

# UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

## FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOLOGÍA EN ACUICULTURA



Crecimiento poblacional y contenido de  $\beta$ -caroteno de *Dunaliella salina* cultivada en laboratorio a diferentes concentraciones (20, 40 y 60 ml.L<sup>-1</sup>) de extracto de lodo proveniente de un cultivo de *Argopecten purpuratus*

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

**TESISTAS:**

**Bach. López Pérez, Jhoan Anderson**

**Bach. Pantoja Tirado, Estrella Celeste**

**ASESOR:**

**Dr. Merino Moya, Juan Fernando**

**NUEVO CHIMBOTE - PERÚ  
2016**

# UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

## FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOLOGÍA EN ACUICULTURA



**Crecimiento poblacional y contenido de  $\beta$ -caroteno de *Dunaliella salina* cultivada en laboratorio a diferentes concentraciones (20, 40 y 60 ml.L<sup>-1</sup>) de extracto de lodo proveniente de un cultivo de *Argopecten purpuratus***

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

**REVISADO POR**

---

**Dr. Merino Moya, Juan Fernando**

**NUEVO CHIMBOTE - PERÚ**  
**2016**

# UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

## FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOLOGÍA EN ACUICULTURA



**Crecimiento poblacional y contenido de  $\beta$ -caroteno de *Dunaliella salina* cultivada en laboratorio a diferentes concentraciones (20, 40 y 60 ml.L<sup>-1</sup>) de extracto de lodo proveniente de un cultivo de *Argopecten purpuratus***

**TESISTAS:**

**Bach. López Pérez, Jhoan Anderson**

**Bach. Pantoja Tirado, Estrella Celeste**

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

---

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

---

**Dr. Fernando Merino Moya**  
**Integrante**

---

**Blga. Acui. Sorayda Mendoza Espinoza**  
**Secretaria**

**NUEVO CHIMBOTE - PERÚ**  
**2016**

## **DEDICATORIA**

A mis padres Santos y Milagros, a quienes amo y quiero mucho, por su apoyo moral, consejos, cariño y comprensión.

A mis hermanos Lucia, Pedro y Deysi, quienes me impulsaron a pasar todos los tropiezos que pude encontrar en el transcurso de mi formación académica.

**Pantoja Tirado, Estrella Celeste**

A mis abuelos, Leoncia y Pedro, quienes me enseñaron los valores de la vida, y me dieron sabios consejos para poder alcanzar la meta de una vida profesional.

A mis padres y Juvencio Yolanda, por apoyarme en todo, y mi hermano Jimmy, quienes de alguna manera forman parte importante de mi vida y siempre están conmigo.

**López Pérez, Jhoan Anderson**

## **AGRADECIMIENTO**

En primer lugar damos gracias a Dios, por habernos dado fuerza y valor para culminar con esta etapa de nuestra vida profesional.

Agradecemos también la confianza y el apoyo brindado por parte de cada uno de nuestros padres, que sin duda alguna en el trayecto de mi vida nos han demostrado su amor, corrigiendo nuestras faltas y celebrando nuestros triunfos.

A nuestro asesor el Dr. Juan Fernando Merino Moya por toda su colaboración brindada, no solo en la elaboración de nuestro trabajo sino también en toda nuestra formación profesional y como persona.

**Los Autores**

## INDICE GENERAL

Páginas

|   |    |
|---|----|
| <b>DEDICATORIA</b>  |    |
| <b>AGRADECIMIENTO</b>   |    |
| <b>RESUMEN</b>  | 1  |
| <b>ABSTRACT</b>   | 2  |
| <b>I. INTRODUCCION</b>  | 3  |
| <b>II. MATERIALES Y MÉTODOS</b>   | 6  |
| 2.1. Diseño experimental  | 6  |
| 2.2. Estrategia de trabajo  | 6  |
| 2.2.1. Procedencia de la cepa   | 6  |
| 2.2.2. Universo, acondicionamiento y característica de la muestra   | 7  |
| 2.2.3. Diseño y características de la muestra   | 7  |
| 2.2.4. Tratamiento del agua de mar  | 7  |
| 2.2.5. Preparación del inóculo microalgal   | 8  |
| 2.2.6. Medio Guillard f/2   | 8  |
| 2.2.7. Preparación del extracto acuoso de lodo de un cultivo de <i>A. purpuratus</i>                            | 9  |
| 2.2.8. Determinación del crecimiento poblacional  | 11 |
| 2.2.9. Determinación de $\beta$ -caroteno   | 11 |
| 2.2.10. Análisis estadísticos de datos  | 13 |
| <b>III. RESULTADOS</b>  | 14 |
| 3.1. Comportamiento de los parámetros de pH y temperatura del cultivo algal                                     | 14 |
| 3.1.1. Ph   | 14 |
| 3.1.2. temperatura  | 14 |
| 3.2. Efecto de diferentes concentraciones de EALCA y la dinámica de crecimiento poblacional de <i>D. salina</i> | 15 |
| 3.2.1. Crecimiento poblacional  | 15 |
| 3.2.2. Tasa de crecimiento poblacional de <i>D. salina</i>  | 17 |
| 3.2.3. Contenido de $\beta$ -caroteno en <i>D. salina</i>   | 19 |
| <b>IV. DISCUSION</b>  | 21 |
| <b>V. CONCLUSIONES</b>  | 25 |
| <b>VI. RECOMENDACIONES</b>  | 26 |
| <b>VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>  | 27 |
| <b>VIII. ANEXOS</b>   | 33 |

## LISTA DE TABLAS

## Páginas

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabla 1.</b> Preparación para los diseños experimentales  | 6  |
| <b>Tabla 2.</b> Aporte de los principales nutrientes de los medios utilizados en el cultivo de <i>D. salina</i> a sus diferentes concentraciones.  | 6  |
| <b>Tabla 3.</b> Composición química del medio de cultivo Guillard f/2.   | 9  |
| <b>Tabla 4.</b> Composición química del medio EALCA  | 10 |
| <b>Tabla 5.</b> Crecimiento poblacional ( $\times 10^5 \text{ cel. ml}^{-1}$ ) de cultivos de <i>Dunaliella salina</i> dosificados con EALCA.  | 16 |
| <b>Tabla 6.</b> Tasa de crecimiento por día ( $\mu$ ) y tiempo de duplicación diaria (TD) de los cultivos de <i>Dunaliella salina</i> dosificado con EALCA durante el día 6.   | 18 |
| <b>Tabla 7.</b> Tasa de crecimiento por día ( $\mu$ ) y tiempo de duplicación diaria (TD) de los cultivos de <i>Dunaliella salina</i> dosificado con EALCA en relación a los días que alcanzaron su mayor crecimiento. | 19 |
| <b>Tabla 8.</b> Contenido de $\beta$ -caroteno de los cultivos de <i>Dunaliella salina</i> dosificados con EALCA.  | 20 |

## LISTA DE FIGURAS

## Páginas

|   |    |
|---|----|
| <b>Fig. 1.</b> Esquema de la secuencia para el tratamiento del agua de mar.   | 8  |
| <b>Fig. 2.</b> Flujograma del proceso de preparación de EALCA.  | 10 |
| <b>Fig. 3.</b> Flujograma del procedimiento del análisis del $\beta$ -caroteno de <i>Dunaliella salina</i> .  | 12 |
| <b>Fig. 4.</b> Comportamiento del pH de los cultivos de <i>Dunaliella salina</i> con diferentes concentraciones de EALCA.   | 14 |
| <b>Fig. 5.</b> Comportamiento de la temperatura de los cultivos de <i>Dunaliella salina</i> con diferentes concentraciones de EALCA.  | 15 |
| <b>Fig. 6.</b> Crecimiento poblacional ( $\times 10^5 \text{ cel. ml}^{-1}$ ) de cultivos de <i>Dunaliella salina</i> dosificados con EALCA.                                  | 16 |
| <b>Fig. 7.</b> Tasa de crecimiento por día ( $\mu$ ) y tiempo de duplicación diaria (TD) de los cultivos de <i>Dunaliella salina</i> dosificado con EALCA hasta el día 6.     | 18 |
| <b>Fig. 8.</b> Tasa de crecimiento por día ( $\mu$ ) y tiempo de duplicación diaria (TD) de los cultivos de <i>Dunaliella salina</i> dosificado con EALCA en días diferentes. | 19 |
| <b>Fig. 9.</b> Contenido de $\beta$ -caroteno ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) de los cultivos de <i>D. salina</i> dosificados con EALCA.   | 20 |

| <b>ANEXOS</b>  | <b>Páginas</b> |
|--|----------------|
| <b>Anexo 1:</b> Toma de muestra del Humedal de Villamaría.   | 33             |
| <b>Anexo 2:</b> Adaptación de <i>D. salina</i> y obtención del inóculo para el cultivo.  | 33             |
| <b>Anexo 3:</b> Instalación del diseño experimental y seguimiento del cultivo.   | 34             |
| <b>Anexo 4:</b> Células de <i>D. salina</i> observadas a 20X.  | 35             |
| <b>Anexo 5:</b> Realización del proceso para obtener el medio EALCA para el cultivo de <i>D. salina</i> .                                      | 36             |
| <b>Anexo 6:</b> Realización del proceso de obtención de los pigmentos y carotenos del cultivo de <i>D. salina</i> .                            | 37             |
| <b>Anexo 7:</b> Matriz de los promedios para el control de pH de los 10 día de cultivo de <i>D. salina</i>                                     | 38             |
| <b>Anexo 8:</b> Matriz de los promedios para el control de temperaturas de los 10 días de cultivo de <i>D. salina</i> ,                        | 39             |
| <b>Anexo 9:</b> Matriz de los promedios para el conteo celular de <i>D. salina</i> , de los 10 días de cultivo.                                | 40             |
| <b>Anexo 10:</b> Matriz de los pigmentos y carotenos para el primer y último día de cultivo de <i>D. salina</i> .                              | 41             |
| <b>Anexo 11:</b> Contenido de clorofila a, carotenos totales y $\beta$ -carotenos para el primer y último día de cultivo de <i>D. salina</i> . | 42             |

## RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se evaluó el efecto del extracto acuoso de lodo proveniente de un cultivo de *Argopecten purpuratus*, “concha de abanico” (EALCA), en el crecimiento poblacional de *Dunaliella salina* así como su influencia en el contenido de  $\beta$ -caroteno, en condiciones de laboratorio. Para la elaboración del extracto se utilizó 2 L de lodo procedentes de la Bahía de Samanco, Chimbote, Perú. Se utilizó el EALCA como tratamiento experimental con dosificaciones de 20, 40 y 60 ml.L<sup>-1</sup>, los que fueron comparados con el tratamiento control (Guillard f/2); obteniendo un mayor crecimiento poblacional con el tratamiento de 40 ml.L<sup>-1</sup> de EALCA, con valores  $7.2 \times 10^5$  cél.mL<sup>-1</sup>. Respecto al contenido de  $\beta$ -caroteno, se obtuvo el mayor valor con el medio control con 29.487 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente. En conclusión, los tratamientos dosificados con EALCA presentaron un mayor crecimiento poblacional y un menor contenido de  $\beta$ -caroteno en comparación al grupo control.

**Palabras claves:** crecimiento, extracto acuoso de lodo, *Argopecten purpuratus*, *Dunaliella salina*,  $\beta$ -caroteno.

## ABSTRACT

In this research the effect of aqueous extract of sludge from a culture of *Argopecten purpuratus*, "scallop" (EALCA) in the population growth of *Dunaliella salina* and its influence on the content of  $\beta$ -carotene was evaluated in laboratory conditions. 2 L was used from Samanco Bay, Chimbote, Peru for the preparation of aqueous extract of clay, was used to meter the EALCA 20, 40 and 60 ml.L<sup>-1</sup>, which were compared with the control medium treatment (Guillard f/2). Finding the highest population growth with the dosage of 40 ml.L<sup>-1</sup> (EALCA) with 7,2 x 10<sup>5</sup> cel.mL<sup>-1</sup>; with respect to the percentage increase of  $\beta$ -carotene the best values were obtained with the control medium with 29.487 mg.L<sup>-1</sup>, respectively. In conclusion all treatments dosed medium EALCA have higher population growth compared to the control group.

