

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



**“CONDENSADO DE VAPOR DE BIOFOULING EN EL CRECIMIENTO
POBLACIONAL Y CONTENIDO DE PIGMENTOS DE *TETRASELMIS
SUECICA*, EN CULTIVOS AL AIRE LIBRE”**

TESIS PARA OPTAR EL TITULO DE BIÓLOGO ACUICULTOR

AUTORES:

Bach. Gustavo César Vásquez, Chumpitaz
Bach. Federico Hipolito Fernandez Sifuentes.

ASESOR:

Dr. Blgo. Pesq. Juan Fernando Merino Moya

NUEVO CHIMBOTE, PERÚ 2020

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



**"CONDENSADO DE VAPOR DE BIOFOULING EN EL CRECIMIENTO
POBLACIONAL Y CONTENIDO DE PIGMENTOS DE *TETRASELMIS
SUECICA*, EN CULTIVOS AL AIRE LIBRE"**

TESIS PARA OPTAR EL TITULO DE BIÓLOGO ACUICULTOR

AUTORES:

Bach. Gustavo César Vásquez, Chumpitaz

Bach. Federico Hipólito Fernández Sifuentes.

ASESOR:

Dr. Bigo. Pese. Juan Fernando Merino Moya

NUEVO CHIMBOTE, PERÚ 2020

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



HOJA DE CONFORMIDAD DEL JURADO EVALUADOR

**"CONDENSADO DE VAPOR DE BIOFOULING EN EL CRECIMIENTO
POBLACIONAL Y CONTENIDO DE PIGMENTOS DE *TETRASELMIS*
SUECICA, EN CULTIVOS AL AIRE LIBRE"**

AUTORES:

Bach. Gustavo César Vásquez, Chumpitaz

Bach. Federico Hipólito Fernández Sifuentes.



Dr. Guillermo Beltrano Saldaña Rojas
Presidente



Mg. Blgo. Juan Carhuapoma Garay
Secretario



Dr. Juan Fernando Merino Moya
Integrante

NUEVO CHIMBOTE, PERÚ 2020

CONSOLIDADO DE NOTAS DE SUSTENTACIÓN DE TESIS (VIRTUAL)

ALUMNO: Federico Hipólito Fernández Sifuentes

NOTA FINAL DE LA SUSTENTACIÓN

N°	JURADO EVALUADOR	NOTA
01	Dr. Guillermo Saldaña Rojas	24
02	MSc. Juan Carhuapoma Garay	25
03	Dr. Fernando Merino Moya	26
PROMEDIO		25

CALIFICATIVO DE: 25 puntos: Equivalente a 16 puntos (BUENO)

Nuevo Chimbote, 23 de febrero del 2021



.....
Presidente del Jurado
Dr. Guillermo Saldaña Rojas



.....
Secretario
MSC. Juan Carhuapoma Garay



.....
Integrante
Dr. Fernando Merino Moya

CONSOLIDADO DE NOTAS DE SUSTENTACIÓN DE TESIS (VIRTUAL)

ALUMNO: Gustavo César Vásquez Chumpitaz

NOTA FINAL DE LA SUSTENTACIÓN

N°	JURADO EVALUADOR	NOTA
01	Dr. Guillermo Saldaña Rojas	24
02	MSc. Juan Carhuapoma Garay	25
03	Dr. Fernando Merino Moya	26
	PROMEDIO	25

CALIFICATIVO DE: 25 puntos: Equivalente a 16 puntos (BUENO)

Nuevo Chimbote, 23 de febrero del 2021



.....
Presidente del Jurado
Dr. Guillermo Saldaña Rojas



.....
Secretario
MSC. Juan Carhuapoma Garay



.....
Integrante
Dr. Fernando Merino Moya

DEDICATORIA

Con todo amor y cariño a Dios que me dio la oportunidad de vivir y cumplir mis metas y cada logro en la vida.

A mis padres que me dieron la vida y han estado conmigo en todo momento, gracias por darme una carrera para mi futuro, por creer en mí, apoyándome y brindarme todo su amor.

Hipolito Fernandez Sifuentes

A Dios, mis padres, hermanos, hija y esposa quienes con su amor, paciencia y esfuerzo me han permitido llegar a cumplir hoy un sueño más.

Gustavo Vásquez, Chumpitaz

AGRADECIMIENTOS

A nuestros profesores, por sus enseñanzas y consejos para ser mejores profesionales.

De manera muy especial a nuestro asesor Dr. Luis Fernando Merino Moya, por habernos orientado en todo momento, por sus consejos para la elaboración de nuestra tesis.

Al Dr. Luis Torres Cabrera, por todas las facilidades brindadas para el montaje del proyecto y su orientación a lo largo de nuestra carrera universitaria.

A nuestros amigos, que siempre nos acompañaron en este caminar, por el apoyo cuando más los necesitábamos y por los ánimos para la culminación de este proyecto, por extender su mano en momentos difíciles y por el amor brindado cada día.

Así mismo, deseamos expresar nuestro reconocimiento a la Universidad Nacional del Santa por la formación brindada a lo largo de nuestra carrera universitaria.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTOS.....	vii
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
LINTRODUCCIÓN.....	15
II.MARCOTEORICO.....	19
2.1. Fundamentos teóricos de la investigación.....	19
III.MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
3.1 LOCALIZACIÓN DEL EXPERIMENTO.....	22
3.2 MATERIAL DE ESTUDIO.....	22
3.2.1 Muestra.....	22
3.2.2 Mantenimiento de <i>T. suecica</i>	22
3.3 MÉTODOS.....	22
3.3.1 Tipo de investigación: Experimental.....	22
3.3.2 Diseño experimental.....	22
3.3.3 Preparación de medio de cultivo.....	23
3.3.4 Tratamiento del agua de mar.....	25
3.3.6 Composición química del CVB.....	26
3.3.7 Determinación de la tasa de duplicación y tasa de crecimiento para cuantificar la población.....	27
3.3.8 Determinación del crecimiento poblacional.....	27
3.3.9 Parámetros ambientales de los cultivos algales.....	28
3.3.10 Determinación de clorofila <i>a</i> , <i>b</i> y β - carotenos.....	28
3.3.11 Técnicas de procesamiento y análisis de datos.....	29
IV. RESULTADOS.....	29
4.1 Crecimiento poblacional de <i>T. suecica</i>	29

4.2 Tasa de crecimiento y tiempo de duplicación poblacional de <i>T. suecica</i>.	30
4.3 Contenido de pigmentos de <i>T. suecica</i>.....	31
4.4 Evaporación en los cultivos de <i>T.suecica</i>.	32
4.5 Variación de la temperatura en el cultivo de <i>T. suecica</i>.....	32
4.6 pH en el cultivo de <i>T. suecica</i>.....	32
4.7 Oxígeno en el cultivo de <i>T. suecica</i>.	33
4.8 Salinidad en el cultivo de <i>T. suecica</i>.	34
V. DISCUSIÓN	34
VI. CONCLUSIONES	40
VII. RECOMENDACIONES.....	41

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla. 1 Preparación de las unidades experimentales.....	22
Tabla. 2 Composición química del medio HM y de CVB.....	23
Tabla. 3 Porcentaje de Especies predominantes.	24
Tabla 4. Acondicionamiento de las unidades experimentales	26
Tabla. 5. Cuadro comparativo de antecedentes y actual de análisis química del CVB analizado por COLECBI S.A.C.....	27
Tabla 6. . Parámetros de crecimiento poblacional de <i>T. suecica</i> dosificados con medio experimental CVB y control HM.....	31
Tabla 7. . Evaporación del agua de los cultivos de <i>T. suecica</i> cultivados al aire libre dosificados con CVB.	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Condensador de vapores del biofouling	25
Fig. 2 Esquema de la secuencia para el tratamiento del agua de mar según Merino <i>et al.</i> (2003).....	26
Fig. 3 Variación del crecimiento poblacional de los cultivos de <i>T. suecica</i> cultivados en aire libre con medios de cultivo HM y 40, 50 y 60 mL L ⁻¹ de CVB.	30
Fig. 4 Contenido de pigmentos en las células del cultivo de <i>T. suecica</i> cultivadas al aire libre.	31
Fig. 5 Variación de temperatura del agua (°C) de los cultivos de <i>T. suecica</i> al aire libre dosificados con CVB.	32
Fig. 6 Variación de pH del agua de los cultivos de <i>T. suecica</i> cultivados en aire libre dosificados con CVB.	33
Fig. 7 Variación del oxígeno disuelto (ml/L) de los cultivos de <i>T. suecica</i> al aire libre dosificados con CVB.	34
Fig. 8 Variación de salinidad de los cultivos de <i>T. suecica</i> cultivados en aire libre	34

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Elaboración del medio de cultivo condensado de vapores de biofouling	49
Anexo 2. Acondicionamiento del lugar donde se realizó la investigación.....	50
Anexo 3. Medición de los parámetros físicos y químicos	51
Anexo 4. Conteo del crecimiento poblacional.....	51
Anexo 5. Protocolo empleado en la determinación de pigmentos (clorofila a y caroteno)....	52

RESUMEN

Se evaluó el efecto del condensado de vapor de biofouling del cultivo de *Argopecten purpuratus*, en el crecimiento poblacional y contenido de pigmentos de clorofila *a*, clorofila *b* y carotenos totales de *Tetraselmis suecica*, en cultivos al aire libre. Para la elaboración del medio de cultivo experimental se usó el biofouling, obtenidos de la empresa Cultimarine s.a.c.”, como medio de cultivo control se utilizó HM. Se emplearon 12 biorreactores plásticos de 10 L de capacidad. Se emplearon tres tratamientos de CVB (40 ml L⁻¹, 50 ml L⁻¹ y 60 ml L⁻¹) y un control, con 3 repeticiones cada uno respectivamente. Se determinó el conteo celular 3 veces al día (8am, 12pm y 6pm) con la ayuda de una cámara de Neubauer. La mayor cantidad de células se obtuvo a los cuatros días de cultivo, en el tratamiento con 50 ml L⁻¹ de CVB siendo superior a los demás tratamientos excepto al control, en el porcentaje de contenido de clorofila *a*, β y carotenos, el tratamiento control obtuvo mayor cantidad en clorofila *a* y carotenos, mientras que en clorofila β se obtuvo mayor cantidad con el tratamiento de 60 ml L⁻¹ de CVB.

Palabras claves: biofouling, *T. suecica*, pigmentos, crecimiento poblacional, clorofila *a*, clorofila *b*, carotenos.

ABSTRACT

The effect of the biofouling vapor condensate from the *Argopecten purpuratus* culture was evaluated on the population growth and content of chlorophyll a, chlorophyll b and total carotenes pigments of *Tetraselmis suecica*, in outdoor cultures. For the elaboration of the experimental culture medium, biofouling was used, obtained from the company Cultimarine s.a.c. ", as a control culture medium, HM was used. 12 plastic bioreactors of 10 L capacity were used. Three CVB treatments were used (40 ml L^{-1} , 50 ml L^{-1} and 60 ml L^{-1}) and a control were used, with 3 repetitions each, respectively. The cell count was determined 3 times a day (8am, 12pm and 6pm) with the help of a Neubauer chamber. The highest number of cells was obtained after four days of culture, in the treatment with 50 ml L^{-1} of CVB, being superior to the other treatments except the control, in the percentage of content of chlorophyll a, β and carotenes, the treatment the control obtained a greater quantity in chlorophyll a and carotenes, while in chlorophyll β , a greater quantity was obtained with the treatment of 60 ml L^{-1} of CVB.

Key words: biofouling, *T. suecica*, pigments, population growth, chlorophyll a, chlorophyll b, carotenes.

I. INTRODUCCIÓN

El cultivo de “concha de abanico” en la región Áncash se ha desarrollado activamente, convirtiéndose en una de las zonas más productivas de la costa peruana. A su vez, genera importantes cantidades de residuos que son vertidos directamente a los ambientes acuáticos o terrestres, afectando negativamente el medio ambiente y la salud de los pobladores (Merino y Encomendero, 2012), el biofouling ocasiona condiciones desfavorables para la crianza de *A. purpuratus*, al limitar el flujo de agua hacia el interior de las linternas y con ello la disponibilidad de oxígeno y alimento para los organismos en cultivo (Loayza, 2011).

