

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



**UNS**  
UNIVERSIDAD  
NACIONAL DEL SANTA

Efecto de la concentración de ensilado biológico de biofouling del cultivo suspendido de *Argopecten purpuratus* “concha de abanico” en el crecimiento poblacional, contenido de clorofila *a* y carotenos totales de *Tetraselmis suecica*, en condiciones de laboratorio.

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL  
DE BIÓLOGO ACUICULTOR**

**TESISTA:**

**Bach. Yauri Pardo, Joel**

**ASESOR:**

**Dr. Merino Moya, Juan Fernando**

**NUEVO CHIMBOTE - PERU**

**2015**

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



**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL  
DE BIÓLOGO ACUICULTOR**

Efecto de la concentración de ensilado biológico de biofouling del cultivo suspendido de *Argopecten purpuratus* “concha de abanico” en el crecimiento poblacional, contenido de clorofila *a* y carotenos totales de *Tetraselmis suecica*, en condiciones de laboratorio.

**REVISADO POR:**

---

**Dr. Merino Moya, Juan Fernando**

**ASESOR**

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



**HOJA DE CONFORMIDAD DEL JURADO EVALUADOR**

Efecto de la concentración de ensilado biológico de biofouling del cultivo suspendido de *Argopecten purpuratus* “concha de abanico” en el crecimiento poblacional, contenido de clorofila *a* y carotenos totales de *Tetraselmis suecica*, en condiciones de laboratorio.

**TESISTA:**

**Bach. Yauri Pardo Joel**

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

---

**MSc. Capa Robles, Willian**  
**Presidente**

---

**Dr. Merino Moya, Juan Fernando**

**Integrante**

---

**Blga. Acuic. Mirian Velasquez Guarniz**

**Secretaria**

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por darnos la vida y la salud.

A mis familiares por su apoyo incondicional.

Al Dr. Merino Moya, Juan Fernando por el asesoramiento del presente trabajo.

Al MSc. Willian Capa Robles por su brindarme su apoyo y sus recomendaciones.

A la Blga. Acuic. Mendoza Espinoza Sorayda, por disponer de su apoyo y tiempo en la información brindada.

A los profesores Dr. Luis Campoverde Vigo; Msc. Rómulo Loayza Aguilar; MSc. Liliana Tapia Ugaz; MSc. Juan Carhuapoma Garay; a la Blga. Acuic. Carmen Izaziga Barrera; Blga. Acuic. Mirian Velasquez Guarniz, por sus orientaciones, y demás profesores de la Escuela de Biología ya que sus enseñanzas han contribuido con nuestra formación profesional.

También agradezco a mis amigos (as) que me apoyaron en el transcurso de mi vida universitaria y la elaboración de esta tesis, a Liliana Valiente. Jeidy Cardenas; Estrella Pantoja; Cleila Carbajal; Marvin Minaya; Darwin Davalos; Melissa Valiente; Dora Rodrigues; Lady Dias; Vanessa Loarte.

Técnicos de laboratorio: Oscar Chauca, Maribel Astete y Lidia Huertas.

A Kelly Ramos por proporcionarme el material biológico del catamarán de la empresa INTERCOLD S.A.C.

## ÍNDICE GENERAL

	Páginas
<b>DEDICATORIA</b>	
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	
<b>RESUMEN</b>	
<b>ABSTRACT</b>	
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>OBJETIVOS</b>	4
Objetivo general	4
Objetivos específicos	4
<b>HIPÓTESIS</b>	4
<b>II MATERIALES Y MÉTODOS</b>	5
2.1. Diseño experimental	5
2.2. Estrategia de trabajo	5
2.1.1 Localización del experimento	5
2.2.2. Material Experimental	5
2.2.2.1. Purificación del aire	5
2.2.2.2. Tratamiento del agua de mar	6
2.2.2.3. Microalga <i>Tetraselmis suecica</i>	7
2.2.2.4. Inóculo de <i>T. suecica</i>	7
2.2.3. Preparación de medios de cultivo	7
2.2.3.1. Preparación del ensilado biológico de biofouling del cultivo de <i>A. purpuratus</i> “concha de abanico” (EBBFCA).	7
a) Preparación del yogurt	8
b) Preparación de la mezcla de insumos	8
2.2.3.2. Medio Guillard f/2	10
2.2.3.3. Medio de cultivo experimental (EBBFCA)	10
2.3. Análisis químico del EBBFCA	11
2.4. Acondicionamiento de las unidades experimentales	11
2.5. Parámetros químicos y ambientales de los cultivos algales	12

2.6.	Evaluación del crecimiento poblacional	12
2.7.	Determinación de clorofila <i>a</i> y carotenos totales	13
2.8.	Determinación de Biomasa	15
2.9.	Análisis estadístico	16
<b>III.</b>	<b>RESULTADOS</b>	17
3.1.	<b>Comportamiento de los parámetros de temperatura y pH de cultivo algal</b>	17
3.4.1.	Temperatura	17
3.1.2.	pH	17
3.2	Efecto de diferentes concentraciones del medio de EBBFCA en la dinámica de crecimiento poblacional de <i>T. suecica</i>	18
3.2.1	<b>Crecimiento poblacional</b>	18
3.2.2	<b>Tasa de crecimiento y tiempo de duplicación poblacional</b>	19
3.3	<b>Contenido de Pigmentos en <i>T. suecica</i></b>	21
<b>IV.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	24
<b>V.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	30
<b>VI.</b>	<b>RECOMENDACIONES</b>	31
<b>VII.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	32
<b>VIII.</b>	<b>ANEXOS</b>	39

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
<b>1</b>	Preparación de las unidades experimentales	5
<b>2</b>	Proporciones de los insumos utilizados para realizar el (EBBFCA)	9
<b>3</b>	Medio Guillard f/2	10
<b>4</b>	Aporte de Nitrógeno del medio EBBFCA en los tratamientos experimentales	11
<b>5</b>	Densidad Poblacional ( $\times 10^6$ cel. mL <sup>-1</sup> ) de <i>T. suecica</i> en los tratamientos cultivados con EBBFCA y grupo control (Guillard f/2).	18
<b>6</b>	Tasa de crecimiento ( $\mu$ ) y Tiempo de duplicación diaria (TD) poblacional de <i>T. suecica</i> en los tratamientos cultivados con EBBFCA y grupo control (Guillard f/2) durante el día 5 de cultivo.	19
<b>7</b>	Contenido porcentual y biomasa de clorofila <i>a</i> y caroteno total; al quinto día de cultivo de <i>T. suecica</i> en los tratamientos dosificados con EBBFCA y grupo control (Guillard f/2).	21

## LISTA DE ANEXOS

Anexo		Página
1.	Ensayo preliminar del crecimiento poblacional de <i>T. suecica</i> utilizando como medio de cultivo EBBFCA y grupo control (Guillard f/2).	40
2.	Ensayo preliminar del crecimiento poblacional de <i>T. suecica</i> utilizando como medio de cultivo EBBFCA y grupo control (Guillard f/2).	40
3.	Catamarán de la empresa INTERCOLD S.A.C.	41
4.	Ubicación del catamarán acuícola del cultivo suspendido de <i>A. purpuratus</i> de la empresa acuícola INTERCOLD S.A.C.	42
5.	Evaluación del biofouling	41
6.	Evaluación Preliminar de especies integrantes del Biofouling del cultivo suspendido de <i>A. purpuratus</i> obtenidos de la empresa acuícola INTERCOLD S.A.C.	43
7.	Preparación de la harina de biofouling de concha de abanico	43
8.	Flujograma de la preparación del inóculo de bacterias de yogurt a partir de bacterias liofilizadas de la marca <i>Sacco-Lyofast</i>	44
9.	preparación del EBBFCA	45
10.	Diagrama de la preparación del medio de cultivo experimental (EBBFCA)	46
11.	Informe del análisis químico del EBBFCA en el laboratorio COLECBI S.A.C.	47
12.	Aporte de Nitrógeno en los Tratamientos	48
13.	Protocolo empleado en la determinación de pigmentos (clorofila <i>a</i> y carotenos totales).	49

14.	Densidad poblacional ( $\times 10^6$ cél. mL <sup>-1</sup> ) de <i>T. suecica</i> con medio de cultivo EBBFCA y grupo control (Guillard f/2).	50
15.	Tratamientos experimentales de <i>T. suecica</i> al 5 <sup>to</sup> día de cultivo	50
16.	Valores de la Tasa de crecimiento ( $\mu$ ) y Tiempo de duplicación diaria (TD) poblacional de <i>T. suecica</i> con medio de cultivo EBBFCA y grupo control (Guillard f/2).	51
17.	Valores de la biomasa, absorbancia, porcentaje y biomasa de clorofilas de <i>T. suecica</i> con medio de cultivo EBBFCA y grupo control (Guillard f/2).	51
18.	Temperatura (°C) en los cultivos de <i>T. suecica</i> con medio de cultivo EBBFCA y grupo control (Guillard f/2).	52
19.	Temperatura promedio (°C) en los cultivos de <i>T. suecica</i> con medio de cultivo EBBFCA y grupo control (Guillard f/2).	52
20.	Valores de pH en los cultivos de <i>T. suecica</i> con medio de cultivo EBBFCA y grupo control (Guillard f/2).	53
21.	Valores de pH promedio en los cultivos de <i>T. suecica</i> con medio de cultivo EBBFCA y grupo control (Guillard f/2).	53

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	“Frascos lavadores de aire”	6
2	Flujograma de la preparación del EBBFCA	9
3	Solución EBBFCA para analizar en COLECBI S.A.C	11
4	Muestras de Solución patrón de EBBFCA analizadas en COLECBI S.A.C.	12
5	Protocolo empleado en la determinación de pigmentos	14
6	Variación de la temperatura promedio (°C) en los cultivos de <i>T. suecica</i> con EBBFCA y grupo control (Guillard f/2).	17
7	Variación del pH promedio en los cultivos de <i>T. suecica</i> con EBBFCA y grupo control (Guillard f/2).	17
8	Variación del crecimiento poblacional de <i>T. suecica</i> utilizando como medio de cultivo EBBFCA a concentraciones de 55; 60 y 65 mL. L <sup>-1</sup> y grupo control. (Guillard f/2)	18
9	Variación de la tasa de crecimiento ( $\mu$ ) y Tiempo de duplicación diaria (TD) poblacional de <i>T. suecica</i>	20
10	Porcentaje de la clorofilas <i>a</i> y <i>b</i> en <i>T. suecica</i> en los tratamientos dosificados con medio de cultivo EBBFCA y grupo control (Guillard f/2).	21
11	Biomasa de las clorofilas expresadas en mg L <sup>-1</sup> de <i>T. suecica</i> en los tratamientos dosificados con EBBFCA y grupo control (Guillard f/2).	22

## RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se evaluó el efecto del ensilado biológico del biofouling del cultivo de *Argopecten purpuratus*, “concha de abanico” (EBBFCA), en el crecimiento poblacional de *Tetraselmis suecica* así como su influencia en el contenido de los pigmentos clorofila *a* y carotenos totales, en condiciones de laboratorio. Para la elaboración del ensilado biológico se utilizó biofouling bajo la forma de harina (250g), y para obtener medio experimental bajo la forma de extracto se utilizó 100g de EBBFCA. Por otra parte el biofouling procedió de las linternas de la Empresa INTERCOLD S.A.C ubicada en la playa el Dorado, Chimbote, Perú. Se utilizó del EBBFCA para dosificar 55, 60 y 65 ml L<sup>-1</sup>, los que fueron comparados con el tratamiento control medio (Guillard f/2). Por otra parte los mayores crecimientos poblacionales ( $p > 0,05$ ) fueron con las concentraciones de 55 y 60 ml L<sup>-1</sup> de (EBBFCA) alcanzando 2,277 y 2,448 x 10<sup>6</sup> cel. mL<sup>-1</sup> respectivamente, por otro lado el contenido porcentual de clorofila *a* de todos los tratamientos con (EBBFCA) de fueron estadísticamente iguales entre sí ( $p < 0,05$ ), pero diferentes y mejores al tratamiento control, al día 5 de cultivo. En conclusión todos los tratamientos dosificados con medio EBBFCA tiene mayor concentración de clorofila *a* y crecimiento poblacional en comparación al grupo control.

**Palabras claves:** crecimiento, ensilado biológico, biofouling, *Tetraselmis suecica*, clorofila, carotenos.

## ABSTRACT

In this research the effect of biofouling biological silage crop of *Argopecten purpuratus*, "scallop" (EBBFCA) in *Tetraselmis suecica* population growth and its influence on the content of chlorophyll *a* and carotenoid total pigments are evaluated, under laboratory conditions. For the preparation of biological silage biofouling used in the form of flour (250g) and for experimental medium in the form of extract was used EBBFCA 100g. Moreover the biofouling proceeded Lanterns Company INTERCOLD SAC located in the Golden Beach, Chimbote, Peru. It was used to meter the EBBFCA 55, 60 and 65 ml L<sup>-1</sup>, which were compared with the control medium (Guillard f/2) treatment. Moreover the greatest population growth ( $p > 0.05$ ) were with the concentrations of 55 and 60 ml L<sup>-1</sup> (EBBFCA) reaching 2,277 and 2,448 x 10<sup>6</sup> cells.mL<sup>-1</sup> respectively, on the other hand the percentage content of chlorophyll of all treatments (EBBFCA) were statistically equal to each other ( $p < 0.05$ ) but different and better treatment control, day 5 of culture. In conclusion all treatments EBBFCA dosed medium has a higher concentration of chlorophyll *a* and population growth compared to the control group.

**Key words:** Growth, biological ensilage, biofouling, *Tetraselmis suecica*, chlorophyll, carotenos.

## I. INTRODUCCIÓN

Las microalgas han ganado relevancia en las últimas dos décadas debido al amplio rango de aplicaciones derivadas de su uso, desde la producción de biomasa para la alimentación humana y animal, su empleo en la acuicultura o su uso como biofertilizante, hasta la obtención de productos de valor terapéutico e industrial. (Gómez *et al.*, 2011). Por sus gran capacidad fotosintética, sintetizan gran número de sustancias químicas aunque son poco explorados, especialmente las de origen marino, habiéndose demostrado la presencia de características bioquímicas no encontradas en las plantas superiores, representando una oportunidad para descubrir nuevos metabolitos y producirlos de forma eficiente y económica (Ulloa, 2011).

Dentro del grupo de microalgas marinas, destaca el género *Tetraselmis*, caracterizado por ser unicelulares móviles de color verde, por la presencia de clorofila *a* y *b*, y por la facilidad de su cultivo a gran escala para ser utilizado como alimento para larvas de moluscos y crustáceos con un valor nutritivo considerable (Ulloa, 2011), encontrándose en cultivos semicontinuos 45% de proteína, 13% de carbohidratos y 32% de lípidos (Chini *et al.*, 2006); por otro lado *Tetraselmis suecica* presenta cuatro flagelos que le permiten movilizarse activamente en toda la columna de agua del recipiente de cultivo, lo que representa doble ventaja: alcanzar altas densidades e incrementar el aprovechamiento de la fuente luminosa para su crecimiento poblacional.

Su importancia comercial de la especie *T. suecica* radica en su amplio uso en acuicultura como alimento vivo para larvas de peces, moluscos y crustáceos. Sin embargo, en los últimos años se ha aprovechado la composición y facilidad de cultivo para producir metabolitos de interés comercial (Chisti, 2007).

Hosikian *et al.* (2010 *in* Ulloa, 2011), sostiene que uno de los compuestos bioactivos más destacables que pueden ser extraídos de *T. suecica* es la clorofila, que presenta interesantes aplicaciones como colorante natural con propiedades antioxidantes y antimutagénicas; Así también Carballo *et al.* (2003), destaca que *T. suecica* es rica en proteínas, lípidos y carbohidratos conteniendo  $\alpha$ -tocoferol, carotenoides (fucoxantina y  $\beta$ -caroteno) cuyas concentraciones esta función de las condiciones y al tipo de sistema de cultivo; por otro lado, Ulloa, (2011), las microalgas contienen clorofila que puede ser

usada para la industria, alimentaria, acuícola, médica y cosmética por presentar antioxidantes, evidenciándose que una dieta rica en clorofila y carotenos puede prevenir enfermedades causadas por la acumulación de radicales libres, como es el cáncer.

Por otro lado, con la finalidad de maximizar su rendimiento y reducir los costos de producción en el cultivo masivos de microalgas es muy importante considerar la tecnología más adecuada para la obtención de determinado metabolito (Harun *et al.*, 2010); en tanto que requieren de la dosificación de nutrientes, orgánicos e inorgánicos, en cantidades balanceadas para asegurar su óptimo crecimiento poblacional y biomasa, (González J. & L. Polo 2013), en tal sentido, es promisorias las excelentes posibilidades de utilizar medios de cultivos alternativos a partir de efluentes y residuos orgánicos provenientes de las diversas actividades humanas, especialmente la maricultura.

El cultivo suspendido de *A. purpuratus* “concha de abanico” es una actividad productiva de gran rentabilidad en el Perú, sin embargo el deficiente manejo de los mismos ocasionan problemas ambientales marinos (Encomendero *et al.*, 2006); los cultivos suspendidos de “concha de abanico” genera grandes volúmenes de biofouling dañando el fondo marino; cuya dinámica de crecimiento resultan perjudiciales para las empresas por su interferencia con el crecimiento por el contrario Claereboudt *et al.* (1994) y Leblanc *et al.* (2002), demostraron que la reducción del biofouling trae efectos positivos al cultivo suspendidos de *A. purpuratus*; por tanto esta actividad presenta diversos problemas, los cuales requieren ser resueltos con urgencia, comprometiendo la realización de ensayos y el uso del biofouling como medios de cultivos microalgales para la obtención de compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes y antimutagénicas para su uso en la salud humana.

