

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS**

ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL BIOLOGÍA EN ACUICULTURA



“Utilización de condensados de vapores del biofouling en el crecimiento poblacional, contenido de clorofila *a* y carotenoides de *Tetraselmis suecica* en condiciones de laboratorio”.

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO ACUICULTOR

TESISTA:

Bach. Cárdenas Toribio Jeidy Beatriz

Bach. Valiente Terrones Lilibeth Liliana

ASESOR:

Dr. Merino Moya, Juan Fernando

NUEVO CHIMBOTE - PERU

2015

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



TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL
BIÓLOGO ACUICULTOR

“Utilización de condensados de vapores del biofouling en el crecimiento poblacional, contenido de clorofila *a* y carotenoides de *Tetraselmis suecica* en condiciones de laboratorio”.

REVISADO POR:

Dr. Merino Moya, Juan Fernando

Asesor

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



HOJA DE CONFORMIDAD DEL JURADO EVALUADOR

“Utilización de condensados de vapores del biofouling en el crecimiento poblacional, contenido de clorofila *a* y carotenoides de *Tetraselmis suecica* en condiciones de laboratorio”.

TESISTAS:

Bach. Cárdenas Toribio Jeidy Beatriz

Bach. Valiente Terrones Lilibeth Liliana

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

MSc. Capa Robles, Willian

Presidente

Dr. Merino Moya, Juan Fernando

Integrante

Mg. Encomendero Yépez, Eleuterio Lucio

Secretario

AGRADECIMIENTO

A Dios por darnos la vida y la salud.

A nuestros familiares por su apoyo incondicional.

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

Al MSc. Willian Capa Robles y Mg. Encomendero Yépez Lucio por brindarme su apoyo y recomendaciones.

A todos los profesores de la Escuela de Biología, por disponer de su apoyo y tiempo en la información brindada y sus enseñanzas que han contribuido con nuestra formación profesional

También agradecemos a nuestros amigos (as) que nos apoyaron en el transcurso de nuestra vida universitaria y la elaboración de esta tesis, a Evelyn Fernández, Joel Yauri Pardo

Técnicos de laboratorio: Oscar Chauca, Maribel Astete.

DEDICATORIA

Doy gracias al señor, que es digno de recibir la gloria y la honra y el poder porque sé que poniendo todo en sus manos; mis planes tendrán éxito y bendición durante toda mi vida.

A mi padres pedro valiente flores y Amidia Terrones Martos por sus apoyos incondicionales y su amor brindado durante mi desarrollo profesional.

A mis queridos hermanos: Jhonnatan, Kevin y Franchesca que siempre me alientan en mis decisiones.

A mis sobrinas que son mis princesas hermosas : Myley, Lucia y Mia que cada día me alegran la vida y mi cuñada Vanessa Alfonso y a una persona muy especial John Vázquez

Lilibeth Liliana valiente terrones.

En primer lugar doy infinitamente gracias a Dios omnipotente y todopoderoso, quien ilumina mi sendero, el que me da fortaleza para continuar esta etapa de mi vida.

Agradezco también la confianza y el apoyo brindado por parte de mi Madre Violeta, que sin duda alguna en el trayecto de mi vida me ha demostrado su amor, corrigiendo mis faltas y celebrando mis triunfos.

A mi Padre Oswaldo, que siempre lo he sentido presente en mi vida. y sé que está orgulloso de la persona en la cual me he convertido.

A mis familiares, tíos y abuelos por sus apoyos incondicionales y su amor brindado durante mi desarrollo profesional; a mi tía Martha Castillo García que siempre me brinda su apoyo y me alientan en mis decisiones.

Y a mis amigos por su apoyo, en brindarme sus mejores deseos.

Jeidy Beatriz Cárdenas Toribio.

ÍNDICE

	Páginas
AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA	ii
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
I. INTRODUCCIÓN	1
Objetivo general	4
Objetivos específicos	4
Hipótesis	4
II. MATERIALES Y MÉTODOS	5
2.1. Localización del experimento	5
2.2. Material Experimental	5
2.2.1. Purificación del aire	5
2.2.2. Tratamiento del agua de mar	6
2.2.3. Microalga <i>Tetraselmis suecica</i>	6
2.2.4. Preparación del cultivo algal (inóculo de <i>T. suecica</i>)	7
2.3. Preparación de medios de cultivo	7
2.3.1. Medio Guillard f/2	7
2.3.2. Extracción del biofouling	7
2.3.2.1. Preparación del condensado de vapores del biofouling (CVB)	8
2.3.3. Análisis químico del CVB	9
2.4. Acondicionamiento de las unidades experimentales.	9
2.5. Determinación de parámetros ambientales	9
2.6. Evaluación del crecimiento poblacional	10
2.7. Determinación de clorofila <i>a</i> y carotenos totales	10
2.8. Determinación de Biomasa	12
2.9. Análisis estadístico	12

III.	RESULTADOS	13
3.1.	Comportamiento de los parámetros de temperatura y pH de cultivo algal	13
3.1.1.	Temperatura	13
3.1.2.	pH	13
3.2.	Crecimiento poblacional <i>T. suecica</i>	14
3.2.1.	Tasa de crecimiento y tiempo de duplicación poblacional	16
3.2.2.	Contenido de Pigmentos en <i>T. suecica</i> .	17
IV.	DISCUSIÓN	21
V.	CONCLUSIONES	25
VI.	RECOMENDACIONES	26
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
VIII.	ANEXOS	33

ANEXOS

	Pag.
Anexo 1. Disposición de las unidades experimentales.	33
Anexo 2. Composición porcentual de los organismos presentes en el biofouling y peso del CVB obtenido.	33
Anexo 3. Densidad poblacional ($\times 10^6$ cél. mL^{-1}) de <i>T. suecica</i> con medio de cultivo CVB.	34
Anexo 4. Valores de la Tasa de crecimiento (μ) y Tiempo de duplicación diaria (TD) poblacional de <i>T. suecica</i> con medio de cultivo CVB.	34
Anexo 5. Valores de la biomasa, absorbancia, porcentaje y biomasa de clorofilas de <i>T. suecica</i> con medio de cultivo CVB y grupo control (Guillard f/2).	35
Anexo 6. Temperatura promedio ($^{\circ}\text{C}$) en los cultivos de <i>T. suecica</i> con medio de cultivo CVB.	36
Anexo 7. Valores de pH promedio en los cultivos de <i>T. suecica</i> con medio de cultivo CVB y grupo control (Guillard f/2).	36

INDICE DE FIGURAS

Tabla		Página
1	Sistema del “lavado del aire” inyectado a los cultivo de <i>T. Suecica</i> .	6
2	Ubicación de la extracción del biofouling del cultivo suspendido de <i>A. Purpuratus</i> .	7
3	Esquema del condensador para la obtención del medio CVB	8
4	Variación de la temperatura promedio (°C) de los cultivos de <i>T. suecica</i> dosificados con CVB.	13
5	Variación del pH promedio en los cultivos de <i>T. suecica</i> dosificados con CVB.	13
6	Crecimiento poblacional de los cultivos <i>T. suecica</i> , dosificados con diferentes concentraciones de CVB.	15
7	Variación de la tasa de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (TD) de los cultivos de <i>T. suecica</i> dosificados con CVB en el día 5.	16
8	Contenido porcentual de los pigmentos en <i>T. suecica</i> dosificados con CVB en el día 5 del crecimiento.	18
9	Contenido de pigmentos (mg L^{-1}) de <i>T. suecica</i> dosificados con CVB en el día 5 del crecimiento.	19

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Preparación de las unidades experimentales con tratamiento Guillard f/2 y condensados de vapores de biofouling (CVB).	5
2	Contenido de N, P y K de los medios Guillard f/2 y CVB.	7
3	Composición química del medio CVB.	9
4	Crecimiento poblacional ($\times 10^6$ cél. mL ⁻¹) de los cultivos y sus desviaciones estándares de los cultivos de <i>T. suecica</i> dosificados con diferentes concentraciones de CVB.	15
5	Tasa de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación diaria (TD) de <i>T. suecica</i> dosificados con CVB y grupo control (Guillard f/2) durante cinco días de cultivo.	16
6	Contenido porcentual, biomasa de clorofila <i>a</i> y caroteno total al quinto día de cultivo de <i>T. suecica</i> en los tratamientos dosificados con CVB y grupo control (Guillard f/2).	17
7	Valores de las densidades, biomasa y contenido de pigmentos de los cultivos dosificados con CVB.	20

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se evaluó el efecto del condensado de los vapores del biofouling de los cultivos de *Argopecten purpuratus* “concha de abanico” (CVB) en el crecimiento poblacional, contenido de clorofila *a* y carotenos de la microalga marina

Tetraselmis suecica con respecto al medio Guillard (Guillard, 1975), en condiciones de laboratorio. Para la elaboración del condensado de vapores se utilizó biofouling (200 g), al cual se procedió a hervir y a obtener el condensado de los vapores desprendidos durante la ebullición del biofouling. Por otra parte el biofouling se obtuvo de las linternas de la Empresa INTERCOLD S.A.C ubicada en la playa el Dorado, Chimbote, Perú. Los cultivos experimentales fueron dosificados en 45, 60 y 75 ml L⁻¹ de CVB comparados con el cultivo control (Guillard f/2). Los mayores crecimientos poblacionales ($p > 0,05$) fue con la concentración de 60 ml L⁻¹ de (CVB) alcanzando $2,448 \times 10^6$ cel. mL⁻¹, por otro lado el contenidos de clorofila *a* de los tratamientos con (CVB) y el control fueron estadísticamente similares entre sí ($p < 0.05$), pero diferentes y mejores al tratamiento control, al día 5 de cultivo. En conclusión todos los tratamientos dosificados con medio CVB tiene mayor concentración de clorofila *a* y crecimiento poblacional en comparación al grupo control.

Palabras clave: crecimiento, condensado de vapores, biofouling, *Tetraselmis suecica*, clorofila, carotenos.

ABSTRACT

In this research the effect of condensate vapors biofouling crops *Argopecten purpuratus* "scallop" (CVB) in population growth, chlorophyll content and carotenes of marine microalgae was evaluated.