Los subproductos de la maricultura pueden usarse en la preparación de medios de cultivos nutritivos para el crecimiento algal, por contener carbono y nitrógeno necesarios para su desarrollo (Merino y Encomendero, 2012).

Los subproductos orgánicos, posibilitan la realización de cultivos heterótrofos que, según Barclay *et al.*, (1994) presentan ventajas sobre la producción fotosintética con un alto grado de control de los procesos, que facilita el rápido crecimiento; fácil mantenimiento de un monocultivo con productos reproducibles; y bajo costo de procesamiento de la biomasa celular.

Las microalgas son un grupo diverso de microorganismos fotosintéticos con una estructura simple lo que permite el rápido crecimiento celular y por lo tanto una mayor producción de biomasa (Li y Huang, 2009). Por esta razón, las microalgas son llamados microorganismos fotoautótrofos, siendo la luz su principal fuente de energía y el dióxido de carbono (CO₂) su principal fuente de carbono (Martin, 2010).

La sencilla y rápida transformación de la energía solar en energía química que convierte posteriormente en su biomasa, la vuelve interesante para su transformación en productos de interés para la industria química y farmacéutica, alimentación humana y animal, la acuicultura, tratamiento de aguas residuales, biorremediación y más recientemente como biocombustibles; jugando un importante papel en la captura de CO₂ (Oligae, 2011).

Las microalgas presentan crecimiento elevado, y una de las ventajas es que acumulan lípidos, por ello, tienen un interés comercial y son ampliamente utilizadas en la producción farmacéutica; la biotecnología en las microalgas ha sido desarrollada en diferentes aplicaciones comerciales, así la alta productividad lipídica es aprovechada en la industria alimentaria para la aplicación en alimentos funcionales, también puede ser reutilizada en sistemas de producción de biocombustibles, procesos de avicultura, acuicultura o agricultura (Chisti, 2007; Harum *et al.*, 2010; Mehrabadi *et al.*, 2015).

Por otra parte, las microalgas, tienen un uso extendido como biofertilizante, tratamiento de aguas residuales, eliminación de contaminantes químicos, además de eliminar patógenos del agua residual (Brennan y Owende, 2010). Por lo tanto, la biorremediación con microalgas es una alternativa por mayor capacidad de adaptación a las condiciones y a la alta remoción de nutrientes (Ortiz M. *et al.*, 2018), especialmente de nitrógeno y fósforo (Bermeo, 2011).

Las microalgas están entre los organismos más eficientes en la conversión de energía solar, cercana al 5%, muy lejos de los valores de uno de los cultivos de crecimiento más rápido como es la caña de azúcar, que no llega al 1% (Adameczak, *et al.*, 2009). Tienen capacidad para sobrevivir en condiciones diversas y extremas, lo cual se refleja en la enorme diversidad y muchas veces a su inusual patrón de lípidos celulares (Sharma *et al.*, 2012), pueden modificar el metabolismo de los lípidos de manera eficiente en respuesta a cambios en las condiciones ambientales.

En condiciones óptimas de crecimiento, donde se producen grandes cantidades de biomasa microalgal, muchas de ellas alteran sus rutas biosintéticas de lípidos hacia la formación y acumulación de lípidos neutros, principalmente en forma de triglicéridos, lo que permite que las microalgas puedan soportar condiciones adversas.

Los cultivos de microalgas son considerados una tecnología de mediana complejidad, con desarrollo en escala de plantas piloto (Flotats *et al.*, 2011). Al tratarse de organismos vivos involucran una serie de parámetros (temperatura, nutrientes, luz y otros) que deben ser considerados, evaluados, determinados y medidos para realizar con éxito un cultivo. Además, cada parámetro tiene un óptimo según la especie cultivada (Grobelaar, (2004); Richmond, (2004); Park *et al.*, 2011).

Uno de los aspectos más importantes para tener en cuenta en la producción de microalgas, es la selección del medio de cultivo químico y económicamente apropiado para utilizar en los diferentes volúmenes del sistema de producción masiva. Cuando se trabaja con volúmenes grandes, el interés radica generalmente en el uso de medios de cultivo de bajo costo y que, a su vez, aseguren altas densidades de los cultivos y buena calidad nutricional de las células (Abalde *et al.*, (1995); Alfonso y Martínez, 1988).

La elección de las especies a cultivar depende directamente de la finalidad que se le desea brindar a la biomasa resultante (biomasa, pigmentos, alimento, etc.). Las especies algales predominantes dentro de un sistema abierto dependen de factores ambientales, operacionales y parámetros biológicos (McGriff y McKinney, (1972); Park *et al.* (2011); Abdel *et al.*, 2012).

En la producción de organismos fotoautótrofos existen 2 diseños básicos (Borowitzka, (1999); Contreras *et al.*, (2003) y Tredici, 2004): cultivos abiertos, donde la biomasa está expuesta a las condiciones medioambientales; y cerrados, denominados fotobiorreactores, con poco o ningún contacto con el medio externo (Contreras *et al.*, (2003); Tredici, (2004); Posten, 2009). Un sistema de cultivo es diseñado en base a diversos criterios: la biología de la(s) especie(s) a cultivar (Borowitzka, (1999); Martínez, 2008); forma del cultivo; requerimientos nutricionales, lumínicos y resistencia al estrés (Martínez, 2008); relación de la superficie iluminada/ volumen del reactor que determina la velocidad de crecimiento (Contreras *et al.*, 2003 y Martínez, 2008); orientación e inclinación; tipo de sistemas de mezcla y dispersión de gases; sistemas de limpieza y de regulación de la temperatura; transparencia y durabilidad del material (Borowitzka, (1999); Martínez, 2008); capacidad de escalado (Borowitzka, 1999). Por último, son también importantes bajos costos de construcción y operación para fines comerciales (Martínez, 2008).

En un sistema cerrado se pueden lograr cultivos monoespecíficos aislados del medioambiente (Posten, 2009). El volumen de producción depende de la cepa de alga seleccionada, calidad del agua, nutrientes y de la ubicación geográfica. Tienen un gran rendimiento y algunos acumulan hasta un 60% de su peso en aceites transformables tanto en biodiesel y otros biocarburantes (Erazo *et al.*, 2010). Un fotobiorreactor es un dispositivo técnico cerrado diseñado para producir en su momento, masa y calor, entre sus ventajas se encuentran: aislamiento del medio ambiente sin intercambio de gases y fuentes de contaminación externas, reduce el riesgo de contaminación, mejora la reproducibilidad de las condiciones de cultivo, brinda un mayor control de las condiciones hidrodinámicas y temperatura, además de permitir un diseño técnico apropiado (Singh y Sharma, 2012).

Entre las microalgas de potencial importancia para la producción de biocombustibles que existen en los cuerpos de agua marina, se encuentra la *T. suecica*, la cual posee en base seca 52% de proteína y entre 15 a 23% de lípidos (Hirata *et al.*, 2001), se caracteriza por ser un alga Chlorofita, unicelular y móvil, de 7 a 9 μm de diámetro y 10 a 16 μm de largo (Diaz *et al.*, 2006). En cultivos autotróficos puede utilizar diferentes fuentes nitrogenadas como úrea, fosfato diamónico, nitratos, nitritos, etc; y en cultivo heterotrófico como ensilado de pescado puede metabolizar diversos aminoácidos y vitaminas, sintetizar ácidos grasos poliinsaturados (Bold y Wynne, 1985).

Actualmente, el gran desarrollo de los cultivos de *A. purpuratus* “concha de abanico” en la Región Ancash ha traído aparejado el establecimiento del “biofouling” o bioincrustantes, es decir organismos que colonizan cabos, boyas, bolsas colectoras, pearl nets, linternas e inclusive las valvas de “concha de abanico” ocasionando pérdidas económicas por el deterioro de materiales, reducción del tiempo de vida útil, incremento del peso de las linternas que disminuyen la flotabilidad del sistema e incrementándose los costos de mantenimiento (Loayza, 2011). El desarrollo del biofouling cubre la superficie de las linternas causando serias dificultades en los cultivos de “concha de abanico” por la disminución del flujo de agua y del suministro de alimento disminuyendo la tasa de ingestión y la disponibilidad de oxígeno, afectando seriamente el crecimiento y supervivencia de los moluscos en cultivo (Claereboudt *et al.*, (1994); Maguire y Burnell, (1999); Uribe y Blanco, (2001); Navarro, (2001); LeBlanc *et al.*, (2002); Villarroel *et al.*, (2004); Hincapié, 2007).

En la bahía de Samanco, Ancash, Perú, el biofouling estuvo compuesto por 29 especies en verano y 38 en invierno. Donde se registraron 9 phylum de macroinvertebrados: Annelida, Arthropoda, Bryozoa, Cnidaria, Chordata, Equinodermata, Mollusca, Platyhelminthes, Porifera, y una División: Rhodophyta; que practican 8 formas de nutrición: comensal, detritívoro, filtrador, herbívoro, omnívoro, predador, productor y parasito. Durante el verano la comunidad estuvo dominada por *Semimytilus-Ciona Bugula* y en invierno por *Semimytilus-Ciona*. La biomasa fresca por linterna, producida en un periodo entre 2 y 3 meses, fue de 68,04 kg en verano y 73,42 kg en invierno. *C. intestinalis* el 29,0 y 22,22%, en verano e invierno, respectivamente, en total 68,04 kg en verano y 73,42 kg en invierno, por lo que las diferencias podrían guardar relación con el nivel de productividad primaria, temperatura y condiciones oceanográficas, de los ecosistemas (Loayza, 2014).

Los métodos de producción de microalgas, los más conocidos son los que comienzan con pequeños volúmenes que, al alcanzar la fase de crecimiento deseada, se inoculan en volúmenes crecientes para la obtención de un cultivo masivo. Estos cultivos son enriquecidos con medios nutritivos complejos y costosos como menciona Walne, (1966); Guillard, (1975), por lo que es necesario evaluar medios nutritivos más económicos y que permitan un alto rendimiento de los cultivos (Buitrago *et al.*, 1989).

El elevado costo en la formulación de los medios de cultivo convencionales es uno de los principales problemas que limitan la producción de microalgas con fines comerciales (Coutteau, 1996). Como alternativa, se viene estudiando el uso de biofouling provenientes del

cultivo de concha de abanico, como medio de cultivo alternativo, para el crecimiento *T. suecica* en laboratorio con diferentes dosificaciones del condensado de biofouling del cultivo suspendido de concha de abanico, obteniendo mejor tasa de crecimiento con los dosificados de 45 ml y 60 ml (Cárdenas y Valiente 2015). Así mismo Yauri, (2015) empleo como medio de cultivo ensilado de biofouling en *T. suecica* en el crecimiento poblacional demostrando mayor crecimiento poblacional y mayor concentración de clorofila α .

Considerando la capacidad de aprovechar sustancias orgánicas y los ensayos preliminares realizados, planteamos el siguiente problema de investigación: ¿Cuál será el efecto de la utilización de condensado de vapor biofouling en el crecimiento poblacional, contenido de pigmentos de *T. suecica* en cultivos al aire libre?

Como hipótesis de investigación se formuló:

Si en condiciones al aire libre se cultiva *T. suecica* con el condensado de vapor del biofouling como medio de cultivo, en concentraciones de 40, 50 y 60 ml L⁻¹, se obtendrán buen crecimiento poblacional y contenido de los pigmentos de *T. suecica* con 50 ml L⁻¹.

El objetivo general fue evaluar la utilización de los condensados de vapor de biofouling (CVB) en el crecimiento poblacional y contenido de pigmentos de *T. suecica*, en cultivos al aire libre.

Los objetivos específicos fueron:

- Cuantificar el crecimiento poblacional (cél. mL⁻¹), tasa de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (TD) de *T. suecica* en los cultivos, utilizando diversos volúmenes de condensado de vapor del biofouling (40, 50 y 60 mL.L⁻¹) en cultivos al aire libre.
- Determinar el efecto de la concentración de condensado de vapor del biofouling (40, 50 y 60 mL.L⁻¹) como medio de cultivo en el contenido de pigmentos de *T. suecica* en cultivos al aire libre.