**Keywords:** growth, aqueous extract of mud, *Argopecten purpuratus*, *Dunaliella salina*, chlorophyll,  $\beta$ -carotene.

## I. INTRODUCCIÓN

Las microalgas son organismos, unicelulares, coloniales o filamentosos que forman cadenas, colonias o cenobios, tienen diversos pigmentos (e.g., clorofilas y carotenoides) y están presentes en agua salada, dulce o en el suelo (Abalde, 2004). Se caracterizan por presentar reproducción asexual (Merino, 2003) la cual es una característica importante para los fines de producción masiva (Gómez, 2007), con miras a su aprovechamiento biocombustibles, suplementos nutritivos, fármacos o cosméticos.

En cuanto a la producción de microalgas, Cañavate (2009) indica que existen cuatro especies de microalgas: *Dunaliella*, *Arthrospira*, *Haematococcus* y *Chlorella* las cuales representan la mayor producción de biomasa algal, alcanzando hasta 10 000 Tm anuales mundialmente. Según Rema (2005), una de las microalgas más utilizadas por sus compuestos bioactivos es la *Dunaliella*, por tener una alta concentración de carotenos, xantofilas incluyendo  $\beta$ -caroteno.

*Dunaliella salina*, se caracteriza por acumular grandes cantidades de carotenoides ( $\beta$ -caroteno), llegando hasta 14% de su masa seca, lo que la convierte en una fuente natural para el uso en las industrias alimenticias y farmacéuticas (Masuda *et al.*, 2002). Esta alga se encuentra predominantemente en ambientes hipersalinos, se caracteriza por tener nutrición fotoautotrófica (Borowitzka & Borowitzka, 1988), aunque en algunas cepas se demostrado que *Dunaliella* puede aprovechar eficientemente los nutrientes orgánicos (Suarez, 1999), por lo que se está explorando esta capacidad nutricional para la formular medios de cultivos basados en el tratamiento de desechos agrícolas, aguas residuales, pesqueros o lodos (Fernández & Paredes, 2006).

Es por ello que el desarrollo de tecnologías orientadas al cuidado del medio ambiente y al tratamiento de los residuos de bajo costo se ha tornado indispensable, ya que entre las tecnologías los cultivos de microalgas han adquirido una gran importancia, al ser consideradas como eco-amigables, por tener la gran capacidad de reciclar eficientemente

contaminantes desde medios líquidos, sólidos y gaseosos (Olguin, 2003, Dominic *et al.*, 2009, Douskova *et al.* 2010), generando así la disminución de los impactos negativos que ocasionan estos residuos orgánicos en el ambiente acuático y terrestre, producido por actividades pesqueras o mariculturales (Merino & Encomendero, 2012).

Para el presente trabajo de investigación, en base a experiencias preliminares, podría ser factible utilizar el lodo de los cultivos de bivalvos para el crecimiento de *D. salina*. El tratamiento de estos tipos de desechos se basa en la recuperación del nitrógeno y otros elementos químicos (Serpa, 2006), en base a esta razón, la opción de los lodos que provocan impactos ambientales se presenta como una gran alternativa viable para su disposición, destacando el cultivo de microalgas por utilizar macronutrientes para su crecimiento (Bermúdez *et al.*, 2003).

Bajo lo mencionado anteriormente Alcedo (2010) confirma que realizó experiencias a nivel de laboratorio, cultivando *Tetraselmis suecica* con Extracto acuoso de lodo (EAL) de la bahía “El Ferrol” como medio de cultivo, en donde se obtuvo la mayor tasa de crecimiento ( $\mu=0.375$ ) con una dosificación de 40 mL.L<sup>-1</sup> y el control con una tasa de crecimiento ( $\mu=0.329$ ), con respecto a la utilización de los residuos de la maricultura Ipanaqué & Paredes (2009) utilizaron ensilado de los desechos blandos (vísceras, mantos, etc.) de *Argopecten purpuratus* (EDBCA), en el crecimiento de *tetraselmis suecica* trabajando con cuatro tratamientos experimentales (40, 60, 80 y 100 mL.L<sup>-1</sup>) demostrando que la concentración de 80 favoreció el crecimiento de los cultivos algales.

Así también, *D. salina* ha sido muy estudiada por su capacidad para producir grandes cantidades de B-caroteno (Cifuentes *et al.*, 1996) sin embargo no se ha encontrado referencias en torno a la utilización de extracto lodo como medio de cultivo para la producción de carotenos para esta especie, autóctona de nuestra localidad, el cual de obtener resultados favorables, significaría una alta producción de carotenos a un bajo costo y a la vez que ayudaría a reducir la contaminación provocado por la actividad maricultural. Por tal motivo se plantea el siguiente problema: ¿Cuál será Crecimiento poblacional y contenido de  $\beta$ -carotenos de *Dunaliella salina* cultivada en laboratorio a diferentes

concentraciones (20, 40 y 60 ml.L<sup>-1</sup>) de extracto de lodo proveniente de un cultivo de *Argopecten purpuratus*.

Como objetivo general se propuso, evaluar el crecimiento y contenido de  $\beta$ -caroteno de *D. salina* a diferentes concentraciones (20, 40 y 60 ml.L<sup>-1</sup>) de extracto de lodo provenientes de un cultivo de *Argopecten purpuratus*, en condiciones de laboratorio. Los objetivos específicos planteados fueron:

- Determinar el crecimiento poblacional de *D. salina* utilizando concentraciones de extracto de lodo provenientes de un cultivo de *Argopecten purpuratus* (20, 40 y 60 ml.L<sup>-1</sup>) como medio de cultivo, en laboratorio.
- Determinar el contenido de  $\beta$ -caroteno de *D. salina* utilizando concentraciones de extracto de lodo provenientes de un cultivo de *Argopecten purpuratus* (20, 40 y 60 ml.L<sup>-1</sup>) como medio de cultivo, en laboratorio.

Si en condiciones de laboratorio, se utiliza concentraciones de 20, 40 y 60 ml.L<sup>-1</sup> de extracto de lodo provenientes de un cultivo de *Argopecten purpuratus*, se obtendrá un mejor crecimiento poblacional y contenido de  $\beta$ -caroteno utilizando la concentración de 40 ml.L<sup>-1</sup>.

Por lo tanto, se plantea el uso de lodo proveniente de un cultivo de *Argopecten purpuratus* en el cultivo de microalgas, ya que remueven substancialmente la materia orgánica y consecuentemente promueven el crecimiento algal, dándole una valorización a la disposición de lodos ya que contienen macro nutrientes, principalmente fosforo y nitrógeno.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Diseño experimental

Se utilizó el diseño experimental de estímulo creciente (Steel & Torre, 1992) el cual consistió en tres tratamientos y un tratamiento control, cada uno con 3 repeticiones (tabla 1).

**Tabla 1.** Preparación para los diseños experimentales.

| Tratamientos | Concentraciones de lodo |                     | Repeticiones |
|--------------|-------------------------|---------------------|--------------|
|              | Expresado en volumen    | Expresado en peso   |              |
| T1           | 20 ml.L <sup>-1</sup>   | 2 g.L <sup>-1</sup> | R1,R2,R3     |
| T2           | 40 ml.L <sup>-1</sup>   | 4 g.L <sup>-1</sup> | R1,R2,R3     |
| T3           | 60 ml.L <sup>-1</sup>   | 6 g.L <sup>-1</sup> | R1,R2,R3     |
| TC           | Guillard f/2            |                     | R1,R2,R3     |

**Tabla 2.** Aporte de los principales nutrientes de los medios utilizados en el cultivo de *D. salina* a sus diferentes concentraciones.

| Nutrientes<br>(mg.L <sup>-1</sup> ) | Guillard f/2 | EALCA (ml.L <sup>-1</sup> ) |        |        |
|-------------------------------------|--------------|-----------------------------|--------|--------|
|                                     |              | 20                          | 40     | 60     |
| Nitrógeno                           | 12.35        | 2                           | 4      | 6      |
| Fosforo                             | 1.12         | 0.0007                      | 0.0014 | 0.0020 |
| Hierro                              | 0.93         | 0.0027                      | 0.0054 | 0.0080 |

### 2.2. Estrategia de trabajo

#### 2.2.1. Procedencia de la cepa

Durante la realización del experimento, se utilizó 5 L de muestras de *D. salina*; proveniente de una laguna artificial del humedal de Villa María- Ancash (anexo 1), dentro de las coordenadas geográficas 09° 06' latitud norte y 74° 34' longitud Oeste.

### **2.2.2. Universo, acondicionamiento y características de la muestra**

Las muestra de agua con *D. salina* tenían una salinidad de 400‰ y las células presentaban una coloración anaranjada (presencia del pigmento  $\beta$ -caroteno), y fueron cultivadas en el laboratorio de Cultivos de Especies Auxiliares de la E.A.P. Biología en Acuicultura; iniciándose el cultivo para mantenimiento de la cepa en botellas de 5 L con 4 L de volumen efectivo (anexo 2), manteniéndose con iluminación constante suministrado por una lámpara fluorescente de 40 watts colocada perpendicularmente a una distancia de 10 cm; con aireación constante suministrado por un Blower de 1/2 HP, con una tasa de flujo de 200 ml.min. Después de dos días de transcurrido el almacenamiento de la cepa, se transfirieron a botellas de 3 L de capacidad y 2 L volumen efectivo, realizando la diluciones sucesivas, con agua de caño, del medio hipersalino desde 400‰ hasta 50‰; y al cabo de 15 días, los cultivos llegaron a tornarse de color verde.

### **2.2.3. Diseño y características de la muestra**

Los cultivos de *D. salina* se mantuvieron en condiciones de laboratorio bajo iluminación y aireación constantes, los tres tratamientos con sus respectivas replicas fueron colocadas en botellas de plástico de 3 L de capacidad, iniciándose los cultivos con 1 L y una concentración celular promedio de  $2,5 \times 10^5$  cel.ml<sup>-1</sup>.

### **2.2.4. Tratamiento del agua de mar**

El agua de mar procedió de la playa “El Dorado” ubicada en la bahía de Samanco (09° 12' LS y 78° 30' LW), Distrito de Nuevo Chimbote, Provincia del Santa, Departamento de Ancash, Perú.

Esta agua de mar está compuesta por la mayoría de minerales, microelementos, para utilizar esta agua se sedimentó por 24 horas y se filtró con una malla de 2 $\mu$  de diámetro luego se añadió 1 ml de hipoclorito de sodio por cada litro de agua de mar. Después lo dejamos en reposo por 24 horas, y se neutralizó con tiosulfato de sodio utilizando 1ml por cada litro de agua de mar (fig. 1) y enseguida se colocó bajo aireación constante para eliminar los residuos de cloro.

