

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



“Efecto de las diferentes concentraciones del extracto de ensilado de *Ulva lactuca*, sobre el crecimiento poblacional y contenido de lípidos de *Tetraselmis suecica*, en condiciones de laboratorio”

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO
ACUICULTOR

TESISTAS :

Martínez Castromonte, Cynthia Lisset

Pérez Chiroque, Jorge Alberto

ASESOR :

Blgo. Acui. Capa Robles, Willian Robert, MSc.

NUEVO CHIMBOTE- PERU
MARZO 2015

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



PROYECTO DE TESIS

Efecto de las diferentes concentraciones del extracto de ensilado de *Ulva lactuca*, sobre el crecimiento poblacional y contenido de lípidos de *Tetraselmis suecica*, en condiciones de laboratorio

Presentado por:

Martínez Castromonte, Cynthia Lisset

Pérez Chiroque, Jorge Alberto

Blgo. Acui. Capa Robles, Willian
ASESOR

Nuevo Chimbote – Perú
Marzo 2015

DEDICATORIA

Doy Infinitas Gracias.....

A Dios, por el camino recorrido.

A mis padres: Pedro y Rosario por su amor y apoyo.

A mis hermanas: karol y Astrid por su cariño sincero.

A la vida por lo aprendido.

Martínez, Cynthya

A Dios que siempre me ilumina, protege y cuida, porque me dio la sabiduría para emprender este camino y siempre me mantuvo con el optimismo de saber que la confianza en si mismo es el primer secreto del éxito.

Con especial cariño y eterna gratitud a mi padre y a mi adorada madre que desde el cielo me cuida y protege; mi familia por su ejemplo de trabajo y apoyo brindado.

Jorge

Pérez,

AGRADECIMIENTOS

A nuestro asesor, Blgo. Acui. Willian Capa Robles MSc., por su paciencia, guía, muestras de amistad y compromiso en asesoría de nuestra investigación.

A nuestra profesora, Blga. Acui. Sorayda Mendoza Espinoza, por su paciencia, guía en la asesoría de nuestra investigación.

A los docentes de la E.A.P Biología en Acuicultura, por sus enseñanzas y apoyo durante nuestra preparación profesional.

A nuestros amigos y compañeros de la Escuela Académica Profesional de Biología en Acuicultura, quienes nos brindaron su apoyo, respeto y aprecio.

CONTENIDO

	Pagina
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
INDICE DE TABLAS	iii
INDICE DE ANEXOS	iv
INDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN	vi
I. INTRODUCCION	1
II. MATERIALES Y MÉTODOS	4
2.1. Obtención de la cepa	4
2.2. Tratamiento del agua de mar	4
2.3. Preparación y volumen del Inóculo	5
2.4. Preparación de Medios de Cultivo	5
2.4.1. Medio Guillard f/2	5
2.4.2. Preparación del ensilado de <i>U. lactuca</i>	6
2.5. Preparación del Extracto de ensilado de <i>U. lactuca</i>	7
2.6. Acondicionamiento de unidades experimentales	7
2.7. Registro de parámetros ambientales	8
2.8. Determinación del crecimiento microalgal	8
2.8.1. Calculo de parámetros poblacionales	9
2.9. Determinación de Biomasa y Lípidos de <i>T. suecica</i> .	9
2.9.1. Cosecha de <i>T. suecica</i> .	9
2.9.2. Determinación de Biomasa Algal	9
2.9.3. Preparación de muestras para la determinación de Lípidos Totales	10
2.9.4. Determinación de Lípidos Totales	11

III. RESULTADOS	
3.1. Registro de Parámetros Ambientales del cultivo de <i>T. Suecica</i>	
3.1.1 Temperatura	
3.1.2 Ph	
3.2. Crecimiento Poblacional de <i>T. Suecica</i>	15
3.3 Constante de Crecimiento y Tiempo de Generación	16
3.4 Contenido de Lípidos y Biomasa Algal	17
IV. DISCUSIÓN	18
V. CONCLUSIONES	23
VI. RECOMENDACIONES	24
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	25
VIII. ANEXOS	32

INDICE ~ ~ TABLAS

	Página
Tabla 1. Constituyentes químicos del medio Guillard f/2 (Guillard, 1975)	5
Tabla 2. Composición química proximal del Extracto de ensilado de <i>U. lactuca</i> .	7
Tabla 3. Descripción de tratamientos, especificación y contenido de N del experimento de cultivo de <i>Tetraselmis suecica</i> con extracto de ensilado de <i>Ulva</i> , considerando tres repeticiones en cada tratamiento	7
Tabla 4. Registro de la temperatura de cultivo de <i>Tetraselmis</i> con diferentes concentraciones de extracto de ensilado biológico de <i>Ulva lactuca</i>	13
Tabla 5. Registro del pH de cultivo de <i>Tetraselmis</i> con diferentes concentraciones de extracto de ensilado biológico de <i>Ulva lactuca</i>	14
Tabla 6. Crecimiento poblacional ($\text{cel.ml}^{-1} \times 10^6$) de <i>T. suecica</i> , con tres concentraciones (0.4, 0.5 y 0.6 g.L^{-1}) del extracto de ensilado de <i>U. lactuca</i> .	15
Tabla 7. Parámetros poblacionales de <i>T. suecica</i> cultivadas en diferentes concentraciones extracto de ensilado de <i>U. lactuca</i> .	16
Tabla 8. Contenido de lípidos y Biomasa algal (ml.l^{-1}) de <i>T. suecica</i> , con tres concentraciones (0.4, 0.5 y 0.6 g.L^{-1}) del extracto de ensilado de <i>U. lactuca</i>	17

