



Universidad Científica del Perú - UCP
Registrado en el Asiento N° A00010 de la Partida N° 11000318, Personas Jurídicas de Iquitos,
Superintendencia de los Registros Públicos - SUNARP

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA
PROGRAMA ACADÉMICO DE ECOLOGÍA

TESIS:

**“INFLUENCIA DEL PETRÓLEO CRUDO EN EL CRECIMIENTO DE
DOS MICROALGAS AMAZÓNICAS *Chlorella sp.* y *Scenedesmus
sp*”**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN
ECOLOGÍA**

AUTOR : Jherson Piere Manzur Rodríguez

ASESORES : Dra. Marianela Cobos Ruiz
Lic. Ecol. María Zadith Casuso Wong

San Juan Bautista - Maynas – Loreto – Perú 2018

DEDICATORIA

A dios, porque me da la vida, las fuerzas y su amor, Él hace las cosas siempre perfectas. A mi madre, Niza Ruth Rodríguez, Por su amor y apoyo incondicional. A mis tías Rosa Rodríguez, Lety Rodríguez, por ser mi soporte y ayuda en todo este tiempo

Jherson Piere Manzur Rodríguez

AGRADECIMIENTO

Al Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética de la Universidad Científica del Perú por permitirme el uso de sus equipos, materiales y reactivos y por proporcionarme las microalgas que fueron utilizadas en el proceso de experimentación de la tesis.

A mis asesoras; Dra. Marianela Cobos Ruiz y Lic. María Zadith Casuso Wong, por brindarme la oportunidad de realizar la presente tesis en el Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética, por sus paciencia, dedicación y conocimiento que me brindaron durante todo el proceso. A ustedes mis más sinceros agradecimientos.

Al Dr. Juan Carlos Castro Gómez, investigador de la Unidad Especializada de Biotecnología del Centro de Investigaciones de Recursos Naturales de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, por el apoyo con el procesamiento estadístico de datos.

A mis colaboradores y amigos, Levi Estela, Joe Petterman, Diego Flores, Carlos Tenorio, Sheyla Pérez, Cecilia Sáenz, Joyce Eguren, por el apoyo brindado durante el proceso de realización de la tesis en el laboratorio,

A todas aquellas personas que de alguna manera contribuyeron a la culminación de la tesis, a todos ellos MUCHAS GRACIAS.

PROGRAMA ACADÉMICO DE ECOLOGÍA

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Con Resolución Decanal N°277-2016-FCEI-UCP-D del 23 de setiembre de 2016, la FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA DE LA UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL PERÚ - UCP designa como Jurado Evaluador y Dictaminador de la Sustentación de Tesis a los Señores:

- Dr. Álvaro Tresierra Ayala Presidente
- Dra. Carmen Patricia Cerdeña Del Águila Miembro
- Dr. Jorge Marapara del Águila Miembro

En la ciudad de Iquitos, siendo las 10 horas del día viernes 09 de febrero de 2018, en las instalaciones de la UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL PERÚ - UCP, se constituyó el Jurado para escuchar la sustentación y defensa de la Tesis: "Influencia del petróleo crudo en el crecimiento de dos microalgas amazónicas *Chlorella sp* y *Scenedesmus sp.*"

Presentado por el sustentante:

JHERSON PIERE MANZUR RODRIGUEZ

Como requisito para optar el título profesional de: **Licenciado en Ecología**

Luego de escuchar la Sustentación y formuladas las preguntas las que fueron: Abstraito

El jurado después de la deliberación en privado llegó a la siguiente conclusión:

La Sustentación es: Aprobado Magna Cum Laude

En fe de lo cual los miembros del jurado firman el acta.



Presidente



Miembro



Miembro

CALIFICACIÓN:	Aprobado (a) Suma Cum Laude	: 18 - 20
	Aprobado (a) Magna Cum Laude	: 17 - 18
	Aprobado (a) Cum Laude	: 15 - 16
	Aprobado (a)	: 13 - 14
	Desaprobado (a)	: 00 - 12

APROVACIÓN

Tesis sustentada en acto público el día viernes 09 de febrero a las 10 horas del
2018

Blgo. Álvaro Benjamín Tresierra Ayala Dr.
PRESIDENTE DEL JURADO

Blgo. Jorge Luis Marapara Del Águila Dr.
MIEMBRO DE JURADO

Ing. Carmen Patricia Cerdeña Del Águila Dra.
MIEMBRO DE JURADO

Blga. Mariana Cobos Ruíz Dra.
ASESORA

Lic. en Ecol. María Zadith Casuso Wong
ASESORA

ASESORA

ASESORA

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Pág.
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS	iv
JURADO CALIFICADOR Y DICTAMINADOR	v
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
CAPÍTULO I	12
INTRODUCCIÓN	12
CAPÍTULO II	15
MATERIALES Y METODOS	15
2.1 Lugar y desarrollo de la investigación	15
2.2 Tipo y Diseño de la investigación	15
2.3 Población y muestra	17
2.3.1 Población	17
2.3.2 Muestra	17
2.4 Técnicas, instrumentos y procedimientos de recolección de datos	17
2.4.1 Técnica de recolección de datos	17
2.4.2 Instrumento de recolección de datos	17
2.4.3 Procedimiento Experimental	18
2.4.3.1 Cultivo de las microalgas	18
2.4.3.2 Cosecha de las microalgas	18
2.4.3.3 Evaluación a exposición de Petróleo Crudo	18
2.4.3.4 Evaluación del crecimiento celular de las microalgas	19
2.4.3.5 Cosecha de la Biomasa microalgal	19
2.4.3.6 Extracción y Análisis de Lípidos Totales	19
2.4.3.7 Determinación del Perfil de Ácidos Grasos	20
2.4.3.8 Procesamiento de la Información	20

CAPÍTULO III	22
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
3.1 Resultados.	
3.1.1 Evaluación del Perfil de Crecimiento de dos especies de microalgas Cultivadas en diferentes concentraciones con Petróleo	22
3.1.2 Contenido de Lípidos Totales en dos especies de microalgas Oleaginosas expuestas a dos concentraciones de Petróleo Crudo	24
3.1.3 Perfil de Ácidos Grasos presentes en <i>Chlorella sp.</i> y <i>Scenedesmus sp</i> Expuestas a dos concentraciones de Petróleo Crudo	26
3.1.3.1 <i>Chlorella sp.</i>	26
3.1.3.2 <i>Scenedesmus sp.</i>	27
3.2 Discusión.	29
CAPÍTULO IV	33
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.	33
4.1 Conclusiones.	33
4.2 Recomendaciones.	33
CAPÍTULO V	34
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
CAPITULO VI	37
ANEXO	37

ÍNDICE DE TABLAS

N°	Título	Pág.
1	Valor de Promedio de Lípidos Totales de dos Especies de microalgas	24
2	Perfil de Ácidos Grasos de <i>Chlorella sp.</i>	26
3	Perfil de Ácidos Grasos de <i>Scenedesmus sp.</i>	27
4	Datos estadios de Perfil de Crecimiento de la especie <i>Chlorella sp.</i> del Ultimo dia de evaluacion	38
5	Datos estadisticos comparativos multiples de los Tratamientos Y su control de la espeie <i>Chlorella sp.</i> del ultimo dia de evaluacion	38
6	Datos estadisticos de Perfil de Crecimiento de la especie <i>Scenedesmus sp.</i> del ultimo dia de evaluacion	39
7	Datos estadisticos compartivos multiples de los Tratamientos Y su control de la especie <i>Scenedesmus sp.</i> del ultmo dia de evaluacion	39
8	Datos estadisticos de Lipídos Totales de la especie <i>Chlorella sp.</i>	40
9	Datos estadisticos de Comparaciones multiples de Lipidos Totales en sus Tratamientos y su Control de la especie <i>Chlorella sp.</i>	40
10	Datos estadisticos de Lípidos Torales de la especie <i>Scenedesmus sp.</i>	41
11	Datos estadísticos Comparativos multiples de Lípidos Totales En sus tratamientos y su control de la especie <i>Scenedesmus Sp.</i>	41