Bajo este contexto se pone como alternativa la producción masiva de microalgas utilizando los residuos de la pectinicultura para la producción de pigmentos de amplio uso (industria alimentaria, farmacéutica, acuícola, cosmética, etc.) el cual puede alentar la inversión privada por el escalamiento de los resultados de laboratorio con la finalidad de incrementar la oferta laboral de profesionales y técnicos, así como mejorar la rentabilidad de las empresas dedicadas a la pectinicultura.

Ipanaqué & Paredes (2009) y Jiménez & Prada (2012), demostraron que las microalgas son capaces de metabolizar los nutrientes orgánicos e inorgánicos presentes en el ensilado biológico de desechos blandos de *A. purpuratus* (EDBCA) alcanzando  $6\ 353,3\ \mu\text{g.L}^{-1}$  de Clorofila *a*, utilizando  $80\ \text{ml.L}^{-1}$  de EDBCA, así mismo, en el laboratorio de cultivo de especies auxiliares de la Universidad Nacional del Santa se ha realizado cultivos preliminares, utilizando tratamientos de 40, 50, 60, y  $75\ \text{mL.L}^{-1}$  de EBBFCA (Merino. Com. Per., 2013), obteniéndose  $2,12 \times 10^{-6}$  cel.  $\text{ml.L}^{-1}$  con el tratamiento de  $60\ \text{ml.L}^{-1}$  al quinto día de cultivo. Por otro lado, Bold & Wynne (1985), consideraron la ventaja de reducir los negativos impactos, el cual de esta manera permite alcanzar una sostenibilidad y el mejoramiento de las condiciones de salubridad de la biota en el ambiente acuático marino.

Desde el punto de vista biológico, la fermentación bacteriana permite una mayor digestibilidad del producto, por ello las técnicas de ensilaje presentan gran potencial (Berenz, 1996), Cuya fermentación de la materia orgánica presente en el biofouling permite la obtención de una mayor variedad de nutrientes, los cuales son fácilmente asimiladas y metabolizadas por la microalga *T. suecica* para la obtención de Clorofila *a*, del mismo modo Jiménez & Prada, (2012) menciono que los ensilados son una excelente alternativa para ser utilizada en el cultivo de microalgas heterotróficas que permiten obtener mayores productividades que la producción fotosintética.

El proceso de ensilado biológico es sencillo, práctico y económico que no requiere de equipos sofisticados, el cual se tomó como método de preparación del medio de cultivo más apropiado para realizar este proyecto de investigación, aperturando la producción económica de este compuesto bioactivo como pigmento natural.

La importancia del presente trabajo de investigación radica en el uso del biofouling procedentes del cultivo suspendido de *A. purpuratus* “concha de abanico” en forma de ensilado biológico para la biotransformación para alcanzar mayores tasas poblacionales y altos niveles de clorofila *a* susceptible de ser utilizado bajo diversos fines (pigmento natural), que a la vez reduce la contaminación del ambiente marino mediante el reciclaje de los desechos los cuales posibilita el desarrollo de nuevas metodologías en la producción de microalgas.

Por tal motivo se plantea el siguiente problema ¿Cuál será el efecto en el crecimiento poblacional, contenido de clorofila *a* y carotenos totales de *T. suecica*, utilizando diferentes concentraciones de ensilado biológico del biofouling de cultivo de *A. purpuratus* “concha de abanico” en condiciones de laboratorio?

Como objetivo general se propuso, evaluar el efecto del ensilado biológico de biofouling del cultivo suspendido de *A. purpuratus* “concha de abanico” en el crecimiento poblacional, contenido clorofila *a* y carotenos totales de *Tetraselmis suecica*, en condiciones de laboratorio. Los objetivos específicos planteados fueron:

- Determinar el crecimiento poblacional cél. mL<sup>-1</sup>, tasa de crecimiento ( $\mu$ ) y tiempo de duplicación (TD) de *T. suecica* utilizando concentraciones de 55, 60 y 65 ml L<sup>-1</sup> de EBBFCA.
- Determinar el contenido de clorofila *a* y carotenos totales de *T. suecica*, utilizado como medio de cultivo concentraciones de 55, 60 y 65 ml L<sup>-1</sup> de EBBFCA.

Se planteó la hipótesis. Si en condiciones de laboratorio, se utiliza concentraciones de 55, 60 y 65 ml L<sup>-1</sup> de ensilado biológico de biofouling de concha de abanico (EBBFCA), se obtendrá el mejor crecimiento poblacional y contenido de clorofila *a* utilizando la concentración de 60 ml .L<sup>-1</sup> de EBBFCA.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Diseño experimental

Se utilizó el diseño experimental de estímulo creciente (Steel & Torre, 1992), el mismo que conto con tres tratamientos experimentales y un tratamiento control, donde cada tratamiento conto con tres repeticiones; (Tabla 1).

**Tabla 1.** Preparación de las unidades experimentales

<b>DISEÑO EXPERIMENTAL</b>	
<b>TRATAMIENTOS</b>	<b>CONCENTRACIONES</b>
<b>TC</b>	1 ml.L <sup>-1</sup> Guillard f/2
<b>T1</b>	55 ml.L <sup>-1</sup> de EBBFCA
<b>T2</b>	60 ml.L <sup>-1</sup> de EBBFCA
<b>T3</b>	65 ml.L <sup>-1</sup> de EBBFCA

### 2.2. Estrategia de trabajo

#### 2.2.1. Localización del experimento

El trabajo experimental se realizó en el laboratorio de Cultivos de Especies Auxiliares de Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional del Santa.

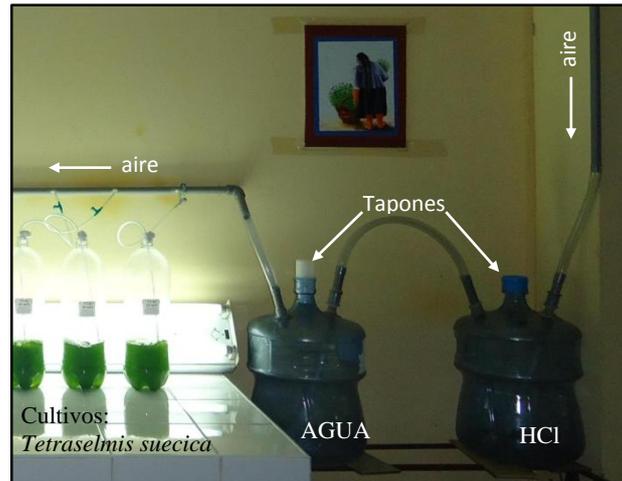
#### 2.2.2. Material Experimental

##### 2.2.2.1. Purificación del aire

Se utilizaron dos frascos grandes como “frascos lavadores de aire” de 20 litros de capacidad interconectados con una manguera de ½ pulgada de diámetro, donde el aire atravesó de la siguiente manera:

El aire ingresa al primer frasco lavador, el cual contiene cuatro litros de HCl con pH 1, cuya función principal es la eliminación de los microorganismos no deseados, evitando de esta manera la contaminación de los cultivo experimentales; Posteriormente el aire pasa al segundo frasco lavador, el cual contiene cuatro litros de agua potable evitando el paso de partículas ácidas, así mismo, como medida preventiva se midió utilizando fenolftaleína a razón de 8 gotas/1000 ml de agua potable, donde el cambio de color de agua nos indicara la existencia de acidez (Merino. Com. Per., 2013).

Durante el desarrollo del crecimiento microalgal no se presentó cambios de color en este segundo frasco, el cual indica dichos frascos no interfieren con el desarrollo del cultivo en tanto que previene de la invasión de microorganismos no deseados (Fig. 1).



**Fig. 1.** “Frascos lavadores de aire”

#### 2.2.2.2. Tratamiento del agua de mar

El agua de mar se filtró con una manga para filtrar agua de mar de  $2\mu$  de diámetro de abertura de la malla, luego se añadió 1 ml de hipoclorito de sodio por cada litro de agua de mar a preparar. Después se dejó en reposo por 24 horas, y se neutralizó con tiosulfato de sodio al 7 % utilizando 1 ml por cada litro de agua de mar y enseguida se colocó bajo aireación constante por 5 horas. (Merino. Com. Per., 2013).

El agua de mar procedió de la playa “El Dorado” ubicada en la bahía de Samanco ( $09^{\circ} 11' 20''$  L.S y  $78^{\circ} 33' 53''$  L.W), Distrito de Nuevo Chimbote, Provincia del Santa, Departamento de Ancash, Perú. Presentado 34.5 de salinidad.

#### **2.2.2.3. Microalga *Tetraselmis suecica***

La cepa de la microalga marina *T. suecica* se obtuvo del laboratorio de Cultivos de Especies Auxiliares que pertenece a la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional del Santa, la misma que fue adaptada al medio F/2 Guillard manteniéndose en condiciones axénicas. El experimento se llevó a cabo en botellas de plástico del cual se utilizó 1000 ml de capacidad efectiva para el experimento.

#### **2.2.2.4. Inóculo de *T. suecica***

El cultivo algal se preparó con agua de mar tratada y medio Guillard f/2 en 2 botellas de plástico de 2000 ml, conteniendo 1500 ml de suspensión algal c/u, con aireación e iluminación constante.

### **2.2.3. Preparación de medios de cultivo**

#### **2.2.3.1. Preparación del ensilado biológico de biofouling del cultivo de *A. purpuratus* “concha de abanico” (EBBFCA).**

El biofouling fue se obtuvo durante las faenas del “desdoble” (cambio de sistemas a los organismos según su talla) de los sistemas o “linternas” que se realizan sobre el catamarán de empresa INTERCOLD S.A.C. ubicada en la bahía de Samanco (Dpto. Ancash Perú); el biofouling fue llenado dentro de una caja de tecnopor con hielo. (cambio de sistemas a los organismos según su talla), y limpieza los organismos en cultivo retirando los organismos epibiontes de las valvas, y el exceso biofouling de los sistemas; Inmediatamente el biofouling fue trasladado hasta el Laboratorio de Cultivos de Especies Auxiliares de la Universidad Nacional del Santa de Nuevo Chimbote para el desarrollo del experimento.

En el laboratorio se procedió a evaluar la presencia porcentual en peso de las especies predominantes que compone el biofouling del cultivo suspendido *A. purpuratus* en esta compuesto de *Ciona intestinalis*, (ciona), *Semimytilus algosus* (chorito), *Gracilaria sp.* (pelillo rojo) y *Bugula nerítica*.

Se utilizó 3 Kg de biofouling y se llevó a cocción 100 °C por 20 min, luego se le secó en estufa a 65 °C por 48 horas, obteniendo 465 g. de biofouling libre de agua, posteriormente se molió y tamizo con el propósito de transformarla en harina (estado útil para la elaboración del ensilado biológico), para su posterior proceso de ensilaje.

#### **a) Preparación del yogurt**

Para realizar el ensilado biológico se hizo necesario obtener suficiente inóculo de yogurt natural, para ello se procedió a utilizar 1000 ml de agua hervida a enfriada a temperatura ambiente se añadió 150 g de leche en polvo de la marca Anchor, luego se diluyo sobre los 1000 ml de agua hervida; luego a esta leche se añadió 0.5 g. de cultivo liofilizado conocido comercialmente como cultivos lácticos (Sacco–Lyofast, el cual contiene *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus termophilus*), por último se le mezclo homogéneamente con ayuda de una varilla de vidrio y se incubó en una estufa a 45 °C por 4 horas (Berenz, 1996).

#### **b) Preparación de la mezcla de insumos**

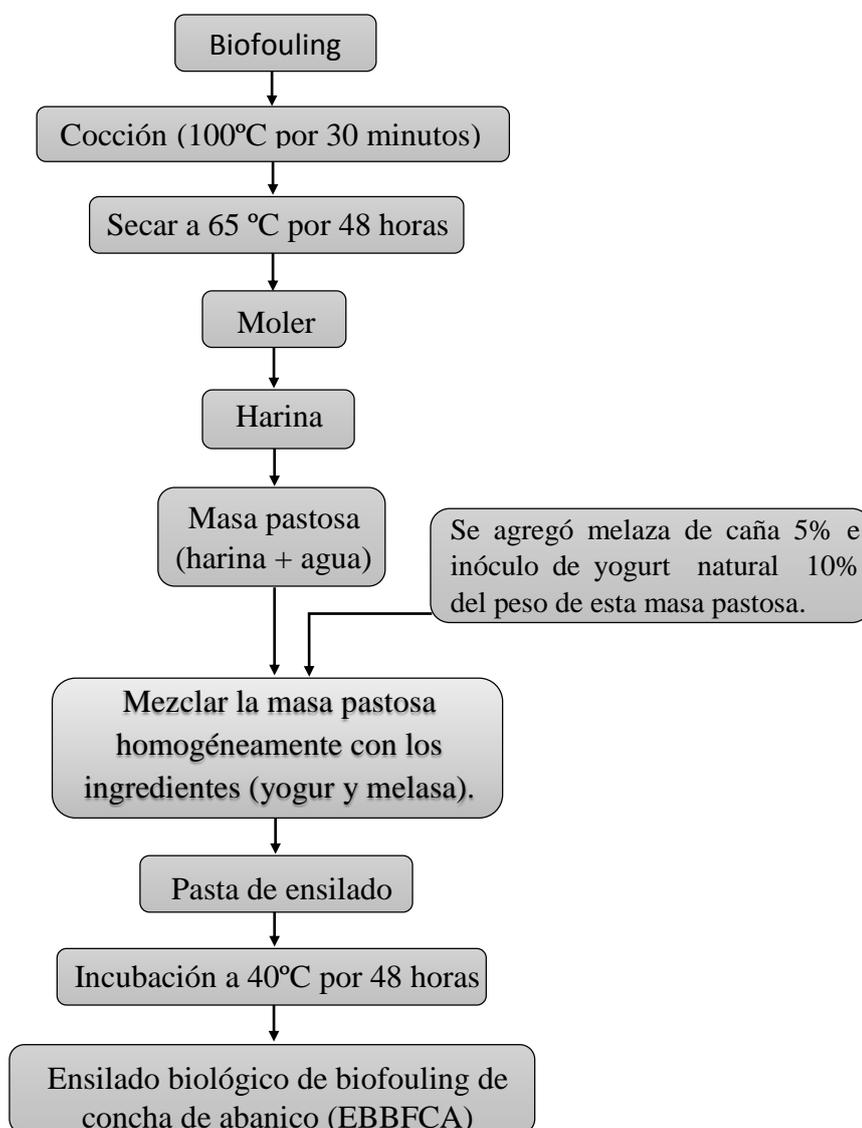
Se pesó 250 g de harina del biofouling al cual se añadió 325 ml de agua tratada (hervida), formándose una masa o “masa pastosa”, llegando a pesar entre ambos 571 g; esta agua añadida permitió luego mezclar de manera homogénea los insumos (yogurt y melaza de caña de la marca “dulce miel” procedente de Bodega & viñedos Nepeña S.R.L), de la manera siguiente:

Sobre la masa (masa pastosa) se le añadió melaza de caña y el yogurt a razón de 5% y 10% del peso total de la masa respectivamente, los cuales equivalen a 28,75 g. de melaza de caña y 57,5 g. de yogurt, cuyas proporciones fueron propuestas por Berenz, (1996) y Encomendero & Uchpa, (2001), donde estos autores a su vez demostraron que el pH no presenta variaciones significativas entre la cantidad de melaza, y el volumen de inóculo de yogurt agregado, razón por la cual para este proyecto se eligió dichas cantidades para realizar el ensilaje (Tabla 2).

**Tabla 2.** Insumos empleados para la preparación del EBBFCA

INSUMOS	CANTIDADES
Harina de biofouling (g)	250
Agua (ml)	325
Masa (g) (harina + agua)	571
Melaza (g) (5% de la masa)	28,55
Yogurt (g) (10% de la masa)	57,10

Estos ingredientes fueron mezclados dentro de un pocillo con la ayuda de una cuchara descartable por un periodo de 5 minutos y luego se llevó a incubación a 40°C por 48 horas, llegando a alcanzar un pH inicial de 6.2 y un pH final de 4,3. (Fig. 2)



**Fig. 2.** Flujograma de la preparación del EBBFCA

### 2.2.3.2 Medio Guillard f/2

El medio Guillard f/2 contiene los siguientes compuestos estándares establecidos por Guillard, (1975), el cual fue utilizado para el mantenimiento del inóculo de *T. suecica* y del tratamiento control del experimento (Tabla 3).

**Tabla 3.** Composición química del medio Guillard f/2 (Guillard, 1975).

Compuesto	Solución stock	Cantidad usada (ml)
NaNO <sub>3</sub>	75 g l <sup>-1</sup> agua	1,0
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	destilada	1,0
Solución metales traza	5 g l <sup>-1</sup> agua	1,0
vitaminas	destilada	0,5
	*	
	**	
Micronutrientes	Solución Stock (g/l)	Cantidad usada
Na <sub>2</sub> -EDTA. 2H <sub>2</sub> O		4,36g
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O		3,5g
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	9,8	1ml
ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	22	1ml
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	10	1ml
MnCl <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O	180	1ml
Na <sub>2</sub> MnO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	6,3	1ml
Aforar con agua destilada con 1L, calentar para disolver y esterilizar a 1L, calentar para disolver y esterilizar en autoclave a 120°C y 1,1Kg cm <sup>-2</sup> durante 15 minutos. Mantener en refrigeradora		
Solución vitaminas (**)	Solución Stock	Cantidad usada
A 950ml de agua destilada añadir:		
Cianocobalamina	1 g l <sup>-1</sup> agua	1ml
Biotina	destilada	10ml
Tiamina-HCl	0,1 g l <sup>-1</sup> agua	200mg
Esterilizar por filtración y mantener en un frasco ámbar en refrigeración		

### 2.2.3.3 Medio de cultivo experimental (EBBFCA)

Para la preparación del medio de cultivo se pesó 100 g de EBBFCA, el cual fue aforada a 1000 ml (100 g de EBBFCA más 900 ml con agua de mar estéril) y se vertió sobre una probeta de un litro, donde se dejó enfriar y sedimentar por 6 horas a temperatura ambiente, luego se extrajo el sobrenadante y se llenó en una botella estéril y a esta, se refrigeró a 0°C para su uso posterior.

