

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOLOGÍA EN ACUICULTURA



Efecto de tres concentraciones de extracto acuoso del lodo de la bahía de Samanco en el crecimiento poblacional y contenido de lípidos totales de *Tetraselmis suecica* en condiciones de laboratorio

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE BIÓLOGO ACUICULTOR

AUTORES:

Bach. FIORELLA LIZBETH, ORTIZ CORAL

Bach. ROSA ESTHER, SENMACHE BARRAZA

ASESOR:

DR. JUAN FERNANDO MERINO MOYA

NUEVO CHIMBOTE - PERÚ

2016

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOLOGÍA EN ACUICULTURA



Efecto de tres concentraciones de extracto acuoso del lodo de la bahía de Samanco en el crecimiento poblacional y contenido de lípidos totales de *Tetraselmis suecica* en condiciones de laboratorio

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE BIÓLOGO ACUICULTOR

AUTORES:

Bach. FIORELLA LIZBETH, ORTIZ CORAL

Bach. ROSA ESTHER, SENMACHE BARRAZA

Revisado y Aprobado por el Asesor

DR. JUAN FERNANDO MERINO MOYA

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



Efecto de tres concentraciones de extracto acuoso del lodo de la bahía de Samanco en el crecimiento poblacional y contenido de lípidos totales de *Tetraselmis suecica* en condiciones de laboratorio

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE BIÓLOGO ACUICULTOR

AUTORES:

Bach. Fiorella Lizbeth, Ortiz Coral

Bach. Rosa Esther, Senmache Barraza

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

M.SC. WILLIAN CAPA ROBLES
Presidente

DR. LUIS TORRES CABRERA
Integrante del Jurado

DR. JUAN FERNANDO MERINO MOYA
Integrante del Jurado

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS	i
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
Objetivos general	4
Objetivos específicos	4
Hipótesis	4
II. MATERIALES Y MÉTODOS	5
2.1. Localización del experimento	5
2.2. Material experimental	5
2.2.1. Material biológico	5
2.3. Preparación del extracto acuoso de lodo de la bahía de Samanco (EALS)	5
2.4. Acondicionamiento de las unidades experimentales	7
2.5. Preparación del medio control (Guillard f/2)	8
2.6. Análisis químico del EALS	8
2.7. Determinación de parámetros del cultivo de <i>T. suecica</i>	9
2.8. Tratamiento del agua de mar de los cultivos de <i>T. suecica</i>	10
2.9. Conteos celulares y determinación del crecimiento poblacional de <i>T. suecica</i>	10
2.10. Determinación del contenido de lípidos en <i>T. suecica</i>	11
2.11. Determinación de la biomasa de <i>T. suecica</i>	13
2.12. Análisis estadístico	13
III. RESULTADOS	14
3.1. Parámetros ambientales del cultivo de <i>T. suecica</i>	14
3.1.1. Temperatura	14
3.1.2. pH	15
3.2. Crecimiento poblacional de <i>T. suecica</i>	16
3.2.1. Curvas de crecimiento poblacional	16

3.2.2. Tasa de crecimiento y tiempo de duplicación poblacional	18
3.3. Contenido de lípidos en <i>T. suecica</i>	20
IV. DISCUSIÓN	23
V. CONCLUSIONES	28
VI. RECOMENDACIONES	29
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
VIII. ANEXOS	40

DEDICATORIA

A:

Mis padres y hermanos quienes me apoyaron todo el tiempo, a mis compañeros de estudio, mis maestros y amigos por su infinita ayuda y enseñanzas para poder alcanzar mis objetivos.

Rosa Senmache

A:

Nuestro Di-s Hashem, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente.

Mi madre Vilma, por creer en mí y porque siempre me apoyo en cada momento.

A mi amado esposo Aharón, por su paciencia y sacrificio, por estar siempre a mi lado.

A mi hijo Aaron Lior, quien con su luz ha iluminado mi vida, fuente de inspiración.

A mis familiares, mi tía Mari por todo su amor, mi hermana Claudia por sus energías.

A mis maestros que en este andar por la vida me influyeron con sus lecciones para ser una gran persona preparada para los retos.

Fiorella Ortiz

AGRADECIMIENTOS

Por presente trabajo de tesis nos gustaría agradecer a la Universidad Nacional del Santa, nuestra alma mater, por darnos la oportunidad de estudiar y lograr ser profesionales.

A nuestro asesor de Tesis de grado, Blgo. Pesq. Fernando Merino Moya por su esfuerzo y dedicación, quien con sus conocimientos, su experiencia, su paciencia y su motivación nos ha apoyado en todo momento. También nos gustaría agradecer a nuestros profesores quienes durante toda la carrera profesional han aportado con un granito de arena a nuestra formación, y en especial a los profesores, Luis Campoverde Vigo , Rómulo Loayza Aguilar y William Capa Robles; por sus consejos, enseñanzas y más que todo por su amistad.

Son muchas las personas quienes han formado parte de nuestra vida profesional a las que nos encantaría agradecerles su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en los momentos más difíciles de mi vida. Algunas están aquí con nosotros y otras en nuestros recuerdos y en nuestro corazón, sin importar en donde estén quisiéramos darles las gracias por formar parte de nosotros, por todo lo que nos han brindado y por todas sus bendiciones.

Para ellos: Muchas gracias y que Dios los bendiga.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos de los cultivos de la microalga <i>T. suecica</i> con diferentes concentraciones del extracto acuoso de lodo de la bahía de Samanco (EALS) y grupo control (Guillard f/2).....	7
Tabla 2. Composición química del medio de cultivo Guillard f/2.....	8
Tabla 3. Valores proximales de la composición química de EALS utilizado en el cultivo de <i>T. suecica</i>	9
Tabla 4. Concentración de N, P y Fe de los cultivos de <i>T. suecica</i> dosificados con tres dosificaciones del EALS.....	9
Tabla 5. Densidad Poblacional ($\times 10^6$ cél. mL ⁻¹) de <i>T. suecica</i> en los tratamientos cultivados con EALS y grupo control (Guillard f/2)....	16
Tabla 6. Tasa de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (TD) de los cultivos de <i>T. suecica</i> con EALS y grupo control, en el quinto día de cultivo.....	18
Tabla 7. Tasa de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (TD) de los cultivos de <i>T. suecica</i> con EALS y grupo control, en el sexto día de cultivo	19
Tabla 8. Contenido de lípidos en porcentaje (%) y biomasa (mg L ⁻¹) al quinto día de cultivo de <i>T. suecica</i> en los dosificados con EALS y grupo control (Guillard f/2)..	20

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Protocolo de preparación del extracto acuoso de lodo de la bahía de Samanco(EALS).	6
Fig. 2. Unidades experimentales en los cultivos microalgales de <i>T. suecica</i> utilizando diferentes concentraciones de EALS.	7
Fig. 3. Protocolo para determinar el contenido de lípidos en <i>T. suecica</i>	12
Fig. 4. Variación de la temperatura promedio (°C) en los cultivos de <i>T. suecica</i> con EALS y grupo control (Guillard f/2).....	14
Fig. 5. Variación del pH promedio en los cultivos de <i>T. suecica</i> con EALS y grupo control (Guillard f/2).....	15
Fig. 6. Variación de la densidad poblacional en los cultivos de <i>T. suecica</i> con EALS y grupo control (Guillard f/2).....	17
Fig. 7. Unidades experimentales al quinto día de cultivo de <i>T. suecica</i> con EALS y grupo control (Guillard f/2).....	19
Fig. 8. Valores de la tasa de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (TD) en los cultivos de <i>T. suecica</i> con EALS y grupo control, al quinto día de cultivo.	19
Fig. 9. Valores de la tasa de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (TD) en los cultivos de <i>T. suecica</i> con EALS y grupo control, al sexto día de cultivo.	20
Fig. 10. Porcentaje de lípidos en <i>T. suecica</i> en los dosificados con EALS y grupo control (Guillard f/2).....	21
Fig. 11. Contenido de lípidos en biomasa de <i>T. suecica</i> en los dosificados con EALS y grupo control (Guillard f/2).....	22

RESUMEN

Se estudió el efecto de concentraciones de 20, 30 y 40 mL L⁻¹ del extracto acuoso de lodo de la bahía de Samanco (EALS), en el crecimiento poblacional y contenido de lípidos de la microalga *Tetraselmis suecica*, cultivada en condiciones de laboratorio. Las mayores densidades poblacionales al quinto día de cultivo de *T. suecica* fueron con 30 y 40 mL L⁻¹ de EALS con 2,03 x10⁶ cél. mL⁻¹ y 2,07 x10⁶ cél. mL⁻¹, respectivamente; mientras que la menor fue con 20 mL L⁻¹ de EALS con 1,59 x10⁶ cél. mL⁻¹. Las mayores tasas de crecimiento al quinto día de cultivo para *T. suecica*, se encontraron con 30 y 40 mL L⁻¹ de EALS con 0,453 día⁻¹ y 0,457 día⁻¹, respectivamente; mientras que la menor se obtuvo con 20 mL L⁻¹ de EALS con 0,405 día⁻¹. El mayor tiempo de duplicación al quinto día de cultivo en *T. suecica*, fue con 20 mL L⁻¹ de EALS con 1,712 día; mientras que los menores se obtuvieron con 30 y 40 mL L⁻¹ de EALS con 1,532 día y 1,518 día, respectivamente. El mayor porcentaje de lípidos en *T. suecica* al quinto día de cultivo se encontró con 20 mL L⁻¹ de EALS con 26,19 %; mientras que los menores fueron con 30 y 40 mL L⁻¹ de EALS con 24,98 % y 24,40 %, respectivamente. Los mayores contenidos de lípidos en biomasa de *T. suecica* al quinto día de cultivo, estuvieron con 30 y 40 mL L⁻¹ de EALS con 125,7 mg L⁻¹ y 126,4 mg L⁻¹, respectivamente; mientras que el menor fue con 20 mL L⁻¹ de EALS con 100,7 mg L⁻¹. Se concluye que el mejor tratamiento, para el crecimiento poblacional y contenido de lípidos, es el dosificado con 30 mL L⁻¹ de EALS.

Palabras Clave: Microalga, *Tetraselmis suecica*, extracto acuoso, lodo, crecimiento poblacional, lípidos, bahía de Samanco.

ABSTRACT

Was studied, the effect of concentrations of 20, 30 and 40 mL L⁻¹ of sludge aqueous extract of Samanco bay (SAES) in population growth and lipid content of the microalgae *Tetraselmis suecica*, cultivated in laboratory conditions. The highest densities of population on the fifth day culture of *T. suecica* were with 30 and 40 mL L⁻¹ of SAES with 2,03 x10⁶ cel. mL⁻¹ and 2,07 x10⁶ cel. mL⁻¹, respectively; while the lowest was with 20 mL L⁻¹ of SAES with 1,59 x10⁶ cel. mL⁻¹. The highest growth rates on the fifth day of culture for *T. suecica* were found with 30 and 40 mL L⁻¹ of SAES with 0,453 day⁻¹ and 0,457 day⁻¹, respectively; while the lowest was with 20 mL L⁻¹ of SAES with 0,405 day⁻¹. The largest doubling time on the fifth day of culture *T. suecica* was 20 mL L⁻¹ of SAES with 1,712 day; while the lowest were obtained with 30 and 40 mL L⁻¹ of SAES with 1,532 day and 1,518 day, respectively. The highest percentage of lipids in *T. suecica* the fifth day of culture was with 20 mL L⁻¹ of SAES with 26,19 %; while the lowest were with 30 and 40 mL L⁻¹ of SAES with 24,98 % and 24,40 %, respectively. The higher lipid content in biomass of *T. suecica* the fifth day of culture, were 30 and 40 mL L⁻¹ of SAES with 125,7 mg L⁻¹ and 126,4 mg L⁻¹, respectively; while the lowest was 20 mL L⁻¹ of SAES with 100,7 mg L⁻¹. We conclude that the best treatment for the population growth and lipid content, is dosed with 30 mL L⁻¹ of SAES.

Key Words: Microalgae, *Tetraselmis suecica*, aqueous extract, sludge, population growth, lipids, Samanco bay.

I. INTRODUCCIÓN

Desde hace varios años se ha evaluado las características de los sedimentos de diferentes bahías en la región Ancash, iniciando con estudios de su origen y cantidad de estos; así, la Comisión Técnica Multisectorial para la recuperación de la bahía “El Ferrol” (CTM, 2011), evaluaron el origen de los sedimentos en la bahía “El Ferrol”, en el cual tuvo la conclusión que el volumen de sedimentos depositados en el fondo corresponde principalmente al material de arrastre del río Lacramarca y del viento desde hace muchos años, complementado con el material proveniente de las actividades de la industria pesquera, siderúrgica y aguas domésticas en las últimas 5 décadas; asimismo los sedimentos en la bahía de Samanco, son principalmente de origen antropogénico y sedimentario por el aporte del río Samanco.

De acuerdo al Reporte Público del Organismo de Evaluación y Fiscalización Ambiental (RPI-OEFA, 2013), en la cual evalúan el sedimento en un área de las concesiones de maricultura de la bahía de Samanco del año 2012, evidencian una alta concentración de sulfuro cuyo tenor reportado es de 279 mg kg⁻¹ representando un valor 265 veces mayor al reportado en la línea base ambiental con 1,05 mg kg⁻¹; mientras que el porcentaje de materia orgánica presente en el sedimento, es 5,4 % que representa 2,5 veces mayor al reportado en la línea base con 2,14 %, menor al reportado en la estación de Impacto con 20,8 % durante el primer semestre del año 2012.