II. MARCO TEORICO

2.1. Fundamentos teóricos de la investigación

El Perú es un país que tiene condiciones excepcionales para la pesca y la acuicultura, gracias a la riqueza de su mar, lagos y ríos. Por ello, en este caso la acuicultura de concha de abanico se constituye en una actividad económica importante, generando divisas al país, además de convertirse en una fuente de sustento económico para familias, a través del cultivo y

comercialización de sus recursos, los cuales son demandantes de servicios indirectos (Sánchez, 2017).

Un factor que incide de manera importante en esta actividad, pero que ha recibido menos atención en cuanto a estudios se refiere, son las especies bioincrustantes (Pacheco y Garate, 2005). Todos los materiales expuestos al agua o a otro fluido sufren con frecuencia el fenómeno conocido como fouling o incrustamiento, que consiste en la formación de depósitos no deseados sobre las superficies que están en contacto con dicho fluido (Jimenes, 2009).

El biofouling es considerado como un problema que tiene su origen en la formación de biopelículas, por tanto, para entender los efectos y dinámica del biofouling y para designar contramedidas adecuadas es importante comprender los procesos de formación y desarrollo de las biopelículas (Flemming, 1991).

Loayza, (2011), menciona que estos obedecen a un modelo de sucesión, iniciado por un proceso de adsorción macromolecular, seguido por colonización bacteriana y epibiontes unicelulares que desarrollan una matriz polimérica, en sustratos vivos y no vivos.

Loayza y Tresierra, (2014), coinciden en que el biofouling, En la bahía de Samanco, Ancash, Perú, es práctica corriente que los cultivadores de *A. purpuratus* para disminuirla producción de “biofouling” sobre las linternas de cultivo, las ubiquen a profundidades de 5-7 m; sin embargo, enfrentan problemas debido a la disminución de las concentraciones de oxígeno disuelto a esas profundidades.

Encomendero et al., (2006) menciona las grandes cantidades de desecho del cultivo de *A. purpuratus* que son dispuestos en ambientes terrestres y acuáticos causando complicaciones en el ecosistema, así mismo Merino y Encomendero, (2012) nos dicen que los lugares de disposición final del biofouling son una fuente de contaminación y afectación a la salud de la población.

Los residuos del cultivo de *A. purpuratus* contienen cantidades importantes de nutrientes que resultan significativos para los cultivos algales y la generación de proteínas y pigmentos (Merino y Encomendero, 2012), es así como la microalga *T. suecica* presenta características mixotróficas que le permiten asimilar nutrientes orgánicos presentes en el biofouling (Van y Pulich, 1973).

El proceso de transformar el biofouling en un medio de cultivo para la producción masiva de microalgas tiene un especial interés ecológico, ya que contribuiría a reducir los impactos negativos que la actividad maricultural está generando (Merino y Encomendero, 2012).

2.2. Marco conceptual

Biofouling

El término biofouling proviene de fouling. Son acumulaciones de microorganismos se denominan biopelículas o biofilms; se considera que son el primer estadio de formación del biofouling bioensuciamiento (Jiménez, 2009).

Según Flemming (1991) los tipos de fouling se clasifican en: fouling por precipitación, fouling orgánico, fouling particulado, biofouling o fouling biológico.

Microalgas

Son llamadas microalgas una gran cantidad de especies que constituyen el fitoplancton, las mismas que contemplan desde organismos autótrofos hasta microflagelados y microciliados auxótrofos. Las microalgas poseen una capacidad fitorremediadora que consiste en la eliminación o biotransformación de contaminantes de un medio líquido o gaseoso. Estos compuestos contaminantes son captados por la biomasa algal y pueden ser recuperados mediante su cosecha (Hernández y Labbé, 2014).

Condensación

Paso del agua de estado gaseoso a líquido cuando la presión del vapor de agua es mayor que la presión de vapor de saturación. Este hecho se produce por el aumento del vapor del agua o por que desciende en la presión de vapor de saturación (Fernández, 1992).

Crecimiento poblacional

Cambio de una población en un cierto plazo y puede ser cuantificado por el número de individuos en una población por unidad de tiempo, para su medición (Hernández, 1996).

Pigmento

Es un material que capta el color de la luz que refleja como resultado de absorción selectiva del color. La percepción de los pigmentos está íntimamente ligada al color de la luz que reciben (Palma, 2012).

Cultivo al aire libre

Son sistemas comunes que comprenden tanto medios naturales como artificiales con variedad de diseños (Hernández y Labbé, 2014).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LOCALIZACIÓN DEL EXPERIMENTO

El trabajo de investigación se realizó en el área superior del Laboratorio de Cultivo de Especies Auxiliares, al frente del laboratorio de impacto ambiental, de la Escuela de Biología en Acuicultura, la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional del Santa, ubicada en el Distrito de Nuevo Chimbote, Provincia del Santa, Departamento de Ancash – Perú.

3.2 MATERIAL DE ESTUDIO

3.2.1 Muestra

Se obtuvo *T. suecica* del cultivo monoalgales del laboratorio de Cultivos de Especies Auxiliares de la Universidad Nacional del Santa, ubicada en el distrito de Nuevo Chimbote, Provincia del Santa, Departamento de Ancash – Perú.

3.2.2 Mantenimiento de *T. suecica*

La cepa de la microalga marina *T. suecica* fue mantenida en medio Guillard f/2 (Guillard, 1975), permaneciendo en condiciones monoalgales. El experimento se llevó a cabo en un matraz de 1L, de los cuales fueron utilizados 1 L de su capacidad para el experimento. Se utilizó agua de mar previamente tratada y enriquecida con medio Guillard f/2, bajo condiciones controladas de iluminación, aireación y temperatura.

3.3 MÉTODOS

3.3.1 Tipo de investigación: Experimental

3.3.2 Diseño experimental

Se utilizó el diseño experimental de estímulo creciente (Steel y Torrie, 1992), y conto con tres tratamientos experimentales y un tratamiento control, para cada tratamiento se realizó tres repeticiones; así mismo, los cultivos algales iniciaron con un promedio de 17×10^4 cél mL⁻¹ (Tabla 1).

Tabla. 1 Preparación de las unidades experimentales

<i>DISEÑO EXPERIMENTAL</i>		
<i>TRATAMIENTOS</i>	REPETICIONES	MEDIO DE CULTIVO
<i>TC</i>	r ₁ r ₂ r ₃	1 ml L ⁻¹ HM
<i>T1</i>	r ₁ r ₂ r ₃	40 ml L ⁻¹ de CVB
<i>T2</i>	r ₁ r ₂ r ₃	50 ml L ⁻¹ de CVB
<i>T3</i>	r ₁ r ₂ r ₃	60 ml L ⁻¹ de CVB

3.3.3 Preparación de medio de cultivo

- **Medio HM (Heussler-Merino)**

Este medio de cultivo fue desarrollado para el cultivo masivo de *Scenedesmus acutus* para consumo humano utilizando fertilizantes agrícolas en la que la presencia de “impurezas”, constituidas por pequeñas cantidades de diversos elementos minerales, se constituirán en micronutrientes para el crecimiento algal, (Merino, 2003). El cual fue brindado por el laboratorio de Cultivos de Especies Auxiliares de la Universidad Nacional del Santa.

Fue utilizado para el mantenimiento del inóculo de *T. suecica* y tratamiento control, añadido a razón de 1ml L⁻¹. A continuación, el contenido de los siguientes compuestos estándares y condensados a vapor de biofouling (Tabla 2).

Tabla. 2 Composición química del medio HM y de CVB.

Nutrientes	HM		CVB	
	(mL.L ⁻¹)		(mL.L ⁻¹)	
	1	40	50	60
Nitrógeno amoniacal	-	35.6	44.5	53.4
Nitrógeno Total	97.2	445	556.25	667.5
Potasio	19.2	0.096	0.12	0.144
Fósforo	11.2	0.0164	0.0205	0.0246

Fuete: Jimenes y Rojas (2015).

- **Preparación del condensado de biofouling (CVB).**

El biofouling fue obtenido de una empresa acuícola, Cultimarine SAC. ubicada entre los 09°10' y 09°17' LS y de 78°28' a 78°34' LW en la bahía de Samanco, Santa, Ancash, Perú, el biofouling fue llenado dentro de una caja de tecnopor con hielo. Esta recolección se realizó en el momento que los operarios realizaban el desdoble (cambio de sistemas a los organismos según su talla) y limpieza de 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 de *A. purpuratus*, lo cual está compuesto como se menciona en la tabla 3.

Tabla. 3 Porcentaje de Especies predominantes en biomasa del biofouling.

N°	N. científico	N. común	Peso en kilogramos (Kg)	Porcentaje (%)
1	<i>Ciona intestinalis</i>	Ciona	0.6	4
2	<i>Semimytilus algosus</i>	Chorito	0.3	2
3	<i>Gracilaria sp.</i>	Pelillo rojo	4.8	32
4	<i>Plathyxanthus orbigny</i>	Cangrejo	0.9	6
5	<i>Argopecten purpuratus</i>	Concha de abanico	0.3	2
6	<i>Ophiothrix sp.</i>	Ofiuo	0.45	3
7	<i>Bugula neritica</i>	Briozoario	0.6	4
8	<i>Halosydna brevisetosa</i>	Poliqueto	0.6	4
9	<i>Neanthes succinea</i>	Nereis	0.6	4
10	<i>Ampelisca sp.</i>	Salmonete	0.45	3
11	<i>Caprella equilibra</i>	cochinillas	1.95	13
12	<i>Austromegabalanus psittacus</i>	Picoroco	0.6	4
13	<i>Eurypanopeus crenatus</i>	Mosca de las piedras	0.45	3
14	<i>Hepatus chilensis</i>	Jaiba puñete	0.3	2
15	<i>Arbacia spatuligera</i>	Erizo	0.45	3
16	<i>Actinostola sp.</i>	anémona	0.3	2
17	<i>Pteria sterna</i>	Concha	0.15	1
18	<i>Crepipatella dilatata</i>	lapa	0.15	1
19	<i>Notoplana sp.</i>	Planaria	0.3	2
20	<i>Rhodymenia howeana</i>	Alga	0.75	5
	total		15	100

- **Medio de cultivo experimental: condensado de vapor de biofouling (CVB)**

Se utilizó 15 Kg biofouling, los cuales fueron sometidos a ebullición, cuyos vapores fueron condensados en un sistema condensador de vapores de Liebig (Fig. 1). Conteniendo el matraz 200 gr de biofouling y 100 mL de agua durante 20 minutos, para así obtener el medio condensado, este procedimiento se repitió hasta obtener 5000 mL de condensado.

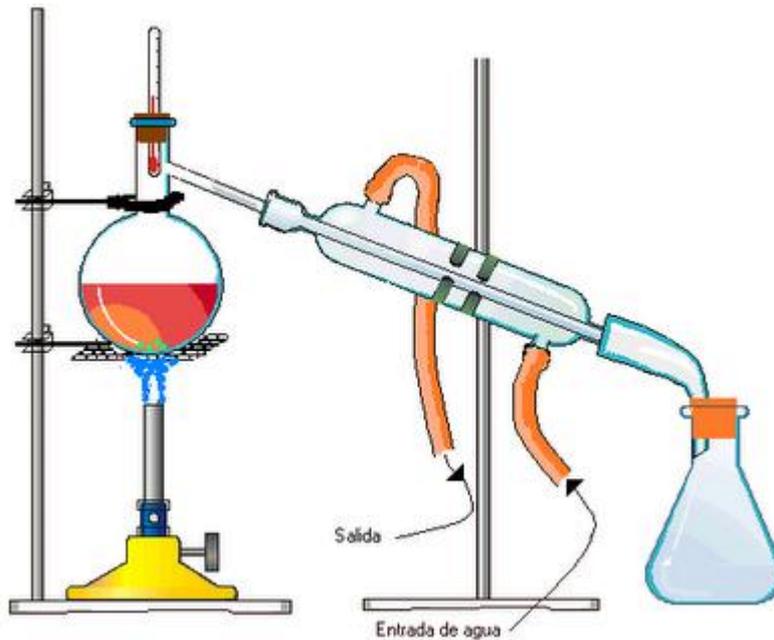


Fig. 1 Condensador de vapores del biofouling.
Fuente: Pérez y Valera, (2009)

Los condensados obtenidos fueron enfriados y dosificados para los cultivos de *T. suecica* como única sustancia que promueva en crecimiento heterotrófico de las microalgas.