ÍNDICE DE FIGURAS

N°	Título	Pág.
1	Flujograma metodológico empleado en la investigación	16
2	Curva de Crecimiento de <i>Chlorella sp.</i>	22
3	Curva de Crecimiento de <i>Scenedesmus sp.</i>	23
4	Contenido de Lípidos totales de dos especies de microalgas.	25
5	Metodología Experimental	37

RESUMEN

En la actualidad la actividad petrolera es una de las industrias que más impactos ambientales en la biodiversidad genera a nivel local y global. En los últimos años, ha comenzado a implementarse la utilización de microalgas como agentes de biorremediación de contaminantes petrolizados, resistentes en su crecimiento, debido a que éstas proveen de oxígeno y nutrientes a otros microorganismos para potenciar la degradación de materia orgánica. El Objetivo fue evaluar la influencia del petróleo crudo en el crecimiento de dos microalgas; *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. Las microalgas fueron cultivadas en el Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética de la Universidad Científica del Perú. Se evaluaron el perfil de crecimiento, la producción de lípidos totales (método gravimétrico) y perfil de ácidos Grasos usando dos Concentraciones (1:9 v/v y 1:18 v/v) de petróleo crudo. En conclusión, los resultados indican que *Chlorella* sp., y *Scenedesmus* sp., alcanzaron un óptimo crecimiento al ser cultivadas con la concentración (1:18 v/v) con respecto al control. Respecto al contenido de lípidos totales se obtuvo un mayor porcentaje en el tratamiento 1 para ambas especies (15.53 y 13.07%) respecto al tratamiento 2, cuyos valores fueron menores (12.40 y 10.73%). El perfil de Ácidos Grasos en las dos especies presentó altos porcentajes de Ácido Palmítico para *Chlorella* sp. Y Ácido Elaídico para *Scenedesmus* sp.

Palabras Claves: Microalgas, Lípidos y Ácidos Grasos.

ABSTRACT

At the current tie, the petroleum activity is one of the industries that has more environment impacts in biodiversity generated in local and global levels.

In the last years the use of microseaweeds has been implemented as agent of bioremediation of petroleum polluting agent, resistant in its growing due that this provides oxygen and nutrients to other microorganisms to maximize the degradation of organic matter.

The objective was to evaluate the influence of crude oil in the growing of two microseaweeds *Chorella sp.* and *scenedesmus sp.* The microseaweeds were cultivated in the biotechnology and bioenergetics scientist laboratory of Perú university. In conclusión, the profiles of growing were evaluated; the total production of lipids (gravimetric method) and the profile of fatty acids using two concentrations (1:9 v/v and 1:18 v/v) of crude oil. The result indicates that the *chorella sp* and *Scenedesmus sp* reached optimum growing when they have been cultivated with the concentration (1:18 v/v) according the control.

In regard to the content of total lipids it's obtained a great percentage in the treatment 1 for both species (15.53 and 13.07%) and in regard of the 2nd treatment were lesser (12.40 and 10.73%) the profile of the fatty acids in both species has presented high percentage of acid palmitic for *Chlorella sp* and acid Elaídico for *Scenedesmus sp.*

Keywords: Microseaweeds, lipids, fatty acids.

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

Durante décadas no se consideró que la industrialización, además de propiciar el bienestar para la población, producía también una degradación de los sistemas naturales. En la actualidad, no existe fuente energética alguna que no implique un costo ambiental. Los combustibles fósiles continúan siendo la principal fuente de energía utilizada. No obstante, la descarga de petróleo y sus productos derivados a las corrientes naturales de aguas superficiales y subterráneas ha planteado un problema de gran relevancia debido a su toxicidad y bioacumulación en las cadenas tróficas (1).

Tal es así, que la actividad petrolera es una de las industrias que más impactos ambientales en la biodiversidad genera a nivel local y global. En las distintas fases de la explotación petrolera y las prácticas operacionales típicas de esta industria petrolera en zonas tropicales se produce destrucción de la biodiversidad y del ambiente en general. Por otro lado, la quema de combustibles fósiles constituye la principal causante del calentamiento global (2)

Siendo el Perú un país petrolero, el 25 de enero de 2016, a consecuencia de la fisura en la línea que transporta el crudo de petróleo del oleoducto Nor-peruano de Petroperú, se produjo el derrame de crudo que recorrió aproximadamente un kilómetro llegando hasta la quebrada Inayo, afectando las localidades Chiriaco Inayo, Distrito de Imaza, Provincia de Bagua. El día 09 de febrero del mismo año, a consecuencia de las constantes precipitaciones pluviales, aumentó el caudal de algunas quebradas rompiendo los badenes de contención del petróleo recolectado, llevándolo hasta los ríos Chiriaco y Marañón afectando localidades aledañas (3).

Por lo que, los derrames de petróleo, cada día son más frecuentes en los océanos y principalmente en los ríos amazónicos, dejando estelas de contaminación de efectos muy largo plazo, así como la formación de una película impermeable sobre el agua que afecta rápida y directamente a las aves y a los mamíferos acuáticos, al impedir el intercambio gaseoso y desviar los rayos luminosos que aprovecha el fitoplancton para llevar a cabo el proceso de fotosíntesis (4).

Afortunadamente, la naturaleza tiene mecanismos de autorregulación, cuando un ecosistema es dañado o perturbado por la presencia de cualquier agente físico, químico o biológico, esta utiliza mecanismos de recuperación, como bacterias, hongos y algunas plantas y algas que pueden degradar a los agentes dañinos. De esta intrínseca capacidad para superar algunos desequilibrios en el ecosistema, surge la biorremediación, lo cual es una técnica de descontaminación muy utilizada actualmente. Se basa en el uso de diferentes organismos plantas, levaduras, hongos, microalgas y bacterias para neutralizar sustancias tóxicas, bien transformándolas en sustancias de carácter menos tóxico o bien convirtiéndolas en inocuas para el medio ambiente y la salud humana. Ese tipo de tratamiento puede ser muy efectivo en la eliminación de compuestos orgánicos, tóxicos y biodegradables en suelos y aguas residuales. (5)

Algunas microalgas de zonas templadas han sido consideradas como especies modelos para estudiar efectos de contaminación, debido a su sensibilidad ante diversos materiales de prueba; además de ser conocido sus requerimientos nutricionales, de poseer una alta tasa de crecimiento y de ser cultivadas fácilmente en el laboratorio (6,7). No obstante, pocas especies tropicales han sido estudiadas.

Entre las microalgas utilizadas en ensayos de toxicidad encontramos las algas verdes como *Scenedesmus* sp, que ha sido utilizada como bioindicador para valorar los efectos del petróleo o efluentes derivados de su extracción, reportando una disminución en la concentración de clorofila a, en el porcentaje de materia seca, en la densidad celular o la tasa de crecimiento. (8,9)

En ese sentido, en los últimos años ha comenzado a implementarse la utilización de microalgas como agentes de biorremediación de contaminantes petrolizados, resistentes en su crecimiento, debido a que estas proveen de oxígeno y nutrientes a otros microorganismos para potenciar la degradación de materia orgánica. No obstante, es importante realizar investigaciones sobre crecimiento de estos microorganismos en medios con petróleo crudo para así poder conocer el comportamiento de los mismos y poder emplearlos en los procesos de biorremediación. Además, estudios relacionados con el efecto del petróleo sobre las

microalgas pueden aportar, además de conocimiento, información de mucha importancia en el área de ecotoxicología, la cual permitiría evaluar y predecir posibles daños causados por eventualidades asociadas a las actividades petroleras además, toda esta información aportará significativamente al estado del arte y en el futuro permitirá el incremento en la producción de lípidos y la mejora del nivel socioeconómico local regional y nacional.

