00 ± 200.00
4	420.00 ± 100.37	486.67 ± 79.11	273.33 ± 60.28	145.83 ± 7.23	262.50 ± 67.50
5	560.00 ± 199.75	500.00 ± 95.79	261.67 ± 28.87	165.00 ± 15.00	262.50 ± 22.50
6	611.67 ± 123.93	458.67 ± 65.43	274.67 ± 71.23	164.33 ± 31.26	301.50 ± 26.50
7	676.67 ± 72.86	421.67 ± 43.68	291.67 ± 117.51	171.67 ± 46.46	342.50 ± 37.50
8	608.33 ± 90.74	530.00 ± 70.53	290.00 ± 78.10	140.00 ± 45.00	317.50 ± 207.50
9	775.00 ± 156.12	606.67 ± 195.85	431.6 ± 138.41	166.67 ± 25.17	797.50 ± 102.50
10	528.33 ± 20.21	286.67 ± 23.63	291.67 ± 38.84	100.00 ± 27.84	555.00 ± 135.00
11	1018.33 ± 222.34	493.33 ± 64.29	503.33 ± 52.99	118.33 ± 44.81	692.50 ± 212.50
12	1118.33 ± 335.80	555.00 ± 65.38	570.00 ± 36.06	127.67 ± 49.66	707.50 ± 207.50
13	1176.67 ± 344.29	616.67 ± 57.52	621.33 ± 30.09	136.67 ± 47.26	725.00 ± 205.00

ANEXO 6– Densidad celular (células x10⁴/mL) de la microalga *Scenedesmus sp.* cultivada en el medio formulado con el residuo líquido de biofloc en el bioensayo III.

Días	T1 (50% RL+ 50% f/2 + Met y Vit)	T2 (75% RL + 25% f/2 + Met y Vit)	T3 (100% RL + Met y Vit)	T4 (Guillard f/2)
0	10	10	10	10
1	85.08 ± 37.08	75.17 ± 6.90	81.67 ± 12.58	33.33 ± 11.88
2	373.33 ± 35.47	356.67 ± 86.07	338.33 ± 40.41	211.67 ± 119.30
3	891.67 ± 176.16	936.67 ± 272.14	1333.33 ± 227.45	623.33 ± 197.88
4	719.47 ± 97.85	806.10 ± 245.01	766.00 ± 343.23	703.33 ± 83.58
5	548.33 ± 71.82	683.33 ± 252.50	551.67 ± 215.08	778.33 ± 183.33
6	463.33 ± 107.74	426.67 ± 272.27	621.67 ± 245.37	1125.00 ± 77.94
7	1058.33 ± 492.38	618.33 ± 511.04	673.33 ± 554.62	1248.33 ± 329.48
8	881.67 ± 669.89	885.00 ± 736.19	344.33 ± 168.57	1651.67 ± 190.35
9	513.33 ± 424.45	658.33 ± 577.35	718.33 ± 797.39	1268.33 ± 126.92
10	600.00 ± 436.49	430.00 ± 312.77	1016.67 ± 1494.87	1198.33 ± 91.70

ANEXO 7– Densidad celular (células x10⁴/mL) de la microalga *Scenedesmus sp.* cultivada en el medio formulado con el residuo sólido de biofloc en el bioensayo III.

Días	T1 (25% RS.+ 75% f/2 + Met y Vit)	T2 (50% RS.+ 50% f/2 + Met y Vit)	T3 (75% RS.+ 25% f/2 + Met y Vit)	T4 (100% RS + Met y Vit)	T5 (Guillard f/2)
0	10	10	10	10	10
1	19.58 ± 4.14	34.42 ± 9.24	21.58 ± 5.20	64.58 ± 7.39	15.08 ± 4.73
2	123.00 ± 55.97	226.00 ± 61.22	223.00 ± 43.31	116.00 ± 14.53	114.00 ± 14.00
3	250.00 ± 124.40	415.00 ± 113.25	421.67 ± 103.00	163.33 ± 28.43	195.00 ± 21.79
4	194.58 ± 70.56	392.25 ± 87.36	410.00 ± 80.47	130.58 ± 25.11	130.33 ± 81.13
5	300.58 ± 126.09	580.00 ± 70.53	458.33 ± 143.38	146.42 ± 30.33	238.17 ± 119.86
6	339.08 ± 222.71	623.33 ± 120.66	386.67 ± 78.16	125.67 ± 28.61	600.00 ± 147.56
7	665.00 ± 400.37	696.67 ± 86.22	483.33 ± 50.08	110.00 ± 21.79	900.00 ± 320.47
8	542.90 ± 325.54	608.50 ± 45.66	399.08 ± 46.74	88.00 ± 5.57	715.67 ± 193.47
9	448.33 ± 233.58	533.33 ± 38.84	346.67 ± 34.03	70.67 ± 8.14	600.00 ± 92.60
10	433.33 ± 236.07	517.67 ± 30.75	320.00 ± 8.54	58.00 ± 6.24	557.33 ± 50.29

