

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOLOGÍA EN ACUICULTURA



Efecto de tres concentraciones de 5, 10 y 15 mL L⁻¹ de extracto acuoso de lodo de la bahía “El Ferrol” en el crecimiento poblacional y contenido de lípidos totales, de la microalga *Tetraselmis suecica* en condiciones de laboratorio

INFORME DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE BIÓLOGO ACUICULTOR

AUTORES:

BACH. DÁVILA VILLAFANA EDEN QUILNER

BACH. DÁVILA VILLAFANA ROBERTH ROSARIO

ASESOR:

DR. JUAN FERNANDO MERINO MOYA

NUEVO CHIMBOTE - PERÚ

2016

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOLOGÍA EN ACUICULTURA



Efecto de tres concentraciones de 5, 10 y 15 mL L⁻¹ de extracto acuoso de lodo de la bahía “El Ferrol” en el crecimiento poblacional y contenido de lípidos totales, de la microalga *Tetraselmis suecica* en condiciones de laboratorio

INFORME DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE BIÓLOGO ACUICULTOR

AUTORES:

BACH. DÁVILA VILLAFANA EDEN QUILNER

BACH. DÁVILA VILLAFANA ROBERTH ROSARIO

Revisado y Aprobado por el Asesor:

DR. JUAN FERNANDO MERINO MOYA

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOLOGÍA EN ACUICULTURA



Efecto de tres concentraciones de 5, 10 y 15 mL L⁻¹ de extracto acuoso de lodo de la bahía “El Ferrol” en el crecimiento poblacional y contenido de lípidos totales, de la microalga *Tetraselmis suecica* en condiciones de laboratorio

INFORME DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE BIÓLOGO ACUICULTOR

AUTORES:

**BACH. DÁVILA VILLAFANA EDEN QUILNER
BACH. DÁVILA VILLAFANA ROBERTH ROSARIO**

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

.....
**Dr. Luis Torres Cabrera
Presidente**

.....
**Mag. Juan M. Carhuapoma Garay
Integrante del Jurado**

.....
**Dr. Fernando Merino Moya
Integrante del Jurado**

DEDICATORIA

*Dedicamos esta tesis A. DIOS, quien
inspiro nuestro espíritu para la conclusión
de esta tesis. A mis padres quienes me
dieron vida, educación, apoyo y consejos.
A mis compañeros de estudio, a mis
maestros y amigos, quienes sin su ayuda
nunca hubiera podido hacer esta tesis. A
todos ellos se los agradezco desde el fondo
de mi alma. Para todos ellos hago esta
dedicatoria*

AGRADECIMIENTOS

*En primer lugar a Dios por habernos guiado por el camino de la felicidad hasta ahora; en segundo lugar a cada uno de los que son parte de nuestra familia a nuestro PADRE **Quilner Dávila**, mi MADRE, **Julia Villafana**; a nuestros hermanos; por siempre habernos dado sus fuerzas y apoyos incondicionales que nos han ayudado y llevado hasta donde estamos ahora. Por último a nuestros profesores a quienes les debemos gran parte de nuestros conocimientos, gracias a su paciencia y enseñanza, a nuestro asesor de tesis quién nos ayudó en todo momento incondicionalmente con su conocimiento y sabiduría, Dr. Fernando Merino y finalmente un eterno agradecimiento a esta prestigiosa universidad la cual nos abrió sus puertas a jóvenes como nosotros, preparándonos para un futuro competitivo y formándonos como personas de bien.*

Los Autores.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vi
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	4
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. Agua del medio de cultivo	6
2.2.3. Preparación del inóculo	7
2.3. PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO	7
2.3.1. Medio Guillard f/2	7
2.3.2. Extracto acuoso de lodo (EAL)	7
2.4. ACONDICIONAMIENTO DE LAS UNIDADES EXPERIMENTALES	8
2.5. DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO MICROALGAL	10
2.6. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE LÍPIDOS TOTALES	10
2.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	13
III. RESULTADOS.....	14
3.1. Comportamiento de la temperatura y pH del cultivo de <i>T. suecica</i>	14
3.1.1. Temperatura en los cultivos	14
3.1.2. pH de los cultivos	15
3.2. Crecimiento poblacional de <i>T. suecica</i>	16
3.2.1. Crecimiento poblacional.....	16
3.2.2. Tasa de crecimiento y tiempo de duplicación poblacional diaria	20
3.3. Contenido de lípidos en <i>T. suecica</i>	21
IV. DISCUSIÓN	25
V. CONCLUSIONES.....	30

VI. RECOMENDACIONES	31
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
VIII. ANEXOS	40
Anexo 1. Composición química del medio de cultivo Guillard f/2.....	41
Anexo 2. Análisis químico del extracto acuoso del lodo de la bahía “El Ferrol” y la composición en los tratamientos utilizados en los cultivos de <i>T. suecica</i>	41
Anexo 3. Temperatura promedio (°C) de los cultivos de <i>T. suecica</i> dosificados con EAL y medio Guillard f/2.....	42
Anexo 4. pH promedio de los cultivos de <i>T. suecica</i> dosificados con EAL y medio Guillard f/2.....	42
Anexo 5. Densidad poblacional ($\times 10^4$ cél. mL ⁻¹) de <i>T. suecica</i> en todas las unidades experimentales de los cultivos dosificados con EAL y medio Guillard f/2.....	43
Anexo 6. Tasa de crecimiento (μ) y Tiempo de duplicación (TD) poblacional al quinto día de cultivo de <i>T. suecica</i> en todas las unidades experimentales dosificadas con medio EAL y medio Guillard f/2.....	43
Anexo 7. Biomasa, absorbancias, porcentaje total de lípidos y concentración total de lípidos, de <i>T. suecica</i> en todas las unidades experimentales de los cultivos dosificados con EAL y medio Guillard f/2.....	44
Anexo 8. Panel Fotográfico.....	45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos utilizados en los cultivos de <i>T. suecica</i> con diferentes concentraciones de Extracto acuoso de lodo (EAL)..	9
Tabla 2. Densidad poblacional ($\times 10^4$ cél. mL ⁻¹) de <i>T. suecica</i> en los cultivos dosificados con medio EAL y con Guillard f/2	16
Tabla 3. Determinación del nivel de Significancia en la Prueba de Comparaciones Múltiples entre los Tratamientos del Crecimiento de <i>T. suecica</i> en condiciones de laboratorio.	16
Tabla 4. Tasa de crecimiento (μ) y Tiempo de duplicación diaria (TD) poblacional en el sexto día de cultivo de <i>T. suecica</i> dosificados con medio EAL y Guillard f/2	20
Tabla 5. Determinación del nivel de significancia en la prueba de comparaciones múltiples en la tasa de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación diaria (TD) poblacional en el sexto día de cultivo de <i>T. suecica</i> dosificados con medio EAL y Guillard f/2.	20
Tabla 6. Porcentaje y peso de lípidos de <i>T. suecica</i> en los cultivos dosificados con medio EAL y Guillard f/2.	21
Tabla 7. Determinación del nivel de Significancia en la Prueba de Comparaciones Múltiples en el Porcentaje y Peso de Lípidos de <i>T. suecica</i> en los cultivos dosificados con Medio EAL y Guillard f/2	22

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Células de <i>T. suecica</i> (100X observado en microscopio óptico).	6
Fig. 2. Flujograma de la metodología de la preparación del extracto de lodo	8
Fig. 3. Unidades experimentales de los cultivos microalgales de <i>T. suecica</i> cultivadas con diferentes concentraciones de EAL	9
Fig. 4. Flujograma del proceso de determinación de los lípidos de <i>T. suecica</i> en todos los tratamientos.....	12
Fig. 5. Curvas de calibración para determinar la concentración de lípidos	12
Fig. 6. Variación promedio de la temperatura en los cultivos de <i>T. suecica</i> en todos los tratamientos.....	14
Fig. 7. Variación promedio del pH en los cultivos de <i>T. suecica</i> en todos los tratamientos.....	15
Fig. 8. Curvas de crecimiento poblacional en los cultivos de <i>T. suecica</i> en los medios de cultivo	19
Fig. 9. Porcentaje de lípidos de <i>T. suecica</i> en los tratamientos con EAL y medio Guillard f/2	23
Fig. 10. Biomasa de lípidos de <i>T. suecica</i> en los tratamientos con EAL y medio Guillard f/2	23

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivos, determinar el crecimiento poblacional y el contenido de lípidos de la microalga *T. suecica*, utilizando las concentraciones de 5, 10 y 15 mL L⁻¹ de extracto acuoso de lodo (EAL) proveniente de la bahía “El Ferrol” cultivadas bajo condiciones de laboratorio. Al día sexto de cultivo, la mayor densidad poblacional de *T. suecica* se obtuvo, en el tratamiento dosificado con 10 mL L⁻¹ de EAL, con 196,33 x10⁴ cél. mL⁻¹; el menor valor de densidad al día seis, se obtuvo en el tratamiento dosificado con 15 mL L⁻¹ de EAL, con 124,67 x10⁴ cél. mL⁻¹. EL mayor valor de la tasa de crecimiento poblacional por día (μ) al día sexto de cultivo se obtuvo en el tratamiento dosificado con 10 mL L⁻¹ de EAL, con 0,491 día⁻¹; mientras que los menores valores se presentaron en los tratamientos dosificados con 5 y 15 mL L⁻¹ de EAL, con 0,429 y 0,422 día⁻¹, respectivamente. Los mayores porcentajes de lípidos totales al día sexto de cultivo para *T. suecica*, se obtuvo en el tratamiento dosificado de 5 mL L⁻¹ de EAL, con 23.5 %, respectivamente; y los menores porcentajes estuvo en los tratamientos dosificados con 10 y 15 mL L⁻¹ de EAL fueron de 22,4 y 21,1 %.

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

ABSTRACT

This study aimed to determine the population growth and lipid content of microalgae *T. suecica*, using concentrations of 5, 10 and 15 mL L⁻¹ of aqueous extract of sludge (EAL) from the bay "the Ferrol "grown under laboratory conditions. By day sixth of culture, the highest population density of *T. suecica* was obtained in the treatment dosed with 10 mL L⁻¹ of EAL, with 196.33 x10⁴ cel. mL⁻¹; the lower density value a day six, was obtained in 15 mL dosed treatment with L⁻¹ of EAL, with 124.67 x10⁴ cel. mL⁻¹. The greatest value of the population growth rate per day (μ) to six day culture was obtained in the treatment dosed with 10 mL L⁻¹ of EAL, with 0.491 day⁻¹; while the lowest values were in treatments dosed with 5 and 15 mL L⁻¹ of EAL, with 0.429 and 0.422 day⁻¹, respectively. The highest percentages of total fat a day six of culture for *T. suecica* was obtained in the treatment dispensed 5 mL L⁻¹ of EAL, with 23.5%, respectively; and lower percentages he was treatments dosed with 10 and 15 mL L⁻¹ of EAL were of 22.4 and 21.1%.

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

I. INTRODUCCIÓN

Tetraselmis suecica, es una microalga marina unicelular de color verde, con forma generalmente ovalada de alrededor de 10 μm de diámetro con 4 flagelos isodinámicos que salen de una invaginación apical que se observa en la porción anterior de la célula y que está ubicada en la misma dirección en la que avanza (Morineau *et al.*, 2001; Ulloa, 2011).

Las microalgas han sido utilizadas durante mucho tiempo para la alimentación humana y animal, y para la producción de proteínas, vitaminas y otros suplementos nutritivos, así como, para el tratamiento de aguas residuales y mejora en la calidad de aguas, o como biofertilizantes (Venkatamaran, 1986; Ventosa & Nieto, 1995; De Philippis & Vicenzini, 1998; Mora *et al.*, 2004).

El cultivo de microalgas se ha incrementado porque son potencialmente fuente de proteínas, ácidos grasos insaturados, vitaminas, minerales, pigmentos, enzimas, aceites esenciales, antibióticos y otros metabolitos biológicamente activos (Fernández-Reiriz, 1989; Arad & Yaron, 1992; Ventosa & Nieto, 1995; Ritter *et al.*, 1999; Bermejo *et al.*, 2002; Morales *et al.*, 2002).