Anexo 1. Análisis de Varianza para el crecimiento poblacional en los diferentes tratamientos durante el periodo de experimentación.	32
Anexo 2. Prueba de Tukey para el crecimiento poblacional en los diferentes tratamientos en el día cuatro de muestreo.	32
Anexo 3. Prueba de Tukey para el crecimiento poblacional en los diferentes tratamientos en el día cinco de muestreo.	33
Anexo 4. Análisis de Varianza para Biomasa (mg L^{-1}), Lípidos (%) y Lípidos (mg L^{-1}).	33
Anexo 5. Prueba de Tukey para el contenido de Lípidos (%) en los diferentes tratamientos.	33
Anexo 6. Prueba de Tukey para el contenido de Lípidos (mg L^{-1}) en los diferentes tratamientos.	34

INDICE DE FIGURAS

iv

	Pagina
Fig. 1 Células de <i>T. suecica</i> observadas en un microscopio óptico compuesto a 40x.	4
Fig. 2 Esquema del proceso de tratamiento del agua de mar, según Merino <i>et al.</i> , (2003).	4
Fig. 3 Preparación del inoculo de las bacterias lácticas de yogurt (<i>Streptococcus thermophilus</i> y <i>Lactobacillus bulgaricus</i>)	6
Fig. 4 Acondicionamiento de unidades experimentales bajo condiciones controladas.	8
Fig. 5 Procedimiento para la determinación de Biomasa Algal	10
Fig. 6 Procedimiento para la preparación de muestras en la determinación de lípidos	10
Fig. 7 Protocolo empleado en la determinación de lípidos.	11
Fig. 8 Comportamiento de la temperatura de cultivo de <i>Tetraselmis</i> con diferentes concentraciones de extracto de ensilado biológico de <i>Ulva lactuca</i> .	13
Fig. 9 Comportamiento del pH de cultivo de <i>Tetraselmis</i> con diferentes concentraciones de extracto de ensilado biológico de <i>Ulva lactuca</i> .	14
Fig. 10 Crecimiento poblacional ($\times 10^6$ cel.ml ⁻¹) de <i>T. suecica</i> , con las diferentes concentraciones del extracto de ensilado de <i>U. lactuca</i> .	16

17

Fig. 11 Contenido de Lípidos y Biomasa algal (ml.l^{-1}) de *T. suecica*, con las diferentes concentraciones del extracto de ensilado de *U. lactuca*.

R v N

A efectos de evaluar la utilización de las diferentes concentraciones del extracto de ensilado de *Ulva lactuca*, sobre el crecimiento poblacional y contenido de lípidos de *T. suecica*, se realizaron ensayos en condiciones de laboratorio dosificando diversas concentraciones (0.4 , 0.5 y 0.6 g.L^{-1}) de Extracto de Ensilado de *Ulva lactuca* (EEUL) frente a un cultivo control, demostrándose que 0.5 g.L^{-1} de EEUL permite obtener los mejores crecimientos. El mayor crecimiento poblacional lo alcanzó el tratamiento con 0.5 g.L^{-1} de EEUL ($2,0500 \times 10^6 \text{ cel.ml}^{-1}$ y $1,6825 \times 10^6 \text{ cel.ml}^{-1}$) con diferencias significativas con respecto a los tratamientos de (0.4 y 0.6 g.L^{-1}) de EEUL, en relación a los días 5, 6 y 7, en que se observa un crecimiento desacelerado significativamente similar en todos los tratamientos empleados, tendiente a la fase de declinación del crecimiento algal. Las mejores velocidades de crecimiento y el mayor tiempo de duplicación (TD) en *T. suecica*, se aprecia con el tratamiento de 0.5 g.L^{-1} EEUL y el tratamiento control; y las menores, con 0.4 y 0.6 g.L^{-1} EEUL; con lo que esta concentración del EEUL demuestra superioridad en relación a los demás tratamientos. La mayor concentración de lípidos lo obtuvo el tratamiento con 0.5 g.L^{-1} de EEUL ($155,166 \text{ mg l}^{-1}$), mientras que el tratamiento con 0.6 g.L^{-1} de EEUL es inferior ($74,333 \text{ mg.l}^{-1}$) a los demás tratamientos. La mayor biomasa algal se obtuvo con el tratamiento con 0.5 g.L^{-1} de EEUL ($470,226 \text{ mg.l}^{-1}$), los cuales no presentaron diferencias.

Palabras clave: *T. suecica*, *Ulva lactuca*, crecimiento, lípidos, ensilado.