En tal sentido, la presente investigación tuvo como objetivo general evaluar la influencia del petróleo crudo en el crecimiento de dos microalgas *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp y como objetivos específicos; Conocer el perfil de crecimiento, determinar la producción de lípidos totales y establecer el perfil de ácidos grasos de *Chlorella* sp y *Scenedesmus* sp., expuestos a dos concentraciones de petróleo crudo (1:9 v/v y 1:18 v/v).

CAPITULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Lugar y desarrollo de la investigación

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética de la Universidad Científica del Perú (UCP), ubicado en la Av. José Abelardo Quiñones km 2,5, Distrito de San Juan Bautista, Provincia de Maynas, Departamento de Loreto.

2.2 Tipo y Diseño de la investigación

La investigación fue descriptivo, ya que se recolectaron datos necesarios para el estudio de las microalgas, influenciadas ante el petróleo crudo en su perfil de crecimiento, producción de lípidos totales y perfil de ácidos grasos de dos especies de microalgas amazónicas.

El diseño fue experimental (Figura 1), porque se manipularon variables necesarias para el crecimiento de las dos microalgas que serán proporcionadas por el Banco de cepas del Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética de la Universidad Científica del Perú. Estas microalgas fueron tratadas con medio CHU10 sin Bicarbonato (grupo control) y petróleo crudo (grupo problema). Cada especie de microalga se trabajó por triplicado y fueron expuestas a 7 y 14 días a diferentes concentraciones 1:9 v/v (400 mL Cultivo + 50 mL Petróleo Crudo), 1:18 v/v (425 mL Cultivo + 25 mL Petróleo Crudo).

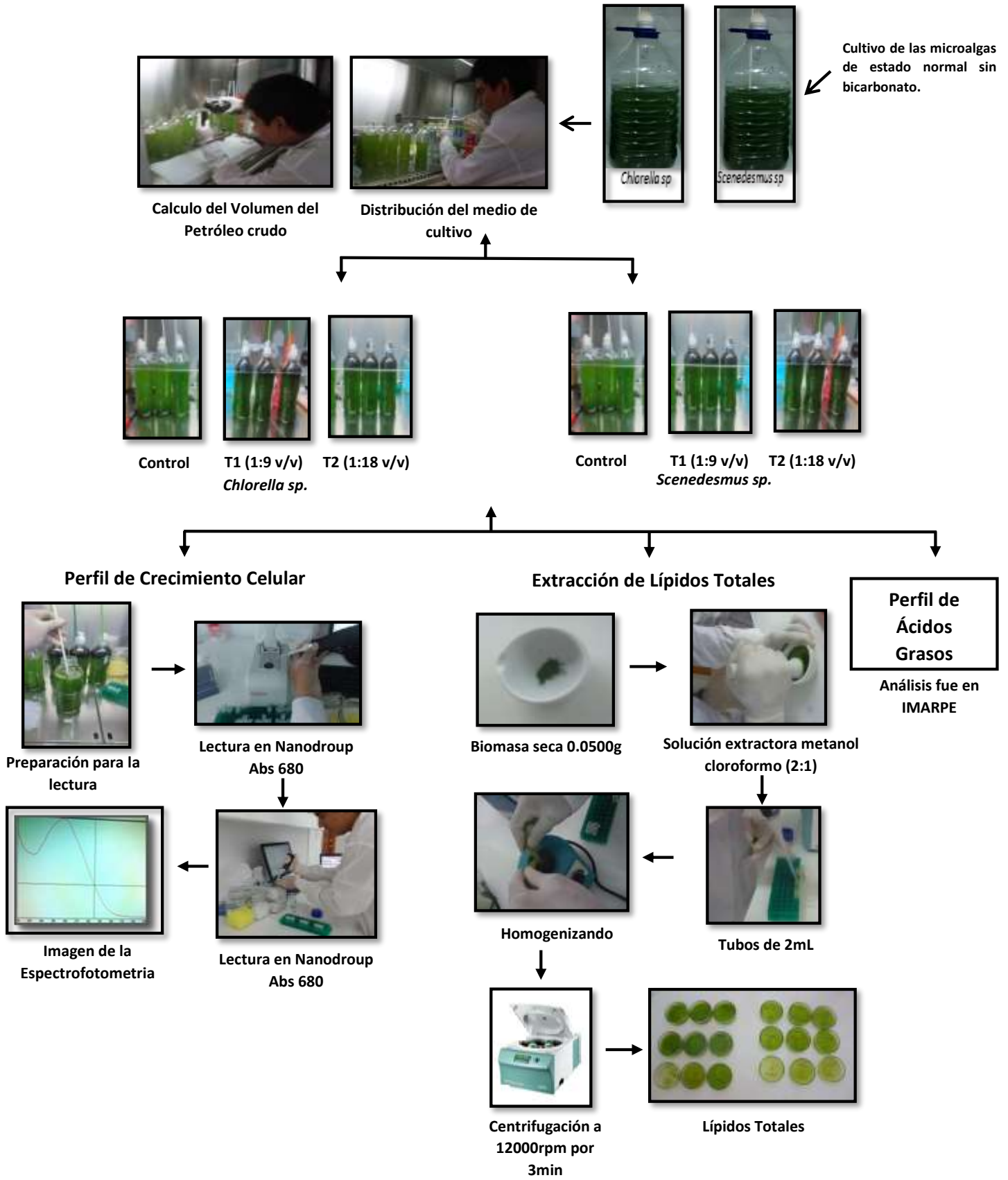


Figura 1: Flujoograma metodológico empleado en la investigación

2.3 Población y Muestra.

2.3.1 Población.

La población estuvo constituida por las especies de microalgas de agua dulce de la Amazonía Peruana.

2.3.2 Muestra.

La muestra fue representada por las microalgas (*Chlorella sp.* y *Scenedesmus sp.*), que fueron proporcionados por el Banco de cepas del Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética de la Universidad Científica del Perú (UCP).

2.4 TÉCNICAS, INSTRUMENTOS Y PROCEDIMIENTOS

2.4.1 Técnica de recolección de datos:

Para la recolección de datos de la investigación se basó en la observación directa y a través de lecturas diarias de las 2 concentraciones más su grupo control en Medio CHU 10 sin bicarbonato por triplicado en el nanoespectrofotometro (Nanodrop 2000, Thermo Scientific).

2.4.2 Instrumento de recolección de datos:

Los instrumentos para la recolección de datos que se utilizaron fueron los siguientes:

- a) Fichas o guías de observación. Se utilizaron para registrar la información obtenida de la tasa de crecimiento microalgal.
- b) Los Equipos que se utilizaron para obtener directamente el registro de datos fueron el Nanoespectrofotometro (Nanodrop 2000, Thermo Scientific), Auto clave (Yamato, SM510), Balanza analítica (Sartorius, ED 124S), Centrifuga universal 320 R, Vórtex (ISOLAB GmbH).

2.4.3 Procedimiento Experimental.

2.4.3.1 Cultivo de las microalgas.

Se cultivaron dos especies de microalgas del banco de cepas del Laboratorio de la Universidad Científica del Perú (*Chlorella* sp UCP 0001, *Scenedesmus* sp UCP 0002). Se contaron con cultivos de las dos especies de microalgas en medio CHU10 sin Bicarbonato. Las dos cepas fueron cultivadas en frascos de 5L con medio hasta su saturación. Cada frasco estuvo en aireación constante, a 26°C y un fotoperiodo de (12:12) luz con una intensidad lumínica de 100 $\mu\text{E. M}^2. \text{S}^{-1}$, por un periodo de 2 meses. Una vez alcanzado la saturación del cultivo se prosiguió con la cosecha respectiva.