### 2.3. Análisis químico del EBBFCA

Se llevó a analizar el contenido de nitrógeno amoniacal, nitrógeno total, fosforo y potasio al laboratorio COLECBI S.A.C. ubicado en Nuevo Chimbote, para ello se prepararon 4 botellas de vidrio de 500 ml estas fueron rotuladas, y su contenido estuvo bajo la forma de solución patrón de EBBFCA. (Fig. 3)



Fig. 3. Solución EBBFCA para analizar en COLECBI S.A.C.

### 2.4. Acondicionamiento de las unidades experimentales

Se utilizaron 12 botellas plásticas con 1000 ml de suspensión algal. Todos los cultivos se iniciaron con baja densidad poblacional ( $0,184 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup>) el cual se determinó por los conteos en el microscopio utilizando una cámara Neubauer, y se dosifico al tratamiento control con medio Guillard f/2 y los cultivos T1, T2 y T3 con la solución patrón EBBFCA, a razón de 55, 60, 65 ml L<sup>-1</sup> respectivamente; asimismo de cada uno de los tratamientos mencionados contara con tres repeticiones (Tabla 4, Fig. 4).

Tabla 4. Aporte de Nitrógeno del medio EBBFCA en los tratamientos experimentales

TRATAMIENTOS	APORTE DE NITRÓGENO EN LOS TRATAMIENTOS	
	MEDIOS DE CULTIVO	mg. Nitrógeno/L <sup>-1</sup>
TC	1 ml L <sup>-1</sup> de Guillard (f/2)	12,35
T1	55 ml L <sup>-1</sup> del EBBFCA	39,05
T2	60 ml L <sup>-1</sup> del EBBFCA	42,60
T3	65 ml L <sup>-1</sup> del EBBFCA	46,15



**Fig. 4.** Acondicionamiento de las unidades experimentales

## 2.5. Parámetros químicos y ambientales de los cultivos algales

Se registró el pH y temperatura cada 24 horas, utilizando un pHímetro digital (PH-009 III,  $\pm 0.01$  de sensibilidad), en tanto para la iluminación se utilizó 2 pares fluorescentes de 40 Watts colocadas a una distancia 15 cm de los cultivos algales. La aireación fue suministrada constantemente desde un Blower de  $\frac{1}{2}$  HP, proporcionando aireación a los cultivos, con el propósito de evitar la sedimentación algal a su vez favorecer la exposición de las algas a la luz e incrementando el contacto de los nutrientes con las algas.

## 2.6. Evaluación del crecimiento poblacional

El crecimiento poblacional se evaluó diariamente mediante el conteo en cinco cuadrantes de una cámara Neubauer y un microscopio binocular marca “Motic BA200”, Las muestras fueron extraídas con la ayuda de una pipeta de 1 ml, asimismo de esta muestra las microalgas fueron inmovilizadas con solución de lugol a fin de facilitar los recuentos. Se graficaron las curvas de crecimiento poblacional, la tasa de crecimiento específico ( $\mu$ ) (Baek & Young, 2002) y el tiempo de duplicación diaria (TD) (Griffiths M. & S. Harrison. 2008), los cuales fueron calculados utilizando datos del día de máximo crecimiento.

$$\mu \text{ (día}^{-1}\text{)} = \frac{\ln (N_f / N_o)}{T_f - T_o}$$

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

Dónde:

$N_o$  = Número inicial de células

$N_f$  = Número final de células

$T_o$  = Tiempo inicial

$T_f$  = Tiempo final

## 2.7. Determinación de clorofila *a* y carotenos totales

La determinación de pigmentos fue realizada en el Laboratorio fisiología genética y biotecnología de la Universidad Nacional de Santa, mediante el análisis espectrofotométrico, para ello se tomaron 10 ml de cultivo algal de cada repetición de los tratamientos, estas fueron centrifugadas a 5000 rpm durante 15 min; luego se procedió a retirar el sobrenadante, a continuación se extrajeron las muestras algales sedimentadas sobre una luna de reloj y se llevaron a la estufa a 45 °C por 12 horas, donde ya liofilizadas se pesó 3 mg de biomasa y se vertió a cada tubo de ensayo con tapa rosca debidamente rotulado, posteriormente sobre esta biomasa se añadió 3 ml de acetona al 90% puro, luego utilizando una varilla de vidrio se le agito homogéneamente por un periodo de 2 minutos a cada uno de los tubos de ensayo, y para asegurar la completa liberación de los pigmentos se les dejó tapados para evitar su evaporación en un ambiente oscuro, a 4 °C por 24 h; después se clarificaron por centrifugación 5000 rpm durante 15 min; Se extrajo el sobrenadante para las lecturas al espectrofotómetro; esta metodologías tomadas de Badillo *et al.*, 2010 y Ulloa, 2011; las absorbancia utilizadas fueron 470, 645 y 662 nm en un espectrofotómetro de la marca “Tuner Barstearnd Internacional”, así mismo el contenido de clorofila *a* y carotenos totales fueron estimados de acuerdo a la fórmula establecida por (Lichtenthaler & Wellburn 1985) (Fig. 5).

$$C_a = 11.75A_{662} - 2.350A_{645}$$

$$C_b = 18.61A_{645} - 3.960A_{662}$$

$$C_{x+c} = (1000A_{470} - 2.270C_a - 81.4 C_b) / 227$$

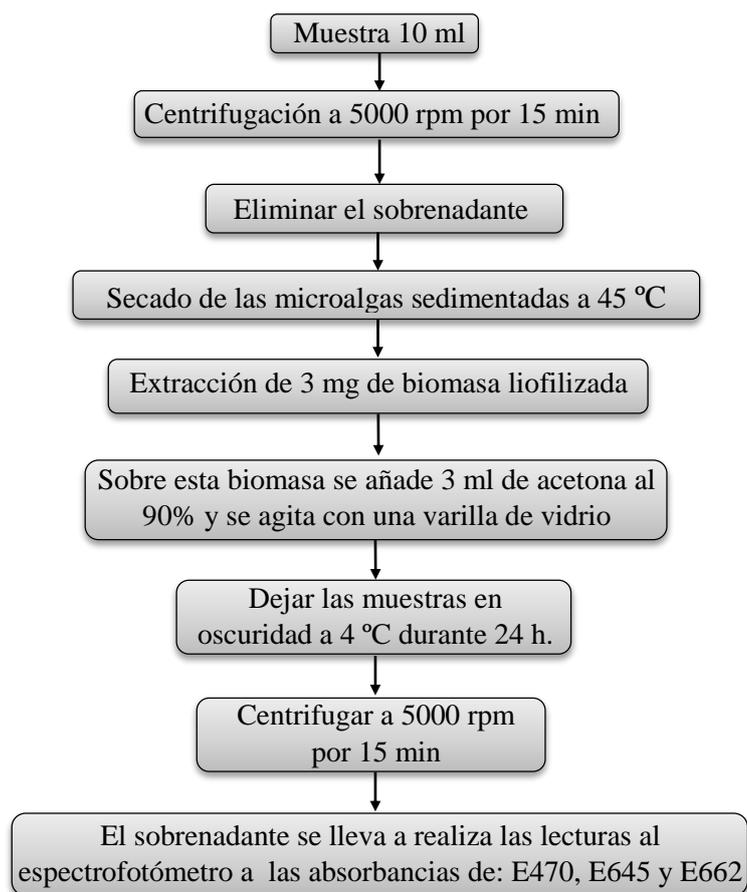
Donde:

$C_a$  = Clorofila *a*

$C_b$  = Clorofila *b*

$C_{x+c}$  = Carotenos totales

$A_x$  = Absorbancias *a* diferentes longitudes de honda expresada en nm.



**Fig. 5.** Protocolo empleado en la determinación de pigmentos (clorofila *a* y carotenos totales).

Para calcular porcentaje de clorofila *a* y carotenos totales se procedió de la siguiente manera:

$$C\% = \left[ \frac{\left( \frac{C_x \times A}{1000} \right)}{w} \right] * 100$$

C% = Porcentaje de Clorofila *a* ó Caroteno

C<sub>x</sub> = cantidad de clorofila ó Caroteno (ug mL<sup>-1</sup>)

A = Cantidad de acetona utilizada (ml)

1000 = Conversión de ug mL<sup>-1</sup> a mg mL<sup>-1</sup>

W = Peso seco de la muestra utilizada (3 ug)

Para determinar el contenido de clorofila *a* y los carotenos totales en bioma de *T. suecica* (mg L<sup>-1</sup>), se procedió de la siguiente formula:

$$C_{\text{mg.L}^{-1}} = \frac{B \times C_x\%}{100}$$

Dónde:

$C_{\text{mg.L}^{-1}}$  = Cantidad de pigmentos

B = Biomasa algal (mg.L<sup>-1</sup>)

$C_x\%$  = porcentaje de Clorofila o de Caroteno Total

100 = porcentaje

## 2.8. Determinación de Biomasa

Para la determinación de la biomasa se utilizó papel filtro de la marca Whatman de 4.0 µm de diámetro de poro y se realizó cuando se presentó el crecimiento máximo, para ello se pesó el papel filtro, luego se vertió 50 ml de muestra del cultivo algal y se dejó filtrando, al finalizar se enjuago cuidadosamente con la ayuda de una pizeta con agua destilada para retirar las sales propias del agua de mar, posteriormente se llevó a la estufa a 60°C por 12 horas. Trascurrido este periodo de tiempo se llevó a pesar en una balanza analítica marca Adam de 0.0001g. de sensibilidad donde se determinó por diferencia de pesos y los datos obtenidos se reemplazaron en la siguiente fórmula modificada de. (Sorokin, 1973)

$$\text{Biomasa mg.L}^{-1} = (P1 - P2) \times 20$$

Dónde:

P1= Peso de papel

P2= Peso de papel con microalgas

\* El factor 20 corresponde a la 20<sup>va</sup> parte de un litro, representado por 50 ml de muestra microalgal

## **2.9. Análisis estadístico**

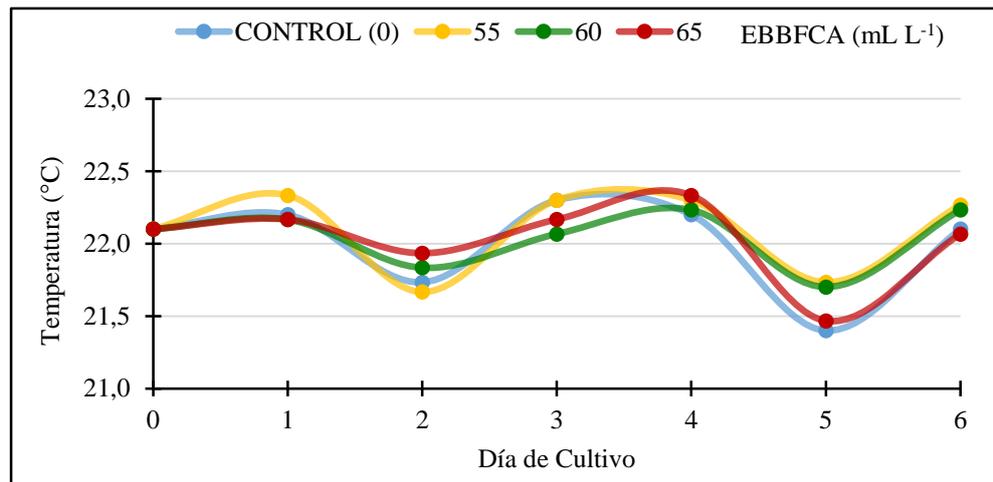
A los datos de crecimiento poblacional y contenido de clorofila a y carotenos totales, se aplicó el análisis de varianza (ANOVA) para ver si existen diferencias significativas entre los tratamientos. Luego se empleó la prueba de Tukey HDD, para identificar diferencias significativas entre los promedios; asimismo el nivel de significancia fue para todos los casos de  $p < 0,05$ . Los análisis estadísticos se desarrollaron usando los programas Microsoft Office Excel 2010 y el programa estadístico SPSS 21.0 en español para Windows.

### III. RESULTADOS

#### 3.1. Comportamiento de los parámetros de temperatura y pH de cultivo algal

##### 3.1.1. Temperatura

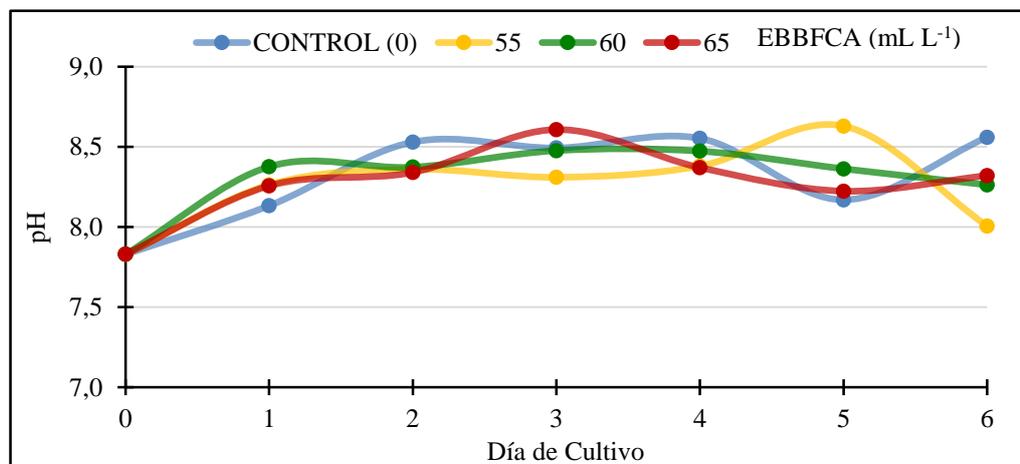
La temperatura de los cultivos fluctuó entre los 21,4 y 22,3 °C durante el periodo del experimento. Estos datos fueron estadísticamente similares ( $p > 0,05$ ) en cada día de cultivo.



**Fig. 6.** Variación de la temperatura promedio (°C) en los cultivos de *T. suecica* con EBBFCA y grupo control (Guillard f/2).

##### 3.1.2. pH

Las variaciones del pH en los cultivos de *T. suecica* encontrándose entre los límites de (7,83 - 8,63) (Fig. 11)



**Fig. 7** Variación del pH promedio en los cultivos de *T. suecica* con EBBFCA y grupo control (Guillard f/2).

Del primer al cuarto día variaciones de los valores de pH fueron estadísticamente iguales ( $p>0,05$ ) y con un ligero incremento, sin embargo en el quinto y sexto existen variaciones de pH, existiendo diferencias significativas entre si numéricamente ( $p>0,05$ ).

### 3.2. Efecto de diferentes concentraciones del medio de EBBFCA en la dinámica de crecimiento poblacional de *T. suecica*

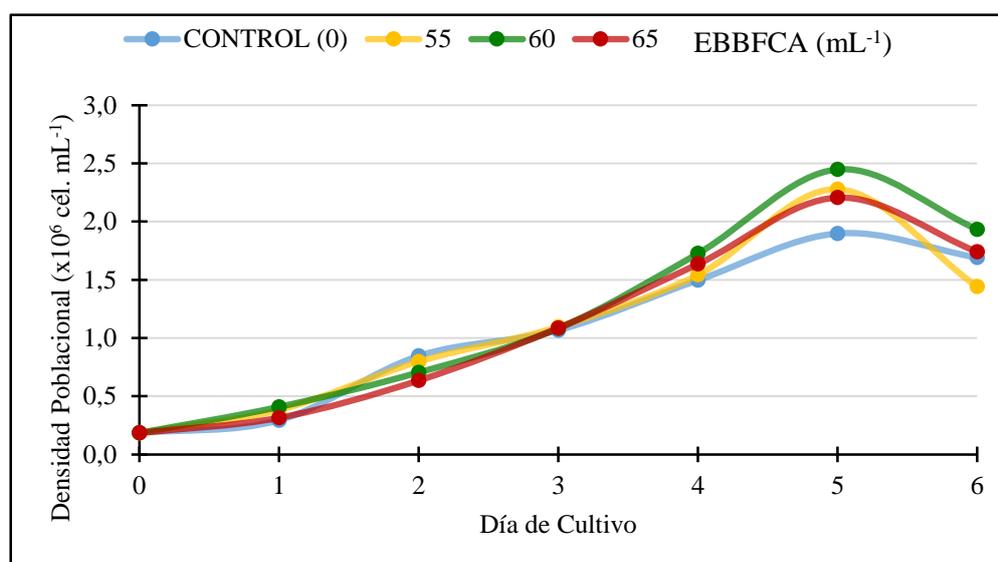
#### 3.2.1. Crecimiento poblacional

En la Tabla 5, Fig. 8, se muestran las densidades poblacionales en los cultivos de *T. suecica* para todos los tratamientos.

**Tabla 5.** Densidad Poblacional ( $\times 10^6$  cel.  $\text{mL}^{-1}$ ) de *T. suecica* en los tratamientos cultivados con EBBFCA y grupo control (Guillard f/2).