ABSTRACT

vi

In order to evaluate the use of different concentrations of the extract of *Ulva lactuca* silage on population growth and lipid content of *T. suecica*, tests were conducted under laboratory conditions dosing various concentrations (0.4, 0.5 and 0.6 g.L⁻¹) Extract silage *Ulva lactuca* (EEUL) versus a control culture, showing that 0.4 g.L⁻¹ EEUL allows best growths. The greatest population growth overtook treatment with 50 ml. EEUL l⁻¹ (2,0500 x 10⁶ cel.ml⁻¹ y 1,6825 x 10⁶ cel.ml⁻¹) with significant differences in the treatments 0.4 and 0.6 g.L⁻¹ EEUL, in relation to day 5, 6 and 7 wherein a growth slowed significantly similar in all treatments used, aimed at the phase of decline of algal growth was observed. The best growth rates and increased doubling time (TD) in *T. suecica*, seen with treatment of 0.5 g.L⁻¹ EEUL and control treatment; and lower, with 0.4 and 0.6 g.L⁻¹ EEUL; with this concentration of EEUL demonstrates superiority over other treatments. The highest concentration of lipid was obtained by treatment with 0.5 g.L⁻¹ EEUL (155.166 mg l⁻¹), whereas treatment with 0.6 g.L⁻¹ EEUL is lower (74.333 mg.l⁻¹) other treatments. Most algal biomass was obtained with treatment with 0.5 g.L⁻¹ EEUL (470,226 mg.l⁻¹), which did not differ.

Keywords: *T. suecica*, *Ulva lactuca*, growth, lipid, silage.

I. INTRODUCCION

La industria de los productos naturales es una de las más prometedoras en el suministro de alimento para la población mundial y que con el fin de asegurar su sostenibilidad ha mostrado un gran interés por el cultivo de microalgas de forma intensiva, debido a la necesidad de obtener alimentos sanos y de alto valor bioquímico, tal como resultan las vitaminas, pigmentos, fitol, aminoácidos, polisacáridos, glicerol, enzimas, promotores de crecimiento, ceras, fosfolípidos, lecitinas, ácidos grasos esenciales y prostaglandinas, obtenidos de los cultivos algales; así como la utilización de los carbohidratos y lípidos algales para la producción de combustibles líquidos (Gómez, 2007).

Las microalgas también vienen siendo usadas como alimento vivo en acuicultura, considerando su alto valor alimenticio, su tamaño, digestibilidad y fácil capturabilidad para la cría de larvas y estadios juveniles de moluscos, crustáceos y peces sometidos a cultivo (Farías & Uriarte, 2002). Asimismo Garibay *et al.* (2009), señalan que los lípidos de las microalgas constituyen del 20 al 50% del peso seco, sin embargo se han reportado valores superiores al 80% en la especie (*Neochloris oleoabundans*), mientras que la especie *Tetraselmis suecica*, alcanza niveles lipídicos en un rango del 15.0 al 23.0% de su peso seco, siendo rangos importantes para su empleo en la producción acuícola.

Estos microorganismos fotosintéticos para su crecimiento y metabolismo en general necesitan cubrir sus requerimientos nutritivos esenciales a través de medios de cultivo; además que requieren del acondicionamiento de diferentes factores ambientales como la luz, temperatura CO₂, pH, fotoperiodo y nutrientes, usando moléculas orgánicas y micronutrientes como catalizadores (Becker, 2004), a fin de producir los lípidos, proteínas y carbohidratos en cantidades significativas en periodos cortos de tiempo tal como resulta el crecimiento algal (Palomino *et al.*, 2010).

Los diferentes medios para el cultivo de microalgas van desde las fórmulas para enriquecer el agua de mar natural, hasta el uso de medios artificiales; la selección de un medio químico adecuado es el primer paso y el más importante para el éxito del cultivo (Paniagua *et al.*, 1989). Generalmente, el uso de los medios antes mencionados, ha incrementado los costos de producción de la biomasa de estos microorganismos, lo que ha obligado a las

empresas acuícolas e investigadores a la búsqueda de alternativas económicas y viables de medios de cultivo de microalgas (Castro *et al.*, 2003; Rosales *et al.*, 2007).

Una alternativa a los medios de cultivo tradicionales como el medio Guillard f/2, son los sustratos orgánicos, mayormente subproductos de otras industrias y en cuya composición se encuentran fuentes de C, N, P, microelementos y oligoelementos. Entre ellas tenemos a las harinas (de pescado, soya, lombriz de tierra, girasol), gallinaza, gas, aceites, melaza de caña, exudados gomosos, residuos pesqueros como la sanguaza y macroalgas (Herrero *et al.*, 1994).

En la Costa Peruana, la macroalga *Ulva lactuca* se acumula en grandes cantidades como consecuencia de las varazones generadas por los movimientos de las mareas y de aquellos propios del mar en diferentes épocas del año. Esta materia no utilizada provoca problemas de contaminación ambiental sobretodo porque se acumulan y descomponen, generando sustancias toxicas en las zonas litorales; sin embargo, esta materia puede ser aprovechada eficientemente si recibe un buen tratamiento para transformarlos y utilizarlo en las industrias alimentaria y farmacéutica. Otra de las aplicaciones es la producción y uso del extracto de ensilado de *Ulva lactuca*, como medio de cultivo alternativo de microalgas (Aldon *et al.*, 2008).

Desde el punto de vista biológico, la fermentación bacteriana permite una mejor digestibilidad del componente celulósico que contiene la biomasa algal, por lo que las técnicas industriales basadas en ellas tienen un gran potencial (Berenz, 1996). Por lo tanto el proceso de ensilado consiste en estabilizar desechos o residuos de diversas industrias con bajo valor comercial, mediante la adición de ácidos orgánicos, inorgánicos, sal, mezcla de ellos o fermentación bacteriana. El producto obtenido es estable, química y microbiológicamente, permitiendo almacenarse a temperatura ambiente por un largo período de tiempo (Tetterson & Windsor, 1995).