Vásquez *et al.* (2000), indican que el sedimento de la bahía de Samanco presenta una coloración de verde oscuro a verde grisáceo con presencia de diatomeas y algunos foraminíferos, y minerales micáceos; además un contenido de materia orgánica entre los 0,96 % y 11,95 %, siendo los más altos en la zona central y norte de la bahía. IMARPE (2009), encontró que la calidad textural del sedimento en Bahía de Samanco estuvo representada principalmente por grava, conchuela, arena y finos como limo y arcilla; a su vez, la materia orgánica en sedimentos superficiales varió de 0,79 % a 14,10 %, con un valor medio de 3,88 %, encontrándose que las mayores concentraciones de materia orgánica registradas están al norte de la bahía

podrían tener sus orígenes en la actividades de maricultura y por los excedentes de producción fitoplanctónica del área en menor grado; asimismo, la concentración promedio de cobre (Cu) fluctuó entre 18,79 mg kg⁻¹ en abril del 2008 y 96,64 mg kg⁻¹ en abril del 2006, estos valores encontrados superaron el valor estipulado de 18,70 mg kg⁻¹ del Nivel Umbral de la Tabla de Protección Costera y Restauración de los EE.UU., aunque en abril del 2008 lo superó ligeramente, mientras que la concentración promedio de hierro (Fe) disminuyó de 6,67 mg kg⁻¹ en marzo del 2007 a 1,53 mg kg⁻¹ en abril del 2008.

Las microalgas están capacitadas para metabolizar nutrientes orgánicos e inorgánicos, en tal sentido los materiales orgánicos provenientes de aguas residuales, excremento animal y otros desechos, han sido utilizados como fertilizantes en los cultivos microalgales desde hace varios años (Oswald, 1988; Borowitzka & Borowitzka, 1989; Benedetti *et al.*, 1998; Knud-Hansen, 1998; Olguin *et al.*, 2001); asimismo se han caracterizado por ser potencialmente fuente de proteínas, ácidos grasos insaturados, vitaminas, minerales, pigmentos, enzimas, aceites esenciales, antibióticos y otros metabolitos biológicamente activos (Fernández-Reiriz, 1989; Arad & Yaron, 1992; Ventosa & Nieto, 1995; Ritter *et al.*, 1999; Bermejo *et al.*, 2002), siendo utilizado para la alimentación humana y animal, y para el tratamiento de aguas residuales o como biofertilizantes (Venkatamaran, 1986; Ventosa & Nieto, 1995; De Philippis & Vicenzini, 1998; Mora *et al.*, 2004).

La microalga *Tetraselmis suecica*, es una microalga marina unicelular de coloración verdosa, que en cultivo acuoso presenta una forma oval con cuatro flagelos con movimientos coordinados los cuales salen de una invaginación apical en la porción anterior de la célula y se ubica en la misma dirección en la que avanza (Morineau *et al.*, 2001; Ulloa, 2011). Presenta una longitud de alrededor de 8 a 10 micrómetros (Morineau *et al.*, 2001).

En Alemania, Thain (1992), ensayó con *T. suecica* utilizando sólo agua de una ensenada, obtuvo al quinto día de cultivo de 0,15 x10⁶ a 0,45 x10⁶ cél. mL⁻¹ y al noveno día de 0,35 x10⁶ a 0,55 x10⁶ cél. mL⁻¹, y con los sedimentos al quinto día los cultivos microalgales presentaron densidades de 0,25 x10⁶ a 0,45 x10⁶

cél. mL⁻¹ y al noveno día de 0,40 x10⁶ a 1,60 x10⁶ cél. mL⁻¹. Esto demuestra que es posible utilizar sedimentos acuáticos como medio de cultivo para microalgas y su utilidad en la regulación de la disponibilidad de los nutrientes marinos al utilizarlos para este fin.

En cuanto al contenido de lípidos en las microalgas, es de suma importancia el encontrar alternativas para la producción de aceites, siendo las microalgas utilizadas como alimento las que contienen entre 1 y 35 % de lípidos, mientras que el porcentaje de lípidos en especies de microalgas para ser usados como biocombustibles está entre el 20 y 80 %, comparado con el contenido del 15 % al 30 % de lípidos en especies para producir aceites vegetales tradicionales; en cualquier caso, los factores ambientales, el tipo de cosecha y el método de secado determinan la cantidad de sustancias potencialmente útiles (Satyanarayana *et al.*, 2011), los que también varían en su contenido por limitación de nutrientes en los cultivos que pueden hacer que los lípidos se incrementen o disminuyan en porcentaje, según sea el contenido en nitrógeno y fósforo (Chisti, 2007; Garibay *et al.*, 2009). Así, la microalga marina *Tetraselmis* contiene en promedio de 15 a 23 % de lípidos bajo sistemas de cultivo autotrófico sin limitaciones de nutrientes (Chisti, 2007). Siendo la limitación de nitrógeno la estrategia más eficiente para incrementar el contenido de lípidos neutros en las microalgas, en particular el de triglicéridos conformados por ácidos grasos con un elevado grado de saturación (Garibay *et al.*, 2009).

Chini-Zittelli *et al.* (2006), han producido biomasa de la microalga *T. suecica* en cultivo semicontinuo, obteniendo una composición de 45% de proteína, 13% de carbohidratos y 32% de lípidos; y cuando se aplican diferentes tasas de renovación del cultivo (del 10 al 50%) el contenido de proteína en *T. suecica* varía de 13% a 22%, el de carbohidratos de 6% a 42% y el de lípidos se mantiene más constante desde 8,9% hasta 10,8% (Fábregas *et al.* 2001). Azam *et al.* (2009) trabajando en biorreactores de 2 L con la microalga *T. suecica*, encontraron que bajo condiciones autotróficas, las concentraciones de proteínas, carbohidratos y lípidos totales fueron 45,7, 7,4 y 24,5 %, respectivamente; y en condiciones heterotróficas el contenido de proteínas fue menor con 10,5 % comparados con las autotróficas, contrario a los contenidos

de carbohidratos y lípidos totales se incrementaron en 14,1 y 51,9 %, respectivamente.

Considerando que la bahía de Samanco presenta lodos, sobre todo de origen municipal y de la maricultura, cuyas condiciones de contaminación se ha visto incrementada y su proceso natural de mineralización superada por la presencia de estas actividades, se hace posible el utilizar el extracto acuoso de lodo de la bahía de Samanco (EALS) para el cultivo de la microalga *T. suecica*, por contener gran cantidad de nutrientes que derivan de los procesos de mineralización y reducción. En base a todo lo mencionado nos planteamos, el siguiente problema: ¿Cuál es el efecto de tres concentraciones de extracto acuoso del lodo de la bahía de Samanco en el crecimiento poblacional y contenido de lípidos totales de *T. suecica* en condiciones de laboratorio?

El objetivo general fue evaluar el efecto de tres concentraciones (20, 30 y 40 mL L⁻¹) del EALS en el crecimiento poblacional y contenido de lípidos totales de *T. suecica* en condiciones de laboratorio.

Asimismo se plantearon los siguientes objetivos específicos: Determinar el efecto de tres concentraciones (20, 30 y 40 mL L⁻¹) del EALS en el crecimiento poblacional de la microalga *T. suecica*; y determinar el efecto de tres concentraciones (20, 30 y 40 mL L⁻¹) del EALS en el contenido de lípidos totales de la microalga *T. suecica*.

Se planteó la hipótesis, para el crecimiento poblacional y contenido de lípidos: Si bajo condiciones de laboratorio, se utilizan tres concentraciones (20, 30 y 40 mL L⁻¹) de extracto acuoso del lodo de la bahía de Samanco en el cultivo de la microalga *T. suecica*, se obtendrá que los dosificados con 30 mL L⁻¹ de EALS, presentarán un mayor crecimiento poblacional y contenido de lípidos totales en comparación de los tratamientos con 20 y 40 mL L⁻¹ de extracto acuoso del lodo de la bahía de Samanco.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Localización del experimento

El experimento se desarrolló en el Laboratorio de Cultivos de Especies Auxiliares de la Escuela Académico Profesional de Biología en Acuicultura, Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional del Santa.

2.2. Material experimental

2.2.1. Material biológico

La microalga *Tetraselmis suecica* procedió del stock mantenido con iluminación (2000 Lux) y aireación (500 mL L⁻¹) constante en el laboratorio de Cultivos de Especies Auxiliares de la E.A.P. Biología en Acuicultura. Inicialmente *T. suecica* se mantuvo con medio Guillard f/2 en matraces de vidrio de 250 mL con 100 mL de volumen efectivo, que fueron llevados a botellas de plástico con 1 L de cultivo y después a otras botellas plásticas con 2 L.

El inóculo utilizado en cada unidad experimental mantuvo la proporción 1:10 con respecto al volumen del cultivo (Ipanaqué & Paredes, 2009), se tomó 200 mL de inóculo microalgal y se aforó a 2 L de volumen final por cada unidad experimental. Los cultivos microalgales de *T. suecica* que se utilizaron como inóculos, estuvieron en la fase de crecimiento exponencial, iniciándose los cultivos experimentales con una concentración promedio de 0,21 x10⁶ cél. mL⁻¹ por unidad experimental.

2.3. Preparación del extracto acuoso de lodo de la bahía de Samanco (EALS)

Se extrajo 4 kg de lodo de la bahía de Samanco, cercanos a las concesiones acuícolas, correspondiente a 09°12'45"S y 78°32'25"O, Nuevo Chimbote, Ancash - Perú, utilizando una draga Ekman. El manejo del lodo se realizó siguiendo el protocolo de cuidados sanitarios del manejo de residuos contaminados propuesto por el Ministerio de Vivienda, Construcción y

Saneamiento del Perú (MVCS, 2013). El lodo fue colocado en un balde de plástico de 5 L con tapa y llevado al laboratorio de Cultivos de Especies Auxiliares la Escuela Académico Profesional de Biología en Acuicultura, de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional del Santa para la preparación del EALS siguiendo el siguiente protocolo (fig. 1).

Una muestra de 500 g de lodo fresco fue secada en una estufa a 60 °C por 12 h hasta peso constante, se tomó 100 g que después de ser pulverizado con un mortero, fue disuelta en 1000 mL de agua destilada y llevada hasta 100 °C por 30 min para eliminar microorganismos y extraer los nutrientes presentes en el lodo. Después de enfriado a temperatura ambiente (24 °C), fue filtrado con malla nital a 5 μ m y aforado a 1000 mL. Finalmente se almacenó en frasco de vidrio ámbar a 5 ° hasta su utilización en la experiencia.

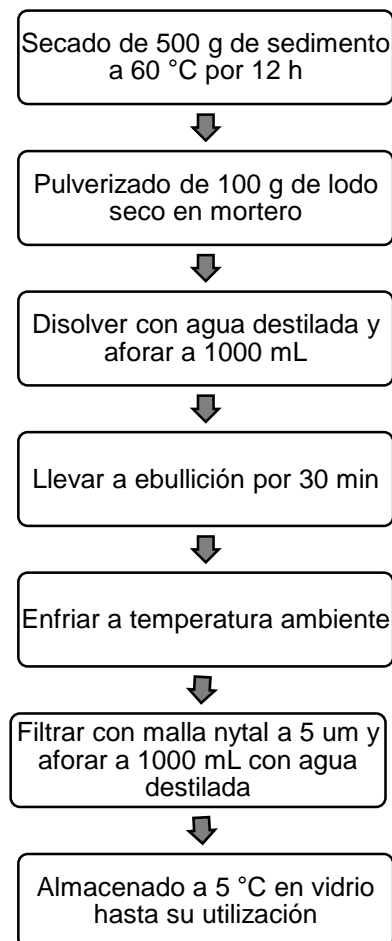


Fig. 1. Protocolo de preparación del extracto de lodo acuoso de la Bahía de Samanco EALS.

2.4. Acondicionamiento de las unidades experimentales

Se utilizaron 12 botellas plásticas de 3 L conteniendo 2 L de volumen efectivo de cultivo (fig. 2), iniciándose los cultivos con una densidad poblacional promedio de $0,21 \times 10^6$ cél. mL⁻¹.

Las experiencias se realizaron mediante un diseño de estímulo creciente (Steel & Torrie, 1988), con tres tratamientos y grupo control (Guillard f/2), con tres repeticiones cada uno (tabla 1).

Tabla 1. Tratamientos de los cultivos de la microalga *T. suecica* con diferentes concentraciones de extracto acuoso de lodo de la bahía de Samanco (EALS) y grupo control (Guillard f/2).

Tratamiento	Especificaciones
Control	Cultivo de <i>T. suecica</i> con medio Guillard f/2.
T1	Cultivo de <i>T. suecica</i> dosificado con 20 mL L ⁻¹ de EALS
T2	Cultivo de <i>T. suecica</i> dosificado con 30 mL L ⁻¹ de EALS.
T3	Cultivo de <i>T. suecica</i> dosificado con 40 mL L ⁻¹ de EALS.



Fig. 2. Unidades experimentales de los cultivos microalgales de *T. suecica* utilizando diferentes concentraciones de EALS.

2.5. Preparación del medio control (Guillard f/2)

El medio de cultivo Guillard f/2 a utilizarse en el tratamiento control, estuvo compuesto íntegramente por sustancias químicas puras (Guillard, 1975) y agua destilada (Tabla 2) y fue autoclavado a 121 °C por 20 min. El stock de los nutrientes que constituyen el medio Guillard f/2 fueron mantenidos en refrigeración a 5 °C para evitar su precipitación y posible desarrollo bacteriano.

Tabla 2. Composición química del medio de cultivo Guillard f/2.