DÍA DE CULTIVO	GUILLARD F/2 CONTROL	EBBFCA ( $\text{mL L}^{-1}$ )		
		55	60	65
0	0,184 $\pm$ 0,000a	0,184 $\pm$ 0,000a	0,184 $\pm$ 0,000a	0,184 $\pm$ 0,000a
1	0,293 $\pm$ 0,033c	0,381 $\pm$ 0,048ab	0,408 $\pm$ 0,004a	0,315 $\pm$ 0,032bc
2	0,845 $\pm$ 0,228a	0,797 $\pm$ 0,349a	0,704 $\pm$ 0,106a	0,635 $\pm$ 0,109a
3	1,067 $\pm$ 0,182a	1,096 $\pm$ 0,062a	1,083 $\pm$ 0,149a	1,085 $\pm$ 0,213a
4	1,496 $\pm$ 0,103a	1,541 $\pm$ 0,162a	1,725 $\pm$ 0,082a	1,635 $\pm$ 0,151a
5	1,897 $\pm$ 0,174b	2,277 $\pm$ 0,121a	2,448 $\pm$ 0,094a	2,205 $\pm$ 0,168ab
6	1,690 $\pm$ 0,203ab	1,440 $\pm$ 0,190b	1,933 $\pm$ 0,205a	1,740 $\pm$ 0,132ab

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



**Fig. 8.** Variación del crecimiento poblacional de *T. suecica* utilizando como medio de cultivo EBBFCA a concentraciones de 55; 60 y 65  $\text{mL L}^{-1}$  y grupo control. (Guillard

La densidad inicial de los tratamientos fue de  $0,184 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup>, los cuales fueron incrementándose al transcurrir los días de cultivo.

Se observa que desde el segundo al cuarto día de cultivo las densidades en todos los tratamientos estadísticamente iguales entre sí ( $p > 0,05$ ) (Fig. 6).

En el quinto día de cultivo, se tiene la mayor densidad poblacional ( $p < 0,05$ ) de *T. suecica* en el tratamiento dosificado con 55 y 60 mL L<sup>-1</sup> de EBBFCA con  $2,277$  y  $2,448 \times 10^6$  cél. mL<sup>-1</sup>, respectivamente seguido del tratamientos de 65 mL L<sup>-1</sup> de EBBFCA con  $2,205 \times 10^6$  cél. mL<sup>-1</sup>, y el menor valor significativo ( $p < 0,05$ ) se obtuvo en el grupo control (Guillard f/2) con  $1,897$  cél. x  $10^6$  mL .L<sup>-1</sup>.

Para el sexto día de cultivo, las mayores densidades poblacionales de *T. suecica* se presentaron en los tratamientos dosificados con 60 y 65 mL L<sup>-1</sup> de EBBFCA con valores significativos ( $p < 0,05$ ) de  $1,933$  y  $1,740 \times 10^6$  cél. mL<sup>-1</sup>, respectivamente; seguido del tratamiento control con  $1,690 \times 10^6$  cél. mL<sup>-1</sup>; por último el menor valor significativo ( $p < 0,05$ ) se obtuvo en el tratamiento dosificado con 55 mL L<sup>-1</sup> de EBBFCA con  $1,440 \times 10^6$  cél. mL<sup>-1</sup>.

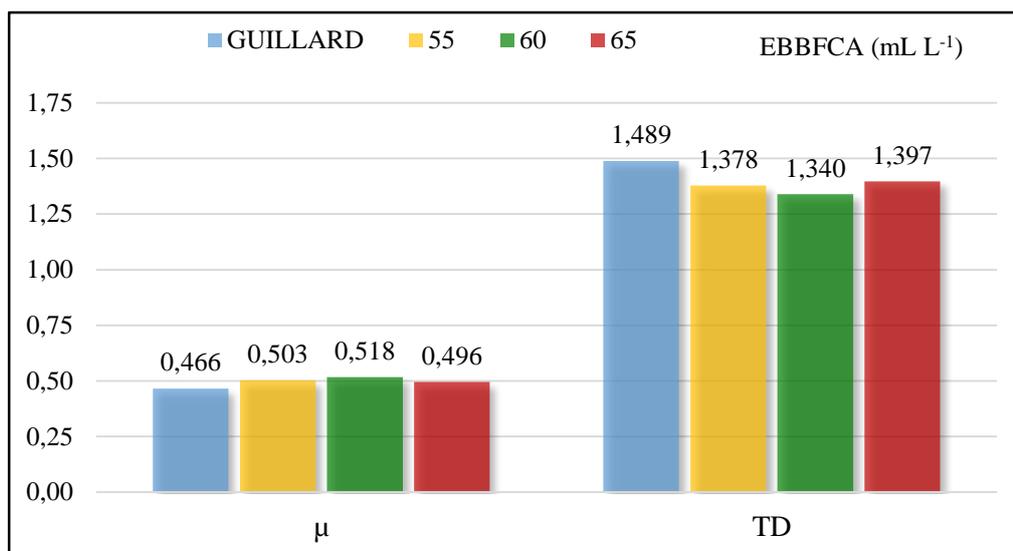
### 3.2.2. Tasa de crecimiento y tiempo de duplicación poblacional

En la Tabla 6, Fig. 9, se observan la tasa de crecimiento ( $\mu$ ) y el tiempo de duplicación diaria (TD) poblacional en los cultivos de *T. suecica* con EBBFCA y grupo control (Guillard f/2), los cuales fueron determinados al quinto día de cultivo.

**Tabla 6.** Tasa de crecimiento ( $\mu$ ) y Tiempo de duplicación diaria (TD) poblacional de *T. suecica* en los tratamientos cultivados con EBBFCA y grupo control (Guillard f/2) durante el día 5 de cultivo.

PARÁMETRO	EBBFCA (mL L <sup>-1</sup> )			
	CONTROL (0)	55	60	65
$\mu$ (día <sup>-1</sup> )	0,466 ±0,018b	0,503 ±0,011a	0,518 ±0,008a	0,496 ±0,015ab
TD (día)	1,489 ±0,057b	1,378 ±0,029a	1,340 ±0,020a	1,397 ±0,042ab

Letras diferentes de la misma fila indican diferencias significativas, con un nivel de 0,05



**Fig. 9.** Variación de la tasa de crecimiento ( $\mu$ ) y Tiempo de duplicación diaria (TD) poblacional de *T. suecica* en los tratamientos cultivados con EBBFCA y grupo control (Guillard f/2) durante el día 5.

Respecto a la tasa de crecimiento ( $\mu$ ) durante el quinto día de cultivo *T. suecica* los mayores valores significativos ( $p < 0,05$ ) se presentaron en los tratamientos dosificados con el tratamiento de 60 y 55 mL L<sup>-1</sup> de EBBFCA con 0,518 y 0,503 respectivamente, y las menores tasas de crecimiento se presentaron en los tratamientos de 65 mL L<sup>-1</sup> de EBBFCA y el grupo control con 0,496 y 0,466 día<sup>-1</sup> respectivamente. También se observó que todos los tratamientos con EBBFCA son estadísticamente similares entre sí pero a su vez diferentes y mayores con respecto al grupo control (Guillard f/2) presentando este último 0,446 día<sup>-1</sup> (Tabla 6, Fig. 9)

El tiempo de duplicación diaria (TD) durante el quinto día de cultivo de *T. suecica* se observó que el menor valor significativo ( $p < 0,05$ ) se presentó en el tratamiento dosificado con 60 mL L<sup>-1</sup> de EBBFCA con 1,340 día<sup>-1</sup>; seguido del tratamiento dosificado con 55 y 65 mL L<sup>-1</sup> de EBBFCA con valores de 1,378 y 1,397 respectivamente; por otro lado se observa que todos los tratamientos con EBBFCA son estadísticamente similares entre sí pero a su vez diferente y menores al grupo control (Guillard f/2) el cual presentó 1,489 día<sup>-1</sup> (Tabla 6, Fig. 9)

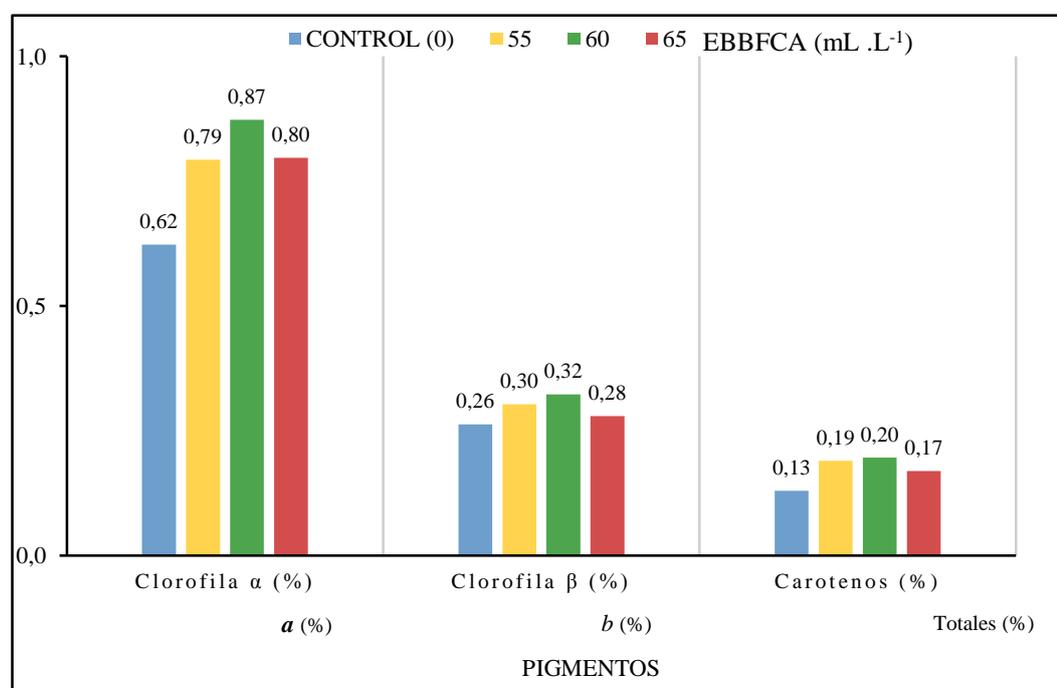
### 3.3. Contenido de Pigmentos en *T. suecica*

En la Tabla 7, y Fig. 10 y 11, se observan los valores del contenido de clorofilas *a* y *b* en porcentaje (%) y biomasa ( $\text{mg L}^{-1}$ ) de *T. suecica* al quinto día de cultivo en todos los tratamientos.

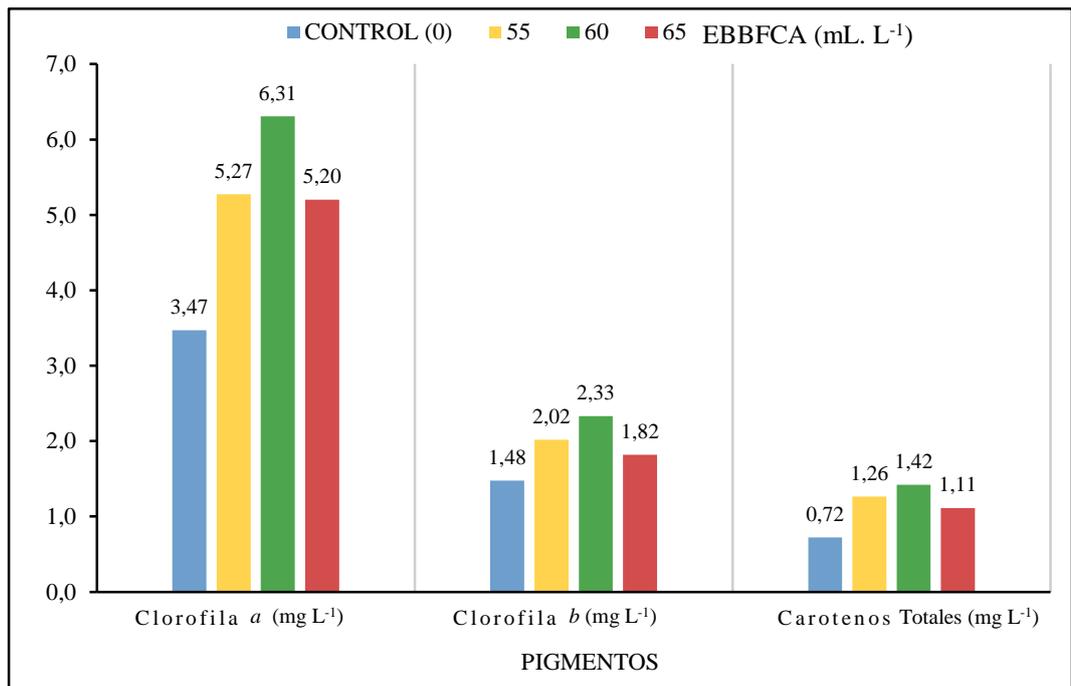
**Tabla 7.** Contenido porcentual y biomasa de clorofila *a* y caroteno total; al quinto día de cultivo de *T. suecica* en los tratamientos dosificados con EBBFCA y grupo control (Guillard f/2).

PARÁMETROS	Guillard f/2	EBBFCA ( $\text{mL L}^{-1}$ )		
	CONTROL	55	60	65
Clorofila <i>a</i> (%)	0,62 ±0,03b	0,79 ±0,02a	0,87 ±0,04a	0,80 ±0,05a
Clorofila <i>b</i> (%)	0,26 ±0,04a	0,30 ±0,03a	0,32 ±0,04a	0,28 ±0,05a
Carotenos (%)	0,13 ±0,03a	0,19 ±0,01a	0,20 ±0,02a	0,17 ±0,05a
Clorofila <i>a</i> ( $\text{mg L}^{-1}$ )	3,47 ±0,41c	5,27 ±0,27ab	6,31 ±0,43a	5,20 ±0,50b
Clorofila <i>b</i> ( $\text{mg L}^{-1}$ )	1,48 ±0,34b	2,02 ±0,28ab	2,33 ±0,29a	1,82 ±0,26ab
Carotenos ( $\text{mg L}^{-1}$ )	0,72 ±0,19b	1,26 ±0,11ab	1,42 ±0,14ab	1,11 ±0,34a

\*Letras diferentes por fila indica diferencia significativa ( $\alpha=0,05$ ).



**Fig. 10.** Porcentaje de la clorofilas *a* y *b* en *T. suecica* en los tratamientos dosificados con medio de cultivo EBBFCA y grupo control (Guillard f/2).



**Fig. 11.** Biomasa de las clorofilas expresadas en mg L<sup>-1</sup> de *T. suecica* en los tratamientos dosificados con EBBFCA y grupo control (Guillard f/2).

El mayor porcentaje de clorofila *a* ( $p < 0,05$ ) al quinto día de cultivo se presentaron en los tratamientos dosificados con 60 y 65 mL L<sup>-1</sup> de EBBFCA con 0,87 y 0,80%, respectivamente; siendo los menores valores significativos obtenidos en los tratamientos dosificados con 55 mL L<sup>-1</sup> de EBBFCA y el grupo control (Guillard f/2) con 0,79 y 0,62%, respectivamente. (Tabla 8, Fig. 8)

Del mismo modo, los mayores valores significativos ( $p < 0,05$ ) se presentaron al quinto día de cultivo, en los tratamientos dosificados con 60 y 55 mL L<sup>-1</sup> de EBBFCA, con 0,32 y 0,30%, respectivamente; y los menores en los dosificados con 65 mL L<sup>-1</sup> de EBBFCA y el grupo control (Guillard f/2) con 0,28 y 0,26%, respectivamente.

De la misma manera, el porcentaje de carotenos al quinto día de cultivo, se presentaron con los mayores valores significativos ( $p < 0,05$ ) en los tratamientos dosificados con 60 y 55 mL L<sup>-1</sup> de EBBFCA con 0,20 y 0,19%, respectivamente; siendo los obtenidos en los tratamientos dosificados con 65 mL L<sup>-1</sup> de EBBFCA y el grupo control (Guillard f/2) con 0,17 y 0,13 % respectivamente con menores valores significativos ( $p < 0,05$ ) (Tabla 8 y Fig. 8).

En cuanto al contenido de clorofila *a* en biomasa ( $\text{mg L}^{-1}$ ) de *T. suecica* al quinto día de cultivo, fue significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) en el tratamiento dosificado con  $60 \text{ mL L}^{-1}$  de EBBFCA con  $6,31 \text{ mg L}^{-1}$ ; seguido del tratamiento de  $55 \text{ mL L}^{-1}$  con  $5,27 \text{ mg L}^{-1}$  respectivamente; y los menores valores significativos ( $p < 0,05$ ) corresponden al tratamiento con  $65 \text{ mL L}^{-1}$  de EBBFCA y el tratamiento control (Guillard f/2) con  $5,20 \text{ mL L}^{-1}$  y  $3,47 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente. (Tabla 8 y Fig. 9)

Asimismo, el contenido de clorofila *b* en biomasa ( $\text{mg L}^{-1}$ ) de *T. suecica* al quinto día de cultivo, se presentaron con los mayores valores significativos ( $p < 0,05$ ) en los tratamientos dosificados con  $60$  y  $55 \text{ mL L}^{-1}$  de EBBFCA con  $2,33$  y  $2,02 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente; y los menores valores significativos ( $p < 0,05$ ) se obtuvieron con  $65 \text{ mL L}^{-1}$  de EBBFCA y grupo control (Guillard f/2) con  $1,82$  y  $1,48 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente. (Tabla 8), (Fig. 9).

Por último, el mayor contenido de carotenos totales de *T. suecica* al quinto día de cultivo, se presentaron con los tratamientos dosificados con  $60$  y  $55 \text{ mL L}^{-1}$  de EBBFCA con  $1,42$  y  $1,26 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente; y los menores valores significativos ( $p < 0,05$ ) se obtuvieron con  $65 \text{ mL L}^{-1}$  de EBBFCA y grupo control (Guillard f/2) con  $1,11$  y  $0,72 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente (Tabla 8), (Fig. 9).