Aldon *et al.* (2008) trabajaron con un ensilado de *Ulva lactuca* extraída de La Punta (Callao), producido a partir de un consorcio de bacterias ácidos lácticas (B-Lac) y evaluado como bioabono mediante ensayo en invernadero (macetería) utilizando las primeras etapas del crecimiento de maíz, determinando que la composición de macroelementos y los niveles de nitrógeno fueron similares a los hallados inicialmente en esta macroalga.

La aplicación de este ensilado biológico incrementó la producción de materia seca en el maíz con respecto al control (rendimientos superiores al 15%) y también se obtuvieron tamaños superiores en plantas con ensilado respecto al control.

La información sobre la utilización de ensilados vegetales en los cultivos microalgales, se ha podido encontrar en trabajos de dos especies de fitoplancton marino bajo condiciones controladas, utilizando extractos líquidos de la macroalga *Macrocystis pyrifera* y del pasto marino *Zostera marina* como medio de cultivo, demostrándose el mayor crecimiento en las microalgas *Monochrysis lutheri* y *Skeletonema costatum*, en 50 ml.l⁻¹ del medio de cultivo (Paniagua & Bückle, 1985).

Por lo que en el presente trabajo se plantea el siguiente problema de investigación; ¿Cuál será el efecto de diferentes concentraciones del extracto de ensilado de *Ulva lactuca* sobre el crecimiento poblacional y contenido de lípidos de *T. suecica*, en condiciones de laboratorio?, asimismo la hipótesis de investigación es, si en condiciones de laboratorio se utiliza como medio de cultivo el extracto de ensilado de *U. lactuca* en concentraciones de 50 ml l⁻¹, se obtendrá mayor crecimiento poblacional y contenido de lípidos de *T. suecica*.

Se planteó como objetivo general, determinar el efecto de las diferentes concentraciones (0.4, 0.5 y 0.6 g.L⁻¹) del extracto de ensilado de *Ulva lactuca* sobre el crecimiento poblacional y contenido de lípidos de *T. suecica*, en condiciones de laboratorio; y como objetivos específicos:

- Determinar el crecimiento poblacional (cel.ml⁻¹) de *T. suecica*, con tres concentraciones (0.4, 0.5 y 0.6 g.L⁻¹) del extracto de ensilado de *U. lactuca* en condiciones de laboratorio.
- Determinar el contenido de lípidos (ml.l⁻¹) de *T. suecica*, con tres concentraciones (0.4, 0.5 y 0.6 g.L⁻¹) del extracto de ensilado de *U. lactuca* en condiciones de laboratorio.

Desde el punto de vista socioeconómico y ambiental este proyecto de investigación es de vital importancia ya que analiza el aprovechamiento del ensilado de la macroalga *Ulva lactuca* en la elaboración de un medio alternativo para el cultivo de microalgas con fines de producción de biomasa y de lípidos de interés económico.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo experimental se realizó en el Laboratorio de Tesistas de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional del Santa, entre los meses de julio-agosto del 2014.

2.1. Obtención de la cepa

La cepa de la microalga marina *T. suecica* (Fig. 1) fue obtenida del laboratorio de Cultivos de Especies Auxiliares de la Escuela de Biología en Acuicultura de la Universidad Nacional del Santa, la misma que fue adaptada al medio Guillard f/2 y se mantuvo en condiciones de axenidad.

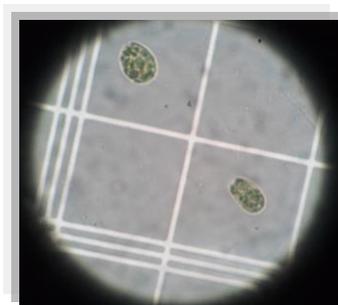


Fig.1. Células de *T. suecica* observadas en un microscopio óptico compuesto a 40x.

2.2 Tratamiento del agua de mar

El agua de mar empleada fue colectada de la playa “El Dorado” (Bahía de Samanco). En la fig. 2, se esquematiza el proceso propuesto por Merino *et. al.* (2003), para eliminar las impurezas, el agua fue filtrada con una malla de 2μ de diámetro, luego se adicionó 1 ml de hipoclorito de sodio por cada litro de agua de mar, dejándola reposar por 24 horas. Posteriormente se neutralizó con tiosulfato de sodio a razón de 1 ml por



Fig. 2. Esquema del proceso de tratamiento del agua de mar, según Merino *et. al.*, (2003).

cada litro de agua de mar, seguidamente se le colocó aireación. El proceso de neutralización permitió eliminar los microorganismos que puedan interferir con el crecimiento algal.

2.3. Preparación y volumen del Inóculo

Los inóculos se prepararon con agua de mar tratada y medio Guillard f/2, manteniéndolos en matraces de 100 ml con un volumen de cultivo de 50 a 80 ml. Y recibieron, agitación mecánica y periódica, iluminación constante (2000 lux). Posteriormente, una vez que los inóculos alcanzaron su máximo fueron colocados en matraces de 1000 ml.

2.4 Preparación de Medios de Cultivo

2.4.1. Medio Guillard f/2

El medio Guillard fue preparado utilizando agua de mar, la misma que contiene las sustancias químicas aportadoras de los macro y micronutrientes según los estándares establecidos por Guillard, 1975 (tabla 1), en la Escuela de Biología en Acuicultura de la Universidad Nacional de Santa, para mantener los cultivos de inóculos y así como los cultivos controles de presente experiencia.