Tetraselmis suecica from the average Guillard (Guillard, 1975), under laboratory conditions. Biofouling (200 g) was used for the preparation of condensed vapor, which he proceeded to boil and to obtain the condensate from the vapors during boiling of biofouling. Moreover, the biofouling was obtained Lanterns Company INTERCOLD S.A.C located on the beach El Dorado, Chimbote, Peru. The experimental cultures were dosed at 45, 60 and 75 ml L⁻¹ compared to control CVB (Guillard f / 2) crop. The highest population growth ($p > 0.05$) was with the concentration of 60 ml L⁻¹ (CVB) reaching $2,448 \times 10^6$ cells. mL⁻¹, on the other hand the content of chlorophyll treatments (CVB) and control were statistically similar to each other ($p < 0.05$), but different and improved treatment control, day 5 of culture. In conclusion all treatments dosed with half CVB has a higher concentration of chlorophyll a and population growth compared to the control group.

Keywords: growth, condensed vapor, biofouling, *Tetraselmis suecica*, chlorophyll, carotenes.

I. INTRODUCCIÓN

La producción de microalgas se convierte en un campo muy atractivo para la Investigación en Biotecnología y acuicultura, posibilitando el desarrollo de sistemas de cultivo bajo condiciones básicas que permitan su producción a bajo costo como una apropiada alternativa para el desarrollo de unidades de cultivo a nivel masivo (Uribe & Vega, 1993).

Tetraselmis suecica es una microalga clorofita marina que por su tamaño y valor nutricional puede ser utilizada como alimento vivo en las fases larvales de bivalvos filtradores (Borowitzka & Borowitzka 1990), además de ser un alga eurihalina que posee la capacidad de formar esporas y cuyos límites de tolerancia a las variables físicas de modo que su cultivo a gran escala es relativamente fácil, constituyéndose como una buena fuente de alimento en la acuicultura (Padilla, 1975). Esta microalga es fuente de proteínas, lípidos y carbohidratos, contiene α -tocoferol (Vit. E), carotenoides (fucoxantina y β -caroteno) como toda planta verde, contiene clorofila y su cantidad de todos estos componentes variará en función de las condiciones y el sistema de cultivo (Cárdenas *et al.*, 2003). Por otro lado, (Ulloa, 2011), las microalgas contienen clorofila que puede ser usada para la industria, alimentaria, acuícola, médica y cosmética por presentar antioxidantes, evidenciándose que una dieta rica en clorofila y carotenos puede prevenir enfermedades causadas por la acumulación de radicales libres, como es el cáncer.

Por otro lado *T. suecica*, puede metabolizar nutrientes orgánicos presentes en los ensilados ya que es una microalga que puede ser cultivada en condiciones heterotróficas y mixotróficas siendo la tasa de crecimiento ligeramente menor y los niveles de pigmentos y lípidos son drásticamente afectados por la generación de metabolitos algales (Betoli & Sipaúva, 2008), en tal sentido pueden incrementar el contenido de pigmentos cuando son cultivados con ensilados biológicos de las partes blandas de *A. purpuratus* (Ipanaque & Paredes, 2009).

Se ha demostrado que *T. suecica* crece adecuadamente en medios de cultivo formulados con sustancias químicamente puras o de grado analítico (Guillard f/2, Ben-Amotz, CHU 10, Yashima, MET 44, etc.); sin embargo, resultan muy caros para ser utilizados en

cultivo a gran escala (Torretera & Tacon, 1989; Cobelas & Gallardo, 1989). En tal sentido, es necesario desarrollar medio de cultivo alternativo que utilicen sustancias más baratas tales como los residuos orgánicos de la pesquería y/o maricultura.

El crecimiento de organismos sobre estructuras sumergidas recibe el nombre de “biofouling” (suciedad, en su traducción literal), Comprende cientos de especies incluyendo *Semimytilus algosus*, *Ciona intestinalis*, *Tubularia sp*, *Polydora sp* y otros organismos que se fijan eficazmente al substrato desarrollando un rápido crecimiento y vasto potencial reproductor (Loayza, 2014). En este contexto, los impactos que ocasiona el desarrollo del biofouling afecta negativamente en el cultivo de *A. purpuratus* “concha de abanico” desarrollándose sobre cabos, boyas, bolsas colectoras, pearl nets, linternas y las valvas de los organismos objeto de cultivo (Uribe y Blanco, 2001).

La mayoría de los organismos del biofouling son filtradores (Mazouni *et al.*, 1998); por tanto, su desarrollo sobre las estructuras de cultivo, pueden incrementar la tasa de biodeposición de heces y pseudoheces y con ello, la producción de desechos catabólicos (amonio, nitritos, sulfuros) al interior de las linternas de cultivo (Uribe & Blanco, 2001). Al cubrir la superficie de las linternas, alteran el flujo de agua hacia el interior, disminuyendo el suministro de alimento, la tasa de ingestión y la disponibilidad de oxígeno, afectando el crecimiento y supervivencia de los organismos objeto de cultivo pudiendo ocasionar pérdidas económicas para las empresas e impactos negativos para el ecosistema (Hincapié & Cárdenas, 2007).

El crecimiento de los organismos que conforman el biofouling incrementan el peso de las linternas de cultivo de *A. purpuratus*, habiéndose reportado para Tongoy, Chile, hasta 100 k durante 3 meses de cultivo (Uribe & Blanco, 2001), mientras que en la bahía de Samanco, Ancash, Perú, se han reportado 68,04 kg en verano y 73,42 kg en invierno en 2,7 y 3,4 meses de cultivo, respectivamente, cuyas diferencias podrían guardar relación con el nivel de productividad primaria, temperatura y condiciones oceanográficas, de los ecosistemas (Loayza, 2014). Por el contrario (Claereboudt *et al.*, 1994 y Leblanc *et al.* 2002); demostraron que la reducción del biofouling trae efectos positivos al cultivo suspendidos de *A. purpuratus*; por tanto esta actividad presenta diversos problemas, los cuales requieren ser resueltos con urgencia, comprometiendo la realización de ensayos y el uso del biofouling como medios de cultivos microalgales

para la obtención de compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes y antimutagénicas para su uso en la salud humana.

El biofouling recolectado por la empresa acuícola es llevado para su descomposición en tierra propiciando la aparición de insectos, de la materia orgánica y la generación de malos olores (Ramos. Com. Per., 2015). Estas dificultades pueden ser minimizadas o eliminadas mediante la aplicación de metodologías de reciclaje mediante microorganismos para la producción de compostaje y microalgas para la producción de cultivos masivos (Piña *et al.*, 2007).

(González J. & L. Polo, 2013) las microalgas se caracterizan por tener una gran capacidad de metabolizar materia orgánica posibilitando la transformación del biofouling en biomasa algal. Asimismo (Yauri, 2015), demuestra la utilización de ensilado biológico del biofouling de cultivo de *A. purpuratus*, como medio de cultivo logrando sostener adecuados crecimientos poblacionales de *T. suecica* presentándose en los tratamientos dosificados con 55 y 60 mL L⁻¹ de EBBFCA alcanzando 2,277 y 2,448 x10⁶ cél. mL L⁻¹.

El condesado de vapores de biofouling es un medio de cultivo alternativo producido a causa de la cocción del biofouling que liberan olores producidos por la presencia de sustancias aromáticas nitrogenadas (amidas, aminoácidos, etc.) (Merino. Com. Per., 2015) cuya condensación pueden ser utilizados como fuentes de carbono y nitrógeno para cultivar microalgas. Estos condensados, como medio de cultivo algal, tendría doble beneficio: 1) reciclaje total del biofouling a través de los cultivos algales de acuerdo a las estaciones del año, y 2) eliminación de los olores producto del biofouling.

Este medio de cultivo (CVB) alternativo por ser nuevo no se dispone de antecedentes, excepto aquellos de (Merino. Com. Per., 2015) que cultivando *T. suecica* con dosificaciones del condensado mencionado (5, 10 y 15 mL L⁻¹) obtuvo mejor crecimiento con 15mL L⁻¹ (2,1 x 10² cél mL⁻¹). Considerando la necesidad de reciclar los residuos de la maricultura, especialmente del biofouling, aprovechando la capacidad de ser metabolizados por *T. suecica* de acuerdo a ensayos preliminares realizados.

En atención a la problemática generada por el “biofouling” el objetivo de este estudio se orientó a la biotransformación de condesados de vapores de “biofouling” en biomasa

algal, para alcanzar mayores niveles de clorofila *a* y carotenoides susceptible de ser utilizado bajo diversos fines (pigmento natural) que a la vez reduce la contaminación del ambiente marino mediante el reciclaje de los desechos los cuales posibilita el desarrollo de nuevas metodologías en la producción de microalgas.

Por tal motivo se plantea el siguiente problema de investigación: ¿Cuál será el efecto de la utilización de condensados de vapores del biofouling en el crecimiento poblacional, contenido de clorofila *a* y carotenoides de *T. suecica* en condiciones de laboratorio?

Como objetivo general se propuso, evaluar el efecto de la utilización de condensados de vapores del biofouling en el crecimiento poblacional, contenido de clorofila *a* y carotenoides de *Tetraselmis suecica* en condiciones de laboratorio. Los objetivos específicos planteados fueron:

- Determinar el crecimiento poblacional (cél. mL⁻¹), tasa de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (TD) de *T. suecica* dosificados con tres volúmenes de condensados de vapores del biofouling (45, 60 y 75 mL L⁻¹) como medio de cultivo.
- Determinar el efecto de la dosificación del condensado de vapores del biofouling (45, 60 y 75 mL L⁻¹) en el contenido de clorofila *a* y carotenoides totales de *T. suecica*, en condiciones de laboratorio.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Localización del experimento

El trabajo experimental se realizó en el laboratorio de Cultivos de Especies Auxiliares de Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional del Santa, empleando el diseño experimental de estímulo creciente (Steel & Torre, 1992), con tres tratamientos experimentales y un tratamiento control, por triplicado. Así mismo, los cultivos algales se iniciaron con un promedio de $0,18 \times 10^6$ cél mL⁻¹.