#### IV. DISCUSIÓN

El empleo de residuos generados por la actividad maricultural para la formulación de medios de cultivo alternativos implica la incorporación de carbono y nitrógeno orgánicos que serán eficientemente aprovechadas por las microalgas. En esta investigación se realizaron cultivos de *T. suecica* en condiciones mixotróficas, ya que contó con aporte de nitrógeno dado por el EBBFCA, una fuente de luz, y entrada de CO<sub>2</sub> proveniente del medio ambiente por la aireación suministrada; esta forma de nutrición también se contrasta con lo afirmado por Jimenez B. & C. Prada. (2012) mencionaron que el ensilado de los desechos blandos de concha de abanico (EDBCA) aportan grandes cantidades de nitrógeno derivados del contenido proteico a su vez el aprovechamiento simultáneo de luz, CO<sub>2</sub> y sustratos orgánicos, de esta manera la microalga *T. suecica* desarrolla su capacidad de nutrición mixotrófica.

También en anteriores trabajos se ha evaluado el contenido proteico de los ensilados observándose que son ricas en compuestos nitrogenados (Encomendero & Uchpa 2002) con valores de 45.12 %; adicionalmente durante el proceso de ensilaje se producen diversas sustancias nitrogenadas y carbonadas orgánicas.

En este trabajo de investigación durante la elaboración del ensilado estuvo dentro de los índices normales de pH respecto a los ensilados biológicos, Spanopoulos, (2010) señala que, tienen valores de pH superiores a 4.1 lo que representa la ventaja de no requerir neutralizar por lo tanto el EBBFCA al ser aforado a 1 Litro con agua de mar para la obtención de solución no presenta bajos tenores de pH en los cultivos de *T. suecica*.

Respecto al crecimiento, todos los cultivos experimentales crecieron similarmente al control debido a la presencia de nutrientes orgánicos e inorgánicos en el EBBFCA, observándose que los mayores crecimientos poblacionales se obtuvieron al día 5, en los cultivos dosificados con 60 ml.l<sup>-1</sup> de EBBFCA (2,448 cél ml<sup>-1</sup>) seguidos de aquellos dosificados con 55 ml.l<sup>-1</sup> de EBBFCA (2,277 cél. ml<sup>-1</sup>), y con 65 ml l<sup>-1</sup> de EBBFCA (2,205 cél ml<sup>-1</sup>), por ultimo con el medio Guillard f/2 (1,897 cél ml<sup>-1</sup>).

En este sentido, es importante resaltar que todos los cultivos de *T. suecica* dosificados con EBBFCA y Guillard f/2 a partir del quinto día en adelante presentaron las densidades más bajas al parecer debido a desbalances nutricionales o agotamiento de nutrientes. (Tabla 6, Fig. 6).

En a la población obtenida en este trabajo de investigación, se pudo contrastar con lo reportado por la FAO. (2006), donde considera que las cosechas de cultivo batch de *T. suecica* se realizaron a una densidad aproximada de  $2 \times 10^6$  cél.mL<sup>-1</sup> y en los cultivos semicontinuos a  $1,5 \times 10^6$  cél. mL<sup>-1</sup>.

Estas densidades pueden aumentarse, dentro ciertos límites, incrementando la intensidad de luz y manteniendo el pH de entre 7,5 a 8,2. Así también en la experiencia realizada por Fabregas J. *et al.*, (1984) en cultivos en batch de *T. suecica* alcanzan densidades de  $1,3 \times 10^6$  cel. mL<sup>-1</sup> utilizando distintas concentraciones de NaNO<sub>3</sub>; de manera similar Piña (2007) cultivando *T. suecica* con Guillard f/2 alcanzó densidades poblacionales de  $1.74 \times 10^6$  cel. mL<sup>-1</sup> y con uso de urea  $1.8 \times 10^6$  cel. mL<sup>-1</sup>; en contraste a los valores de crecimiento mencionados por estos autores, son menores a la poblaciones obtenidas en este experimento, cuyos crecimientos poblacionales alcanzaron  $2,277$  y  $2,448 \times 10^6$  cel. mL<sup>-1</sup> utilizando las dosificaciones de 55 y 60 mL.L<sup>-1</sup> de EBBFCA ( $p > 0,05$ ) respectivamente, considerando a ambas como las concentración más adecuada para que *T. suecica* aproveche eficientemente los nutrientes, especialmente las fuentes de nitrógeno y carbono orgánicos

Por otro lado con respecto a la nutrición de la microalga *T. suecica* Ipanaqué & Paredes, (2009) han encontrado un óptimo crecimiento; utilizando 80 mL.L<sup>-1</sup> de EDBCA (ensilado de desechos blandos de concha de abanico) por el alto contenido de nitrógeno y diversos nutrientes derivados de las proteínas, lípidos, carbohidratos, en relación al medio Guillard f/2, constituida exclusivamente con sales minerales.

El aporte de aminoácidos como fuente de nitrógeno, carbono y energía, posibilita la nutrición heterotrófica de *T. suecica* con los subsiguientes incrementos de las tasas de crecimiento. En tal sentido Barclay *et al.*, (1994), consideran que la dosificación de los cultivos microalgales con nutrientes orgánicos, principalmente carbono y nitrógeno, conlleva a la optimización de la fotosíntesis y alto grado de control del proceso que

puede facilitar el rápido crecimiento así como mayor producción y fácil mantenimiento de un monocultivo. Adicionalmente este tipo de cultivos posibilitan la reducción de los costos de producción por las altas densidades obtenidas y las facilidades que implica las técnicas de procesamiento de suspensiones algales altamente densas en relación a los cultivos normalmente realizados con medios de cultivo minerales.

Con respecto al contenido de nitrógeno, Ponte & Ruiz. (2013), afirman que la degradación de proteínas presente en los medios orgánicos producirá nitrógeno orgánico e inorgánico, siendo el nitrógeno orgánico mucho más aprovechable que el nitrógeno inorgánico.

Es en este sentido, mientras el medio Guillard f/2 aporta 12,35 mg L<sup>-1</sup> de nitrógeno, los tratamientos con 55, 60 y 65 ml.L<sup>-1</sup> de EBBFCA aportan 39,05; 42,6 y 46,15 mg L<sup>-1</sup> respectivamente (Tabla 4).

Por razones económicas el medio de cultivo Guillard f/2 no está orientado a la producción masiva, sino a cultivos a nivel de laboratorio (Darley, 1987), además en esta fuente nitrogenada es inorgánica (nitrato de sodio) y su asimilación por *T. suecica* requiere mayor consumo de energía para su reducción; mientras que en el ensilado, el nitrógeno es orgánico y de fácil asimilación por la microalga, debido a sus características nutricionales heterotróficas, por otro lado, se observa la composición química del EBBFCA (710 mg/L<sup>-1</sup> de nitrógeno total), que al dosificarse con 55, 60 y 65 ml L<sup>-1</sup> de EBBFCA contendrán 39,05; 42,60 y 46,15 mg.L<sup>-1</sup> de nitrógeno, respectivamente, asimismo el medio Guillard proporciona 12,35 mg.L<sup>-1</sup> de nitrógeno inorgánico, por lo tanto el EBBFCA aporta mayor cantidad de nitrógeno. (Tabla 5)

La microalga *T. suecica* aprovecha óptimamente los nutrientes de EBBFCA, ya que al incrementar el crecimiento y la pigmentación en relación a los controles, estaría demostrando dicha capacidad. Además es importante la participación de la fuente y concentración de nitrógeno en la obtención de importantes cambios en el crecimiento y composición bioquímica de una especie microalgal (Utting, 1985; Kaplan *et al.*, 1986; Vieira y Klaveness, 1986; Vonshak, 1986; Wikfors, 1986), y según los resultados el nitrógeno orgánico contenido en el ensilado permite su acumulación en los pigmentos algales permitiendo su producción masiva mediante la utilización del EBBFCA como medio de cultivo alternativo de la microalga marina *T. suecica*.

Desde el punto de vista de su productividad, la utilización del nitrógeno en pigmentos algales y su influencia en la composición bioquímica es debido a variaciones en sus concentraciones (Richmond, 1986; Cohen, 1986). En este sentido el alto contenido de nitrógeno orgánico ( $710 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) en la solución de EBBFCA permite obtener altos valores de pigmentos ( $6,31 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) de clorofila *a* en los cultivos dosificados con  $60 \text{ ml}\cdot\text{L}^{-1}$  de EBBFCA; que son superiores como lo reportado por Fabregas *et al.*, (1987a) utilizando fertilizantes, extracto de suelo y micronutrientes que aportan  $28 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de nitrógeno los que permiten obtener  $4.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de clorofila *a*.

Desde el punto de vista nutricional, la presencia de una amplia elementos inorgánicos tales como N, P, K, Mg, Ca, S, Fe, Cu, Mn y Zn requeridos para el crecimiento algal (Krauss, 1958; O'Kelly, 1968), procedentes del proceso de ensilaje y del material orgánico utilizado ensilado biológico del Biofouling de “concha de abanico” son eficientemente metabolizados por la microalga *T. suecica*. En consecuencia, la utilización del EBBFCA para la producción de biomasa y pigmentos algales representan una alternativa importante para reducir los costos de producción masiva y contribuir a minimizar los impactos negativos de las actividades mariculturales en el medio ambiente marino.

En relación al contenido de pigmentos, Serpa & Calderón (2006) hallaron evidencias que sustentan que la cantidad de clorofila se correlaciona positivamente con la densidad o biomasa celular y que las fuentes de nitrógeno promueven la acumulación de clorofila que a su vez es un indicador del crecimiento poblacional, fundamentado en que los mayores niveles de clorofila promueven mayor producción de oxígeno y radicales oxidantes con efectos positivos en la dinámica de crecimiento.

Los resultados evidencian que a mayor producción de biomasa mayor contenido de pigmentos (Tabla 7 y Fig. 11) y que en el día 5 la producción de biomasa en el tratamiento dosificado con  $60 \text{ ml}\cdot\text{L}^{-1}$  de EBBFCA ( $721 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) se obtuvo mayores contenidos de clorofila *a* ( $6,31 \text{ mg L}^{-1}$  que corresponde al 0,87%) y caroteno ( $1,42 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  que corresponde al 0,2%). estos datos se corroboran con los mencionados por Spolaore *et al.*, (2006), las microalgas son ricas en clorofila que comprenden de 0,5% a 1% de peso seco y carotenoides desde 0,1 a 0,2% de peso seco y hasta 14% de peso seco para  $\beta$ -caroteno de *Dunaliella sp.* Asi también se comparó con otra especie

(*Tetraselmis gracilis*) por Baek J & B. Young (2002), donde utilizó un medio enriquecido con nitrógeno y fosforo encontró que *Tetraselmis gracilis* presenta clorofila *a* 4,68 mg·L<sup>-1</sup>, por otra parte, Ulloa (2011) utilizando Guillard obtuvo 0,75% de clorofila *a*, demostrándose de esta manera la ventaja de utilizar EBBFCA para el crecimiento y desarrollo de *T. suecica* en la mejor producción de clorofila *a*. (0,87%).

Es importante destacar que el metabolismo de los macro y micronutrientes presentes en el EBBFCA por las células de *T. suecica* es tan eficiente que todos los cultivos alcanzan mayores porcentajes de pigmentos en comparación al grupo control (Guillard f/2).

En consecuencia la presencia de nutrientes nitrogenados y carbonados orgánicos en el EBBFCA, inferidos de su contenido de proteínas y carbohidratos, son los responsables de la formación y acumulación de pigmentos fotosintéticos, considerándose a estos pigmentos como reserva de nitrógeno y que juegan un papel interactivo muy importante en el crecimiento algal (Liotenberg *et al.*, 1996; Raven, 1988).

El contenido de pigmentos en las microalgas depende de varios factores, entre ellos de nutriente, en este sentido, Jiménez y Prada (2012), comprobaron utilizando 80 ml.L<sup>-1</sup> de EDBCA en los cultivos de *T. suecica* obteniendo 6,35 mg.L<sup>-1</sup> y 0,85% de clorofila *a*; de manera similar se obtuvo en este experimento, considerándose como la mejor dosificación 60 ml.L<sup>-1</sup> de EBBFCA con 6,31 mg L<sup>-1</sup> y 0,87% de clorofila *a* frente a 3,47 mg.L<sup>-1</sup> y 0,62% del grupo control (Guillard f/2), existiendo diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre ellos. (Tabla 8, Fig. 8).

Respecto al contenido de caroteno el tratamiento dosificado con 60 ml.l<sup>-1</sup> de EBBFCA fue el que presento mayor cantidad de carotenos totales (1,42 mg L<sup>-1</sup>), similar a los dosificados con 55, y 65 ml.L<sup>-1</sup> de EBBFCA con (1,26 mg L<sup>-1</sup>) y (1,1 mg L<sup>-1</sup>) respectivamente, pero estadísticamente diferentes ( $p > 0.05$ ) al tratamiento control Guillard f/2 (0,72 mg.L<sup>-1</sup>). Por otro lado los tratamientos con 55 y 60 ml.L<sup>-1</sup> de EBBFCA no presentan diferencias significativas entre sí ( $p > 0.05$ ). (Tabla 8 y Fig. 8)

Respecto al contenido de carotenos totales el tratamiento dosificado con 60 ml.L<sup>-1</sup> de EBBFCA (1,42 mg.L<sup>-1</sup>) numéricamente fue mayor de todos los tratamientos, pero estadísticamente iguales al tratamiento de 55 ml.L<sup>-1</sup> EBBFCA; asimismo fue estadísticamente similar ( $p > 0.05$ ) al tratamiento control (Guillard f/2) y al de 65 ml.L<sup>-1</sup>

de EBBFCA con 0,72 y 1,11 mg.L<sup>-1</sup> respectivamente. En consecuencia se considera que la dosificación de 60 ml.L<sup>-1</sup> de EBBFCA es la más adecuada para que *T. suecica* aproveche eficientemente los nutrientes presentes en el EBBFCA. (Tabla 08 y Fig. 9)

Finalmente durante los cultivos se determinaron los valores de pH y temperatura cuyas variaciones se encuentran dentro de los índices normales que va desde 7,83 a 8,63 de pH y la temperatura de 21,4 y 22,3 °C; coincidiendo con lo reportado por Silva *et al.*, (2011) por lo que estos parámetros no han influido en el crecimiento poblacional ni en el contenido de pigmento de *T. suecica*.

## V. CONCLUSIONES

- los mayores crecimientos poblacionales de *T. suecica* se presentaron en los tratamientos dosificados con 55 y 60 mL L<sup>-1</sup> de EBBFCA alcanzando 2,277 y 2,448 x10<sup>6</sup> cél. mL<sup>-1</sup> respectivamente, siendo entre ellos estadísticamente iguales entre sí (p<0.05).
- El contenido porcentual de clorofila *a* en todos los cultivos *T. suecica* dosificados con EBBFCA fueron estadísticamente iguales entre sí (p<0.05), pero diferentes y mejores al tratamiento control, al día 5 de cultivo.
- El contenido porcentual de caroteno en los cultivos de *T. suecica* al quinto día son estadísticamente iguales entre sí (p<0.05).
- Las mayores tasas de crecimiento ( $\mu$ ) al quinto día de cultivo se presentaron en los tratamientos dosificados con el tratamiento de 60 y 55 mL L<sup>-1</sup> de EBBFCA con 0,518 y 0,503 día<sup>-1</sup> respectivamente.
- El menor tiempo de duplicación diaria (TD) al quinto día de cultivo se presentó en el tratamiento dosificado con 60 mL L<sup>-1</sup> de EBBFCA con 1,340 día<sup>-1</sup> seguido del tratamiento dosificado con 55 y 65 mL L<sup>-1</sup> de EBBFCA con valores de 1,378 y 1,397 respectivamente.
- Todos los tratamientos dosificados con medio EBBFCA tiene mayores concentraciones de clorofila *a* y crecimiento poblacional en comparación al grupo control (Guillard f/2).

## VI. RECOMENDACIONES

- Realizar experimentos en cultivos masivos utilizando EBBFCA a fin de establecer una metodología que permita evaluar el crecimiento de *T. suecica* para la obtención de Clorofila *a* y carotenos totales.
- Evaluar el cultivo microalga *T. suecica* utilizando dosificaciones diarias de EBBFCA para evaluar para la producción de clorofila *a* y carotenos totales
- Evaluar los costos de producción algal utilizando el EBBFCA como medio de cultivo alternativo para los cultivos masivos de *T. suecica*.
- Evaluar los parámetros de pH, temperatura y salinidad en cultivos al aire libre y su relación con la dinámica de crecimiento poblacional y contenido de clorofila *a* y carotenos totales de *T. suecica* utilizando EBBFCA.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Badillo M.; Galindo M.; Gallardo A.; Lizama G.; U.; Palomino G.; Arena M. & X. Chiappa. 2010. Manual de Prácticas de Ecología Acuática, Universidad Nacional Autónoma de México, Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación, Facultad de Ciencias, 98p.
- Baek J & B. Young 2002. Growth Characteristics of Five Microalgal Species Isolated from Jeju Island and Four Microalgal Stock Strains in Hatchery. Department of Oceanography, College of Ocean Sciences, Cheju National University, Jeju 690-756. Volume 17(2): 117-125 9p.
- Barclay. W; Meagerk & J. Abril. 1994. Heterotrophic production of long Chain omega- 3 fatty acids utilizing algae and algae-like. *Journal of Applied Phycology* 6: 123-129.
- Berenz, Z. 1996. Ensilado de Residuos de Pescado. *In XI Curso Internacional de Procesamiento de Productos Pesqueros*. Instituto Tecnológico Pesquero del Perú. Callao, Perú 9-31p.
- Bold, H. & M. Wynne. 1985. Introduction to the Algae. New Jersey: Prentice Hall. USA.
- Carballo E, Tuan P, Janssen M. & R. Wijffels 2003. Vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol) production by marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* and *Tetraselmis suecica* in batch cultivation. *Biomolecular Engineering* 20 139-147.
- Chini G, Rodolfi L, Biondi N, & N, Tredicci 2006. Productivity and photosynthetic efficiency of outdoor cultures of *Tetraselmis suecica* in annular columns. *Aquaculture* 261:932-943
- Chisti F. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 25:294 –306.