Tabla 1. Constituyentes químicos del medio Guillard f/2 (Guillard, 1975).

Compuesto	Concentración (mg. L ⁻¹)
Macronutrientes	
NaNO ₃	75.0
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	5.0
Na ₂ SiO ₃ 9H ₂ O	30.0(+5.0 ml HCl)
NH ₄ Cl	26.5
Micronutrientes	
Na ₂ EDTA	4.36
FeCl ₃ 6H ₂ O	3.15
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.01
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.022
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.01
MnCl ₂ 4H ₂ O	0.18
Na ₂ MnO ₄ 2H ₂ O	0.0016
Vitaminas	
Tiamina	0.0001
Biotina	0.5
Cyanocobalamina	0.5

2.4.2 Preparación del ensilado de *Ulva Lactuca*

Se usó el método propuesto por el ITP (1995), para lo cual se colectó 200 g de la macroalga *U. lactuca* de la playa “El Dorado”, posteriormente se colocaron sobre tamices, y colocado en la estufa para su secado por unas 5 horas a 50°C, posteriormente se realizó la molienda con la ayuda de un molino manual de carne de 3mm de diámetro. Una vez obtenida la harina de la macroalga, se procedió a mezclar con la melaza a 5 % y el inóculo de las bacterias lácticas de yogurt 10 % hasta obtener un homogenizado. Finalmente, se procedió a inocular la pasta con bacterias lácticas de yogurt (*Streptococcus termophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*), los que se prepararon sembrando 5 ml de un cultivo madre de yogurt, en 100 ml de leche pasteurizada y se incubó a 45°C durante 4 horas (fig. 3). La fermentación se realizó en frascos cónicos de vidrio de 200 ml de capacidad previamente esterilizados en una autoclave. Tanto la concentración de melaza, sacarosa e inóculo de bacterias lácticas de yogurt, estuvieron en función de la concentración de la harina de *U. lactuca*. Todas las muestras se incubaron a 40°C por 48 horas.



Fig. 3. Preparación del inóculo de las bacterias lácticas de yogurt (*Streptococcus termophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*)

2.5 Preparación del extracto de ensilado *U. lactuca* (EEUL)

Aproximadamente 10 g de extracto de ensilado de *U. lactuca* se disolvieron en 1L de agua de mar, y a partir de esta solución, se dosificaron las concentraciones de (0.4, 0.5 y 0.6 g.L⁻¹) de extracto de ensilado de *U. lactuca* por litro de medio de cultivo. Aldon *et al.* (2008) mencionan que la composición de macroelementos y los niveles de nitrógeno pueden ser similares a los hallados inicialmente en *U. lactuca*. Además no existen pérdidas de nitrógeno como gas debido al bajo pH por acción del ácido láctico. Los niveles altos de potasio están relacionados a las altas concentraciones de este elemento en *U. lactuca* y principalmente en la melaza de caña. En relación a los microelementos, las altas concentraciones de hierro en el ensilado se relacionan a los altos niveles de este elemento en la composición de esta alga.

