

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOLOGÍA EN ACUICULTURA



“Efecto de la concentración del extracto acuoso de *Salicornia fruticosa* en el crecimiento poblacional y contenido de lípidos totales de la microalga *Tetraselmis suecica* cultivada en condiciones de laboratorio”

Tesis para obtener el Título de Biólogo Acuicultor

AUTORES:

Bach. ALEXIS RICARDO ESCOBAR GIL

Bach. JORGE LUIS CANO MANRIQUE

ASESOR:

Dr. JUAN FERNANDO MERINO MOYA

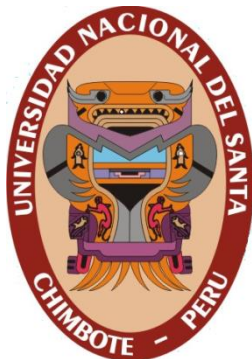
NUEVO CHIMBOTE – PERÚ

2015

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOLOGÍA EN ACUICULTURA



“Efecto de la concentración del extracto acuoso de *Salicornia fruticosa* en el crecimiento poblacional y contenido de lípidos totales de la microalga *Tetraselmis suecica* cultivada en condiciones de laboratorio”

Tesis para Obtener el Título de Biólogo Acuicultor

AUTORES:

Bach. ALEXIS RICARDO ESCOBAR GIL

Bach. JORGE LUIS CANO MANRIQUE

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 la concentración del extracto acuoso de *Salicornia fruticosa* en el crecimiento poblacional y contenido de lípidos totales de la microalga *Tetraselmis suecica* cultivada en condiciones de laboratorio”

Tesis para obtener el Título de Biólogo Acuicultor

AUTORES:

Bach. ALEXIS RICARDO ESCOBAR GIL

Bach. JORGE LUIS CANO MANRIQUE

APROBADO POR EL JURADO CALIFICADOR INTEGRADO POR LOS SEÑORES MIEMBROS

.....
M.Sc. ROMULO LOAYZA AGUILAR

.....
Blgo. Acui. CARMEN YZASIGA BARRERA

.....
Dr. JUAN FERNANDO MERINO MOYA

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS	iv
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTOS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
Objetivo General	5
Objetivos Específicos	5
Hipótesis	5
II. MATERIALES Y MÉTODOS	6
2.1. Localización del experimento	6
2.2. Material experimental	6
2.2.1. Material biológico	6
2.2.2. Tratamiento del agua de cultivo	6
2.2.3. Preparación del inóculo microalgal	7
2.3. Preparación de los medios de cultivo	7
2.3.1. Medio Guillard f/2	7
2.3.2. Preparación del medio de cultivo con extracto acuoso de <i>S. fruticosa</i> (ESALI)	8
2.4. Acondicionamiento de las unidades experimentales	10
2.5. Determinación del crecimiento poblacional	12
2.6. Determinación de la biomasa	13
2.7. Determinación de los lípidos totales	13
2.8. Análisis estadístico de los datos	16
III. RESULTADOS	17
3.1. Parámetros ambientales del cultivo de <i>T. suecica</i>	17
3.1.1. Temperatura	17
3.1.2. pH	18
3.2. Crecimiento poblacional	19
3.2.1. Curvas de crecimiento	19

3.2.2. Tasa de crecimiento y tiempo de duplicación	22
3.3. Concentración de lípidos en <i>T. suecica</i>	24
IV. DISCUSIÓN.....	27
V. CONCLUSIONES	34
VI. RECOMENDACIONES.....	35
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
VIII. ANEXOS.....	43

DEDICADO A:

A Dios; por habernos permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr nuestros objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A nuestros padres por ser el pilar fundamental en todo lo que somos, en toda nuestra educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo.

Alexis y Jorge

AGRADECIMIENTOS

A nuestro asesor Dr. Juan Fernando Merino Moya, por el acompañamiento y dedicación en la elaboración del presente trabajo, por su gran apoyo y motivación para la culminación de nuestros estudios profesionales y para la elaboración de esta tesis y por su tiempo compartido, por impulsar el desarrollo de nuestra formación profesional, a nuestros jurados por apoyarnos en todo momento.

A nuestros amigos; que nos apoyaron mutuamente en nuestra formación profesional y que hasta ahora, seguimos siendo amigos-

Finalmente a los docentes de la Escuela Académico Profesional de Biología en Acuicultura, aquellos que marcaron cada etapa de nuestro camino universitario, y que nos ayudaron en asesorías y dudas presentadas en la elaboración de la tesis y a lo largo de nuestra carrera universitaria.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición química del medio de cultivo Guillard f/2.....	8
Tabla 2. Tratamientos utilizados en los cultivos de <i>T. suecica</i> con ESALI	10
Tabla 3. Valores de la composición química del ESALI y <i>S. fruticosa</i> , utilizados en el cultivo experimental con <i>T. suecica</i>	11
Tabla 4. Densidad Poblacional ($\times 10^6$ cél. mL ⁻¹) de <i>T. suecica</i> en los tratamientos cultivados con medio ESALI y Guillard f/2 (control).....	20
Tabla 5. Tasa de crecimiento (μ) y Tiempo de duplicación diaria (TD) poblacional de <i>T. suecica</i> en los tratamientos cultivados con medio ESALI y Guillard f/2 (control).....	23
Tabla 6. Concentración de lípidos en porcentaje (%) y biomasa (mg L ⁻¹) en el quinto día de cultivo de <i>T. suecica</i> en los tratamientos dosificados con medio ESALI y Guillard f/2 (control).....	24
Tabla 7. Temperatura (°C) en los cultivos de <i>T. suecica</i> de los tratamientos con medio de cultivo ESALI y Guillard f/2 (control).....	46
Tabla 8. Temperatura promedio (°C) en los cultivos de <i>T. suecica</i> de los tratamientos con medio de cultivo ESALI y Guillard f/2 (control).....	46
Tabla 9. Valores de pH en los cultivos de <i>T. suecica</i> de los tratamientos con medio de cultivo ESALI y Guillard f/2 (control).....	47
Tabla 10. Valores de pH promedio en los cultivos de <i>T. suecica</i> de los tratamientos con medio de cultivo ESALI y Guillard f/2 (control).....	47
Tabla 11. Densidad poblacional ($\times 10^6$ cél. mL ⁻¹) de <i>T. suecica</i> de los tratamientos cultivados con medio de cultivo ESALI y Guillard f/2 (control).....	48
Tabla 12. Valores de la Tasa de crecimiento (μ) y Tiempo de duplicación diaria (TD) poblacional de <i>T. suecica</i> de los tratamientos cultivados con medio de cultivo ESALI y Guillard f/2 (control).....	49
Tabla 13. Valores de la Biomasa, Absorbancia, Porcentaje de lípidos y Biomasa de lípidos de <i>T. suecica</i> de los tratamientos cultivados con medio de cultivo ESALI y Guillard f/2 (control).....	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Esquema para el tratamiento del agua de mar natural	7
Fig. 2. Flujo de la preparación del medio ESALI para el cultivo de <i>T.suecica</i> . ..	9
Fig. 3. Cultivos microalgales de los diferentes tratamientos de <i>T. suecica</i>	11
Fig. 4. Flujograma para determinar los lípidos totales de <i>T. suecica</i>	14
Fig. 5. Variación de la temperatura promedio (°C) en los cultivos de <i>T. suecica</i> de los tratamientos con medio ESALI y Guillard f/2 (control).	17
Fig. 6. Variación del pH promedio en los cultivos de <i>T. suecica</i> de los tratamientos con medio ESALI y Guillard f/2 (control).....	18
Fig. 7. Variación de la densidad poblacional ($\times 10^6$ cél. mL ⁻¹) en los cultivos de <i>T. suecica</i> con medio ESALI y Guillard f/2 (control).	20
Fig. 8. Variación de la Tasa de crecimiento (μ ; día ⁻¹) y Tiempo de duplicación diaria (TD; día) poblacional de <i>T. suecica</i> en los tratamientos cultivados con medio ESALI y Guillard f/2 (control).	23
Fig. 9. Concentración de lípidos en porcentaje de <i>T. suecica</i> en los tratamientos dosificados con medio de cultivo ESALI y Guillard f/2 (control)....	25
Fig. 10. Concentración de lípidos en mg L ⁻¹ de <i>T. suecica</i> en los tratamientos dosificados con medio de cultivo ESALI y Guillard f/2 (control).	26

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivos, determinar el crecimiento poblacional (cél mL⁻¹) y la concentración de lípidos totales (mg L⁻¹) de la microalga *Tetraselmis suecica* dosificados con tres concentraciones (5, 10 y 15 mL L⁻¹) de extracto acuoso de *Salicornia fruticosa* (ESALI) y una unidad control suministrado con medio Guillard f2, con tres repeticiones cada una. El cultivo de las microalgas se realizó en botellas plásticas de 1.5 L durante 7 días consecutivos, con aireación e iluminación constante. La mayor densidad poblacional de *T. suecica* al quinto de cultivo se presentó en el tratamiento dosificado con 10 mL L⁻¹ de ESALI, con 6,05 x10⁶ cél. mL⁻¹ y la menor en el tratamiento con 15 mL L⁻¹ de ESALI con 2,26 x10⁶ cél. mL⁻¹. La mayor tasa de crecimiento (μ) para *T. suecica* al quinto de cultivo se presentó en el tratamiento dosificado con 10 mL L⁻¹ de ESALI con 0,753 día⁻¹, y el menor valor se presentó en el tratamiento dosificado con 15 mL L⁻¹ de ESALI con 0,556 día⁻¹; el mayor tiempo de duplicación (TD) se obtuvo con 15 mL L⁻¹ de ESALI con 1,247 día, y el menor se presentó en el tratamiento con 10 mL L⁻¹ de ESALI con 0,920 día. Los lípidos fueron encontrados en mayor porcentaje en *T. suecica* al quinto día de cultivo en los tratamientos dosificados con 10 y 15 mL L⁻¹ de ESALI con 23,77 y 23,97 %, respectivamente, y fue menor con 5 mL L⁻¹ de ESALI con el 22,27 %; mientras que el mayor valor de lípidos en peso, se obtuvo en el tratamiento dosificado con 10 mL L⁻¹ de ESALI con 180,0 mg L⁻¹, y el menor se encontró con 5 mL L⁻¹ de ESALI con 147,0 mg L⁻¹, habiéndose encontrado diferencias significativas entre los tratamientos en relación al tratamiento control. Se concluye que el tratamiento dosificado con 10 mL L⁻¹ de ESALI fue el mejor para producir biomasa y lípidos en *T. suecica*.

Palabras Clave: *Tetraselmis suecica*, *Salicornia fruticosa*, microalga, lípidos.

ABSTRACT

This study aimed to determine the population growth (cel. mL⁻¹) and concentration of total lipids from microalgae *Tetraselmis suecica* dosed with three concentrations of 5; 10 and 15 mL L⁻¹ of aqueous extract of *Salicornia fruticosa* (ESALI). The highest population density of *T. suecica* the fifth cultivation occurred in the dosed treatment with 10 mL L⁻¹ of ESALI with 6,05 x10⁶ cel. mL⁻¹; the lowest was found in the treatment with 15 mL L⁻¹ of ESALI to 2,26 x10⁶ cel. mL⁻¹. The highest growth rate (μ) for *T. suecica* the fifth culture was presented in the treatment dosed with 10 mL L⁻¹ of ESALI with 0,753 day⁻¹, and the lowest value was recorded in the treatment dosed with 15 mL L⁻¹ of ESALI with 0,556 day⁻¹; the highest doubling time (TD) was obtained with 15 mL L⁻¹ of ESALI with 1,247 day, and the lowest occurred in the treatment with 10 mL L⁻¹ of ESALI with 0,920 day. The lipids were found in highest percentage *T. suecica* in the fifth day of culture in treatments dosed with 10 and 15 mL L⁻¹ of ESALI with 23,77 and 23,97 %, respectively, and was lower with 5 mL L⁻¹ of ESALI with 22,27 %; while the highest value of lipid weight was obtained in the treatment dosed with 10 mL L⁻¹ of ESALI with 180,0 mg L⁻¹, and the lowest was found with 5 mL L⁻¹ of ESALI with 147,0 mg L⁻¹. We conclude that treatment dosed with 10 mL L⁻¹ of ESALI was the most optimal to produce biomass and lipids in *T. suecica*.

Key Words: *Tetraselmis suecica*, *Salicornia fruticosa*, microalgae, lipids.

I. INTRODUCCIÓN

Las microalgas han merecido considerable atención por su potencialidad en la alimentación, investigaciones genéticas, morfológicas, fisiológicas, nutricionales y bioquímicas (Blanco, 1991; Alveal *et al.*, 1995; Bertoldo *et al.*, 2006), así como su utilidad como fuente de biocombustible, por la posibilidad de suplir de manera parcial la escasez de suministro de petróleo, y se presentan como una alternativa a los precios elevados de las materias primas tradicionales, para la obtención de los biocombustibles como son la soja, caña de azúcar, maíz, palma aceitera, colza, grasas animales, residuos de grasas, entre los más representativos (Vieira, 2004; Garibay *et al.*, 2009).