2.4.3.2 Cosecha de las microalgas

El cultivo microalgal se cosechó mediante centrifugación. Se distribuyó 200 mL del cultivo en 4 tubos para centrifugar 50 mL (Corning®) y se centrifugó a 4000rpm a 10°C por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante e inmediatamente se añadió más cultivo en los mismos tubos, se centrifugó bajo las condiciones indicadas, este paso se repitió hasta obtener toda la biomasa microalgal de cada tratamiento de cultivo y su medio de control por triplicado.

2.4.3.3 Evaluación a exposición de Petróleo Crudo.

Para la evaluación de la influencia del petróleo crudo se usaron 5 Litros de cultivo microalgal, de las cuales fueron distribuidas uniformemente en frascos de 500mL por triplicado empleando diferentes concentraciones 1:9 v/v (400 mL Cultivo + 50 mL Petróleo Crudo), 1:18 v/v (425 mL Cultivo + 25 mL Petróleo Crudo).

El petróleo crudo (625 mL) fue proporcionado por PETROLEO DEL PERU – PETROPERU S. A. Refinería Iquitos, extraída del Lote 131 cuyo sistema de coordenadas geográficas son: Proyección: Universal Transversal de Mercator

(UTM) Datum: Sistema Geodésico Mundial de 1984 (WGS-84) Zona: 18 Sur. Entre el departamento de Huánuco, Pasco y Ucayali. Su grado API es de 24 a 27 API.

Se contaron con dos grupos de trabajo: un grupo control constituido por 450 mL de medio CHU10 sin bicarbonato y un grupo experimental constituido por petróleo crudo en cada concentración diluido con medio CHU10 sin bicarbonato. Estos ensayos se realizaron por triplicado, sometidas a condiciones de aireación constante, a 26 °C y un fotoperiodo de (12:12) luz con una intensidad lumínica de 100 μ E. M. La evaluación de crecimiento se realizó de manera diaria, la acumulación de lípidos totales y el perfil de ácidos grasos se realizó a los 14 días.

2.4.3.4 Evaluación del crecimiento celular de las microalgas

El crecimiento de las microalgas evaluadas se realizó diariamente a la misma hora, utilizando el Nanoespectrofotometro (Nanodrop 2000, Thermo Scientific),

2.4.3.5 Cosecha de la Biomasa microalgal.

La cosecha por centrifugación se realizó después de 14 días de iniciado la evaluación, la biomasa obtenida fue secada a temperatura ambiente por 72 horas.

2.4.3.6 Extracción y Análisis de Lípidos Totales.

La extracción de lípidos totales se realizó según Yu et al., (10), que consistió en transferir la biomasa seca a morteros para su trituración con 8 mL de una mezcla de solución extracción cloroformo: metanol (2:1). El extracto obtenido se transfirió a microtubos de 2 mL. La solución se homogenizó en vórtex por 30 seg. y centrifugó a 12000rpm a 4°C por 3 min.

La fase clorofórmica se transfirió a placas Petri de 15x60mm con peso conocido. Los restos celulares y otros componentes fueron retenidos en la fase intermedia (entra fases acuosa y clorofórmica) y fueron tratados varias veces con la solución extractora de lípidos (cloroformo: metanol) después de su homogenización en el vortex y centrifugación. Todos los extractos con solventes orgánicos fueron filtrados y transferidos a la misma placa Petri de 15x60mm de precipitado. Los solventes

orgánicos se evaporaron de la placa petri de precipitado en un hotplate a 50°C por 4 horas. Luego el componente lipídico retenido en la placa petri de precipitado se secó a 50°C por 4 horas. Finalmente, la placa Petri de precipitado se atemperó a 25°C y se determinó su peso. Por diferencia de peso de la placa petri de precipitado con y sin los lípidos se determinó la cantidad de lípidos totales obtenidos con la siguiente ecuación:

$$\text{Contenido lipídico (\%)} = \frac{PL}{Pm} \times 100$$

PL =Es el peso seco de los lípidos totales

PM =Es el peso seco de las microalgas.

2.4.3.7 Determinación del perfil de ácidos grasos

Esta etapa se desarrolló en el Instituto del Mar del Perú-IMARPE y consistió en lo siguiente: los ésteres de metilo de los ácidos grasos (FAME) denominados biodiésel, fueron preparados por transesterificación ácida según Liu et al. (11). Brevemente, el extracto de lípidos totales fue incubado con una mezcla de tolueno y ácido sulfúrico al 1 % en metanol (1:2, v/v) por 12 horas a 50°C. Los FAMES producidos fueron extraídos con hexano y luego analizados con un cromatógrafo de gases con detector de ionización de flama modelo varían CP- 3800. Los FAME fueron identificados por comparación con los perfiles cromatográficos de estándares auténticos (de Sigma – Aldrich). Las cantidades de FAME individuales fueron estimadas de área de los picos de los cromatogramas usando el ácido heptadecanoico como estándar interno.

2.4.3.8 Procesamiento de la información.

Se determinó el promedio, desviación estándar, para conocer si existen diferencias estadísticas significativas entre la concentración de petróleo crudo con el crecimiento de las microalgas. Así como la relación entre el perfil de crecimiento microalgal, producción de lípidos totales y perfil de ácidos grasos para los cuales se emplearon la estadística descriptiva e inferencial mediante el programa IBM SPSS

Statistics 20 y los gráficos fueron diseñados en ANOVA con prueba de HSO de Tukey.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 RESULTADOS

3.1.1 Evaluación del perfil de crecimiento de dos especies de microalgas cultivadas en diferentes concentraciones con Petróleo Crudo.

Chlorella sp., inició la evaluación con una densidad óptica de 0.214 y a los 14 días de exposición al petróleo crudo, se evidenció un perfil de crecimiento óptimo, alcanzando densidades entre 0.300 y 0.350 con ambos tratamientos, tal como se observa en la Figura 2. Asimismo, se observa que a partir del 5to día la densidad microalgal se incrementa gradualmente hasta el día 14, mostrando diferencias altamente significativas ($F=27,810$; $p=0,002$) ($p<0,05$) (Anexo, Tabla 4 y 5), estas diferencias radican exclusivamente entre ambos tratamientos con respecto al control (C+) ($p=0,002$; y $p=0,009$) ($p<0,05$) tratamiento 1 y 2 respectivamente.

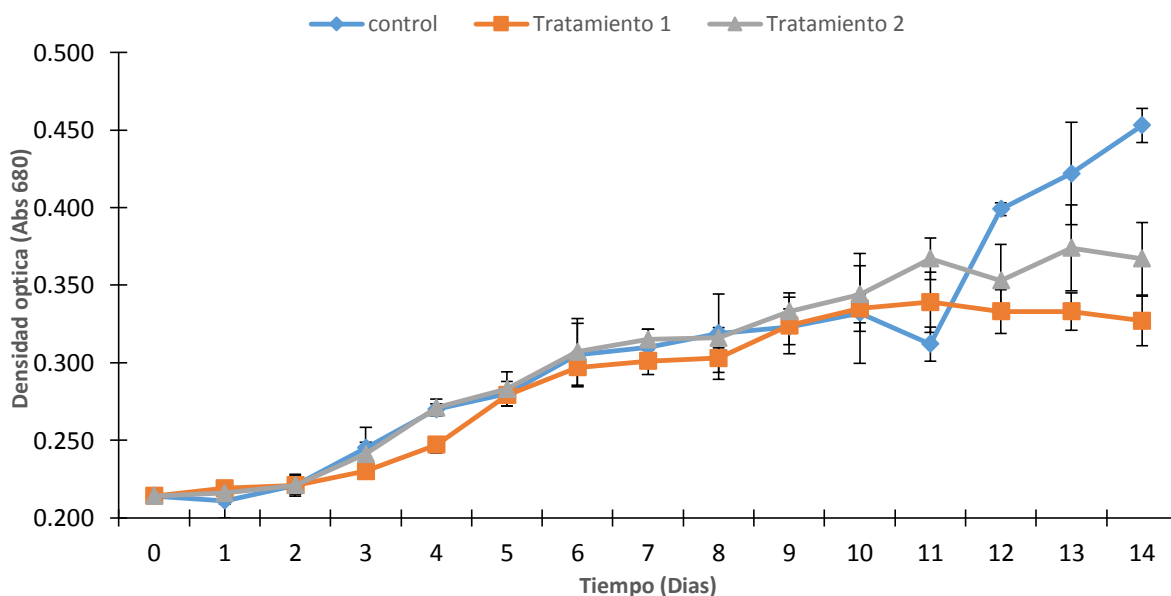


Figura 2: Curva de crecimiento de *Chlorella* sp. Sometidas a diferentes días de concentración de petróleo crudo