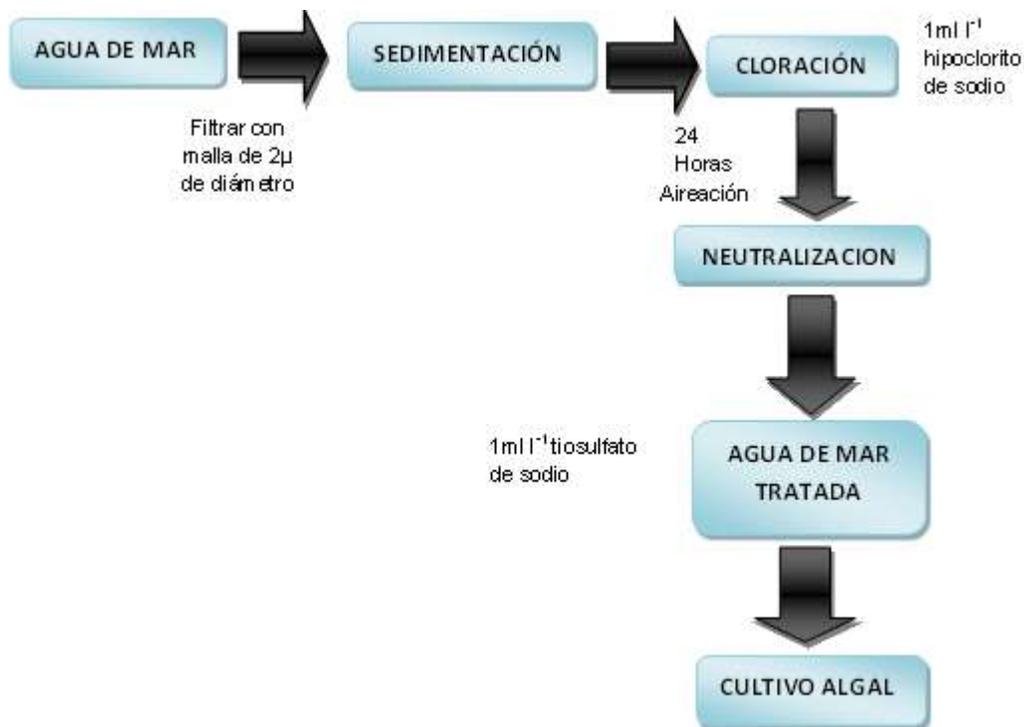


Fig. 1 Esquema de la secuencia para el tratamiento del agua de mar según Merino *et al.* (2003).

### 2.2.5. Preparación del inóculo microalgal

Habiendo bajado su medio hipersalino de *D. salina* a 50‰ y obteniendo así un color verde se transfirieron a botellas de 3 L de capacidad con 1 L volumen efectivo, iniciándose así los cultivos con una concentración de  $2,5 \times 10^5$  cel.ml<sup>-1</sup> en cada unidad experimental (anexo3), utilizando para el control Guillard f/2 y para los tratamientos concentraciones de 20, 40 y 60 ml.L<sup>-1</sup> de EALCA.

### 2.2.6. Medio Guillard f/2

El medio de cultivo Guillard f/2 (tabla 2) que se utilizó para el mantenimiento de los inóculos de *D. salina* y el control con medio Guillard f/2 durante la experiencia, fue preparado según lo propuesto por Guillard (1973).

**Tabla 3.** Composición química del medio de Cultivo Guillard f/2.

| COMPUESTO   | CONCENTRACIÓN(mg L <sup>-1</sup> ) |
|---|------------------------------------|
| <b>Nutrientes mayores</b>                           |                                    |
| NaNO <sub>3</sub>                                   | 75,0                               |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O   | 5,0                                |
| <b>Micronutrientes</b>                              |                                    |
| Na <sub>2</sub> EDTA                                | 4,36                               |
| FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O                | 3,15                               |
| CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O                | 0,01                               |
| ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                | 0,022                              |
| CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O                | 0,01                               |
| MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O                | 0,18                               |
| Na <sub>2</sub> MnO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O | 0,006                              |
| <b>Vitaminas</b>                                    |                                    |
| Tiamina   | 0,1                                |
| Biotina   | 0,5                                |
| Cianocobalamina                                     | 0,5                                |

### **2.2.7. Recolección del lodo de un cultivo de *A. purpuratus* y preparación de su extracto acuoso**

La zona de colección corresponde a la bahía de Samanco. La recolección del lodo del fondo del cultivo suspendido de *A. purpuratus* se realizó con ayuda de un buzo, obteniendo una muestra de 2 L, la cual fue transportada al laboratorio de cultivos auxiliares de la Universidad Nacional del Santa (anexo 5) donde se procedió a la preparación del extracto acuoso de lodo de concha de abanico *A. purpuratus* (EALCA), de la siguiente manera:

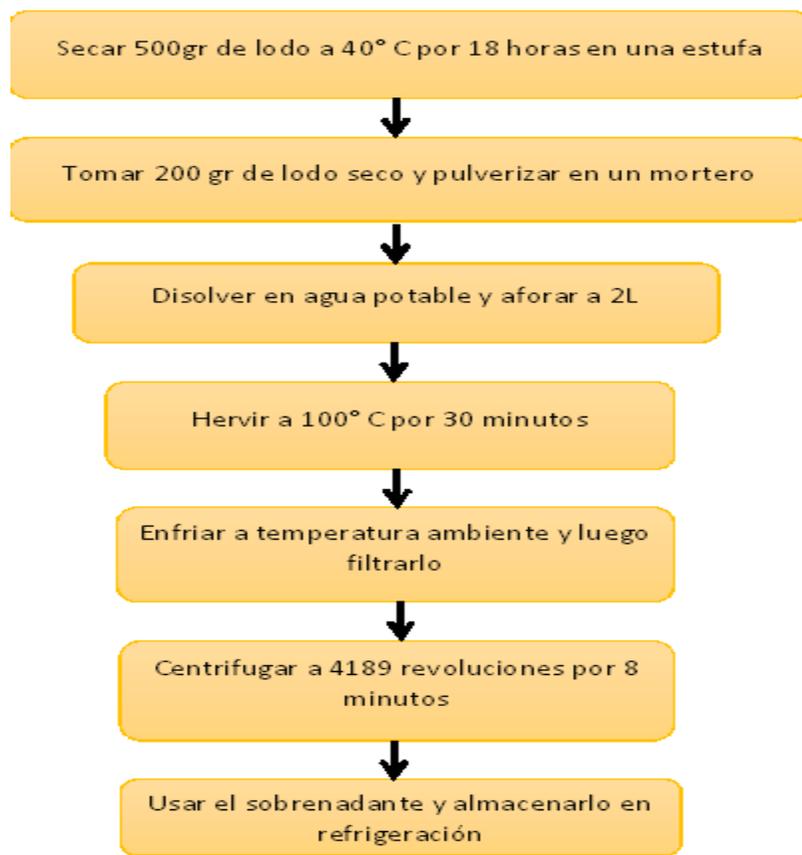


Fig. 2. Flujograma del proceso de preparación del EALCA. (Merino *et al.* 2003)

La composición química del EALCA fue realizado en el laboratorio Colechi S.A.C.(tabla 3) a fin de conocer el aporte de los principales nutrientes (N, P, K y Fe) en comparación al medio Guillard utilizado como control en nuestras experiencias (tabla 4).

**Tabla 4.** Composición química del medio EALCA

| Nutriente | Concentración (mg.L <sup>-1</sup> ) |
|-----------|-------------------------------------|
| Nitrógeno | 100                                 |
| Fosforo   | 0.034                               |
| Potasio   | 54.82                               |
| Hierro    | 0.134                               |

### 2.2.8. Determinación del crecimiento poblacional

El crecimiento poblacional de los cultivos algales se realizaron por conteos diarios, teniendo una duración de 10 días. Las muestras fueron extraídas con la ayuda de una pipeta de 1 ml, la muestra se inmovilizo con solución de lugol a fin de facilitar los recuentos celulares; diariamente se realizó el conteo celular mediante una cámara Neubauer y de 0,1 mm de profundidad y un microscopio de la marca OLYMPUS; el conteo se realizó tomando los cinco cuadrantes de la cámara y usando el objetivo de 10x. Se graficaron las curvas de crecimiento poblacional, la tasa de crecimiento específico ( $\mu$ ) y el tiempo de duplicación diaria (TD), los cuales fueron calculados utilizando datos del día de máximo crecimiento (anexo 4), según la ecuación dada (Guillard 1973).

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

Dónde:

$N_o$  = Número inicial de células

$N_f$  = Número final de células

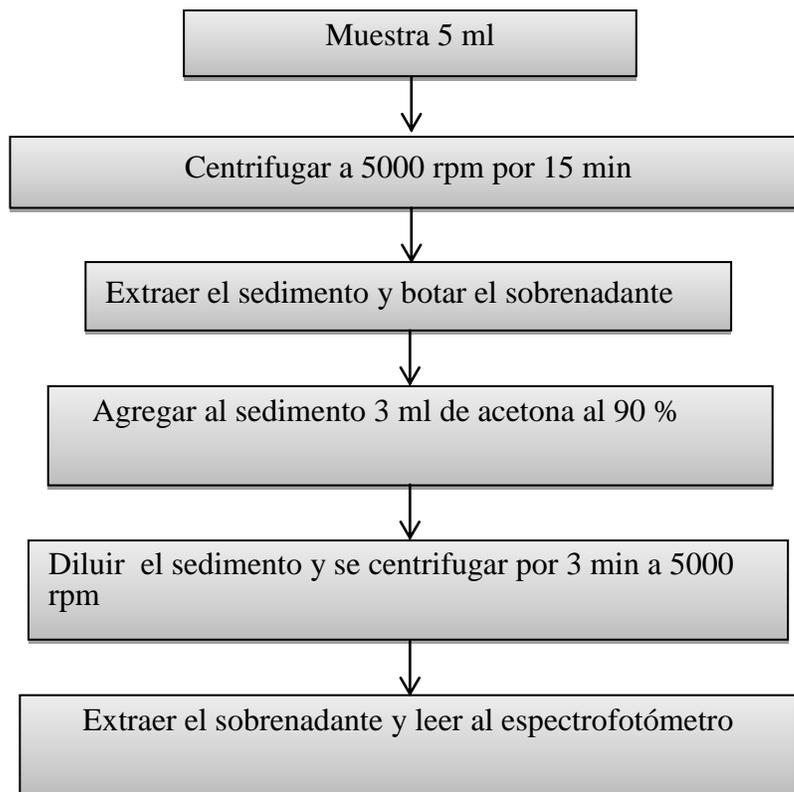
$T_o$  = tiempo inicial

$T_f$  = tiempo final

$\mu$  = Constante de crecimiento

### 2.2.9. Determinación de $\beta$ -caroteno

Se determino el contenido de  $\beta$ -caroteno, del primer y último día de cultivo (anexo 6), en tubos de ensayo se extrajeron 5 ml de suspensión algal de cada unidad experimental (fig. 1).



**Fig. 3:** Flujograma del procedimiento de análisis del  $\beta$ -caroteno en *D. salina* (Capa, 2010).

La separación de la biomasa algal del medio de cultivo se realizó con una centrífuga marca Ref. S-240 a 5000 rpm por espacio de 15 min. Seguidamente, se procedió a recuperar el pellet obtenido el mismo que fue resuspendido en 3 ml de acetona al 90 % y se procedió nuevamente a centrifugarse a 5000 rpm por un lapso de 3 min. A los extractos obtenidos, se les efectuó lecturas de absorbancia a 470, 647 y 663 nm, usando un espectrofotómetro Aqua Mate Plus (Capa, 2010).