3.3.4 Tratamiento del agua de mar

El agua de mar procedió de la playa “EL DORADO” ubicada en la bahía de Samanco ($09^{\circ} 11' 20''$ LS y $78^{\circ} 33' 53''$ LW), Distrito de Nuevo Chimbote, Provincia del Santa, Departamento de Ancash, Perú. El agua se filtró con un tapiz de 4μ de diámetro, posteriormente con una manga de 1μ de diámetro de abertura de la malla, luego se dejó sedimentar por 24 horas y se añadió 1 mL de hipoclorito de sodio por cada litro de agua de mar. 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 finalmente se dejó reposar por 24 horas para la inhibición del cloro y enseguida se colocó bajo aireación constante por 24 horas (**Fig.2**).



Fig. 2 Esquema de la secuencia para el tratamiento del agua de mar según Merino *et al.* (2003).

3.3.5 Acondicionamiento de las unidades experimentales.

El cultivo inicial para todos los tratamientos fue de 10 L de agua a 100 % con un inóculo de 17×10^4 cel.ml⁻¹, y se cultivaron en 12 biorreactores plásticos de 10L. de capacidad. Se determinó el conteo celular 3 veces al día (8:00 am, 12:00 pm y 6:00 pm) con la ayuda de una cámara de Neubauer de 0.1 mm de profundidad modelo Manienfeld fermanni y un microscopio óptico Olympus modelo CX31RBSFA con una profundidad de 0.1 mm. Se determinó los pigmentos por cromatografía, utilizando acetona al 90% con la ayuda de un espectrofotómetro modelo AcuaMate Plus para medir la absorbancia (Tabla N°4).

TRATAMIENTOS	REPETICIONES	AGUA DE MAR	PROPORCIÓN	MEDIOS DE CULTIVO
TC	R1, R2, R3	10L	1 mL. L ⁻¹	HM
T1	R1, R2, R3	10L	40 mL. L ⁻¹	CVB
T2	R1, R2, R3	10L	50 mL. L ⁻¹	CVB
T3	R1, R2, R3	10L	60 mL. L ⁻¹	CVB

Tabla 4. Acondicionamiento de las unidades experimentales

3.3.6 Composición química del CVB

El medio de cultivo experimental CVB, para *T. suecicca* fue analizado por la corporación de laboratorios de ensayo clínico, biológico e industriales “COLECBI” S.A.C. (Tabla 5).

Tabla. 5. Cuadro comparativo de antecedentes y actual de análisis química del CVB analizado por COLECBI S.A.C.

Nutrientes	CVB (2015) (mg/L)	CVB (2020) (mg/L)
Nitrógeno amoniacal	3.86	890
Nitrógeno Total	1200	11125
Potasio	279.7	2.4
Fósforo	8.23	0.41

Fuente: Cárdenas y Valiente, (2015).

3.3.7 Determinación de la tasa de duplicación y tasa de crecimiento para cuantificar la población

Se graficaron las curvas de crecimiento poblacional, la tasa de crecimiento específico (μ) y el tiempo de duplicación diaria (TD), los cuales fueron calculados utilizando datos del día de máximo crecimiento, según la ecuación dada (Guillard, 1973).

$$\mu = \frac{\ln\left(\frac{N_f}{N_o}\right)}{T_f - T_o} \quad TD = \frac{\ln(2)}{\mu}$$

Donde:

N_o = Número inicial de células N_f = Número final de células

T_o = tiempo inicial T_f = tiempo final μ = Constante de crecimiento

3.3.8 Determinación del crecimiento poblacional

El conteo del crecimiento poblacional de los cultivos algales se realizó 3 veces al día (8am, 12m y 6pm) hasta el sexto día, las muestras fueron extraídas con la ayuda de una pipeta de 1 ml, inmovilizando las células con una solución de lugol a fin de facilitar los recuentos celulares, el conteo celular se realizó con una cámara Neubauer de 0.1 mm de profundidad modelo Marienfeld, y un microscopio óptico Olympus modelo CX31RBSFA, en cinco cuadrantes (Stein, 1973).

$$N^{\circ} \text{ cel. ml}^{-1} = \frac{P \times 10^6}{4 \times D}$$

Donde:

P: promedio del conteo de alícuotas.

D: diluciones hechas.

3.3.9 Parámetros ambientales de los cultivos algales

Se registró el pH, oxígeno (O₂) y temperatura tres veces al día (8 am, 12 pm y 6 pm) utilizando un PH metro portátil - pH 600 series - OAKTON (0.01 sensibilidad) y la salinidad se registró con un refractómetro de salinidad modelo Salinometro Rhs- 28 Atc (0.1 sensibilidad), La iluminación fue acorde a las horas del día, siendo de mayor cantidad de luz en horas del mediodía.

La aireación fue suministrada constante por un Blower de 1/2 HP, proporcionando aireación a los cultivos, con el propósito de evitar la sedimentación algal y favorecer la constante exposición de las algas a la luz e incrementando el contacto de los nutrientes con las algas.

3.3.10 Determinación de clorofila *a*, *b* y β - carotenos

La determinación de pigmentos fue realizada en el Laboratorio de Impacto Ambiental y Limnología de la Universidad Nacional de Santa, mediante el método espectrofotométrico, Se utilizó 10 ml de cultivo de cada unidad experimental, los cuales fueron extraídos en tubos de ensayo al mismo tiempo del conteo celular; a las muestra extraída se la centrifugó con la ayuda de una centrífuga Ref. S – 240 a 5000 rpm, por espacio de 15 min, luego se extrajo el sobrenadante de tal manera que sólo queda una muestra sólida, la cual se llevó a una estufa a 45 °C por un lapso de 12 horas, luego se adicionó 3ml de acetona al 90%, para posteriormente centrifugarse a 5000 rpm por 3min (Ulloa, 2011; Badillo *et al.*, 2010).

El sobrenadante fue analizado en el espectrofotómetro para medir la absorbancia con longitudes de onda de 470nm, 645nm y 662 nm, con los que se determinó los picos de absorción máxima de clorofila *a*, *b* y β – caroteno. Para una mejor lectura se fijó como blanco a la acetona al 90%.

Para la obtención de las cantidades de β – caroteno se utilizó las siguientes formulas:

$$\text{Clorofila a:} \quad (11.75 \times A_{662}) - (2.350 \times A_{645})$$

$$\text{Clorofila b:} \quad (18.61 \times A_{645}) - (3.960 \times A_{662})$$

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

Donde:

A₆₆₂: absorbancia a 662 nm de longitud de onda

A₆₄₅: absorbancia a 645 nm de longitud de onda

A₄₇₀: absorbancia a 470 nm de longitud de onda

C_a: clorofila *a*.

C_b: clorofila *b*.

C_{x+c}: caroteno total.

3.3.11 Técnicas de procesamiento y análisis de datos

Se empleó el diseño aleatorio completamente al azar con nueve tratamientos y más un control y tres réplicas de cada uno, aplicándose análisis multifactorial para establecer diferencias entre promedios (Steel y Torrie, 1988), con un nivel de significancia del 5%. El procesamiento de datos se realizó según TUKEY, a través del programa estadístico IBM SPSS Statistics versión 20 en español.

IV. RESULTADOS

4.1 Crecimiento poblacional de *T. suecica*.

Los cultivos se iniciaron con 17×10^4 cel/mL⁻¹, en todos los tratamientos y sus réplicas.

En el segundo día, en horas de 8am a 12m, el T2 registró mayor concentración celular de 74.4×10^4 cel/mL⁻¹ ($p > 0.5$). A las 6pm todos los tratamientos tuvieron un crecimiento significativo, pero, el tratamiento control presentó una mayor concentración celular de $16,68 \times 10^5$ cel/mL⁻¹.

En el tercer día, a las 8am el T3 tuvo una reducción poblacional (86×10^4 cel/mL⁻¹), el mayor crecimiento poblacional lo presentó el T2 que fue de 14×10^5 cel/mL⁻¹ ($p < 0.05$). A las 12m el T3 tuvo una alta concentración celular de 22.58×10^5 cel/mL⁻¹ a comparación del T2 (95×10^4 cel/mL⁻¹) ($p < 0.05$). A las 6pm todos los tratamientos tuvieron un crecimiento significativo, siendo el TC quien presentó mayor concentración celular, de 21.63×10^5 cel/mL⁻¹.

En el cuarto día, a las 8am los T1 y T3 tuvieron diferencias significativas con respecto al T2 ($p < 0.05$), teniendo el T2 una alta concentración celular (11.36×10^5 cel mL⁻¹). Sin embargo, el TC tuvo una mayor concentración (22.48×10^5 cel mL⁻¹). A las 12 pm los T1, T2 y T3 tuvieron menor concentración de densidad celular que el TC (23.82×10^5 cel mL⁻¹) y a las 6pm el T2 tuvo mayor concentración celular (22.54×10^5 cel mL⁻¹), mientras que el TC fue mayor (28.43×10^5 cel mL⁻¹).

En el quinto día, a las 8 am, se obtuvo mayor crecimiento en el TC con 25.56×10^5 cel/mL⁻¹, mientras que de los tratamientos experimentales el T2 tuvo mayor crecimiento ($p > 0.05$) con 16.09×10^5 cel/mL⁻¹, a las 12 pm todos los tratamientos presentaron incrementos significativos ($p < 0.05$), siendo el de mayor concentración celular el tratamiento control. A las 6 pm se registra el punto de quiebre de todos los tratamientos experimentales, siendo el T2 quien tuvo una

mayor concentración celular (14.95×10^6 cel/mL⁻¹), a diferencia del TC que mantiene su crecimiento de 25.84×10^6 cel/mL⁻¹.

Al sexto día, se evidencia reducción celular en los tratamientos, a las 8 am los T1 y T2 ($p > 0.05$), tienen diferencias significativas con el T3 ($p < 0.05$), teniendo una mayor concentración el T1, mientras que el TC evidencia una ligera reducción. A las 12m y 6pm el T2 tuvo una mayor densidad celular en comparación a los demás tratamientos ($p < 0.05$).

Al séptimo día, a las 8am el T3 tuvo mayor concentración celular (17.05×10^4 cel/mL⁻¹) con respecto a los demás tratamientos ($p < 0.05$). Sin embargo, todos los tratamientos tuvieron una reducción significativa.

Se observó la tendencia del crecimiento poblacional de *T. suecica*, que alcanzó valores elevados en el día 4, para luego declinar en el día 7, como se muestra en la fig. 3.

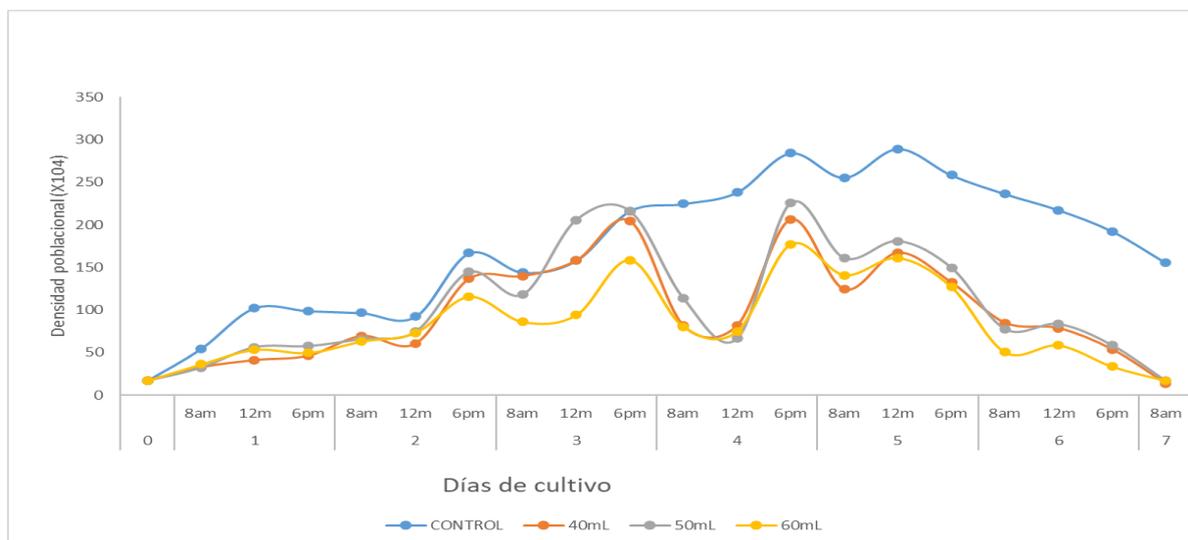


Fig. 3 Variación del crecimiento poblacional de los cultivos de *T. suecica* cultivados en aire libre con medios de cultivo HM y 40, 50 y 60 mL L⁻¹ de CVB.