Tabla 1. Preparación de las unidades experimentales con tratamiento Guillard f/2 y condensados de vapores de biofouling (CVB)

DISEÑO EXPERIMENTAL				
TRATAMIENTOS	REPETICIONES			MEDIO DE CULTIVO
TC	r ₁	r ₂	r ₃	1 mL L ⁻¹ Guillard f/2
T1	r ₁	r ₂	r ₃	45 mL L ⁻¹ de (CVB)
T2	r ₁	r ₂	r ₃	60 mL L ⁻¹ de (CVB)
T3	r ₁	r ₂	r ₃	75 mL L ⁻¹ de (CVB)

2.2. Material Experimental

2.2.1. Purificación del aire

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

El aire ingresa al primer frasco lavador, el cual contiene cuatro litros de agua potable pero previamente tratada y 4 mL de HCl diluido al 20% con pH 1, cuya función principal es la eliminación de los microorganismos no deseados, evitando de esta manera la contaminación de los cultivos experimentales; posteriormente el aire pasa al segundo frasco lavador, el cual contiene cuatro litros de agua potable con el propósito de asegurar el lavado y evitar que llegue pequeñas partículas del primer frasco de ácido; así también como medida de control en este segundo frasco lavador se controlará la acidez del agua utilizando fenolftaleína para neutralizar y evitar la acidificación a razón de 8 gotas/1000mL de agua, en donde el cambio de color de agua nos indicará la existencia de acidez (Merino, 2013).

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

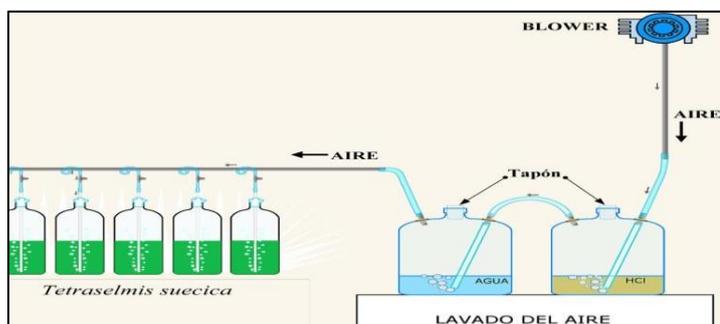


Fig. 1. Sistema del “lavado del aire” inyectado a los cultivo de *T. Suecica*

2.2.2. Tratamiento del agua de mar

El agua de mar procedió de la playa “EL DORADO” ubicada en la bahía de Samanco (09° 11' 20” LS y 78° 33' 53” LW), distrito de Nuevo Chimbote, Provincia del Santa, Departamento de Ancash, Perú. Con la finalidad de tratar el agua, se filtró con una manga de 2 μ de diámetro de malla, luego se añadió 1 mL de hipoclorito de sodio por cada litro de agua de mar a preparar. Después se dejó en reposo por 24 horas y se neutralizo con tiosulfato de sodio al 7 % utilizando 1 mL por cada litro de agua de mar y enseguida se colocó bajo aireación constante por 5 horas. (Merino, 2013).

2.2.3. Microalga *Tetraselmis suecica*

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

2.2.4. Preparación del cultivo algal (inóculo de *T. suecica*)

El cultivo algal se preparó con agua de mar previamente tratada que es descrita en el párrafo 2.2.2 y medio Guillard f/2 en 2 botellas de plástico (Tereftalato polietileno) 2000 mL, conteniendo 1000 mL de suspensión algal c/u, con aireación e iluminación constante.

2.3. Preparación de medios de cultivo

2.3.1. Medio Guillard f/2

El medio Guillard f/2 contiene los siguientes compuestos, estándares establecidos por Guillard, (1975), el cual fue utilizado para el mantenimiento del inóculo de *T. suecica* y del tratamiento control, y fue añadido a razón de 1 mL L^{-1} (Tabla 2).

Tabla 2. Contenido de N, P y K de los medios Guillard f/2 y CVB

Nutriente (mg L^{-1})	CVB (mL L^{-1})			
	CONTROL (Guillard f/2)	45	60	75
N	12,35	54	72	90
K		12,59	16,78	20,98
P	1,12	0,37	0,49	0,62

2.3.2. Extracción del biofouling

El biofouling se obtuvo de las linternas de cultivo suspendido de *Argopecten purpuratus* bajo la modalidad de líneas suspendidas en una de las empresa de maricultura, localizada en la bahía de Samanco, Ancash, Perú. $90^{\circ} 12' 45''$ LS y $78^{\circ} 33' 04''$ LW (Fig.2).



Fig. 2. Ubicación de la extracción del biofouling del cultivo suspendido de *A. Purpuratus*.

Las muestras de biofouling fueron recolectada en la estación de invierno, de una linterna de cultivo intermedio de “*A. purpuratus*” concha de abanico de un 1m de largo y de los pisos 1, 5 y 10. Asimismo fueron recolectadas en bolsas plásticas, preservadas en hielo y trasladadas al Laboratorio de Cultivos de Especies Auxiliares de la Universidad Nacional del Santa de Nuevo Chimbote para el tratamiento correspondiente. Las especies identificadas fueron *Ciona intestinalis*, (ciona), *Semimytilus algosus* (choro) y *Gracilaria sp.* (Pelillo rojo), *Bugula nerítina*, etc (Anexo.2). Por lo tanto se obtuvo los pesos porcentuales de cada uno de los organismos presentes en el biofouling y volúmenes (CVB).

Los registros de temperatura y oxígeno disuelto en el agua fueron realizados en una estación fija de la concesión marina de la empresa, a una profundidad de 6 m (14.8 °C y 4.7 mg/L) con un oxímetro multiparametro YSI mod. 550 que fue brindado por la empresa de maricultura.

2.3.3. Preparación del condensado de vapores del biofouling (CVB)

El medio CVB se obtuvo de cinco muestras de 200 g de biofouling c/u, colocando en un matraz (500 mL) agregando 100 mL de gua. Para luego ser conectado al condensador artesanal por 20 minutos de ebullición (100 °C) logrando obtener de la primera muestra 138 mL. Las cinco muestras (CVB) fueron homogenizadas para obtener una sola muestra patrón. (Anexo 2).

El condensador artesanal está confeccionado por tubos de PVC y de vidrio, tapones de jebe y sistema de ingreso y salida constante del agua (Fig.3). Los condensados recepcionados fueron enfriados y dosificados directamente a los cultivos de *T. suecica* como única sustancia que promueve en crecimiento heterotrófico de las microalgas.

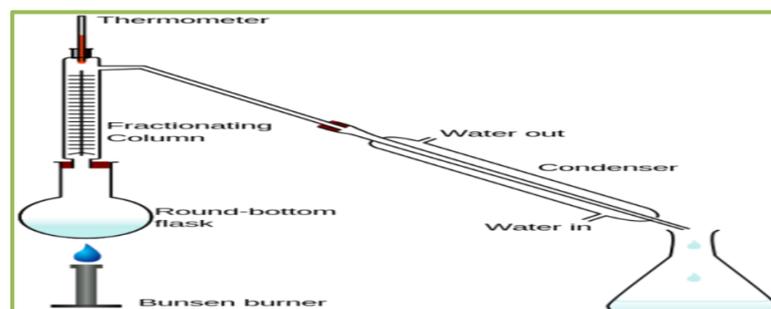


Fig. 3. Esquema del condensador para la obtención del medio CVB

2.3.4. Análisis químico del CVB

El condensado del biofouling se analizó en el Laboratorio COLECBI S.A.C. (Nuevo Chimbote), determinando el contenido de nitrógeno amoniacal, nitrógeno total, fósforo y potasio que muestran (Tabla 3) a fin de comparar el aporte de los N, P y K con el medio Guillard f/2 utilizados en los ensayos.

Tabla 3. Composición química del medio CVB.

Nutrientes	CVB (mg/L)
Nitrógeno amoniacal	3,86
Nitrógeno (N) total orgánico	1 200,00
Potasio (K)	279,70
Fósforo (P)	8,23

2.4. Acondicionamiento de las unidades experimentales

Se utilizó 12 botellas plásticas (Tereftalato polietileno) de 2500 mL de capacidad, que contenían 1000 mL de suspensión algal. Todos los cultivos se inició con baja densidad poblacional ($0,184 \times 10^6$ cél mL⁻¹) el cual se determinó por los conteos en el microscopio utilizando una cámara Neubauer, se dosificó a los cultivos controles con medio Guillard f/2 y los cultivos experimentales (Tratamientos T1, T2 y T3) con la solución patrón CVB, a razón de 45, 60, 75 mL L⁻¹ respectivamente. Asimismo cada tratamiento tuvo tres repeticiones. (Anexo. 1).

2.5. Determinación de parámetros ambientales

Durante el trabajo experimental se registró el pH cada 24 horas, utilizando un pH metro digital PH-009 III, con $\pm 0,01$ de sensibilidad. También se registró la temperatura de los cultivos algales a las 8:00 am, para ello se utilizó un termómetro digital marca Hanna con una sensibilidad de $0.1 \pm$ °C. La iluminación fue constante utilizando 2 pares fluorescentes de 40 Watts colocado a una distancia 15 cm de los cultivos algales. La aireación fue suministrada constante por un Blower de ½ 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.

2.6. Evaluación del crecimiento poblacional

El crecimiento poblacional de los cultivos algales se realizó por conteos diarios, teniendo una duración de 6 días. Las muestras fueron extraídas con la ayuda de una pipeta de 1 mL para luego ser inmovilizadas con solución de lugol a fin de facilitar los recuentos celulares; diariamente se realizó el conteo celular mediante una cámara Neubauer y un microscopio binocular marca “Motic BA200”, el conteo se realizó en los cuatros cuadrantes. Luego se graficaron las curvas de crecimiento poblacional, la tasa de crecimiento específico (μ) (Baek & Young, 2002) y el tiempo de duplicación diaria (TD) (Griffiths M. & S. Harrison, 2008), los cuales fueron calculados utilizando datos del día de máximo crecimiento.