Anexo 8 - Procesamiento estadístico de los resultados de crecimiento de la microalga *Scenedesmus sp.* cultivada en el medio formulado con el residuo líquido de biofloc. Nivel de confianza del 95% ($\alpha = 0.05$)

	VARIABLES	Kolmogorov-smirnov	Normalidad	Análisis	p-valor
Bioensayo 1	Velocidad de crecimiento	>0.150	Si	ANOVA, Tukey	0.004
	Tiempo de duplicación	>0.150	Si	ANOVA, Tukey	0.037
	DCM	0.138	Si	ANOVA, Tukey	0.571
bioensayo 2	Velocidad de crecimiento	0.077	Si	ANOVA, Tukey	0.001
	Tiempo de duplicación	0.132	Si	ANOVA, Tukey	0.005
	DCM	>0.150	Si	ANOVA, Tukey	0.01
bioensayo 3	Velocidad de crecimiento	>0.150	Si	ANOVA, Tukey	0.03
	Tiempo de duplicación	>0.150	Si	ANOVA, Tukey	0.032
	DCM	>0.150	Si	ANOVA, Tukey	0.267

Anexo 9 - Procesamiento estadístico de los resultados de crecimiento de la microalga *Scenedesmus sp.* cultivada en el medio formulado con el residuo sólido de biofloc. Nivel de confianza del 95% ($\alpha = 0.05$)

	VARIABLES	Kolmogorov-smirnov	Normalidad	Análisis	p-valor
Bioensayo 1	Velocidad de crecimiento	0.119	Si	ANOVA, Tukey	0.193
	Tiempo de duplicación	>0.150	Si	ANOVA, Tukey	0.186
	DCM	<0.010	No	Kruskal-wallace	0.033
bioensayo 2	Velocidad de crecimiento	0.025	No	Kruskal	0.234
	Tiempo de duplicación	<0.010	No	Kruskal	0.234
	DCM	>0.150	Si	ANOVA, Tukey	0.001
bioensayo 3	Velocidad de crecimiento	<0.010	No	Kruskal-Wallace	0.056
	Tiempo de duplicación	<0.010	No	Kruskal-Wallace	0.054
	DCM	>0.150	Si	ANOVA, Tukey	0.019

Anexo 10 - Concentración de nutrientes en el medio formulado con el residuo sólido de biofloc

Nutriente	Concentración (g/L)	Metodología
Nitrógeno Total (orgánico)	0.800	APHA, 2005.
Fósforo Total (orgánico + inorgánico)	1.010	APHA, 2005.
Sulfatos	0.045	APHA, 2005.

Anexo 11 – Preparación y composición de nutrientes del medio formulado con el residuo líquido de biofloc.

En la tabla se muestra el porcentaje de efluente usado para la preparación del medio líquido .

C:N 20	50%
C:N 15	30%
C:N 10	20%

La composición de nitrógeno inorgánico (NAT, N-NO₂ y N-NO₃) y fósforo (PO₄) presente en el medio formulado con el residuo líquido fue estimada al multiplicar la concentración de cada nutriente, por el porcentaje de participación de cada sistema biofloc con el cual fue formulado el medio.

Repetición	Nitrógeno (mg/L)			Fósforo (mg/L)		
	C:N 10	C:N 15	C:N 20	C:N 10	C:N 15	C:N 20
I	1.064	0.929	0.827	0.630	0.585	0.503
II	1.029	0.833	0.943	0.608	0.513	0.480
III	0.979	0.563	0.671	0.626	0.472	0.458
Promedio	1.024	0.775	0.813	0.621	0.524	0.480

Medio de Residuo líquido		
Total de nitrógeno	0.844mg/L	0.060mmoles/L
Total de fósforo	0.522mg/L	0.017mmoles/L
N:P	1.6:1	3.6:1