NUTRIENTES	CONCENTRACIÓN
Solución de macronutrientes	
NaNO ₃	75,00 mg
PO ₄ H ₂ Na.H ₂ O	5,00 mg
Solución de metales traza	
Na ₂ EDTA	4,36 mg
Cl ₃ Fe.6H ₂ O	3,15 mg
SO ₄ Cu.5H ₂ O	0,01 mg
SO ₄ Zn.7H ₂ O	0,022 mg
Cl ₂ Co.6H ₂ O	0,01 mg
Cl ₂ Mn.4H ₂ O	0,18 mg
MoO ₄ Na ₂ .2H ₂ O	0,006 mg
Solución de vitaminas	
Cianocobalamina (B12)	0,50 mg
Tiamina. HCl (B1)	0,10 mg
Biotina (Vit. H)	0,50 mg

2.6. Análisis químico del EALS

La concentración final de EALS en la solución stock es de aproximadamente 80 mg mL⁻¹, que al dosificarse a los cultivos microalgales con 20, 30 y 40 mL L⁻¹ equivalen a 1600, 2400 y 3200 mg L⁻¹ de peso seco del lodo, respectivamente. En la solución stock se determinó el contenido humedad según AOAC (2007), y de nitratos, nitritos, nitrógeno amoniacal, fósforo y hierro según APHA (2005) (tabla 3). Todos los parámetros fueron evaluados en el laboratorio de Biología y Ecología, de la facultad de Ciencias, Universidad Nacional del Santa.

Tabla 3. Valores proximales de la composición química del EALS utilizado en el cultivo de *T. suecica*.

PARÁMETROS	CONCENTRACIÓN
Humedad (%)	92,02
Sólidos Totales (g L ⁻¹)	79,83
Nitratos (mg-NO ₃ L ⁻¹)	580,52
Nitritos (mg-NO ₂ L ⁻¹)	4,38
N-Amoniacal (mg-NH ₃ L ⁻¹)	1,59
Fósforo (mg-PO ₄ L ⁻¹)	11,23
Hierro (mg-Fe L ⁻¹)	8,06

A fin de comparar el aporte de los nutrientes más importantes, especialmente nitrógeno se calcularon las concentraciones en cada uno de los cultivos ensayados (tabla 4).

Tabla 4. Concentración de N, P y Fe de los cultivos de *T. suecica* dosificados con tres dosificaciones del EALS.

PARÁMETROS	GUILLARD f/2	TRATAMIENTOS			
		EALS	EALS (mL L ⁻¹)		
			20	30	40
N (mg-(NO ₂ +NO ₃ +NH ₃) L ⁻¹)	12,36	586,49	11,73	17,59	23,46
P (mg-PO ₄ L ⁻¹)	1,29	11,23	0,22	0,34	0,45
Fe (mg-Fe L ⁻¹)	0,72	8,06	0,16	0,24	0,32

2.7. Determinación de parámetros del cultivo de *T. suecica*

Se registró diariamente la temperatura con un termómetro Boeco ($\pm 0,1$ °C), pH con un pH-metro digital Hanna ($\pm 0,01$), y se mantuvo el flujo de aire suministrado por un blower a 500 mL min⁻¹ en cada unidad experimental, el cual fue medido utilizando un flujómetro Cole Parmer (± 10 ml min⁻¹).

Asimismo, los cultivos microalgales recibieron iluminación constante con fluorescentes de luz blanca de 40 w, ubicados a 10 cm del cultivo, cada fluorescente emite una intensidad luminosa de aproximadamente 2000 lux, los que se midieron con un luxómetro digital Hanna ($\pm 0,1$ lux), y la tasa de aireación de 1000 mL por minuto, los que se midieron con un flujómetro Cole Parmer (± 10 mL).

2.8. Tratamiento del agua de mar de los cultivos de *T. suecica*

El agua de mar utilizada en el experimento procedió de “El Dorado”, bahía de Samanco ($09^{\circ} 12' S$ y $78^{\circ} 30' W$), distrito de Nuevo Chimbote - Perú, y fue trasladado en un recipiente de 100 L de capacidad, al laboratorio de Cultivos de Especies Auxiliares la Escuela Académico Profesional de Biología en Acuicultura. Después de sedimentar por 24 h, se filtró con mallas de 10 y 5 μm y se agregó 1 mL L⁻¹ de hipoclorito de sodio al 4 % dejándolo actuar por 12 h para eliminar la mayor cantidad de microorganismos presentes. Luego fue neutralizado con 1 mL L⁻¹ de tiosulfato de sodio al 15 % con vigorosa aireación durante 30 min.

2.9. Conteos celulares y determinación del crecimiento poblacional de *T. suecica*

El crecimiento poblacional de los cultivos se determinó mediante conteos celulares diarios (cél. mL⁻¹) utilizando una cámara Neubauer con microscopio binocular Olympus durante los 7 días que duró el experimento. Los recuentos celulares fueron utilizados para elaborar las correspondientes curvas de crecimiento poblacional y determinar las tasas de crecimiento específico (μ) y el tiempo de duplicación (TD) según las siguientes fórmulas (Guillard, 1975):

$$\mu = \frac{\ln(N_f / N_0)}{t_f - t_0}$$

N_f y N_0 : Número de células, al final e inicio de los cultivos microalgales.

$$TD = \frac{\ln(2)}{\mu}$$

2.10. Determinación del contenido de lípidos totales en *T. suecica*

Para determinar el contenido de lípidos totales, al final de la fase exponencial del crecimiento microalgal (día 5), se obtuvieron muestras para determinar el contenido de lípidos totales en *T. suecica* de todas las unidades experimentales.

Los lípidos fueron determinados utilizando la metodología propuesta por Bligh & Dyer (1959) y Marsh & Weinstein (1966) que consiste en agregar en un tubo de ensayo 2 mL de la suspensión algal y centrifugarlo a 10000 rpm por 10 min.; se elimina el sobrenadante y el sedimento que queda es resuspendido con agua destilada y nuevamente centrifugada a 10000 rpm por 10 min. Después de eliminar el sobrenadante, el material celular o pasta microalgal fue secada en estufa a 60 °C por espacio de 3 h. A cada uno de los tubos se les adicionó 2 mL de una solución de cloroformo: metanol (1:2) y se dejó reposar por 12 h en refrigeración a 5 °C. Transcurrido 12 h fueron centrifugados a 10000 rpm por 5 min, y el sobrenadante se transfirió a tubos de ensayo cónicos, se agregó 2 mL de agua destilada a cada tubo, y fueron centrifugados a 6000 rpm por 10 min, posteriormente la capa coloreada se transfirió a tubos de ensayo de vidrio para llevar a baño María a 80 °C a fin de evaporar el solvente. Finalmente son secados en estufa a 105 °C por 30 min para asegurar la evaporación total del solvente y restos de agua que puedan contener las muestras.

A cada una de las muestras enfriadas a temperatura ambiente por 30 min, se les adicionó 2 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado (98 %) y fueron calentados a 200°C por 1 h que luego de enfriadas a temperatura ambiente se les agregó 2 mL de agua destilada y realizar las lecturas en un espectrofotómetro Aquamat con celdas de cuarzo (1cm) a 375 nm de longitud de onda (fig. 3).

Para determinar la curva de calibración para los lípidos totales (L) se utilizaron como patrones colesterol y aceite de oliva a cuatro concentraciones, obteniéndose la siguiente ecuación:

$$L (\%) = \frac{\left(\left(\frac{\text{Absorbancia}}{4,3362} \right) \times V \right)}{M} \times 100$$

Donde:

V: Volumen final de muestra analizada (4 mL).

M: Peso seco (mg) en 2 mL de cultivo microalgal en cada unidad experimental.

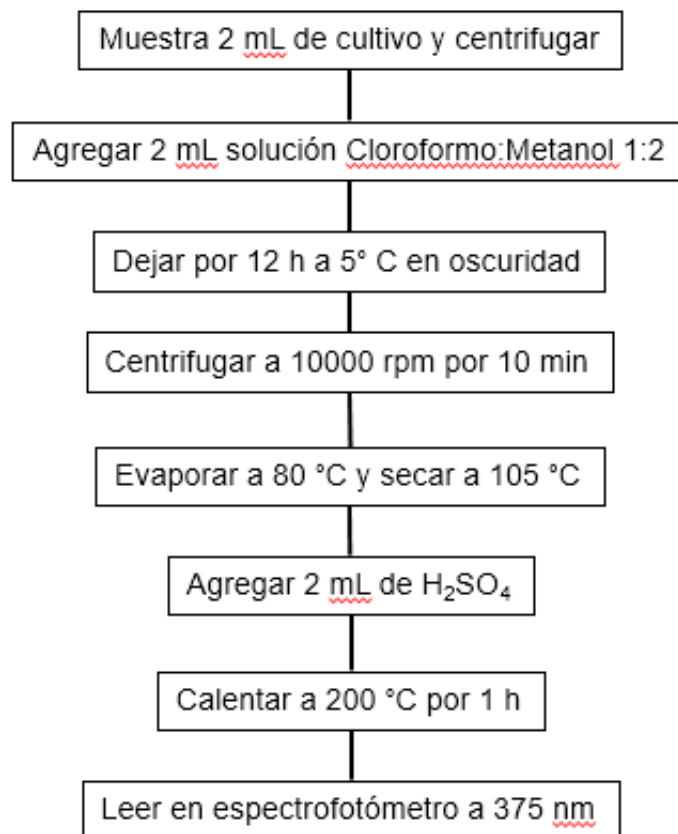


Fig. 3. Protocolo para determinar el contenido de lípidos en *T. suecica*.

2.11. Determinación de la biomasa de *T. suecica*

Para determinar la concentración de los lípidos totales en biomasa (mg L^{-1}) de los cultivos de *T. suecica*, se filtró de cada unidad experimental 50 mL de suspensión microalgal en papel filtro Whatman N° 42 y fueron secados en estufa a 60 °C por 6 h, seguido de 105 °C durante 15 min para luego ser enfriado por 1h. Los cálculos de los pesos se realizaron por diferencias de pesos entre el papel filtro y el papel que contenía las muestras secas; utilizando una balanza analítica de sensibilidad 0,0001 mg. Así, los cálculos de la biomasa microalgal (B) y lípidos en biomasa (BL) de cada unidad experimental fueron estimados utilizando las siguientes fórmulas:

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

Donde: *P1* y *P2* son el Peso papel (mg) y Peso papel + muestra seca (mg), respectivamente.

$$BL (\text{mg L}^{-1}) = \frac{L \times B}{100}$$

Donde:

L: Porcentaje de lípidos (%).

B: Biomasa seca total por litro (mg).

2.12. Análisis estadístico

Los datos del crecimiento poblacional (densidad, tasa de crecimiento y tiempo de duplicación poblacional) y contenido de lípidos, se sometieron al análisis de varianza (ANOVA) para establecer diferencias entre promedios y la prueba de Tukey HSD para establecer el mejor promedio, con un nivel de significancia de 0,05. Todo el proceso estadístico fue desarrollado utilizando los programas, Microsoft Excel 2010 e IBM SPSS Statistics 20.0 para Microsoft Windows 8.

III. RESULTADOS

3.1. Parámetros ambientales del cultivo de *T. suecica*

3.1.1. Temperatura

La variación de la temperatura en los cultivos de *T. suecica* se muestra en la fig. 4.

La temperatura de los cultivos microalgales varió entre los 23,3 y 25,2 °C durante el experimento. Estos fueron estadísticamente similares ($p>0,05$) en cada día de cultivo.

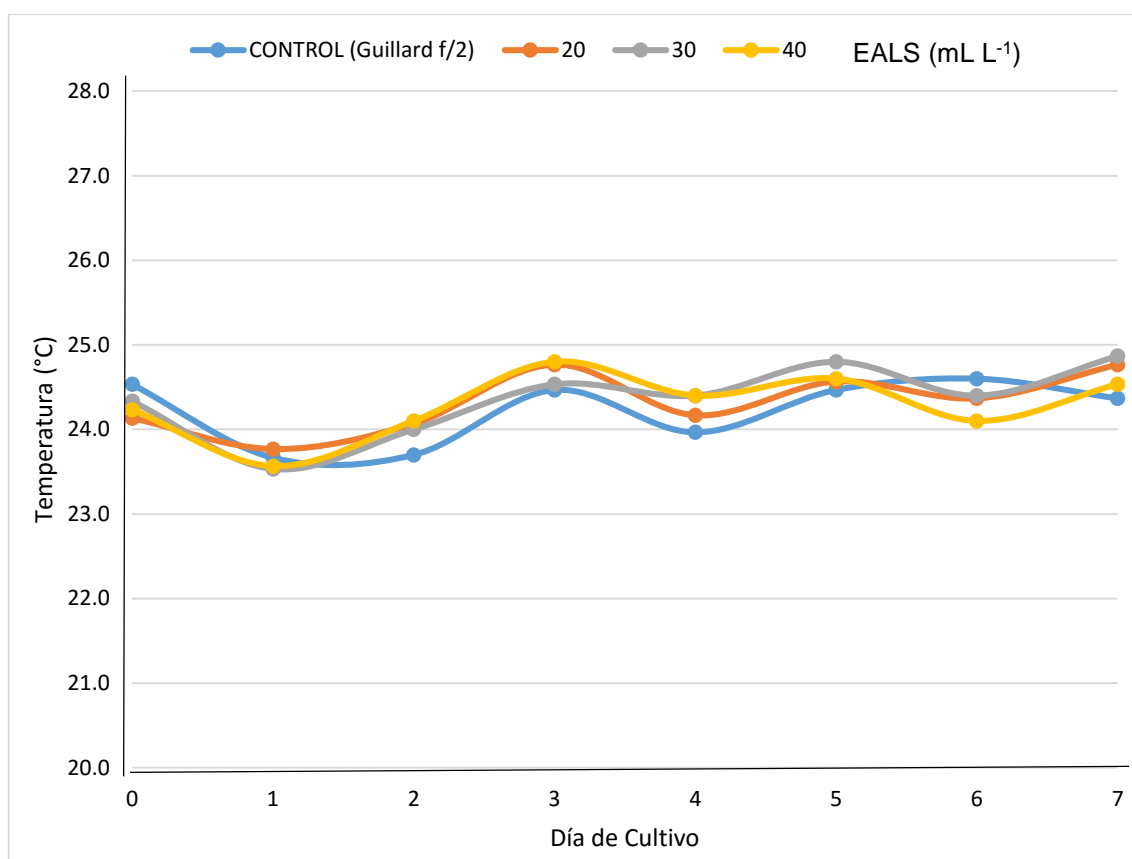


Fig. 4. Variación de la temperatura promedio (°C) en los cultivos de *T. suecica* con EALS y grupo control (Guillard f/2).