Para la determinación del contenido de  $\beta$ -caroteno en *D. salina*, se utilizó las siguientes fórmulas propuestas por Mogedas *et al.* (2006):

$$\text{Clorofila } a \text{ (Ca)} = 5 \times [(12.25 \times \text{Abs}_{663}) - (2.73 \times \text{Abs}_{647})]$$

$$\text{Carotenos totales } (\mu\text{g ml}^{-1}) = \frac{[(3000 \times \text{Abs}_{470}) - 1.63 \times (\text{Ca})]}{221}$$

221

### **2.2.10. Análisis estadísticos de datos**

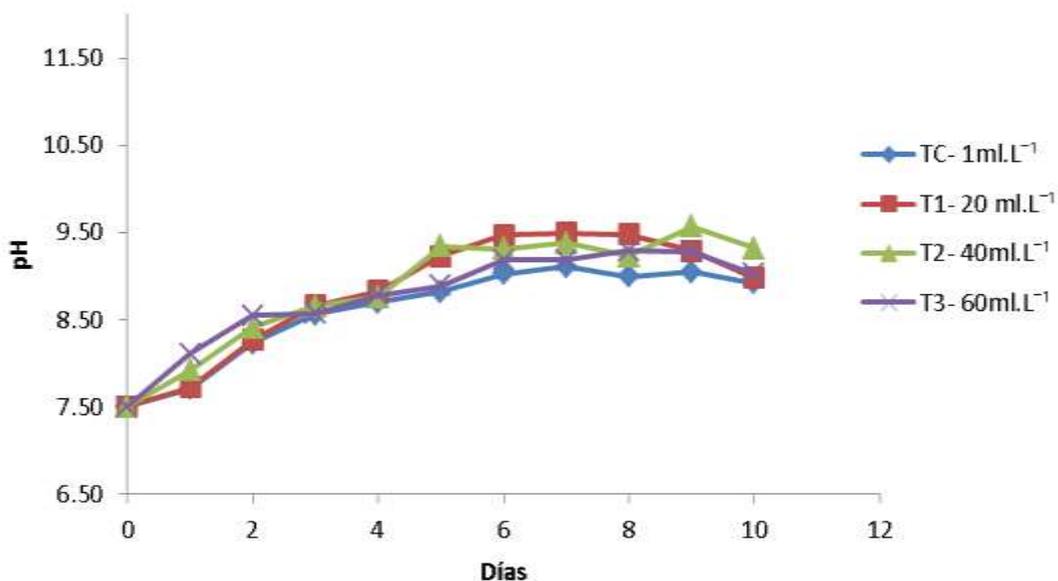
Para los datos de crecimiento poblacional y contenido de  $\beta$ -caroteno, se aplicó el análisis de varianza (ANOVA) para establecer si existen diferencias significativas entre los tratamientos. Se empleó la prueba de Tukey, para identificar diferencias significativas entre los promedios; asimismo el nivel de significancia fue para todos los casos  $p < 0,05$ . Los análisis estadísticos se desarrollaron usando los programas Microsoft Office Excel 2013 y el programa estadístico SPSS 18.

### III. RESULTADOS

#### 3.1. Comportamiento del pH y la temperatura de los cultivos de *D. salina*

##### 3.1.1. pH

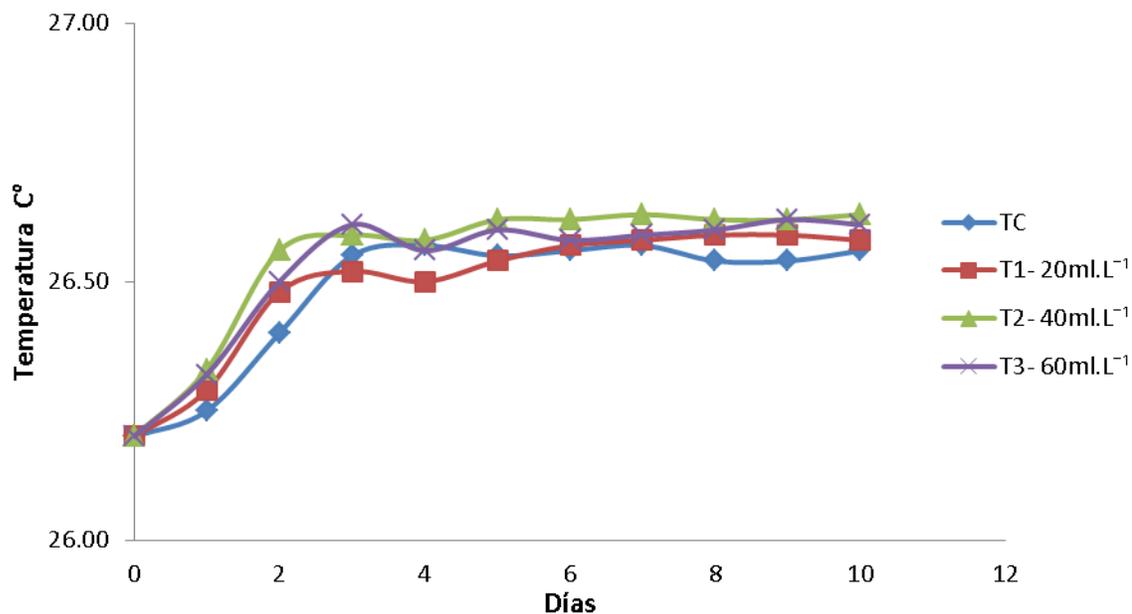
En la fig. 4, se muestra el comportamiento del pH de los cultivos de *D. salina* con las diferentes concentraciones de EALCA, encontrándose un rango de 7.50 a 9.57 durante los 10 días que duró la experiencia.



**Fig. 4:** Comportamiento promedio del pH del cultivo de *D. salina* con diferentes concentraciones de EALCA.

##### 3.1.2. Temperatura

En la fig. 5, se muestra el comportamiento de la temperatura de los cultivos de *D. salina* con diferentes concentraciones de EALCA, fluctuando entre los valores de 26.20 a 26.63 °C durante los días que duró la experiencia.



**Fig. 5:** Comportamiento promedio de la temperatura del cultivo de *D. salina* con diferentes concentraciones de EALCA.

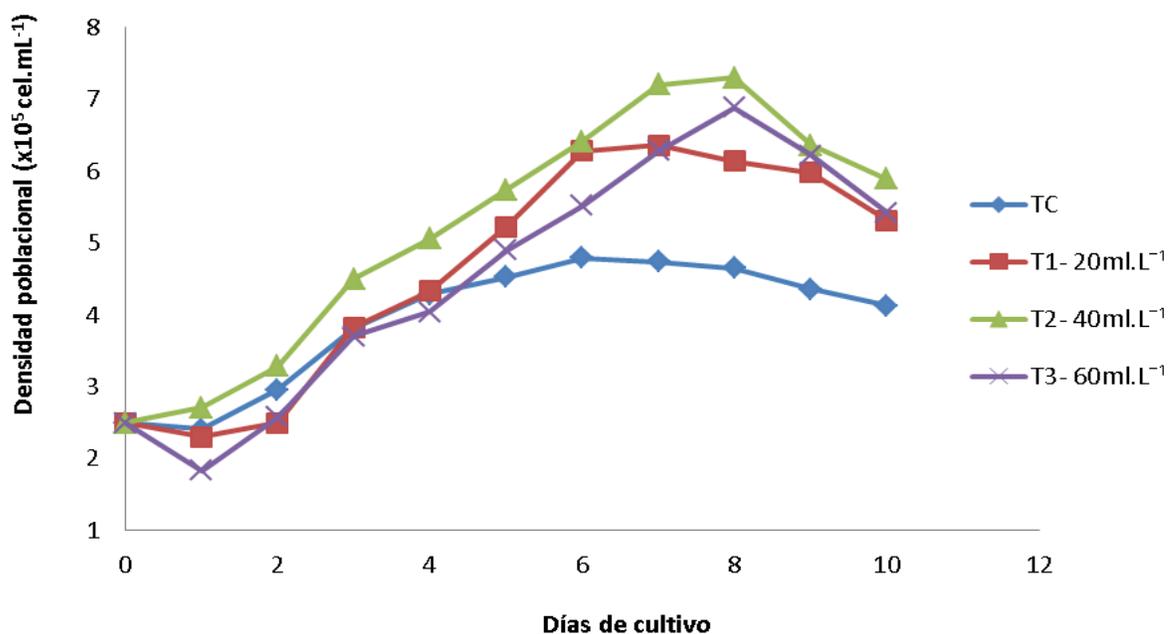
### 3.2. Efecto de las diferentes concentraciones de EALCA en el crecimiento poblacional de *D. salina*.

#### 3.2.1. Crecimiento poblacional

En la tabla 5 y fig. 6, se muestran los crecimientos poblacionales de los cultivos de *D. salina* observándose un mayor crecimiento algal a los cultivos dosificados con EALCA en relación al control.

**Tabla 5.** Crecimiento poblacional ( $\times 10^5$  cel. mL<sup>-1</sup>) de los cultivos de *D. salina* dosificados con EALCA.

| Días de cultivo | EALCA (ml L <sup>-1</sup> ) |                            |                           |                            |
|-----------------|-----------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|
|                 | 0                           | 20                         | 40                        | 60                         |
| 0               | 0,250 ± 0,00 <sup>a</sup>   | 0,250 ± 0,00 <sup>a</sup>  | 0,250 ± 0,00 <sup>a</sup> | 0,250 ± 0,00 <sup>a</sup>  |
| 1               | 2,407 ± 0,14 <sup>ab</sup>  | 2,300 ± 0,06 <sup>ab</sup> | 2,707 ± 0,30 <sup>a</sup> | 1,833 ± 0,29 <sup>b</sup>  |
| 2               | 2,960 ± 0,26 <sup>ab</sup>  | 2,500 ± 0,05 <sup>c</sup>  | 3,287 ± 0,06 <sup>a</sup> | 2,573 ± 0,18 <sup>bc</sup> |
| 3               | 3,807 ± 0,34 <sup>a</sup>   | 3,827 ± 0,23 <sup>a</sup>  | 4,500 ± 0,56 <sup>a</sup> | 3,700 ± 0,41 <sup>a</sup>  |
| 4               | 4,287 ± 0,42 <sup>a</sup>   | 4,333 ± 0,25 <sup>a</sup>  | 5,053 ± 0,67 <sup>a</sup> | 4,040 ± 0,20 <sup>a</sup>  |
| 5               | 4,527 ± 0,48 <sup>a</sup>   | 5,220 ± 0,09 <sup>ab</sup> | 5,740 ± 0,25 <sup>b</sup> | 4,893 ± 0,38 <sup>ab</sup> |
| 6               | 4,787 ± 0,26 <sup>a</sup>   | 6,280 ± 0,08 <sup>b</sup>  | 6,413 ± 0,14 <sup>b</sup> | 5,520 ± 0,75 <sup>ab</sup> |
| 7               | 4,740 ± 0,22 <sup>a</sup>   | 6,360 ± 0,79 <sup>b</sup>  | 7,200 ± 0,47 <sup>b</sup> | 6,280 ± 0,24 <sup>b</sup>  |
| 8               | 4,650 ± 0,29 <sup>a</sup>   | 6,140 ± 0,15 <sup>b</sup>  | 7,300 ± 0,37 <sup>b</sup> | 6,880 ± 0,75 <sup>b</sup>  |
| 9               | 4,353 ± 0,46 <sup>a</sup>   | 5,973 ± 0,13 <sup>b</sup>  | 6,353 ± 0,18 <sup>b</sup> | 6,217 ± 0,26 <sup>b</sup>  |
| 10              | 4,127 ± 0,34 <sup>a</sup>   | 5,310 ± 0,19 <sup>b</sup>  | 5,887 ± 0,07 <sup>c</sup> | 5,420 ± 0,18 <sup>bc</sup> |



**Fig.6.** Crecimiento poblacional ( $\times 10^5$  cel.mL<sup>-1</sup>) de *D. salina* en los cultivos dosificados con EALCA.

Los cultivos con *D. salina* se iniciaron con poblacionales promedio significativamente similares ( $p > 0,05$ ) de  $2,5 \times 10^5$  cel.mL<sup>-1</sup>, observándose incrementos similares durante los días 1, 2, 3 y 4, para recién presentar diferencias en los días 5 y 6 (tabla 5, fig.6). En el día 6, los cultivos dosificados con EALCA presentaron crecimientos poblacionales significativamente diferentes mostrándose más altos que los controles; cuyo valores son 6,280; 6,413 y  $5,520 \times 10^5$  cel.mL<sup>-1</sup> para los tratamientos con 20; 40 y 60 mL.L<sup>-1</sup> de EALCA y  $4,787 \times 10^5$  cel.mL<sup>-1</sup> para el control, respectivamente.

Asimismo, los valores más altos fueron observados en los días 7 y 8, en los cultivos dosificados con 40 mL.L<sup>-1</sup> de EALCA ( $7,20$  y  $7,30 \times 10^5$  cel.mL<sup>-1</sup> respectivamente); seguido de los dosificados con 20 y 60 mL.L<sup>-1</sup> de EALCA ( $6,360$ ,  $6,140$  y  $6,280$ ,  $6,880 \times 10^5$  cél.mL<sup>-1</sup>, respectivamente), y de los controles ( $4,74$  y  $4,65 \times 10^5$  cél.mL<sup>-1</sup>).