4.2 Tasa de crecimiento y tiempo de duplicación poblacional de *T. suecica*.

Las tasas de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación poblacional (TD) de *T. suecica* fueron determinadas en el día 4 de cultivo.

Tabla 6. . Parámetros de crecimiento poblacional de *T. suecica* dosificados con medio experimental CVB y control HM.

PARÁMETROS	HM (mL L ⁻¹)		CVB (mL L ⁻¹)	
	1	40	50	60
Densidad inicial (x 10 ⁴ cel ml ⁻¹)	170	170	170	170
Densidad final (x 10 ⁴ cel ml ⁻¹)	2843	2067	2255	1770
Día	4	4	4	4
μ (d ⁻¹)	0.25 ±0.02 ^c	0.11 ±0.02 ^b	0.12 ±0.01 ^b	0.06 ±0.01 ^a
TD (d)	2.85 ±0.03 ^c	6.02 ±0.02 ^b	5.61 ±0.01 ^b	10.16 ±0.01 ^a

Tasa de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación diaria (TD) poblacional

Datos con letras iguales en superíndices en una fila indica que no hay diferencia significativa (p>0.05).

La mayor tasa de crecimiento poblacional (μ) en los tratamientos fue determinado en los cultivos de *T. suecica* dosificados con 50 mL.L⁻¹ de CVB (T2) y la menor tasa de crecimiento en los cultivos con 60 mL.L⁻¹ de CVB (T3), en comparación que el control, asimismo, el tiempo de duplicación poblacional (TD) presentaron valores inversos (tabla 6), porque a mayor tasa de división menor tiempo de duplicación.

4.3 Contenido de pigmentos de *T. suecica*.

El mayor contenido de clorofila α fue reportado por el TC (8.07 μg/g), seguido del T3 (2.37 μg/g), T1 (0.85 μg/g) y el T2 (0.65 μg/g). Respecto a la clorofila β, el mayor contenido de pigmentos fue determinada en el T3 (5.86 μg/g), seguido por el T2 (4.41 μg/g) el T1 (3.51 μg/g) y el TC (0.72 μg/g). Asimismo, el contenido de carotenos, el TC presentó el valor más alto (9.54 μg/g), seguido del T1 (1.65 μg/g), T2 (0.62 μg/g) y el T3 (0.08 μg/g). (fig. 4)

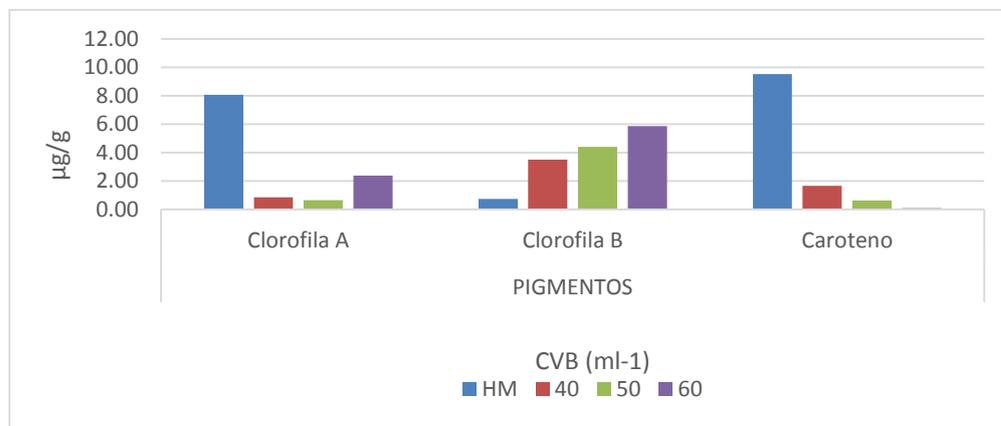


Fig. 4 Contenido de pigmentos en las células del cultivo de *T. suecica* cultivadas al aire libre.

4.4 Evaporación en los cultivos de *T.suecica*.

La evaporación del agua de los cultivos al aire libre fue estadísticamente igual, aunque el T3 presentó valores ligeramente más altos (tabla 7).

Tabla 7. . Evaporación del agua de los cultivos de *T. suecica* cultivados al aire libre dosificados con CVB.

PARÁMETROS	Volumen L (L ⁻¹)			
	TC	T1	T2	T3
Volumen Inicial (mL)	10000 ±0	10000 ±0	10000 ±0	10000 ±0
Volumen Final (mL)	8700 ±100 ^a	8686 ±100 ^a	8633 ±58 ^a	8600 ±58 ^a
Evaporación (mL)	1300 ±100 ^a	1314 ±100 ^a	1367 ±58 ^a	1400 ±58 ^a

Datos con letras iguales en superíndices en una fila indica que no hay diferencia significativa ($p>0.05$).

4.5 Variación de la temperatura en el cultivo de *T. suecica*.

La temperatura del agua de los cultivos algales de *T. suecica* fluctuó entre 22.12 °C y 39.13 °C sin presentar diferencias significativas en los tres tratamientos y el control ($p>0.05$), y fueron superiores a la temperatura ambiente. (Fig. 5).

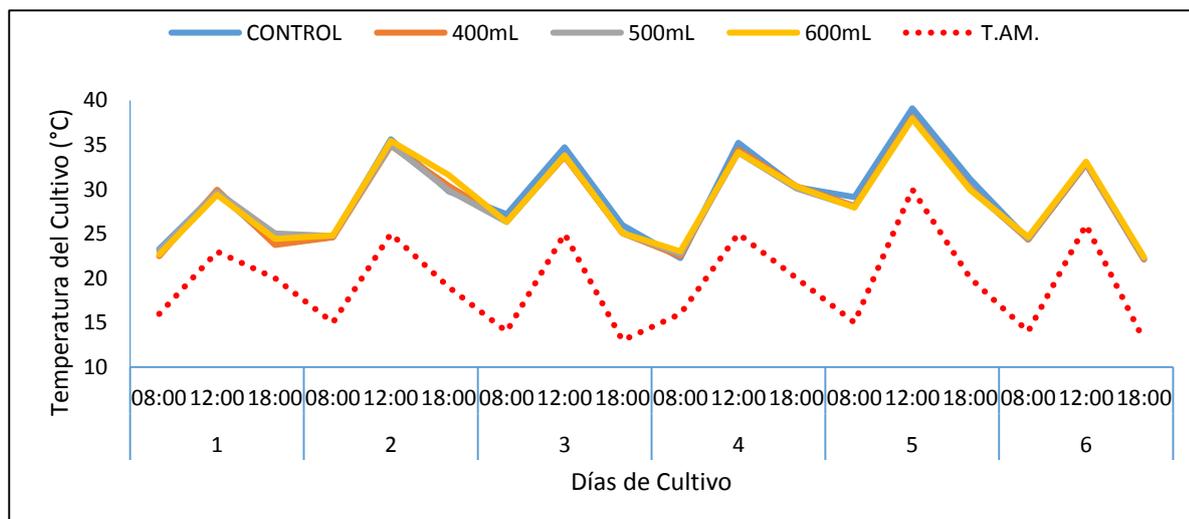


Fig. 5 Variación de temperatura del agua (°C) de los cultivos de *T. suecica* al aire libre dosificados con CVB.

4.6 pH en el cultivo de *T. suecica*.

Los valores de pH del agua en los cultivos de *T. suecica* en el primer día no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos con valores de 8.38 hasta 9.21 ($p>0.05$).

En el segundo día, los valores fluctuaron entre 8.82 y 10.04 para el T3 y TC respectivamente.

Como se observa en la fig. 6 a partir del día 2 al día 6 el T3 siempre presentó los valores más bajos y el TC los valores más altos, asimismo, al quinto día a las 12 pm se puede evidenciar una reducción de pH en todos los tratamientos. Lo mismo ocurre en el día 6.

También, los valores del pH del agua de los cultivos presentaron mayores valores en horas de la tarde.

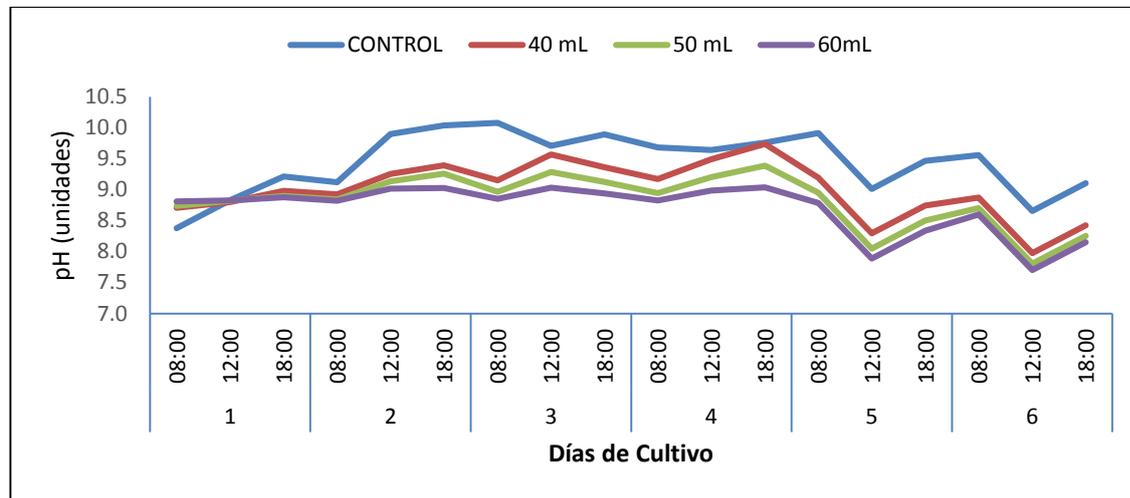


Fig. 6 Variación de pH del agua de los cultivos de *T. suecica* cultivados en aire libre dosificados con CVB.

4.7 Oxígeno en el cultivo de *T. suecica*.

La variación de oxígeno disuelto en el agua de cultivo de *T. suecica* desde el primer día a las 8 am no tuvieron diferencias significativas en ninguno de los tratamientos incluido el control, mientras que a las 12 pm los tratamientos tuvieron diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto al TC (11.8 ml/L) que tuvo una mayor concentración, a diferencia de los tratamientos dosificados con CVB que todos tuvieron de 8.2 a 8.7 (ml/L). Este comportamiento se repitió para los días posteriores al medio día.

Durante todos los días de cultivo el T1, T2 y T3 tuvieron menor concentración de oxígeno respecto al TC, tanto a las 8 am, 12 pm y 6 pm (Fig. 7).