Darley (1982), Paniagua *et al.* (1986) y Paniagua *et al.* (1989), consideran que para iniciar el cultivo de microalgas primero se debe disponer de un método de cultivo adecuado, existiendo dos tipos de medio de cultivo; el medio de agua de mar o agua dulce enriquecidos con sales incorporadas y el medio acuoso químicamente definido. Generalmente, la preparación de los medios antes mencionados, tiene una serie de limitaciones, siendo la más importante, los altos costos que resultan del uso de nutrientes químicos de alto grado de pureza (Paniagua *et al.*, 1986). En consecuencia, en la búsqueda de medios nutritivos económicos que permitan obtener altos rendimientos de los cultivos, se han utilizado con relativo éxito, recursos orgánicos como desechos domésticos, humus, harina de pescado, etc., que tratados adecuadamente para evitar la presencia de microorganismos patógenos, lo que abre las posibilidades de utilizar otros residuos tales como lodos. Ello es posible ya que en el fondo de la bahía “El Ferrol” existen sedimentos y lodos resultados del

vertimiento de efluentes y residuos de las actividades pesqueras y domésticas efectuadas en su entorno, así como el material de arrastre del río Lacramarca y de la acción eólica, llegando a profundidades de hasta 2,5 m de espesor en los lugares de mayor acumulación (Comisión Técnica Multisectorial para la Recuperación Ambiental de la Bahía El Ferrol, 2011).

El uso de materiales orgánicos de aguas residuales, excremento animal y otros desechos, han sido utilizados como fertilizantes en los cultivos microalgales desde hace varios años (Oswald, 1988; Borowitzka & Borowitzka, 1989; Benedetti *et al.*, 1998; Knud-Hansen, 1998; Olguin *et al.*, 2001).

Chimbote es una de las áreas de mayor interés por su riqueza pesquera, por ser uno de los centros de afloramiento, que asociado con la circulación de las aguas influye en la productividad. En la bahía de “El Ferrol” se ha realizado diversos estudios relacionados con el desarrollo pesquero y la concomitante generación de residuos que han formado grandes deposiciones de lodo en los fondos de la bahía (Guillén *et al.*, 1977; Guillén & Aquino, 1978; Guillén, 1981 y 1984; Guillén & Carcamo, 1993; Guillén & Calienes, 1981a y 1981b; Conapuma, 1989; Sánchez *et al.*, 1994; Jacinto *et al.*, 1994; Arévalo & Loayza, 1996) y otros orientados a determinar los niveles de sedimentos acumulados (Comisión Técnica Multisectorial para la Recuperación Ambiental de la Bahía El Ferrol, 2011). Los residuos industriales pesqueros y domésticos depositados en los fondos marinos de la bahía “El Ferrol”, durante muchos años ha originado la acumulación de lodo, ocasionando dificultades tales como, mareas rojas, contaminación microbiológica por bacterias patógenas, eliminación de casi todas las especies ícticas, disminución drástica de la biodiversidad, etc. (Guillén & Carcamo, 1993; Arévalo & Loayza, 1996; Comisión Técnica Multisectorial para la Recuperación Ambiental de la Bahía El Ferrol, 2011), por lo que se hace un gran problema la disposición de estos, lo que se hace necesario buscar alternativas de utilización como lo es el cultivo microalgal.

En la Comisión Técnica Multisectorial para la Recuperación Ambiental de la Bahía El Ferrol (2011), se desarrollaron exposiciones en la cual mostraron los resultados de análisis de composición química de sedimentos marinos frente a

las instalaciones de PETROPERU en la parte central de la bahía, para los años 2008 y 2010, señalando que existían una elevada concentración de materia orgánica de 3,6 a 3,7 %, lo cual indica la necesidad de considerar medidas para la remediación ambiental en dicha zona. Pero aún hacen falta muchos estudios, uno de ellos se deriva de la gran acumulación de lodo y que se le puede dar alguna utilidad benéfica.

Las microalgas con elevadas productividades lipídicas, entre ellas *T. suecica*, también son deseables para la elaboración de biodiesel, razón por la cual la cantidad de lípidos contenidos en la biomasa y la velocidad de crecimiento, sumados a la eficiencia metabólica y la robustez del microorganismo, son relevantes para su selección (Chisti, 2007; Rosenberg *et al.*, 2008), teniendo en consideración la capacidad de metabolizar los nutrientes presentes en residuos orgánicos es posible viabilizar la utilización de residuos como los lodos mediante la aplicación de tratamientos adecuados en la formulación de un medio de cultivo para *T. suecica*, a fin de transformarlos en biomasa microalgal.

Adicionalmente, la producción de microalgas, mediante la utilización de lodos, implicaría la conversión de residuos en biomasa microalgal con la consecuente reducción de impactos ambientales negativos y la reducción de los costos de producción microalgal (Fábregas *et al.*, 1984; Cano & Pisfil, 2007; Gómez *et al.*, 2008), así como la generación de sustancias químicas (proteínas, pigmentos, lípidos, etc.) de gran demanda industrial y alimentaria.

Los resultados positivos obtenidos en el uso de residuos pesqueros en los cultivos microalgales posibilita el uso de lodo, considerando las posibilidades de colaborar en el desarrollo de nuevas metodologías en la producción masiva de microalgas y sus derivados con fines acuiculturales ya sea en la producción de alimento vivo u obtención de diversas sustancias bioactivas. Así, la presencia de nutrientes en el lodo, son aprovechadas por diversas microalgas destacando la clorofita marina *T. suecica* con potencial para la producción de biodiesel, no sólo por la alta productividad de lípidos, sino también por su alta productividad celular y por la facilidad de su cultivo en diversos sistemas (Rodolfi *et al.* 2009). *T. suecica* también es importante por su utilización en

acuicultura como alimento vivo para larvas de moluscos, crustáceos y peces, asimismo, en la obtención de metabolitos u obtener biodiesel (Chisti, 2007). Desde el punto de vista productivo y económico, posibilita el uso de lodos de la bahía “El Ferrol” para la producción masiva de *T. suecica*, propiciando una sensible reducción de los costos de producción.

La importancia del trabajo radica en la utilización de lodo como medio de cultivo para la producción de biomasa microalgal y lípidos susceptibles de ser utilizados como alimento o biocombustible, así como, el reciclaje de los desechos generados por la industria pesquera; es decir, la conversión de lodo en biomasa microalgal permitiría la efectiva recuperación de la bahía al reducir o eliminar las interferencias que el lodo actualmente causa en la dinámica biológica del ambiente marino de la bahía El Ferrol.

Considerando la presencia de lodo en la bahía “El Ferrol”, procedente de los residuos orgánicos de la industria pesquera y con las condiciones de mineralización en que se hallan, el extracto acuoso de lodo (EAL) puede ser utilizado para el cultivo de la microalga *T. suecica*; además, el uso del lodo en cultivos de *T. suecica* se presenta como una nueva metodología de producir microalgas a bajo costo.

Por todo lo expuesto, planteamos el siguiente problema: ¿Cuál será el efecto de tres concentraciones de 5, 10 y 15 mL L⁻¹ de extracto acuoso de lodo de la bahía “El Ferrol” en el crecimiento poblacional y contenido de lípidos totales, de la microalga *T. suecica* en condiciones de laboratorio?.

El presente trabajo tuvo como objetivo general: Evaluar el efecto de tres concentraciones de 5, 10 y 15 mL L⁻¹ de extracto acuoso de lodo de la bahía “El Ferrol” en el crecimiento poblacional y contenido de lípidos totales, de la microalga *T. suecica* en condiciones de laboratorio; y como objetivos específicos: a) Determinar el efecto de 5, 10 y 15 mL L⁻¹ del extracto acuoso de lodo de la bahía “El Ferrol” en el crecimiento poblacional de la microalga *T. suecica*, y b) Determinar el efecto de 5, 10 y 15 mL L⁻¹ de extracto acuoso de

lodo de la bahía “El Ferrol” en el contenido de lípidos de la microalga *T. suecica*.

Además, se planteó la siguiente hipótesis: Si bajo condiciones de laboratorio, se utiliza extracto acuoso de lodo (EAL) en el cultivo de la microalga *T. suecica*, en concentraciones de 5, 10 y 15 mL L⁻¹ que corresponden a los tratamientos T1, T2 y T3, respectivamente, se obtendrá que los dosificados con 10 mL L⁻¹ de extracto acuoso de lodo, presentarán un mayor crecimiento poblacional y contenido de lípidos totales en comparación de los tratamientos con 5 y 15 mL L⁻¹ de EAL.

Se planteó para el crecimiento poblacional y contenido de lípidos totales:

H0: T1 = T2 = T3

Ha: T1 < T2 > T3

T1: Tratamiento a concentración de 5 mL L⁻¹ de EAL.

T2: Tratamiento a concentración de 10 mL L⁻¹ de EAL.

T3: Tratamiento a concentración de 15 mL L⁻¹ de EAL.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. LOCALIZACIÓN DEL EXPERIMENTO

El trabajo fue desarrollado en el laboratorio de Cultivos de Especies Auxiliares de la Escuela Académico Profesional de Biología en Acuicultura, Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional del Santa, con fecha desde setiembre a octubre del 2012.

2.2. MATERIAL EXPERIMENTAL

2.2.1. Material biológico

La microalga *Tetraselmis suecica* (Fig. 1) fue proporcionada por el Laboratorio de Cultivos de Especies Auxiliares de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional del Santa, la misma que se mantuvo con medio Guillard f/2 preparado con agua de mar esterilizada a 121 °C y 15 psi, contenidas en 4 matraces con 500 mL e iluminados con un fluorescente de 42 w (2000 lux), con agitación manual dos veces al día, que luego de cuatro días sirvieron para su uso en los tratamientos.

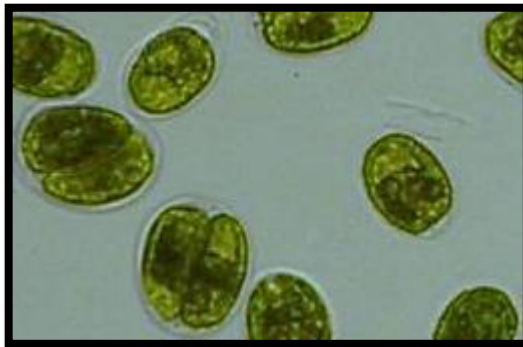


Fig. 1. Células de *T. suecica* (100X observado en microscopio óptico).

2.2.2. Agua del medio de cultivo

El agua de mar que se utilizó en el experimento se recolectó del sector playa “El Dorado” en la bahía de Samanco, distrito de Nuevo Chimbote (Perú), y fue trasladado al laboratorio en 1 bidón de plástico con 100 L de volumen efectivo. Para su utilización se siguió la metodología modificada de González & Polo (2013) filtrando con malla de Nylal de 5

μm , y se agregó 1 mL de hipoclorito de sodio (Clorox al 5,25%) por litro, dejando actuar por 24 h para eliminar la mayoría de las bacterias presentes en el medio. Luego se neutralizó con una solución de tiosulfato de sodio al 15% a razón de 1 mL por litro de agua de mar, el mismo que seguido se colocó abundante aireación (10 L min^{-1}) por espacio de 30 min para eliminar el cloro residual.

2.2.3. Preparación del inóculo

Los inóculos de *T. suecica* para todos los tratamientos fueron tomados inicialmente de 4 matraces con 500 mL de cultivo. Estos inóculos fueron utilizados en la fase de crecimiento exponencial (cuarto día de cultivo) para asegurar que las microalgas estuvieran en un estado fisiológico óptimo, los mismos que se agregaron a razón de 1:10 en cada unidad experimental.

2.3. PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

2.3.1. Medio Guillard f/2

El medio de cultivo Guillard f/2 utilizado (Anexo 1), para el mantenimiento de los inóculos de *T. suecica* y el tratamiento control, fue elaborado según lo establecido por Guillard (1975).

2.3.2. Extracto acuoso de lodo (EAL)

Se obtuvo una muestra de 5 kg de lodo procedente de la bahía “El Ferrol” (09°05'42”S; 78°36'14”O), Chimbote - Ancash, utilizando una draga Van Veen, el que fue trasladado en un balde plástico de 20 L de capacidad, hasta el laboratorio de Cultivos de Especies Auxiliares.

Para la preparación del EAL (Fig. 2) se pesó aproximadamente 500 g de lodo fresco y se llevó a estufa para su secado a 60°C por 12 h hasta peso constante, del cual se tomó 200 g para ser pulverizados con un mortero. El polvo obtenido se disolvió en agua destilada y se aforó hasta 2000 mL. Esta solución fue calentada hasta 100 °C por 30 min. Luego se enfrió a temperatura ambiente y se filtró con papel Whatman N° 42 con ayuda de una bomba de vacío y embudo Buchner. Finalmente esta

solución fue almacenada en un frasco de vidrio ámbar a 5 °C hasta su utilización en la experiencia.