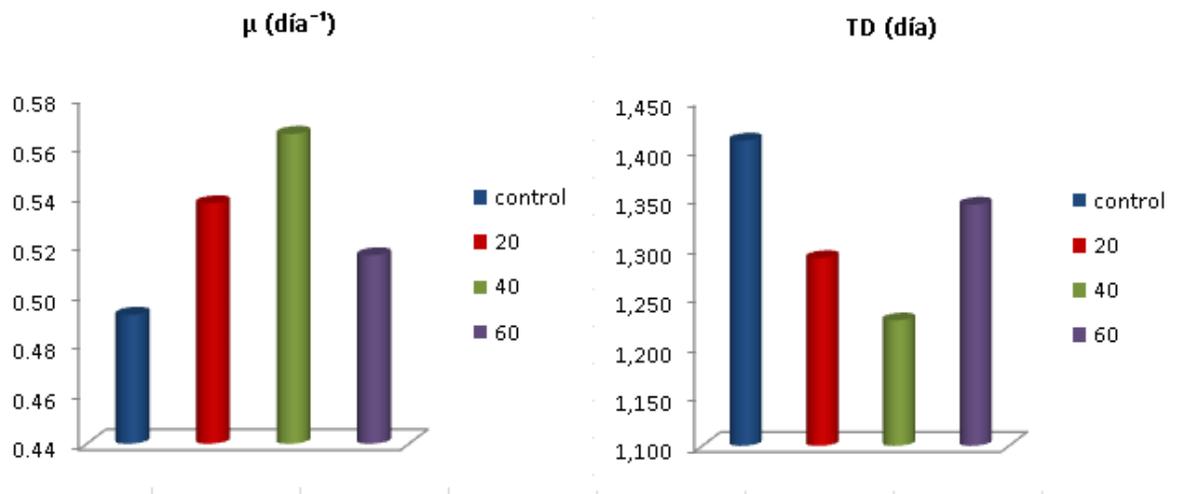
Todos los cultivos presentan la característica curva de crecimiento en la que los valores más altos de la fase logarítmica corresponden a los dosificados con EALCA, iniciándose la declinación a partir del día 9 con valores de  $4,353$ ;  $5,973$ ;  $6,353$  y  $6,217 \times 10^5$  cel.mL<sup>-1</sup>, para el control y los dosificados con 20; 40 y 60 mL.L<sup>-1</sup> de EALCA, respectivamente.

### **3.2.2. Tasa de crecimiento poblacional de *D. salina***

Considerando que la fase logarítmica del crecimiento en los controles se logró el día 6, se determinó el valor de la tasa de crecimiento ( $\mu$ ) de los cultivos dosificados con EALCA (tabla 6) a fin de evaluarlos comparativamente. Los cultivos dosificados con 40 mL.L<sup>-1</sup> de EALCA presentaron los valores más altos ( $0,565$  día<sup>-1</sup>) seguido de los dosificados con 20 ( $0,537$  día<sup>-1</sup>), 60 ( $0,516$  día<sup>-1</sup>) mL.L<sup>-1</sup> de EALCA y el grupo control ( $0,492$  día<sup>-1</sup>); asimismo el mayor tiempo de duplicación diaria (TD) correspondió al grupo control ( $1,409$  día) seguido de los dosificados con 60 ( $1,344$  día), 20 ( $1,290$  día) y 40 ( $1,227$  día) mL.L<sup>-1</sup> de EALCA.

**Tabla 6.** Tasa de Crecimiento por día ( $\mu$ ) y Tiempo de Duplicación Diaria (TD) de los cultivos de *D. salina* dosificados con EALCA durante el día 6.

| Parámetro                  | EALCA (ml.L <sup>-1</sup> ) |        |        |        |
|----------------------------|-----------------------------|--------|--------|--------|
|                            | 0                           | 20     | 40     | 60     |
| N <sub>i</sub>             | 25000                       | 25000  | 25000  | 25000  |
| N <sub>f</sub>             | 478666                      | 628000 | 741300 | 552000 |
| $\Delta t$ (días)          | 6                           | 6      | 6      | 6      |
| $\mu$ (día <sup>-1</sup> ) | 0.492                       | 0.537  | 0.565  | 0.516  |
| TD (día)                   | 1.409                       | 1.290  | 1.227  | 1.344  |

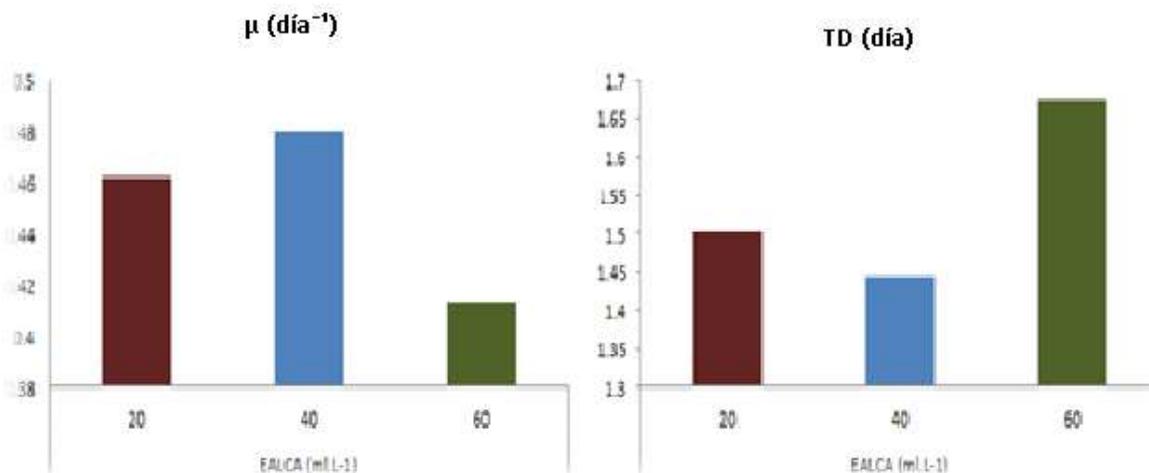


**Fig. 7.** Tasa de crecimiento ( $\mu$ ) y Tiempo de duplicación diaria (TD) de los cultivos de *D. salina* dosificados con EALCA hasta el día 6.

Los cultivos dosificados con EALCA continuaron creciendo hasta alcanzar sus máximas densidades poblacionales en días diferentes, por lo que los valores de  $\mu$  y TD mostraron diferencias significativas, obteniéndose mayores valores de  $\mu$  en los cultivos dosificados con 40 ml.L<sup>-1</sup> (0,480 día<sup>-1</sup>) seguido de los de 20 (0,462 día<sup>-1</sup>) y de 60 (0,414 día<sup>-1</sup>) ml.L<sup>-1</sup> (tabla 7 y fig. 8). En relación al TD, el mayor valor significativo ( $p < 0,05$ ) fue el tratamiento dosificado con 60 ml.L<sup>-1</sup> de EALCA (1,676 día); seguido de los tratamientos dosificados con 20 (1,503 día) y 40 (1,445 día) ml.L<sup>-1</sup> de EALCA.

**Tabla 7.** Tasa de Crecimiento por día ( $\mu$ ) y Tiempo de Duplicación Diaria (TD) de los cultivos de *D. salina* dosificados con EALCA en relación a los días que alcanzaron su mayor crecimiento.

| Parámetro                  | EALCA (ml.L <sup>-1</sup> ) |        |        |
|----------------------------|-----------------------------|--------|--------|
|                            | 20                          | 40     | 60     |
| N <sub>i</sub>             | 25000                       | 25000  | 25000  |
| N <sub>f</sub>             | 636000                      | 720000 | 688000 |
| $\Delta t$ (días)          | 7                           | 7      | 8      |
| $\mu$ (día <sup>-1</sup> ) | 0.462                       | 0.480  | 0.414  |
| TD (día)                   | 1.503                       | 1.445  | 1.676  |



**Fig. 8.** Tasa de crecimiento ( $\mu$ ) y Tiempo de duplicación diaria (TD) de los cultivos de *D. salina* dosificados con EALCA en días diferentes.

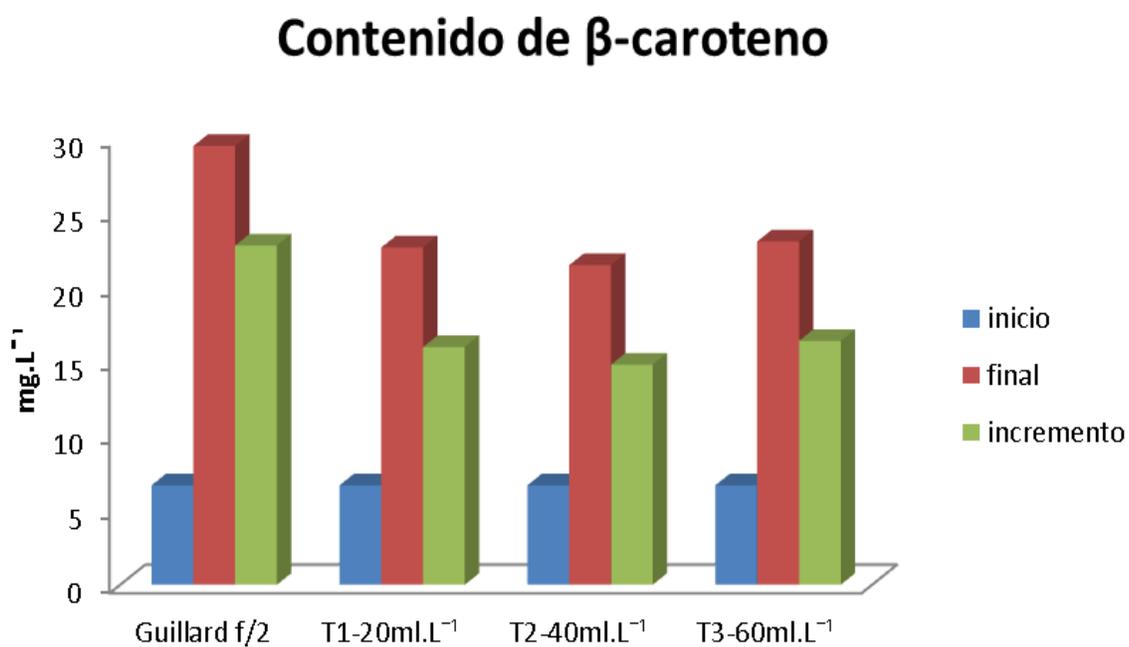
### 3.2.3. Contenido de $\beta$ -caroteno en *D. salina*

Para determinar  $\beta$ -caroteno de *D. salina* se realizaron determinaciones fotocolorimétricas al inicio y final de los ensayos.

Para los incrementos de  $\beta$ -caroteno, expresados en mg.L<sup>-1</sup>, revelan menor incremento en los cultivos dosificados con EALCA en relación a los controles con valores de 22.67; 21.48; 23.074 y 29.487 correspondiendo a los dosificados con 20, 40 y 60 ml.L<sup>-1</sup> de EALCA y los controles, respectivamente; (tabla 8 y Fig.9).

**Tabla 8.** Contenido e incremento de  $\beta$ -caroteno de los cultivos de *D. salina* dosificados con EALCA.

| $\beta$ - caroteno (mg.L <sup>-1</sup> ) | EALCA (ml.L <sup>-1</sup> ) |        |        |        |
|--|-----------------------------|--------|--------|--------|
|  | 0                           | 20     | 40     | 60     |
| Inicio                                   | 6.686                       | 6.686  | 6.686  | 6.686  |
| Final                                    | 29.487                      | 22.67  | 21.48  | 23.074 |
| Incremento                               | 22.801                      | 15.984 | 14.794 | 16.388 |



**Fig.9.** Contenido e incremento de  $\beta$ -caroteno (mg.L<sup>-1</sup>) de los cultivos de *D. salina* dosificados con EALCA.