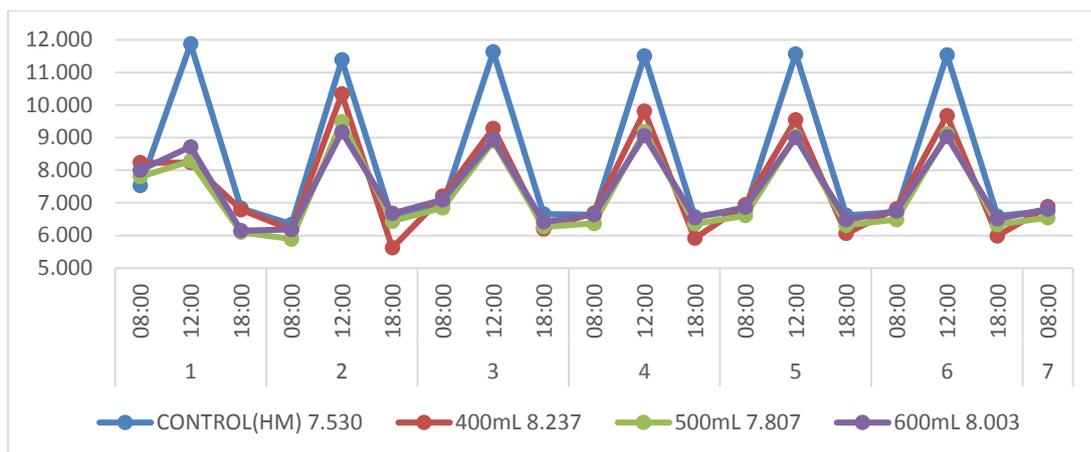


Fig. 7 Variación del oxígeno disuelto (ml/L) de los cultivos de *T. suecica* al aire libre dosificados con CVB.

4.8 Salinidad en el cultivo de *T. suecica*.

La variación de la salinidad de los tratamientos estuvo directamente relacionada con la evaporación diaria. Y pese a presentar diferencias, todos los cultivos mostraron incremento continuo (Fig. 7). El tratamiento control mostró el mayor incremento en la salinidad de 37.7 a 40.98), en comparación al T3 (35.4 a 37.91). Asimismo, los valores de la evaporación durante la experiencia de 6 días fluctuaron de 32 hasta 41 (fig. 8), demostrándose que todos los tratamientos dosificados con CVB presentaron valores menores al control.

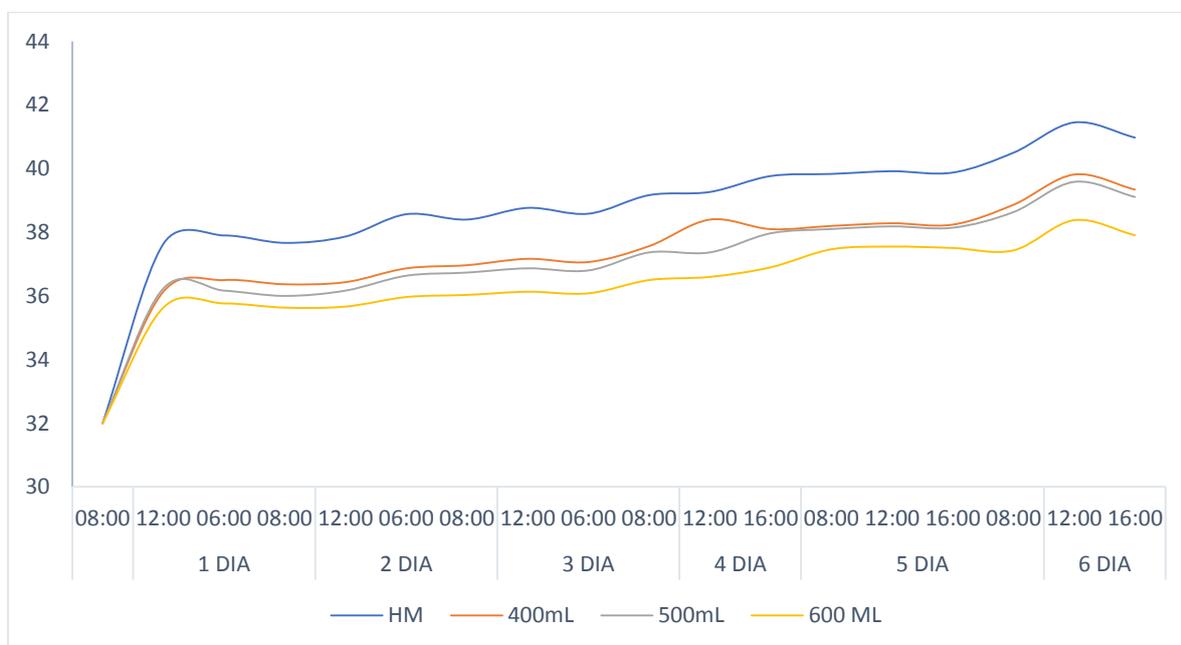


Fig. 8 Variación de salinidad de los cultivos de *T. suecicca* cultivados en aire libre

V. DISCUSIÓN

El empleo de los desechos generados de la actividad del cultivo de *A purpuratus*, genera grandes cantidades de desechos ricos en nitrógeno y carbono (Merino y Encomendero, 2012). Así como las muestras colectadas de biofouling, donde el mayor representante fue la especie *Gracilaria sp*, rica en proteínas y componentes nitrogenados, llegando a alcanzar hasta el 41.9 g/100g (Toledo *et al.*, 2009), así mismo el resto de las especies registradas tienen cantidades importantes de proteínas y compuestos nitrogenados (Merino y Encomendero, 2012), lo que se refleja en el alto contenido de nitrógeno total (11125 mg/l) obtenido en CVB.

El cultivo de *T. suecica*, empleado en esta investigación, es utilizado como alimento vivo para larvas de moluscos, peces y crustáceos, con potencial producción de biodiesel (Rodolfi *et al.*, 2009).

El alto contenido de N (11125 mgL⁻¹) del CVB utilizado como medio de cultivo de *T. suecica* al aire libre permitió obtener crecimiento y alto contenido de clorofila b. El contenido de nutrientes de los medios de cultivos (HM y CVB) permitieron el crecimiento continuo hasta el 4° día con valores mayores en el tratamiento control a las 6pm con (2.8 x 10⁶ cél mL⁻¹) seguido con las dosificaciones de 50 mL.L⁻¹ de CVB (2.3 x 10⁶ cél mL⁻¹), 40 mL L⁻¹ de CVB (2.1 x 10⁶ x cél mL⁻¹) y 60 mL L⁻¹ de CVB (1.8 x 10⁶ cél mL⁻¹) (Fig. 3), casi similares a los obtenidos por Cárdenas y Valiente, (2015) con dosificación de 60 mL L⁻¹ (2.2 x 10⁶ cél.mL⁻¹). Igualmente, como los obtenidos en cultivos batch utilizando NaNO₃ (1.3 x 10⁶ cel. mL⁻¹) y urea (1.8 x 10⁶ cel. mL⁻¹) por Fábregas *et al.*, (1985). Los mejores crecimientos de las dosificaciones de 50 mL L⁻¹ y 40 mL.L⁻¹ de CVB si mostrar diferencias significativas, podría ser consecuencia del mayor balance de nutrientes del condensado.

Cabe destacar que el medio de cultivo control (HM), tuvo la mayor concentración celular de la investigación, respecto al cultivo experimental CVB, con 2.89 x 10⁶ cel. mL⁻¹ (>0.05). Merino, (2003), menciona que, la composición química de nutrientes, como el contenido de nitrógeno 97.2 mg/L, de potasio 11.2 mg/L, de fósforo 19.2 mg/L favorecen el elevado crecimiento algal. No obstante, es importante resaltar que, según los resultados de los análisis realizados al medio de cultivo CVB, se reportó un alto contenido de nitrógeno 11125 mgL⁻¹, lo que favoreció a la dosificación 50 mL.L⁻¹. Sin embargo, en un estudio similar Cárdenas y Valiente (2015) reportaron menor valor de nitrógeno de 1200 mgL⁻¹. La presencia de nitrógeno orgánico en el CVB es más aprovechable que el nitrógeno inorgánico (HM) y además es un

constituyente esencial de todas las proteínas estructurales y funcionales en las células de algas. (Ponte y Ruiz, (2013); Grau y Meléndez, 2018).

Se han realizado varios estudios en cuanto al efecto de los nutrientes en el crecimiento de *Tetraselmis*, en general, el medio más utilizado para el cultivo de esta microalga es el f/2 (Guillard, (1962); Chen *et al.*, 2008) estudiaron cultivos heterotróficos, mixotróficos y autotróficos de *Tetraselmis* y determinaron que el cultivo mixotrófico tiene mucho mejor desempeño en cuanto a volumen y densidad celular, así como, en velocidad de crecimiento.

Así también, Jiménez y Prada (2012) determinaron los valores más altos de la densidad poblacional de *Tetraselmis*, dosificando 80 ml L⁻¹ de ensilado de desechos blandos de *A. purpuratus* (3.94 x 10⁶ cel mL⁻¹) debido al alto contenido de aminoácidos derivados de la degradación bacteriana de las proteínas presentes en dicho ensilado, siendo similares a lo reportado por Valiente y Cárdenas (2015) quienes tuvieron un crecimiento poblacional con el tratamiento de 60 ml L⁻¹ (2.44 x 10⁶ cel mL⁻¹) debido a la presencia de sustancias aromáticas orgánicas (aminoácidos, amidas, etc.) en el CVB. En este trabajo de investigación se presentó una alta concentración celular con el tratamiento de 50 ml L⁻¹, corroborando lo reportado por las autoras.

Al considerar la tasa de crecimiento (μ) en nuestra experiencia tomamos en cuenta su relación inversa con el tiempo de duplicación diaria (TD), de tal manera que, el incremento de la μ significa mayor densidad microalgal (cel mL⁻¹); nuestros resultados demuestran que los mejores valores de la μ se han determinado en los cultivos dosificados con 40 mL L⁻¹ y 50 mL L⁻¹ de CVB (0.11 y 0.12, respectivamente) siendo mejor el control (0.25), correspondiendo los valores de TD de 6.2, 5.61, 2.85 día⁻¹ para las dosificaciones de 40 L⁻¹ y 50 mL L⁻¹ y control antes mencionado, demostrando la asimilación de los nutrientes presentes en el CVB y la existencia de una adecuada relación N/P como indicador de buen balance de nutrientes (Molina *et al.*, 1991).

Con respecto a la Temperatura ambiental del 1° a 7° día, se registraron a las 8am (14 a 16 °C), 12m (23° a 30 °C) y 6pm (13 a 20 °C). Sin embargo, en el quinto día se registraron valores muy altos a las 12 pm, valores que oscilaron de 37.93 °C (T3) a 39.13°C (TC), favoreciendo el crecimiento algal ya que es un factor muy importante. Por otro lado, al 6° día a las 6 pm la temperatura de todos los tratamientos disminuyó drásticamente, llegando a 22.12°C (TC) y a 22.38°C (T3). Cabe mencionar, que las microalgas toleran rangos de temperatura variable, dependiendo de la especie, así, algunas especies suelen estar por debajo de los 25 °C, mientras,

que otras especies soportan hasta los 36 °C (Abalde *et al.*, 1995). Sin embargo, la FAO (2008) afirma que la temperatura óptima para el crecimiento de *T. suecica* es de 18°C, mostrando su amplio rango de tolerancia e indicando que es un parámetro de suma importancia ya que, regula el metabolismo de las microalgas, la composición de la biomasa y la velocidad de crecimiento, mientras que Zare (2018) menciona que Una temperatura óptima para el crecimiento puede dar como resultado células de algas con un tamaño celular mínimo, contenido celular bajo en carbono y nitrógeno, mientras que una temperatura inferior o superior al nivel óptimo puede conducir a aumentos en el volumen celular y contenido bioquímico alto.

Richmond (1986) menciona que las microalgas muestran una clara dependencia respecto al pH del medio de cultivo y diferentes especies varían ampliamente en su respuesta al mismo. Cada microalga presenta un pH óptimo para su cultivo entre (7 y 8). Un descenso de pH puede ser letal, en cambio suelen soportar mejor los incrementos de pH, hasta un cierto límite.