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

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

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

2.7. Determinación de clorofila *a* y carotenos totales

La determinación de pigmentos fue realizada en el Laboratorio de Ciencias y Biotecnología de la Universidad Nacional de Santa, mediante el método espectrofotométrico, para ello se tomaron 10 mL de cultivo algal de cada repetición de los tratamientos, estas fueron centrifugadas a 5000 rpm durante 15 min; luego se procedió a retirar el sobrenadante, a continuación se extrajeron las muestras algales sedimentadas sobre una luna de reloj y se llevaron a la estufa a 45 °C por 12 horas, donde ya liofilizadas se pesó 3 mg de biomasa y se vertió a cada tubo de ensayo con tapa rosca debidamente rotulado, posteriormente sobre esta biomasa se añadió 3 mL de acetona al 90% puro, luego utilizando una varilla de vidrio se le agito homogéneamente por un periodo de 2 minutos a cada uno de los tubos de ensayo, y para asegurar la completa liberación de los pigmentos se les dejó tapados para evitar su evaporación en un ambiente oscuro, a 4 °C por 24 h; después se clarificaron por centrifugación 5000 rpm durante 15 min; Se extrajo el sobrenadante para las lecturas al espectrofotómetro; esta

metodologías tomadas de (Badillo *et al.*, 2010 & Ulloa, 2011); las absorbancia utilizadas fueron 470, 645 y 662 nm en un espectrofotómetro de la marca Tuner Barstearnd Internacional, así mismo los contenidos de clorofila *a* y carotenos totales calculados según la fórmula establecida por (Lichtenthaler & Wellburn 1985).

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

$$C_b = 18,61A_{645} - 3.960A_{662}$$

$$C_{x+c} = (1000A_{470} - 2,270C_a - 81,4 C_b) / 227$$

Dónde:

C_a = Clorofila *a*

C_b = Clorofila *b*

C_{x+c} = Carotenos totales

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

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

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

C% = Porcentaje de Clorofila *a* ó Caroteno

C_x = cantidad de clorofila ó Caroteno ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)

A = Cantidad de acetona utilizada (mL)

1000 = Conversión de $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ a $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$

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

Para determinar el contenido de clorofila *a* y los carotenos totales en bioma de *T. suecica* ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), se procedió de la siguiente formula:

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

Dónde:

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

B = Biomasa algal (mg.L^{-1})

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

100 = porcentaje

2.8.Determinación de Biomasa

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

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

Dónde:

P1= Peso de papel

P2= Peso de papel con microalgas

* El factor 20 corresponde a la 20va parte de un litro, representado por 50 mL de muestra microalgal.

2.9.Análisis estadístico.

Los datos de crecimiento poblacional de contenido de clorofila *a* y de carotenos totales, fueron se aplicó el análisis de varianza (ANOVA) para establecer la existencia de diferencias significativas entre los promedios. También se empleó la prueba de Tukey HDD, para identificar los promedios significativamente diferentes; para todos los casos se utilizó un nivel de significancia de $p < 0,05$. Los análisis estadísticos se desarrollaron usando los programas Microsoft Office Excel 2010 y el programa estadístico SPSS 21.0. en español para Windows.

III. RESULTADOS

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

3.1.1. Temperatura

La temperatura de los cultivos algales osciló entre 24,7 °C y 25,3°C durante el periodo del experimento. Estos datos fueron estadísticamente similares ($p > 0,05$) en cada día de cultivo (Fig. 4).

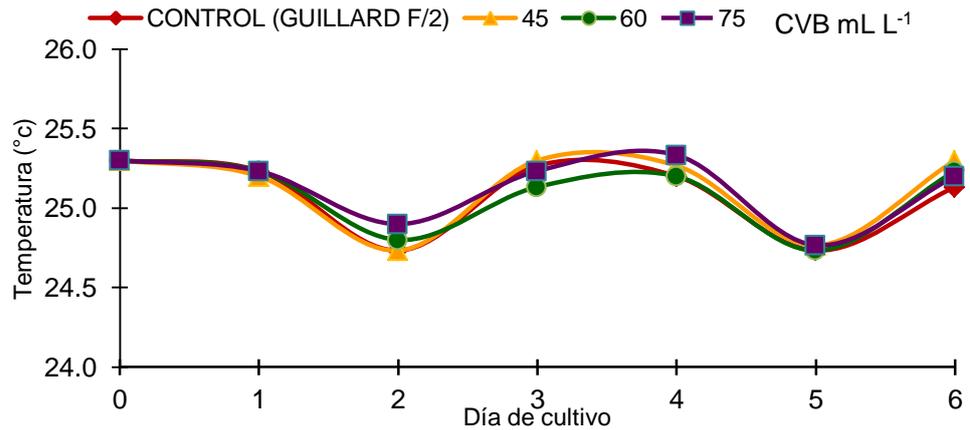


Fig. 4. Variación de la temperatura promedio (°C) de los cultivos de *T. suecica* dosificados con CVB.

3.1.2. pH

Los valores de pH registrados en los cultivos algales oscilaron entre 7,04 y 7,63. (Fig. 5).

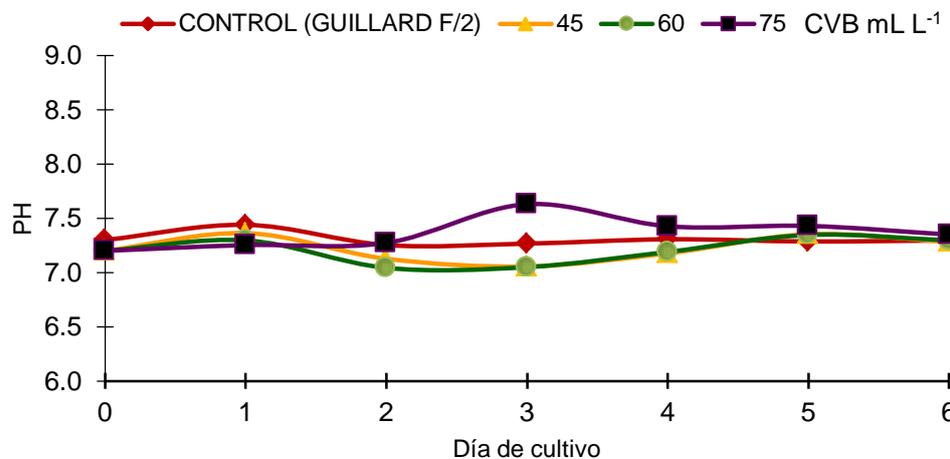


Fig. 5. Variación del pH promedio en los cultivos de *T. suecica* dosificados con CVB.

Cabe destacar que las variaciones del pH durante los dos primeros días fueron estadísticamente iguales ($p > 0,05$), sin embargo en el tercer día se observó un ligero incremento en el tratamiento de 75 mL L^{-1} (CVB) pero luego tiende a recuperar sus valores iniciales denotando activo consumo de esta importante fuente orgánica de nitrógeno.

3.2. Crecimiento poblacional *T. suecica*

Los incrementos poblacionales diarios de *T. suecica* son presentados en la (Tabla 4 y Fig 6), observándose que los cultivos dosificados con 60 mL L^{-1} de CVB presentan desde el primer día, valores más altos aunque sin mostrar diferencias estadísticas significativas ($0,616 \times 10^6 \text{ cel. mL}^{-1}$). Esta tendencia fue mantenida hasta el día 3 observándose ligeramente menores densidades poblacionales en los cultivos controles y los dosificados con 45 y 75 mL L^{-1} ($1,427$, $1,393$ y $1,403 \times 10^6 \text{ cél mL}^{-1}$, respectivamente).

Desde el segundo al tercer día de cultivo, se aprecia que las densidades microalgales fueron similares ($p > 0,05$); destacando los valores de $1,393$; $1,764$; $1,403$ y $1,427 \times 10^6 \text{ cél.mL}^{-1}$, para los tratamientos con 45 ; 60 y 75 mL L^{-1} de CVB y el grupo control, respectivamente.

Al cuarto día de cultivo, las mayores densidades poblacionales se presentaron en los tratamientos dosificados con 60 mL.L^{-1} de CVB ($2,224 \times 10^6 \text{ cél.mL}^{-1}$) seguido del control ($2,055 \times 10^6 \text{ cél. mL.L}^{-1}$) y de los tratamientos de 45 mL L^{-1} de CVB ($1,871 \times 10^6 \text{ cél. mL}^{-1}$) y 75 mL L^{-1} de CVB ($1,571 \times 10^6 \text{ cél.mL}^{-1}$). Estas tendencias se mantuvieron en los días 5 y 6 en que los cultivos alcanzan el máximo crecimiento logarítmico e ingresan a la fase estacionaria (Fig. 6). A efectos de evaluar comparativamente el efecto del CVB en el crecimiento poblacional y el contenido de pigmentos de *T. suecica*, se han considerado los valores correspondientes durante el quinto día, se presentaron con los mayores valores significativos ($p < 0,05$) en los tratamientos dosificados con 60 mL L^{-1} de CVB ($2,443 \times 10^6 \text{ cél. mL}^{-1}$) seguido del control ($2,155 \times 10^6 \text{ cél. mL}^{-1}$), del dosificado con 45 mL L^{-1} ($1,975 \times 10^6 \text{ cél. mL}^{-1}$) y 75 mL L^{-1} de CVB ($1,225 \text{ cél.} \times 10^6 \text{ mL L}^{-1}$)

Tabla 4. Crecimiento poblacional ($\times 10^6$ cél. mL⁻¹) de los cultivos y sus desviaciones estándares de los cultivos de *T. suecica* dosificados con diferentes concentraciones de CVB.

DÍA DE CULTIVO	CONTROL (GUILLARD F/2)	CVB (mL L ⁻¹)		
		45	60	75
0	0,180 ±0,000 ^a	0,180 ±0,000 ^a	0,180 ±0,000 ^a	0,180 ±0,000 ^a
1	0,455 ±0,176 ^a	0,527 ±0,177 ^a	0,616 ±0,084 ^a	0,533 ±0,190 ^a
2	0,919 ±0,417 ^a	1,128 ±0,208 ^a	1,243 ±0,217 ^a	0,981 ±0,042 ^a
3	1,427 ±0,134 ^a	1,393 ±0,330 ^a	1,764 ±0,194 ^a	1,403 ±0,067 ^a
4	2,055 ±0,190 ^{ab}	1,871 ±0,272 ^{ab}	2,224 ±0,203 ^a	1,571 ±0,162 ^b
5	2,155 ±0,047 ^{ab}	1,975 ±0,277 ^b	2,443 ±0,118 ^a	1,225 ±0,114 ^c
6	1,965 ±0,067 ^a	1,708 ±0,389 ^a	2,019 ±0,245 ^a	1,079 ±0,029 ^b

Letras diferentes en una misma fila indican diferencias significativas, con un nivel de 0,05.