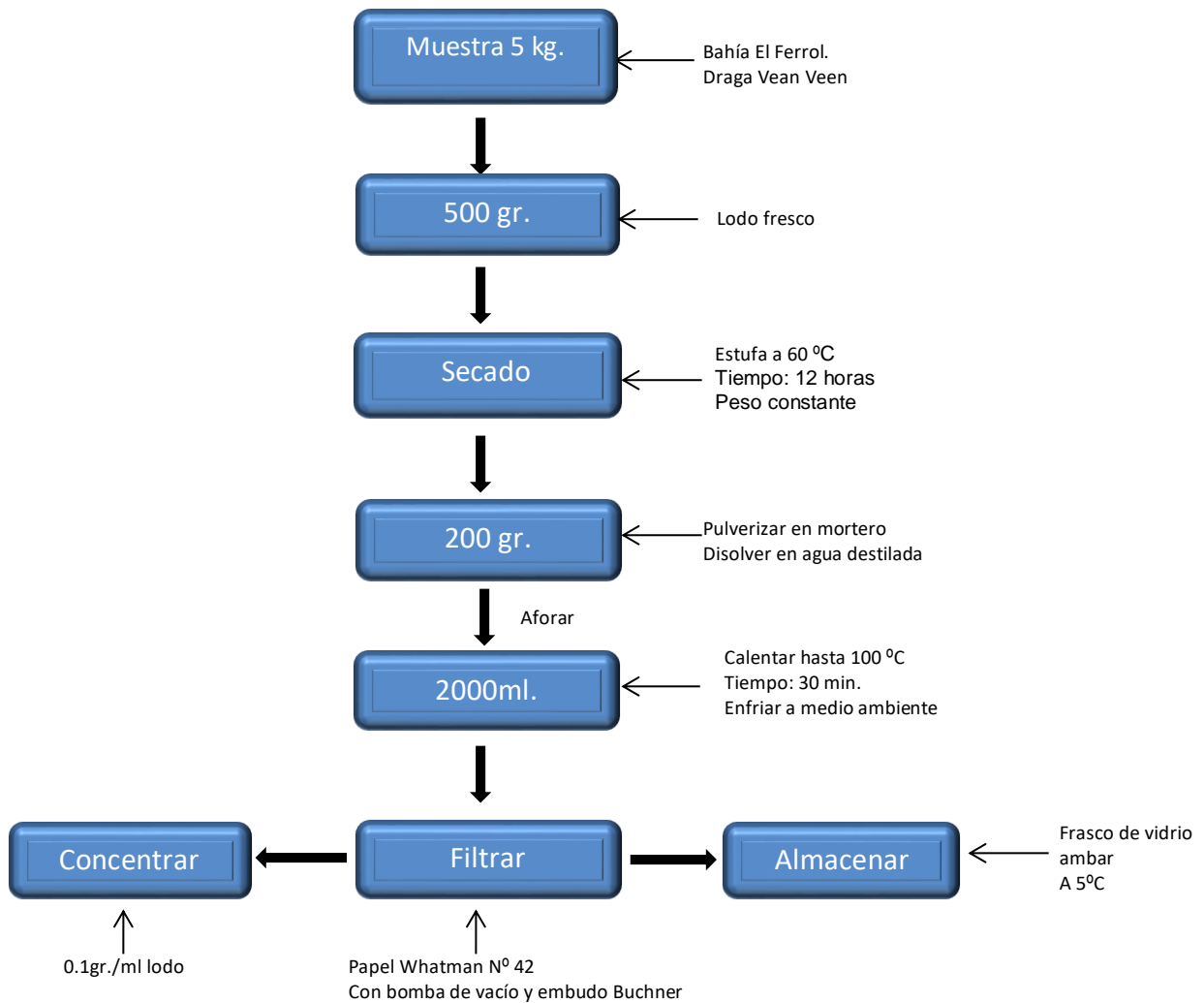


Fig. 2. Flujograma de la metodología de la preparación del extracto de lodo.

La concentración final de lodo en la solución stock fue de 100 mg mL⁻¹ del extracto de lodo y para efectos de su dosificación a los cultivos microalgales se utilizaron 5, 10 y 15 mL de EAL por litro de cultivo, equivalentes a 500, 1000 y 1500 mg L⁻¹ de lodo en peso seco, respectivamente. A esta solución se analizó el contenido de materia orgánica e inorgánica (AOAC, 1995), y colorimétricamente se determinó el nitrógeno total, fósforo total y hierro (APHA, 2005) (Anexo 2).

2.4. ACONDICIONAMIENTO DE LAS UNIDADES EXPERIMENTALES

Para el experimento se utilizaron 12 botellas plásticas de 1500 mL conteniendo 1000 mL de volumen efectivo de cultivo, los que se iniciaron con un promedio de la concentración celular, de acuerdo a ensayos previos, de $15,0 \times 10^4$ cél. mL⁻¹ de *T. suecica*.

Se empleó el diseño completamente al azar (Steel & Torrie, 1988), con 4 tratamientos y tres repeticiones cada uno, incluido un grupo control (Tabla 1).

Tabla 1. Tratamientos utilizados en los cultivos de *T. suecica* con diferentes concentraciones de Extracto acuoso de lodo (EAL).

Tratamientos	Especificaciones
T _c	Cultivo de la microalga <i>Tetraselmis suecica</i> con medio Guillard f/2.
T ₁	Cultivo de la microalga <i>Tetraselmis suecica</i> con 5 mL L ⁻¹ de EAL.
T ₂	Cultivo de la microalga <i>Tetraselmis suecica</i> con 10 mL L ⁻¹ de EAL.
T ₃	Cultivo de la microalga <i>Tetraselmis suecica</i> con 15 mL L ⁻¹ de EAL.



Fig. 3. Unidades experimentales de los cultivos microalgales de *T. suecica* cultivadas con diferentes concentraciones de EAL.

Se efectuaron registros diarios de temperatura con un termómetro digital Hanna ($\pm 0,1$ °C), pH con un pH-metro digital Hanna ($\pm 0,01$) y flujo de aire utilizando un flujómetro Cole Parmer (± 10 mL min⁻¹).

2.5. DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO MICROALGAL

El crecimiento de los cultivos se determinó por conteos diarios (cél. mL⁻¹) utilizando cámara de Neubauer y microscopio óptico compuesto marca Nikon, durante los ocho días de duración del experimento.

Las curvas de crecimiento se construyeron con la densidad poblacional diaria, y con la fase exponencial de la misma se determinó la tasa de crecimiento poblacional por día (μ) y el tiempo de duplicación poblacional diaria (TD) al quinto día de cultivo, según Guillard (1975) mediante las fórmulas:

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

Dónde:

N_0 y N_f corresponde al número de células por mL en los tiempos T_0 y T_f , respectivamente.

2.6. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE LÍPIDOS TOTALES

Con el fin de determinar la concentración de los lípidos totales por litro de cultivo, se determinó la biomasa microalgal al quinto día de cultivo de la siguiente manera: Se filtró 20 mL de suspensión microalgal en papel Whatman N° 42 (\emptyset 1,0 μ m) por cada unidad experimental y se llevaron a secado en una estufa a 60 °C por 6 h, y se dejó enfriar por 1 h. Para determinar el peso seco, se registraron los pesos antes y después del filtrado, y los cálculos se hicieron según la siguiente fórmula:

$$\text{Biomasa (mg L}^{-1}\text{)} = (P1 - P2) \times 1000 / 20$$

Dónde:

P1: Peso inicial muestra (mg)

P2: Peso final muestra (mg)

El contenido de lípidos fue determinado según metodología modificada de Bligh & Dyer (1959) y Marsh & Weinstein (1966); para lo cual se tomó una muestra de 25 mL de suspensión microalgal de cada unidad experimental y se centrifugó a 10000 rpm por 10 min, seguido se eliminó el sobrenadante dejando la pasta de microalga que fue secada en estufa a 60 °C por espacio de 3 h hasta peso constante. A cada uno de los tubos se les adicionó 3 mL de una solución de cloroformo: metanol (2:1) y se dejó reposar por 12 h en refrigeración a 5 °C.

Luego de transcurridas 12 h se agregó 2 mL de agua destilada a cada tubo, y fueron centrifugados a 10000 rpm por 10 min, seguido se eliminó la capa superior; el restante se evaporó en baño María, y fueron secados en una estufa a 105 °C por 30 min para asegurar la evaporación total de agua que pueda quedar como residuo.

Las muestras con los tubos de ensayo se enfriaron a temperatura ambiente por 30 min, se adicionó a cada tubo 2 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado y se calentó a una temperatura de 200 °C por una hora. Nuevamente se enfrió al ambiente como paso previo para realizar las lecturas con ayuda de un espectrofotómetro Turner Barstearnd Internacional con celdas de cuarzo (1 cm) a 375 nm de longitud de onda.

Para la curva de calibración se utilizaron colesterol, dipalmitina y triestearina. Para obtener una fórmula general del porcentaje de lípidos se utilizó metodología modificada de Ipanaqué & Paredes (2009), promediando las tres pendientes de las ecuaciones de regresión con estas sustancias, dando como fórmula general la siguiente:

$$L (\%) = \frac{\left[\left(\frac{Abs}{1,1231} \right) \times V \right]}{M} \times 100$$

Abs : Absorbancia (nm).

V : Volumen de muestra final analizada (5 mL).

M : Peso seco de la muestra microalgal en 20 mL de cultivo (mg).

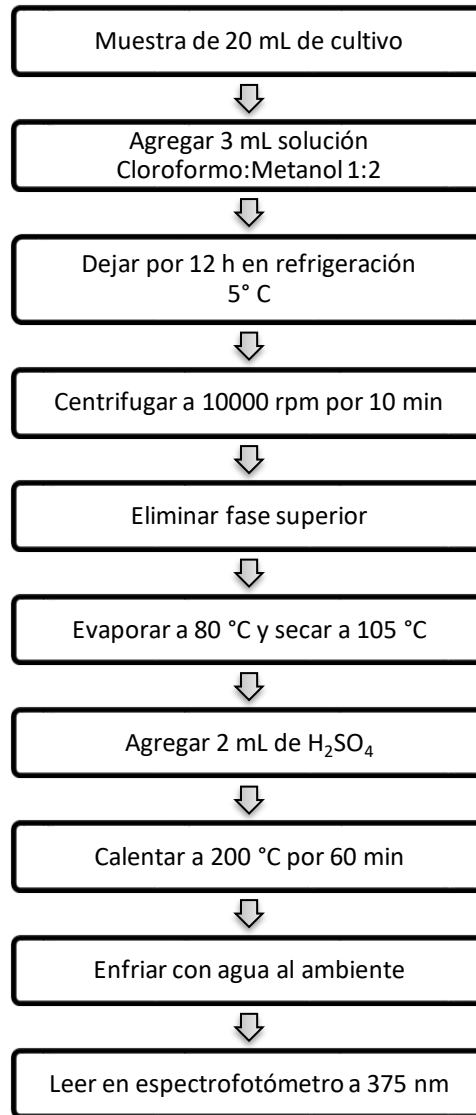


Fig. 4. Flujoograma del proceso de determinación de los lípidos de *T. suecica* en todos los tratamientos.

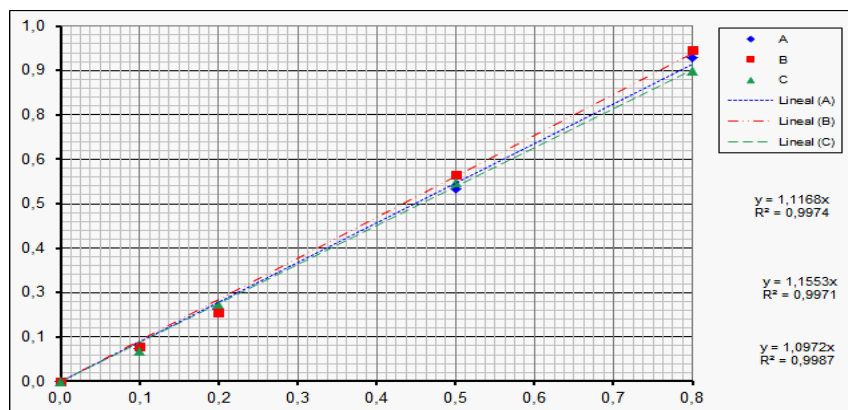


Fig. 5. Curvas de calibración para determinar la concentración de lípidos.

Con los datos obtenidos de biomasa y el porcentaje de lípidos se calcularon la biomasa de lípidos por litro de cultivo y los lípidos por célula en cada unidad experimental mediante las siguientes fórmulas:

Lípidos totales en peso seco por litro (B)

$$B (mg L^{-1}) = \frac{P (L)}{100}$$

P : Peso seco del total de biomasa microalgal en un litro (mg).

L : Porcentaje de Lípidos (%).