Respecto a *Scenedesmus* sp.; esta microalga inició con una densidad óptica de 0.220. Los resultados muestran un perfil de crecimiento de *Scenedesmus* sp. (Figura 3) muy similar a lo observado en *Chlorella* sp. La exposición a petróleo en esta especie no afectó su crecimiento durante toda la evaluación por lo que no mostraron diferencias significativas ($F=0,749$; $p=0,512$) ($p>0,05$) con relación al control (C+) ni entre los tratamientos evaluados, ya que todos mostraron un mismo patrón de crecimiento del inicio hasta el final de la evaluación (Anexo, Tabla 6).

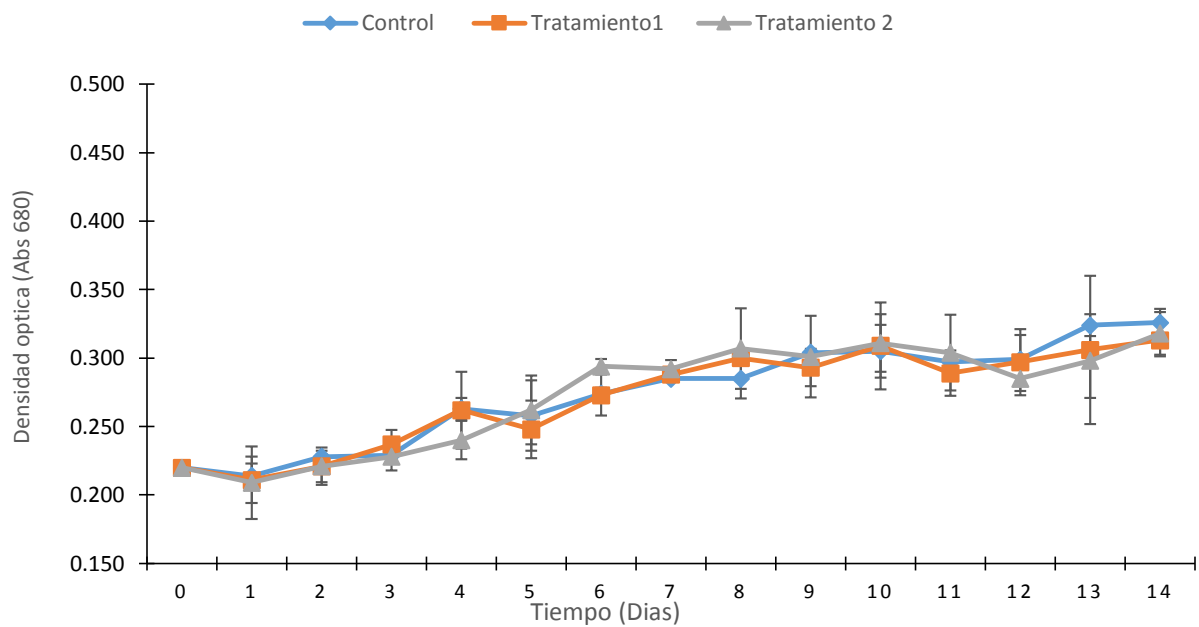


Figura 3: Curva de crecimiento de *Scenedesmus* sp. Sometidas a diferentes días de concentración de petróleo crudo

3.1.2 Contenido de lípidos totales en dos especies de microalgas oleaginosas expuestos a dos concentraciones de Petróleo Crudo.

Los resultados evidencian que el contenido de lípidos totales es mayor en el tratamiento 1 en ambas especies de microalgas (Tabla 1). *Scenedesmus* sp obtuvo un promedio de 15.53 ± 0.14 respecto al tratamiento 2 (12.40 ± 1.41).

Respecto a *Chlorella* sp., se observa similar contenido de lípidos totales en el tratamiento 1 (13.07 ± 1.13) con respecto al tratamiento 2 (10.73 ± 1.84).

Asimismo, es notorio que el grupo control de ambas microalgas muestran un contenido de lípidos totales muy bajos con respecto a los tratamientos.

Tabla 1: Valor Promedio de Lípidos Totales (%) de dos especies de microalgas oleaginosas cultivadas en diferentes concentraciones de Petróleo Crudo

Especie microalgal	Producción de Lípidos Totales (%)		
	Control	Tratamiento 1	Tratamiento 2
<i>Scenedesmus sp.</i>	08.13 ± 1.41	15.53 ± 0.14	12.40 ± 1.41
<i>Chlorella sp.</i>	07.33 ± 0.85	13.07 ± 1.13	10.73 ± 1.84

Además, se observa que existen diferencias estadísticas significativas para *Chlorella* sp. ($F= 20,859$; $p=0,017$) ($p<0,05$), (Anexo Tabla 8). Estas diferencias radican exclusivamente entre el control (C+) con respecto al tratamiento 1 (T1) ($p=0,016$) ($p<0,05$) (Anexo, Tabla 10). Esto se interpreta que la producción de lípidos en el tratamiento 1 fue mayor con relación al control (C+). Además, cabe mencionar que no existen diferencias

significativas entre los tratamientos entre sí. Del mismo modo, los resultados muestran que existen diferencias estadísticas altamente significativas para *Scenedesmus* sp ($F= 46,333$; $p=0,006$) ($p<0,05$), cuyas diferencias se muestran entre el Control (C+) con respecto a los tratamientos 1 y 2 ($p=0,005$ y $p=0,024$) respectivamente (Anexo, Tabla 10, 11).

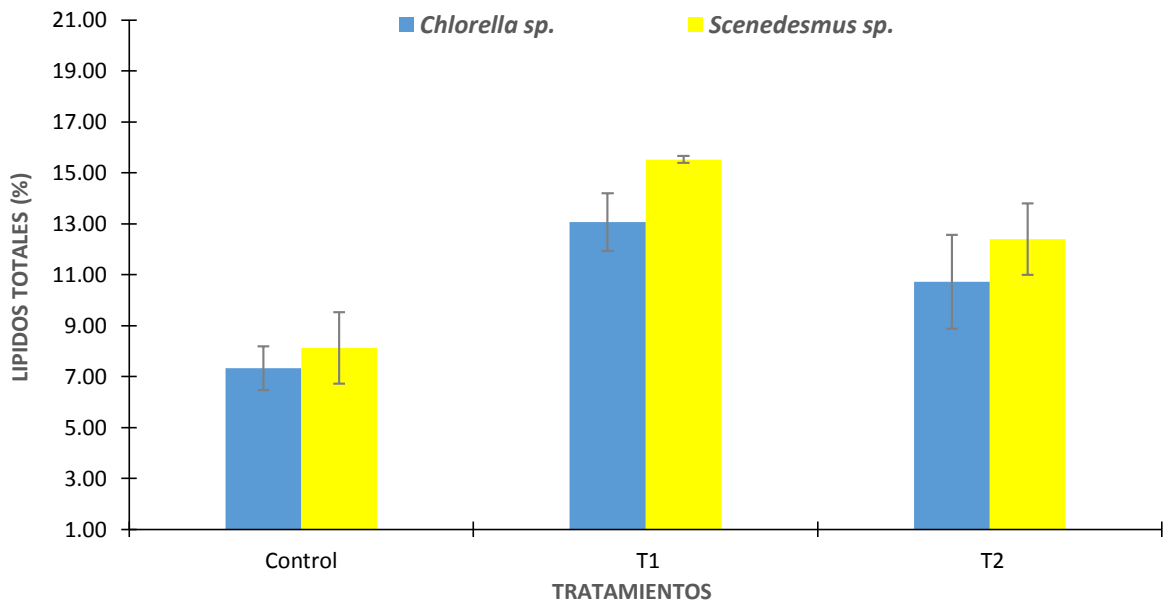


Figura 4: Contenido de Lípidos Totales (%) de dos especies de microalgas cultivadas en diferentes concentraciones de Petróleo Crudo

3.1.3. Perfil de Ácidos Grasos presentes en *Chlorella sp.* Y *Scenedesmus sp* expuestos a dos concentraciones de Petróleo Crudo.