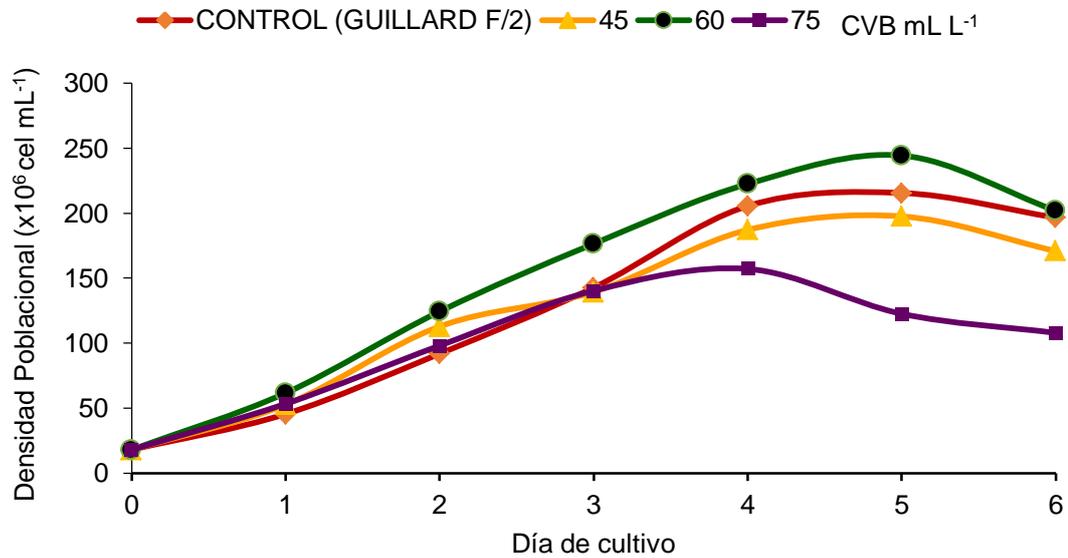


Fig.6. Crecimiento poblacional de los cultivos *T. suecica*, dosificados con diferentes concentraciones de CVB.

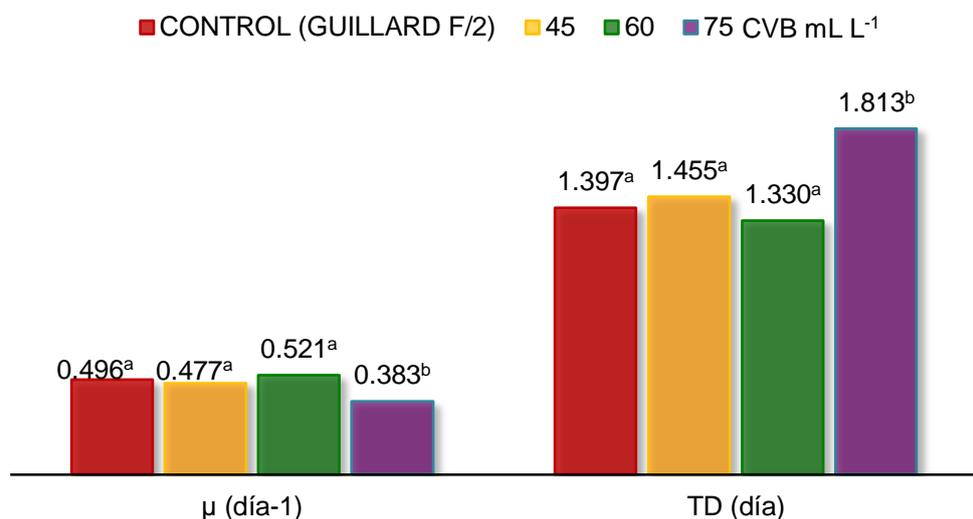
3.2.1. Tasa de crecimiento y tiempo de duplicación poblacional

Los valores de la tasa de crecimiento (μ) y el tiempo de duplicación diaria (TD) de los cultivos de *T. suecica* con CVB y grupo control (Guillard f/2) fueron determinados al quinto día de cultivo mostrándose en la Tabla 5.

Tabla 5. Tasa de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación diaria (TD) de *T. suecica* dosificados con CVB y grupo control (Guillard f/2) durante cinco días de cultivo.

PARÁMETRO	CONTROL (GUILLARD F/2)	CVB (mL L ⁻¹)		
		45	60	75
μ (día ⁻¹)	0,496 ±0,005 ^a	0,477 ±0,028 ^a	0,521 ±0,010 ^a	0,383 ±0,019 ^b
TD (día)	1,397 ±0,013 ^a	1,455 ±0,085 ^a	1,330 ±0,025 ^a	1,813 ±0,088 ^b

Letras diferentes en una misma fila indican diferencias significativas, con un nivel de 0,05.



Letras diferentes en una misma fila indican diferencias significativas, con un nivel de 0,05.

Fig. 7. Variación de la tasa de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (TD) de los cultivos de *T. suecica* dosificados con CVB en el día 5.

La tasa de crecimiento (μ) durante el quinto día de cultivo *T. suecica* los mayores valores significativos ($p < 0,05$), se presentaron en los tratamientos dosificados con 60 mL L^{-1} de CVB y control con $0,521$ y $0,496 \text{ día}^{-1}$ respectivamente. También se observó que el tratamiento con 75 mL L^{-1} CVB es menor su tasa de crecimiento presentando este último $0,383 \text{ día}^{-1}$ (Tabla. 5).

Respecto al tiempo de duplicación diaria (TD), por proceder de una relación inversa del crecimiento, los dosificados con 75 mL L^{-1} de CVB presentaron los valores altos ($1,813 \text{ día}$) seguido de los dosificados con 45 mL L^{-1} de CVB ($1,455 \text{ día}$) y de los controles ($1,397 \text{ día}$), mientras que los cultivos dosificados con 60 mL L^{-1} de CVB presentaron los valores más bajos ($1,330 \text{ día}$); por otro lado se observa que todos los tratamientos con CVB son estadísticamente similares entre sí pero a su vez diferente numéricamente (Tabla 5, Fig. 7).

3.2.2. Contenido de Pigmentos en *T. suecica*

En la Tabla 6, y Fig. 8 y 9, se observan los valores de clorofilas *a* y carotenos en porcentaje (%) y biomasa (mg L^{-1}) de *T. suecica* al quinto día de cultivo.

Tabla 6. Contenido porcentual, biomasa de clorofila *a* y caroteno total al quinto día de cultivo de *T. suecica* en los tratamientos dosificados con CVB y grupo control (Guillard f/2).

PARÁMETROS	CVB (mL L^{-1})			
	CONTROL (Guillard f/2)	45	60	75
Clorofila <i>a</i> (%)	$0,51 \pm 0,03^b$	$0,72 \pm 0,16^{ab}$	$0,76 \pm 0,07^a$	$0,71 \pm 0,06^{ab}$
Carotenos (%)	$0,11 \pm 0,02^a$	$0,13 \pm 0,02^a$	$0,15 \pm 0,04^a$	$0,14 \pm 0,03^a$
Clorofila <i>a</i> (mg L^{-1})	$3,12 \pm 0,14^b$	$3,96 \pm 0,33^b$	$5,43 \pm 0,65^a$	$3,08 \pm 0,53^b$
Carotenos (mg L^{-1})	$0,69 \pm 0,11^a$	$0,71 \pm 0,11^a$	$1,05 \pm 0,32^a$	$0,61 \pm 0,08^a$

Letras diferentes en una misma fila indican diferencias significativas, con un nivel de 0,05.

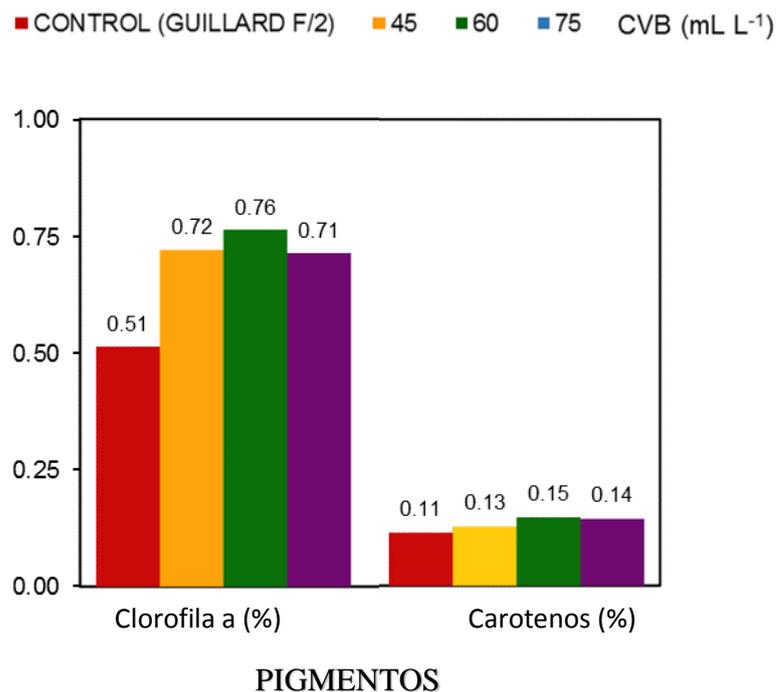


Fig.8. Contenido porcentual de los pigmentos en *T. suecica* dosificados con CVB en el día 5 del crecimiento.