Se reporta cultivos de *T. suecica* en intervalos de pH de 7.3 a 8.5 según Millán-Núñez *et al.*, (2010) y de 8.2 a 9.1 bajo el efecto del ensilado de desechos blandos de concha de abanico (Jiménez y Prada, 2012). Por tal motivo, se puede aseverar que, el pH del cultivo de esta investigación se encontró en un rango adecuado durante los 4 primeros días donde vario desde 8.8 hasta 10.77, posterior a los 4 días mostró una caída moderada en el ph lo cual está directamente relacionada con la densidad población según Martínez (2008); Park *et al.*, (2011) (fig. 5) lo cual no afectaría a los cultivos porque los rangos de pH se encuentran dentro de lo óptimo para el cultivo de *T. suecica*.

Los valores de salinidad según Zare, (2018) menciona que la fotosíntesis de las algas es inhibida por el estrés osmótico, estado de fotoinhibición, respuesta inducida por el estrés de la salinidad, de acuerdo a nuestros resultados la salinidad estuvo en aumento de acorde a los días y en consecuencia de la evaporación y estos resultaron desfavorecieron al crecimiento poblacional, obteniendo valores de salinidad hasta 39.33 en el tratamiento 3 (40 mL L⁻¹), es decir como menciona Rubio (2015) que a medida que se incrementa la concentración salina afecta el crecimiento celular disminuyendo su concentración, de la misma manera Serpa, (2005) observa que hay una relación inversa entre la densidad celular promedio y el nivel de salinidad, donde a mayor salinidad obtuvo menor densidad del promedio final de las cuatro cepas evaluadas.

Respecto al contenido de los pigmentos, Serpa y Calderón, (2006), evidenciaron 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, considerándose como un indicador del crecimiento poblacional debido a que mayores niveles de clorofila promueven la mayor producción de oxígeno y radicales oxidantes, y según Becker (1994) el contenido de pigmentos clorofilianos en las microalgas se consideran abundantes entre 0.5 a 1.5% de su peso seco total, coincidiendo con nuestros resultados en los que los mayores valores de clorofila α (%) en los cultivos de *T. suecica*, se hallaron en el tratamiento control (2.42 %) y con respecto a los dosificados CVB se halló que la mayor cantidad de clorofila α , lo presentó el dosificado de 60 ml L⁻¹ (0.81%) y los menores porcentajes fueron encontrados en los dosificados de 40 ml L⁻¹ (0.34%) y 50 ml L⁻¹ (0.28%); mientras que los mayores porcentajes de clorofila β se hallaron en los dosificados de 60 ml L⁻¹ (1.64%) y 50 ml L⁻¹ (1.58%), mientras que el dosificado 40 ml L⁻¹ (1.15%) y el control (0.33%) presentaron los menores valores de clorofila β .

Se ha demostrado que el contenido de clorofila α y en general los pigmentos fotosintéticos de células de microalgas cambian cuando son expuestas a condiciones de estrés, limitación de luz, variaciones de temperatura o nutrientes según Goericke y Montoya, (1998); Descy *et al.*, (2000), por lo que, el estrés generado por la variación de luz y temperatura explicaría la disminución del porcentaje y biomasa de la clorofila α en los dosificados CVB (40 ml L⁻¹, 50 ml L⁻¹ y 60 ml L⁻¹) y que cambian sus rutas metabólicas, para preferir un comportamiento autótrofo del alga, por la composición básica de los nutrientes según (Braida V. *et al.*, 2016).

Según Manrique (2003) la clorofila β es pigmentos accesorios, cuya función es por una parte ampliar el espectro de absorción de los pigmentos primarios y por otra de servirles como sistemas de protección frente a la luz excesiva, lo que nos indicaría que como mediada de protección ante es estrés lumínico los dosificados de CVB (40 ml L⁻¹, 50 ml L⁻¹ y 60 ml L⁻¹) incrementaron sus niveles de clorofila β , con respecto al control.

Asimismo, Spolaore *et al.*, (2006), consideran que las microalgas son ricas en carotenoides cuando tienen un porcentaje de 0.1 a 0.2%, en nuestra investigación el control (3.25%), los dosificados 40 ml L⁻¹ (0.66) y de 50 ml L⁻¹ (0.27) se consideran ricos en carotenoides, mientras que el tratamiento de 60 ml L⁻¹ tuvo un porcentaje de 0.03%, no considerándose como rico en carotenoides. Varios autores Vieira y Klaveness, (1986); Vonshak, (1986); Henriksen *et al.*, 2002, mencionan la importancia de la fuente y concentración de nitrógeno en el crecimiento y composición bioquímica de las microalgas; asimismo, el agotamiento de nitrógeno en el medio puede causar el cese de la división celular, aunque el metabolismo del carbono continúa (Beopoulos *et al.*, 2009).

La formación y acumulación de las clorofilas α y β , que según Raven (1988); Liotenberg *et al.*, (1996), son reserva de nitrógeno debido a la estructura química básica de las porfirinas y son de vital importancia en el crecimiento microalgal.

Así mismo, las microalgas tienen la capacidad de crecer y hacer fotosíntesis con diferentes nutrientes como las sales minerales en condiciones autotróficas y sustancias orgánicas en condiciones mixotróficas (Ortiz *et al.*, 2010). Un balance de sales minerales, nutrientes y condiciones de estrés lumínico presentes en los dosificados CVB restringen el crecimiento de *T. suecica* y la producción de clorofila α y aumentando los niveles de clorofila β , como lo menciona Fánor *et al.*, (2012), que, en relación con la intensidad lumínica del día, no se encontró diferencia estadísticamente significativa para el contenido de clorofila a, pero sí para la cantidad de clorofila β , lo que nos indica que el trabajo realizado brinda información sobre las dificultades y ventajas para la producción de clorofila a, b y carotenos.

VI. CONCLUSIONES

- Las mayores densidades poblacionales de *T. suecica* fueron obtenidas en el día 4; en los cultivos dosificados con 40 y 50 mL L⁻¹ de CVB con valores de 20.7 x10⁵ cel./mL⁻¹ y 22.6 x10⁵ cel./mL⁻¹ respectivamente.
- La mayor tasa de crecimiento (μ) en el día 4 de los cultivos dosificados con CVB fue determinado en los cultivos dosificados con 50 mL L⁻¹ de CVB (0.12) y fue menor al control HM (0.25).
- Las variaciones de la temperatura (22.12°C a 39.13°C) y del pH (8.38 a 10.04) de los cultivos dosificados con CVB no afectaron el crecimiento poblacional de *T. suecica*; asimismo, la concentración de oxígeno, mayor de 5 mgL⁻¹ revela buena actividad fotosintética del crecimiento algal.
- El mayor contenido de clorofila α fue reportado por el tratamiento control (8.07 $\mu\text{g/g}$) en comparación con los experimentales de CVB; T3 (2.37 $\mu\text{g/g}$), T1 (0.85 $\mu\text{g/g}$) y el T2 (0.65 $\mu\text{g/g}$); la clorofila b presenta mayor concentración con el T3 de CVB con (5.86 $\mu\text{g/g}$) respecto al TC que solo llega a (0.72 $\mu\text{g/g}$). Respecto a los carotenos el TC presento mayor concentración (9.54 $\mu\text{g/g}$) comparado con los experimentales de CVB que tuvieron T1 (1.65 $\mu\text{g/g}$), T2 (0.62 $\mu\text{g/g}$) y el T3 (0.08 $\mu\text{g/g}$).
- Los cultivos algales demostraron que las condiciones al aire libre afectan considerablemente el crecimiento poblacional y contenido de pigmentos respecto al control y que estas mismas condiciones al aire libre genera el aumento del pigmento de clorofila b en los dosificados de CVB.

VII. RECOMENDACIONES

- Considerando las grandes cantidades de biofouling que se generan durante el cultivo de *A. purpuratus* y la habilidad de la microalga *T. suecica* para metabolizar los nutrientes de origen orgánico presentes en el medio de cultivo CVB, es necesario realizar ensayos de su cultivo a mayor escala con la finalidad de desarrollar una metodología que permita la obtención de pigmentos algales que puedan ser utilizados como insumos para la industria cosmética y alimentaria.
- Continuar con el experimento haciendo otras mediciones de calidad de agua como conductividad eléctrica, amonio, nitrito, nitrato, CO₂, intensidad lumínica entre otras, para conocer como la microalga puede ayudar en la biorremediación.
- Realizar trabajos incrementando la salinidad u otro parámetro de calidad de agua para comprobar si tiene relación con el incremento de la concentración de pigmentos.
- Realizar cultivos masivos al aire libre en piletas someras y en biorreactores de grandes volúmenes tendiendo a instalar centros de producción algal aprovechando los residuos del cultivo de concha de abanico y la disponibilidad de terrenos eriazos y arenosos aledaños a los centros de cultivo y procesamiento de concha de abanico. Asimismo, el desarrollo de nuevas metodologías (extractos acuosos, condensados de vapores) y/u optimización del cultivo masivo (piletas, biorreactores) permitirán el posicionamiento de nuestra universidad como líder en la producción de biomasa algal utilizando residuos de la pectinicultura.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abalde, J., Cid A., Fidalgo P., Torres, E. & Herrero, C. 1995. Microalgas: cultivo y aplicaciones. Universidad da Coruña, Monografías. p. 26 – 210.
- Abdel, R., Homaidan, A. & Ibraheem, I. 2012. Microalgae and wastewater treatment. Saudi Journal of Biological Sciences 19: 257-275
- Adamczak, M., Bornscheuer, U. & Bernarsk, W. 2009. The Application of biotechnological methods for the shynthesis of biodiesel. Eur. J. Lipid Sci. Tehcnol. 111(8):801-813.
- Alfonso, E. & Martínez, L. 1988. Medio de cultivo para microalgas marinas. Rev Invest. Mar., 9 (1): 39-46.
- Badillo, M., Galindo, M., Gallardo, A., Lizama, G., Palomino, G.; Arena, M. & Chiappa, X. 2010. Manual de Prácticas de Ecología Acuática, Universidad Nacional Autónoma de México, Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación, Facultad de Ciencias, 98p.
- Becker, E. 1994. Biotechnology and microbiology. Cambridge University Press, Cambridge. U.S.A. p. 293.
- Beopoulos, A., Chardot, T. & Nicaud, J. 2009. *Yarrowia lipolytica*: a model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation. Biochimie. 91(6):692-696.
- Bermeo, L. 2011. Estudio del cosechado de cultivos de microalgas en agua residual mediante técnicas de centrifugado. (Tesis de pregrado). Universidad de Cádiz. Cádiz, España. p. 56.
- Bold, H. & Wynne, M. 1985. Introduction to the Algae. New Jersey: Prentice Hall. USA.
- Braida, V., Campot, M. & Tartaglia C. 2016. Diseño de procesos para la obtención de biocombustibles a partir de microalgas. Universidad ORT Uruguay Facultad de Ingeniería. p. 58
- Buitrago, E., Norcini, C. & Arrage, M. 1989. Evaluación de tres medios nutritivos empleados en el cultivo masivo de *Isochrysis aff. galbana* Green. Bol. Ocean. De Venezuela, Univ. de Oriente, 28 (1-2): 197-202.
- Cardenas, H. & Valiente, L. 2015. Utilización de condensados de vapores del biofouling en el crecimiento poblacional, contenido de clorofila a y carotenoides de *T. suecica* en condiciones de laboratorio”. Tesis para optar el Titulo de Biólogo Acuicultor. Escuela

- de Biología en Acuicultura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional del Santa. p. 39.
- Claereboudt, M., Bureau, J. & Himmelman, J. 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.
- Contreras, C., Peña, J., Flores, C. & Cañizares, V. 2003. Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. *Interciencia* 28(8): 450-456.
- Coutteau, P. 1996. Micro Algae, in: Lavens, P., Sorgeloos, P. (Eds.), *Manual on the production and use of live food for aquaculture*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, p. 7-30.
- Descy, J., Higgins, W., Mackey, D., Hurley, J. & Frost, T. 2000. Pigments ratios and phytoplankton assessment in northern Wisconsin lakes. *J. Phycol.* 36:274-286.
- Díaz, A., Ramírez, A., Godínez, D. & Gallo, C. 2006. Efecto del tamaño de las microalgas sobre la tasa de ingestión en larvas de *Artemia franciscana* (Kellog, 1906). *Zootecnia Tropical* 24(2): 193-203.
- Erazo R., Woolcott F., Anaya M., Calvo B. & Carbajal G. 2010. Producción de biodiesel en un fotobiorreactor a partir de biomasa de microalgas utilizando emisiones industriales de dióxido de carbono. *Rev. Per. Quím. Ing. Quím.* Vol. 13 N.º 2. p. 57-63.
- Fábregas, J., Herrero, C. & Abalde, C. 1985. Growth, chlorophyll a and protein of the marine microalga *Isochrysis galbana* in batch cultures with different salinities and high nutrient concentrations. *Aquaculture*. 50:1-11.
- Fánor, C., Ávila L. & Riascos, O. 2012. Diurnal changes in photosynthetic pigments content in sun and shade marigold leaves. a Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. p. 63 y 64
- Fernández, P. 1992. *Ingeniería térmica y de fluidos*. Primera edición. Universidad de Catambria. España. p.67.
- Flemming, H. 1991. "Biofouling in water treatment". *Biofouling and Corrosion in Industrial Systems*. Ed. Springer-Verlag. p. 27.
- Flotats, X, Foged, H., Blasi, A., Palatsi, J., Magri, A. & Schel, K. 2011. *Manure Processing Activities in Europe - Project reference: ENV.B.1/ETU/2010/0007 Manure Processing Technologies*. Technical Report 2, European Commission, Directorate-General Environment. p. 184.