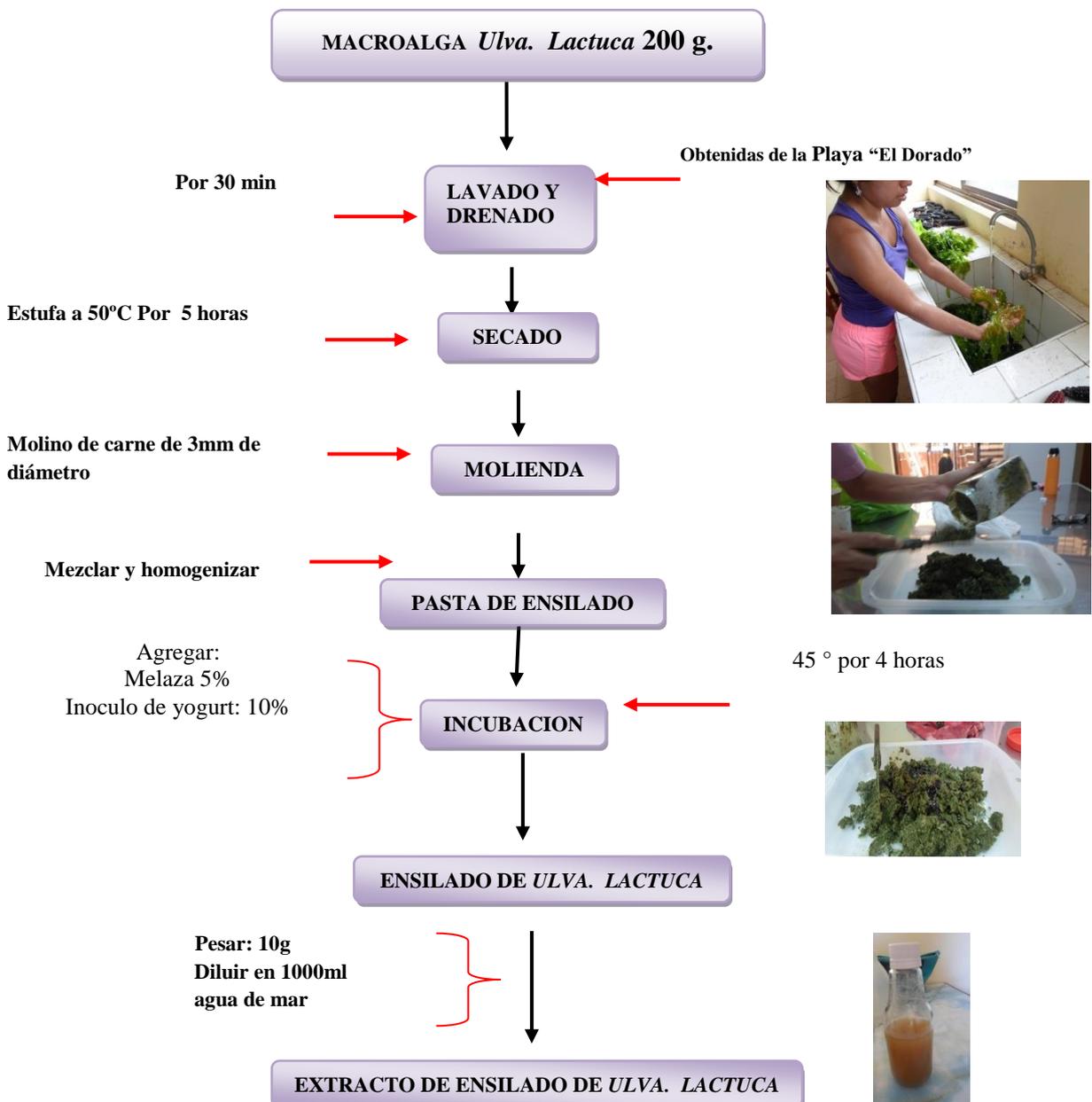


Tabla 2. Composición química del ensilado de *U. lactuca* (Aldon *et al.*, 2008)

Macroelementos					Microelementos				
<i>N</i>	<i>P</i>	<i>K</i>	<i>Ca</i>	<i>Mg</i>	<i>Cu</i>	<i>Zn</i>	<i>Mn</i>	<i>Fe</i>	<i>B</i>
%	%	%	%	%	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm
2.46	0.16	6.79	0.75	1.9	17.5	30	25.5	994.5	62.3

2.6 Descripción y acondicionamiento de unidades experimentales

Se empleó el diseño estímulo creciente (Steel & Torrie, 1998) con un tratamiento control y tres tratamientos experimentales, de tres repeticiones cada uno (Tabla 3).

Tabla 3. Descripción de tratamientos, especificación y contenido de N del experimento de cultivo de *Tetraselmis suecica* con extracto de ensilado de *Ulva*, considerando tres repeticiones en cada tratamiento.

Tratamientos	Especificaciones	Contenido de N (mg.l ⁻¹)
Tc	Cultivo de <i>T. suecica</i> con medio Guillard f/2 (Control)	12.35
T1	Cultivo de <i>T. suecica</i> con 0.4 g.L ⁻¹ de EEUL	9.84
T2	Cultivo de <i>T. suecica</i> con 0.5 g. L ⁻¹ de EEUL	12.30
T3	Cultivo de <i>T. suecica</i> con 0.6 g.L ⁻¹ de EEUL	14.76

Las experiencias se realizaron en 12 botellas plásticas de 1,5 l (con 1 l de volumen efectivo de cultivo), con una concentración celular promedio de 0.250 x 10⁶ cel.ml⁻¹.



Fig. 4. Acondicionamiento de unidades experimentales bajo condiciones controladas.

2.7 Registro de los parámetros ambientales del cultivo algal

Se registró diariamente el pH de los cultivos usando un pH-ímetro digital Checker 1 con + 0,01 de sensibilidad; también se determinó la temperatura del cultivo algal como la del ambiente utilizando un termómetro de mercurio de 0.1 °C de sensibilidad. Con iluminación constante la cual fue suministrada por 2 fluorescentes de 40 w, ubicados a 10 cm de los cultivos algales (Fig. 4). Se suministró aireación constante mediante un Blower de ½ HP, a través de tuberías calibradas a razón de 200 ml⁻¹, proporcionando agitación y aire de forma permanente a los cultivos.

2.8 Determinación del crecimiento microalgal

Se extrajo 0.1 ml de la solución algal haciendo uso de una micropipeta Pasteur la cual se colocó en una cámara de Neubauer y cubrió con una laminilla para luego ser observada al microscopio óptico compuesto binocular marca Nikon. El conteo se hizo en los cuatro campos tomados al azar. Para cada repetición se cargó dos o tres veces, obteniendo el número de células, luego se obtuvo el promedio que corresponde a la densidad celular en base a las células por campo.

El crecimiento algal se evaluó cada 24 horas determinando sobre la base del aumento en el número de células.

2.8.1. Cálculos de parámetros poblacionales

Se obtuvo el crecimiento logístico del cultivo mediante los siguientes métodos.

A. Tasa de crecimiento específico (μ), o constante de crecimiento

Señala la velocidad de crecimiento del cultivo. Se determinó según recomendaciones de Environmental Protection Agency (1971), modificado por Guillard (1973) y citado en Velarde (1984) de la forma siguiente:

$$\mu = \ln (N_1/N_0) / T_1 - T_0$$

Dónde: u = Constante de crecimiento (día^{-1}), N = Numero de cel.ml⁻¹) al tiempo T_0 = Tiempo inicial, t_i = Tiempo final.