3.1.2. pH

Las variaciones del pH en los cultivos son mostrados en la fig. 5, encontrándose una variación de 7,64 y 8,89 unidades.

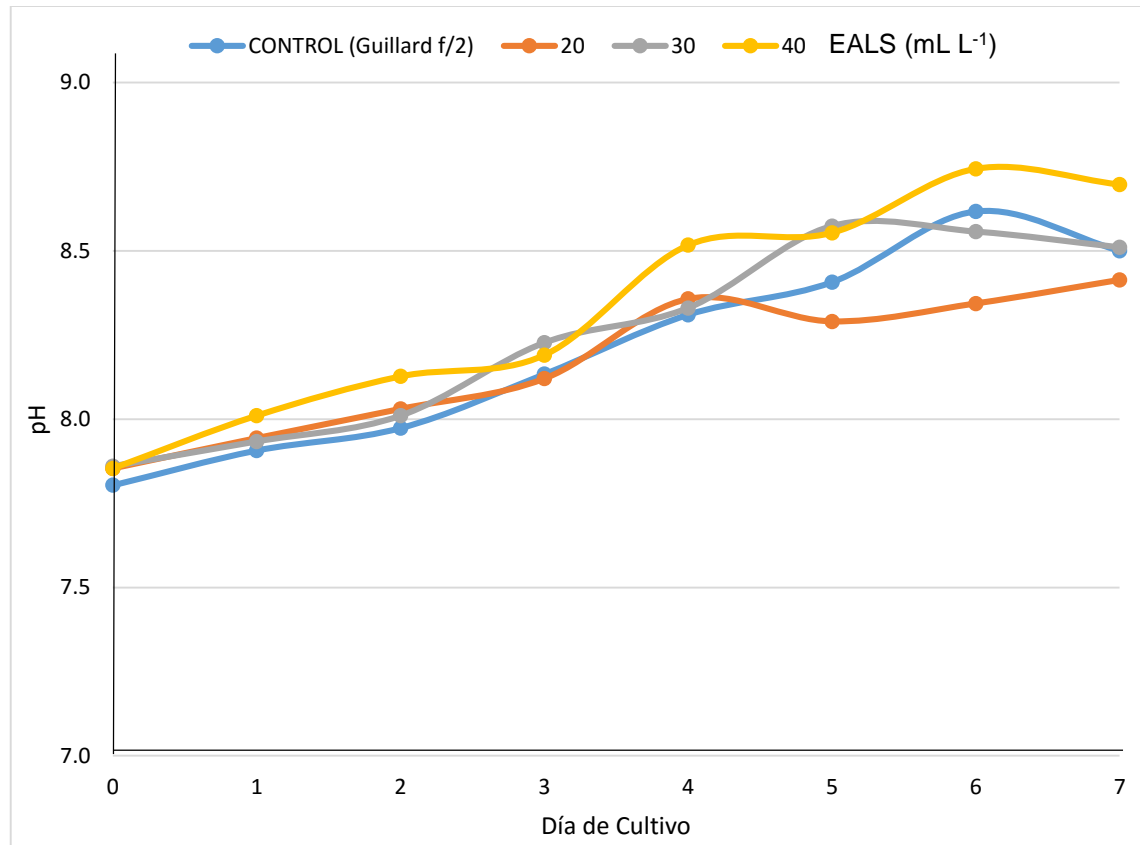


Fig. 5. Variación del pH promedio en los cultivos de *T. suecica* con EALS y grupo control (Guillard f/2).

Los valores de pH presentaron una tendencia al incremento de acuerdo a los días en cultivo, siendo estadísticamente similares ($p > 0,05$) hasta el quinto día de cultivo.

Al sexto día de cultivo, los valores de pH se presentaron con mayores valores ($p < 0,05$) en los dosificados con 30 y 40 mL L⁻¹ de EALS, con 8,56 y 8,74 unid., respectivamente; mientras el menor ($p < 0,05$) fue el dosificado con 20 mL L⁻¹ de EALS, con 8,34 unid. Para el último día de cultivo (día 7) los valores de pH fueron similares entre sí ($p > 0,05$).

3.2. Crecimiento poblacional de *T. suecica*

3.2.1. Curvas de crecimiento poblacional

En la tabla 5 se observa las densidades poblacionales y sus respectivas diferencias estadísticas de los cultivos de *T. suecica* dosificadas con EALS y grupo control.

Tabla 5. Densidad poblacional ($\times 10^6$ cél. mL⁻¹) de *T. suecica* dosificados con EALS y grupo control (Guillard f/2).

DÍA DE CULTIVO	EALS (mL L ⁻¹)			
	CONTROL (Guillard f/2)	20	30	40
0	0,21 \pm 0,00a	0,21 \pm 0,00a	0,21 \pm 0,00a	0,21 \pm 0,00a
1	0,32 \pm 0,06a	0,38 \pm 0,09a	0,34 \pm 0,05a	0,31 \pm 0,06a
2	0,88 \pm 0,05a	0,74 \pm 0,08a	0,71 \pm 0,06a	0,74 \pm 0,10a
3	1,27 \pm 0,03a	1,26 \pm 0,10a	1,16 \pm 0,09a	1,20 \pm 0,16a
4	1,62 \pm 0,06ab	1,46 \pm 0,07b	1,64 \pm 0,10ab	1,75 \pm 0,12a
5	1,96 \pm 0,09a	1,59 \pm 0,05b	2,03 \pm 0,17a	2,07 \pm 0,15a
6	2,14 \pm 0,16ab	1,78 \pm 0,14b	2,22 \pm 0,21a	2,29 \pm 0,12a
7	2,19 \pm 0,18a	1,77 \pm 0,13b	2,26 \pm 0,15a	2,33 \pm 0,16a

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

Todos los cultivos se iniciaron con $0,21 \times 10^6$ cél. mL⁻¹, los cuales fueron incrementándose durante el experimento. Durante los días 1, 2 y 3 las densidades microalgales de todos los cultivos de *T. suecica* fueron similares ($p>0,05$).

En el cuarto día de cultivo, las mayores densidades poblacionales de *T. suecica* se encontraron en los dosificados con 30 y 40 mL L⁻¹ de EALS con valores significativos ($p<0,05$) de $1,64 \times 10^6$ cél. mL⁻¹ y $1,75 \times 10^6$ cél. mL⁻¹, respectivamente; mientras que el menor valor significativo ($p<0,05$) se obtuvo en el tratamiento dosificado con 20 mL L⁻¹ de EALS con $1,46 \times 10^6$ cél. mL⁻¹; aunque los dosificados con 30 mL L⁻¹ de EALS y los controles fueron similares entre si ($p>0,05$).

En el quinto día de cultivo, las mayores densidades poblacionales de *T. suecica* corresponden a los tratamientos con 30 y 40 mL L⁻¹ de EALS con valores significativos ($p < 0,05$) de $2,03 \times 10^6$ cél. mL⁻¹ y $2,07 \times 10^6$ cél. mL⁻¹ respectivamente; mientras, que la menor densidad poblacional corresponde al tratamiento con 20 mL L⁻¹ de EALS con $1,59 \times 10^6$ cél. mL⁻¹.

Similar tendencia se observa en el sexto día de cultivo, en las que los tratamientos con 30 y 40 mL L⁻¹ de EALS presentan valores significativamente más altos ($p < 0,05$) de $2,22 \times 10^6$ cél. mL⁻¹ y $2,29 \times 10^6$ cél. mL⁻¹, respectivamente.

Los valores del crecimiento poblacional de los cultivos de *T. suecica* ensayados son mostrados en la fig. 6.

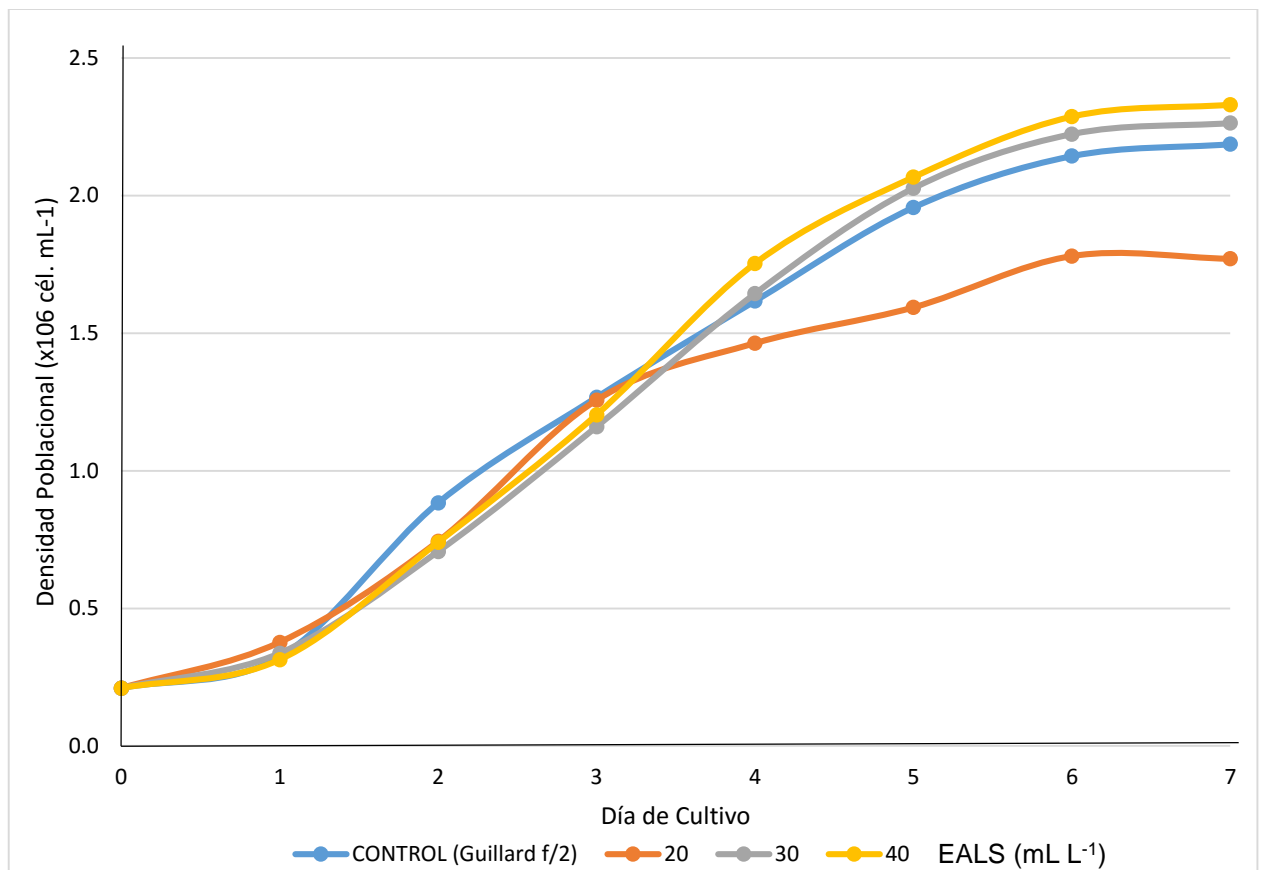


Fig. 6. Variación de la densidad poblacional en los cultivos de *T. suecica* con EALS y grupo control (Guillard f/2).

En la fig 7 se muestra la coloración que adquiere cada unidad experimental al quinto día de cultivo (fig. 7).

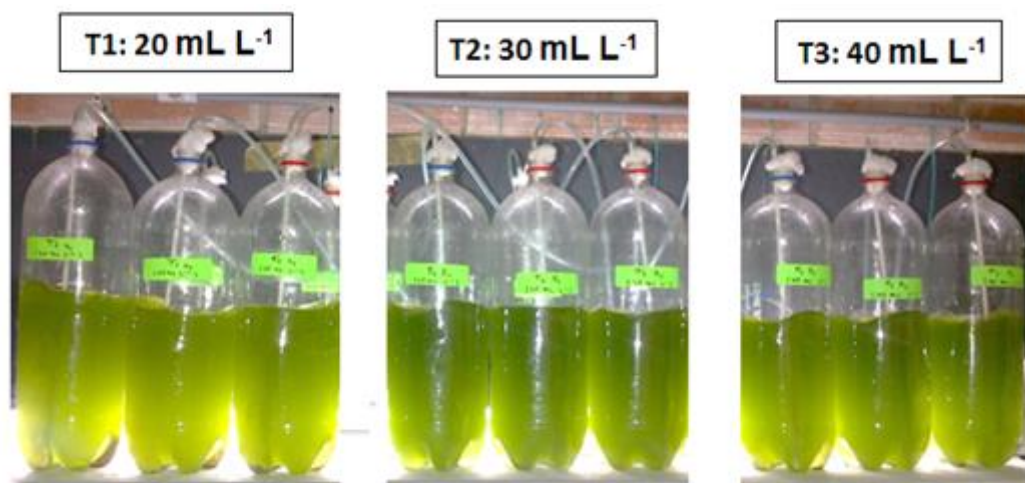


Fig. 7. Unidades experimentales al quinto día de cultivo de *T. suecica* con EALS y grupo control (Guillard f/2).