La tecnología aplicada a las microalgas respecto a la obtención de lípidos es prometedora dadas las ventajas que ofrece en contraste con las plantas oleaginosas, tales como: mayor eficiencia fotosintética; eficacia superior en la asimilación de nutrientes y periodos cortos de producción sostenida durante todo el año, debido a los breves tiempos de duplicación y así mismo en el contenido oleaginoso y el perfil de composición lipídica de las microalgas, puede ser controlado en función de las condiciones de cultivo, principalmente mediante la limitación de nutrientes (Garibay *et al.*, 2009). La ventaja competitiva más importante del biodiesel de microalgas, consiste en los rendimientos lipídicos por unidad de área, considerablemente superior a los obtenidos con plantas oleaginosas (Arredondo & Vázquez, 1991).

Dependiendo de las especies, las microalgas producen diferentes tipos de lípidos, hidrocarburos y otros aceites complejos (Álvarez & Zarco, 1989; Guschina & Harwood, 2006), de los cuales no todos son adecuados para producir biodiesel.

En las microalgas, la producción de lípidos al igual que su composición, dependen principalmente de la especie y su constitución genética, pero estos son influenciados por diversas condiciones físicas y químicas de cultivo, como la fase de crecimiento, la disponibilidad y la clase de nutrientes, la salinidad, los periodos e intensidad de luz, la temperatura, el pH, e incluso, la asociación con

otros microorganismos (Garibay *et al.*, 2009). Los lípidos comprendidos en las microalgas por lo general constituyen del 20 al 50% de su peso seco, sin embargo se han reportado valores en un rango del 1 al 80%, o incluso superiores (Arredondo & Vázquez, 1991; Chisti, 2007).

Los lípidos se encuentran presentes en las células microalgales, y su composición puede ser regulada mediante la adición o restricción de algunos componentes como el nitrógeno en el medio de cultivo (Alsull & Wan, 2012). Entre las microalgas de potencial importancia para la producción de biocombustibles, se encuentra la *Tetraselmis suecica*, la cual posee en promedio de peso seco 52 % de proteína y de 15 a 23% de lípidos, y se caracteriza por ser una alga unicelular y móvil con 4 flagelos, de 7 a 9 µm de diámetro y 10 a 16 µm de largo (Díaz *et al.*, 2006).

Las microalgas con elevadas productividades lipídicas son deseables para la elaboración de biodiesel como lo es *T. suecica*, razón por la cual la cantidad de lípidos contenidos en la biomasa y la velocidad de crecimiento, son parámetros relevantes para su selección (Chisti, 2007; Rosenberg *et al.*, 2008). *T. suecica* en cultivos autotróficos puede utilizar diferentes fuentes nitrogenadas tradicionales como urea, fosfato diamónico, etc.; sin embargo, en cultivos heterotróficos puede metabolizar diversos aminoácidos y vitaminas produciendo cambios importantes en su crecimiento y composición bioquímica convirtiendo a esta microalgas como una de las favoritas para realizar este tipo de investigación (Merino *et al.*, 2008).

T. suecica es una microalga eurihalina muy utilizada en la alimentación de microcrustáceos de interés económico debido a que es capaz de sintetizar en su interior ácidos grasos disueltos en el agua, transformar sales inorgánicas en compuestos orgánicos por medio de la fotosíntesis, aspectos que las convierten en imprescindibles como alimento vivo (Borowitzka & Borowitzka, 1989).

Uno de los factores importantes para la producción de las microalgas son los medios de cultivo, los cuales pueden clasificarse en definidos y los naturales.

Los primeros son aquellos que se les conoce la naturaleza y la concentración de cada uno de sus componentes y son usados a escalas de laboratorio, y por lo tanto, permiten determinar requerimientos específicos para el crecimiento microalgal (Running *et al.*, 1994), siendo el más utilizado el medio Guillard f/2 que ha demostrado ser eficiente para un gran número de microalgas (Torrentera & Tacon, 1989).

Por otro lado, los medios naturales, no son químicamente definidos, más bien se preparan generalmente a partir de fertilizantes agrícolas (N:P:K) o sub productos como melazas, extractos orgánicos y biodigeridos, provenientes de las industrias azucareras, avícola, pesquera, acuícola, entre otras; resultando más económicas que los medio definidos (Hernández *et al.*, 2003).

Ipanaqué & Paredes (2009), trabajaron con extracto de residuos blandos de concha de abanico (EDBCA) como medio de cultivo para la obtención de lípidos en *T. suecica*, obteniendo una concentración de lípidos hasta los 180,6 mg L⁻¹ haciendo notar que esta microalga marina está capacitada para sintetizar ácidos grasos, debido que puede metabolizar y acumular los nutrientes orgánicos en condiciones heterotróficas. Por otro lado Jiménez & Prada (2012), demostraron que los parámetros de la dinámica del crecimiento de *T. suecica* (crecimiento poblacional, tasa de crecimiento y tiempo de duplicación) fueron estadísticamente mayores en los cultivos dosificados con 80 mL L⁻¹ de EDBCA comparados con los otros tratamientos (40, 60 y 100 mL L⁻¹) y el control que utilizó medio Guillard f/2 (1 mL L⁻¹). Asimismo hacen mención que los parámetros fisicoquímicos como temperatura y pH no afectan la dinámica del crecimiento de la microalga *T. suecica* por lo que los resultados obtenidos son el reflejo de la influencia de los nutrientes, orgánicos e inorgánicos, presentes en el ensilado.

Una nueva alternativa para el cultivo de microalgas son los nutrientes y aceites presentes en plantas halófitas, organismos capaces de sobrevivir en ambientes altamente salinos (Gargiulo, 2000). Rodríguez *et al.* (2009), sostienen que los lípidos son nutrientes principales capaces de cumplir la función energética en relación de la planta con su ambiente y por esta razón, *Salicornia fruticosa*

almacena ácidos grasos debido al estrés salino que presenta en el suelo donde crece (Ivanova *et al.*, 2006).

Robles (2011), demostró que el contenido de lípidos de las semillas de *S. fruticosa* procedentes de zonas húmedas y zonas secas del Humedal de Villa María (Chimbote, Perú), fue de 92,85 mg g⁻¹ y 65,83 mg g⁻¹, respectivamente. Da Silva *et al.* (2002), afirman que la halófito *S. fruticosa* está siendo cultivada a pequeña y mediana escala en Egipto, India, México, Pakistán, Arabia Saudita, así como en China a gran escala ya que tiene 300 Ha de zonas costeras. Por otro lado, Arana & Salinas (2003), reportan la presencia de *S. fruticosa* en la flora vascular del país y específicamente en el humedal de Villa María (Chimbote, Perú). Aquí se encuentran plantas que están perfectamente adaptadas a vivir en biotopos acuáticos y terrestres como las que constituyen el gramadal, juncal, carrizal y salicornial. El salicornial se desarrolla sobre el suelo pantanoso con abundante turba y elevada salinidad, en las cercanías al mar; su extensión comprende aproximadamente un 20% del humedal, advirtiendo que en estos últimos años progresivamente se está haciendo cada vez más importante (Loayza, 2002)

En los últimos años, se realizan esfuerzos para la generación de nuevas metodologías y desarrollo tecnológico para la producción masiva de microalgas y sus derivados, mediante el uso de medios de cultivos alternativos. Este gran interés en producir biomasa microalgal para la obtención de biocombustible busca paliar la alta demanda energética mundial agravada por el agotamiento de los combustibles fósiles, o en tanto las microalgas son una excelente alternativa por no competir con los cultivos tradicionales, fuente actual de alimentos para la humanidad (Donohue & Codgell, 2006; Meng *et al.*, 2009; Rodolfi *et al.*, 2009).

Una alternativa a los medios de cultivo tradicionales ya estandarizados (puros y químicamente definidos, como el medio Guillard f/2) son los medios orgánicos, que en su mayoría son subproductos de otras industrias y en cuya composición se encuentran fuentes de C, N, P, microelementos y oligoelementos, aunque existen otras fuentes de naturaleza orgánica que son escasamente utilizadas

como el extracto de *S. fruticosa* (ESALI) que deben ser estudiadas (Ivanova *et al.*, 2006). Debido a la carencia de investigaciones sobre el extracto acuoso de *S. fruticosa* como medio de cultivo alternativo para el crecimiento poblacional de microalgas ha motivado la realización del presente trabajo, a fin de posibilitar su biotransformación en biomasa microalgal.

Teniendo en consideración que la realización de cultivos alternativos utilizando fuentes de nitrógeno y compuestos orgánicos permitirá incrementar la producción de biomasa microalgal y el contenido de lípidos, con la consiguiente disminución de los costos de producción, planteamos el siguiente problema: ¿Cuál será el efecto de la concentración del extracto acuoso de *Salicornia fruticosa* en el crecimiento poblacional y contenido de lípidos totales de la microalga *Tetraselmis suecica* cultivada en condiciones de laboratorio?

El objetivo general fue, conocer el efecto de la concentración del extracto acuoso de *Salicornia fruticosa* en el crecimiento poblacional y contenido de lípidos totales de la microalga *Tetraselmis suecica* cultivada en condiciones de laboratorio.

Los objetivos específicos propuestos fueron, 1) Determinar el crecimiento poblacional (cél. mL⁻¹) de la microalga *T. suecica* dosificados con tres concentraciones de 5, 10 y 15 mL L⁻¹ de extracto acuoso de *S. fruticosa* en comparación a los dosificados con medio Guillard f/2; y 2) Determinar la concentración de lípidos totales de la microalga *T. suecica*, dosificados en concentraciones de 5, 10 y 15 mL L⁻¹ con extracto acuoso de *S. fruticosa* en comparación a los dosificados con medio Guillard f/2.

Las hipótesis planteadas fueron: Si en condiciones de laboratorio, utilizamos las concentraciones de 5, 10 y 15 mL L⁻¹ de ESALI, se obtendrá mayor crecimiento poblacional con el tratamiento de 10 mL L⁻¹ en comparación a los dosificados con medio Guillard f/2.

Si en condiciones de laboratorio, utilizamos las concentraciones de 5, 10 y 15 mL L⁻¹ de ESALI, se obtendrá mayor concentración de lípidos con el tratamiento de 5 mL L⁻¹ en comparación a los dosificados con medio Guillard f/2.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Localización del experimento

El experimento se realizó en el Laboratorio de Evaluación de Recursos Acuáticos y Cultivos de Especies Auxiliares de la Facultad de Ciencias, Universidad Nacional del Santa, Nuevo Chimbote, Perú.

2.2. Material experimental

2.2.1. Material biológico

La microalga *T. suecica* fue proporcionada por el Laboratorio de Evaluación de Recursos Acuáticos y Cultivos de Especies Auxiliares de la Facultad de Ciencias en la Universidad Nacional del Santa, los que se mantuvieron en suspensión con medio Guillard f/2 en matraces de 250 mL e iluminados con un fluorescente de 40 w, con agitación diaria.

2.2.2. Tratamiento del agua de cultivo

El agua de mar utilizada en los cultivos procedió de la playa “El Dorado” ubicada en la bahía de Samanco (09° 12' S y 78° 30' W), distrito de Nuevo Chimbote, provincia del Santa, región Ancash, Perú. El agua de mar inicialmente fue sedimentada durante 24 horas y luego, para eliminar impurezas, se filtró con una malla de 2 μ m de diámetro, seguidamente se fue agregado 1 mL de hipoclorito de sodio por cada litro de agua de mar, dejándola reposar durante 12 h. Posteriormente se neutralizó el pH con tiosulfato de sodio al 15 % a razón de 1 mL por cada litro de agua de mar y enseguida se le colocó a esta agua aireación constante por el lapso de 1 h. Este proceso (Fig. 1) permite eliminar la mayor parte de los microorganismos que pudieran interferir en el crecimiento microalgal.

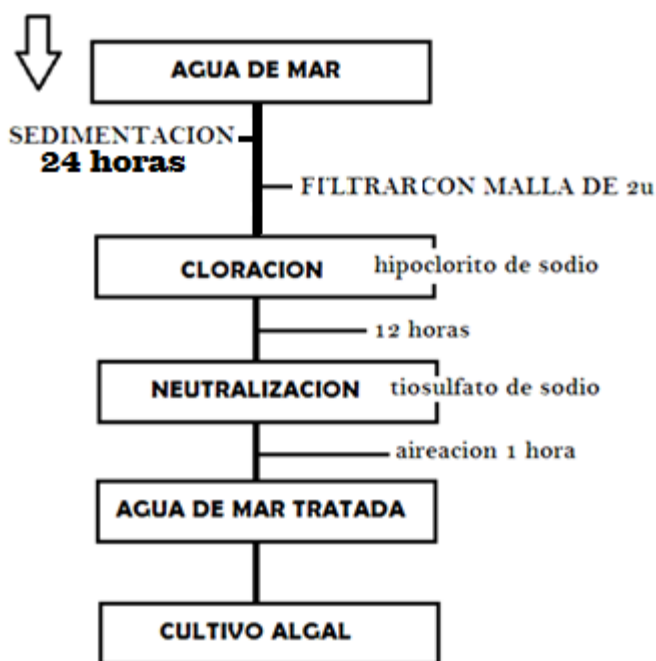


Fig. 1. Esquema para el tratamiento del agua de mar natural.