## VI. DISCUSIÓN

El empleo de sedimentos (lodos), residuos provenientes de la actividad maricultural (cultivo de *Argopecten purpuratus*) para emplearlos en los cultivos de microalgas abre las posibilidades de incorporar diversos elementos químicos (potasio, hierro, fósforo, nitrógeno, etc.) como nutrientes en los cultivos algales y reemplazar a aquellos medios de cultivos formulados con sustancias químicas de altos costos (Paniagua *et al.*, 1989). De acuerdo a Thain (1992) es posible el uso de sedimentos en la preparación económica de medios de cultivo con un previo tratamiento térmico o químico que evite la presencia de microorganismos patógenos; demostrándose así la capacidad de las algas para aprovechar dichos nutrientes cuya ventaja adicional lograra controlar el gradual y paulatino deterioro de los ambientes acuáticos marinos.

Según Limón (2013) asegura que los lodos, también pueden ser utilizados como mejoradores de suelo en la agricultura ya que estos mejoran las características del suelo y proveen nutrientes esenciales para el crecimiento vegetal como nitrógeno, fósforo, níquel, zinc, cobre entre otros, debido a sus ventajas, pueden utilizarse como sustituto de fertilizantes químicos, basada en esta información se mandó analizar la composición química del EALCA, encontrándose nitrógeno N<sub>2</sub> (0.01%), potasio (54,82 mg.L<sup>-1</sup>), fosforo (0,034 mg.L<sup>-1</sup>) y hierro (0,134 mg.L<sup>-1</sup>) propiciando esto las condiciones para el crecimiento de *D. salina*.

La presencia de nitrógeno y potasio en el EALCA (tabla 2) como resultado de la actividad de microbiana, relacionada con la descomposición de residuos orgánicos provenientes de distintas fuentes (Sylvia *et.al.*, 1998) son susceptibles de ser utilizada por bacterias aerobias, anaerobias y algas para su crecimiento (Chung, 2008). Asimismo Alef (1995) indica que la actividad metabólica que realizan los microorganismos en cualquier proceso de descomposición puede ser cuantificada por medición de la producción de CO<sub>2</sub> o por el consumo de O<sub>2</sub>.

Siendo *D. salina* una microalga halotolerante caracterizada por soportar altas temperaturas las cuales oscilan entre 20 y 40 °C e intensidades de luz y siendo una fuente muy rica en  $\beta$ -caroteno y glicerol (Oren, 2005), en nuestro trabajo de investigación la temperatura promedio fue 26.51 °C, encentrándose en un rango adecuado, considerado como óptimo para el crecimiento algal (García *et al.*, 2000; Dipak & Lee, 2004), de esta manera se demuestra que la temperatura no ha influido en la dinámica del crecimiento algal así como el pH, que se mantuvo dentro de los índices normales de 5,5 a 10 según Sánchez (2003).

El crecimiento poblacional de los cultivos algales siguen un patrón estándar que comprende diversas fases, tales como las de inducción o lag, exponencial, declinación relativa, estacionaria y de muerte (Sánchez, 2003), en nuestros ensayos, todos los cultivos no mostraron una marcada fase log debido al adecuado tamaño de inóculo utilizado procedente de cultivos creciendo vigorosamente en fase logarítmica Merino (2003).

En tal sentido, el crecimiento de los cultivos dosificados con EALCA fueron mayores a los controles debido a la presencia de nutrientes orgánicos siendo más altos en los de 40 y 20 ml.l<sup>-1</sup> de EALCA en el día 7 (7,200 y 6,360 cél. ml<sup>-1</sup>, respectivamente), seguidos de los dosificados con 60 ml.l<sup>-1</sup> de EALCA, cuyo valor más alto se obtuvo en el día 8 (6,880 cél.ml<sup>-1</sup>), los cultivos controles, presentaron mayor crecimiento el día 6 (4787 cél. ml<sup>-1</sup>), debido al agotamiento de sus nutrientes, iniciándose una relativa larga fase estacionaria de crecimiento (fig. 6).

En cuanto al menor tiempo en que llegan a la fase estacionaria los cultivos controles se debe al agotamiento de los nutrientes, mientras que, pese al menor contenido de nitrógeno de los cultivos dosificados con EALCA, sus fases de crecimiento logarítmicos duran más, al parecer, por la presencia de sustancias orgánicas derivadas de la actividad bacteriana y disueltas en el solución acuosa del EALCA, estos resultados pueden relacionarse con lo manifestado por Alvares (2009): si se cultivan microalgas con un medio orgánico es probable la presencia de nitrógeno amoniacal y

orgánico (aminoácidos) ya que la degradación de proteínas produce estos compuestos, y el nitrógeno orgánico es más aprovechable que el inorgánico.

Comparativamente, el crecimiento de *D. salina* en medio de inorgánico (Johnson) y orgánico (agua residual pesquero), Suarez (1999), obtuvo la misma población algal ( $100 \times 10^6$  cel.ml<sup>-1</sup>) en menor tiempo (19 días) en este medio que en aquellos (27 días).

Considerando el día 6 como la parte final del crecimiento logarítmico de los controles, todos los cultivos dosificados con EALCA (tabla 6) presentan mayores tasas de crecimiento, siendo el de 40 ml L<sup>-1</sup> el mejor (0,565) como resultado de su mejor contenido y balance de nutrientes, asimismo, presentan los menores tiempos de duplicación (1,227); sin embargo, cuando se comparan los días en que alcanzan los valores más altos de la fase logarítmica (tabla 7), los dosificados con 20 y 40 ml L<sup>-1</sup> del EALCA lo hacen en el día 7 y los de 60 ml L<sup>-1</sup> el día 8, siendo mayores los dosificados con 40 ml L<sup>-1</sup> de EALCA (0,480) que los de 20 y 60 ml L<sup>-1</sup> de EALCA (0,462 y 0,414, respectivamente).

Estos resultados demuestran el aprovechamiento eficiente de los nutrientes, orgánicos, presentes en el EALCA en la que el nitrógeno y otros nutrientes brindan un buen crecimiento poblacional a *D. salina*.

Se conoce que el contenido de pigmentos algales está influenciado por el contenido de nitrógeno siendo más altos en aquellos cultivos creciendo en condiciones autotróficas por cuanto los pigmentos son considerados almacén del nitrógeno (Merino, 2003).

Los cultivos iniciales mostraron igual contenido de  $\beta$ -caroteno progresivamente al pasar los días estos fueron adquiriendo una coloración verde amarillenta en aquellos dosificados con EALCA como consecuencia de la disminución de nitrógeno (tabla 8); es por ello posible que la dosificación del EALCA también implique estrés para

algas motivando esto a su cambio de coloración, influyendo esto en el metabolismo de los lípidos, asimismo, existen varios estímulos que influyen en la composición química de las algas, siendo los principales la deficiencia de nutrientes (nitrógeno, fósforo, azufre y silicio), la salinidad y el pH de los cultivos; por otro lado, es posible que el pH tenga algún efecto por cuanto, pese a la salinidad (50‰) de la suspensión algal, habiendo llegado a 9 lo cual indica mínima cantidad de  $\beta$ -caroteno (De *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2008; Mendoza *et al.*, 2008; Solovchenko *et al.*, 2008; Gouveia & Oliveira, 2009; Rodolfo *et al.*, 2009).

Los carotenoides son pigmentos accesorios que tienen la función de ayudar a la captación más eficiente de la luz, Chisti, (2007) afirma que si exponemos a una alga a una alta salinidad, alta intensidad luminosa, deficiencia de nitrógeno, temperaturas extremas y variaciones de pH estimulan una mayor producción de carotenoides, por lo que su acumulación es indicativa de un cierto grado de estrés provocado, asimismo estas sustancias en las algas son proporcionales a la intensidad del estrés provocado.

De acuerdo a Sánchez (2003), la acumulación de carotenos se produce en el espacio intratilacoidal en pequeños glóbulos lipídicos y su color marrón se enmascara por la mayor cantidad de la clorofila a, sin embargo, pese a la mayor acumulación de ambos pigmentos (clorofila a y  $\beta$ -caroteno) en los cultivos controles, aquellos dosificados con EALCA presentan menores proporciones de acumulación de  $\beta$ -caroteno, es decir, *D. salina* direcciona más eficientemente los nutrientes a la acumulación de  $\beta$ -caroteno. Esto es muy importante por cuanto la interferencia que puedas causar el contenido de clorofila será menor durante la extracción de  $\beta$ -caroteno. Obviamente, los cultivos controles por el mayor contenido de clorofila a serán más verdes mientras que los dosificados con EALCA, por el contenido de lípidos y triglicéridos y menores contenidos de pigmentos serán verdeamarillentos, color característico de los cultivos algales creciendo en menores cantidades de nitrógeno (García, 2005) (tabla 10).

## V. CONCLUSIONES

- Los mayores valores de la tasa de crecimiento ( $\mu$ ) se presentaron en el día 6 en los tratamientos dosificados con 40 y 20 ml.L<sup>-1</sup> de EALCA con 0,565 y 0,537 día<sup>-1</sup> respectivamente, mientras que el menor se observó en el tratamiento control con 0.492 día<sup>-1</sup>.
- El menor tiempo de duplicación diaria (TD) se obtuvo al sexto día en tratamientos dosificados con 40 y 20 ml.L<sup>-1</sup> de EALCA con 1,227 y 1,290 día<sup>-1</sup>, mientras mejores se obtuvieron con los controles suministrados con Guillard f/2 con 1,409 día<sup>-1</sup>
- La mayor cantidad de  $\beta$ -caroteno se determinó en el cultivo control con un valor de 29.487 mg.L<sup>-1</sup>; mientras que los dosificados con 20, 40 y 60 ml.L<sup>-1</sup> de EALCA alcanzaron menores cantidades como 22.67, 21.48, 23.074 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente.
- La temperatura y el pH no influyen en el crecimiento de *D. salina* ya que se encontraban en sus rangos adecuados de 26.20 a 26.63 °C y 7.50 a 9.57.

## VI. RECOMENDACIONES

- ✓ Realizar experimentos en cultivos de *D. salina* utilizando EALCA y realizando un profundo estudio en la composición química de este medio a fin de especificar con precisión el componente químico que favorece su crecimiento y contenido de  $\beta$ -caroteno.
- ✓ Realizar cultivos microalgales de *D. salina* utilizando dosificaciones diarias de EALCA para observar cómo es su crecimiento con esta manera de alimentación.
- ✓ Determinar la composición de otros pigmentos mediante técnicas de HPLC a fin de precisar las concentraciones relativas de cada una de ellas-
- ✓ Realizar el mismo trabajo, pero obtener lípidos en vez de  $\beta$ -caroteno ya que nuestro trabajo parece no tener este pigmento si no parece que tener lípidos por su color y por los resultados.
- ✓ Tener un perfil bioquímico de la cantidad de proteínas carbohidratos nuestro medio de cultivo a utilizar.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abalde, J. & C., Herrero. 2004. Microalgas en Acuicultura: calidad nutricional. *Algas* 32:16-18 (APM, Aplicación)
- Alcedo, N. & F. Merino. 2010. Experiencias a nivel de laboratorio, cultivando *Tetraselmis suecica* con Extracto acuoso de lodo (EAL) de la bahía “El Ferrol” como medio de cultivo para la obtención de un mayor crecimiento.
- Alef K. 1995. Soil respiration. In: Alef K, Nannipieri P (eds). *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. Academic Press Limited, San Diego, USA, Pp 214-218.
- Álvarez, J.; Huamancóndor Y.; Meza J.; Pérez A.; Mendoza S.; Pérez L. & C. Rodríguez. 2009. Efecto del ensilado de los desechos blandos de *Argopecten purpuratus* “concha de abanico” en el crecimiento poblacional de *Tetraselmis suecica* en condiciones de laboratorio. X Congreso Nacional de Estudiantes de Biología – VII Congreso Internacional de estudiantes de Ciencias Biológicas. 14 pp.
- Andrade, M. & M. Montero. 2000. Contenido, evolución de nutrientes y productividad en un suelo tratado con lodos residuales urbanos. *Edafología*. 7(3) 21-29.
- Bermúdez, J.; Sánchez G.; Fuenmayor G. & E. Morales. 2003. Efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento y producción de pigmentos de la microalga marina *Chroomonas* sp. *Ciencia*. 11(4). 265–269 pp.
- Borowitzka, M. & J. Borowitzka. 1998. Dunalliella en: *Micro-algal Biotechnology*. Edición M. A. Borowitzka y L. J. Borowitzka Cambridge University Press. Gran Bretaña, p. 27-58.
- Cano, J. & J. Pisfil. 2007. Cultivo de *Tetraselmis suecica* utilizando CO<sup>2</sup> obtenido a partir