- Claereboudt M; Bureau D; Cote J. & J. Himmelman. 1994. Fouling development and its effect on the growth of juvenile giant scallops (*Placopecten magellanicus*) in suspended culture. *Aquaculture*. Vol. 121, no. 4, p. 327-342.
- Cohen, Z. 1986. Products from microalgae. En: Richmond, A. ed. *Handbook of Microalgal Mass Culture*. Boca Raton, Florida. CPC Press. pp: 421-454.
- Darley, W. 1987. *Biología de las Algas*. Enfoque Fisiológico. México, Editorial Limusa. 236 p.
- Encomendero E. & F. Uchpa. 2002. Producción de ensilado biológico de subproductos de concha de abanico (*Argopecten purpuratus*). Universidad Nacional del Santa - Chimbote Perú. p. 292 - 298.
- Encomendero E; Merino F. & F. Uchpa. 2006. Efecto de los poliquetos epibiontes sobre la concha de abanico, *Argopecten purpuratus*, cultivada en el Dorado. Universidad Nacional del Santa. Chimbote- Perú.
- Encomendero E. & F. Uchpa. 2001. Evaluación del ensilado biológico a partir de desechos de “Concha de abanico” *Argopecten purpuratus*, de la empresa ACUAPESCA S.A.C (Casma - Perú), Universidad Nacional del Santa, Nuevo Chimbote 30p.
- Fabregas J, Abalde J, Herrero C, Cabezas B & M. Veiga 1984, Growth of the marine microalga *Tetraselmis Suecica* In Batch Cultures With Different Salinities And Nutrient Concentrations, Departamento de Microbiología, Facultad de Farmacia y Medicina, Isevier Science Publishers B.V., Amsterdam - Printed in The Netherlands, Universidad de Santiago, Santiago de Compostela (Spain), *Aquaculture*, 42 (207 - 2015), 9p
- Fabregas J., Toribio L., Abalde J., Cabezas B. & C. Herrero 1987a. Approach to Biomass Production of the Marine Microalga *Tetraselmis suecica* (Kyllin) Butch

- Using Common Garden Fertilizer and Soil Extract as Cheap Nutrient Supply in Batch Cultures. Departamento de Microbiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago, Santiago de Compostela, Spain. *Aquacultural Engineering* 6 (141 – 150) 10p.
- Fabregas J, Herrero C, Cabezas B. & J. Abalde 1987b. Growth and biochemical variability of the marine microalga *Chlorella stigmatophora* in batch cultures with different salinities and nutrient gradient concentration. Departamento de Microbiología, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, España. Volume 22, Issue 3, 1987, pages 269-276. 10p
- FAO. 2006. Cultivo de bivalvos en criadero “Un manual práctico” Organización De Las Naciones Unidas Para La Agricultura Y La Alimentación. Documento Técnico De Pesca. Roma 198 p.
- Gómez J; García T; Gómez V; Garbayo I. & C. Vílchez 2011. Las microalgas, nuevos caminos hacia alimentos funcionales. I Jornadas del Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario. Departamento de Química y CCMM, Facultad de CC. Experimentales, Universidad de Huelva, 4p.
- González J. & L. Polo 2013, 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. Nuevo Chimbote – Perú 40p.
- Griffiths M. & S. Harrison. 2008. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *J Appl Phycol* (2009) 21:493–507. 15p.
- Guillard, R. 1975. Culture of Phytoplakton for feeding marine invertebrates. *In* Smith, L & H. Chnadley. (eds). Culture of marine invertebrates animal, Plenum Press. London, England. 29 - 60 p.

- Harun R; Singh M; Forde G. & M. Danquah 2010. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14:1037–1047.
- Hosikian A; Lim S; Halim R. & M. Danquah. 2010. Chlorophyll Extraction from Microalgae: A Review on the Process Engineering Aspects. *International Journal of Chemical Engineering*; Edit. Ravichandra Potumarthi, Department of Chemical Engineering, Monash University, Victoria 3800, Australia, 11p.
- Ipanaqué J. & Y. 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 Biólogo Acuicultor. Universidad Nacional del Santa. Chimbote, Perú. 48p.
- Kaplan, D., A. Richmond, Z. Dubinsky & S. Aarons. 1986b. Algal nutrition. En: *Handbook of Microalgal Mass Culture*. Richmond, A. (ed.), pp: 447-447. SPB. Academic publishing Bv, the Hague.
- Krauss, R.W. 1958. Physiology of the fresh-water algae. In: *Annual Review of Plant Physiology*, 68: 439-442.
- Jimenez 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 *a* y carotenos totales de *Tetraselmis suecica*, en condiciones de laboratorio. Tesis para optar el Título de Biólogo Acuicultor. Universidad Nacional del Santa, Escuela académico profesional de Biología en Acuicultura, Nuevo Chimbote. 48p.
- Baek J. & B. Young. 2002. Growth Characteristics of Five Microalgal Species Isolated from Jeju Island and Four Microalgal Stock Strains in Hatchery. Department of Oceanography, College of Ocean Sciences, Cheju National University, Jeju 690-756 Volume 17(2): 117-125, 2002. 9p.

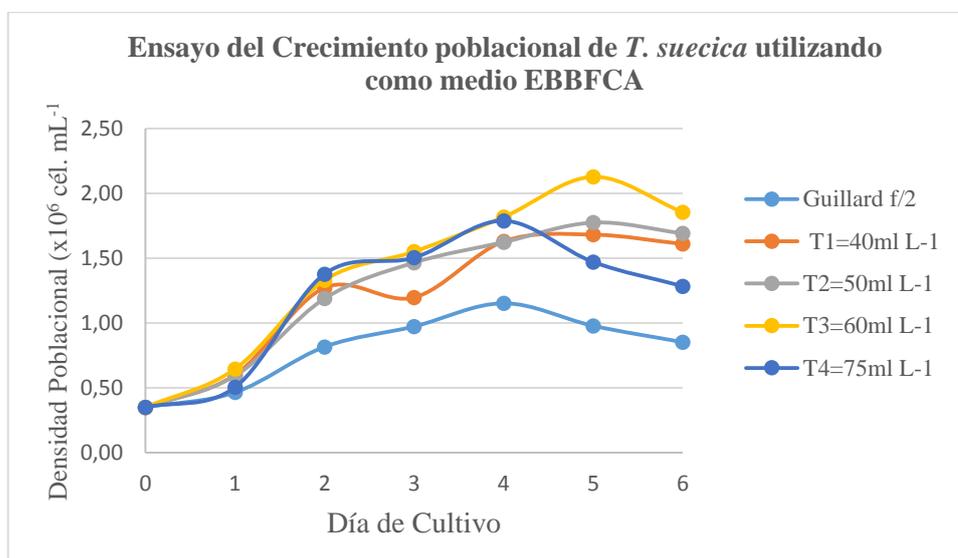
- Leblanc A.; Landry T. & G. Miron. 2002. Fouling organisms in a mussel cultivation bay: their effect on nutrient up take and release. Department de biology University de Moncton, Nouveau-Brunswick. Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci 2431:1-16.
- Lichtenthaler, H. & A. Wellburn. 1985, Determination of total carotenoids and chlorophylls A and B of leaf in different solvents. Biol. Soc. Trans. 11 591-592p.
- Liotenberg, S., D. Campell, R. Rippka, J. Houmard & N. Tandeau de Marsac. 1996. Effect of the nitrogen source on phycobiliprotein synthesis and cell reserves in a chromatically adapting filamentous cyanobacterium. Microbiology. 142:611-622.
- Moronta, R., Mora R. & Morales. 2006. Respuestas de la microalga *Chlorella* Sarokinina al pH, salinidad y temperatura en condiciones axénicas y no axénicas. Rev. Fac. Agrono-luz., 23:28 – 43.
- O'Kelly, J.C. 1968. Mineral nutrition of algae. *In: Annual Review of Plant Physiology*, 19: 89-112.
- Olvera, R.; Ríos, E. & Vicente, V. 2003. Manual de técnicas para el cultivo y extracción de Bioproductos a partir de Microalgas. México. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB). Instituto Politécnico Nacional (IPN). 70 p.
- Piña P., Medina M., Nieves M., Leal S., López J. y M. Guerrero 2007. Cultivo de cuatro especies de microalgas con diferentes fertilizantes utilizados en acuicultura. Laboratorio de Ecofisiología y Cultivo de Organismos Acuáticos, Facultad de Ciencias de Mar, Universidad de Sinaloa, Mexico. *Rev. Invest. Mar.* 28(3):225-236. 12p.
- Ponte G. & M. Ruiz. 2013, Efecto del extracto acuoso de harina de pescado en el crecimiento poblacional y contenido de B-caroteno en *Dunaliella salina*, en condiciones de laboratorio Escuela Académico profesional de Biología En Acuicultura. 59p.

- Raven, J. 1988. Limits to growth. En: Microalgal Biotechnology. Borowitzka, M. & Borowitzka, L. (eds), pp: 257-287.
- Richmond, A. & E. Becker. 1986. Technological aspect of mass cultivation. A general outline. En: Handbook of Microalgal Mass Culture. Richmond, A. (ed.), pp: 25-44. CRC Press Inc. Boca Ratón, Florida.
- Serpa, R. & A. Calderón 2006. Efecto de diferentes fuentes de nitrógeno en el contenido de carotenoides y clorofila de cuatro cepas peruanas de *Dunaliella salina* Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima – Perú. Rev. Ecología aplicada pp 93,99. ISSN 1726-2216.
- Silva J.; Vásquez V. & F. Merino 2011. Producción de biomasa de *Tetraselmis suecica* empleando agua de mar con sanguaza. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Trujillo. Scientia Agropecuaria 2(2011) 13 – 23. 11p.
- Sorokin, C. 1973. Dry weight, packed cell volume and optical density. 321–343 p. En: Stein, J. R. (Ed.). Hand book of phycological methods. Culture methods and growth measurements. Cambridge University Press. Cambridge, MA.USA. 448 p.
- Spolaore P.; Joannis C.; Duran E. & I. Arsene. 2006, Commercial Applications of Microalgae, Laboratoire de Génie des Procédés et Matériaux, Ecole Centrale Paris, Vol. Paris France. 101, No. 2, 87–96. 10p.
- Steel, R. & J. Torre. 1992. Bioestadística principios y procedimientos. Editorial Graf América. México 622p.
- Spanopoulos M., Ponce J., Barba G., Ruelas J., Tiznado, M., Hernández C. & K. Shirai 2010. Producción de ensilados biológicos a partir de desechos de pescado, del ahumado de atún aleta Amarilla (*Thunnus Albacares*) y del fileteado de tilapia (*Oreochromis sp*), para la Alimentación de Especies Acuícolas. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. Vol. 9, (Nº. 2) 167-178. 12p.

- Utting, S. 1985. Influence of nitrogen availability on the biochemical composition of three unicellular marine algae of commercial importance. *Aquacult. Eng.* 4: 175-190.
- Ulloa R. 2011. Inducción de Productos Bioactivos en la Microalga Marina *Tetraselmis suecica* .para optar al grado de Doctora por la Universidad de Santiago de Compostela Santiago de Compostela, Departamento De Ingeniería Química. 220p.
- Vieira, A. & D. Klaveness. 1986. The utilization of organic nitrogen compound as sole nitrogen source by some freshwater phytoplankton. *Nord. J. Bot.* 6:93-97.
- Vonshak, J. 1986. Laboratory techniques for the cultivation of microalgae. En: *Handbook of Microalgal Mass Culture*. Richmond, A. (ed.), CRC Press Inc. Boca Raton, Florida. pp: 117-145.
- Wikfors, G. 1986. Altering growth and gross chemical composition of two microalgae molluscan foos species by varyng nitrate and phosphate. *Aquaculture* 59: 1-14.

## VIII. ANEXOS

**Anexo 1.** Ensayo preliminar del crecimiento poblacional de *T. suecica* utilizando como medio de cultivo EBBFCA y grupo control (Guillard f/2).



**Anexo 2.** Ensayo preliminar del crecimiento poblacional de *T. suecica* utilizando como medio de cultivo EBBFCA y grupo control (Guillard f/2).

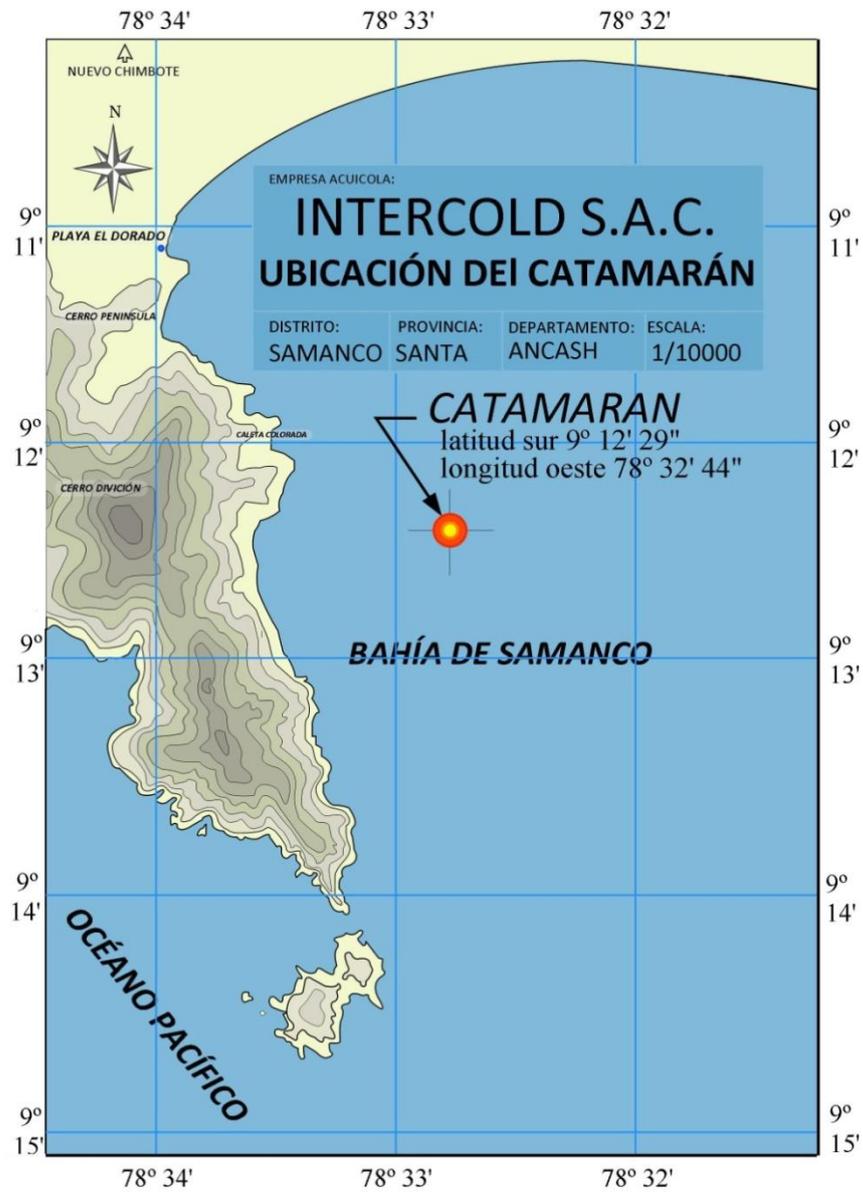
DIAS	CONTROL	EBBFCA			
	Guillard f/2	T1=40ml L <sup>-1</sup>	T2=50ml L <sup>-1</sup>	T3=60ml L <sup>-1</sup>	T4=75ml L <sup>-1</sup>
0	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35
1	0,46	0,60	0,59	0,65	0,50
2	0,82	1,27	1,19	1,33	1,38
3	0,97	1,20	1,47	1,55	1,50
4	1,15	1,63	1,62	1,82	1,79
5	0,98	1,68	1,78	2,13	1,47
6	0,85	1,61	1,69	1,86	1,28

\* Datos del ensayo realizado en laboratorio de cultivos de especies auxiliares de la universidad nacional del Santa de Chimbote.

**Anexo 3.** Catamarán de la empresa INTERCOLD S.A.C. (1a); biofouling (1b); caja para el transporte (1c).



**Anexo 4.** Ubicación del catamarán acuícola del cultivo suspendido de *A. purpuratus* de la empresa acuícola INTERCOLD S.A.C.