2.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La densidad celular, la tasa de crecimiento, tiempo de duplicación, y contenido de lípidos totales de *T. suecica* cultivada con diferentes concentraciones de EAL y el grupo control con Guillard f/2, fueron sometidos al análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey HSD para establecer diferencias entre los tratamientos. En todos los casos se utilizó una significancia de 0,05. Todo el tratamiento estadístico fue desarrollado utilizando los programas, Microsoft Excel 2010 y SPSS 19.0 para Microsoft Windows 7.

III. RESULTADOS

3.1. Comportamiento de la temperatura y pH del cultivo de *T. suecica*

3.1.1. Temperatura en los cultivos

En la Fig. 6 se muestra la variación de la temperatura en los cultivos de *T. suecica* durante la experiencia.

La temperatura en los cultivos de *T. suecica* de los diferentes tratamientos varió entre los 24,1 y 24,8 °C durante los días del experimento, siendo estadísticamente iguales ($p > 0,05$) entre ellos y en cada uno de los días de cultivo (Anexo 3).

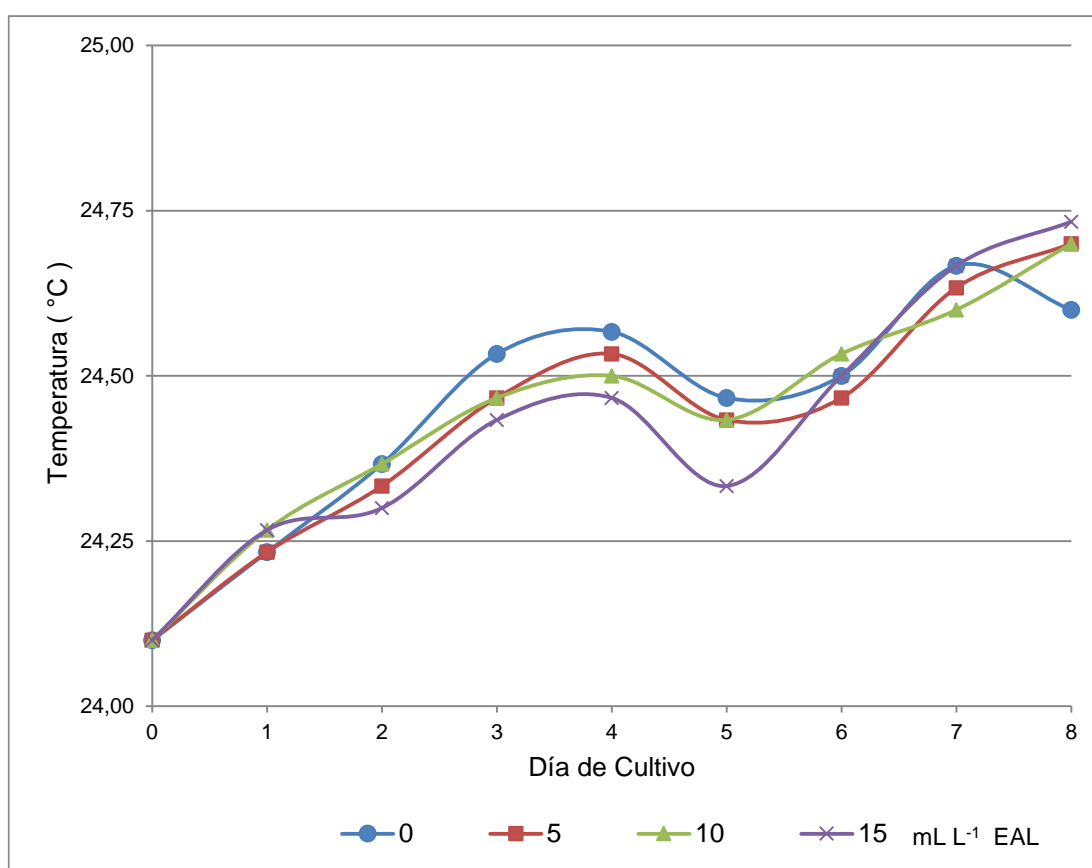


Fig. 6. Variación promedio de la temperatura en los cultivos de *T. suecica* en todos los tratamientos.

3.1.2. pH de los cultivos

Las curvas de variación del pH en los cultivos de *T. suecica* durante la experiencia son mostradas en la Fig. 7.

El pH de los cultivos de *T. suecica* en los diferentes tratamientos con EAL varió entre los 8,10 al inicio del experimento y 8,93 al cuarto día de cultivo. Al sexto día de cultivo se presentó el mayor promedio significativo ($p < 0,05$) de 8,90 que corresponde al tratamiento dosificado con medio Guillard f/2; mientras que para el tratamiento con 15 mL de EAL el mayor promedio fue de 8,87 al quinto día de cultivo (Anexo 4).

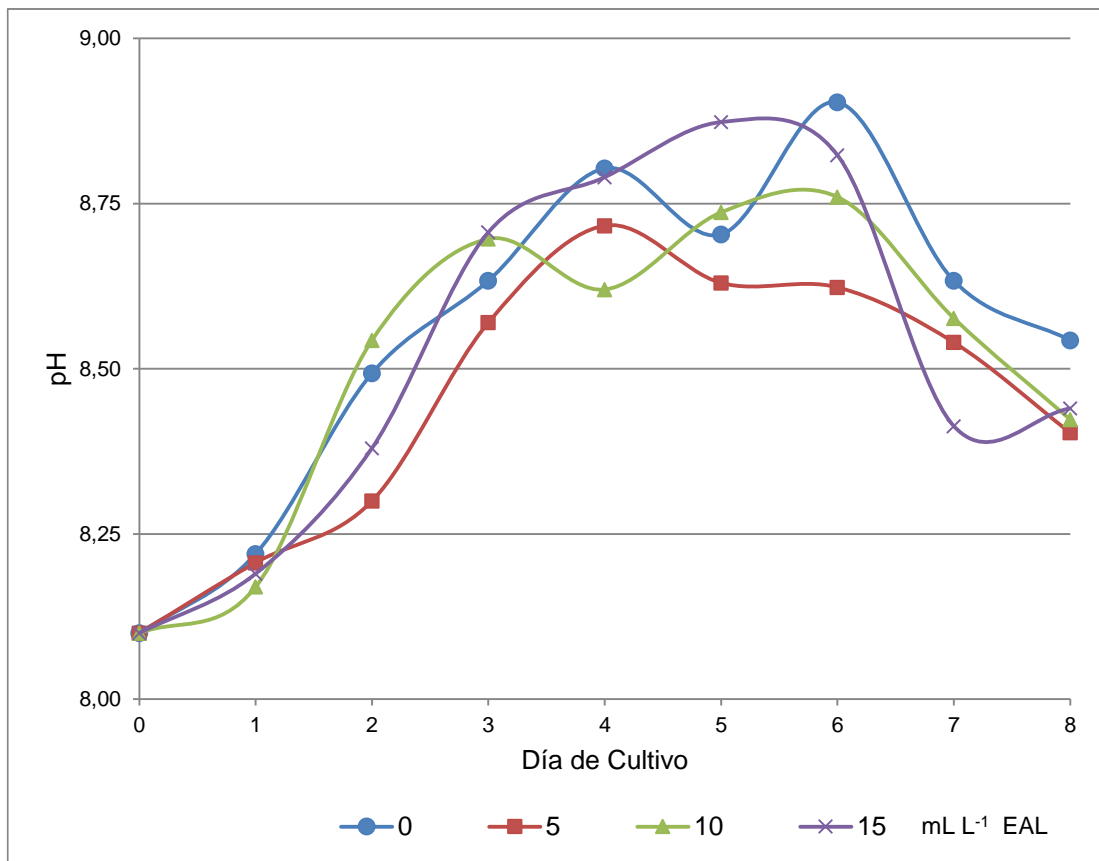


Fig. 7. Variación promedio del pH en los cultivos de *T. suecica* en todos los tratamientos.

3.2. Crecimiento poblacional de *T. suecica*

3.2.1. Crecimiento poblacional

En la Tabla 2 y Fig. 8, se muestran las densidades celulares en los cultivos de *T. suecica* en los tratamientos con EAL y Guillard f/2 durante la experiencia.

Tabla 2. Densidad poblacional ($\times 10^4$ cél. mL⁻¹) de *T. suecica* en los cultivos dosificados con medio EAL y con Guillard f/2.

DÍA DE CULTIVO	Guillard f/2	EAL (mL L ⁻¹)		
		5	10	15
0	15,00	15,00	15,00	15,00
1	24,00	23,67	30,00	23,67
2	59,67	53,33	70,67	61,33
3	101,33	102,67	114,67	100,67
4	154,67	111,67	140,33	115,33
5	169,33	128,33	175,33	124,00
6	219,67	149,67	196,33	124,67
7	199,67	169,33	165,00	131,00
8	162,67	127,00	148,00	103,00

Tabla 3. Determinación del nivel de Significancia en la Prueba de Comparaciones Múltiples entre los Tratamientos del Crecimiento de *T. suecica* en condiciones de laboratorio

Variable Dependiente	Tratamientos	Tratamientos	Nivel de Significancia	Interpretación
D1	CONTROL	5 ml	0,998	No Significativo
		10 ml	0,065	No Significativo
		15 ml	0,998	No Significativo
	5 ml	CONTROL	0,998	No Significativo
		10 ml	0,051	No Significativo
		15 ml	1,000	No Significativo
	10 ml	CONTROL	0,065	No Significativo
		5 ml	0,051	No Significativo
		15 ml	0,051	No Significativo
	15 ml	CONTROL	0,998	No Significativo
		5 ml	1,000	No Significativo
		10 ml	0,051	No Significativo
D2	CONTROL	5 ml	0,259	No Significativo
		10 ml	0,033	Significativo

	5 ml	15 ml	0,949	No Significativo
		CONTROL	0,259	No Significativo
		10 ml	0,003	Significativo
	10 ml	15 ml	0,126	No Significativo
		CONTROL	0,033	Significativo
		5 ml	0,003	Significativo
	15 ml	15 ml	0,070	No Significativo
		CONTROL	0,949	No Significativo
		5 ml	0,126	No Significativo
D3	CONTROL	10 ml	0,070	No Significativo
		5 ml	0,903	No Significativo
		15 ml	0,001	Significativo
	5 ml	CONTROL	0,986	No Significativo
		10 ml	0,903	No Significativo
		15 ml	0,001	Significativo
	10 ml	CONTROL	0,746	No Significativo
		5 ml	0,001	Significativo
		15 ml	0,000	Significativo
15 ml	CONTROL	0,000	Significativo	
	5 ml	0,986	No Significativo	
	10 ml	0,746	No Significativo	
D4	CONTROL	5 ml	0,000	Significativo
		10 ml	0,024	Significativo
		15 ml	0,620	No Significativo
	5 ml	CONTROL	0,037	Significativo
		10 ml	0,024	Significativo
		15 ml	0,138	No Significativo
	10 ml	CONTROL	0,988	No Significativo
		5 ml	0,620	No Significativo
		15 ml	0,138	No Significativo
15 ml	CONTROL	0,212	No Significativo	
	5 ml	0,037	Significativo	
	10 ml	0,988	No Significativo	
D5	CONTROL	5 ml	0,212	No Significativo
		10 ml	0,018	Significativo
		15 ml	0,936	No Significativo
	5 ml	CONTROL	0,010	Significativo
		10 ml	0,018	Significativo
		15 ml	0,008	Significativo
	10 ml	CONTROL	0,974	No Significativo
		5 ml	0,936	No Significativo
		15 ml	0,008	Significativo
15 ml	CONTROL	0,005	Significativo	
	5 ml	0,010	Significativo	
	10 ml	0,974	No Significativo	
D6	CONTROL	5 ml	0,005	Significativo
		10 ml	0,008	Significativo
		15 ml	0,472	No Significativo
	5 ml	0,001	Significativo	
		CONTROL	0,008	Significativo

	10 ml	10 ml	0,064	No Significativo
		15 ml	0,418	No Significativo
		CONTROL	0,472	No Significativo
		5 ml	0,064	No Significativo
	15 ml	15 ml	0,007	Significativo
		CONTROL	0,001	Significativo
		5 ml	0,418	No Significativo
		10 ml	0,007	Significativo
D7	CONTROL	5 ml	0,082	No Significativo
		10 ml	0,046	Significativo
		15 ml	0,001	Significativo
	5 ml	CONTROL	0,082	No Significativo
		10 ml	0,976	No Significativo
		15 ml	0,029	Significativo
	10 ml	CONTROL	0,046	Significativo
		5 ml	0,976	No Significativo
		15 ml	0,050	No Significativo
	15 ml	CONTROL	0,001	Significativo
		5 ml	0,029	Significativo
		10 ml	0,050	No Significativo
D8	CONTROL	5 ml	0,007	Significativo
		10 ml	0,295	No Significativo
		15 ml	0,000	Significativo
	5 ml	CONTROL	0,007	Significativo
		10 ml	0,096	No Significativo
		15 ml	0,055	No Significativo
	10 ml	CONTROL	0,295	No Significativo
		5 ml	0,096	No Significativo
		15 ml	0,002	Significativo
	15 ml	CONTROL	0,000	Significativo
		5 ml	0,055	No Significativo
		10 ml	0,002	Significativo

Diferencia Significativa (P<0.05)

El primer día de cultivo (Tabla 2 y 3, Fig. 8) la densidad poblacional en todos los tratamientos fue estadísticamente igual ($p>0,05$), es decir no hubo una predominancia en crecimiento celular en ninguno de los tratamientos, con valores entre los $23,67 \times 10^4$ cél. mL⁻¹ (5 y 15 mL L⁻¹ de EAL) y $30,00 \times 10^4$ cél. mL⁻¹ (10 mL L⁻¹ de EAL).