(Merino *et al.*, 2003)

2.2.3. Preparación del inóculo microalgal

A efectos de la ejecución del trabajo experimental, los cultivos microalgales fueron preparados utilizando medio Guillard f/2, agua de mar tratada y microalga *T. suecica*; en matraces de 250 mL conteniendo 100 mL de solución microalgal con densidad de $134,4 \text{ cel. } \mu\text{L}^{-1}$ (2.688×10^4) células contenidas en 200 ml de cultivo, con iluminación constante y agitados manualmente de forma periódica. Luego de cuatro días de crecimiento, los cultivos fueron llevados a un volumen de 1000 mL para ser utilizados en la ejecución de la Tesis.

2.3. Preparación de los medios de cultivo

2.3.1. Medio Guillard f/2

El medio de cultivo Guillard f/2 (Tabla 1) que se utilizó para el mantenimiento de los inóculos de *T. suecica* y el control con medio Guillard f/2 durante la experiencia, se preparó según el estándar propuesto por Guillard (1975). Los reactivos fueron proporcionados por el Laboratorio de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional del Santa.

Tabla 1. Composición química del medio de cultivo Guillard f/2.

Compuesto	Concentración (mg l⁻¹)
Nutrientes Mayores	
NaNO ₃	75,0
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	5,0
Micronutrientes	
Na ₂ EDTA	4,36
FeCl ₃ .6H ₂ O	3,15
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,01
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,022
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,01
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,18
Na ₂ MnO ₄ .2H ₂ O	0,006
Vitaminas	
Tiamina	0,1
Biotina	0,5
Cianocobalamina	0,5

2.3.2. Preparación del medio de cultivo con extracto acuoso de *S. fruticosa* (ESALI)

La *S. fruticosa* es una planta de fácil obtención y de cultivo, ya que sólo necesita agua de mar y tierras desérticas y/o salitrosas, que lo tenemos en gran cantidad, a lo largo del litoral de nuestro distrito y de la Costa del Perú y además por poseer propiedades nutritivas, siendo un alimento con concentración de proteínas y rico en aminoácidos, así como otros de su misma familia (Scott, 1977).

La muestra de *S. fruticosa* fue recolectada artesanalmente de la zona aledaña al AA.HH. "Las Brisas" del distrito de Nuevo Chimbote. Con la ayuda de un cuchillo pequeño se cortaron tallos y las ramas que fueron colocadas en bolsas plásticas y selladas herméticamente para su traslado hacia el Laboratorio de Evaluación de Recursos Acuáticos y Cultivo de Especies Auxiliares de la Escuela Académico Profesional de Biología en Acuicultura de la Facultad Ciencias de la Universidad Nacional del Santa.

Una vez en el Laboratorio, solo fueron seleccionadas pequeñas ramas verdes y pesadas en una balanza analítica (de 0.01 g de sensibilidad) hasta obtener 1000 g. Seguido, la muestra seleccionada fue lavada con agua dulce corriente para desprender de ella todo tipo de pajillas o polvo que interfieran en el proceso de elaboración del extracto acuoso. Luego la muestra fue triturada con un mortero y filtrada en un tamiz de 5 μ de diámetro obteniendo aproximadamente 478 mL de extracto, que se colectó en tubos de ensayo para ser centrifugado a 5000 rpm durante 15 min, donde se obtuvo 350 mL y fue aforado a 1000 mL con agua de mar para su posterior utilización.

En el siguiente flujograma (Fig. 2) se detallan los pasos para la elaboración del medio ESALI.

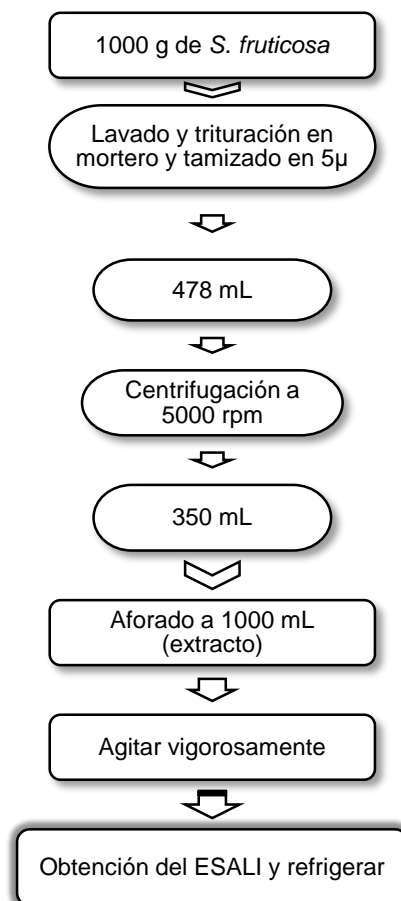


Fig. 2. Flujo de la preparación del medio ESALI para el cultivo de *T. suecica*.

Las concentraciones de ESALI se establecieron de la siguiente manera, como se uso 1000 g de *S. fructicosa* y la solución final fue de 1000 mL, entonces las concentraciones fueron de la siguiente manera; 5 mL L⁻¹ (5 g L⁻¹), 10 mL L⁻¹ (10 g L⁻¹), 15 mL L⁻¹ (15 g L⁻¹).

2.4. Acondicionamiento de las unidades experimentales

Se utilizaron 12 botellas plásticas de 1500 mL de volumen total con 1000 mL de volumen efectivo de cultivo, iniciándose los cultivos microalgales con un promedio de 0,14 x10⁶ cél. mL⁻¹ (Fig. 3).

Se empleó el diseño estímulo creciente (Steel & Torrie, 1988), con tres tratamientos y un grupo control (Guillard f/2), y tres repeticiones cada uno (Tabla 2).

Tabla 2. Tratamientos utilizados en los cultivos de *T. suecica* con ESALI.

Tratamientos	Especificaciones
T0	Cultivo de <i>T. suecica</i> con medio de cultivo Guillard f/2 (Control).
T1	Cultivo de <i>T. suecica</i> dosificado con 5 mL L ⁻¹ de ESALI.
T2	Cultivo de <i>T. suecica</i> dosificado con 10 mL L ⁻¹ de ESALI.
T3	Cultivo de <i>T. suecica</i> dosificado con 15 mL L ⁻¹ de ESALI.



Fig. 3. Cultivos microalgales de los diferentes tratamientos de *T. suecica*.

Los tratamientos fueron determinados de acuerdo a ensayos previos en laboratorio. La composición química del ESALI se realizó según la AOAC (2007) para humedad y cenizas, APHA (2005) para lípidos y Lowry *et al.* (1951) para proteínas en solución, que se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Valores de la composición química del ESALI, utilizados en el cultivo experimental con *T. suecica*.

Parámetros	Concentración (%)
Humedad ESALI *	97,29
Proteínas ESALI *	0,53
Lípidos ESALI *	0,24
Cenizas ESALI *	0,38

*Laboratorio de Biología y Ecología de la Universidad Nacional del Santa, porcentaje en peso húmedo.

Se registró en forma diaria el pH y la temperatura, haciendo uso de un pHmetro digital marca Oakton ($\pm 0,01$ unidades) y un termómetro digital marca Hanna ($\pm 0,1$ °C).

La aireación fue constante, proveída por un Blower de 1/2 HP y conducida a través de tubos de PVC de ½", con un flujo de aire de 500 mL min⁻¹ para cada unidad experimental. El valor del flujo de aire se determinó con un flujómetro Cole Parmer (±10 mL min⁻¹).

La iluminación fue constante y suministrada con dos fluorescentes de luz blanca de 40 w y colocados a una distancia aproximada de 10 cm de las botellas de los cultivos microalgales, irradiando a una intensidad luminosa promedio de 4000 lux medidos con un luxómetro digital Hanna (±0,1 lux).

2.5. Determinación del crecimiento poblacional

El crecimiento poblacional en los cultivos de *T. suecica* se determinó por conteos diarios del número de células en alícuotas por triplicado. Para ello se tomó una muestra de la suspensión microalgal en un tubo de ensayo, se fijó con solución de lugol y se colocó en una cámara Neubauer con una micropipeta Pasteur para ser observado en un microscopio binocular marca Olympus a un aumento de 100X y realizar los conteos en 5 cuadrículas tomadas al azar.

Se graficaron las curvas con los datos obtenidos de las densidades algales diarias, y se determinó la tasa de crecimiento poblacional por día (μ) y el tiempo de duplicación diaria (TD) teniendo en cuenta el quinto día de cultivo, según Guillard (1975).

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

Donde:

N_0 y N_f corresponden al número de células por mL al inicio del experimento y al quinto día de cultivo (T_0 y T_f), respectivamente.

2.6. Determinación de la Concentración de la Biomasa

Para determinar la concentración de la biomasa en *T. suecica*, inicialmente se pesó el papel filtro Whatman N° 42 previamente secado en la estufa a 70 °C, se colocó en un embudo Büchner con matraz Kitasato y con ayuda de una bomba de vacío se filtró 50 mL de suspensión microalgal en cada unidad experimental, se llevó a la estufa a 60 °C por 6 hr y seguido a una temperatura de 105 °C por 10 min. Se dejó enfriar en un secador de campana por media hora y se pesó cada papel con muestra seca en una balanza analítica Hanna. Para obtener el valor de la concentración de la biomasa se reemplazaron los pesos obtenidos en la siguiente fórmula según Blight & Dyer (1959) y Marsh & Weinstein (1966):

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

Donde:

P1: Peso inicial (papel) (mg)
P2: Peso final (papel + muestra) (mg)
50: alícuota del filtrado en ml

2.7. Determinación de la Concentración de Lípidos

Las muestras para el análisis de lípidos en los cultivos de *T. suecica* fueron obtenidas en el final de la fase exponencial (día 5).

Para la determinación de los lípidos totales de *T. suecica* se siguió la metodología de Blight & Dyer (1959) y Marsh & Weinstein (1966) (Fig. 4).

Se centrifugó 10 mL del cultivo microalgal en tubos de ensayo de 100 ml a 10000 rpm por 10 min, eliminándose el sobrenadante y dejando la pasta de microalga que luego fue secada en estufa a 60 °C por 3 hr. Se pesó 5 mg de cada una de las muestras centrifugadas secas y se colocó en tubos de ensayo debidamente rotulados, se añadió 3 mL de una solución de cloroformo:metanol (1:2), se suspendió y se mantuvieron en refrigeración a 5 °C por 24 hr protegidas de la luz. Seguido se adicionó 3 mL de agua destilada a cada tubo

de ensayo, se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min, se extrajo la capa superior y lo restante se evaporó en una estufa a 80 °C aproximadamente.

Una vez secado cada muestra en el mismo tubo de ensayo, se agregó 2 mL de ácido sulfúrico concentrado (98 %) y se llevó a digestión a una temperatura de 200 °C por 1 hr; luego se enfrió en agua potable a temperatura ambiente.

Posteriormente se realizaron las lecturas en un espectrofotómetro Turner Barstearnd Internacional con celdas de cuarzo a una longitud de onda de 375 nm.

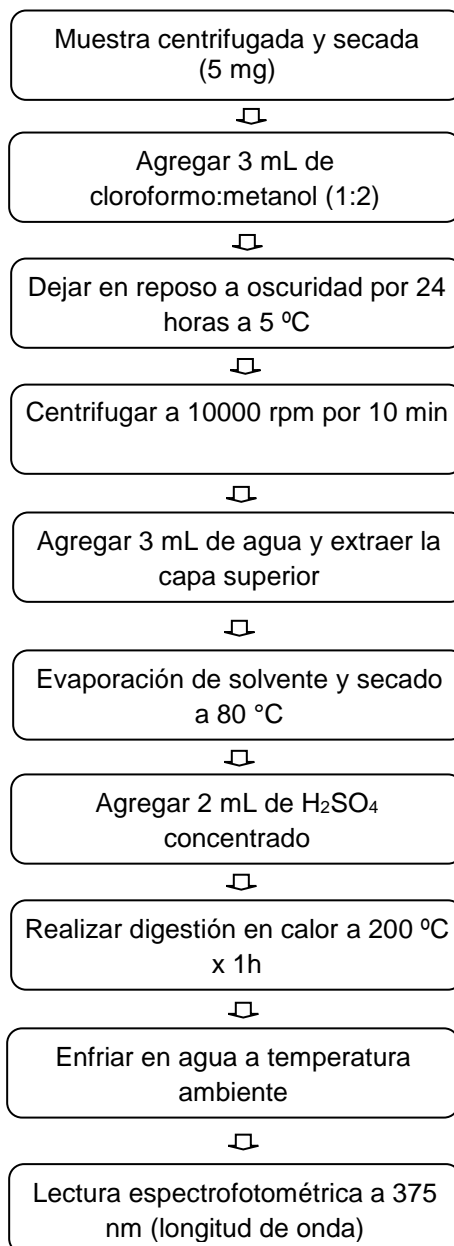


Fig. 4. Flujograma para determinar los lípidos totales de *T. suecica*.

Tomado de Blight & Dyer (1959) y Marsh & Weinstein (1966).