3.2.2. Tasa de crecimiento y tiempo de duplicación poblacional

En la tabla 6 y fig. 8 Se muestran la tasa de crecimiento (μ) y el tiempo de duplicación (TD) de *T. suecica* dosificados con EALS y el control determinados al quinto día de cultivo, demostrándose que aquellos dosificados con 30 y 40 mL L⁻¹ de EALS presentaron las más altas tasas de crecimiento 0,453 día⁻¹ y 0,457 día⁻¹ respectivamente. Mientras que los menores tiempos de duplicación (TD) fueron en aquellos dosificados con 30 y 40 mL L⁻¹ de EALS, correspondiendo a 1,532 día y 1,518 día respectivamente.

Tabla 6. Tasa de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (TD) de los cultivos de *T. suecica* dosificados con EALS en el quinto día de cultivo.

PARÁMETRO	EALS (mL L ⁻¹)			
	CONTROL (Guillard f/2)	20	30	40
N ₀	0,21 ±0,00	0,21 ±0,00	0,21 ±0,00	0,21 ±0,00
N _f	1,96 ±0,09	1,59 ±0,05	2,03 ±0,17	2,07 ±0,15
Día	5	5	5	5
μ (día ⁻¹)	0,446 ±0,009a	0,405 ±0,006b	0,453 ±0,018a	0,457 ±0,014a
TD (día)	1,554 ±0,033a	1,712 ±0,027b	1,532 ±0,061a	1,518 ±0,047a

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

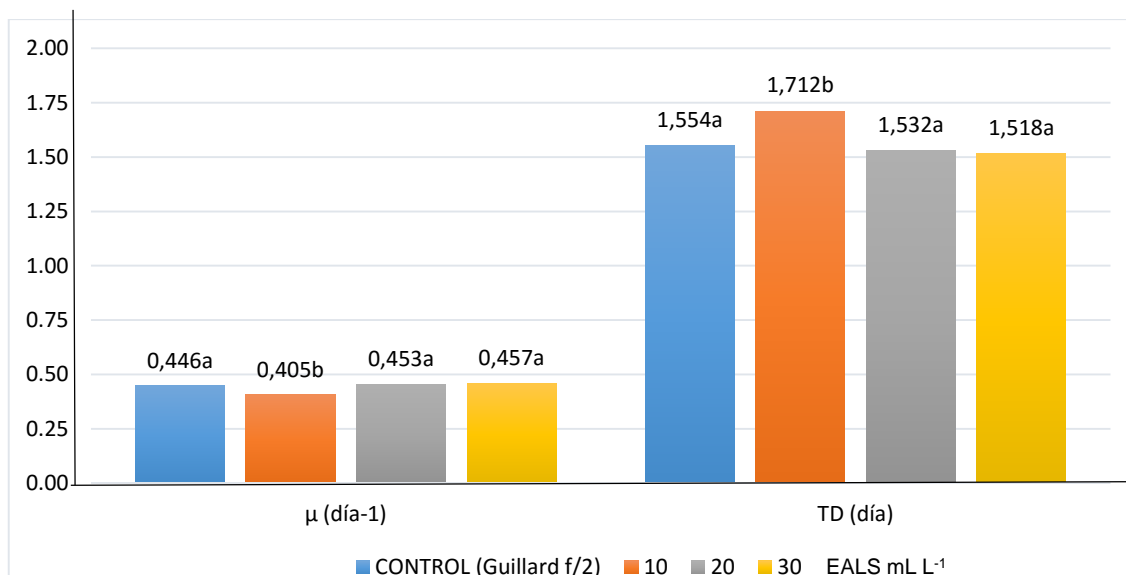


Fig. 8. Valores de la tasa de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (TD) de los cultivos de *T. suecica* con EALS y grupo control al quinto día de cultivo.

Asimismo, en el sexto día de cultivo los valores de la tasa de crecimiento (μ) y el tiempo de duplicación (TD) mostraron similares tendencias; en los tratamientos dosificados con 30 y 40 mL L⁻¹ de EALS presentaron las más altas tasas de crecimiento 0,393 día⁻¹ y 0,398 día⁻¹ respectivamente. Mientras que los menores tiempos de duplicación (TD) fueron en aquellos dosificados con 30 y 40 mL L⁻¹ de EALS, correspondiendo a 1,767 y 1,743, respectivamente (tabla 7 y fig. 9).

Tabla 7. Tasa de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (TD) de los cultivos de *T. suecica* dosificados con EALS en el sexto día de cultivo.

PARÁMETRO	EALS (mL L ⁻¹)			
	CONTROL (Guillard f/2)	20	30	40
NO	0,21 ±0,00	0,21 ±0,00	0,21 ±0,00	0,21 ±0,00
Nf	2,14 ±0,16	1,78 ±0,14	2,22 ±0,21	2,29 ±0,12
Día	6	6	6	6
μ (día⁻¹)	0,387 ±0,012ab	0,356 ±0,013b	0,393 ±0,015a	0,398 ±0,009a
TD (día)	1,792 ±0,056a	1,949 ±0,072b	1,767 ±0,066a	1,743 ±0,040a

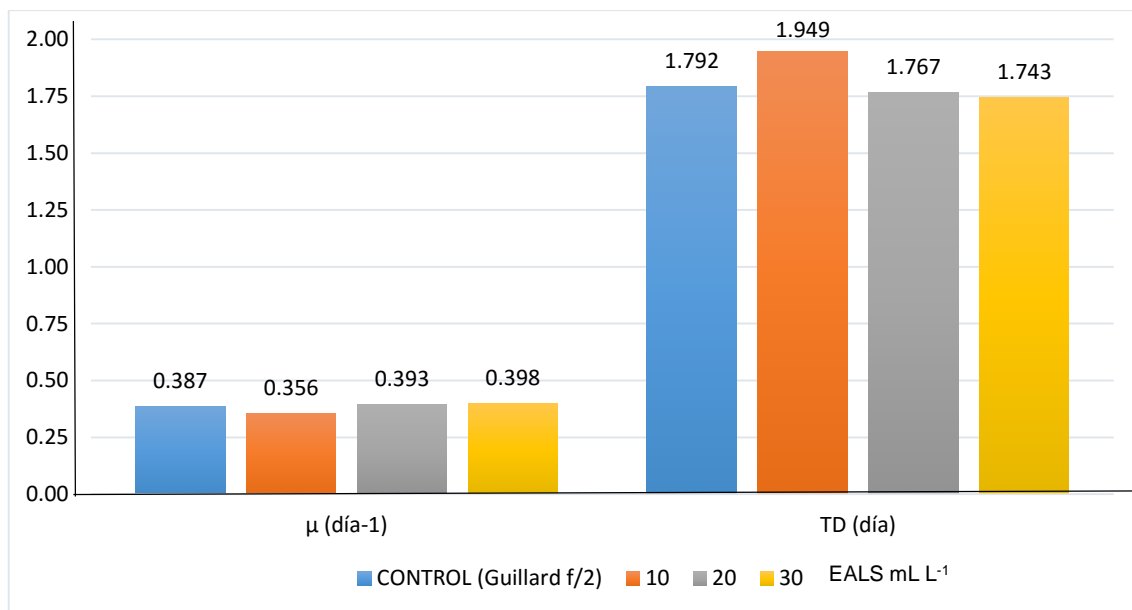


Fig. 9. Valores de la tasa de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (TD) de los cultivos de *T. suecica* con EALS y grupo control al sexto día de cultivo.

3.3. Contenido de lípidos en *T. suecica*

En la tabla 8 se muestran los valores del contenido de lípidos en porcentaje (%) y biomasa (mg L^{-1}) de *T. suecica* al quinto día de cultivo en los tratamientos con EALS y grupo control, cuyas variaciones se muestran en las fig. 10 y 11.

Tabla 8. Contenido de lípidos en porcentaje (%) y biomasa (mg L^{-1}) al quinto día de cultivo de *T. suecica* en los dosificados con EALS y grupo control.

PARÁMETRO	EALS (mL L^{-1})			
	CONTROL (Guillard f/2)	20	30	40
Biomasa (mg L^{-1})	473,8 \pm 21,2	384,3 \pm 11,5	503,3 \pm 43,2	517,8 \pm 38,3
Lípidos (%)	20,31 \pm 0,65c	26,19 \pm 0,38a	24,98 \pm 0,17b	24,40 \pm 0,42b
Lípidos (mg L^{-1})	96,4 \pm 7,3b	100,7 \pm 4,0b	125,7 \pm 11,2a	126,4 \pm 10,9a

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

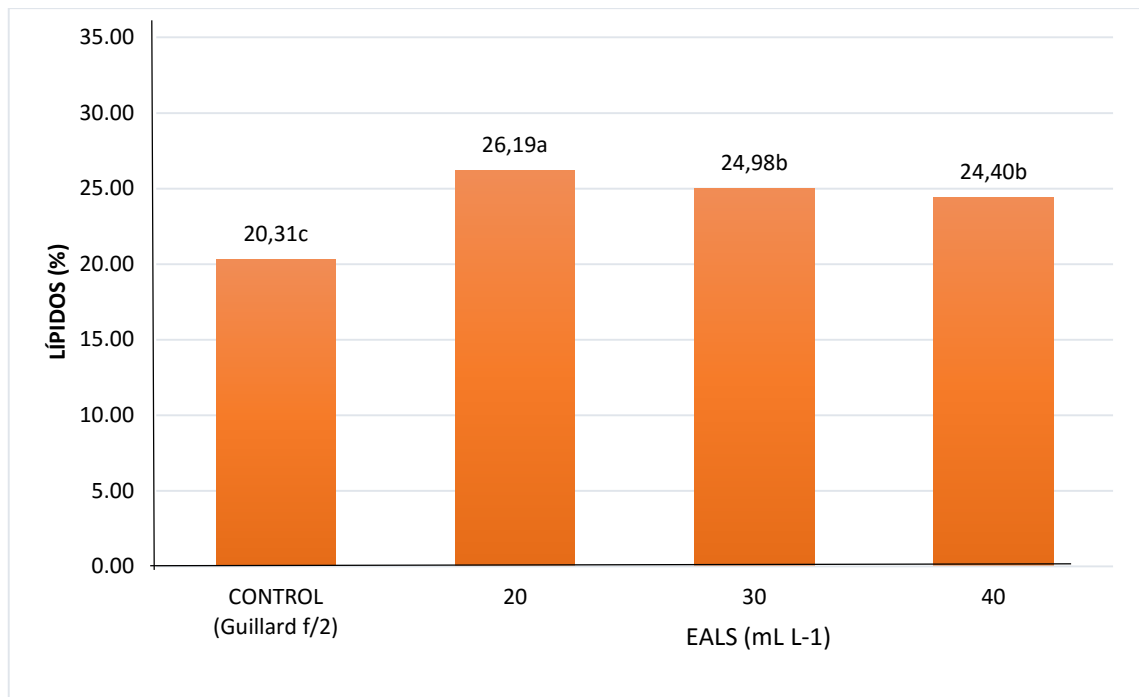


Fig. 10 Porcentaje de lípidos en *T. suecica* en los dosificados con EALS y grupo control.

El contenido de lípidos de *T. suecica* expresado en porcentaje al quinto día de cultivo (fig. 9) fueron significativamente mayores ($p < 0,05$) en los cultivos dosificados con 20 mL L⁻¹ de EALS (26,19 %); mientras, que los menores valores significativos ($p < 0,05$) fueron obtenidos en los dosificados con 30 y 40 mL L⁻¹ de EALS con 24,98 % y 24,40 %, respectivamente.

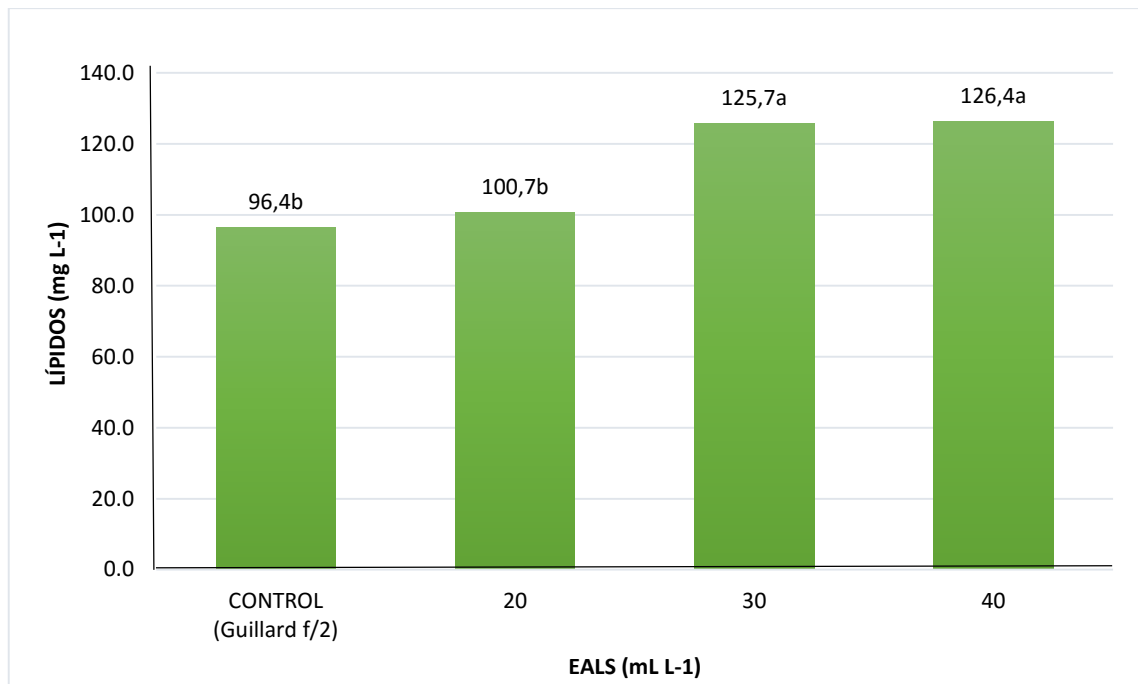


Fig. 11. Contenido de lípidos en biomasa de *T. suecica* en los dosificados con EALS y grupo control (Guillard f/2).