3.1.3.1 *Chlorella sp.*

Tabla 2: Perfil de Ácidos Grasos de *Chlorella sp.*, al ser expuestas a diferentes tratamientos con Petróleo Crudo

Ácidos Grasos		<i>Chlorella sp.</i>		
		Control	T1	T2
C 14:0	Ac. Mirístico	0,2 ± 0	0,3 ± 0	0,2 ± 0
C 16:0	Ac. Palmítico	18,9 ± 0,02	16,6 ± 0,01	17,7 ± 0,01
C 16:1n-7	Ac. Palmitoleico	2,5 ± 0	3,3 ± 0	2,8 ± 0
C 18:0	Ac. Esteárico	0,9 ± 0	0,6 ± 0	0,7 ± 0
C 18:1n-7	Ac. Vaccénico	1,7 ± 0	1,8 ± 0	1,6 ± 0
C 18:1n-9	Ac. Elaídico	16,7 ± 0,02	15,6 ± 0	16,4 ± 0,01
C 18:2n-6	Ac. Linoleico	17,7 ± 0,02	18,2 ± 0	18,3 ± 0,01
C 18:3n-3	Ac. Omega Linolénico	18,1 ± 0,02	17,7 ± 0	17,9 ± 0,01
C 18:3n-6	Ac. Alfa Linolénico	1,3 ± 0	1,8 ± 0	1,6 ± 0
C 18:4n-3	Ac. Estearidónico	4,5 ± 0	4,8 ± 0	4,4 ± 0
No identificado		13,7 ± 0,01	14,5 ± 0,01	13,9 ± 0

La tabla 2. Muestra el perfil de ácidos grasos de *Chlorella sp.* Cultivada con petróleo crudo. En el tratamiento 1, se evidencia un alto porcentaje de Ácido Linoleico con 18,2 ± 0,0, seguido del Ácido omega Linolénico con 17,7 ± 0,00 y ácido palmítico (16,6 ± 0,01) respectivamente. Los porcentajes más bajos son mostrados por el ácido mirístico (0,3 ± 0,0) y ácido esteárico (0,6 ± 0,0) respectivamente.

En el tratamiento 2, se observa que los ácidos grasos que mostraron mayores porcentajes son el ácido linoleico con 18,3 ± 0,01, seguido del ácido omega linolénico con 17,9 ± 0,01 y ácido palmítico con 17,7 ± 0,01. Asimismo, se

evidencia que los valores más bajos de ácidos grasos son el ácido mirístico ($0,2 \pm 0,0$) y el ácido esteárico ($0,7 \pm 0,0$) respectivamente. Es importante indicar que los valores más altos de ácidos grasos se muestran en el grupo control como son el ácido palmítico ($18,9 \pm 0,02$), seguido del ácido omega linolénico ($18,1 \pm 0,02$), ácido Linoleico ($17,7 \pm 0,02$) y ácido elaídico ($16,7 \pm 0,02$)

3.1.3.2 *Scenedesmus sp.*

Tabla 3: Perfil de Ácidos Grasos *Scenedesmus sp.* Expuestas a diferentes tratamientos con Petróleo Crudo

Ácidos Grasos		Control	T1	T2
C 16:0	Ac. Palmítico	$23,7 \pm 0,02$	$23,9 \pm 0,01$	$24,3 \pm 0,05$
C 16:1n-7	Ac. Palmitoleico	$1,3 \pm 0$	$1,2 \pm 0$	$1,2 \pm 0$
C 18:0	Ac. Esteárico	$1,7 \pm 0$	$1,7 \pm 0$	$1,7 \pm 0$
C 18:1n-7	Ac. Vaccénico	$1,4 \pm 0$	$1,5 \pm 0$	$1,6 \pm 0$
C 18:1n-9	Ac. Elaídico	$31,5 \pm 0,02$	$29,0 \pm 0,01$	$28,8 \pm 0,05$
C 18:2n-6	Ac. Linoleico	$16,8 \pm 0,01$	$17,1 \pm 0,01$	$16,7 \pm 0,03$
C 18:3n-3	Ac. Omega Linolénico	$11,4 \pm 0,01$	$12,5 \pm 0$	$12,5 \pm 0,02$
C 18:3n-6	Ac. Alfa Linolénico	$0,08 \pm 0$	$1,0 \pm 0$	$1,0 \pm 0$
C 18:4n-3	Ac. Estearidónico	$2,6 \pm 0$	$3,2 \pm 0$	$3,3 \pm 0,01$
No identificado		$8,8 \pm 0$	$8,7 \pm 0$	$8,8 \pm 0,02$

La tabla 3. Muestra el perfil de ácidos grasos de *Scenedesmus sp.* Cultivada con petróleo crudo. En el tratamiento 1, se evidencia un alto porcentaje de Ácido Elaídico con $29,0 \pm 0,1$, seguido del Ácido Palmítico con $23,9 \pm 0,01$, y Ácido Linoleico $16,6 \pm 0,01$, respectivamente. Los porcentajes más bajos son mostrados por el Ácido alfa Linolénico ($1,0 \pm 0,0$) y Ácido Palmitoleico ($1,2 \pm 0,0$) respectivamente.

En el tratamiento 2, se observa que los ácidos grasos que mostraron mayores porcentajes son el ácido Elaídico con $28,8 \pm 0,05$, seguido del ácido Palmítico con $24,3 \pm 0,05$ y ácido Linoleico con $16,7 \pm 0,03$. Asimismo, se evidencia que los valores más bajos de ácidos grasos son el ácido Linolénico ($1,0 \pm 0,0$) y el ácido Palmitoleico ($1,2 \pm 0,0$) respectivamente. Es importante indicar que los valores más altos de ácidos grasos se muestran en el grupo control como son el ácido Elaídico ($31,5 \pm 0,02$), seguido del ácido Palmítico ($23,7 \pm 0,02$), ácido Linoleico ($16,8 \pm 0,01$).