Las curvas de calibración para los lípidos correspondieron a los reportados por Ipanaqué & Paredes (2006), con Dipalmitina, Triestearina y Colesterol que corresponden a las siguientes ecuaciones:

$$A = (\text{Absorbancia} - 0,0041) / 2,543 \text{ (Dipalmitina)}$$

$$B = (\text{Absorbancia} - 0,0067) / 2,7922 \text{ (Triestearina)}$$

$$C = (\text{Absorbancia} - 0,0073) / 2,6109 \text{ (Colesterol)}$$

Se promediaron las pendientes de las tres curvas de calibración dando como ecuación general para determinar la concentración de lípidos (Blight & Dyer, 1959; Marsh & Weinsteinn, 1966) la siguiente:

$$\text{Concentración de Lípidos (\%)} = \frac{\left(\left(\frac{\text{Absorbancia} - 0,006}{2,6487} \right) \times V \right)}{M} \times 100$$

Donde:

V: Volumen final de muestra analizada (5 mL)

M: Peso seco de muestra (5 mg)

La concentración de lípidos en biomasa para cada unidad experimental, fueron determinados según la siguiente ecuación (Blight & Dyer, 1959; Marsh & Weinsteinn, 1966):

$$\text{Concentración de Lípidos (mg L}^{-1}\text{)} = \frac{P \times B}{100}$$

Donde:

P: Porcentaje de lípidos (%)

B: Concentración de Biomasa (mg L⁻¹)

2.8. Análisis estadístico de los datos

Los datos de crecimiento poblacional, concentración de lípidos, pH y temperatura de todos los tratamientos fueron sometidos al análisis de varianza (ANOVA) para establecer diferencias entre sus promedios. Para aquellos casos en donde se demostró diferencias significativas se aplicó la prueba de Tukey HSD para determinar el mejor promedio. Todos los datos fueron analizados con un nivel de significancia de 0,05. El proceso estadístico fue desarrollado utilizando los programas, Microsoft Office Excel 2010 y SPSS 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 se muestra en la fig. 5, y tabla 7 y 8.

La temperatura de los cultivos de *T. suecica* en los tratamientos varió entre $24,3 \pm 0,1$ y $23,7 \pm 0,2$ °C durante el experimento. Estos mismos fueron estadísticamente similares ($p > 0,05$) en cada día de cultivo.

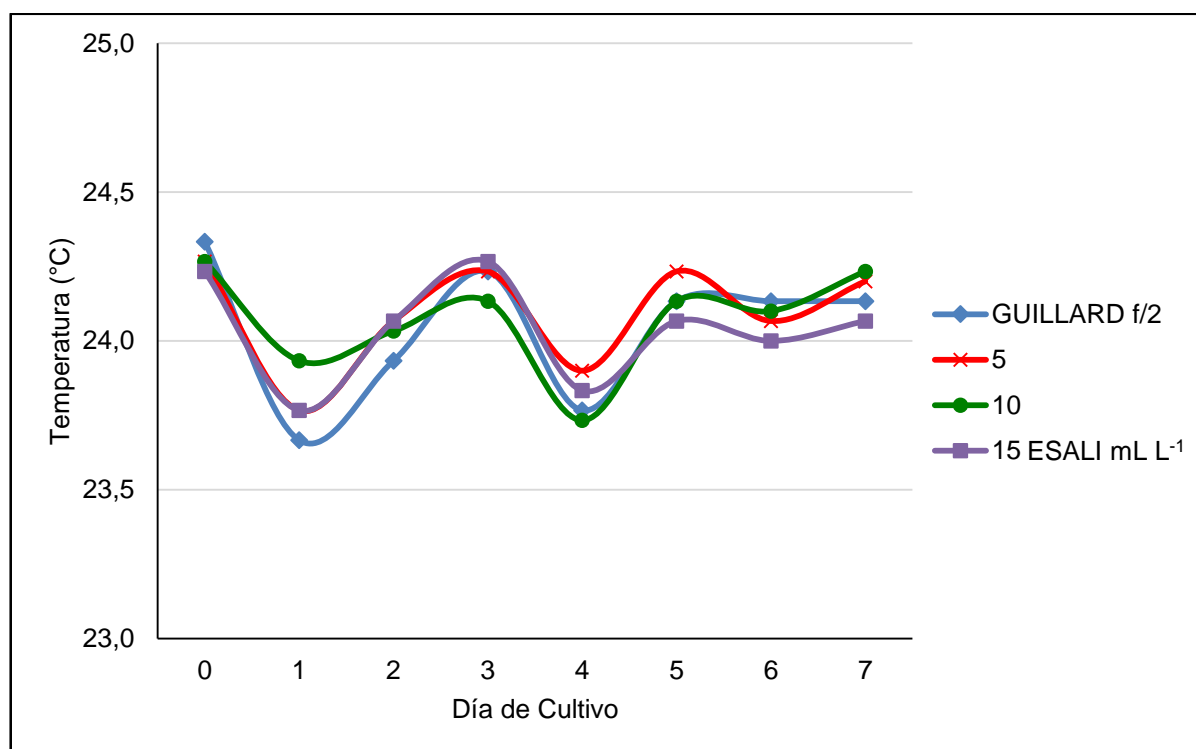


Fig. 5. Variación de la temperatura promedio (°C) en los cultivos de *T. suecica* de los tratamientos con medio ESALI y Guillard f/2 (control).

3.1.2. pH

Las variaciones del pH en los cultivos durante el experimento son mostrados en la fig. 6, y tabla 9 y 10.

El pH de los cultivos de *T. suecica* en los tratamientos con ESALI varió entre $8,17 \pm 0,05$ y $9,26 \pm 0,08$ durante el experimento.

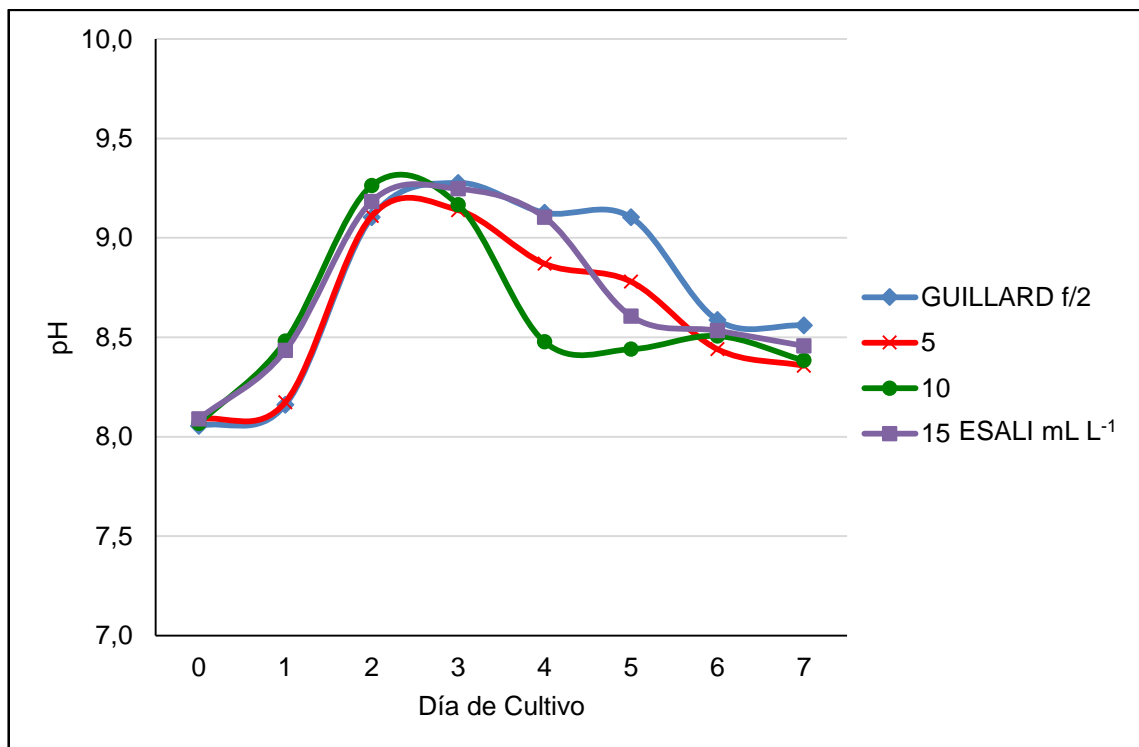


Fig. 6. Variación del pH promedio en los cultivos de *T. suecica* de los tratamientos con medio ESALI y Guillard f/2 (control).

Al primer día de cultivo, los valores de pH ya se diferenciaron entre los tratamientos, siendo los mayores los dosificados con 10 y 15 mL L⁻¹ de ESALI con 8,48 y 8,43 unidades, respectivamente. Mientras que los menores fueron los dosificados con medio Guillard f/2 y 5 mL L⁻¹ de ESALI con 8,16 y 8,17 unidades, respectivamente.

Al segundo día de cultivo, se alcanzaron los máximos valores de pH de la experiencia, el mayor valor el obtenido en el tratamiento con 10 mL L⁻¹ de ESALI con 9,26 unidades, siendo similar al dosificado con 15 mL L⁻¹

de ESALI con 9,18 unidades. El menor promedio obtenido 9,11 y 9,10 unidades en el tratamiento dosificado con 5 ml L⁻¹ de ESALI y con Guillard f/2, respectivamente.

Al tercer día de cultivo se presentaron valores similares al segundo día con tendencia a disminuir, siendo los mayores dosificados con medio Guillard f/2 y 15 mL L⁻¹ de ESALI con 9,28 y 9,25 unidades, respectivamente. Mientras que los tratamientos dosificados con 5 y 10 mL L⁻¹ de ESALI reportaron 9,14 y 9,17 unidades, respectivamente.

Las variaciones de pH ocurridas en cuarto día reportan una disminución para los tratamientos dosificados con 10 y 15 ml L⁻¹ de ESALI con 8,48 y 9,10 unidades, respectivamente. Así mismo los tratamientos dosificados con 5 ml L⁻¹ de ESALI y con Guillard f/2, presentaron valores de 8,87 y 9,13 unidades, respectivamente.

Para el quinto día, el tratamiento dosificado con 10 ml L⁻¹ de ESALI con 8,44 unidades, presento el valor más mínimo en comparación al tratamiento dosificado con Guillard f/2, con 9,10 unidades.

Los días siguientes se presentaron variaciones con tendencia descendente. Encontrando en los días 6 y 7 valores diarios estadísticamente similares. Obteniéndose en el día 7 de cultivo, valores de 8,56; 8,36; 8,38 y 8,46 unidades, para los tratamientos dosificados con medio Guillard f/2, y 5; 10 y 15 mL L⁻¹ de ESALI, respectivamente.

3.2. Crecimiento poblacional de *T. suecica*

3.2.1. Curvas de crecimiento

En la tabla 4, fig. 7, son presentados las densidades poblacionales en los cultivos de *T. suecica* en los tratamientos.

Tabla 4. Densidad poblacional ($\times 10^6$ cél. mL^{-1}) de *T. suecica* en los tratamientos cultivados con medio ESALI y Guillard f/2 (control).

Día de cultivo	Guillard f/2	ESALI (mL L^{-1})		
		5	10	15
0	0,14 \pm 0,00a	0,14 \pm 0,00a	0,14 \pm 0,00a	0,14 \pm 0,00a
1	0,40 \pm 0,01a	0,31 \pm 0,00c	0,36 \pm 0,01b	0,36 \pm 0,01b
2	1,04 \pm 0,01bc	0,93 \pm 0,06c	1,25 \pm 0,02a	1,20 \pm 0,12ab
3	1,64 \pm 0,06c	1,92 \pm 0,06b	2,86 \pm 0,15a	1,35 \pm 0,06d
4	3,07 \pm 0,05b	2,59 \pm 0,08c	4,76 \pm 0,30a	2,37 \pm 0,09c
5	3,76 \pm0,06c	4,69 \pm0,12b	6,05 \pm0,07a	2,26 \pm0,16d
6	3,63 \pm0,12c	5,34 \pm0,66b	6,64 \pm0,13a	2,19 \pm0,16d
7	3,45 \pm0,17c	5,30 \pm0,16b	6,35 \pm0,08a	1,57 \pm0,03d

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

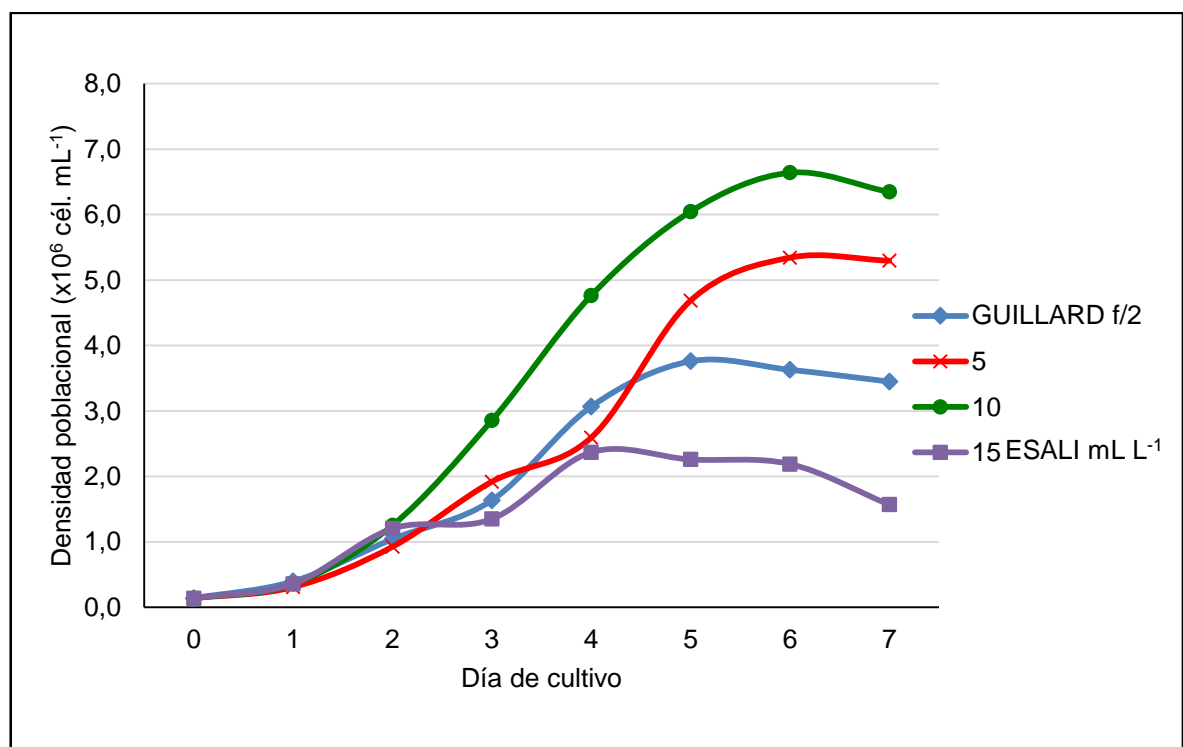


Fig. 7. Variación de la densidad poblacional ($\times 10^6$ cél. mL^{-1}) en los cultivos de *T. suecica* con medio ESALI y Guillard f/2 (control).