En cuanto al contenido de lípidos en biomasa (mg L^{-1}) al quinto día de cultivo (fig. 10), fueron significativamente mayores ($p < 0,05$) en los dosificados con 30 y 40 mL L^{-1} de EALS con $125,7 \text{ mg L}^{-1}$ y $126,4 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente, y menor en el dosificado con 20 mL L^{-1} de EALS con $100,7 \text{ mg L}^{-1}$.

IV. DISCUSIÓN

El crecimiento y composición química de las microalgas pueden ser afectadas por las condiciones del cultivo, especialmente la temperatura, salinidad, pH y luz (Cho *et al.*, 2007; Khatoon *et al.*, 2014), en tal sentido es importante controlar el comportamiento de estas variables. Respecto a la temperatura, Abalde *et al.* (1995), consideran que el rango varía según la especie, existiendo especies que no soportan temperaturas superiores a 25 °C, mientras que otras crecen bien hasta los 36 °C; asimismo, según Laing & Helm (1981), la productividad de *T. suecica* no es afectada entre los 18 y 22 °C y Weiss *et al.* (1985), el crecimiento óptimo para *Tetraselmis* sp. se encuentra entre los 25 y 27°C y que con abundante suministro de nutrientes, es posible sostener buenas densidades microalgales en un rango de 15 a 32 °C.

Las variaciones de la temperatura en nuestros ensayos (23,3 y 25,2 °C) se ubican en los rangos mencionados por Weiss *et al.* (1985), por lo que consideramos que la temperatura no afecta el crecimiento ni el contenido de lípidos de *T. suecica* cultivadas con diferentes concentraciones de EALS.

El pH es un factor de decisiva participación en la dinámica del crecimiento microalgal y en el contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos siendo el rango de 7,5 y 8,5 el más adecuado para *Tetraselmis* sp (Khatoon *et al.*, 2014), observándose incremento del pH con el tiempo (Mohamed *et al.*, 2014) debido al consumo de nitrógeno y mayor fijación de CO₂ (Pérez-García *et al.*, 2011). Cabe destacar que el descenso brusco del pH suele ser letal mientras que pueden soportar mejor los incrementos del pH hasta un cierto límite (Richmond & Becker, 1986).

Silva *et al.* (2011) demostró que el rango del pH de 7,13 a 8,69 no afectaron el crecimiento de *T. suecica*, asimismo, Millán-Núñez *et al.* (2010), reportan cultivos de *T. suecica* en rangos de 7,3 a 8,5 unidades, coincidiendo con nuestros resultados en las que se observa gradual incremento del pH de 7,64 y 8,89 unidades, por lo que el pH no tendría influencia en los resultados de crecimiento y contenido de lípidos obtenidos.

La nutrición heterotrófica de *T. suecica* le permite utilizar para su crecimiento diferentes fuentes nitrogenadas como urea, fosfato diamónico, nitratos y nitritos, así como ensilado de pescado, aminoácidos y vitaminas (Bold & Wynne, 1985). Teóricamente un compuesto nitrogenado que entra en la vía bioquímica de las microalgas puede ser considerado como una fuente de nitrógeno que son rápidamente asimilados (Flynn & Butler, 1986), en tal sentido, los compuestos nitrogenados aportados por el EALS soportan los crecimientos poblacionales observados en todos los tratamientos.

El aumento de contenido de nitrógeno con la dosificación del EALS a los cultivos de *T. suecica* muestra una positiva relación con los crecimientos alcanzándose densidades poblacionales de $1,59 \times 10^6$, $2,03 \times 10^6$ y $2,07 \times 10^6$ cél. mL⁻¹ en los cultivos dosificados con 20, 30 y 40 mL L⁻¹, respectivamente. En tal sentido, el aporte de nitrógeno es suficiente para mantener adecuados crecimientos poblacionales, ya que Alsull & Wan (2012) demostraron que en condiciones de limitación de nitrógeno el crecimiento puede detenerse.

Considerando que la concentración y la composición de nutrientes en aguas residuales determina la concentración máxima de biomasa que se puede alcanzar (Michels *et al.* 2014) y que el equilibrio de nutrientes se convierte en limitante para el crecimiento de las microalgas (Wang & Lan, 2011), las concentraciones de los nutrientes P, Fe y N se hallan mejor equilibrados en las dosificaciones de 30 y 40 mL L⁻¹ de EALS.

Las variaciones de los incrementos poblacionales están directamente relacionados con la tasa de crecimiento (μ), es decir que valores más altos de μ denotan mayor velocidad de reproducción y, por lo tanto, mayores densidades de los cultivos, de tal manera que la tasa máxima de crecimiento específico (μ_{max}) representa el potencial biológico respecto al tiempo de duplicación de la especie microalgal cuando no hay deficiencia de nutrientes o de luz (Griffiths *et al.*, 2012 y Roleda *et al.* 2013). En nuestros ensayos se obtuvieron los mejores valores de μ en los cultivos dosificados con 30 mL L⁻¹ (0,453 día⁻¹) y 40 mL L⁻¹ de EALS (0,457 día⁻¹) presentando la misma tendencia de la densidad celular.

Comparativamente los valores de los cultivos controles, usando Guillard f/2, son menores ($0,446 \text{ día}^{-1}$) a los reportados por Montoya & Acosta (2011) que utilizaron bicarbonato y fertilizantes comerciales conteniendo N, P_2O_5 , K_2O ($0,65 \text{ día}^{-1}$), y a los de Silva *et al.* (2011) que utilizando una solución de sanguaza y agua de mar (4,56 %) obtuvieron $0,659 \text{ día}^{-1}$, al parecer, por el mejor balance de nutrientes u óptimas condiciones de cultivo (aireación, control del pH, temperatura, etc).

Habiéndose demostrado la capacidad de *T. suecica* de crecer en condiciones heterotróficas, es decir, aprovecha el carbono y nitrógeno orgánicos de variada procedencia (Merino *et al.*, 2003; Fernández & Paredes, 2007; Ipanaqué & Paredes, 2009), concuerda con nuestros resultados ya que los nutrientes orgánicos contenidos en el EALS y extraído por ebullición, permiten obtener adecuados crecimientos poblacionales. Todos los cultivos dosificados con EALS muestran adecuados crecimiento poblacionales, sin embargo, aquellos dosificados con 30 y 40 mL L^{-1} de EALS presentan valores estadísticamente similares a los controles ($0,453$, $0,457$ y $0,446 \text{ día}^{-1}$, respectivamente) corroborando la habilidad de *T. suecica* para metabolizar eficientemente los nutrientes, orgánicos e inorgánicos, presentes en el EALS.

Respecto al tiempo de duplicación (TD), el tiempo que demora la microalga en dividirse, *T. suecica* presenta mayores valores con 20 mL L^{-1} de EALS ($1,712 \text{ día}$); y los menores con los dosificados con 30 ($1,532 \text{ día}$) y 40 mL L^{-1} de EALS ($1,518 \text{ día}$). Estos valores son similares a los obtenidos por Sheehan *et al.* (1998) utilizando medio Guillard f/2 ($1,5 \text{ día}$) y que según Molina *et al.* (1991), está influenciado por el contenido y balance de nutrientes, por lo tanto, los nutrientes presentes en los cultivos dosificados con 20 mL L^{-1} de EALS son insuficientes requiriendo *T. suecica* más tiempo para duplicarse. Según González-Rodríguez & Maestrini (1984), existe una relación inversa entre la tasa de crecimiento (μ) y la cantidad de nitrógeno celular y la deficiencia de nitrógeno en las células de *Isochrysis galbana* reduce la tasa de crecimiento (Fábregas *et al.*, 1985).

La composición química de las microalgas puede ser manipulado mediante el cambio de los parámetros físicos y químicos del medio de cultivo (Huang *et al.*, 2012), y desde el punto de vista del contenido lipídico, las microalgas pueden contener de 1 al 90 % de su peso seco dependiendo también de las especies (Spolaore *et al.*, 2006). También se ha demostrado que los medios de cultivo con suficiente nitrógeno, permiten que las algas sintetizen principalmente proteínas para mantener el crecimiento y la división, y que en condiciones limitadas de nitrógeno, las algas aumenten las sustancias de reserva, hidratos de carbono y lípidos de reserva, a expensas de la síntesis proteica (Sukenik *et al.*, 1993).

Por otro lado, la acumulación de lípidos en las células microalgales está asociada con el crecimiento poblacional y el contenido de nitrógeno, en tal sentido, Chiu *et al.* (2009) hallaron altos contenidos de lípidos (30,8 y 50,4 %), en *Nannochloropsis oculata* creciendo en un medio limitado en nitrógeno, que limita o detiene la división celular, aunque el metabolismo del carbono continúa y desvía el carbono para la producción de lípidos (Beopoulos *et al.*, 2009). Asimismo, Jiang (2002) y Huang *et al.* (2003), demostraron en la microalga *N. oculata* que la deficiencia de nitrógeno es una condición severa de estrés para las microalgas dado que es un constituyente principal de proteínas y ácidos nucleicos que son altamente abundante en las células vivas, sacrificando en cierta manera la producción de clorofilas; por lo que el aumento del contenido de lípidos va de acuerdo con el estrés ambiental, siendo este un eficaz mecanismo para la acumulación de lípidos en las células de microalgas (Hong *et al.*, 2008).

Las dosificaciones con 20, 30 y 40 ml L⁻¹ de EALS proporcionan 11,73, 17,59 y 23,46 mg L⁻¹ de nitrógeno, respectivamente, tienen influencia en el contenido de lípidos de *T. suecica*, así tenemos, que conforme aumenta el contenido de nitrógeno disminuye el de lípidos, correspondiendo 26,19%, 24,98% y 24,40 % a los cultivos dosificados con 20, 30 y 40 ml L⁻¹ de EALS. Asimismo, pese a los similares contenidos de nitrógeno del cultivo control (12,36 mg L⁻¹) y los dosificados con 20 ml L⁻¹ de EALS (11,73 mg L⁻¹), los contenidos de lípidos muestran notorias diferencias (20,31 % y 26,19%, respectivamente), al parecer la mayor concentración de lípidos se ve influenciado por el nitrógeno orgánico

contenido en el EALS. En consecuencia, queda demostrado que el porcentaje de lípidos es mayor en los cultivos conteniendo menor contenido de nitrógeno.

Los resultados obtenidos en el presente estudio son cercanas a los obtenidos por Sheehan *et al.* (1998), en *T. suecica* cultivada con medio Guillard f/2, que contenía hasta 22 % de lípidos, aunque Azma *et al.* (2009), obtuvieron contenidos de 24,5 % y 51,9 %, ya sea en condiciones autotróficas o heterotróficas, demostrando que la naturaleza del medio de cultivo, inorgánico u orgánico, permite incrementar el contenido de lípidos.

Las limitaciones de P y Fe de los cultivos dosificados con EALS podría influenciar los altos contenidos de lípidos, ya que según experiencias de Chini-Zittelli *et al.* (2006), se puede obtener hasta 32% de lípidos en cultivos semicontinuos de *T. suecica* cuando se aplican diferentes tasas de renovación del cultivo (del 10 al 50%). Dicha limitación de nutrientes se muestran en el EALS en comparación al medio Guillard f/2, los mismos que también permitirían obtener mayores contenidos de lípidos al utilizar menores concentraciones de EALS.

Adicionalmente, Cohen (1999), sostiene que la deficiencia de nutrientes, sobre todo minerales, típicamente disminuye la tasa de crecimiento, aunque muchas especies de microalgas continúan sintetizando activamente ácidos grasos, como los incrementos de lípidos reportados por Alsull & Wan (2012), en *Tetraselmis sp* de 13,29 % en condiciones de limitación de nitrógeno hasta los 29,51 %, en condiciones de restricción total.

Finalmente, el contenido de lípidos en peso seco (mg L^{-1}) de los cultivos está relacionado con la biomasa producida y los correspondientes porcentajes de lípidos evidenciándose que las dosificaciones de 30 mL L^{-1} de EALS (125,7 mg L^{-1} y 24,98%) y 40 mL L^{-1} de EALS (126,4 mg L^{-1} y 24,40%) presentaron mayores valores que los controles (96,4 mg L^{-1} y 20,31%) debido a las densidades celulares y tasa de crecimiento alcanzados. En tal sentido, consideramos que la dosificación de 30 mL L^{-1} de EALS es la que permite obtener mejor balance entre la densidad microalgal, tasa de crecimiento y contenido de lípidos.