- de valvas de *Argopecten purpuratus* en condiciones de laboratorio. En libro de resúmenes V congreso Nacional de estudiantes de ciencias biológicas. VIII congreso nacional de estudiantes de biología. Tacna- Perú.
- Cañavate, J. 2009. Una visión integrada sobre el cultivo de microalgas para la producción de biocombustibles. IFAPA Centro el Toruño. Instituto de investigación y formación agraria, pesquera y de la producción ecológica. Puerto Santa María Cádiz. España. 4pp.
- Capa, W. 2010. Biología y biotecnología de microalgas. Edit. CONCYTEC. Chimbote – Perú.
- Capa W. 2000. Efecto de la salinidad y concentración de harina de pescado en el crecimiento de *Dunaliella salina* (Volvocales, Chlorophyta) en laboratorio. Tesis. Universidad Nacional del Santa. Chimbote – Perú.
- Cifuentes, A. & M. Zuñiga. 1996. Cultivo de cepas de *Dunaliella salina* (Teodoresco 1905) en diferentes medios bajo condiciones de laboratorio. Rev. Chilena Historia Natural 69:105-112.
- Chung, B. 2008. Control de los contaminantes químicos en el Perú. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica. vol.25 no.4 Lima.
- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. Biotechnol Adv 25(3):294-306.
- De, B.K., Chaudhury, S., Bhattacharyya, D.K. 1999. Effect of nitrogen sources on  $\gamma$ -linoleic acid accumulation in *Spirulina platensis*. JAOCS 76(1):156.
- Dipak, S. & S. Lee. 2004. Carotenoids production from microalga, *Dunaliella salina*. *Indian Journal of Biotechnology*. Vol. 4. 476–483 pp.
- Dominic, V. & M. Nisha. 2009. Eficiencia biorremediación de tres algas. *Chlorella*

*vulgaris*, *Synechocystis* y *Gloeocapsa*. Revisión académica 16 (1-2): 138-146 pp.

Douskova, I. & V. Zachleder. 2010. La utilización de la vinaza de destilería para la generación de energía y la producción simultánea de valiosa biomasa de microalgas en la secuencia: biogás productos de microalgas de cogeneración. Conversión de energía y la gestión. 51:606-611.

Fernández, M. & C. Paredes. 2006. 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.

García, M.; Manzano J.; Moreno J. & M. Guerrero. 2000. Biotecnología del cultivo de *Dunaliella salina* en el litoral andaluz. *Spain: Pesca y Acuicultura, Consejería de Agricultura y Pesca*. 163 pp.

García, M.; Cañavate P.; Angis V.; Prieto A. & C. Manzano. 2005. Desarrollo y evaluación de la producción de  $\beta$ -caroteno por *Dunaliella salina* en la bahía de Cádiz. *Libro de Actas del IX Congreso Nacional de Acuicultura*. 347–352 pp.

Gouveia, L., Oliveira, A.C. 2009. Microalgae as a raw material for biodiesel production. *J Ind Microbiol Biotechnol* 36(2):269-274.

Guillard, R. 1973. Division Rates. *In: J. R. Stein (ed). Handbook of phycological methods and grow measurement*. Cambridge University Press. London. 290–311 pp.

Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, Darzins, A.I. 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstock for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J* 54(4):621-639.

Ipanaque, 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 profesional. Universidad nacional del santa. Nuevo Chimbote – Perú. 65p.

Limón, J. 2013. Lodos de las plantas de tratamiento de aguas residuales. Ingeniería química. Guadalajara, Jalisco.

Li, Q., Du, W., Liu, D. 2008a. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. Appl Microbial Biotechnol 80:749-756.

Masuda, T. 2002. Biosynthesis and Distribution of Chlorophyll among the Photosystems during Recovery of the Green Alga *Dunaliella salina* from Irradiance Stress. Department of Plant and Microbial Biology, University of California, Berkeley, California.

Merino, F. & L. Encomendero. 2012. Producción de microalgas usando subproductos mariculturales. Revista oficial de la Universidad Privada Antenor Orrego. Vol. 23. N° 2. Trujillo- Perú. 399p.

Merino F. 2003. Cultivo masivo de microalgas de agua salada en laboratorio. Informe de actividad realizada durante año sabático UNS.

Mogedas, B.; Salguero A.; Casal C. & C. Vílchez. 2006. Estimulación de la producción de carotenoides de *Dunaliella bardawil* por radiaciones UV-A en un fotobiorreactor de lecho fluidizado por aire. Congreso Interamericano Virtual de Acuicultura – CIVA. 647–654 pp.

Olguín, E.J., Galicia, S., Angulo-Guerrero, O., Hernández, E. 2003. The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina* sp. (*Arthrospira*) grown on digested pig waste. Bioresource Technol 77(1):19-24.

- Oren, A. 2005. A hundred years of *Dunaliella* research: 1905–2005. *Saline Systems*. 1 (2). 14 pp.
- 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.
- Rema, P. & L. Gouveia. 2005. Effect of Various Sources of Carotenoids on Survival and Growth of Goldfish (*Carassius auratus*) Larvae and Juveniles. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 4 (7). 654–658 pp.
- Rodolfo, L., Zitelli, G.C., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., Tredici, M.R. 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.
- Sánchez, J. 2003. Biotecnología de microalgas. Laboratorio de microbiología ambiental y tratamiento de aguas residuales. Departamento de biotecnología.
- Serpa, I. & A. Calderón. 2006. Efecto del estrés por salinidad en cuatro cepas de *Dunaliella salina* Teod. En el Perú. *Ecología Aplicada*. 4 (1,2). 127–133 pp.
- Suárez, G.; López T. & A. Borowitzka. 1999. Cultivo de *D. salina* en medio orgánico. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas*. 33 (3). 11–225 pp.
- Steel, R. & J. Torre. 1992. Bioestadística principios y procedimientos. Editorial Graf América. México 622p.
- Sylvia D, J Fuhrmann, P Hartel, D Zuberer. 1998. *Principles and applications of soil microbiology*. Prentice Hall Inc., New Jersey, USA.

Solovchenko, A. 2008. Effects of light intensity and nitrogen starvation on growth, total fatty acids and arachidonic acid in the green microalga *Parachlorella kuetzingii*. *J Appl Phycol* 20(3): 245-251

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.

## VIII. ANEXOS

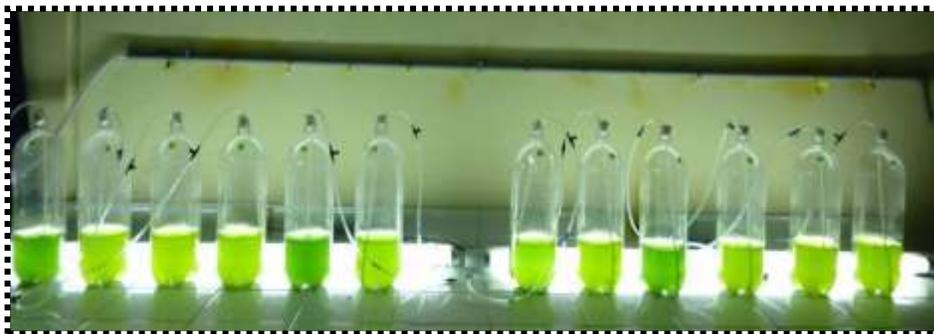
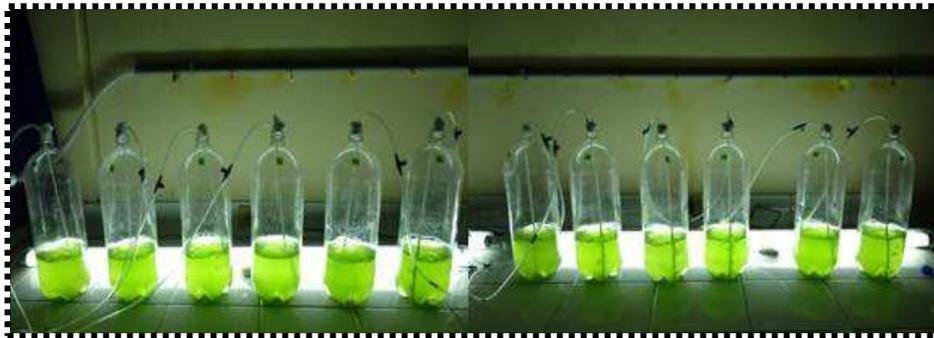
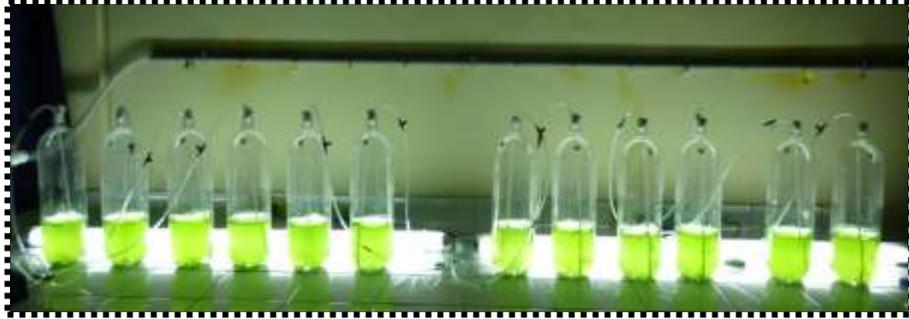
**Anexo 1:** Toma de muestra del Humedal de Villamaría.