Estos resultados demuestran que la cantidad de ácidos grasos producido no varía de acuerdo a la cantidad de petróleo sometido en el tratamiento. Además se muestra que los demás datos son muy homogéneos sin que existan diferencias significativas entre ellas

3.2 Discusión

En general, el crecimiento de las microalgas evaluadas se vio afectado por el petróleo y esto se hizo evidente a medida que transcurrieron los días de evaluación. En *Chlorella* sp el crecimiento celular fue afectado por los tratamientos de petróleo, a partir del día 11 de la evaluación ya que las absorbancias disminuyeron a medida que los tratamientos con petróleo crudo se incrementan con relación al control, por lo que asumimos que el medio con las microalgas se sobrecarga con desechos que son productos del metabolismo microalgas que se comportan como tóxicos en el medio de cultivo. Estos resultados son similares a los obtenidos por Otero y Cruz *et al.* (12) quienes evaluaron el efecto del hidrocarburo sobre el crecimiento de *Chlorella vulgaris*, encontrando que los tratamientos con mayor inhibieron el crecimiento hasta en un 59 %. Además, Cortez *et al.* (13) en un estudio con *Tetraselmis* sp, *Chaetocerus* sp, y *Dunaliella salina* en donde mencionan que evidentemente en la fase estacionaria los nutrientes son limitantes y las células como estrategia adaptativa entra en un estado de mantenimiento fisiológico, el cual condiciona mayor sensibilidad. Por otro lado, los resultados muestran que el perfil de crecimiento de *Scenedesmus* sp., no se ve afectado por los tratamientos de petróleo crudo, resultados que difieren con respecto a *Chlorella* sp.

En cuanto al contenido de lípidos totales en estas dos especies se obtuvo un mayor porcentaje para el tratamiento 1 con 13.07 ± 1.13 y 15.53 ± 0.14 para *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. Respectivamente, resultados que difieren a

lo obtenido por Cobos *et al.* (14) en donde muestran que los contenidos de lípidos para estas especies fueron de 22 y 28 (%) el doble de lo obtenido en este estudio. Es preciso mencionar que los cultivos microalgas para la obtención de lípidos totales por este autor fueron desarrollados en condiciones de cultivos normales por lo que los valores obtenidos reflejan una diferencia sustancial en cuanto a nuestros resultados. Por otro lado, Cobos *et al.* (14), mencionan que, mientras la cantidad de lípidos totales puede llegar a incrementarse significativamente cuando existe limitación de algún nutriente, la tasa de crecimiento o producción de biomasa puede disminuir, estos resultados concuerdan con los obtenidos en el presente estudio, ya que el Control (C+) de la especie *Scenedesmus* sp tuvo un mayor crecimiento en los últimos días, sin embargo fue el que obtuvo el más bajo porcentaje en la producción de lípidos totales con relación a sus tratamientos.

En términos generales el perfil de crecimiento y el contenido de lípidos totales en las especies estudiadas fueron variables ya que se observó un buen perfil de crecimiento en los controles y en los tratamientos para *Scenedesmus* sp, observándose un comportamiento diferente en *Chlorella* sp. Sin embargo, estos no estuvieron relacionados directamente con la producción de lípidos totales, lo cual nos sugieren que algunas especies microalgas tienen la capacidad de modificar el metabolismo de lípidos como respuesta a los cambios en las condiciones del medio tal como menciona Cobos *et al.* (14).

En este estudio las dos especies de microalgas evaluadas presentaron ácidos grasos, en *Chlorella* sp se evidenció el mayor porcentaje de Ac.

Palmítico con $18,9 \pm 0,02$ para el control (C+) concordando con lo obtenido por López (15) en cual muestra que el mayor porcentaje de Ácidos grasos en *Chlorella* sp. Fue Ac. Palmítico con $23.0 \pm 0,2$ % en medio CHU- 10, un promedio elevado con respecto al obtenido en el presente estudio, en cambio en medio CHU- 10 obtuvo un porcentaje de $16.7 \pm 0,04$ cuyo resultado es bastante cercano a lo obtenido, ya que la variación en el porcentaje de lípidos y el contenido de ácidos grasos son más sensibles a la intensidad de luz que a la fuente de carbono de acuerdo con Metz et al. (16). Asimismo, se mostró porcentajes mínimos de ácidos grasos de 0,2 como el Ac. Mirístico para *Chlorella* sp., no se encontraron trabajos similares para estos porcentajes en esta especie.

Por otro lado, *Scenedesmus* sp también mostró porcentajes elevados de ácidos grasos tales como el Ac. Elaídico con $31,5 \pm 0,02$ para el control (C+) resultados muy similares con lo obtenido por López et al. (15) el cual demuestra que el Ac. Elaídico mostró un valor de 35 % en medio CHU- 10, esto nos permite mencionar que estos ácidos grasos son los más abundantes y frecuentes en estas especies, del mismo modo el autor destaca al Ácido palmítico con un valor de 26.3 % datos que concuerdan con lo obtenido en el estudio, ya que se obtuvo un porcentaje de $24,3 \pm 0,05$. También, se mostraron ácidos grasos con menores porcentajes uno de los cuales fue Ac. Alfa Linolénico con 0,08 % para el control (C+).

Por lo que, los resultados obtenidos en esta investigación constituyen un punto de partida para futuras aplicaciones en trabajos de biorremediación de ambientes contaminados con petróleo a partir de microalgas.

CAPITULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones.

- *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp mostraron un perfil de crecimiento óptimo al ser expuestos a dos concentraciones de petróleo crudo.
- *Scenedesmus* sp fue la microalgas que mostró un mayor contenido de lípidos totales en el tratamiento 1 con respecto a *Chlorella* sp.
- Las dos especies de microalgas evaluadas presentaron altos porcentajes de ácidos, el Ac. Palmítico y Ac. Elaico.

4.2 Recomendaciones

- Aplicar un análisis de cuantificación multivariado del Petróleo Crudo para un mejor entendimiento de todo el proceso de la evaluación.
- Se sugiere realizar estudios complementarios a esta investigación, a más días con mayor volumen para maximizar la comprensión sobre el perfil de crecimiento y la producción de Ácidos Grasos.
- Realizar estudios comparativos con otras microalgas de la Amazonia relacionadas con el Petróleo Crudo.

CAPITULO V

Referencias Bibliográficas

1. GARZA R. (1998) Biorremediación de aguas contaminadas con hidrocarburos. Tesis para optar el grado de Magister en Ingeniería Ambiental. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, Mexico.
2. DÍAS ROSSMERY TATIANA. Genotoxicidad por petróleo en *Eisenia foetida* "Lombriz Roja". Perfil de Anteproyecto de Tesis presentada para optar Título Profesional de Licenciado en Ecología.
3. INDECI. reporte de complementario nº 156. – 17/02/2016 / COEN – INDECI /. Derrame de petróleo afecta localidades del distrito Imaza – Amazonas.
4. GRIMALDO L. (2009). Contaminación ambiental a causa de refinería. Tesis Ingeniería Ambiental. Universidad Politécnica de la Región Ribereña. Ciudad Madero, Mexico.
5. GOMEZ S., AMAYA D., MALDONADO C., MARTINEZ M., QUEVEDO B., SOTO A., PEDROZA M. (2008). Evaluación de tres hongos lignolíticos y de *Aspergillus niger* como alternativa para el tratamiento de aguas residuales del curtido de pieles. Revista internacional de contaminación ambiental, Vol.24. No3, pp 93-106.
6. COUTURE, P., S. VISSER, R. VANCOILLIE & C. BLAISE. (1985). Algal bioassays their significance in monitoring water quality with respect to nutrients and toxicants. Schweiz. Z. Hydrol. 47: 127-158.
7. NALEWAJKO, C. & M. OLAVENSON. (1998). Ecofisiological considerations in microalgal toxicity test, pp. 289-309. In P. Wells, K. Lee & Ch. Blaise (eds).

Microscale testing in aquatic toxicity: advances, technical and practice. CRC, Boca Raton, Florida.