Las densidades poblacionales en los tratamientos cultivando *T. suecica*, se iniciaron con valores promedio significativamente similares ($p>0,05$)

de $0,14 \times 10^6$ cél. mL^{-1} , los cuales presentaron una variación en el transcurso del cultivo.

Al primer día de cultivo, se aprecia el mejor crecimiento en el grupo control con $0,40 \times 10^6$ cél. mL^{-1} , seguido de los tratamientos dosificados con 10 y 15 mL L^{-1} de ESALI, con valores de $0,36$ y $0,36 \times 10^6$ cél. mL^{-1} , respectivamente, y el menor valor ($p < 0,05$) se encontró en el dosificado con 5 mL L^{-1} de ESALI con $0,31 \times 10^6$ cél. mL^{-1} .

Al segundo día de cultivo, se aprecia el mejor crecimiento en los dosificados con una mayor dosis de ESALI, siendo el tratamiento con 10 mL L^{-1} de ESALI el que presentó un mayor valor significativo con $1,25 \times 10^6$ cél. mL^{-1} , similar al tratamiento con 15 mL L^{-1} de ESALI con $1,20 \times 10^6$ cél. mL^{-1} , y los menores valores ($p < 0,05$) se presentaron en el grupo control (Guillard f/2) y el tratamiento dosificado con 5 mL L^{-1} de ESALI con $1,04$ y $0,93 \times 10^6$ cél. mL^{-1} , respectivamente.

En el tercer día de cultivo, se aprecia que la mayor densidad poblacional se presentó en el tratamiento dosificado con 10 mL L^{-1} de ESALI con un valor significativo ($p < 0,05$) de $2,86 \times 10^6$ cél. mL^{-1} , seguido del tratamiento dosificado con 5 mL L^{-1} de ESALI con $1,92 \times 10^6$ cél. mL^{-1} , y el grupo control (Guillard f/2) con $1,64 \times 10^6$ cél. mL^{-1} , y el menor valor ($p < 0,05$) se obtuvo en el tratamiento dosificado con 15 mL L^{-1} de ESALI con $1,35 \times 10^6$ cél. mL^{-1} .

Al cuarto día de cultivo, la mayor densidad poblacional se presentó en el tratamiento dosificado con 10 mL L^{-1} de ESALI con un valor significativo ($p < 0,05$) de $4,76 \times 10^6$ cél. mL^{-1} , seguido del grupo control (Guillard f/2) con $3,07 \times 10^6$ cél. mL^{-1} , y los menores valores significativos ($p < 0,05$) se obtuvieron en los tratamientos dosificados con 5 y 15 mL L^{-1} de ESALI, con $2,59$ y $2,37 \times 10^6$ cél. mL^{-1} , respectivamente.

Para el quinto día de cultivo, la mayor densidad poblacional (al igual que los días 2; 3 y 4) se presentó en el tratamiento dosificado con 10 mL L^{-1}

de ESALI con un valor significativo ($p < 0,05$) de $6,05 \times 10^6$ cél. mL⁻¹, seguido del tratamiento con 5 mL L⁻¹ de ESALI con $4,69 \times 10^6$ cél. mL⁻¹, y el grupo control (Guillard f/2) con $3,76 \times 10^6$ cél. mL⁻¹, y el menor valor ($p < 0,05$) se obtuvo en el tratamiento dosificado con 15 mL L⁻¹ de ESALI con $2,26 \times 10^6$ cél. mL⁻¹.

Al sexto día de cultivo, la mayor densidad poblacional se presentó en el tratamiento dosificado con 10 mL L⁻¹ de ESALI con un valor significativo ($p < 0,05$) de $6,64 \times 10^6$ cél. mL⁻¹, seguido del tratamiento dosificado con 5 mL L⁻¹ de ESALI con $5,34 \times 10^6$ cél. mL⁻¹, y el grupo control (Guillard f/2) con $3,63 \times 10^6$ cél. mL⁻¹, y el menor valor ($p < 0,05$) se obtuvo en el tratamiento dosificado con 15 mL L⁻¹ de ESALI con $1,57 \times 10^6$ cél. mL⁻¹.

En el último día de cultivo (día 7), y como tendencia general entre los tratamientos, la mayor densidad poblacional se presentó en el tratamiento dosificado con 10 mL L⁻¹ de ESALI con un valor significativo ($p < 0,05$) de $6,35 \times 10^6$ cél. mL⁻¹, seguido del tratamiento dosificado con 5 mL L⁻¹ de ESALI con $5,30 \times 10^6$ cél. mL⁻¹, y el grupo control (Guillard f/2) con $3,45 \times 10^6$ cél. mL⁻¹, y el menor valor ($p < 0,05$) se obtuvo en el tratamiento dosificado con 15 mL L⁻¹ de ESALI con $1,57 \times 10^6$ cél. mL⁻¹. Teniendo una tendencia decreciente en la densidad poblacional con respecto a los demás días de cultivo.

3.2.2. Tasa máxima de crecimiento y tiempo de duplicación

En la tabla 5 y 12, fig. 8, se observa la tasa de crecimiento (μ) y el tiempo de duplicación diaria (TD) poblacional en los cultivos de *T. suecica* con medio ESALI y grupo control (Guillard f/2), determinado en el quinto día de cultivo.

Tabla 5. Tasa de crecimiento (μ) y Tiempo de duplicación Diaria (TD) poblacional de *T. suecica* en los tratamientos cultivados con medio ESALI y Guillard f/2 (control).

PARÁMETRO	GUILLARD f/2	ESALI (mL L ⁻¹)		
		5	10	15
μ (día ⁻¹)	0,658 ±0,003c	0,702 ±0,005b	0,753 ±0,002a	0,556 ±0,014d
TD (día)	1,053 ±0,005c	0,987 ±0,007b	0,920 ±0,003a	1,247 ±0,031d

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

La tasa de crecimiento (μ) en el quinto día de cultivo de *T. suecica* (Tabla 5, Fig. 8) presentó el mayor valor significativo ($p<0,05$) en el tratamiento dosificado con 10 mL L⁻¹ de ESALI con 0,753 día⁻¹, seguido del tratamiento dosificado con 5 mL L⁻¹ de ESALI con 0,702 día⁻¹, y el grupo control (Guillard f/2) con 0,658 día⁻¹, y la menor tasa de crecimiento significativa ($p<0,05$) se obtuvo en el tratamiento dosificado con 15 mL L⁻¹ de ESALI con 0,556 día⁻¹.

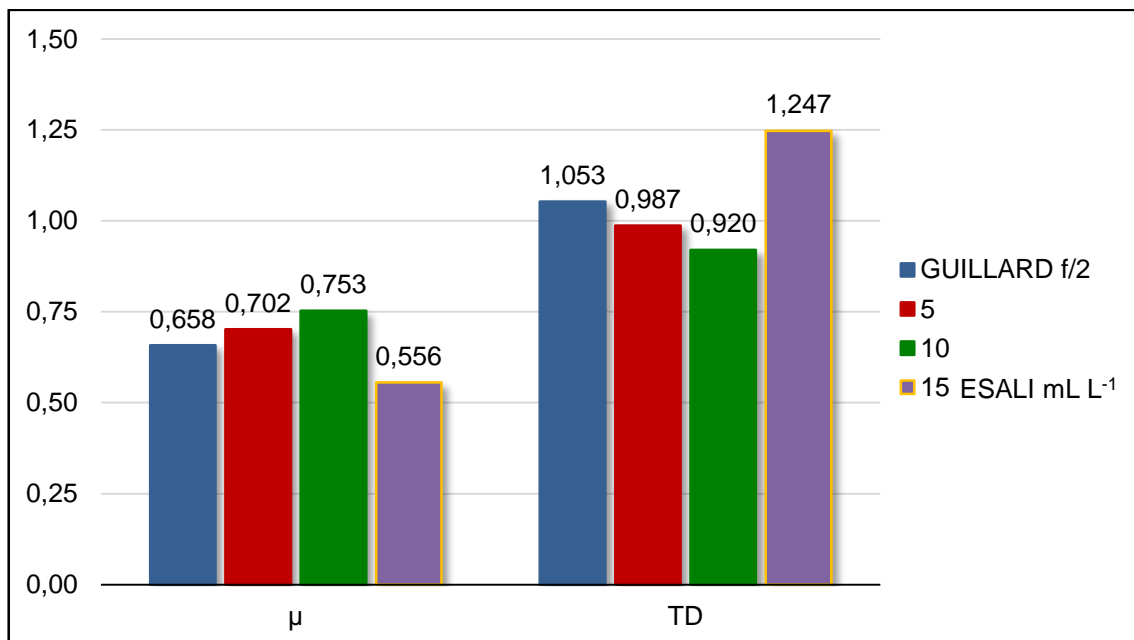


Fig. 8. Variación de la Tasa máxima de crecimiento (μ) y Tiempo de duplicación diaria (TD) poblacional de *T. suecica* en los tratamientos cultivados con medio ESALI y Guillard f/2 (control).

En lo que respecta al tiempo de duplicación diaria (TD) en el quinto día de cultivo de *T. suecica* (Tabla 5, Fig. 8) el mayor valor significativo ($p < 0,05$) se presentó en el tratamiento dosificado con 15 mL L⁻¹ de ESALI con 1,247 día, seguido del grupo control (Guillard f/2) con 1,053 día, y el tratamiento dosificado con 5 mL L⁻¹ de ESALI con 0,987 día, y el menor tiempo de duplicación significativo ($p < 0,05$) se obtuvo en el tratamiento dosificado con 10 mL L⁻¹ de ESALI con 0,920 día.

3.3. Concentración de Lípidos

En la Tabla 6, y Fig. 9 y 10, se observan los valores promedio de la concentración de lípidos (% y mg L⁻¹) de *T. suecica* al quinto día de cultivo en todos los tratamientos.

Tabla 6. Concentración de lípidos en porcentaje (%) y biomasa (mg L⁻¹) en el quinto día de cultivo de *T. suecica* en los tratamientos dosificados con medio ESALI y Guillard f/2 (control).

Parámetro	Guillard f/2		ESALI (mL L ⁻¹)					
			5	10	15			
Lípidos (%)	22,23	±0,72b	22,27	±0,67b	23,77	±0,40a	23,97	±0,21a
Lípidos (mg L ⁻¹)	109,5	±3,7d	147,0	±4,3c	180,0	±3,0a	159,6	±1,4b
Biomasa (mg L ⁻¹)	492,53	±0,2	660,33	±0,1	757,17	±0,2	665,77	±0,2

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

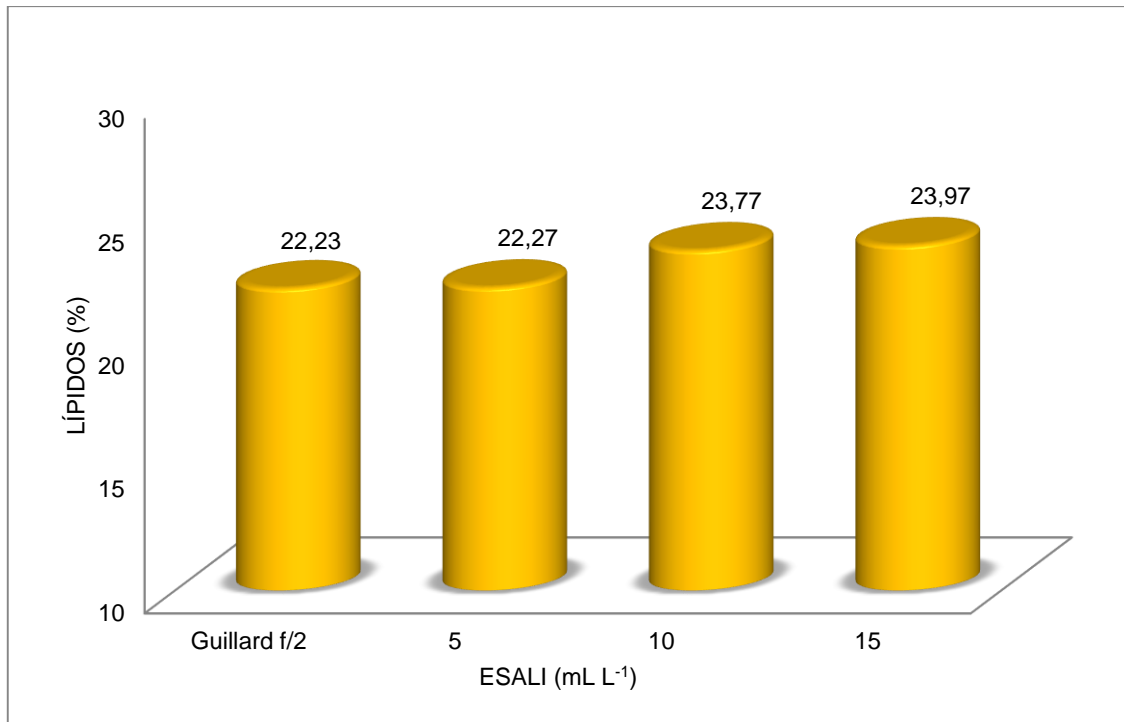


Fig. 9. Concentración de lípidos en porcentaje de *T. suecica* en los tratamientos dosificados con medio de cultivo ESALI y Guillard f/2 (control).