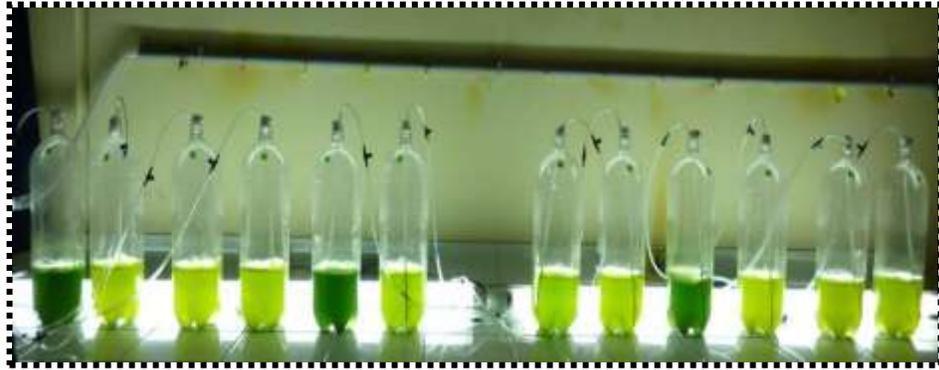


**Anexo 2:** Adaptación de *D. salina* y obtención del inóculo para el cultivo.



**Anexo 3:** Instalación del diseño experimental y seguimiento del cultivo



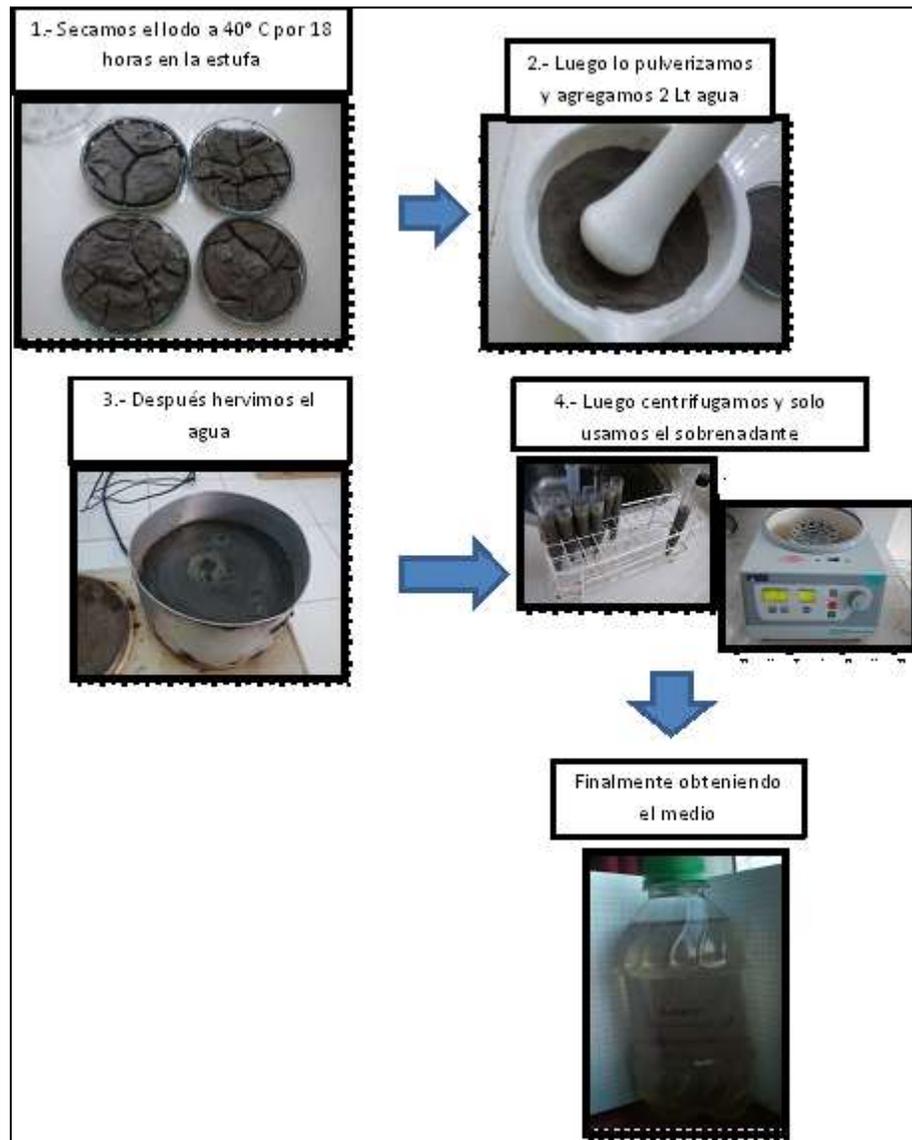


**Anexo 4:** Células de *D. salina* observadas a 20X.



**Anexo 5:** Realización del proceso para obtener el medio EALCA para el cultivo de

*D. salina.*



**Anexo 6:** Realización del proceso de obtención de los pigmentos y carotenos del cultivo de *D. salina*.

Se extrajo 5 ml de muestra de cada tratamiento



se botó el sobrenadante y quedando solo el sedimento se agregó 3ml de acetona al 90%



Se diluyó el sedimento y se volvió a centrifugar, luego se extrajo el sobrenadante y se leyó al espectrofotómetro



**Anexo 7:** Matriz de los promedios para el control de pH de los 10 día de cultivo de

*D. salina.*

|           | <b>TC</b> | <b>T1</b> | <b>T2</b> | <b>T3</b> |
|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <b>0</b>  | 7.50      | 7.50      | 7.50      | 7.50      |
| <b>1</b>  | 7.71      | 7.72      | 7.92      | 8.11      |
| <b>2</b>  | 8.23      | 8.27      | 8.41      | 8.55      |
| <b>3</b>  | 8.56      | 8.66      | 8.65      | 8.57      |
| <b>4</b>  | 8.70      | 8.83      | 8.76      | 8.78      |
| <b>5</b>  | 8.82      | 9.23      | 9.34      | 8.89      |
| <b>6</b>  | 9.02      | 9.47      | 9.31      | 9.18      |
| <b>7</b>  | 9.11      | 9.49      | 9.38      | 9.18      |
| <b>8</b>  | 8.99      | 9.48      | 9.23      | 9.29      |
| <b>9</b>  | 9.05      | 9.29      | 9.57      | 9.28      |
| <b>10</b> | 8.92      | 8.98      | 9.32      | 9.02      |

**Anexo 8:** Matriz de los promedios para el control de temperaturas (° C) de los  
10 días de cultivo de *D. salina*.

|           | <b>TC</b> | <b>T1</b> | <b>T2</b> | <b>T3</b> |
|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <b>0</b>  | 26.20     | 26.20     | 26.20     | 26.20     |
| <b>1</b>  | 26.25     | 26.29     | 26.33     | 26.32     |
| <b>2</b>  | 26.40     | 26.48     | 26.56     | 26.50     |
| <b>3</b>  | 26.55     | 26.52     | 26.59     | 26.61     |
| <b>4</b>  | 26.57     | 26.50     | 26.58     | 26.56     |
| <b>5</b>  | 26.55     | 26.54     | 26.62     | 26.60     |
| <b>6</b>  | 26.56     | 26.57     | 26.62     | 26.58     |
| <b>7</b>  | 26.57     | 26.58     | 26.63     | 26.59     |
| <b>8</b>  | 26.54     | 26.59     | 26.62     | 26.60     |
| <b>9</b>  | 26.54     | 26.59     | 26.62     | 26.62     |
| <b>10</b> | 26.56     | 26.58     | 26.63     | 26.61     |

**Anexo 9:** Matriz de los promedios para el conteo celular (cel.mE<sup>1</sup>) de *D. salina*, en los 10 días de cultivo.

|           | <b>TC</b> | <b>T1</b> | <b>T2</b> | <b>T3</b> |
|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <b>0</b>  | 25000     | 25000     | 25000     | 25000     |
| <b>1</b>  | 240666    | 230000    | 270666    | 183333    |
| <b>2</b>  | 296000    | 250000    | 328666    | 257333    |
| <b>3</b>  | 380666    | 382666    | 450000    | 370000    |
| <b>4</b>  | 428666    | 433333    | 505333    | 404000    |
| <b>5</b>  | 452666    | 522000    | 574000    | 489333    |
| <b>6</b>  | 478666    | 628000    | 641333    | 552000    |
| <b>7</b>  | 474000    | 636000    | 720000    | 628000    |
| <b>8</b>  | 465000    | 614000    | 730000    | 688000    |
| <b>9</b>  | 435333    | 597333    | 635333    | 621666    |
| <b>10</b> | 412666    | 531000    | 588666    | 542000    |

**Anexo 10:** Matriz de los pigmentos y carotenos para el primer y último día de cultivo de *D. salina*.

| <b>Tratamientos</b> | <b>470 nm</b> | <b>647 nm</b> | <b>663 nm</b> | <b>Clorofila a (%)</b> | <b>Carotenos totales (ug/ml)</b> | <b>% B-car/cel</b> | <b>B-carot(pg/cel)</b> | <b>B-carot(mg/L)</b> |
|---------------------|---------------|---------------|---------------|------------------------|----------------------------------|--------------------|------------------------|----------------------|
| <b>Inicio 1</b>     | 0.528         | 0.238         | 0.381         | 20.09                  | 7.02                             | 0.000119579        | 0.000280771            | 0.007019264          |
| <b>Inicio 2</b>     | 0.478         | 0.197         | 0.345         | 18.44                  | 6.35                             | 0.000108223        | 0.000254107            | 0.006352666          |
| <b>TcR1</b>         | 2.357         | 0.964         | 1.710         | 91.58                  | 31.32                            | 2.95111E-05        | 6.92921E-05            | 0.031320029          |
| <b>TcR2</b>         | 2.369         | 0.895         | 1.659         | 89.40                  | 31.50                            | 3.39627E-05        | 7.97443E-05            | 0.031499018          |
| <b>TcR3</b>         | 1.932         | 0.723         | 1.456         | 79.31                  | 25.64                            | 2.79296E-05        | 6.55787E-05            | 0.02564128           |
| <b>T1R1</b>         | 1.751         | 0.266         | 0.650         | 36.18                  | 23.50                            | 1.81332E-05        | 4.25768E-05            | 0.023502371          |
| <b>T1R2</b>         | 1.742         | 0.257         | 0.631         | 35.14                  | 23.39                            | 1.89729E-05        | 4.45483E-05            | 0.023387876          |
| <b>T1R3</b>         | 1.571         | 0.197         | 0.503         | 28.12                  | 21.12                            | 1.74306E-05        | 4.09271E-05            | 0.021118393          |
| <b>T2R1</b>         | 1.618         | 0.294         | 0.543         | 29.25                  | 21.75                            | 1.56990E-05        | 3.68612E-05            | 0.021748098          |
| <b>T2R2</b>         | 1.642         | 0.291         | 0.697         | 38.72                  | 22.00                            | 1.61298E-05        | 3.78727E-05            | 0.022004017          |
| <b>T2R3</b>         | 1.539         | 0.200         | 0.493         | 27.47                  | 20.69                            | 1.48088E-05        | 3.47711E-05            | 0.020688824          |
| <b>T3R1</b>         | 1.655         | 0.251         | 0.609         | 33.88                  | 22.22                            | 1.68359E-05        | 3.95306E-05            | 0.022216215          |
| <b>T3R2</b>         | 1.702         | 0.245         | 0.604         | 33.65                  | 22.86                            | 1.81608E-05        | 4.26416E-05            | 0.022855879          |
| <b>T3R3</b>         | 1.798         | 0.257         | 0.626         | 34.83                  | 24.15                            | 1.94801E-05        | 4.57392E-05            | 0.024150316          |

**Anexo 11:** Contenido de clorofila a, carotenos totales y  $\beta$ -carotenos para el primer y último día de cultivo de *D. salina*.

| Parámetros                                    | EALCA (ml.L <sup>-1</sup> ) |       |       |       |
|---|-----------------------------|-------|-------|-------|
|   | 0                           | 20    | 40    | 60    |
| <b>Clorofila a (%)</b>                        |                             |       |       |       |
| Inicio  | 19,26                       | 19,26 | 19,26 | 19,26 |
| Final   | 86,76                       | 33,15 | 31,81 | 34,12 |
| <b>Carotenos totales (ug.ml<sup>-1</sup>)</b> |                             |       |       |       |
| Inicio  | 6,69                        | 6,69  | 6,69  | 6,69  |
| Final   | 29,49                       | 22,67 | 21,48 | 23,07 |

| Parámetros  | EALCA (ml.L <sup>-1</sup> ) |           |           |           |
|---|-----------------------------|-----------|-----------|-----------|
|   | 0                           | 20        | 40        | 60        |
| <b>% <math>\beta</math>-caroteno.cel<sup>-1</sup></b>     |                             |           |           |           |
| Inicio  | 0.0001139                   | 0.0001139 | 0.0001139 | 0.0001139 |
| Final   | 0.0000305                   | 0.0000182 | 0.0000155 | 0.0000182 |
| <b><math>\beta</math>-caroteno (pg. cel<sup>-1</sup>)</b> |                             |           |           |           |
| Inicio  | 0.0002674                   | 0.0002674 | 0.0002674 | 0.0002674 |
| Final   | 0.0000715                   | 0.0000427 | 0.0000365 | 0.0000426 |
| <b><math>\beta</math>-caroteno (mg.L<sup>-1</sup>)</b>    |                             |           |           |           |
| Inicio  | 0.0066860                   | 0.0066860 | 0.0066860 | 0.0066860 |
| Final   | 0.0294868                   | 0.0226695 | 0.0214803 | 0.023041  |