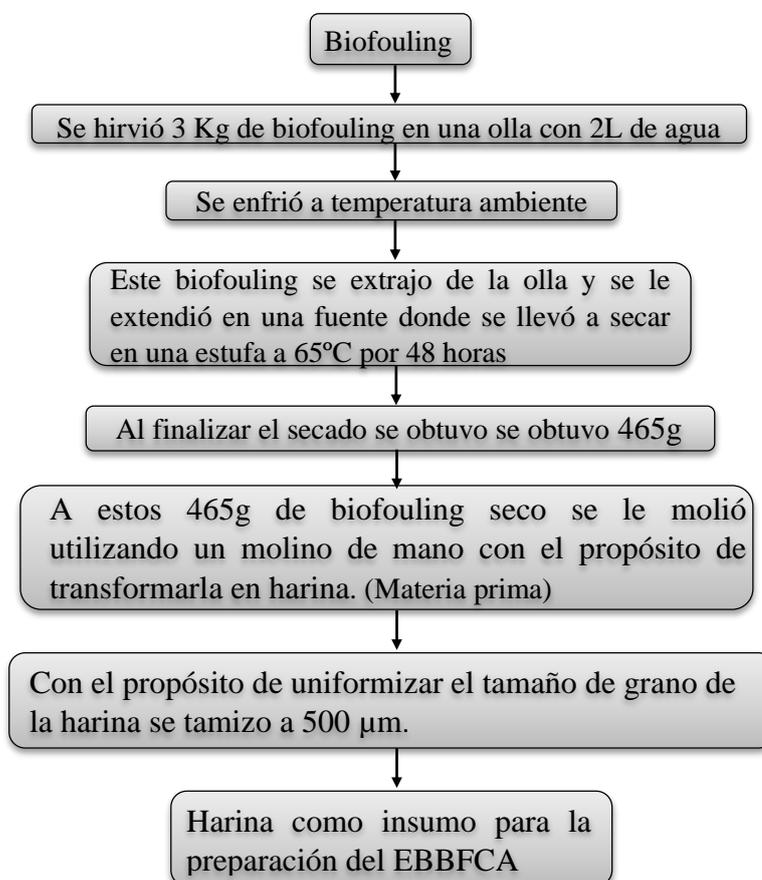
**Anexo 5. Evaluación del biofouling:** se esparció una porción de biofouling que fue tomado al azar (3a); se formó grupos para la evaluación (3b)



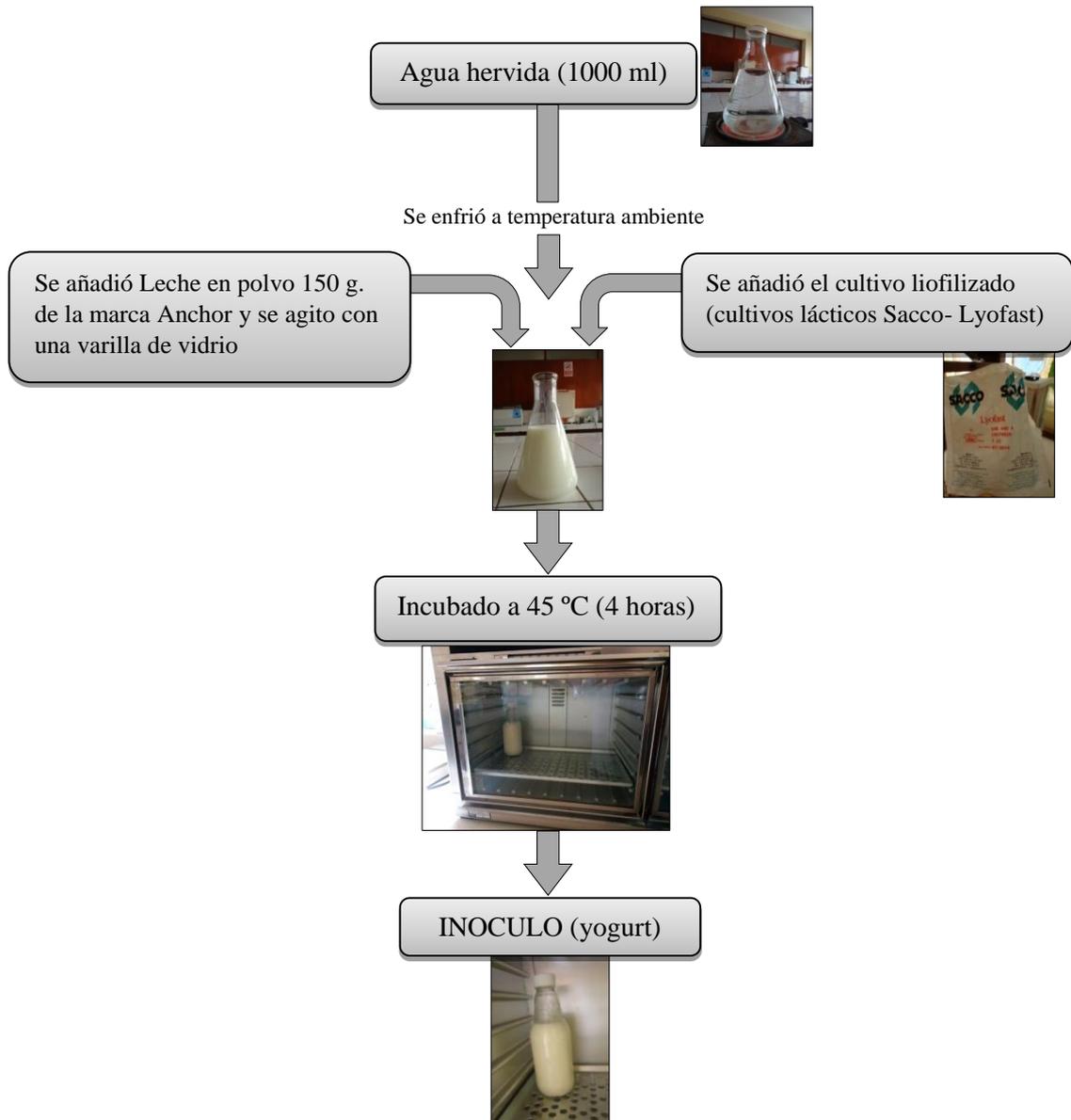
**Anexo 6.** Evaluación Preliminar de especies integrantes del Biofouling del cultivo suspendido de *A. purpuratus* obtenidos de la empresa acuícola INTERCOLD S.A.C.

ESPECIES	MUESTRA										Peso total (n°)	número total de organismos (N°)
	1 <sup>ra</sup>		2 <sup>da</sup>		3 <sup>ra</sup>		4 <sup>ta</sup>		5 <sup>ta</sup>			
	Gramos (g)	Cantidad (n°)										
<i>Ciona intestinalis</i>	175	602	126	64	124	53	167	49	10	51	602	819
<i>Semimytilus algosus</i>	22	190	18	136	32	306	18	136	18	245	108	1013
<i>Gracilaria sp &amp; Bugula nerítica</i>	11	-	20	-	24	-	13	-	14	-	82	colonia
Otras especies	0,4	1,17	0,58	3	0,19	1	0	0	0	0	1,17	5,17
<b>Peso y número de organismos</b>	<b>208.4</b>	<b>793.2</b>	<b>164.6</b>	<b>203</b>	<b>180.2</b>	<b>360</b>	<b>198</b>	<b>185</b>	<b>42</b>	<b>296</b>	<b>793.2</b>	<b>1837.2</b>

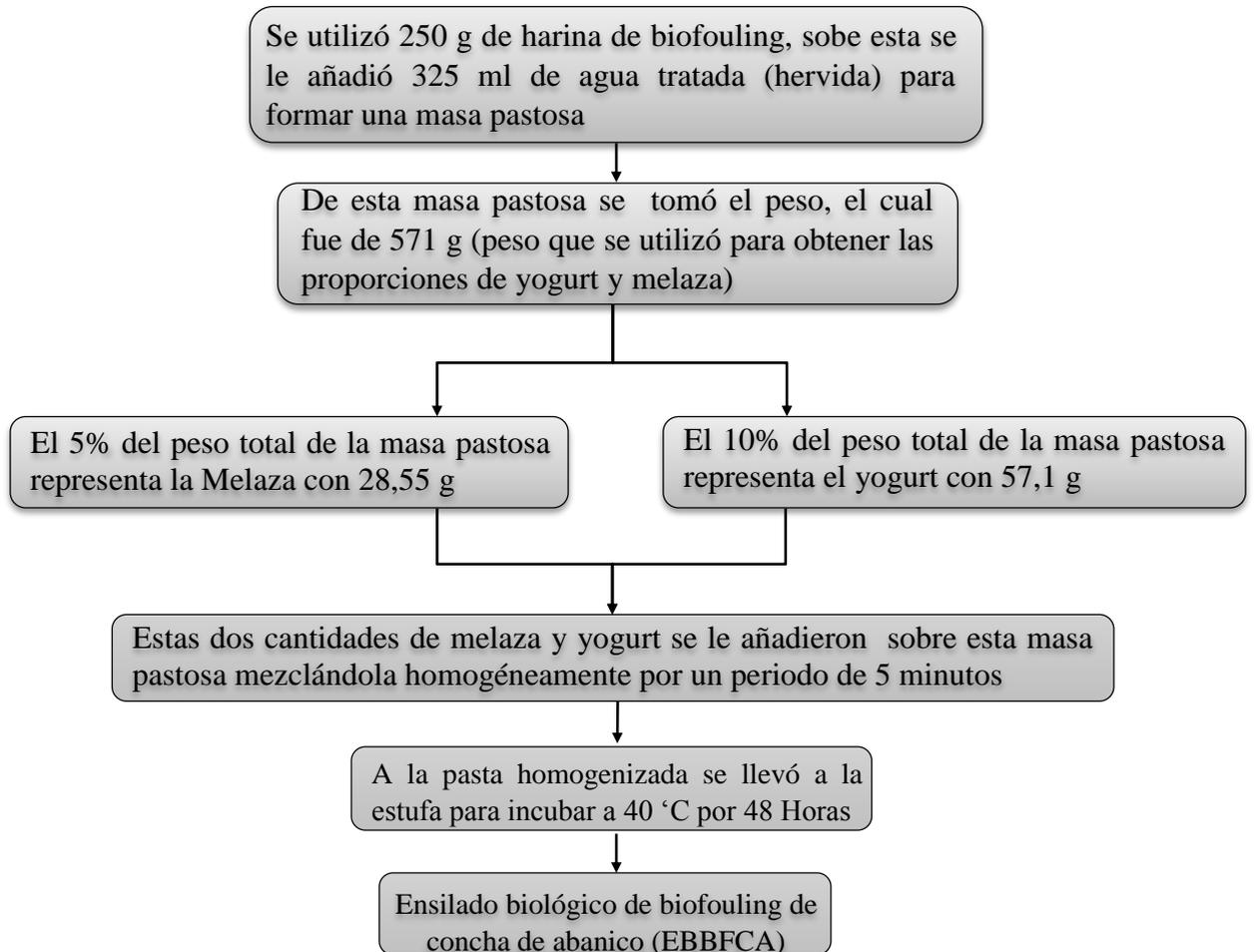
**Anexo 7:** Preparación de la harina de biofouling de concha de abanico



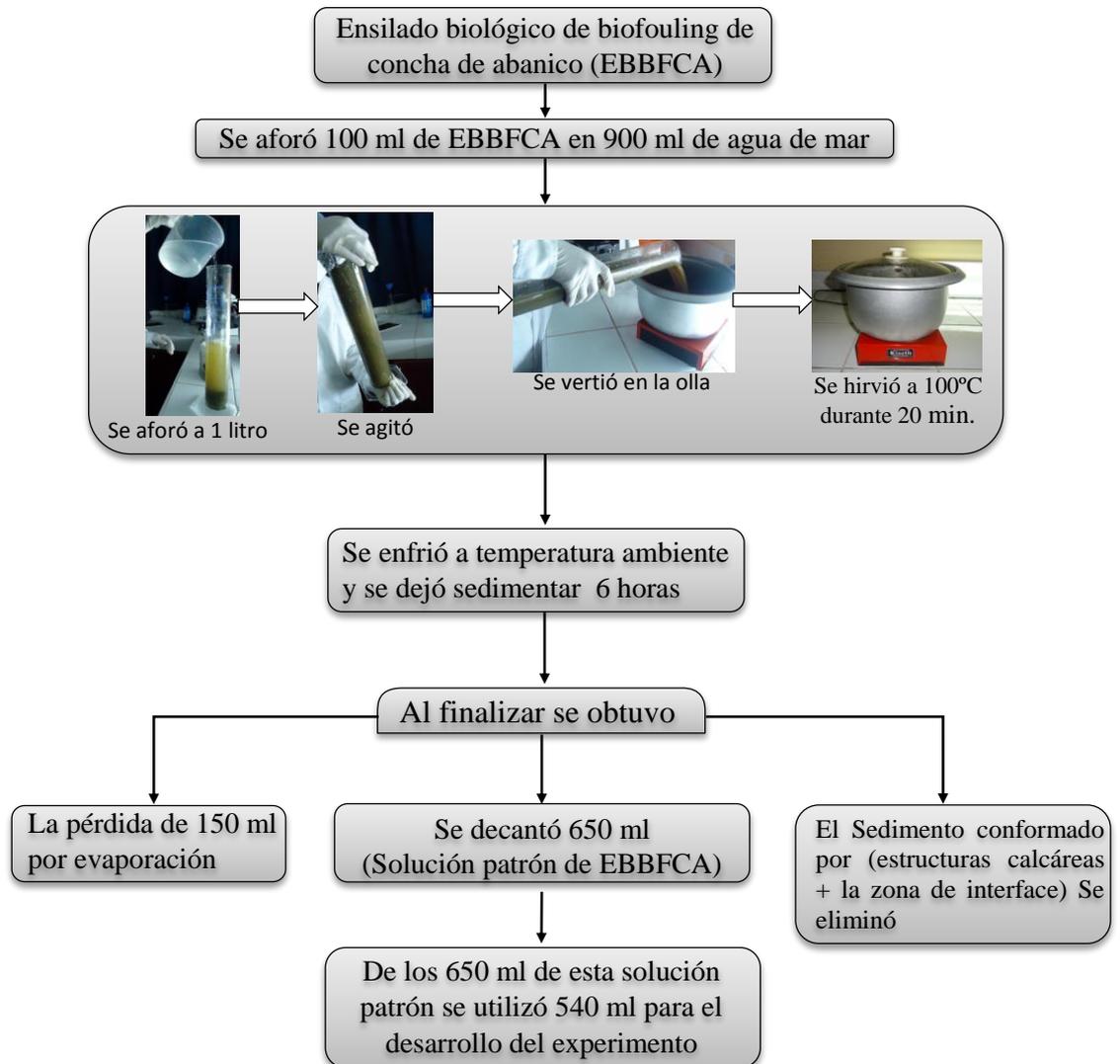
**Anexo 8:** Flujograma de la preparación del inóculo de bacterias de yogurt a partir de bacterias liofilizadas de la marca *Sacco-Lyofast*

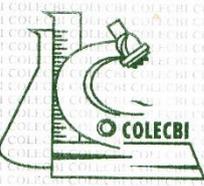


**Anexo 9:** preparación del EBBFCA



**Anexo 10.** Diagrama de la preparación del medio de cultivo experimental (EBBFCA)





CORPORACIÓN DE LABORATORIOS DE ENSAYOS  
CLÍNICOS, BIOLÓGICOS E INDUSTRIALES

**“COLECBI” S.A.C.**

REGISTRADO EN LA DIRECCIÓN GENERAL DE POLÍTICAS Y DESARROLLO PESQUERO - PRODUCE

Pág. 1 de 1

**INFORME DE ENSAYO N° 1889-14**

SOLICITADO POR : YAURI PARDO JOEL  
DIRECCIÓN : Mz. D Lote 4 Alto Perú Chimbote.  
PRODUCTO DECLARADO : ENSILADO BIOLÓGICO.  
CANTIDAD DE MUESTRA : 04 muestras x 600mL c/u aproximadamente.  
PRESENTACIÓN DE LA MUESTRA : En frasco de vidrio transparente.  
FECHA DE RECEPCIÓN : 2014-06-20  
FECHA DE INICIO DEL ENSAYO : 2014-06-20  
FECHA DE TERMINO DEL ENSAYO : 2014-06-23  
CONDICIÓN DE LA MUESTRA : En buen estado.  
ENSAYOS REALIZADOS EN : Laboratorio Subcontratado.  
CODIGO COLECBI : SS 000879-14

**RESULTADOS**

ENSAYOS	MUESTRA
	ENSILADO BIOLÓGICO
Nitrógeno Amoniacal (mg/L)	20,9
Nitrógeno Total (mg/L)	710
Potasio (mg/L)	189,0
Fósforo (mg/L)	887,0

**METODOLOGIA EMPLEADA**

Nitrógeno Amoniacal : COVENIN 1269-80 1980  
Nitrógeno Total : UNE-EN ISO 5983-2 Parte 2 Dic. 2006.  
Potasio : EPA 200.7  
Fósforo : EPA 200.7

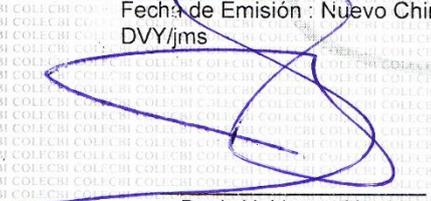
**OBSERVACIÓN** : Este documento al ser emitido sin el símbolo de acreditación, no se encuentra dentro del marco de la acreditación otorgada por el Indecopi SNA.

**NOTA :**

- Muestra recepcionada en Laboratorios COLECBI S.A.C.
- Los resultados presentados corresponden sólo a la muestra ensayada.
- Estos resultados de ensayos no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto e como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce.

Fecha de Emisión : Nuevo Chimbote, Junio 23 del 2014.

DVY/jms

  
Denis M. Vargas Yepéz  
Jefe de Laboratorio  
Físico Químico  
COLECBI S.A.C.

LC-MP-HRIE  
Rev. 03  
Fecha 2012-07-27

PROHIBIDA LA REPRODUCCION TOTAL O PARCIAL DE ESTE INFORME  
SIN LA AUTORIZACION ESCRITA DE COLECBI S.A.C.

Urb. Buenos Aires Mz. A - Lt. 7 | Etapa - Nuevo Chimbote - Telefax: 043-310752  
Nextel: 839\*2893 - RPM # 902995 - Apartado 127  
e-mail: [colecbi@speedy.com.pe](mailto:colecbi@speedy.com.pe) / [medioambiente\\_colecbi@speedy.com.pe](mailto:medioambiente_colecbi@speedy.com.pe)  
Web: [www.colecbi.com](http://www.colecbi.com)

## Anexo 12. APOORTE DE NITRÓGENO EN LOS TRATAMIENTOS

### Aporte de nitrógeno del tratamiento Control (Guillard f/2)

Se sabe que el medio Guillard f/2 contiene como principal aportador de nitrógeno al  $\text{NaNO}_3$ , esta molécula se añade a razón de 75g/L, por otro lado esta molécula presenta una masa molar de (85g/mol); de donde la masa atómica del nitrógeno es 14.0067u

\* Unidad de masa atómica unificada (u)

### Obtención de la cantidad de nitrógeno Del Guillard f/2

Masa molecular	Nitrógeno (N)
85 g/mol	14
75 g/mol	X
<hr/>	
X	= 12,35

\*"X" es la cantidad de nitrógeno a encontrar.