El mayor porcentaje de clorofila *a* ($p < 0,05$ al quinto día de cultivo, presentaron los en los tratamientos dosificados con 75 y 60 mL L⁻¹ de CVB con 0,71 y 0,76 %, respectivamente, siendo los menores valores significativos obtenidos en los tratamientos con 45 mL L⁻¹ de CVB y el grupo control con 0,72 y 0,51 %, respectivamente (Tabla 6 y Fig. 8).

Del mismo modo el contenido porcentual de los carotenos, los mayores valores fueron obtenidos en los tratamientos dosificados con 60, 75 y 45 mL L⁻¹ de CVB (0,15; 0,14 y 0,13, respectivamente) y los menores en el grupo control (0,11%).

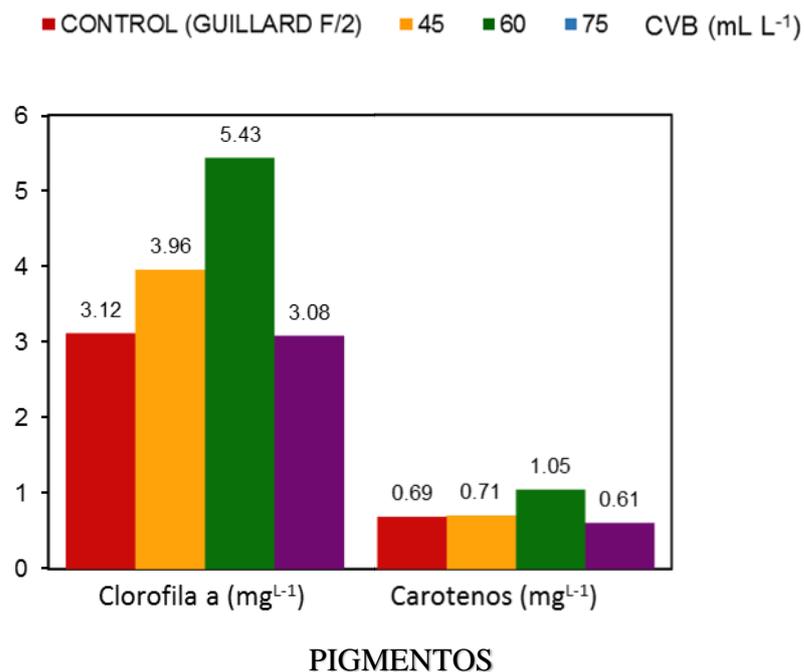


Fig. 9. Contenido de pigmentos (mg L⁻¹) de *T. suecica* dosificados con CVB en el día 5 del crecimiento.

En cuanto, el contenido de clorofila *a* expresado como biomasa (mg L⁻¹) los mayores valores se presentan en los cultivos dosificados con 60 mL L⁻¹ de CVB (5,43 mg L⁻¹), seguidos de los dosificados con 45 mL L⁻¹ (3,96 mg L⁻¹), y los menores fueron determinados en los controles (3,12 mL L⁻¹) y con 75 mL L⁻¹ de CVB (3,08 mg L⁻¹).

Por último el contenido de carotenos totales (mg L⁻¹) los mayores valores fueron obtenidos en los tratamientos dosificados con 60 mL L⁻¹ de CVB (1,05 mg L⁻¹) seguidos de los dosificados con 45, 75 y el grupo control con valores de 0,71; 0,61 y 0,64 mg L⁻¹, relacionados con los contenidos porcentuales de los pigmentos totales (Tabla 6). Asimismo, las mayores densidades poblacionales ($2,443 \times 10^6$ cel mL⁻¹) y porcentajes de pigmentos totales (1,21%) se hallan en los cultivos dosificados con 60 mL L⁻¹ de CVB (Tabla 6).

Tabla 7. Valores de las densidades, biomasa y contenido de pigmentos de los cultivos dosificados con CVB.

Parámetro	CVB (mL L ⁻¹)			
	0	45	60	75
Densidad poblacional (x 10 ⁶ cel mL ⁻¹)	2,155	1,975	2,443	1,225
Biomasa (mg. 10 mL ⁻¹)	6,07	5,61	7,11	4,31
Pigmentos totales (mg L ⁻¹)	5,00	6,09	8,58	4,79
Pigmentos totales (%)	0,82	1,11	1,21	1.10

IV. DISCUSIÓN

El empleo de residuos generados por la actividad maricultura para la formulación de medios de cultivo alternativos implica la incorporación de carbono y nitrógeno orgánicos que serán eficientemente aprovechadas por microalgas que presenten nutrición heterotrofia o mixotrófica. Este aspecto es muy importante por cuanto el aprovechamiento simultáneo de la luz, CO₂ y sustratos orgánicos, la microalga desarrolla su capacidad de nutrición mixotrófica, que según Moronta *et al.*, (2006), producen mayor cantidad de biomasa en comparación a las obtenidas en cultivos autotróficos y heterotróficos.

En este trabajo investigación se realizaron cultivos de *T. suecica* en condiciones mixotróficas, ya que conto con aporte de nitrógeno dado por el CVB, una fuente de luz, y entrada de CO₂ proveniente del medio ambiente por la aireación suministrada; esta forma de nutrición también se contrasta con lo afirmado por (Jiménez B. & C. Prada. 2012) mencionaron que el ensilado de los desechos blandos de concha de abanico (EDBCA) aportan grandes cantidades de nitrógeno derivados del contenido proteico a su vez el aprovechamiento simultáneo de luz, CO₂ y sustratos orgánicos, de esta manera la microalga *T. suecica* desarrolla su capacidad de nutrición mixotrófica.

La presencia de nutrientes en los medios ensayados (Guillard y CVB) permiten el crecimiento continuo hasta el día cinco de todos los cultivos de *T. suecica*, observándose mayores densidades poblacionales en aquellos dosificados con 60 mL L⁻¹ de CVB (2,443 x 10⁶ cél mL⁻¹) seguido de los controles (2,155 x 10⁶ cél mL⁻¹), de los dosificados con 45 mL L⁻¹ de CVB (1,975 10⁶ x cél mL⁻¹), y 75 mL L⁻¹ de CVB (1,225 10⁶ x cél mL⁻¹), para luego declinar por el consumo de nutrientes como consecuencia del crecimiento algal (Tabla 4).

Estos resultados son similares a lo reportado por FAO (2006) para el cultivo de *T. suecica* en condiciones batch y semicontinuo alcanzando densidades de 2 x10⁶ cél.mL⁻¹ y 1,5 x 10⁶ cél. mL⁻¹, respectivamente, pudiéndose incrementar, dentro ciertos límites, aumentando la intensidad de luz y manteniendo el pH entre 7,5 a 8,2; asimismo, así como a los obtenidos por Fábregas J. *et al.*, (1984) en cultivos batch y utilizando NaNO₃ (1,3 x10⁶ cel. mL⁻¹) y por (Piña, 2007) utilizando Guillard (1.74 x10⁶ cel. mL⁻¹

¹) y urea (1.8×10^6 cel. mL⁻¹). Sin embargo, las densidades poblacionales obtenidos en el presente ensayo con 60 mL L⁻¹ de CVB ($2,443 \times 10^6$ cél mL⁻¹) es mayor, debido a las características del crecimiento mixotrófico y al alto contenido de nitrógeno orgánico aportado con el CVB (Tabla 3).

Las ventajas de la nutrición mixotrófica de *T. suecica* ha sido demostrada por Jiménez & Prada, (2012) quienes determinaron los valores más altos de la densidad poblacional dosificando 80 ml L⁻¹ de ensilado de desechos blandos de *A. purpuratus* ($3,94 \times 10^6$ cel mL⁻¹) debido al alto contenido de aminoácidos derivados de la degradación bacteriana de las proteínas presentes en dicho ensilado, similares a nuestros resultados ($2,44 \times 10^6$ cel mL⁻¹) debido a la presencia de sustancias aromáticas orgánicas (aminoácidos, amidas, etc.) en el CVB.

De acuerdo a Ponte & Ruiz, (2013), la degradación de proteínas presente en los medios orgánicos produce nitrógeno orgánico e inorgánico, siendo el nitrógeno orgánico mucho más aprovechable que el nitrógeno inorgánico; en tal sentido, el nitrógeno aportado del CVB explica los valores altos del crecimiento algal en relación al contenido de nitrógeno inorgánico del medio Guillard, asimismo, considerando la relación positiva entre el contenido de nitrógeno y el crecimiento algal, aquellos dosificados con CVB por aportar mayores cantidades de N ($54, 72$ y 90 mg L⁻¹) que el Guillard ($12,35$ mg L⁻¹) se obtendrán crecimientos estadísticamente similares.

En tal sentido, la eficiente asimilación mixotrófica de los nutrientes, especialmente nitrógeno orgánico, presentes en el CVB por *T. suecica* favorece su crecimiento, además de ejercer importantes cambios en el crecimiento y composición bioquímica (Utting, 1985; Kaplan *et al.*, 1986; Vieira & Klaveness, 1986; Vonshak, 1986; Wikfors, 1986), especialmente en el contenido de los pigmentos fotosintéticos (clorofilas y carotenos); así tenemos que el aporte de 72 mg L⁻¹ de N (Tabla 2) correspondiente a los dosificados con 60 mL L⁻¹ de CVB presentaron los mayores concentraciones de clorofila a ($5,43$ mg L⁻¹), comparados con el control ($3,12$ mg L⁻¹); siendo aquellos valores superiores a lo reportado por Fábregas *et al.*, (1987) quienes utilizando 28 mg. L⁻¹ de N, procedentes de fertilizantes, extracto de suelo y micronutrientes, obtuvieron 4.4 mg.L⁻¹ de clorofila *a*.

Como se ha mencionado anteriormente, el nitrógeno es importante para sostener la dinámica del crecimiento algal e incrementar el contenido de pigmentos, por considerarse que estos son reservorios de tan importante nutriente; sin embargo, su concentración tendrá un valor óptimo, que según nuestros resultados, corresponde a la dosificación de 60 mL L⁻¹ de CVB, puesto que en dicha dosificación se han determinado los valores más altos de la densidad poblacional (2,443 x 10⁶ cél mL⁻¹), de clorofila a (5,43 mg L⁻¹) y de carotenos (1,05 mg L⁻¹). Comparativamente, los contenidos de clorofila a y carotenos son mayores cuando *T. suecica* se cultiva con ensilados de residuos blandos de *A. purpuratus*, cuyos valores son de 6,35 y 2,61 mg L⁻¹ (Jiménez & Prada, 2012), al parecer, por la mayor riqueza y complejidad de nutrientes de los ensilados.