La concentración de lípidos expresado en porcentaje (Tabla 6, Fig. 9) al quinto día de cultivo, presentó las mayores concentraciones significativas ($p < 0,05$) en los tratamientos dosificados con 10 y 15 mL L⁻¹ de ESALI con 23,77 y 23,97 % de lípidos, respectivamente. Los menores valores significativos ($p < 0,05$) se obtuvieron con en el grupo control (Guillard f/2) y el tratamiento dosificado con 5 mL L⁻¹ de ESALI con 22,23 y 22,27 % de lípidos, respectivamente.

En cuanto a la concentración de lípidos en mg L⁻¹ de *T. suecica* (Tabla 5, Fig. 10) en el quinto día de cultivo, se encontró el mayor valor significativo ($p < 0,05$) en el tratamiento dosificado con 10 mL L⁻¹ de ESALI con 180,0 mg L⁻¹ de lípidos, seguido del tratamiento dosificado con 15 mL L⁻¹ de ESALI con 159,6 mg L⁻¹ de lípidos, con un valor intermedio en el tratamiento dosificado con 5 mL L⁻¹ de ESALI con 147,0 mg L⁻¹ de lípidos, y el menor valor significativo ($p < 0,05$) se obtuvo en el grupo control (Guillard f/2) con 109,5 mg L⁻¹ de lípidos.

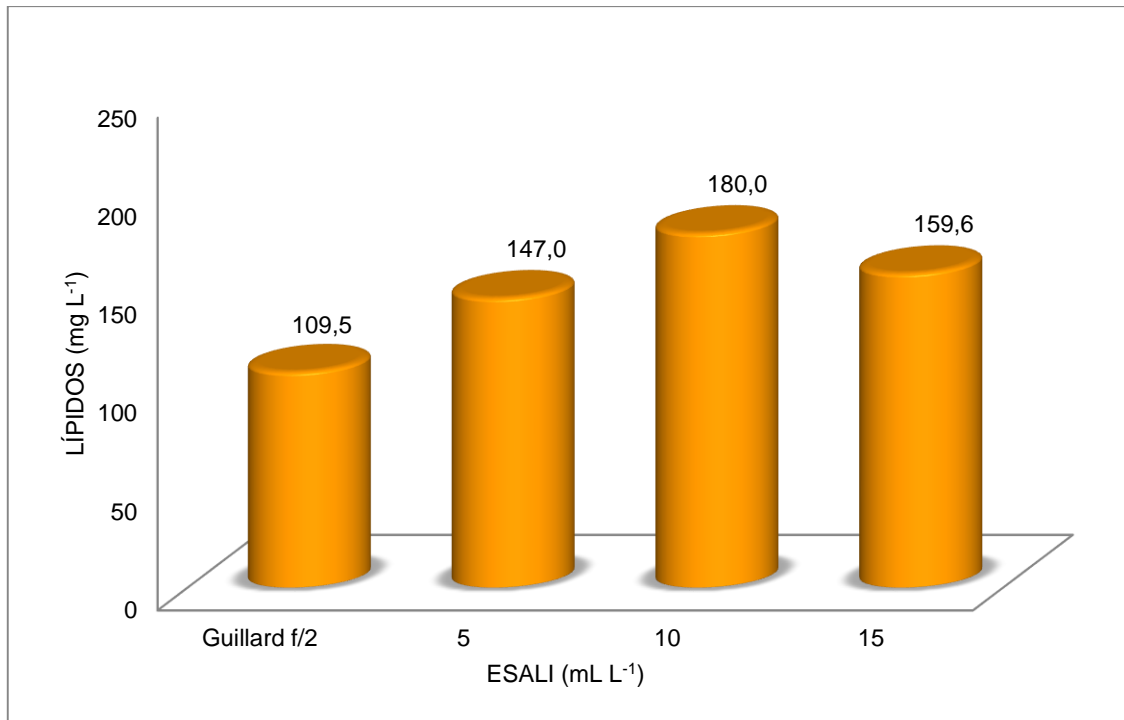


Fig. 10. Concentración de lípidos en mg L⁻¹ de *T. suecica* en los tratamientos dosificados con medio de cultivo ESALI y Guillard f/2 (control).

IV. DISCUSIÓN

Los cultivos de microalgas se ven influenciadas por los parámetros medioambientales que condicionan su composición química. Estos factores pueden ser la intensidad luminosa, calidad y cantidad de nutrientes, pH, temperatura y salinidad (Laing & Helm, 1981; Richmond & Becker, 1986; Ipanaqué & Paredes, 2009; Millán-Núñez *et al.*, 2010). En el trabajo los nutrientes disueltos el medio de cultivo orgánico favorecieron el crecimiento poblacional (fig. 7) y así mismo la acumulación de lípidos.

Según Abalde *et al.* (1995), la temperatura del cultivo de las microalgas varía según la especie, aunque algunas especies no soportan temperaturas superiores a los 25 °C, pero otras son más resistentes y crecen bien hasta los 36 °C, mientras Silva *et al.* (2011), cultivaron *T. suecica* fluctuando entre 21 y 24 °C de manera regular. En la experiencia los cultivos presentaron un rango de temperatura para todos los tratamientos desde los 23,5 a 24,4 °C, rango que se encuentra de acuerdo a Silva *et al.* (2011), por lo que la temperatura del cultivo no se constituye en un factor que pudo haber interferido en la obtención de los resultados del experimento.

El pH es un parámetro a tener en cuenta en los cultivos microalgales, ya que estas requieren estar en un rango de 7.0 a 9.0 unidades para su desarrollo (Richmond & Becker, 1986). Laing & Helm (1981), mencionan que la productividad de *T. suecica* no es afectada si la fuente de dióxido de carbono es suficiente que permiten mantener el crecimiento poblacional de las microalgas, siendo esta una condición inversamente proporcional al pH.

Millán-Núñez *et al.* (2010), cultivaron sin inconvenientes *T. suecica* en intervalos de pH de 7,3 y 8,5, y al igual que Silva *et al.* (2011), en la misma especie, encontraron que en rangos de pH entre 7,13 y 8,69, no se presentaron problemas por este factor. También, González & Polo (2014), reportan que el rango de pH para cultivos de *T. suecica*, oscilaron entre los 7,81 y 9,26 unidades de pH, con un buen crecimiento con medio Guillard f/2. Al final en el experimento, obtuvimos un rango entre 8,01 y 9,34 unidades de pH (fig. 6), los

mismos que son cercanos a los reportados por Silva *et al.* (2011) y González & Polo (2014), por lo que este factor no tendría efecto significativo en la obtención de los resultados.

El crecimiento poblacional en microalgas es un parámetro que indica la asimilación de los nutrientes. En cultivos autotróficos *T. suecica* puede utilizar diferentes fuentes nitrogenadas inorgánicas como zeolitas, úrea, roca fosfato, nitratos; y en cultivos heterotróficos con nutrientes orgánicos (Bold & Wynne, 1985). Para el caso el medio de cultivo ESALI, este proporciona compuestos nitrogenados que pasan por la membrana plasmática y entran a las rutas bioquímicas de las microalgas que puede ser considerado como fuente de nitrógeno; aunque dichos procesos deben ser llevados con la mayor rapidez para ser considerados asimilables (Flynn & Butler, 1986), por lo mismo considerarlos como medio de cultivo para microalgas.

Fábregas *et al.* (1997), utilizaron fracción soluble de “papa” *Solanum tuberosum* como medio de cultivo en el rango de peso seco de 0,1 a 2,0 mg mL⁻¹ en cultivos de *T. suecica*. La concentración de 0,5 mg mL⁻¹ produce la mayor densidad microalgal con 1,4 x10⁶ cél mL⁻¹, esto significó de 3,9 a 3,1 más alto que los controles autotrófico y fotoheterotrófico que obtuvieron 0,4 x10⁶ cél mL⁻¹ y 0,5 x10⁶ cél mL⁻¹, respectivamente. Utilizando el ESALI como nutriente orgánico, en el experimento reportamos que los mayores crecimientos poblacionales en *T. suecica* se presentaron desde el tercer día en el tratamiento dosificado con 10 mL L⁻¹ de ESALI tal como se aprecia en la fig. 7, teniendo su mayor concentración el día 6 con 6,64 x10⁶ cél. mL⁻¹; mientras que la menor densidad microalgal se presentó en el tratamiento con 15 mL L⁻¹ de ESALI siendo su mayor concentración poblacional el día 4 con 2,37 x10⁶ cél. mL⁻¹; y el tratamiento con un crecimiento intermedio fue con 5 mL L⁻¹ de ESALI con una mayor densidad el día 6 con 5,34 x10⁶ cél. mL⁻¹. Estos valores indicarían que *T. suecica* asimiló los nutrientes contenidos en el ESALI, los que sirvieron para incrementarse hasta densidades importantes aún mayores comparadas al máximo valor obtenido (3,76 x10⁶ cél. mL⁻¹) en el grupo control con Guillard f/2, por lo que el medio ESALI con 10 mL L⁻¹, tendría una

composición y balance de nutrientes adecuado para obtener un buen crecimiento en *T. suecica*.

Utilizando medios de cultivo orgánicos con residuos de origen animal, Fernández & Paredes (2007), trabajaron con ensilado de pescado como fuente de nutrientes para el cultivo de *T. suecica*, aunque no se reporta el balance de nutrientes en sus diferentes concentraciones de ensilado y urea, obtuvieron buenos resultados con ensilado con 40 mL L⁻¹. Del mismo modo, Ipanaqué & Paredes (2009), utilizaron extracto de ensilado de residuos orgánicos *Argopecten purpuratus* en el cultivo de *T. suecica*, encontraron que las mayores densidades poblacionales se encontraron con 60 y 80 mL L⁻¹ de extracto de ensilado con valores de 6,38 y 6,88 x10⁶ cél mL⁻¹, respectivamente, y estos fueron mayores que aquellos obtenidos con medio de cultivo f/2 de Guillard (3,67 x10⁶ cél. mL⁻¹) reconocido medio estandarizado para el cultivo de la mayoría de microalgas marinas, entre éstas *T. suecica*. Aunque, González & Polo (2014), trabajando con agua de bombeo de pescado (EEA) encontraron valores de concentración para *T. suecica* menores que Ipanaqué & Paredes (2009), fueron buenos con valores máximos de densidades poblacionales para *T. suecica* al quinto día de cultivo con 2 y 5 % de EEA de 2,65 y 2,78 x10⁶ cél mL⁻¹, respectivamente. Teniendo en cuenta que el presente experimento el origen del medio ESALI es vegetal, obtuvimos valores máximos cercanos de la densidad poblacional de *T. suecica* con 6,64 y 5,34 x10⁶ cél mL⁻¹ con los tratamientos de 10 y 5 mL L⁻¹ (tabla 4 y fig. 7), respectivamente a los máximos reportados por Ipanaqué & Paredes (2009) y mayores a los obtenidos por González & Polo (2014), es posible considerar que los crecimientos microalgales dependen mayormente de la composición de nutrientes que del origen de los mismos.

Un balance adecuado de los nutrientes son determinantes en el crecimiento microalgal (Fernández & Paredes, 2007; Silva *et al.*, 2011), así, Alsull & Wan (2012), observaron que en condiciones de limitación de nitrógeno orgánico en el cultivo de *Tetraselmis* sp., el crecimiento fue menor, en consecuencia es necesario la presencia de los nutrientes para incrementar la concentraciones de carbono y nitrógeno, en tanto son los mayores limitantes del crecimiento fotoheterotrófico de *T. suecica* (Fábregas *et al.*, 1997).