En los días de cultivo 2 y 3; se mantuvo la tendencia que el mayor crecimiento de células de *T. suecica* se obtuvo con 10 mL L⁻¹, con valores de $70,67 \times 10^4$ cél.mL⁻¹ y $114,67 \times 10^4$ cél.mL⁻¹ respectivamente; y entre el tratamiento control y los tratamientos de 5 y 15 mL L⁻¹ no hubo diferencia significativa en el crecimiento poblacional, con valores de

59,67 x10⁴ cél.mL⁻¹ 53,33 x10⁴ cél.mL⁻¹ 61,33 x10⁴ cél.mL⁻¹ (día 2)
101,33 x10⁴ cél.mL⁻¹ 102,67 x10⁴ cél.mL⁻¹ 100,67 x10⁴ cél.mL⁻¹ (día 3).

En los días de cultivo 4 y 5; entre el tratamiento control y el tratamiento de 10 mL L⁻¹ no hubo diferencia significativa ya que estadísticamente tuvieron igual crecimiento poblacional, con valores para el día 4 de 154,67 x10⁴ cél.mL⁻¹ 140,33 x10⁴ cél.mL⁻¹ y para el día 5, 169,33 x10⁴ cél.mL⁻¹ 175,33 x10⁴ cél.mL⁻¹ consecutivamente; mientras que para con los tratamientos 5 y 15 si hubo diferencia significativa debido a que tuvieron un menor crecimiento poblacional, con valores para el día 4 de 111,67 x10⁴ cél.mL⁻¹ 115,33x10⁴ cél.mL⁻¹ y valores para el día 5 de 128,33x10⁴ cél.mL⁻¹ 124,00x10⁴ cél.mL⁻¹ consecutivamente.

En el sexto día de cultivo; entre el tratamiento control y el tratamiento de 10 mL L⁻¹ no hubo diferencia significativa (219,67 x10⁴ cél.mL⁻¹, 196,33 x10⁴ cél.mL⁻¹) ya que estadísticamente tuvieron igual crecimiento poblacional siendo para este día el máximo crecimiento poblacional, debido a que partir del séptimo día empieza a decaer el crecimiento poblacional en todos los tratamientos (199,67 x10⁴ cél.mL⁻¹ 169,33 x10⁴ cél.mL⁻¹ 165,00 x10⁴ cél.mL⁻¹ 131,00 x10⁴ cél.mL⁻¹).

En el último día de cultivo (día 8), las mayores densidades significativas (p<0,05) se encontraron en los tratamientos con medio Guillard f/2 y 10 mL L⁻¹ de EAL, con 162,67 y 148,00 x10⁴ cél. mL⁻¹, respectivamente; y la menor densidad poblacional significativa (p<0,05) se encontró en el tratamiento dosificado con 15 mL L⁻¹ de EAL con un valor de 103,00 x10⁴ cél. mL⁻¹.

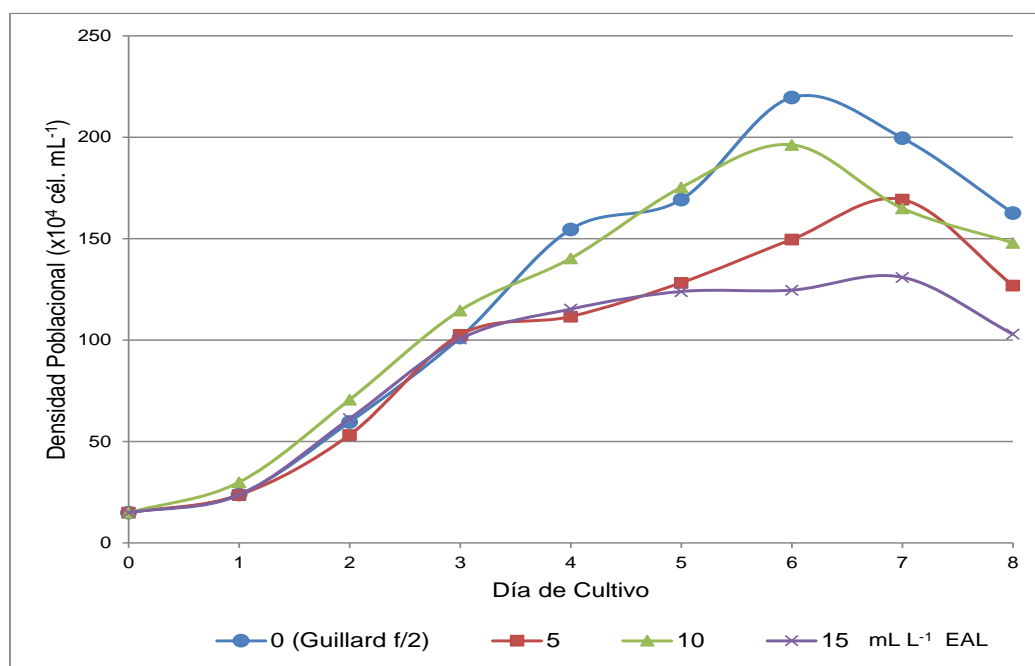


Fig. 8. Curvas de crecimiento poblacional en los cultivos de *T. suecica* en los medios de cultivo.

3.2.2. Tasa de crecimiento y tiempo de duplicación poblacional diaria

En la Tabla 4, se muestra la tasa de crecimiento (μ) y el tiempo de duplicación (TD) poblacional en los cultivos con medio EAL y Guillard f/2, en el sexto día.

Tabla 4. Tasa de crecimiento (μ) y Tiempo de duplicación diaria (TD) poblacional en el sexto día de cultivo de *T. suecica* dosificados con medio EAL y Guillard f/2.

PARÁMETRO	Guillard f/2	EAL (mL L ⁻¹) (x10 ⁴ cél. mL ⁻¹)		
		5	10	15
N_i	15,00	15,00	15,00	15,00
N_f	219,67	149,67	196,33	124,67
μ (día ⁻¹)	0.447	0.383	0.429	0.353
TD (día)	1.55	1.81	1.62	1.96

Tabla 5. Determinación del nivel de significancia en la prueba de comparaciones múltiples en la tasa de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación diaria (TD) poblacional en el sexto día de cultivo de *T. suecica* dosificados con medio EAL y Guillard f/2.

Variable dependiente	Tratamientos	Tratamientos	Nivel de Significancia	Interpretación
μ_6	CONTROL	5 ml	0,010	Significativo
		10 ml	0,914	No Significativo
		15 ml	0,005	Significativo
	5 ml	CONTROL	0,010	Significativo
		10 ml	0,004	Significativo
		15 ml	0,947	No Significativo
	10 ml	CONTROL	0,914	No Significativo
		5 ml	0,004	Significativo
		15 ml	0,002	Significativo
	15 ml	CONTROL	0,005	Significativo
		5 ml	0,947	No Significativo
		10 ml	0,002	Significativo
TD6	CONTROL	5 ml	0,006	Significativo
		10 ml	0,911	No Significativo
		15 ml	0,003	Significativo
	5 ml	CONTROL	0,006	Significativo
		10 ml	0,003	Significativo
		15 ml	0,888	No Significativo
	10 ml	CONTROL	0,911	No Significativo
		5 ml	0,003	Significativo
		15 ml	0,001	Significativo
	15 ml	CONTROL	0,003	Significativo
		5 ml	0,888	No Significativo
		10 ml	0,001	Significativo

La tasa de crecimiento (μ) al sexto día de cultivo (Tabla 4 y 5), día de mayor crecimiento algal, no presento diferencia significativa ($p < 0,05$) entre el tratamiento con 10 mL L⁻¹ de EAL y Guillard f/2, siendo para estos dos tratamientos el máximo crecimiento respectivamente 0,429 y 0,447 día⁻¹, estos tratamientos presentaron diferencia significativa ($p < 0,05$) con los tratamientos 5 y 15 mL L⁻¹ de EAL con valores de 0,383 y 0,353 día⁻¹, respectivamente. Asimismo, el tiempo de duplicación diaria poblacional, para el sexto día, los mayores valores estuvieron en el tratamiento de dosificación 10 mL L⁻¹ de EAL y el Guillard f/2 con 1,55 y

1,62 día, respectivamente; y los menores valores en los tratamientos dosificados con 5 y 15 mL L⁻¹ con 1,81 y 1,96 día, respectivamente.

3.3. Contenido de lípidos en *T. suecica*

En la Tabla 6 y Fig. 9 y 10, se muestran los valores de concentración de lípidos de *T. suecica* al sexto día de cultivo.

Tabla 6. Porcentaje y peso de lípidos de *T. suecica* en los cultivos dosificados con medio EAL y Guillard f/2.

PARÁMETROS	Guillard f/2	EAL (mL L ⁻¹)		
		5	10	15
Lípidos (%)	18.6	23.5	22.4	21.1
Lípidos (mg L ⁻¹)	57,88	56,84	72,34	48,01

Tabla 7. Determinación del nivel de Significancia en la Prueba de Comparaciones Múltiples en el Porcentaje y Peso de Lípidos de *T. suecica* en los cultivos dosificados con Medio EAL y Guillard f/2

Variable dependiente	Tratamientos	Tratamientos	Nivel de Significancia	Interpretación
LÍP_POR	CONTROL	5 ml	0,000	Significativo
		10 ml	0,000	Significativo
		15 ml	0,002	Significativo
	5 ml	CONTROL	0,000	Significativo
		10 ml	0,146	No Significativo
		15 ml	0,003	Significativo
	10 ml	CONTROL	0,000	Significativo
		5 ml	0,146	No Significativo
		15 ml	0,076	No Significativo
		CONTROL	0,002	Significativo
		5 ml	0,003	Significativo
		10 ml	0,076	No Significativo
15 ml	CONTROL	0,002	Significativo	
	5 ml	0,003	Significativo	
	10 ml	0,076	No Significativo	
	CONTROL	0,002	Significativo	
LÍP_BIO	CONTROL	5 ml	0,994	No Significativo
		10 ml	0,029	Significativo
		15 ml	0,146	No Significativo
	5 ml	CONTROL	0,994	No Significativo

		10 ml	0,021	Significativo
		15 ml	0,207	No Significativo
10 ml		CONTROL	0,029	Significativo
		5 ml	0,021	Significativo
		15 ml	0,001	Significativo
15 ml		CONTROL	0,146	No Significativo
		5 ml	0,207	No Significativo
		10 ml	0,001	Significativo

Diferencia Significativa ($P < 0.05$)

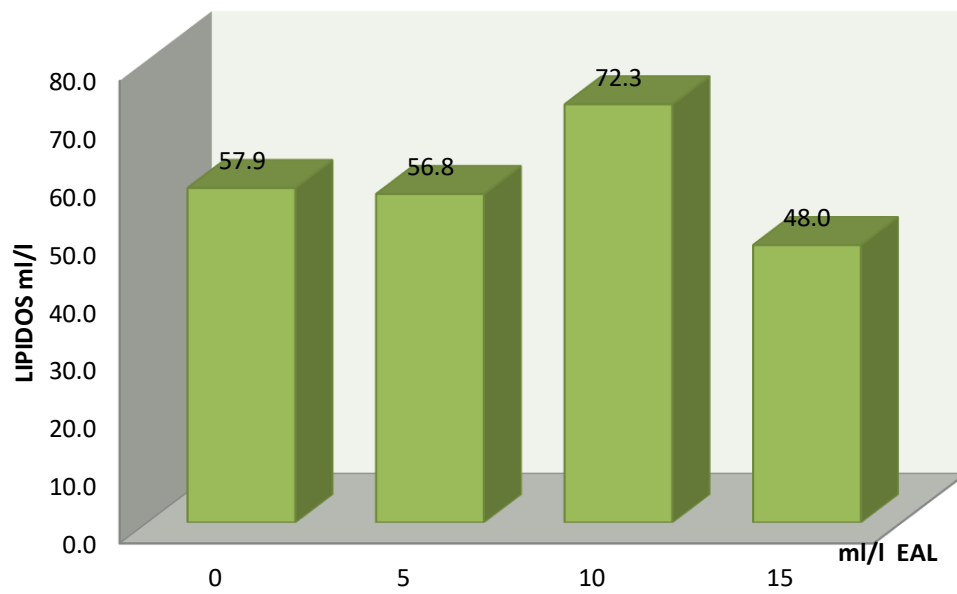


Fig. 9. Biomasa de lípidos de *T. suecica* en los tratamientos con EAL y medio Guillard f/2.