Según Serpa & Calderón (2006), la cantidad de clorofila se correlaciona positivamente con la densidad o biomasa celular y las fuentes de nitrógeno promueven su acumulación y mayor producción de oxígeno y radicales oxidantes con efectos positivos en la dinámica de crecimiento; evidenciados con nuestros resultados. Adicionalmente, los contenidos porcentuales de clorofila a y carotenos obtenidos en los cultivos dosificados con CVB con 60 mL L⁻¹ de CVB (0,76% y 0,15%, respectivamente) son similares los que reportados por Spolaore *et al.*, (2006), quienes consideran que las microalgas son ricas en clorofila (0,5% a 1%) y carotenoides (0,1 a 0,2%). Por otro lado, (Baek J & B. Young, 2002) obtuvieron valores de clorofila *a* (4,68 mg L⁻¹) menores que los nuestros (5,43 mg L⁻¹), al parecer, por el medio enriquecido con nitrógeno y fósforo utilizado y/o las condiciones de cultivo. Estos resultados permiten establecer la existencia de una relación directa entre el contenido de nitrógeno en el medio de cultivo y la acumulación de pigmentos, considerados como reserva de nitrógeno, y que juegan un papel interactivo muy importante en el crecimiento algal (Liotenberg *et al.*, 1996; Raven, 1988).

En los cultivos algales es muy importante mantener niveles adecuados de concentraciones de orgánicas, a fin de evitar que estos propicien el establecimiento y desarrollo de bacterias que competirán con las algas por los nutrientes y afectaran el normal crecimiento de *T.suecica*; ya que el tratamiento de 75 mL L⁻¹ de CVB se obtuvieron menores resultados (1,225 10⁶ x cél mL⁻¹) y observándose un decaimiento en el cuarto día a consecuencia de mayor carga orgánica; en consecuencia

considerando que la cantidad de 60 mL L^{-1} de CVB ($2,443 \times 10^6 \text{ cél mL}^{-1}$) y 45 mL L^{-1} de CVB ($1,975 \times 10^6 \text{ x cél mL}^{-1}$) son las más eficiente para el crecimiento de *T. suecica*.

Finalmente, las variaciones del pH (7,05 a 7,63) y de la temperatura (24,7 y 25,3 °C) de los cultivos de *T. suecica*, por estar dentro de los rangos normales reportados por Silva *et al.*, (2011), no han interferido en los resultados obtenidos.

VII. CONCLUSIONES

- Los mayores crecimientos poblacionales de *T. suecica* se presentaron en los tratamientos dosificados con 60 mL L⁻¹ de CVB con (2,443 x10⁶ cél. mL⁻¹), seguido del grupo control con (2,155 x10⁶ cél. mL⁻¹), siendo entre ellos estadísticamente iguales entre sí (p<0.05).
- El contenido porcentual de clorofila *a* en todos los cultivos *T. suecica* dosificados con CVB fueron estadísticamente iguales entre sí (p<0.05), pero diferentes y mejores al tratamiento control, al día 5 de cultivo, mientras que el contenido porcentual de caroteno en los cultivos de *T. suecica* son estadísticamente iguales entre sí (p<0.05).
- Las mayores tasas de crecimiento (μ) al quinto día de cultivo se presentaron en los tratamientos dosificados con 45 y 60 mL L⁻¹ de CVB (0,477 y 0,521 día⁻¹) seguido del grupo control con (0,496 día⁻¹), asimismo el menor tiempo de duplicación diaria (TD) se presentó en el tratamiento dosificado con 60 mL L⁻¹ de CVB (1,330 día⁻¹), seguido del tratamiento dosificado con 45 y 75 mL L⁻¹ de CVB con valores de 1,455 y 1,813 respectivamente.
- Los parámetros físicos de temperatura y pH no afectan la dinámica del crecimiento de la microalga *Tetraselmis suecica* por lo que los resultados obtenidos son el reflejo de la influencia de los nutrientes, orgánicos e inorgánicos, presentes en CVB posibilitando el crecimiento mixotrófico de dicha microalga.

VIII. RECOMENDACIONES

- Evaluar el cultivo microalga *T. suecica* utilizando dosificaciones diarias de CVB para evaluar el crecimiento algal y la producción de clorofila *a* y carotenos totales.
- Realizar experiencias de cultivos de *T. suecica* al aire libre tendiente a la utilización eficiente de los residuos de la maricultura y al establecimiento de una metodología que permita producir sustancias biocativas de interés económico en nuestra región.
- Realizar ensayos experimentales manteniendo el efecto de la fuente nitrogenada orgánica (CVB) en el contenido de pigmentos de la microalga *T. suecica*.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Badillo M.; Galindo M.; Gallardo A.; Lizama G.; U.; Palomino G.; Arena M. & X. Chiappa. 2010. Manual de Prácticas de Ecología Acuática, Universidad Nacional Autónoma de México, Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación, Facultad de Ciencias, 98p.
- Baek J & B. Young 2002. Growth Characteristics of Five Microalgal Species Isolated from Jeju Island and Four Microalgal Stock Strains in Hatchery. Department of Oceanography, College of Ocean Sciences, Cheju National University, Jeju 690-756. Volume 17(2): 117-125 9p.
- Betioli, T. & L. Sipaúva. 2008. Cultivo de *Ankistrodesmus gracilis* (Chlorophyta) em laboratório à base de esterco suíno. Biotemas. 21 (1). 7–16 pp.
- Borowitzka, L. & M. Borowitzka.1990. Comercial production of beta carotene by *Dunaliella salina* in open ponds. bull. mar sci. 47:247-252
- Cárdenas E, Tuan P, Janssen M, Wijffels R, 2003, Vitamin E (α -tocopherol) production by marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* and *Tetraselmis suecica* in batch cultivation. Biomolecular Engineering 20 139-147.
- Cobelas, M. & T. Gallardo. 1989. Una revisión sobre la biotecnología de las Algas. Bot. Complutensis. (15) 9–60 pp.
- Claereboudt, M; Bureau D; Cote 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, pp. 327-342.
- Fabregas J, Abalde J, Herrero C, Cabezas B & M. Veiga 1984, Growth of the marine microalga *Tetraselmis Suecica* In Batch Cultures With Different Salinities

And Nutrient Concentrations, Departamento de Microbiología, Facultades de Farmacia y Medicina, Isevier Science Publishers B.V., Amsterdam -

Printed in The Netherlands, Universidad de Santiago, Santiago de Compostela (Spain), *Aquaculture*, 42 (207 - 2015), 9p.

Fabregas J, Herrero C, Cabezas B. & J. Abalde 1987b. Growth and biochemical variability of the marine microalga *Chlorella stigmatophora* in batch cultures with different salinities and nutrient gradient concentration. Departamento de Microbiología, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, España. Volume 22, Issue 3, 1987, pages 269-276. 10p.

FAO. 2006. Cultivo de bivalvos en criadero “Un manual práctico” Organización De Las Naciones Unidas Para La Agricultura Y La Alimentación. Documento Técnico De Pesca. Roma 198 p.

González J. & L. Polo 2013, Rendimiento de biomasa y contenido de lípidos de *Tetraselmis suecica* utilizando diferentes concentraciones de efluentes de bodegas de embarcaciones anchoveteras industriales en condiciones de laboratorio. Tesis para optar el título de biólogo acuicultor. Nuevo Chimbote – Perú 40p

Griffiths M. & S. Harrison. 2008. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *J Appl Phycol* (2009) 21:493–507. 15p.

Guillard, R. 1975, Culture of Phytoplakton for feeding marine invertebrates. In Smith, L & H. Chnadley. (eds). Culture of marine invertebrates animal, Plenum Press. London, England. 29- 60 p.

Hincapié-Cárdenas, 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.

Ipanaqué J., & Y. Paredes 2009. Efecto del Ensilado de los Desechos Blandos de *Argopecten purpuratus* “concha de abanico” en el crecimiento poblacional y contenido de lípidos totales de *Tetraselmis Suecica*, en condiciones de laboratorio. Tesis Biólogo Acuicultor. Universidad Nacional del Santa. Chimbote, Perú.

Jiménez & Prada. 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 *a* y carotenos de *T. suecica*, en condiciones de laboratorio. Tesis Biólogo Acuicultor. Universidad Nacional del Santa. Chimbote, Perú.

Kaplan, D., A. Richmond, Z. Dubinsky & S. Aarons. 1986b. Algal nutrition. En: Handbook of Microalgal Mass Culture. Richmond, A. (ed.), pp: 447-447. SPB. Academic publishing Bv, the Hague.

Leblanc A., T. Landry, G. Miran. 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., D. Campell, R. Rippka, J. Houmard & N. Tandeau de Marsac. 1996. Effect of the nitrogen source on phycobiliprotein synthesis and cell reserves in a chromatically adapting filamentous cyanobacterium. Microbiology. 142:611-622.

Lichtenthaler, H. K y A. R. Wellburn 1985, Determination of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf in different solvents. Biol. Soc. Trans. 11 591-592p.