8. AGUILAR-LEÓN D, OTERO-PATERNINA AM, CRUZ-CASALLAS PE, VELASCOSANTAMARÍA YM. *Scenedesmus* sp.: microalga bioindicadora de toxicidad de efluentes de un campo petrolero en la Orinoquia colombiana. Universidad de los Llanos. En: XVI Jornada de Acuicultura. Villavicencio, Colombia; (2010). p. 14-18.
9. GÓMEZ L, RAMÍREZ Z. Microalgas como biomonitores de contaminación. Rev Cubana Quím. (2004);XVI(2):34-48.
10. YU X, ZHAO P, HE C, LI C, ZHOU J, HUANG Z. Isolation of a novel strain of *Monoraphidium* sp. and characterization of its potential application as biodiesel feedstock. Bioresour Technol. (2012); 121:256-262.
11. LI Q, DU W. Y LIU D. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. Applied Microbiology Biotechnology. 80: 749-756; 2008.
12. OTERO A, CRUZ P, VELASCO Y. Evaluación del efecto del hidrocarburo Fenantreno sobre el crecimiento de *Chlorella vulgaris* (*Chlorellaceae*). Acta biol. Colomb., Vol. 18 n.º 1, 2013 87 - 98
13. CORTEZ MAGO R., GUEVARA MIGUEL, VÁSQUEZ ALEIKAR Y LODEIROS SEIJO C. Influencia del petróleo crudo en el crecimiento de microalgas del nororiente de Venezuela. Boletín Del Centro De Investigaciones Biológicas Volumen 41, NO. 4, (2007), PP. 471–483 Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.
14. COBOS RUIZ M, CASTRO GÓMEZ J.C, Y CERDEIRA GUTIERREZ J.A. Potencial biotecnológico para la producción sustentable de biodiesel de

microalgas oleaginosas aisladas del río Itaya, Loreto, Perú. *Ecología Aplicada*, vol. 13, núm. 2, julio-diciembre, 2014, pp. 169-175 Universidad Nacional Agraria La Molina Lima, Perú.

15. LÓPEZ SULLA L. Efecto de tres medios de cultivos en el Perfil de Ácidos Grasos de tres especies de microalgas Oleaginosas Amazónica. Tesis presentada para optar el Título Profesional de Ingeniería Ambiental. Universidad Científica del Perú. Viernes 24,(2017).
16. METZ J. Production of polyunsaturated fatty acids by polyketide synthases in both prokaryotes and eukaryotes. *Science*. (2001); 293(5528):291-3.

CAPITULO VI: ANEXO



Distribución del medio de cultivo



Calculo del Volumen del Petróleo Crudo



Distribución del Petróleo crudo en su cultivo microalgal



Tratamientos 1, 2 y su control de cada especie



Lectura diaria en el Nanodrop del crecimiento celular de *Chlorella sp.*



Lectura diaria en el Nanodrop del crecimiento celular de *Scenedesmus sp*



Biomasa Seca de las microalgas 0.500g



Trituración de biomasa seca con la solución extractora



Extracción de la solución con Lípidos Totales



Vorteceado



Lípidos Totales

Figura 5: Metodología experimental

Tabla 4 . Datos estadísticos de Perfil de Crecimiento de la especie *Chlorella sp.* del ultimo día de evaluación.

ANOVA

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,019	2	,010	27,810	,002
Within Groups	,002	5	,000		
Total	,021	7			

Tabla 5. Datos estadísticos de comparaciones múltiples de los Tratamientos y su control de la especie *Chlorella sp.* Del último día de evaluación

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Unidad por Porcentaje

	(I) Tratamientos	(J) Tratamientos	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	Control	T1	,125667*	,016938	,002	,07055	,18078
		T2	,085667*	,016938	,009	,03055	,14078
	T1	Control	-,125667*	,016938	,002	-,18078	-,07055
		T2	-,040000	,015150	,099	-,08930	,00930
	T2	Control	-,085667*	,016938	,009	-,14078	-,03055
		T1	,040000	,015150	,099	-,00930	,08930
Games- Howell	Control	T1	,125667*	,012197	,005	,07326	,17807
		T2	,085667*	,015645	,026	,01928	,15205
	T1	Control	-,125667*	,012197	,005	-,17807	-,07326
		T2	-,040000	,016296	,155	-,10175	,02175
	T2	Control	-,085667*	,015645	,026	-,15205	-,01928
		T1	,040000	,016296	,155	-,02175	,10175

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Tabla 6. Datos estadísticos de Perfil de Crecimiento de la especie *Scenedesmus sp.* del último día de evaluación.

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,000	2	,000	,749	,512
Within Groups	,001	6	,000		
Total	,001	8			

Tabla 7. Datos estadísticos de comparaciones múltiples de los Tratamientos y su control de la especie *Scenedesmus sp.* Del último día de su evaluación

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Unidad por Porcentaje

	(I) Tratamientos	(J) Tratamientos	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	Control	T1	,012333	,010173	,489	-,01888	,04355
		T2	,007667	,010173	,743	-,02355	,03888
	T1	Control	-,012333	,010173	,489	-,04355	,01888
		T2	-,004667	,010173	,892	-,03588	,02655
	T2	Control	-,007667	,010173	,743	-,03888	,02355
		T1	,004667	,010173	,892	-,02655	,03588
Games-Howell	Control	T1	,012333	,008654	,415	-,01906	,04373
		T2	,007667	,010509	,764	-,03363	,04896
	T1	Control	-,012333	,008654	,415	-,04373	,01906
		T2	-,004667	,011185	,911	-,04606	,03673
	T2	Control	-,007667	,010509	,764	-,04896	,03363
		T1	,004667	,011185	,911	-,03673	,04606

Tabla8: Datos estadísticos de Lípidos Totales de la especie *Chlorella sp.*

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	74,813	2	37,407	20,859	,017
Within Groups	5,380	3	1,793		
Total	80,193	5			

Tabla 9: Datos estadísticos de comparaciones múltiples de Lípidos Totales en sus Tratamientos y su Control de la especie *Chlorella sp.*

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Unidad de Porcentaje

	(I) Tratamientos	(J) Tratamientos	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	Control	T1	-8,60000*	1,33915	,016	-14,1959	-3,0041
		T2	-5,10000	1,33915	,063	-10,6959	,4959
	T1	Control	8,60000*	1,33915	,016	3,0041	14,1959
		T2	3,50000	1,33915	,153	-2,0959	9,0959
	T2	Control	5,10000	1,33915	,063	-,4959	10,6959
		T1	-3,50000	1,33915	,153	-9,0959	2,0959
Games- Howell	Control	T1	-8,60000*	1,00000	,030	-15,0139	-2,1861
		T2	-5,10000	1,43178	,186	-18,6346	8,4346
	T1	Control	8,60000*	1,00000	,030	2,1861	15,0139
		T2	3,50000	1,52643	,288	-7,7425	14,7425
	T2	Control	5,10000	1,43178	,186	-8,4346	18,6346
		T1	-3,50000	1,52643	,288	-14,7425	7,7425

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Tabla 10: Datos estadísticos de Lípidos Totales de la especie *Scenedesmus sp.*

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	124,173	2	62,087	46,333	,006
Within Groups	4,020	3	1,340		
Total	128,193	5			

Tabla 11: Datos estadísticos comparativos múltiples de Lípidos Totales en sus Tratamientos y su Control de la especie *Scenedesmus sp.*

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Unidad de Porcentaje

	(I) Tratamientos	(J) Tratamientos	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	Control	T1	-11,10000*	1,15758	,005	-15,9372	-6,2628
		T2	-6,40000*	1,15758	,024	-11,2372	-1,5628
	T1	Control	11,10000*	1,15758	,005	6,2628	15,9372
		T2	4,70000	1,15758	,054	-,1372	9,5372
	T2	Control	6,40000*	1,15758	,024	1,5628	11,2372
		T1	-4,70000	1,15758	,054	-9,5372	,1372
Games- Howell	Control	T1	-11,10000	1,00499	,083	-29,3536	7,1536
		T2	-6,40000	1,41421	,082	-14,7308	1,9308
	T1	Control	11,10000	1,00499	,083	-7,1536	29,3536
		T2	4,70000	1,00499	,196	-13,5536	22,9536
	T2	Control	6,40000	1,41421	,082	-1,9308	14,7308
		T1	-4,70000	1,00499	,196	-22,9536	13,5536

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.