- Goericke, R. & Montoya, J. 1998. Estimation the contribution of microalgal taxa to chlorophyll a in the field-variations of pigment ratios under nutrient and light limited growth. *Marine Ecology Progress series*. 169:97-112.
- Grobbelaar, U. 2004. Algal nutrition: mineral nutrition. In: Richmond A (ed). *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology*. p. 97-115.
- Guillard, R. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. *Culture of marine invertebrate animals*. Plenum Preess, N.Y. p. 29-59.
- Harun, R., Singh, M., Forde, G. & Danquah, M. 2010. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14:1037–1047.
- Hernández, A. & Labbé, J. 2014. Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* Vol. 49, N°2: 157-173.
- Hernández, A. 1996. El estudio de crecimiento de las poblaciones humanas papeles de la población. *Universidad Autónoma del estado de Mexico*. p. 68.
- Henriksen, P., B. Riemann, H. Kaas., Munk, H. & Lang, H. 2002. Effects of nutrient limitation and irradiance on marine phytoplankton Pigments. *J. Plank. Res.* 24(9):835-858.
- Hincapié, C. 2007. Macrobiofouling on open-ocean submerged aquaculture cages in Puerto Rico. A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science in Marine Sciences, University of Puerto Rico Mayagüez Campus. Mayagüez, Puerto Rico. p. 56.
- Hirata K., Tsujimoto Y., Namba, T., Ohta T., Hirayanagi N., Miyasaka H., Zenk M. & Miyamoto K. 2001. Strong induction of phytochelatin synthesis by zinc in marine green algae, *Dunaliella tertiolecta*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 92: 24-29.
- Jiménez, T. 2009. Caracterización biológica del biofouling marino mediante métodos moleculares. aislamiento y determinación de actividad quorum sensing de las especies implicadas en el proceso. TESIS DOCTORAL. Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales Departamento de Tecnologías del Medio Ambiente. p. 9 – 10.
- Jiménez, B. & Prada, C. 2012. Efecto del ensilado de los desechos blandos de *A. purpuratus* “concha de abanico” como medio de cultivo en el crecimiento poblacional, contenido de clorofila α y carotenoides de *T. suecica*, en condiciones de laboratorio. Tesis para optar el grado de Biólogo Acuicultor. Escuela Académica Profesional de Biología en

- Acuicultura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional del Santa. Ancash – Perú. p. 47.
- Leblanc, A., Landry, T & Miran, G. 2002. Fouling organisms in a mussel cultivation bay: their effect on nutrient uptake and release. Department de biology University de Moncton, Nouveau-Brunswick. Can. Tech. Rep. Fish. Aquat.Sci. 2431:1-16.
- Liotenberg, S., Campell, D., Rippka, R., Houmard, J. & Tandreau, N. 1996. Effect of the nitrogen source on phycobiliprotein synthesis and cell reserves in a chromatically adapting filamentous cyanobacterium. Microbiology. 142:611-622.
- Loayza, R. 2011. Problemática del biofouling en el cultivo de *A. purpuratus* en el peru. Revista AquaTIC, nº 35, p. 9-19.
- Maguire, J & Burnel, G. 1999. The potential for scallop spat collection in Bantry Bay, Ireland. Biology and Environment: Proceedings Of The Royal Irish Academy 99b(3):183–190
- Manrique, E. 2003. Los pigmentos fotosintéticos, algo más que la captación de luz. Ecosistemas 2003/1. p. 23.
- Martínez, L. 2008. Eliminación de CO₂ con microalgas autóctonas. Tesis Doctoral, Instituto de Recursos Naturales, Universidad de León, León. p. 226.
- Merino, F. & Encomendero, E. (2012). Producción de microalgas usando subproductos mariculturales. Pueblo cont. 23(2).
- Merino, J. 2003. Cultivo masivo de microalgas de agua salada en laboratorio. Informe de actividades realizadas durante año sabático. Univ. Santa. Nuevo Chimbote, Peru. p. 34.
- McGriff, J. & McKinney, R. 1972. The removal of nutrients and organics by activated algae. Water Research 6: 1155-1164.
- Millán, R., Valenzuela, E., Trees, C., Santamaría del Ángel, E. & Núñez, F. 2010. Efecto de la intensidad de luz en la razón de pigmentos de *Tetraselmis suecica*. Revista Acuicultura. p. 13.
- Molina, E., Martínez, E., Sánchez, S., García, F. & Contreras, A. 1991. Growth and Biochemical composition with emphasis on the fatty acids of *tetraselmis* sp. Appl. Microbiol. Biotechnol., 36, 21-25.
- Oilgae, 2011. Comprehensive Oilgae Report. Energy from Algae: Products, Market, Processes & Strategies., Tamilnadu, India: s.n.

- Ortiz, M., Romero, M., & Meza, L. 2018. La biorremediación con microalgas (*Spirulina* máxima, *Spirulina platensis* y *Chlorella vulgaris*) como alternativa para tratar la eutrofización de la laguna de Ubaque, Colombia. *Rev.investig.desarro.innov*, 9(1), 163-176. doi: 10.19053/20278306.v9.n1.8. p. 153 – 163.
- Pacheco, A. y Garate, A. 2005. Bioincrustantes en estructuras de cultivo de *Argopecten purpuratus* en bahía Samanco, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima – Perú. p. 45.
- Palma, S. 2012. Pigmentos, tintes y formas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México.
- Park, J., Craggs, R. & Shilton, A. 2011. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresource Technology* 102: 35-42.
- Pérez, F. & Valera, A. 2009. Ciencias Naturales para Secundaria Básica: Octavo grado: Proyecto de contenido. p. 13.
- Posten, C. 2009. Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae. *Engineering in Life Science* 9(3): 165-177.
- Raven, J. 1988. Limits to growth. In: *Microalgal Biotechnology*. Borowitzka, M. & Borowitzka, L. (eds). Cambridge University Press. p. 331-356.
- Richmond, A. 1986. Cell response to environmental factor. En: *Handbook of Microalgal Mass Culture*. Richmond A. (ed.). p. 66 – 69.
- Richmond, A. 2004. Biological principles of mass cultivation. In: Richmond A (ed). *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology*, p. 57-82, 125-177.
- Loayza, R. 2011. Problemática del biofouling en el cultivo de *Argopecten purpuratus* en el Perú. *Revista AquaTIC*, nº 35, p. 9-19.
- Loayza, R. & Tresierra, A. 2014. Variación del “biofouling” en linternas de cultivo de “concha de abanico” *Argopecten purpuratus* en bahía Samanco, Ancash, Perú. “Ciencia y Tecnología”, Año 10, N° 2. p. 19-34.
- Rubio, F. & Hernández, G. 2015. Evaluación de las incidencias de salinidad y ph sobre la biomasa, productividad y acumulación de lípidos en cultivos de *Chlorella vulgaris* en un fotobiorreactor de placa plana. *ITECKNE Vol. 13 Número 1 • ISSN 1692-1798 • ISSN Digital. p. 2339-3483.*

- Sánchez, L. 2017. Análisis sectorial de la cadena de valor, bajo el Enfoque value links, para la concha de abanico en la Bahía de Sechura. Lima-Perú. p. 23.
- Serpa, R. & Calderón, A. 2006. Efecto de diferentes fuentes de nitrógeno en el contenido de carotenoides y clorofila de cuatro cepas peruanas de *Dunaliella salina* TEOD. Rev. Ecología aplicada. 5(1;2):93-99.
- Sharma, K., Schuhmann H. & Schenk P. 2012. High Lipid induction in microalgae for biodiesel production. Energies. (5):1532-1553. Doi:10.3390/en5051532.
- Spolaore, P., Joannis C., Duran E. & Arsène, I. 2006, Commercial Applications of Microalgae, Laboratoire de Génie des Procédés et Matériaux, Ecole Centrale Paris, Vol. Paris France. 101, No. 2. p. 87–96.
- Steel, R., & Torrie, Y. 1988. Bioestadística: Principios y Procedimientos. 2 da Edic. (1 ra en español) Edit. McGraw-Hill. México. p. 622.
- Toledo, M., Ávila, M., Manríquez, A., Olivares, G., Soto, A. & Saavedra, S. 2009. Insumo alternativo para la alimentación de especies acuícolas. Ediciones Universitarias de Valparaíso. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. p. 61.
- Stein, J. 1973. Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurement. Cambridge University Press, Cambridge, 448 pp.
- Ulloa, G. 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. p. 220.
- Uribe, E. & Blanco, J. 2001. Capacidad de los sistemas acuáticos para el sostenimiento del cultivo de pectínidos: el caso de *Argopecten purpuratus* en la Bahía Tongoy, Chile. En: A. Maeda-Martínez (ed.), Los moluscos pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura, Cap. 12:233-248.
- Vieira, A. & Klaveness, D. 1986. The utilization of organic nitrogen compounds as sole nitrogen source by some freshwater phytoplankters. Nord. J. Bot. 6(1):93-97.
- Villarreal, E., Buitrago, E. & Lodeiros, C. 2004. Identificación de factores ambientales que afectan al crecimiento y la supervivencia de *Crassostrea rhizophorae* (Mollusca: Bivalvia) bajo condiciones de cultivo suspendido en el golfo de Cariaco, Venezuela. Revista Científica, FCV-LUZ 14(1):28-35.

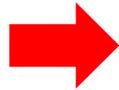
- Vonshak, J. 1986. Laboratory techniques for the culturing of microalgae. In: Handbook of Microalgal Mass Culture. Richmond, A. (ed.), CRC Press Inc. Boca Raton. Florida, U.S.A. p. 117-145.
- Walne, P. 1966. Experiments in the large scale culture of the larvae of *Ostrea edulis* L. Fishery Invest. Min. Agric. Fish. Series 2, 24(4): 8
- Yauri, P. 2015. 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. p. 29 – 34.
- Zare, J. 2018. Uso de ensilado a base de residuos de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) como fertilizante orgánico para producción de microalga marina *Tetraselmis suecica*”. Universidad Nacional Agraria la Molina. p. 68.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anexo 1. Elaboración del medio de cultivo condensado de vapores de biofouling



Pesado del biofouling



Se colocó en un matraz 200 g
agregando 500 mL de agua



Muestra de CVB



Se conectó a un condensador
artesanal por 20 min de
ebullición (100 °C)

Anexo 2. Acondicionamiento del lugar donde se realizó la investigación



Instalación de las tuberías para la aireación



Instalación de los biorreactores para el cultivo de *T. suecica*



Anexo 3. Medición de los parámetros físicos y químicos



Medición de parámetros



Medición de Salinidad

Anexo 4. Conteo del crecimiento poblacional



Sacando la muestra de cada tratamiento



Realizando el conteo en el microscopio en una cámara Newbauer mejorada de



Anexo 5. Protocolo empleado en la determinación de pigmentos (clorofila a y caroteno).