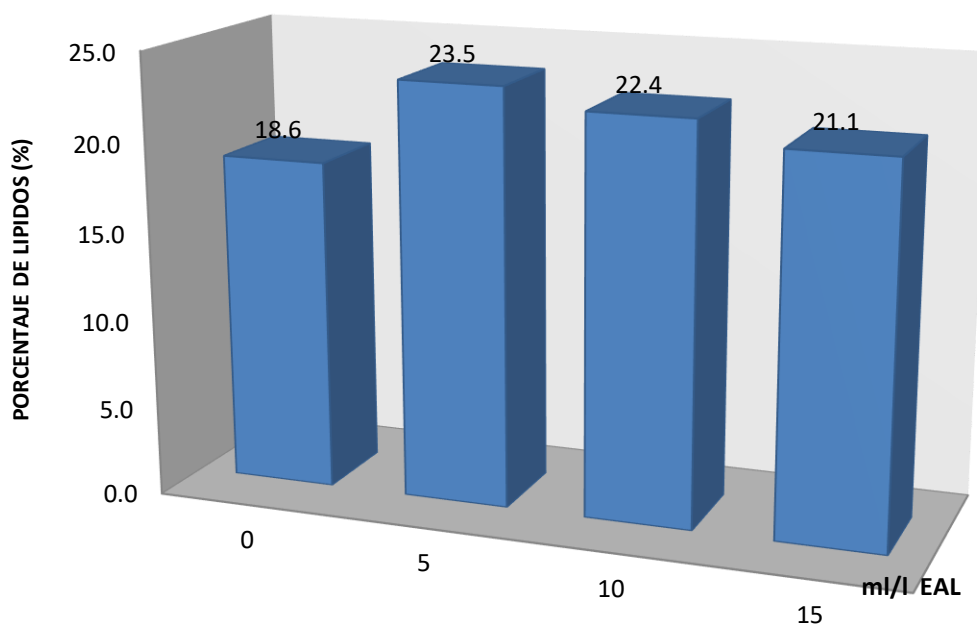


Fig. 10. Porcentaje de lípidos de *T. suecica* en los tratamientos con EAL y medio Guillard f/2.

El mayor valor de significancia ($p < 0,05$) del porcentaje de lípidos (Tabla 6 y 7 Fig. 9 y 10), se encontró en el tratamiento dosificado con 5 mL L^{-1} de EAL con un porcentaje de 23,5 %; seguido de los tratamientos con 10 y 15 mL L^{-1} de EAL con promedios de 22,4 y 21,1 %, respectivamente. El menor valor significativo ($p < 0,05$) de lípidos fue encontrado en el tratamiento de 15 mL L^{-1} con un promedio de 21,1 %.

Referente al peso lipídico, presento el mayor valor de significancia ($p < 0,05$) el tratamiento dosificado con 10 mL L^{-1} de EAL con $72,34 \text{ mg L}^{-1}$. Los menores valores de significancia ($p < 0,05$) de peso lipídico fue encontrado en los tratamientos con 5 y 10 mL L^{-1} de EAL y el medio Guillard f/2, con valores de 56,84; 48,01 y $57,88 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente.

IV. DISCUSIÓN

Los cultivos microalgales están condicionados por diversos factores siendo los más importantes los nutrientes, la intensidad lumínica y el pH, los que pueden incidir en la composición química y deben ser controlados en su rango óptimo para que estos no sean factores determinantes que influyan en lo que se pretende encontrar en el trabajo de investigación (Richmond & Becker, 1986; Abalde *et al.*, 1995; Silva *et al.*, 2011).

Abalde *et al.* (1995), mencionan que la temperatura es un factor importante a tener en cuenta en los cultivos microalgales y que su rango óptimo del cultivo varía según la especie, existiendo algunas especies que no soportan temperaturas superiores a los 25 °C y otras crecen bien hasta los 36 °C. También Coll-Morales (1983), indica una temperatura óptima de 18 °C mientras que Serdar *et al.* (2007), reportan una experiencia de buen crecimiento de *T. suecica* a 20 °C. En el presente trabajo los cultivos presentaron un estrecho rango de temperatura de 24,1 a 24,8 °C no afectando la dinámica del crecimiento a *T. suecica* en las condiciones de laboratorio.

Richmond & Becker (1986), mencionan que las especies de microalgas requieren un rango de pH óptimo para su cultivo que va entre los 7 y 8, y que descensos bruscos del pH suelen ser letales, aunque suelen soportar mejor los incrementos. Silva *et al.* (2011), encontraron en cultivos microalgales rangos de pH entre 7,13 y 8,69 con la temperatura fluctuando entre 21 y 24°C. De igual manera Millán-Núñez *et al.* (2010), reportan en cultivos de *T. Suecica* intervalos de pH de 7,3 a 8,5, en consecuencia en el presente trabajo los cultivos presentaron un rango adecuado de pH (8,10 y 8,93) por lo que las variaciones de este parámetro no afectan el crecimiento de *T. suecica*.

Sánchez *et al.* (2008), utilizando el ensilado de pescado como medio de cultivo orgánico para evaluar el crecimiento mixotrófico de *Nannochloropsis oculata*, y trabajando con diferentes concentraciones de nitrógeno en cada medio, así el T3 estuvo compuesto por ensilado en una concentración de 1 mL L⁻¹, el T4 con solución Yashima y con la solución de ensilado en una concentración de 0,67

mL L⁻¹, el T5 con solución de ensilado en una concentración de 1 mL L⁻¹; obtuvieron una mayor densidad poblacional utilizando el medio Yashima (778,23 x10⁵ cél. mL⁻¹), seguido por el tratamiento dosificado con ensilado de pescado (669,73 x10⁵ cél. mL⁻¹) y la densidad poblacional utilizando Guillard f/2 fue de 260,15 x10⁵ cél. mL⁻¹, y teniendo en cuenta el balance de las concentraciones de nutrientes en cada uno de los medios de cultivo, el medio Yashima presentó una mayor densidad celular a pesar de tener menor concentración de nutrientes, pero se debió a que presenta un mejor balance de nitrógeno y fósforo (20:1) frente al ensilado (155:1)..

En el presente trabajo los máximos valores de densidad poblacional se encontraron en el día 6 con el tratamiento de 10 mL L⁻¹ de EAL y Guillard f/2 con valores de 196,33 y 219,67 x10⁴ cél. mL⁻¹, respectivamente; demostrando la adecuada proporción de nutrientes que favorecen el crecimiento microalgal. En contraste, el tratamiento con 15 mL L⁻¹ de EAL, presenta la menor concentraciones de células (131,00 x10⁴ cél. mL⁻¹) que fue al parecer consecuencia del exceso de nutrientes o al desbalance del N y P.

Para demostrar que los sedimentos contienen nutrientes suficientes para incrementar las densidades microalgales, Thain (1992), ensayó cultivos de *T. suecica* con muestras de agua y sedimento de una Ensenada alemana; así, utilizando solamente agua de la Ensenada obtuvo al quinto día de cultivo de 15 x10⁴ a 45 x10⁴ cél. mL⁻¹, y al noveno día de cultivo se obtuvo de 35 x10⁴ a 55 x10⁴ cél mL⁻¹; por otro lado, utilizando sólo sedimentos, al quinto día los cultivos microalgales presentaron densidades de 25 x10⁴ a 45 x10⁴ cél. mL⁻¹ y al noveno día de cultivo de 40 x10⁴ a 160 x10⁴ cél mL⁻¹.

En el trabajo de investigación se encontró que los tratamientos con 10 mL L⁻¹ de EAL y Guillard f/2, presentaron los mayores valores promedios de la tasa de crecimiento poblacional al día sexto de cultivo con 0,429 y 0,447 día⁻¹, respectivamente, por lo que se estima que la mejor concentración se encuentra en 10 mL L⁻¹ de EAL, los mismos que fueron ligeramente menores a los encontrados por Silva *et al.* (2011), que evaluaron el crecimiento de

Tetraselmis sp., obteniendo el mayor valor de la tasa de crecimiento poblacional ($0,659 \text{ día}^{-1}$) con una concentración de 4,56 % de sanguaza/agua.

El tiempo de duplicación poblacional diaria (TD), que es el tiempo en días que toma una población en duplicarse en número de células, está relacionada con la velocidad de crecimiento, a mayor velocidad de crecimiento menor tiempo de duplicación por lo que el incremento de la tasa implica a su vez una mayor producción microalgal. Sheehan *et al.* (1998), determinaron que *T. suecica* cultivada con medio Guillard f/2, tuvo un tiempo de duplicación de 1,50 día; mientras que en nuestra experiencia el control presentó un promedio ligeramente mejor (1,55 día). Asimismo, el cultivo de *T. suecica* dosificado con 10 mL L^{-1} de EAL fue el mejor tratamiento (1,62 día) dada su menor TD, es decir le toma menos tiempo en duplicar el número de células, lo que indicaría que en este tratamiento, *T. suecica* encuentra las mejores condiciones de crecimiento en comparación con los demás tratamientos.

Los lípidos se encuentran en las células microalgales y su contenido puede ser regulado mediante la adición o restricción del nitrógeno en el medio de cultivo lo que hace variar el contenido lipídico, y puede ser incrementado por la limitación del 1% de las sales nutritivas nitrogenadas (Loera-Quezada & Olguín, 2010). Fernández & Paredes (2007), cultivaron *T. suecica* con extracto de ensilado de pescado y urea, obteniendo incrementos del contenido de lípidos de 154 % con respecto al grupo control (medio Guillard f/2), en los dosificados con 40 mL L^{-1} del extracto. Sheehan *et al.* (1998), cultivando *T. suecica* con medio Guillard f/2, encontraron una concentración lipídica de 22 % en peso seco. De acuerdo a ellos y a nuestra experiencia, utilizando residuos de bajo costo, como medios de cultivo alternativos para microalgas, son factibles de utilizar y muestran una buena producción de lípidos como lo encontrado en el tratamiento con 5 y 10 mL L^{-1} de EAL en los que se obtuvieron 23,5% y 22,4 %, respectivamente.

Loera-Quezada & Olguín (2010), mencionan que la deficiencia de nitrógeno es el factor que más afecta el metabolismo de los lípidos, por lo que la limitación de nitrógeno es considerada como la estrategia más eficiente para incrementar

el contenido de lípidos neutros en las microalgas, en particular el de triglicéridos conformados por ácidos grasos con un elevado grado de saturación (Garibay *et al.*, 2009), siendo para el estudio, la mejor condición encontrada en el tratamiento de 5 mL L⁻¹ de EAL con 23.5% de lípidos por presentar las menores concentraciones de nutrientes (nitrógeno y fosforo).

Según Sukenik *et al.* (1993), en los medios de cultivo con suficiente nitrógeno las células sintetizan principalmente proteínas para mantener el crecimiento y la división, pero ante condiciones de limitación o agotamiento de nitrógeno no habría nutrientes suficientes para mantener el crecimiento celular, por lo que aumentan las sustancias de reserva como los lípidos a expensas de la síntesis proteica; sin embargo Fábregas *et al.* (1996), considera que con los cultivos saturados de nitrógeno se disminuye la concentración celular y aumenta el peso de cada célula, con una inhibición del crecimiento celular y aumentando el porcentaje de proteína ya que se sigue incorporando nitrógeno aun presentándose el bloqueo de la división celular, el mismo proceso produce la disminución de la proporción proteínas/lípidos haciendo que los lípidos se muestren con un menor porcentaje. De todo ello queda claro que el contenido lipídico de *T. suecica* se debe a la calidad y cantidad de nutrientes (N, P) empleados como medio de cultivo.

Chiu *et al.* (2009), mencionan que la acumulación de lípidos en las células microalgales están asociadas con el crecimiento poblacional, ellos encontraron que los contenidos de lípidos en células de *Nannochloropsis oculata*, con un medio limitado en nitrógeno durante las fases de crecimiento logarítmica, estacionaria temprana y final, fueron 30,8; 39,7, y 50,4 %, respectivamente, relacionando los mayores valores con la disminución en el contenido de nitrógeno en el medio de cultivo. Por otro lado, Beopoulos *et al.* (2009), evidencian que el agotamiento de nitrógeno en el medio puede causar la detención de la división celular, pero el metabolismo del carbono continúa, lo que da como resultado una mayor producción de lípidos.