\* las flechas corresponde a la orientación del cálculo de regla de tres simple.

### Interpretación:

En el medio Guillard f/2 se encuentra 12,35 mg. Nitrógeno/L<sup>-1</sup>

### Aporte de nitrógeno del Tratamiento con 55 ml L<sup>-1</sup> EBBFCA

En los análisis realizados a la solución patrón de EBBFCA por el laboratorio COLECBI S.A.C. Se halló 710 mg/L<sup>-1</sup> de nitrógeno.

Cantidad de EBBFCA	Nitrógeno (N)
1 ml	0,71mg/L <sup>-1</sup>
55ml	T <sub>(55)</sub>
<hr/>	
T <sub>(55)</sub>	= 39,05

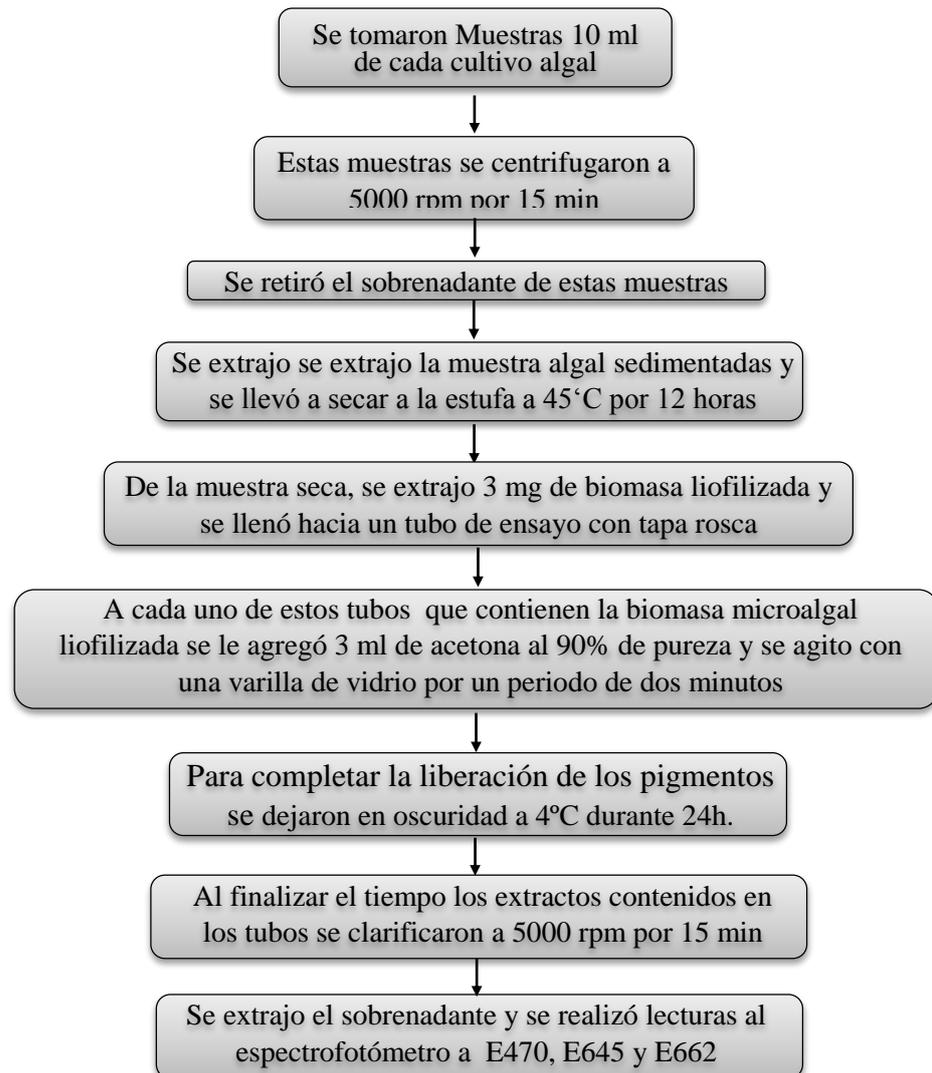
\* T<sub>(55)</sub> representa el tratamiento con 55 ml l<sup>-1</sup> de EBBFCA

\* Se procedió de la misma manera para los tratamientos 60 y 65 ml L<sup>-1</sup> EBBFCA

### Interpretación:

55 ml l<sup>-1</sup> de EBBFCA aporta 39,05 mg. de Nitrógeno/L<sup>-1</sup>

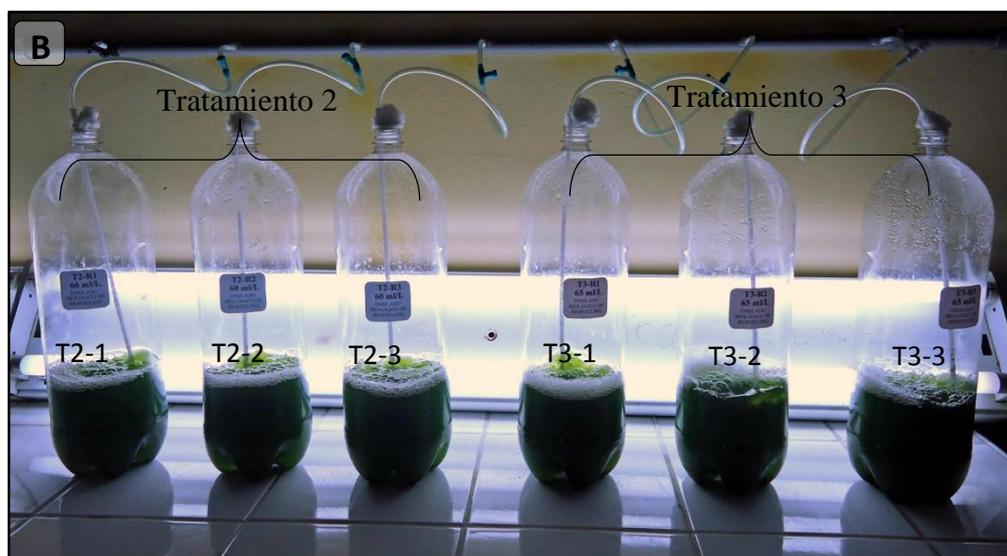
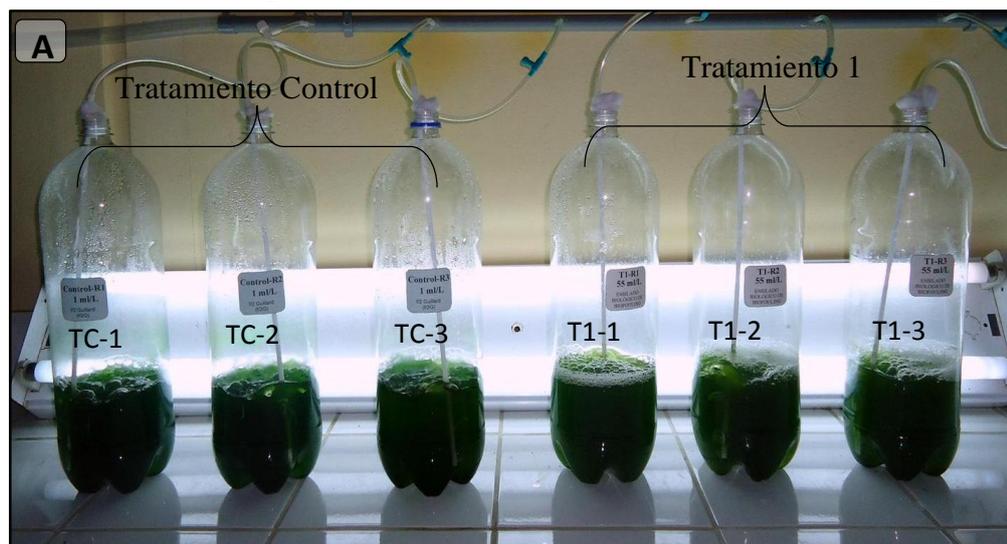
**Anexo 13.** Protocolo empleado en la determinación de pigmentos (clorofila *a* y carotenos totales).



**Anexo 14.** Densidad poblacional ( $\times 10^6$  cél. mL<sup>-1</sup>) de *T. suecica* con medio de cultivo EBBFCA y grupo control (Guillard f/2).

DÍA DE CULTIVO	Guillard f/2 CONTROL			EBBFCA (mL L <sup>-1</sup> )									
	R1	R2	R3	55			60			65			
				R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	
0	0,184	0,184	0,184	0,184	0,184	0,184	0,184	0,184	0,184	0,184	0,184	0,184	0,184
1	0,256	0,304	0,320	0,432	0,336	0,376	0,405	0,412	0,407	0,344	0,320	0,280	
2	0,624	1,080	0,832	0,576	0,616	1,200	0,624	0,664	0,824	0,616	0,752	0,536	
3	1,264	1,032	0,904	1,056	1,168	1,064	0,944	1,240	1,064	1,328	0,928	1,000	
4	1,506	1,594	1,388	1,462	1,434	1,728	1,650	1,714	1,812	1,514	1,804	1,586	
5	1,850	2,090	1,752	2,168	2,256	2,408	2,448	2,354	2,542	2,388	2,056	2,172	
6	1,650	1,910	1,510	1,230	1,600	1,490	1,730	1,930	2,140	1,840	1,590	1,790	

**Anexo 15.** Tratamientos experimentales de *T. suecica* al 5<sup>to</sup> día de cultivo en fig. “A y B”



**Anexo 16.** Valores de la Tasa de crecimiento ( $\mu$ ) y Tiempo de duplicación diaria (TD) poblacional de *T. suecica* con medio de cultivo EBBFCA y grupo control (Guillard f/2).

PARÁMETRO	Guillard f/2 CONTROL			EBBFCA (mL L <sup>-1</sup> )								
				55			60			65		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
<b>N0</b>	0,184	0,184	0,184	0,184	0,184	0,184	0,184	0,184	0,184	0,184	0,184	0,184
<b>Nf</b>	1,850	2,090	1,752	2,168	2,256	2,408	2,448	2,354	2,542	2,388	2,056	2,172
<b>Día</b>	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
<b><math>\mu</math> (día<sup>-1</sup>)</b>	0,462	0,486	0,451	0,493	0,501	0,514	0,518	0,510	0,525	0,513	0,483	0,494
<b>TD (día)</b>	1,502	1,426	1,538	1,405	1,383	1,348	1,339	1,360	1,320	1,352	1,436	1,404

**Anexo 17.** Valores de la biomasa, absorbancia, porcentaje y biomasa de clorofilas de *T. suecica* con medio de cultivo EBBFCA y grupo control (Guillard f/2).

PARÁMETROS	Guillard f/2 CONTROL			EBBFCA (mL L <sup>-1</sup> )								
				55			60			65		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
<b>Biomasa (mg L<sup>-1</sup>)</b>	573,79	589,60	504,11	644,18	664,02	685,03	739,23	699,73	725,67	655,97	628,76	671,94
<b>B Muestra (mg)</b>	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
<b>A470</b>	0,490	0,632	0,471	0,661	0,683	0,736	0,772	0,682	0,722	0,639	0,551	0,672
<b>A645</b>	0,269	0,291	0,236	0,307	0,310	0,343	0,373	0,339	0,324	0,304	0,326	0,288
<b>A662</b>	0,585	0,611	0,555	0,729	0,737	0,761	0,851	0,786	0,804	0,731	0,706	0,782
<b>Clorofila a (ug mL<sup>-1</sup>)</b>	6,24	6,50	5,97	7,84	7,93	8,14	9,12	8,44	8,69	7,87	7,53	8,51
<b>Clorofila b (ug mL<sup>-1</sup>)</b>	2,69	3,00	2,19	2,83	2,85	3,37	3,57	3,20	2,85	2,76	3,27	2,26
<b>Carotenos (ug mL<sup>-1</sup>)</b>	1,13	1,64	1,23	1,82	1,91	1,95	2,03	1,77	2,07	1,75	1,18	2,06
<b>Clorofila a (%)</b>	0,62	0,65	0,60	0,78	0,79	0,81	0,91	0,84	0,87	0,79	0,75	0,85
<b>Clorofila b (%)</b>	0,27	0,30	0,22	0,28	0,29	0,34	0,36	0,32	0,29	0,28	0,33	0,23
<b>Carotenos (%)</b>	0,11	0,16	0,12	0,18	0,19	0,20	0,20	0,18	0,21	0,18	0,12	0,21
<b>Clorofila a (mg L<sup>-1</sup>)</b>	3,56	3,83	3,02	5,02	5,25	5,55	6,73	5,88	6,31	5,18	4,72	5,71
<b>Clorofila b (mg L<sup>-1</sup>)</b>	1,55	1,77	1,11	1,80	1,93	2,33	2,66	2,24	2,10	1,84	2,07	1,55
<b>Carotenos (mg L<sup>-1</sup>)</b>	0,63	0,94	0,60	1,16	1,26	1,37	1,48	1,26	1,52	1,18	0,75	1,41

**Anexo 18.** Temperatura (°C) en los cultivos de *T suecica* con medio de cultivo EBBFCA y grupo control (Guillard f/2).

DÍA DE CULTIVO	Guillard f/2 CONTROL			EBBFCA (mL L <sup>-1</sup> )								
				55			60			65		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
0	22,1	22,1	22,1	22,1	22,1	22,1	22,1	22,1	22,1	22,1	22,1	22,1
1	22,1	22,2	22,3	22,4	22,3	22,3	22,3	22,1	22,1	22,0	22,2	22,3
2	21,6	21,7	21,9	21,8	21,6	21,6	22,0	21,8	21,7	21,9	21,9	22,0
3	22,2	22,3	22,4	22,4	22,3	22,2	22,3	22,0	21,9	22,1	22,2	22,2
4	22,1	22,1	22,4	22,5	22,2	22,2	22,3	22,2	22,2	22,3	22,3	22,4
5	21,2	21,4	21,6	21,9	21,7	21,6	21,9	21,6	21,6	21,3	21,5	21,6
6	22,0	22,1	22,2	22,4	22,2	22,2	22,3	22,2	22,2	21,9	22,1	22,2

**Anexo 19.** Temperatura promedio (°C) en los cultivos de *T suecica* con medio de cultivo EBBFCA y grupo control (Guillard f/2).

DÍA DE CULTIVO	Guillard f/2 CONTROL	EBBFCA (mL L <sup>-1</sup> )		
		55	60	65
0	22,1 ±0,0a	22,1 ±0,0a	22,1 ±0,0a	22,1 ±0,0a
1	22,2 ±0,1a	22,3 ±0,1a	22,2 ±0,1a	22,2 ±0,2a
2	21,7 ±0,2a	21,7 ±0,1a	21,8 ±0,2a	21,9 ±0,1a
3	22,3 ±0,1a	22,3 ±0,1a	22,1 ±0,2a	22,2 ±0,1a
4	22,2 ±0,2a	22,3 ±0,2a	22,2 ±0,1a	22,3 ±0,1a
5	21,4 ±0,2a	21,7 ±0,2a	21,7 ±0,2a	21,5 ±0,2a
6	22,1 ±0,1a	22,3 ±0,1a	22,2 ±0,1a	22,1 ±0,2a

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

**Anexo 20.** Valores de pH en los cultivos de *T. suecica* con medio de cultivo EBBFCA y grupo control (Guillard f/2).

DÍA DE CULTIVO	Guillard f/2 CONTROL			EBBFCA (mL L <sup>-1</sup> )								
				55			60			65		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
0	7,83	7,83	7,83	7,83	7,83	7,83	7,83	7,83	7,83	7,83	7,83	7,83
1	8,05	8,13	8,22	8,54	8,16	8,09	8,51	8,31	8,31	8,17	8,28	8,32
2	8,40	8,45	8,74	8,63	8,26	8,19	8,44	8,35	8,33	8,22	8,37	8,43
3	8,38	8,52	8,58	8,45	8,27	8,21	8,66	8,42	8,35	8,55	8,56	8,71
4	8,36	8,53	8,77	8,53	8,34	8,27	8,52	8,47	8,43	8,33	8,34	8,44
5	8,05	8,16	8,30	8,82	8,58	8,49	8,38	8,38	8,33	8,08	8,24	8,35
6	8,54	8,55	8,59	8,17	7,97	7,88	8,39	8,24	8,16	8,20	8,31	8,45

**Anexo 21.** Valores de pH promedio en los cultivos de *T. suecica* con medio de cultivo EBBFCA y grupo control (Guillard f/2).

DÍA DE CULTIVO	Guillard f/2 CONTROL	EBBFCA (mL L <sup>-1</sup> )		
		55	60	65
0	7,83 ±0,00a	7,83 ±0,00a	7,83 ±0,00a	7,83 ±0,00a
1	8,13 ±0,09a	8,26 ±0,24a	8,38 ±0,12a	8,26 ±0,08a
2	8,53 ±0,18a	8,36 ±0,24a	8,37 ±0,06a	8,34 ±0,11a
3	8,49 ±0,10a	8,31 ±0,12a	8,48 ±0,16a	8,61 ±0,09a
4	8,55 ±0,21a	8,38 ±0,13a	8,47 ±0,05a	8,37 ±0,06a
5	8,17 ±0,13b	8,63 ±0,17a	8,36 ±0,03ab	8,22 ±0,14b
6	8,56 ±0,03a	8,01 ±0,15b	8,26 ±0,12ab	8,32 ±0,13a

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