B. Tiempo de duplicación (T.D)

Es el tiempo necesario para crecer la población al doble de la cantidad del período precedente. Se determinó según recomendaciones de De la Cruz y Alfonso (1975) mencionado en Velarde (1984):

$$T.D = \ln(2) / u$$

2.9 Determinación de biomasa y lípidos de *T. suecica*.

2.9.1 Cosecha de *T. suecica*.

Una vez que los cultivos algales alcanzaron la fase final del crecimiento logarítmico se procedió a interrumpir la aireación a fin de favorecer la sedimentación algal como paso previo para la obtención de las muestras para los análisis químicos.

2.9.2 Determinación de Biomasa Algal

Para la cuantificación de la biomasa algal se filtro 50 ml de muestra en papel filtro, para luego ponerlos a la estufa a 60 ° C por 3 horas, finalizado este periodo se procedió a pesar las muestras. (Fig. 5).



Fig. 5. Procedimiento para la determinación de Biomasa Algal

El cálculo de la biomasa seca se realizó de acuerdo a la formula siguiente.

$$Biomasa\ total\ (mg\ L^{-1}) = \frac{(P2 - P1)}{50} \times 1000$$

Donde:

P1: Peso inicial (papel) (mg)

P2: Peso final (papel + muestra) (mg)

2.9.3 Preparación de muestras para la determinación de Lípidos Totales.

La determinación de lípidos totales se efectuó para cada tratamiento al final de la fase exponencial, tomándose 2 ml de cultivo y centrifugado a 1000 rpm por 5

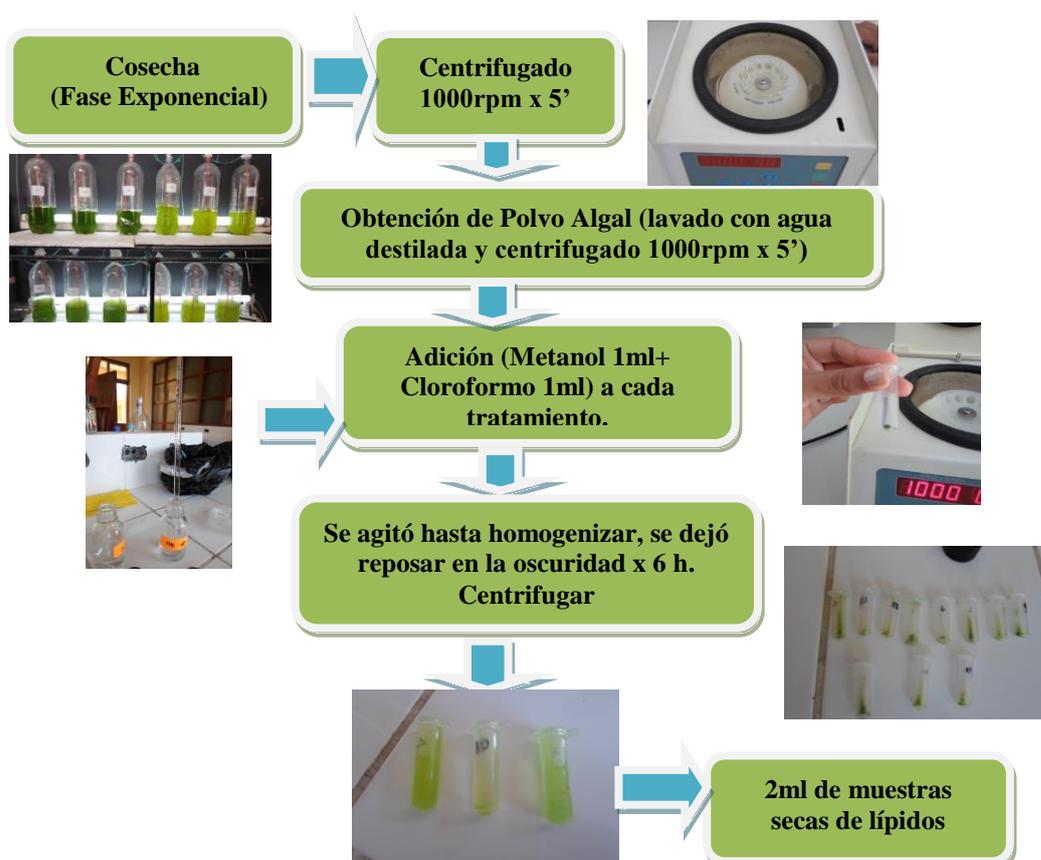


Fig. 6. Procedimiento para la preparación de muestras en la determinación de lípidos minutos. El concentrado fue lavado con agua destilada y nuevamente centrifugado a) 1000 rpm, por 5 minutos. Se le agregó metanol + cloroformo a cada tratamiento, se agitó hasta homogenizar, se dejó reposar en la oscuridad por 6 horas. Centrifugar a 1000 rpm hasta obtener muestras secas. (Fig. 6), según Dubois (1956) y Bligh & Dyer (1959).

2.9.4 Determinación de Lípidos Totales

La determinación de los lípidos totales de *Tetraselmis suecica*, se realizó mediante la técnica modificada por Bligh *et al.* (1959) y Marsh *et al.* (1966)

para lo cual se tomaron las muestras secas obtenidas en el primer procedimiento, se extrajo el líquido obtenido de la centrifugación y se agregó 2ml de ácido sulfúrico concentrado y se llevó a ebullición a 155° C por 1 hora aproximadamente, dejándolo enfriar en agua, posteriormente se realizó la lectura espectrofotométrica a 375 nm (fig. 7).