V. CONCLUSIONES

- ❖ Las mayores densidades poblacionales de *T. suecica* al quinto día de cultivo ($p < 0,05$), fueron obtenidas en los tratamientos con 30 y 40 mL L⁻¹ de EALS con valores de $2,03 \times 10^6$ cél. mL⁻¹ y $2,07 \times 10^6$ cél. mL⁻¹ respectivamente.
- ❖ Las mayores tasas de crecimiento (μ) al quinto día de cultivo ($p < 0,05$) para *T. suecica*, se encontraron en los tratamientos con 30 y 40 mL L⁻¹ de EALS con $0,453$ día⁻¹ y $0,457$ día⁻¹, respectivamente; mientras que la menor μ ($p < 0,05$) de *T. suecica* se obtuvo con 20 mL L⁻¹ de EALS con $0,405$ día⁻¹.
- ❖ El menor tiempo de duplicación (TD) al quinto día de cultivo ($p < 0,05$) en *T. suecica*, fue obtenido en los tratamientos con 30 y 40 mL L⁻¹ de EALS con 1,532 día y 1,518 día, respectivamente; mientras que el mayor TD se obtuvo en el tratamiento con 20 mL L⁻¹ de EALS con 1,712 día.
- ❖ El mayor porcentaje de lípidos ($p < 0,05$) en *T. suecica* al quinto día de cultivo se encontró en el tratamiento con 20 mL L⁻¹ de EALS con 26,19 %; mientras que los menores promedios significativos ($p < 0,05$) se obtuvieron con 30 y 40 mL L⁻¹ de EALS con 24,98 % y 24,40 %, respectivamente.
- ❖ Los mayores contenidos de lípidos en biomasa ($p < 0,05$) en *T. suecica* al quinto día de cultivo, estuvieron en los tratamientos con 30 y 40 mL L⁻¹ de EALS con 125,7 mg L⁻¹ y 126,4 mg L⁻¹, respectivamente; mientras que el menor contenido ($p < 0,05$) fue obtenido con 20 mL L⁻¹ de EALS con 100,7 mg L⁻¹.

VI. RECOMENDACIONES

- ❖ Realizar un análisis de la composición química del EALS para evaluar los posibles efectos de los nutrientes N, P, K, Fe, etc., de este medio complejo en el crecimiento y contenido de lípidos de *Tetraselmis suecica*.
- ❖ Determinar el efecto de diferentes concentraciones de EALS y su tasa de suministro en el crecimiento poblacional y contenido de lípidos en cultivos masivos de *T. suecica*.
- ❖ Evaluar el uso de EALS como medio de cultivo a escala piloto de *T. suecica* con fines de producción de biomasa y lípidos algales.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arad, S. & A. Yaron. 1992. Natural pigments from red microalgae for use in foods and cosmetics. *Trends Food Science and Technology*. 3:92-97.
- Abalde, J.; A. Cid; P. Fidalgo; E. Torres & C. Herrero. 1995. Microalgas: Cultivos y Aplicaciones. Monografía N° 26. Coruña: Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias, Universidad de Coruña. La Coruña, España. 181p.
- Alsull, M. & W. Wan. 2012. Responses of *Tetraselmis* sp. and *Nannochloropsis* sp. isolated from Penang National Park coastal waters, Malaysia, to the combined influences of salinity, light and nitrogen limitation. International Conference on Chemical, Ecology and Environmental Sciences (ICEES'2012) 17-18 de marzo, 2012. Bangkok, Tailandia. 142-145pp.
- AOAC. 2007. Official methods of analysis, 18th edic. edn. 2005. Current through revision 2, 2007. AOAC International. Gaithersburg, MD.
- APHA. 2005. Métodos estándares para el análisis de agua potable y agua residuales. Standard Methods for the examination of wastewater. 21 edit. American Public Health Association (APHA) - American Water Works Association (AWWA) - Water Environment Federation (WEF). 1082p.
- Azma, M.; R. Rahim; R. Mohamad & A. Ariff. 2009. Heterotrophic cultivation of microalga *Tetraselmis suecica* in stirred tank bioreactor for biomass and biofuel production. International Advanced of Technology Congress, PTWC. 3-5 noviembre del 2009. Malaysia. Care 001.
- Beopoulos, A.; T. Chardot & J. Nicaud. 2009. *Yarrowia lipolytica*: a model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation. *Biochimie*. 91(6):692-696.

- Benedetti, A.; S. Canali & F. Lianello. 1998. La fertilizzazione organica dei suoli. En I Fertilizzanti Organici. Paolo Sequi (Ed.). Italia. Edizioni L'Informatore Agrario. 1-12pp.
- Bermejo, R., P. Álvarez, F. Acién & G. Molina. 2002. Recovery of pure N-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*. *J. Biotechnology*. 93:73-85.
- Bertoldo, F.; E. Sant'anna; M. Villela & J. Barcelos. 2006. Lípidos, composición de ácidos grasos y carotenos en *Chlorella vulgaris* cultivadas en solución hidropónica residual. *Grasas y Aceites*. 57(3):270-274.
- Bligh, E. & W. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 3:911-917.
- Bold, H. & M. Wynne. 1985. Introduction to the Algae. New Jersey: Prentice Hall Inc. Englewood Cliffs, N. J. USA. 720p.
- Borowitzka, M. & I. Borowitzka. 1989. Microalgal Biotechnology. Eds. Cambridge University Press. España.
- Chini-Zittelli, G.; L. Rodolfi; N. Biondi & N. Tredicci. 2006. Productivity and photosynthetic efficiency of outdoor cultures of *Tetraselmis suecica* in annular columns. *Aquaculture*. 261:932-943.
- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*. 25(3):294-306.
- Chiu, S.; C. Kao; M. Tsai; S. Ong; C. Chen & C. Lin. 2009. Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration. *Bioresource Technol.* 100(2):833-838.

- Cho, S.; S. Ji; S. Hur; J. Bae; I. Park & Y. Song. 2007. Optimum temperature and salinity conditions for growth of green algae *Chlorella ellipsoidea* and *Nannochloris oculata*. *Fish. Sci.* 73:1050-1056.
- Cohen, Z. 1999. Chemicals from Microalgae. Taylor and Francis Inc. Cohen Zvi Ed. London. 450p.
- CTM. 2011. Plan de recuperación ambiental de la bahía “El Ferrol” (Chimbote, Perú). Comisión Técnica Multisectorial para la Recuperación Ambiental de la Bahía El Ferrol (CTM). D.S. N° 005-2002-PE.
- De Philippis, R. & M. Vincenzini. 1998. Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. *F.E.M.S. Microbiol. Rev.* 22:151-175.
- Donohue, T. & R. Cogdell. 2006. Microorganisms and clean energy. *Nat. Rev. Microbiol.* 4(11):800.
- Fábregas, J.; C. Herrero & C. Abalde. 1985. Growth, chlorophyll a and protein of the marine microalga *Isochrysis galbana* in batch cultures with different salinities and high nutrient concentrations. *Aquaculture.* 50:1-11.
- Fábregas, J.; A. Otero; A. Domínguez & M. Patiño. 2001. Growth rate of the microalga *Tetraselmis suecica* changes the biochemical composition of *Artemia* species. *J. Mar Biotechnol.* 3:256-263.
- Fernández, M. & C. Paredes. 2007. Efecto del extracto de ensilado de pescado y urea en el crecimiento poblacional y contenido de carbohidratos y lípidos de la microalga *Tetraselmis suecica* cultivada en condiciones de laboratorio. Tesis para optar el Título de Biólogo Acuicultor. Universidad Nacional del Santa. Nuevo Chimbote, Perú. 62p.

- Fernández-Reiriz, M. 1989. Biomass production and variation in the biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. *Aquaculture*. 83:17-37.
- Flynn, K. & I. Butler. 1986. Nitrogen sources for the growth of marine microalgae: role of dissolved free amino acids. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 34:281-304.
- Garibay, A.; R, Vázquez-Duhalt; M. Sánchez; L. Serrano & A. Martínez. 2009. Biodiesel a partir de microalgas. *BioTecnología*. 13(3):38-61.
- Go, S.; S.J. Lee; G.T. Jeong & S.K. Kim. 2012. Factors affecting the growth and the oil accumulation of marine microalgae, *Tetraselmis suecica*. *Bioprocess. Biosyst. Eng.* 35(1-2):145-150.
- González, M. 2006. Aplicación e importancia de las microalgas en el tratamiento de aguas residuales. *Contactos*. 59:64-70.
- González-Rodríguez, E. & S. Maestrini. 1984. The use of some agricultural fertilizers for the mass production of marine microalgae. *Aquaculture*. 36:245-256.
- Griffiths, M.; R. Van Hille & S. Harrison. 2012. Lipid productivity, settling potential and fatty acid profile of 11 microalgal species grown under nitrogen replete and limited conditions. *J. Appl. Phycol.* 24:989-1001.
- Guillard, R. 1975. Culture of Phytoplankton for feeding marine invertebrates. *In*: W.L. Smith and M. H. Chanley, eds., Culture of marine invertebrate animals. Plenum Book Publ. Corp., New York, U.S.A. 29-60pp.
- Hong, Y.; H. Hu & F. Li. 2008. Physiological and biochemical effects of allelochemical ethyl 2-methyl acetoacetate (EMA) on cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 71:527-534.

- Huang, X.; H. Zhou; C. Yuan & M. Sun. 2003. The effects of nitrogen source and concentration on the nutritional value of *Nannochloropsis oculata*. *J. Shanghai Fish Univ.* 12:113-116.
- Huang X.; Z. Huang; W. Wen & J. Yan. 2012. Effects of nitrogen supplementation of the culture medium on the growth, total lipid content and fatty acid profiles of three microalgae (*Tetraselmis subcordiformis*, *Nannochloropsis oculata* and *Pavlova viridis*). *J. Appl. Phycol.* DOI 10.1007/s10811-012-9846-9.
- Ipanaqué, J. & I. Paredes. 2009. Efecto del ensilado de los desechos blandos de *Argopecten purpuratus* "concha de abanico", en el crecimiento poblacional y contenido de lípidos totales de *Tetraselmis suecica*, en condiciones de laboratorio. Tesis para optar el Título de Biólogo Acuicultor. Universidad Nacional del Santa. Nuevo Chimbote, Perú. 65p.
- Jiang, X.M. 2002. Effects of temperatures, light intensity and nitrogen concentrations on the growth and fatty acid composition of *Nannochloropsis oculata*. *Mar. Science.* 26:9-12.
- Khatoon, H.; N. Rahman; S. Banerjee; N. Harun; S. Suleiman; N. Zakaria; F. Lananan; S. Abdul & A. Endut. 2014. Effects of different salinities and pH on the growth and proximate composition of *Nannochloropsis* sp. and *Tetraselmis* sp. isolated from South China Sea cultured under control and natural condition. *International Biodeterioration & Biodegradation.* 95:11-18.
- Knud-Hansen, C. 1998. Pond fertilization: ecological approach and practical applications. Pond dyn MICS/Aquaculture collaborative research support program. Oregon State University, Corvallis, Or. 125p.

- Laing, I. & M. Helm. 1981. Factors affecting the semi-continuous production of *Tetraselmis suecica* (Kyllin) Butch. in 200-l vessels. *Aquaculture*. 22:137-148.
- Marsh, J. & D. Weinstein. 1966. Simple charring method for determination of lipids. *J. Lipid Res.* 7:574-576.
- MVCS. 2013. Protocolo de Monitoreo de la calidad de los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales domésticas o municipales. Ministerio de Vivienda, Construcción y Saneamiento (MVCS), Oficina de Medio Ambiente, RM N° 273-2013-Vivienda. Lima, Perú. 31p.
- Meng, X.; X. Yang; X. Xu; L. Zhang; Q. Nie & M. Xian. 2009. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy*. 34(1):1-5.
- Merino, F.; W. Capa & G. Alayo. 2003. Efecto combinado de la fuente nitrogenada y la concentración de silicato en el crecimiento y contenido de lípidos y carbohidratos de *Chaetoceros gracilis* en laboratorio. Informe de investigación. Universidad Nacional del Santa. Chimbote - Perú. 32p.
- Michels, M.; M. Vaskoska; M. Vermüe & R. Wiffels. 2014. Growth of *Tetraselmis suecica* in a tubular photobioreactor on wastewater from a fish farm. *Water Research*. 65:290-296.
- Millán-Núñez, R.; E. Valenzuela-Espinoza; C. Trees; E. Santamaría Del Ángel & F. Núñez. 2010. Efecto de la intensidad de luz en la razón de pigmentos de *Tetraselmis suecica*. *Revista Acuicultura*. 2p. <<http://promepsol.sep.gob.mx/archivospdfs/produccion/Producto773306.PDF>>. Accesado: 18/05/2015.
- Mohamed, M.; J. Shun; S. Kadkhodaei; R. Mohamad; M. Mokhtar & A. Ariff. 2014. Kinetics and modeling of microalga *Tetraselmis* sp. *FTC* 209

growth with respect to its adaptation toward different trophic conditions. *Biochemical Engineering Journal*. 88:30-41.

- Montoya, C. & A. Acosta. 2011. Producción de biomasa microalgal de *Tetraselmis* sp. en fotobiorreactor tipo columna de burbujeo. V Simposio Internacional de Biofábricas y I Congreso Internacional de Flujos Reactivos. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de minas. 157-158pp.
- Mora, R.; J. Ortega & R. Moronta. 2004. Crecimiento y producción de pigmentos de la microalga nativa *Chlorella* sp. aislada de la represa de Tulé, Municipio Mara Estado Zulia, Venezuela. *Ciencia*. 12(2):117-124.
- Morineau, T.; P. Legentilhomme; P. Jaouen; B. Lepine & Y. Rince. 2001. Influence a swirl motion on the interaction between microalgal cells and environmental medium during ultrafiltration of a culture of *Tetraselmis suecica*. *Biotechnology Letters*. 23:1539-1545.
- Olguin, E.; S. Galicia; O. Angulo-Guerrero & E. Hernandez. 2001. The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina* sp. (*Arthrospira*) grown on digested pig waste. *Bioresource Technology*. 77:19-24.
- Oswald, W. 1988. *Micro-algae and waste-water treatment*. En: Borowitzka M.A., L.J. Borowitzka, (eds.). *Micro-Algal Biotechnology*. New York, Cambridge University Press. 305-328pp.
- Paniagua, J.; F. Buckle; C. Granados & D. Loya. Daniel. 1989. Manual de metodologías y alternativas para el cultivo de microalgas. Informe OC-89-01, CICESE. Ensenada Nuevo México, México. 67p.
- Pérez-García, O.; F. Escalante; L. de-Bashan & Y. Bashan. 2011. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water Res*. 45(1):11-36.