La tasa de crecimiento es un indicador del potencial biológico relacionado al tiempo de duplicación de los organismos en un entorno de crecimiento particular, que se ve afectada por cualquier deficiencia de nutrientes o limitación de luz. De acuerdo a Griffiths *et al.* (2012), las especies con las tasas máximas de crecimiento fueron las microalgas verdes como *Nannochloropsis oleoabundans*, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus* sp. y *Tetraselmis suecica*, y otros como la haptofita *Isochrysis* sp., presentando *T. suecica* valores máximos de crecimiento de 1,20 a 1,32 día⁻¹ bajo condiciones controladas, aunque Montoya & Acosta (2011), encontraron una tasa de crecimiento con el medio fertilizante comercial Crezilizer (N, P₂O₅, K₂O) de 0,65 día⁻¹. En el experimento obtuvimos al quinto día de cultivo la mayor tasa de crecimiento (0,753 día⁻¹) con 10 mL L⁻¹ de ESALI, mientras que el menor (0,556 día⁻¹) se presentó con 15 mL L⁻¹ de ESALI, los cuales tienen relación directa con las densidades poblacionales, y a su vez con un balance adecuado que presenta el dosificado con 10 mL L⁻¹ de ESALI que fue mayor al reportado por Montoya & Acosta (2011).

Por lo mismo, las densidades microalgales están en función a la velocidad de crecimiento en la cual se producen más células por lo que mayores velocidades indica una mayor densidad. Alsull & Wan (2012), trabajaron con *Tetraselmis* sp., cultivadas en laboratorio combinando varios factores como la salinidad, luz y limitación de nitrógeno, obteniendo así una alta tasa de crecimiento de 0,86 día⁻¹, mantenidas bajo un régimen de 24 h luz. Además se conoce que la deficiencia de nitrógeno influye de manera negativa en la densidad poblacional de una especie de microalga (Fábregas *et al.*, 1985) y también se reduce la tasa de crecimiento, aunque a concentraciones sobresaturadas se presentan otros inconvenientes como la contaminación y precipitación de los mismos (Fábregas *et al.*, 1985; Silva *et al.*, 2011; González & Polo, 2014). Por otro lado Silva *et al.* (2011) para evaluar la tasa de crecimiento de *T. suecica* trabajó con una concentración de sanguaza/agua de mar de 4,56 % obteniendo valores de 0,659 día⁻¹, valores menores a los obtenidos en el mejor tratamiento (10 mL L⁻¹ de ESALI) del presente experimento.

El tiempo de duplicación diaria (TD) está relacionada inversamente con la densidad poblacional y la velocidad de crecimiento; así, el incremento del tiempo de duplicación implica una menor densidad y velocidad de crecimiento. Sheehan *et al.* (1998), determinaron que *T. suecica* cultivada con medio Guillard f/2, presenta un tiempo de duplicación de 1,50. Además, González & Polo (2014), con EEA al 1, 2 y 5 % obtuvieron TD de 1,40; 1,29 y 1,27 para *T. suecica*, respectivamente; mientras que, Ipanaqué & Paredes (2009), obtuvieron con los residuos orgánicos de concha de abanico, un rango de TD para *T. suecica* de 1,06 a 1,12 día. En el experimento obtuvimos al quinto día de cultivo el TD máximo (ver tabla 5, fig. 8) en el tratamiento con 15 mL L⁻¹ de ESALI (1,247), mientras que el menor se presentó con 10 mL L⁻¹ de ESALI (0,92), valores que conjuntamente con la tasa de crecimiento y densidad microalgal, denotan la asimilación e incorporación de los nutrientes orgánicos por las células de *T. suecica*, haciendo del medio ESALI un buen candidato para la producción de *T. suecica*, y por lo obtenido en el tratamiento con 10 mL L⁻¹ de ESALI y de acuerdo a Molina *et al.* (1991), un buen crecimiento microalgal estaría influenciado por el balance adecuado de nutrientes en el medio de cultivo.

Se ha demostrado que muchas microalgas pueden utilizar diferentes fuentes de nutrientes, que pueden crecer tanto autotrófica como heterotróficamente, con capacidad de producir una alta biomasa relativa o la acumulación de lípidos utilizando diferentes fuentes de carbono y bajo varias condiciones ambientales (Miao & Wu, 2006; Xu *et al.*, 2006; Ipanaqué & Paredes, 2009; Heredia-Arroyo *et al.*, 2010; Chen & Walker, 2011; González & Polo, 2014), por lo que, 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). Esto permite que en medios de cultivo sin deficiencia de nitrógeno, las células sintetizan principalmente proteínas para mantener el crecimiento y la división celular, pero en condiciones de limitación de nitrógeno, no hay la concentración de nutrientes necesarios para mantener el crecimiento celular, por lo que aumentan las sustancias de reserva, hidratos de carbono y lípidos, a expensas de la síntesis proteica (Sukenik *et al.*, 1993).

Alsull & Wan (2012), trabajando con *Tetraselmis* sp. incrementaron significativamente la concentración de lípidos desde 13,29 % en condiciones de limitación de nitrógeno, hasta los 29,51 % en condiciones de restricción total. Entonces la deficiencia de nutrientes, sobre todo inorgánicos, causa una tasa de crecimiento cada vez menor, pero que bajo estas circunstancias muchas especies de microalgas continúan sintetizando activamente ácidos grasos (Sukenik *et al.*, 1993; Cohen, 1999). En el experimento se obtuvieron las mayores concentraciones de lípidos (ver tabla 6, fig. 9 y 10) en los tratamientos con 10 y 15 mL L⁻¹ de ESALI con 23,77 % (180.0 mL L⁻¹) y 23,97 % (159.6 mL L⁻¹), respectivamente; mientras que la menor concentración estuvo en el tratamiento con 5 mL L⁻¹ de ESALI con 22,27 % (147.0 mL L⁻¹), lo que no concordaría con lo mencionado por Alsull & Wan (2012), pero teniendo en cuenta que el ESALI proporciona el medio adecuado para que se incremente la producción de lípidos debido a la baja concentración de nitrógeno, lo que en cierta forma explicaría el aumento de los porcentajes de lípidos a mayor concentración de nutrientes del ESALI.

Cohen (1999), menciona que cuando el crecimiento poblacional se retarda en respuesta a un factor limitante como la luz, disponibilidad de nutrientes, pH, temperatura o salinidad, la síntesis de lípidos y carbohidratos son incrementadas a expensas de la síntesis de proteínas. Pero esto afecta la biomasa de lípidos, ya que la mayor producción en peso de las microalgas está relacionado directamente con la densidad microalgal, siendo así que se obtuvo un mayor valor de lípidos al quinto día de cultivo de *T. suecica*, dosificando con 10 mL L⁻¹ de ESALI con 180,0 mg L⁻¹, seguido del tratamiento con 15 mL L⁻¹ de ESALI con 159,6 mg L⁻¹, y el menor valor el obtenido con 5 mL L⁻¹ de ESALI con 147,0 mg L⁻¹. Aunque Thompson (1996), menciona que en las microalgas pueden duplicar la cantidad de lípidos, bajo condiciones de limitación de nutrientes. Cuando el crecimiento disminuye y no hay requerimiento para la síntesis de nuevos compuestos de membrana, y más aún si afecta la división celular disminuyendo la densidad poblacional también incrementa la síntesis de lípidos.

La utilización de *Salicornia fruticosa*, tanto por su disponibilidad todo el año en la zona y sus efectos en el incremento de la densidad poblacional y los lípidos, sobre todo a una concentración de 10 mL L⁻¹ de ESALI, se recomienda su utilización como medio de cultivo para *T. suecica* (Arana & Salinas, 2008).

V. CONCLUSIONES

- ✓ El mayor valor para la densidad poblacional de *T. suecica* al quinto de cultivo se presentó en el tratamiento dosificado con 10 mL L⁻¹ de ESALI, con 6,05 x10⁶ cél. mL⁻¹; el menor valor se encontró en el tratamiento con 15 mL L⁻¹ de ESALI con 2,26 x10⁶ cél. mL⁻¹. El mayor valor de la tasa de crecimiento para *T. suecica* al quinto día de cultivo se presentó en el tratamiento dosificado con 10 mL L⁻¹ de ESALI, con 0,753 día⁻¹; y el menor valor se presentó en el tratamiento dosificado con 15 mL L⁻¹ de ESALI, con 0,556 día⁻¹, para ambos casos presentaron diferencias significativas.
- ✓ El mayor valor del tiempo de duplicación para *T. suecica* en el quinto día de cultivo, se obtuvo en el tratamiento con 15 mL L⁻¹ de ESALI, con 1,247 día; mientras que el menor valor se presentó en el tratamiento con 10 mL L⁻¹ de ESALI, con 0,920 día.
- ✓ El mayor porcentaje de lípidos para *T. suecica* al quinto día de cultivo, fueron obtenidos en los tratamientos dosificados con 10 y 15 mL L⁻¹ de ESALI, con 23,77 y 23,97 %, respectivamente; y el menor valor se obtuvo con 5 mL L⁻¹ de ESALI, con el 22,27 %.
- ✓ El mayor valor de lípidos expresado en peso para *T. suecica* al quinto día de cultivo, se obtuvo en el tratamiento dosificado con 10 mL L⁻¹ de ESALI, con 180,0 mg L⁻¹; y el menor valor se encontró con 5 mL L⁻¹ de ESALI, con 147,0 mg L⁻¹.
- ✓ Teniendo en cuenta la densidad poblacional, tasa de crecimiento, tiempo de duplicación, porcentaje y peso de lípidos obtenidos para *T. suecica* al quinto día de cultivo, se concluye que el tratamiento dosificado con 10 mL L⁻¹ de ESALI fue el mejor para producir biomasa y lípidos.

VI. RECOMENDACIONES

- Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de ESALI en el crecimiento poblacional y contenido de lípidos de *T. suecica* a mayor escala y en condiciones outdoor.
- Evaluar económicamente los cultivos de *T. suecica* producidos con diferentes concentraciones de ESALI.
- Determinar la composición de los HUFA y su rendimiento en los cultivos de *T. suecica* utilizando ESALI como medio de cultivo.
- Realizar un análisis proximal de la composición química que contenga el Extracto Acuoso de Salicornia (ESALI).

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abalde, J.; A. Cid; P. Fidalgo; E. Torres & C. Herrero. 1995. Microalgas: Cultivos y Aplicaciones. Monografía No 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. 142:145.
- Álvarez, M. & J. Zarco. 1989. Lipids in microalgae. A review. I. Biochemistry. *Grasas y Aceites*. 40(2):118-145.
- Alveal, K.; M.E. Ferreiro; E.C. Oliveira & E. Sar, 1995. Manual de métodos ficológicos. Universidad de Concepción. Concepción. Chile.298-309pp.
- 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.
- Arana, C. & L. Salinas. 2003. Flora vascular de los Humedales de Chimbote, Perú. *Rev. Peru. Biol.* 10(2):221-224.
- Arredondo, B. & R. Vázquez. 1991. Aplicaciones biotecnológicas en el cultivo de microalgas. *Ciencia y Desarrollo*. 17:99-111.

- 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.
- Bertoldo, F., E. Sant'Anna, M. Villela & J. Barcelos. 2006. Lípidos, composición de ácidos grasos y carotenos en *Chlorella vulgaris* cultivadas en solución hidropónica residual. *Grasas y Aceites*. 57(3): 270-274.
- Blanco, J. 1991. El Fitoplancton: Su cultivo. Tema 3. Conselleria de pesca, marisqueo e acuicultura. Xunta de Galicia, España. 32p.
- 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.
- Borowitska, M. & L. Borowitzka. 1989. Microalgal biotechnology. Second Edition. Cambridge University. Cambridge. England.477p.
- Chen, Y. & T. Walker. 2011. Biomass and lipid production of heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides* by using biodiesel-derived crude glycerol. *Biotechnol. Lett.* 33:1973-1983.
- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*. 25:294-306.
- Cohen, Z. 1999. Chemicals from Microalgae. Taylor and Francis Inc. Cohen Zvi Ed. London. 450p.
- DaSilva, E.J.; E. Baydoun & A. Badran. 2002. Biotechnology and the developing world. *Electronic Journal of Biotechnology*. 5(1). < <http://www>.

ejbiotechnology.info/index.php/ejbiotechnology/article/view/v5n1-1/945 >.
Accesado: 11 de febrero del 2014.

Díaz, A.; A. Ramírez; D. Godínez & C. Gallo. 2006. Efecto del tamaño de las microalgas sobre la tasa de ingestión en larvas de *Artemia franciscana* (Kellog, 1906). *Zootecnia Tropical*. 24(2):193-203.

Donohue, T. & R. Cogdell. 2006. Microorganisms and clean energy. *Nat. Rev. Microbiol.* 4(11):800.

Elsebaie, E.; S. Elsanat; M. Gouda & K. Elnemr. 2014. Utilization of *Salicornia fruticosa* herb for producing antioxidants. *Bangladesh J. Sci. Ind. Res.* 49(1):53-58.

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.; E. Morales; D. García; B. Cabezas & A. Otero. 1997. The soluble fraction of *Solanum tuberosum* enhances growth and pigmentation of the microalga *Tetraselmis suecica* under photoheterotrophic conditions. *Bioresource Technology*. 59(1997):263-266.

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. Escuela Académico Profesional. Biología en Acuicultura, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional del Santa. Nuevo Chimbote, Perú. 62p.

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.