En consecuencia, al incrementarse las densidades microalgales, durante el crecimiento se produce el paulatino agotamiento de nutrientes, principalmente

la fuente de nitrógeno, explicándose el mayor porcentaje de lípidos en el cultivo dosificado con 5 mL L⁻¹ de EAL (23,5 %), pero la mayor densidad poblacional obtenida fue en el tratamiento con 10 mL L⁻¹ de EAL, obteniéndose una mayor biomasa lipídica (72,34 mg L⁻¹ y 22.4%), siendo esta última la mejor dosis para la obtención de lípidos. Esto es corroborado por Alsull & Wan (2012), que obtuvieron porcentajes lipídicos en *Tetraselmis* sp., desde 13,29 % en condiciones de limitación de nitrógeno, hasta los 29,51 % en condiciones de restricción total, concluyéndose que existe una relación inversa entre la concentración de N en los nutrientes y el contenido de lípidos en la microalga.

En base a los resultados obtenidos, el contenido lipídico de *T. suecica* estaría influenciado por la proporción de N en el extracto acuoso de lodo (Tabla 4, Anexo 2). Lo que se evidencia que al utilizar un menor contenido de N (5 mL L⁻¹ de EAL; 4,73 ppm N) presenta un mayor porcentaje de lípidos (23,5 %), y con un mayor contenido de N (15 mL L⁻¹ de EAL; 14,19 ppm N) se presentó un menor porcentaje de lípidos (21,1 %); mientras que el tratamiento con 10 mL L⁻¹ de EAL (9,46 ppm N) presenta un porcentaje de 22,4 % de lípidos, y que relacionado con su mayor contenido en peso de lípidos (72,34 mg L⁻¹), consideramos como la mejor dosificación de EAL para la obtención de lípidos.

De acuerdo a los resultados encontrados se acepta la hipótesis alternativa en donde el tratamiento de 10 mL L⁻¹ de EAL presenta buen crecimiento poblacional y alto contenido de lípidos, en comparación a los otros dos tratamientos de 5 mL L⁻¹ de EAL y 15 mL L⁻¹ de EAL respectivamente.

V. CONCLUSIONES

- En la curva de crecimiento población se encontró que en el día seis se da el máximo crecimiento poblacional, para todos los tratamientos de *T. suecica*, obteniendo el mayor valor para el tratamiento dosificado con 10 mL L⁻¹ de EAL, con 196,33 x10⁴ cél. mL⁻¹; y el menor valor se obtuvo en el tratamiento de 15 mL L⁻¹ de EAL, con 124,67 x10⁴ cél. mL⁻¹.
- En el día sexto de cultivo, el mayor valor de la tasa de crecimiento (μ) para *T. suecica*, se obtuvo en el tratamiento dosificado con 10 mL L⁻¹ de EAL, con 0,429 día⁻¹; y los valores menores se presentaron en los tratamientos dosificados con 5 y 15 mL L⁻¹ de EAL, con 0,383 y 0,353 día⁻¹, respectivamente.
- En el sexto día de cultivo, el menor valor del tiempo de duplicación (TD) para *T. suecica*, se presentó en el tratamiento dosificado con 10 mL L⁻¹ de EAL, con un valor de 1,62 día; y los mayores valores se obtuvieron con los tratamientos dosificado con 5 mL L⁻¹ de EAL y 10 mL L⁻¹ de EAL, con 1,81 día y 1,96 día.
- Al sexto día de cultivo, el mayor porcentaje de lípidos totales para *T. suecica*, se obtuvo en el tratamiento dosificado con 5 mL L⁻¹ de EAL, con un valor de 23,5%; mientras que los menores porcentajes se encontraron en los tratamientos dosificados con 10 mL L⁻¹ de EAL y 15 mL L⁻¹ de EAL, con 22,4 y 21,15 % respectivamente.

VI. RECOMENDACIONES

- ✓ Evaluar el contenido de carbohidratos, proteínas y cenizas de los cultivos de *T. suecica* con diferentes concentraciones del extracto acuoso de lodo (EAL) para determinar el valor nutricional de la microalga.
- ✓ Conociendo la procedencia del extracto acuoso de lodo para la producción de *T. suecica* no se recomendaría para el consumo humano por la posible presencia de metales pesados.
- ✓ Evaluar el crecimiento poblacional y el contenido de lípidos de *T. suecica* en el sexto día de cultivo según los resultados obtenidos como el día de máximo crecimiento poblacional.
- ✓ Evaluar el crecimiento poblacional y el contenido de lípidos, carbohidratos y proteínas de *Tetraselmis suecica* en cultivos semicontinuos utilizando diferentes concentraciones de EAL en condiciones de aire libre con el fin de optimizar el escalamiento del cultivo.
- ✓ Evaluar la tasa de consumo de nutrientes (nitrógeno, fósforo y hierro) y el contenido de clorofilas y carotenos de *Tetraselmis suecica* en cultivos semicontinuos utilizando diferentes concentraciones de EAL, para determinar el mejor método de cultivo y su valoración en la utilización como especie potencial para biorremediación de aguas residuales.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alsull, M. & W. Wan. 2012. Responses of *Tetraselmis* sp. and *Nannochloropsis* sp. isolated from Penang National Park coastal waters, Malaysia, to the combined influences of salinity, light and nitrogen limitation. International Conference on Chemical, Ecology and Environmental Sciences (ICEES'2012) 17-18 de marzo, 2012. Bangkok, Tailandia. 142-145pp.
- AOAC. 1995. Official Methods of Analysis. 16th. AOAC (Association of Official Analytical Chemists) 0066-961X, Arlington, Va. U.S.A. 1093p.
- 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.
- ARAD, S. & A. YARON. 1992. Natural pigments from red microalgae for use in foods and cosmetics. *Trends Food Science and Technology*. **3**:92-97.
- ARÉVALO, W. & S. LOAYZA. 1996. Impacto Ambiental de la Industria Pesquera en Chimbote. Tesis para optar el título Universitario. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima - Perú. 327p.
- BENEDETTI, A., S. CANALI. & F. LIANELLO. 1998. La fertilizzazione organica dei suoli. En *I Fertilizzanti Organici*. Paolo Sequi (Ed.). Italia. Edizioni L'Informatore Agrario. 1-12pp.
- 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.
- BERMEJO, R., P. ÁLVAREZ, F. ACIÉN & G. MOLINA. 2002. Recovery of pure N-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*. *J. Biotechnology*. **93**:73-85.

- BLIGH, E.G. & W.J. DYER. 1959. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**:911-917.
- BOROWITZKA, M. & I. BOROWITZKA. 1989. *Microalgal Biotechnology*. Eds. Cambridge University Press. España.
- CANO, J. & J. PISFIL. 2007. Cultivo de *Tetraselmis suecica* utilizando CO₂ obtenido a partir de valvas de *Argopecten purpuratus* en condiciones de laboratorio. *En: Libro de resúmenes del V Congreso Internacional de Estudiantes en Ciencias Biológicas, VIII Congreso Nacional de Estudiantes de Biología y I Simposio Nacional de Estudiantes de Educación en Ciencias Biológicas, del 4 al 9 de noviembre del 2007. Tacna, Perú.*
- CHIU, S.; C. KAO; M. TSAI; S. ONG; C. CHEN & C. LIN. 2009. Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration. *Bioresource Technol.* **100**(2):833-838.
- CHISTI, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances.* **25**:294-306.
- COLL-MORALES, J. 1983. *Acuicultura Marina Animal*. Mundi-Prensa, Madrid. España. 670p.
- COMISIÓN TÉCNICA MULTISECTORIAL PARA LA RECUPERACIÓN AMBIENTAL DE LA BAHÍA EL FERROL (CTM). 2011. Plan de recuperación ambiental de la bahía "El Ferrol" (Chimbote, Perú). Comisión Técnica Multisectorial para la Recuperación Ambiental de la Bahía El Ferrol (CTM). D.S. N° 005-2002-PE.
- CONAPUMA, C. 1989. Caracterización y vigilancia de la contaminación marina a partir de fuentes domésticas, industriales agrícolas y minería en el área costera de Chimbote. Informe de la Dirección de Hidrografía de la Marina, Lima-Perú.

- DARLEY, W. 1982. *Algal biology: A physical approach*. In: Wilkinson JF. ed. Basic Microbiology. Vol. 9. Blackwell Scientific Publications. 30-52pp.
- DE PHILIPPIS, R. & M. VINCENZINI. 1998. Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. *F.E.M.S. Microbiol. Rev.* **22**:151-175.
- FÁBREGAS, J.; J. ABALDE; C. HERRERO; B. CABEZAS & M. VEIGA. 1984. Growth of marine microalgae *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities y nutrient concentration. *Aquaculture*. **42**:207-215.
- FÁBREGAS J.; A. OTERO; E. MORALES; B. CORDERO & M. PATIÑO. 1996. *Tetraselmis suecica* cultured in different nutrient concentrations varies in nutritional value to *Artemia*. *Aquaculture*. **143**:197-204.
- 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 Profesional. Universidad Nacional del Santa. Nuevo Chimbote - Perú. 62p.
- FERNÁNDEZ-REIRIZ, M. 1989. Biomass production and variation in the biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. *Aquaculture*. **83**:17-37.
- GÓMEZ, C.; S. MENDOZA & C. YZÁSIGA. 2008. Efecto del extracto de valvas de *Argopecten purpuratus* "concha de abanico" en el crecimiento de *Tetraselmis suecica* en condiciones de laboratorio. En: Libro de resúmenes del VI Congreso Internacional de Estudiantes en Ciencias Biológicas, IX Congreso Nacional de Estudiantes de Biología y II Simposio Nacional de Estudiantes de Educación en Ciencias Biológicas, del 5 al 10 de noviembre del 2008. Piura, Perú.

- GONZÁLEZ, A & 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 Obtener el Título de Biólogo Acuicultor. E.A.P. Biología en Acuicultura, Facultad de Ciencias. Universidad Nacional del Santa. Nuevo Chimbote, Perú. 61p.
- 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.
- GUILLÉN, O. & E. CARCAMO. 1993. Nitrógeno Kjeldahl, Nitrógeno Orgánico y Demanda Bioquímica de oxígeno en la bahía de Chimbote. Presentado al V Congreso Latinoamericano sobre ciencias del mar. La Paz, B.C.S. del 27 de setiembre al 1 de octubre de 1993. México.
- GUILLÉN, O. & R. AQUINO. 1978. Contaminación en los Puertos del Callao y Chimbote y su Efecto en la Productividad. *Inst. Mar Perú*. **61**:22.
- GUILLÉN, O. & R. CALIENES. 1981a. Productividad y Afloramiento frente a las Aguas Costeras Peruanas. *Bol. Inst. Mar*. Vol. extraordinario, Icaño. 255-281pp.
- GUILLÉN, O. & R. CALIENES. 1981b. Upwelling off Chimbote. In: *Coastal Upwelling American Union*. WAD:312326.
- GUILLÉN, O. 1981. Fuentes, Niveles, Efectos de la Contaminación Marina en el Perú, CPPS. *Serie Seminarios y Estudios*. **2**:51-166.
- GUILLÉN, O. 1984. Diagnóstico sobre los contaminantes que afectan los Recursos hidrobiológicos de los Países del Convenio Andrés Bello. Año VII. (21):89-132.

- GUILLÉN, O.; R. CALIENES & R. IZAGUIRRE DE RONDÁN. 1977. El Medio Ambiente y Productividad frente al Área Pimentel Chimbote. *Bol. Inst. Mar Perú.* 3(4):107-159.
- IPANAQUÉ, J. & I. PAREDES. 2009. Efecto del ensilado de los desechos blandos de *Argopecten purpuratus* "concha de abanico", en el crecimiento poblacional y contenido de lípidos totales de *Tetraselmis suecica*, en condiciones de laboratorio. Tesis para optar el Título de Biólogo Acuicultor. Universidad Nacional del Santa. Nuevo Chimbote, Perú. 65p.
- JACINTO, M.; R. CABELLO; M. GUZMÁN, P. MORÓN; P. VILLANUEVA & J. CÓRDOVA. 1994. Evaluación de la Contaminación Marina en la Bahía Ferrol - Chimbote. Informe Inst. Mar Perú. 43p.
- KNUD-HANSEN, C. 1998. Pond fertilization: ecological approach and practical applications. Pond dynMICS/Aquaculture collaborative research support program. Oregon State University, Corvallis, Or. 125p.
- LOERA-QUEZADA, M & E, OLGUÍN. 2010. Las microalgas oleaginosas como fuente de biodisel: retos y oportunidades. *Rev. Latinoam. Biotecnol. Amb. Algal.* 1(1):91-116.
- MARSH, J. & D. WEINSTEIN. 1966. Simple charring method for determination of lipids. *J. Lipid Res.* 7:574-576.
- 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.* 2 p. <<http://promepsol.sep.gob.mx/archivospdfs/produccion/Producto773306.PDF>>. Accesado: 23/04/2013.
- MONTOYA, C. & A. ACOSTA. 2011. Producción de biomasa microalgal de *Tetraselmis* sp. en fotobiorreactor tipo columna de burbujeo. V Simposio

Internacional de Biofábricas y I Congreso Internacional de Flujos Reactivos. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de minas. 157-158pp.