- Richmond, A. & E.W. Becker. 1986. *Technological aspects of mass cultivation - A general outline*. In: Richmond A (ed.), CRC Handbook of microalgal mass culture. CRC Press Inc., Boca Raton. 245-264pp.
- Ritter, S.; R. Hiller; P. Wrench; W. Welte & K. Diederichs. 1999. Crystal structure of a phycourobilin-containing phycoerythrin at 1.90-Å resolution. *J. Struct. Biol.* 126:86-97.
- Rodolfi, L.; Z. Chini; N. Bassi; G. Padovani; N. Biondi; G. Bonini & M. Tredici. 2009. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low cost photobioreactor. *Biotechnol Bioeng.* 102(1):100-112.
- Roleda, M.; S. Slocombe; R. Leakey; J. Day; E. Bell & M. Stanley. 2013. Effects of temperature and nutrient regimes on biomass and lipid production by six oleaginous microalgae in batch culture employing a two-phase cultivation strategy. *Bioresource Technology.* 129:439-449.
- RPI-OEFA. 2013. Reporte Público del Informe N° 00120-2013-OEFA/DS-PES. Supervisión Ambiental Especial en Concesión Acuícola en la bahía de Samanco. Reporte Público del Informe del Organismo de Evaluación y Fiscalización Ambiental (RPI-OEFA). Lima, Perú. 6p.
- Rosales, N.; J. Bermúdez; R. Moronta & E. Morales. 2007. Gallinaza: Un residual avícola como fuente alternativa de nutrientes para producción de biomasa microalgal. *Rev. Colomb. Biotechnol.* 9(1):41-48.
- Rosenberg, J.; G. Oyler; L. Wilkinson & M. Betenbaugh. 2008. A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19:430-436.

- Satyanarayana, K.G.; A.B. Mariano & J.V. Vargas. 2011. A review on microalgae, a versatile source for sustainable energy and materials. *Int. J. Energy Res.* 35:291-311.
- Schenk, P.M.; S.R. Thomas-Hall; E. Stephens; U.C. Marx; J.H. Mussgnug; C. Posten; O. Kruse & B. Hankamer. 2008. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenerg. Res.* 1:20-43.
- Sheehan, J.; T. Dunahay; J. Benemann & P. Roessler. 1998. A look back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from algae. Close-Out report. National Renewable Energy Lab., Department of Energy, Golden. Colorado, U.S.A. Report number NREL/TP-580-24190.
- Sijbesma, W.; J. Almeida; M. Reis & H. Santos. 1996. Uncoupling effect of nitrite during denitrification by *Pseudomonas fluorescens*: an in vivo. 31P-NMR study. *Biotechnol. Bioeng.* 52(1):176-182.
- Silva, J.; V. Vásquez & F. Merino. 2011. Producción de biomasa de *Tetraselmis suecica* empleando agua de mar con sanguaza. *Scientia Agropecuaria.* 2(2011):13-23.
- Spolaore, P.; C. Joannis-Cassan; E. Duran & A. Isambert. 2006. Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* 101(2):87-96.
- Sukenik, A.; O. Zamora & Y. Carmeli. 1993. Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. II. *Nannochloropsis* sp. *Aquaculture.* 117:313-326.
- Steel, R. & J. Torrie. 1988. Bioestadística: Principios y procedimientos. 2da. edic. Edit. McGraw-Hill. Traducción por Ricardo Martínez. México. 622p.

- Thain, J. 1992. Growth of the algae *Isochrysis galbana* and *Tetraselmis suecica* in water and sediment elutriate samples from the German Bight. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 91:229-231.
- Tylova-Munzarova, E.; B. Lorenzen; H. Brix & O. Votrubova. 2005. The effects of NH_4^+ and NO_3 on growth, resource allocation and nitrogen uptake kinetics of *Phragmites australis* and *Glyceria maxima*. *Aquat. Bot.* 81(4):326-342.
- Ulloa, R. 2011. Inducción de productos bioactivos de la microalga marina *Tetraselmis suecica*. Tesis para optar al grado de Doctora, Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela, España. 220p.
- Vásquez, I.; J. Tenorio; M. Crispín; F. Velazco & J. Solís. 2000. Caracterización física, química y biológica en la bahía de Samanco, Chimbote, 19-22 de julio del 2000. Informe Progresivo N° 131, Instituto del Mar del Perú. Callao, Perú. 1-16pp.
- Venkatamaran, L. 1986. Blue-Green algae as biofertilizer. *In: Handbook of Microalgal Mass Culture*. Ed. A. Richmond. C.R.C. Press Inc. Boca Raton, Florida. U.S.A. 455-472pp.
- Ventosa, A. & J. Nieto. 1995. Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganism. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 11:85-94.
- Wang, B. & C. Lan. 2011. Biomass production and nitrogen and phosphorus removal by the green alga *Neochloris oleoabundans* in simulated wastewater and secondary municipal wastewater effluent. *Bioresour. Technol.* 102(10):5639-5644.
- Weiss, V.; Z. Gromet-Elhanan & M. Halmann. 1985. Batch and continuous culture experiments on nutrient limitations and temperature effects in the marine alga *Tetraselmis suecica*. *Water Res.* 19(2):185-190.

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Temperatura (°C) en las unidades experimentales de los cultivos de *T. suecica* dosificados con EALS y grupo control (Guillard f/2).

DÍA DE CULTIVO	EALS (mL L ⁻¹)											
	CONTROL (Guillard f/2)			20			30			40		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
0	24,3	24,7	24,6	24,1	23,9	24,4	24,5	24,2	24,3	24,4	24,3	24,0
1	23,9	23,4	23,7	23,6	23,8	23,9	23,5	23,8	23,3	23,9	23,5	23,3
2	23,4	23,9	23,8	24,0	23,9	24,3	23,7	24,1	24,2	24,2	24,0	24,1
3	24,1	24,9	24,4	25,2	24,4	24,7	24,4	24,8	24,4	24,9	24,5	25,0
4	24,2	23,6	24,1	24,0	24,1	24,4	24,1	24,5	24,6	24,2	24,6	24,4
5	24,5	24,3	24,6	24,2	24,6	24,9	24,6	25,1	24,7	24,7	24,8	24,3
6	24,5	24,9	24,4	24,6	24,4	24,1	24,3	24,4	24,5	24,8	23,8	23,7
7	24,3	24,1	24,7	24,7	25,0	24,6	24,9	24,6	25,1	24,2	24,6	24,8

Anexo 2. Temperatura promedio (°C) en los cultivos de *T. suecica* dosificados con EALS y grupo control (Guillard f/2).

DÍA DE CULTIVO	EALS (mL L ⁻¹)			
	CONTROL (Guillard f/2)	20	30	40
0	24,5 ±0,2a	24,1 ±0,3a	24,3 ±0,2a	24,2 ±0,2a
1	23,7 ±0,3a	23,8 ±0,2a	23,5 ±0,3a	23,6 ±0,3a
2	23,7 ±0,3a	24,1 ±0,2a	24,0 ±0,3a	24,1 ±0,1a
3	24,5 ±0,4a	24,8 ±0,4a	24,5 ±0,2a	24,8 ±0,3a
4	24,0 ±0,3a	24,2 ±0,2a	24,4 ±0,3a	24,4 ±0,2a
5	24,5 ±0,2a	24,6 ±0,4a	24,8 ±0,3a	24,6 ±0,3a
6	24,6 ±0,3a	24,4 ±0,3a	24,4 ±0,1a	24,1 ±0,6a
7	24,4 ±0,3a	24,8 ±0,2a	24,9 ±0,3a	24,5 ±0,3a

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

Anexo 3. pH (unid.) en las unidades experimentales de los cultivos de *T. suecica* dosificados con EALS y grupo control (Guillard f/2).

DÍA DE CULTIVO	EALS (mL L ⁻¹)											
	CONTROL (Guillard f/2)			20			30			40		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
0	7,87	7,79	7,75	7,81	7,87	7,88	7,86	7,85	7,87	7,80	7,85	7,91
1	8,11	7,64	7,97	7,88	7,77	8,18	7,85	7,96	7,99	8,10	7,82	8,11
2	7,97	7,83	8,12	8,00	7,93	8,16	8,14	8,00	7,89	8,00	8,24	8,14
3	7,99	8,13	8,28	8,20	8,16	8,00	8,22	8,35	8,11	8,29	8,35	7,93
4	8,13	8,25	8,55	8,23	8,38	8,46	8,27	8,35	8,37	8,46	8,50	8,59
5	8,13	8,43	8,66	8,25	8,32	8,30	8,66	8,32	8,74	8,63	8,59	8,44
6	8,54	8,63	8,68	8,28	8,53	8,22	8,65	8,39	8,63	8,78	8,83	8,62
7	8,46	8,52	8,52	8,47	8,36	8,41	8,56	8,38	8,59	8,72	8,89	8,48

Anexo 4. Valores de pH promedio (unid.) en los cultivos de *T. suecica* dosificados con EALS y grupo control (Guillard f/2).

DÍA DE CULTIVO	EALS (mL L ⁻¹)			
	CONTROL (Guillard f/2)	20	30	40
0	7,80 ±0,06a	7,85 ±0,04a	7,86 ±0,01a	7,85 ±0,06a
1	7,91 ±0,24a	7,94 ±0,21a	7,93 ±0,07a	8,01 ±0,16a
2	7,97 ±0,15a	8,03 ±0,12a	8,01 ±0,13a	8,13 ±0,12a
3	8,13 ±0,15a	8,12 ±0,11a	8,23 ±0,12a	8,19 ±0,23a
4	8,31 ±0,22a	8,36 ±0,12a	8,33 ±0,05a	8,52 ±0,07a
5	8,41 ±0,27a	8,29 ±0,04a	8,57 ±0,22a	8,55 ±0,10a
6	8,62 ±0,07ab	8,34 ±0,16b	8,56 ±0,14ab	8,74 ±0,11a
7	8,50 ±0,03a	8,41 ±0,06a	8,51 ±0,11a	8,70 ±0,21a

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

Anexo 5. Densidad poblacional ($\times 10^6$ cél. mL⁻¹) de *T. suecica* dosificadas con EALS y grupo control (Guillard f/2).

DÍA DE CULTIVO	EALS (mL L ⁻¹)											
	CONTROL (Guillard f/2)			20			30			40		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
0	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21
1	0,37	0,26	0,34	0,29	0,38	0,46	0,38	0,35	0,28	0,26	0,31	0,37
2	0,94	0,87	0,84	0,72	0,83	0,68	0,72	0,64	0,76	0,62	0,79	0,81
3	1,26	1,24	1,30	1,31	1,14	1,32	1,18	1,06	1,24	1,09	1,13	1,39
4	1,67	1,62	1,56	1,51	1,38	1,50	1,64	1,55	1,74	1,63	1,87	1,76
5	1,86	2,03	1,98	1,61	1,54	1,63	1,83	2,09	2,16	2,01	2,24	1,95
6	1,99	2,30	2,14	1,80	1,63	1,91	2,05	2,17	2,45	2,30	2,40	2,16
7	2,02	2,38	2,16	1,79	1,63	1,89	2,16	2,20	2,43	2,32	2,49	2,18

Anexo 6. Valores de la Tasa de crecimiento (μ) y Tiempo de duplicación poblacional diaria (TD) de *T. suecica* en las unidades experimentales dosificadas con EALS y grupo control (Guillard f/2).

PARÁMETROS	EALS (mL L ⁻¹)											
	CONTROL (Guillard f/2)			20			30			40		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
N₀	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21
N_f	1,86	2,03	1,98	1,61	1,54	1,63	1,83	2,09	2,16	2,01	2,24	1,95
Día	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
μ (día⁻¹)	0,436	0,454	0,449	0,407	0,398	0,410	0,433	0,460	0,466	0,452	0,473	0,446
TD (día)	1,590	1,527	1,544	1,703	1,742	1,691	1,601	1,507	1,487	1,534	1,465	1,554

Anexo 7. Valores de la biomasa, absorbancia, y porcentaje y biomasa de lípidos de *T. suecica* cultivadas con EALS y grupo control (Guillard f/2).

PARÁMETROS	EALS (mL L ⁻¹)											
	CONTROL (Guillard f/2)			20			30			40		
Biomasa (mg x2mL ⁻¹)	0,90	0,98	0,96	0,78	0,74	0,79	0,91	1,04	1,07	1,01	1,12	0,98
Biomasa (mg L ⁻¹)	450,40	491,60	479,40	388,40	371,40	393,20	454,40	519,00	536,40	503,60	561,20	488,60
Absorbancia	0,191	0,221	0,214	0,219	0,209	0,228	0,246	0,280	0,292	0,270	0,299	0,254
Lípidos (%)	19,58	20,80	20,56	25,90	26,05	26,62	24,94	24,84	25,17	24,66	24,63	23,91
Lípidos (mg L ⁻¹)	88,2	102,3	98,6	100,6	96,7	104,7	113,3	128,9	135,0	124,2	138,2	116,8

Anexo 8. Curva de Calibración para la determinación de lípidos en *T. suecica* dosificadas con EALS y grupo control (Guillard f/2).

Nº	Concentración	Oliva	Colesterol
1	0,000	0,000	0,000
2	0,050	0,176	0,192
3	0,100	0,438	0,507
4	0,200	0,842	0,870