- Gargiulo, J. 2000. Caminos alternativos dentro de las alternativas. Tercer concurso de Ensayos de Cumbres de las Américas. Universidad Caece. Buenos Aires. Argentina.
- Garibay, A.; R. Vázquez-Duhalt; M. Sánchez; L. Serrano & A. Martínez. 2009. Biodiesel a partir de microalgas. *BioTecnología*. 13(3):38-61.
- González, F. & L. Polo. 2014. Rendimiento de biomasa y contenido de lípidos de *Tetraselmis suecica* utilizando diferentes concentraciones de efluentes de bodegas de embarcaciones anchoveteras industriales en condiciones de laboratorio. Tesis Para Optar el Título de Biólogo Acuicultor. Escuela Academico Profesional, Biología en Acuicultura, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional del Santa. Nuevo Chimbote, Perú. 61p.
- 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.
- Guschina, I. & J. Harwood. 2006. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in Lipid Research*. 45:160-186.
- Heredia-Arroyo, T.; W. Wei & B. Hu. 2010. Oil accumulation via heterotrophic/mixotrophic *Chlorella protothecoides*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 162:1978-1995.
- Hernández, A.; A. Caballero; M. Pazos; R. Ramírez & M. Heydrich. 2003. Identificación de algunos géneros microbianos asociados al cultivo del maíz (*Zea Mays* L.) en diferentes suelos de Cuba. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 5(1):45-55.

- Hodaifa, G.; E. Martínez & S. Sánchez. 2008. Use of industrial wastewater from olive-oil extraction for biomass production of *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology*. 99:1111-1117.
- 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.
- 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.
- 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. Escuela Académico Profesional, Biología en Acuicultura, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional del Santa. Nuevo Chimbote, Perú. 65p.
- Ivanova, A.; J. Nechev & K. Stefanov. 2006. Effect of soil salinity on the lipid composition of halophyte plants from the sand bar of Pomorie. *Gen. Appl. Plant. Physiology. Special issue*:125-130.
- Jiang, X. 2002. Effects of temperatures, light intensity and nitrogen concentrations on the growth and fatty acid composition of *Nannochloropsis oculata*. *Mar. Science*. 26:9-12.
- Jiménez, B. & C. Prada. 2012. Efecto del ensilado de los desechos blandos de *Argopecten purpuratus* “concha de abanico” como medio de cultivo en el crecimiento poblacional, contenido de clorofila α y carotenoides de *Tetraselmis suecica*, en condiciones de laboratorio. Tesis para optar el

Título de Biólogo Acuicultor. Escuela Académico Profesional, Biología en Acuicultura, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional del Santa. Nuevo Chimbote, Perú. 64p.

Laing, I. & M. Helm. 1981. Factors affecting the semi-continuous production of *Tetraselmis suecica* (Kyllin) Butch. in 200-l vessels. *Aquaculture*. 22:137-148.

Loayza, R. 2002. Diagnostico del humedal de Villa María. Proyecto Uso Sostenible de los Humedales de Villa María. Insytuto Ambientalista Natura. Universidad Nacional del Santa.

Loera-Quezada, M. & E. Olgúin. 2010. Las microalgas oleaginosas como fuente de biodiesel: retos y oportunidades. *Rev. Latinoam. Biotecnol. Amb. Algal*. 1(1):91-116.

Lowry, O.; N. Rosebrough.; A. Farr & R. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265-275.

Marsh, J. & D. Weinstein. 1966. Simple charring method for determination of lipids. *J. Lipid Res.* 7:574-576.

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, J.; L. Encomendero; E. Zelada; C. Yzásiga & Z. Mendoza. 2008. Cultivo de microalgas para el tratamiento de aguas residuales provenientes del campus universitario de la Universidad Nacional del Santa. Chimbote - Perú. Trabajo de Investigación Docente. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional del Santa. Nuevo Chimbote, Perú. 71p.

Merino, J.; 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. Nuevo Chimbote, Perú. 32p.

Miao, X. & Q. Wu. 2006. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresour. Technol.* 97:841-846.

Miedzobrodzka, A.; E. Cieslik; E. Sikora & T. Leszczynnska. 1992. The effect of environment conditions on the level of nitrates and nitrites in various varieties of potato. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 1:45-56.

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: 16/04/2014.

Molina, E.; M. Martinez; S. Sanchez; F. Garcia & A. Contreras. 1991. Growth and biochemical composition with emphasis on the fatty acids on *Tetraselmis* sp. *Appl Microbiol Biotechnol.* 36:21-25.

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, Bogotá, Colombia. 157-158pp.

Richmond, A. & E. 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, Florida, United States. 245-264pp.

Robles, L. 2011. Contenido de lípidos de semillas de *Salicornia fruticosa*, procedentes de zonas húmedas y secas del humedal de Villa María (Chimbote, Perú). Tesis para optar el Título de Biólogo Acuicultor.

Escuela Académico Profesional, Biología en Acuicultura, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional del Santa. Nuevo Chimbote, Perú. 62p.

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.

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.

Running, J.; R. Huss & P. Olson. 1994. Heterotrophic production of ascorbic acid by microalgae. *J. appl. Phycol.* 6:99-104.

Scott, A. 1977. Reinstatement and revision of Salicorniaceae. *Bot. J. Linn. Soc.* Volumen 75. 357-374.

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.

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.

Steel, R. & J. Torrie. 1988. Bioestadística: Principios y procedimientos. 2da. edic. Edit. McGraw-Hill. Traducción por Ricardo Martínez. México. 622p.

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.

- Thompson, G.A. 1996. Lipids and membrane function in green algae. *Biochim. Biophys. Acta.* 1302(1):17-45.
- Torrentera, L. & A. Tacon. 1989. La Producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura una Diagnósis. Programa Cooperativo Gubernamental. FAO-Italia. 90p.
- Vieira, J. A. 2004. Produção de biodiesel a partir de microalgas. 1er Congreso Latinoamericano sobre Biotecnología Algal. Argentina.
- Xu, H.; X. Miao & Q. Wu. 2006. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *J. Biotechnol.* 126:499-507.

VIII. ANEXOS

Tabla 7. Temperatura (°C) en los cultivos de *T. suecica* de los tratamientos con medio de cultivo ESALI y Guillard f/2 (control).

Día de cultivo	Guillard f/2			ESALI (mL L ⁻¹)								
				5			10			15		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
0	24,3	24,4	24,3	24,3	24,2	24,3	24,2	24,3	24,3	24,4	24,1	24,2
1	23,5	23,6	23,9	23,8	24,0	23,5	23,9	24,1	23,8	23,5	23,9	23,9
2	23,8	24,1	23,9	24,3	24,0	23,9	24,1	24,1	23,9	24,2	23,7	24,3
3	24,3	24,1	24,3	24,1	24,3	24,3	24,3	24,2	23,9	24,2	24,3	24,3
4	23,5	23,8	24,0	23,9	23,8	24,0	24,0	23,5	23,7	23,9	23,7	23,9
5	24,2	24,0	24,2	24,2	24,3	24,2	24,0	24,2	24,2	24,2	23,8	24,2
6	24,1	24,1	24,2	24,1	24,0	24,1	23,8	24,2	24,3	23,9	23,9	24,2
7	24,2	24,1	24,1	24,0	24,3	24,3	24,2	24,3	24,2	23,9	24,1	24,2

Tabla 8. Temperatura promedio (°C) en los cultivos de *T. suecica* de los tratamientos con medio de cultivo ESALI y Guillard f/2 (control).

Día de cultivo	Guillard f/2	ESALI (mL L ⁻¹)		
		5	10	15
0	24,3 ±0,1a	24,3 ±0,1a	24,3 ±0,1a	24,2 ±0,2a
1	23,7 ±0,2a	23,8 ±0,3a	23,9 ±0,2a	23,8 ±0,2a
2	23,9 ±0,2a	24,1 ±0,2a	24,0 ±0,1a	24,1 ±0,3a
3	24,2 ±0,1a	24,2 ±0,1a	24,1 ±0,2a	24,3 ±0,1a
4	23,8 ±0,3a	23,9 ±0,1a	23,7 ±0,3a	23,8 ±0,1a
5	24,1 ±0,1a	24,2 ±0,1a	24,1 ±0,1a	24,1 ±0,2a
6	24,1 ±0,1a	24,1 ±0,1a	24,1 ±0,3a	24,0 ±0,2a
7	24,1 ±0,1a	24,2 ±0,2a	24,2 ±0,1a	24,1 ±0,2a

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

Tabla 9. Valores de pH en los cultivos de *T. suecica* de los tratamientos con medio de cultivo ESALI y Guillard f/2 (control).

Día de cultivo	Guillard f/2			ESALI (mL L ⁻¹)								
				5			10			15		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
0	8,01	8,12	8,03	8,10	8,04	8,12	8,01	8,06	8,13	8,11	8,04	8,12
1	8,11	8,16	8,21	8,22	8,12	8,18	8,59	8,43	8,42	8,45	8,41	8,44
2	9,10	9,11	9,10	9,11	9,12	9,10	9,26	9,34	9,19	9,17	9,23	9,15
3	9,28	9,26	9,29	9,21	9,10	9,11	9,24	9,12	9,14	9,24	9,23	9,27
4	9,10	9,12	9,16	8,76	8,93	8,92	8,70	8,11	8,62	9,02	9,21	9,08
5	9,08	9,12	9,11	8,47	8,91	8,96	8,26	8,79	8,27	8,58	8,46	8,78
6	8,62	8,52	8,62	8,41	8,47	8,44	8,51	8,62	8,39	8,53	8,54	8,53
7	8,62	8,39	8,67	8,37	8,42	8,28	8,45	8,20	8,50	8,35	8,49	8,53

Tabla 10. Valores de pH promedio en los cultivos de *T. suecica* de los tratamientos con medio de cultivo ESALI y Guillard f/2 (control).

Día de cultivo	Guillard f/2	ESALI (mL L ⁻¹)		
		5	10	15
0	8,05 ±0,06a	8,09 ±0,04a	8,07 ±0,06a	8,09 ±0,04a
1	8,16 ±0,05b	8,17 ±0,05b	8,48 ±0,10a	8,43 ±0,02a
2	9,10 ±0,01b	9,11 ±0,01b	9,26 ±0,08a	9,18 ±0,04ab
3	9,28 ±0,02a	9,14 ±0,06b	9,17 ±0,06ab	9,25 ±0,02ab
4	9,13 ±0,03a	8,87 ±0,10ab	8,48 ±0,32b	9,10 ±0,10a
5	9,10 ±0,02a	8,78 ±0,27ab	8,44 ±0,30b	8,61 ±0,16ab
6	8,59 ±0,06a	8,44 ±0,03a	8,51 ±0,12a	8,53 ±0,01a
7	8,56 ±0,15a	8,36 ±0,07a	8,38 ±0,16a	8,46 ±0,09a

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

Tabla 11. Densidad poblacional ($\times 10^6$ cél. mL⁻¹) de *T. suecica* de los tratamientos cultivados con medio de cultivo ESALI y Guillard f/2 (control).

Día de cultivo	Guillard f/2			ESALI (mL L ⁻¹)									
				5			10			15			
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	
0	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14
1	0,40	0,39	0,40	0,31	0,31	0,31	0,35	0,35	0,37	0,36	0,35	0,37	0,37
2	1,05	1,04	1,04	1,00	0,90	0,88	1,23	1,26	1,27	1,08	1,31	1,22	1,22
3	1,61	1,59	1,71	1,99	1,88	1,89	2,89	2,99	2,69	1,42	1,32	1,31	1,31
4	3,03	3,12	3,05	2,69	2,55	2,54	4,42	4,88	4,99	2,28	2,37	2,46	2,46
5	3,76	3,82	3,70	4,80	4,57	4,69	5,99	6,03	6,12	2,44	2,13	2,21	2,21
6	3,62	3,75	3,52	5,65	5,79	4,59	6,57	6,56	6,79	2,38	2,09	2,10	2,10
7	3,57	3,52	3,26	5,43	5,34	5,12	6,36	6,42	6,26	1,59	1,54	1,58	1,58

Tabla 12. Valores de la Tasa de crecimiento (μ) y Tiempo de duplicación diaria (TD) poblacional de *T. suecica* de los tratamientos cultivados con medio de cultivo ESALI y Guillard f/2 (control).

PARÁMETRO	GUILLARD f/2			ESALI (mL L ⁻¹)								
				5			10			15		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
NO	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14
Nf	3,76	3,82	3,70	4,80	4,57	4,69	5,99	6,03	6,12	2,44	2,13	2,21
Día	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
μ (día⁻¹)	0,658	0,661	0,655	0,707	0,697	0,702	0,751	0,753	0,756	0,572	0,544	0,552
TD (día)	1,053	1,048	1,058	0,980	0,994	0,987	0,923	0,921	0,917	1,213	1,273	1,256

Tabla 13. Valores de la Biomasa, Absorbancia, Porcentaje de lípidos y Biomasa de lípidos de *T. suecica* de los tratamientos cultivados con medio de cultivo ESALI y Guillard f/2 (control).

Parámetro	Guillard f/2			ESALI (mL L ⁻¹)								
				5			10			15		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Biomasa (mg)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Biomasa (mg L⁻¹)	493,3	492,3	492,0	660,0	661,0	660,0	756,7	756,9	757,9	666,1	665,1	666,1
Absorbancia	0,608	0,605	0,573	0,605	0,576	0,607	0,633	0,646	0,627	0,636	0,639	0,647
Lípidos (%)	22,70	22,60	21,40	22,60	21,50	22,70	23,70	24,20	23,40	23,80	23,90	24,20
Lípidos (mg L⁻¹)	112,0	111,3	105,3	149,2	142,1	149,8	179,3	183,2	177,3	158,5	159,0	161,2