MORA, R.; J. ORTEGA & R. MORONTA. 2004. Crecimiento y producción de pigmentos de la microalga nativa *Chlorella* sp. aislada de la represa de Tulé, Municipio Mara Estado Zulia, Venezuela. *Ciencia*. **12**(2):117-124.

MORALES, E.; M. RODRÍGUEZ; D. GARCÍA; C. LORETO & E. MARCO. 2002. Crecimiento, producción de pigmentos y exopolisacáridos de la cianobacteria *Anabaena* sp. PCC 7120 en función del pH y CO₂. *Interciencias*. **27**:373-378.

MORINEAU, T.; P. LEGENTILHOMME; P. JAOUEN; B. LEPINE & Y. RINCE. 2001. Influence a swirl motion on the interaction between microalgal cells and environmental medium during ultrafiltration of a culture of *Tetraselmis suecica*. *Biotechnology Letters*. **23**:1539-1545.

OLGUIN, E.; S. GALICIA; O. ANGULO-GUERRERO & E. HERNANDEZ. 2001. The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina* sp. (*Arthrospira*) grown on digested pig waste. *Bioresource Technology*. **77**:19-24.

OSWALD, W. 1988. *Micro-algae and waste-water treatment*. En: Borowitzka M.A., L.J. Borowitzka, (eds.). *Micro-Algal Biotechnology*. New York, Cambridge University Press. 305-328pp.

PANIAGUA, E.; J. MICHELL; L. VOLTOLINA; D. BÜCKLE & F. RAMÍREZ. 1989. Manual de metodología y alternativas para el cultivo de microalgas. Inst. cienc. del Mar y Limnol. México. 233p.

PANIAGUA, J., F. BUCKLES, C. GRANADOS & D. LOYA. 1986. Manual de metodologías y alternativas para el cultivo de microalgas. CICESE. México 93p.

- RICHMOND, A. & E.W. BECKER. 1986. *Technological aspects of mass cultivation - A general outline*. In: Richmond A (ed.), CRC Handbook of microalgal mass culture. CRC Press Inc., Boca Raton. 245-264pp.
- RITTER, S., R. HILLER, P. WRENCH, W. WELTE & K. DIEDERICHS. 1999. Crystal structure of a phycourobilin-containing phycoerythrin at 1.90-Å resolution. *J. Struct. Biol.* **126**:86-97.
- RODOLFI, L.; Z. CHINI; N. BASSI; G. PADOVANI; N. BIONDI; G. BONINI & M. TREDICI. 2009. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low cost photobioreactor. *Biotechnol Bioeng.* **102**(1):100-112.
- 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.
- SÁNCHEZ, G.; O. MORÓN; G. LI PADILLA & R. OROZCO. 1994. Evaluación de efectos de la contaminación en comunidades marinas en las Bahías Ferrol y Samanco. Agosto 1994. *Inf. Ejecutivo. Inst. Mar. Perú.* 19p.
- SÁNCHEZ, H.; J. JUSCAMAITA; J. VARGAS & R. OLIVEROS. 2008. Producción de la microalga *Nannochloropsis oculata* (Droop) Hibberd en medios enriquecidos con ensilado biológico de pescado. *Ecología Aplicada.* **7**:149-158.
- SERDAR, S.; A. LÖK; S. ACARLI & A. KÖSE. 2007. The effect of two different culture media and five different salinities on growth of *Tetraselmis suecica*. *Rapp. Comm. int. Mer Médit.* **38**:394.
- 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.

THAIN, J. 1992. Growth of the algae *Isochrysis galbana* and *Tetraselmis suecica* in water and sediment elutriate samples from the German Bight. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **91**:229-231.

ULLOA, R. 2011. Inducción de productos bioactivos de la microalga marina *Tetraselmis suecica*. Tesis para optar al grado de Doctora, Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela, España. 220p.

VENKATAMARAN, L. 1986. Blue-Green algae as biofertilizer. *In*: Handbook of Microalgal Mass Culture. Ed. A. Richmond. C.R.C. Press Inc. Boca Raton, Florida. U.S.A. 455-472pp.

VENTOSA, A. & J. NIETO. 1995. Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganism. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **11**:85-94.

VIII. ANEXOS

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

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN (mg L ⁻¹)
Nutrientes	
Mayores	
NaNO ₃	75,00
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	5,00
Micronutrientes	
Na ₂ EDTA	4,360
FeCl ₃ .6H ₂ O	3,150
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,010
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,022
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,010
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,180
Na ₂ MnO ₄ .2H ₂ O	0,006
Vitaminas	
Tiamina	0,100
Biotina	0,500
Cianocobalamina	0,500

Anexo 2. Análisis químico del extracto acuoso del lodo de la bahía “El Ferrol” y la composición en los tratamientos utilizados en los cultivos de *T. suecica*.

PARÁMETROS	EXTRACTO ACUOSO DE LODO	MEDIO GUILLARD f/2	TRATAMIENTOS		
			EAL (mL L ⁻¹)		
			5	10	15
Materia Orgánica (ppm)	14530	-	72,65	145,30	217,95
Materia Inorgánica (ppm)	85470	-	427,35	854,70	1282,05
N (Total) (ppm)	946	12,36	4,73	9,46	14,19
P (Total) (ppm)	171	1,29	0,86	1,71	2,57
Fe (ppm)	314	0,72	1,57	3,14	4,71

Anexo 3. Temperatura promedio (°C) de los cultivos de *T. suecica* dosificados con EAL y medio Guillard f/2.

DÍA DE CULTIVO	EAL (mL L ⁻¹)			
	0	5	10	15
0	24,1	24,1	24,1	24,1
1	24,2	24,2	24,3	24,3
2	24,4	24,3	24,4	24,3
3	24,5	24,5	24,5	24,4
4	24,6	24,5	24,5	24,5
5	24,5	24,4	24,4	24,3
6	24,5	24,5	24,5	24,5
7	24,7	24,6	24,6	24,7
8	24,6	24,7	24,7	24,7

Letras diferentes por fila, indican diferencia significativa (p<0,05).

Anexo 4. pH promedio de los cultivos de *T. suecica* dosificados con EAL y medio Guillard f/2.

DÍA DE CULTIVO	EAL (mL L ⁻¹)			
	0	5	10	15
0	8,10	8,10	8,10	8,10
1	8,22	8,21	8,17	8,19
2	8,49	8,30	8,54	8,38
3	8,63	8,57	8,70	8,71
4	8,80	8,72	8,62	8,79
5	8,70	8,63	8,74	8,87
6	8,90	8,62	8,76	8,82
7	8,63	8,54	8,58	8,41
8	8,54	8,40	8,42	8,44

Letras diferentes por fila, indican diferencia significativa (p<0,05).

Anexo 5. Densidad poblacional ($\times 10^4$ cél. mL^{-1}) de *T. suecica* en todas las unidades experimentales de los cultivos dosificados con EAL y medio Guillard f/2.

DÍA DE CULTIVO	EAL (mL L^{-1})											
	0			5			10			15		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
0	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00
1	24,00	22,00	26,00	22,00	24,00	25,00	29,00	31,00	30,00	23,00	20,00	28,00
2	60,00	60,00	59,00	53,00	49,00	58,00	65,00	70,00	77,00	61,00	60,00	63,00
3	101,00	103,00	100,00	99,00	103,00	106,00	115,00	113,00	116,00	98,00	101,00	103,00
4	125,00	160,00	179,00	108,00	110,00	117,00	138,00	145,00	138,00	119,00	113,00	114,00
5	146,00	175,00	187,00	130,00	127,00	128,00	170,00	165,00	191,00	125,00	126,00	121,00
6	201,00	203,00	255,00	150,00	160,00	139,00	178,00	201,00	210,00	131,00	113,00	130,00
7	194,00	196,00	209,00	169,00	183,00	156,00	153,00	164,00	178,00	139,00	112,00	142,00
8	154,00	163,00	171,00	136,00	130,00	115,00	138,00	146,00	160,00	98,00	101,00	110,00

Anexo 6. Tasa de crecimiento (μ) y Tiempo de duplicación (TD) poblacional al sexto día de cultivo de *T. suecica* en todas las unidades experimentales dosificadas con medio EAL y medio Guillard f/2.

PARÁMETRO	EAL (mL L^{-1})											
	0			5			10			15		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
N_0 ($\times 10^4$ cél. mL^{-1})	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00
N_t ($\times 10^4$ cél. mL^{-1})	201,00	203,00	255,00	150,00	160,00	139,00	178,00	201,00	210,00	131,00	113,00	130,00
Δt (día)	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
μ (día^{-1})	0.433	0.434	0.472	0.384	0.395	0.371	0.412	0.433	0.440	0.361	0.337	0.360
TD (día)	1.60	1.60	1.47	1.81	1.76	1.87	1.68	1.60	1.58	1.92	2.06	1.93

Anexo 7. Biomasa, absorbancias, porcentaje total de lípidos y concentración total de lípidos, de *T. suecica* en todas las unidades experimentales de los cultivos dosificados con EAL y medio Guillard f/2.

PARÁMETROS	EAL (mL L ⁻¹)											
	0			5			10			15		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Biomasa (mg x20mL⁻¹)	5,34	6,41	6,96	4,86	4,78	4,89	6,29	6,07	6,99	4,58	4,59	4,45
Biomasa (mg L⁻¹)	267,00	320,50	348,00	243,00	239,00	244,50	314,50	303,50	349,50	229,00	229,50	222,50
Absorbancia	0,232	0,258	0,290	0,255	0,248	0,263	0,318	0,297	0,360	0,218	0,221	0,208
Lípidos (%)	19,34	17,92	18,55	23,36	23,10	23,94	22,51	21,78	22,93	21,19	21,44	20,81
Lípidos (mg L⁻¹)	51,64	57,43	64,55	56,76	55,20	58,54	70,79	66,11	80,14	48,53	49,19	46,30

Anexo 8. PANEL FOTOGRÁFICO

PREPARACION DEL EXTRACTO DE LODO



REGISTRO DE CRECIMIENTO POBLACIONAL



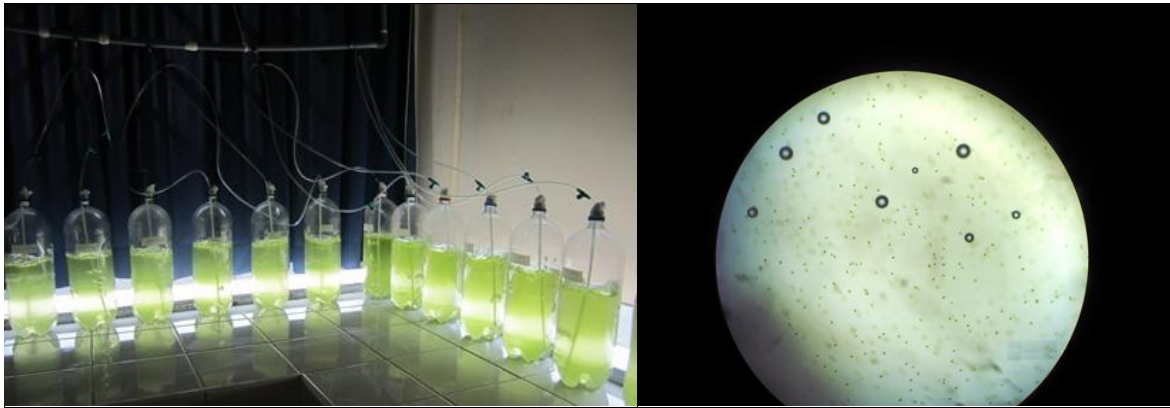
REGISTRO DE pH Y TEMPERATURA DEL MEDIO DE CULTIVO



ADICIONANDO EL EXTRACTO ACUOSO DE LODO



TRATAMIENTOS Y CAMPO OPTICO DE T. suecica



PROCESO DE DETERMINACION DE LIPIDOS