- Loayza A. R. 2014, Variación del “biofouling” en linternas de cultivo de “concha de abanico” *Argopecten purpuratus* en bahía Samanco, Ancash, Perú Biología Acuática, Escuela de Biología en Acuicultura, Universidad Nacional del Santa, Perú; rloayza@uns.edu.pe.
- Mazouni, J., Gaertner, C., Deslous-Paoli, J. 1998. Influence of oyster culture on water column characteristics in a costal lagoon (Thau, France). *Hydrobiologia* 373-374:149-165.
- Merino, J. 2003. Cultivo masivo de microalgas de agua salada en laboratorio. Informe de actividades realizadas durante año sabático. Univ. Santa. Nuevo Chimbote, Peru.
- Moronta, R., Mora R. & Morales. 2006. Respuestas de la microalga *Chlorella Sarokinina* al pH, salinidad y temperatura en condiciones axénicas y no Axénicas. *Rev. Fac. Agrono-luz.*, 23:28 – 43.
- Padilla M. 1975, Crecimiento poblacional de *Tetraselmis suecica* en ambiente Controlado Departamento de Oceanografía, Universidad de Chile, Valparaíso *Revista de Biología Marina*. Vol. 15, No 3, p.287-296.
- Piña P., Medina M., Nieves M., Leal S., López J. y M. Guerrero 2007. Cultivo de cuatro especies de microalgas con diferentes fertilizantes utilizados en acuicultura.
- Ponte G. & M. Ruiz. 2013, Efecto del extracto acuosos de harina de pescado en el crecimiento poblacional y contenido de *b*-caroteno en *Dunaliella salina*, en condiciones de laboratorio Escuela Académico profesional de Biología En Acuicultura. 59p.
- Raven, J. 1988. Limits to growth. En: *Microalgal Biotechnology*. Borowitzka, M. & Borowitzka, L. (eds), pp: 257-287.
- Serpa, R. & A. Calderón 2006. Efecto de diferentes fuentes de nitrógeno en el contenido de carotenoides y clorofila de cuatro cepas peruanas de

Dunaliella salina Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima – Perú.
Rev. Ecología aplicada pp 93,99. ISSN 1726-2216.

Silva J.; Vásquez V. & F. Merino 2011. Producción de biomasa de *Tetraselmis suecica* empleando agua de mar con sanguaza. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Trujillo. Scientia Agropecuaria 2(2011) 13 – 23. 11p.

Spolaore P.; Joannis C.; Duran E. & I. Arsène. 2006, Commercial Applications of Microalgae, Laboratoire de Génie des Procédés et Matériaux, Ecole Centrale Paris, Vol. Paris France. 101, No. 2, 87–96. 10p.

Steel, R. B. & J. H. Torre. 1992. Bioestadística principios y procedimientos. Editorial Graf América. México 622p.

Sorokin, C. 1973. Dry weight, packed cell volume and optical density. 321–343 p. En: Stein, J. R. (Ed.). Hand book of phycological methods. Culture methods and growth measurements. Cambridge University Press. Cambridge, MA.USA. 448 p.

Torrentera, L. & A. Tacon. 1989. La producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura – Una diagnosis. Cultivo de microalgas. FAO. Disponible en URL:<http://www.fao.org/docrep/field/003/AB473S/AB473S00.htm#TOC>.

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. Edit. Limusa, México, D.F., México.

Uribe, E., Vega, 1993. Cultivo de microalgas. In 6 Curso Internacional en Cultivos de Moluscos, 25 de Octubre al 19 de Noviembre 1993. Univ. Católica del Norte, Facultad de Ciencias del Mar / JICA. Coquimbo, Chile. pp. 32–65.

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

X. ANEXOS

Anexo 1. Disposición de las unidades experimentales.



Anexo 2. Composición porcentual de los organismos presentes en el biofouling y

Organismos	MUESTRAS					Total (g)	%
	1	2	3	4	5		
<i>Ciona intestinalis</i>	47	25	38	27	49	186	18,6
<i>Tubularia sp</i>	4	91	35	95	60	345	34,5
<i>Semimytilus algosus</i>	75	61	106	56	61	359	35,9
<i>Polidora sp</i>	4	2	4	4	5	19	19,0
otros	10	21	17	18	25	91	9,1
Total (g)	200	200	200	200	200	1000	100
Condensados (mL)	138	142	141	140	139	700	70
Peso húmedo (g)	162	158	159	160	161	800	80

CVB obtenido.

Anexo 3. Densidad poblacional ($\times 10^6$ cél. mL^{-1}) de *T. suecica* con medio de cultivo CVB.

DÍA DE CULTIVO	CONTROL (GUILLARD F/2)			CVB (mL L^{-1})								
				45			60			75		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
0	18,00	18,00	18,00	18,00	18,00	18,00	18,00	18,00	18,00	18,00	18,00	18,00
1	40,00	65,20	31,20	37,20	48,80	72,00	53,60	60,80	70,40	44,00	75,20	40,80
2	51,60	89,20	134,80	136,80	100,40	101,20	108,00	116,00	149,00	93,20	100,20	100,80
3	151,60	127,20	149,20	109,60	174,80	133,60	196,40	157,60	175,20	135,60	137,20	148,00
4	183,60	215,20	217,60	217,60	165,60	178,00	199,60	229,20	238,40	138,40	167,60	165,20
5	218,00	218,40	210,00	226,40	194,80	171,20	232,80	256,40	243,60	111,60	134,40	121,60
6	191,20	194,40	204,00	215,60	151,20	145,60	182,00	194,40	229,20	111,20	106,80	105,60

Anexo 4. Valores de la Tasa de crecimiento (μ) y Tiempo de duplicación diaria (TD) poblacional de *T. suecica* con medio de cultivo CVB.

PARÁMETRO	CONTROL (GUILLARD F/2)			CVB (mL L^{-1})								
				45			60			75		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
N0	18,00	18,00	18,00	18,00	18,00	18,00	18,00	18,00	18,00	18,00	18,00	18,00
Nf	218,00	218,40	210,00	226,40	194,80	171,20	232,80	256,40	243,60	111,60	134,40	121,60

Día	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
μ (día ⁻¹)	0,499	0,499	0,491	0,506	0,476	0,450	0,512	0,531	0,521	0,365	0,402	0,382
TD (día)	1,389	1,389	1,412	1,370	1,456	1,540	1,354	1,305	1,330	1,899	1,724	1,815

Anexo 5. Valores de la biomasa, absorbancia, porcentaje y biomasa de clorofilas de *T. suecica* con medio de cultivo CVB y grupo control (Guillard f/2).

PARÁMETROS	CVB (mL L ⁻¹)											
	CONTROL (Guillard f/2)			45			60			75		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Biomasa (mg x50mL ⁻¹)	30,75	30,75	29,60	32,10	27,70	24,30	33,90	37,25	35,50	19,65	23,55	21,40
B Muestra (mg X 10mL ⁻¹)	6,15	6,15	5,92	6,42	5,54	4,86	6,78	7,45	7,10	3,93	4,71	4,28
A470	0,893	0,916	0,785	1,041	0,870	0,959	1,314	1,593	1,244	0,705	0,768	0,881
A645	0,457	0,396	0,407	0,493	0,505	0,553	0,751	0,733	0,707	0,313	0,469	0,418
A662	0,995	0,925	0,982	1,163	1,190	1,331	1,603	1,904	1,544	0,807	1,135	0,926
Clorofila a (ug mL ⁻¹)	10,62	9,94	10,58	12,51	12,80	14,34	17,07	20,65	16,48	8,75	12,23	9,90
Clorofila b (ug mL ⁻¹)	4,56	3,71	3,69	4,57	4,69	5,02	7,63	6,10	7,04	2,63	4,23	4,11
Carotenos (ug mL ⁻¹)	2,19	2,61	2,03	2,82	2,02	2,28	2,88	4,62	2,79	2,08	1,74	2,31
Clorofila a (%)	0,52	0,48	0,54	0,58	0,69	0,89	0,76	0,83	0,70	0,67	0,78	0,69
Clorofila b (%)	0,22	0,18	0,19	0,21	0,25	0,31	0,34	0,25	0,30	0,20	0,27	0,29
Carotenos (%)	0,11	0,13	0,10	0,13	0,11	0,14	0,13	0,19	0,12	0,16	0,11	0,16
Clorofila a (mg L ⁻¹)	3,20	2,95	3,20	3,72	3,82	4,33	5,15	6,18	4,97	2,63	3,67	2,95
Clorofila b (mg L ⁻¹)	1,35	1,11	1,12	1,35	1,39	1,51	2,31	1,86	2,13	0,79	1,27	1,24
Carotenos (mg L ⁻¹)	0,68	0,80	0,59	0,83	0,61	0,68	0,88	1,42	0,85	0,63	0,52	0,68

Anexo 6. Temperatura promedio (°C) en los cultivos de *T. suecica* con medio de cultivo CVB.

DÍA DE CULTIVO	CONTROL (GUILLARD F/2)	CVB (mL L ⁻¹)		
		45	60	75
0	25,3 ±0,0 ^a	25,3 ±0,0 ^a	25,3 ±0,0 ^a	25,3 ±0,0 ^a
1	25,2 ±0,1 ^a	25,2 ±0,0 ^a	25,2 ±0,1 ^a	25,2 ±0,1 ^a
2	24,7 ±0,3 ^a	24,7 ±0,3 ^a	24,8 ±0,1 ^a	24,9 ±0,1 ^a
DÍA DE CULTIVO	CONTROL (GUILLARD F/2)	CVB (mL L ⁻¹)		
		45	60	75
5	24,7 ±0,1 ^a	24,8 ±0,1 ^a	24,7 ±0,1 ^a	24,8 ±0,1 ^a
6	25,1 ±0,1 ^a	25,3 ±0,1 ^a	25,2 ±0,1 ^a	25,2 ±0,2 ^a

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

Anexo 7. Valores de pH promedio en los cultivos de *T. suecica* con medio de cultivo CVB y grupo control (Guillard f/2).

F/2)				
0	7,30 ±0,00 ^a	7,20 ±0,00 ^a	7,20 ±0,00 ^a	7,20 ±0,00 ^a
1	7,44 ±0,11 ^a	7,36 ±0,35 ^a	7,30 ±0,23 ^a	7,25 ±0,06 ^a
2	7,25 ±0,07 ^a	7,13 ±0,06 ^b	7,04 ±0,02 ^b	7,27 ±0,01 ^a
3	7,27 ±0,06 ^b	7,06 ±0,04 ^c	7,05 ±0,03 ^c	7,63 ±0,07 ^a
4	7,31 ±0,09 ^{ab}	7,18 ±0,09 ^b	7,19 ±0,09 ^b	7,43 ±0,04 ^a
5	7,29 ±0,04 ^a	7,35 ±0,03 ^a	7,35 ±0,03 ^a	7,43 ±0,10 ^a
6	7,30 ±0,02 ^b	7,28 ±0,02 ^b	7,30 ±0,02 ^b	7,35 ±0,03 ^a

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