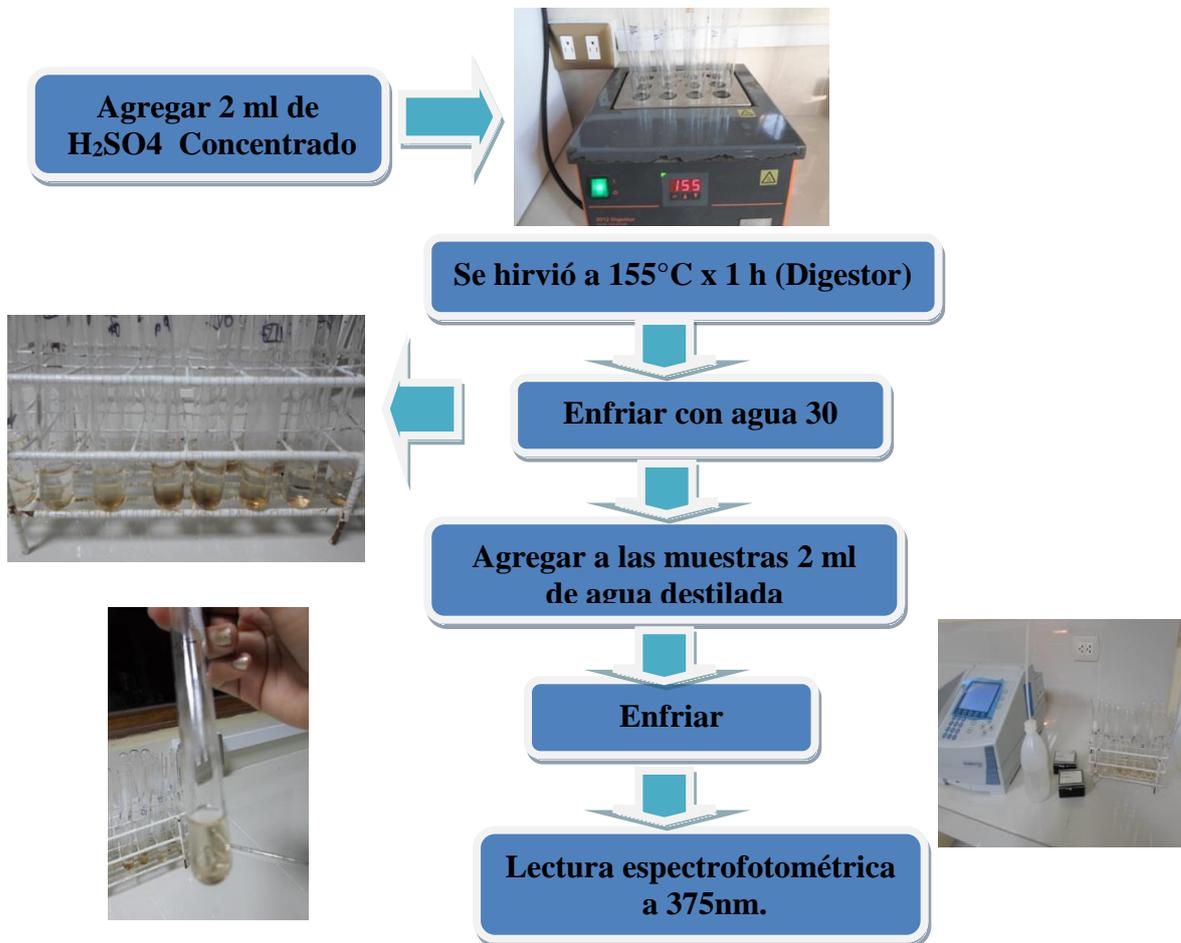


Fig. 7. Protocolo para la determinación de lípidos de *T. suecica* cultivada con EEUL.

La ecuación general para determinar el contenido de los lípidos, en base a porcentaje (%) es la siguiente:

$$\text{Lípidos (\%)} = \frac{\left(\left(\frac{\text{Absorbancia}}{1,7256} \right) \times V \right)}{M} \times 100$$

Donde:

V: Volumen final de muestra analizada (5 mL)

M: Peso seco (mg) en 10 mL de cultivo

Para determinar los lípidos totales (mg L^{-1}), los datos obtenidos se reemplazaron en la siguiente fórmula:

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

Donde:

P: Porcentaje de lípidos (%)

B: Biomasa seca total por litro (mg)

III. RESULTADOS

3.1. Registro de parámetros ambientales del cultivo de *T. Suecica*

3.1.1. Temperatura

La temperatura ambiental se mantuvo en un rango que osciló entre 22,3 y 22,5 °C; mientras que la temperatura de los cultivos algales estuvieron en un rango que varió entre 22,1 y 23,8°C (tabla 4 y fig. 8).

Tabla 4. Registro de la temperatura de cultivo de *Tetraselmis* con diferentes concentraciones de extracto de ensilado biológico de *Ulva lactuca*

Día de cultivo	Tratamiento EEUL (ml.l ⁻¹)			
	Guillard f/2	40	50	60
0	22.5	22.5	22.5	22.5
1	23.5	23.8	22.5	22.7
2	22.3	23.7	23.2	23.3
3	23.8	22.5	23.5	22.5
4	23.7	23.7	22.1	22.2
5	22.5	22.5	22.7	22.1
6	23.5	23.2	22.5	22.1
7	22.5	23.2	22.6	22.7

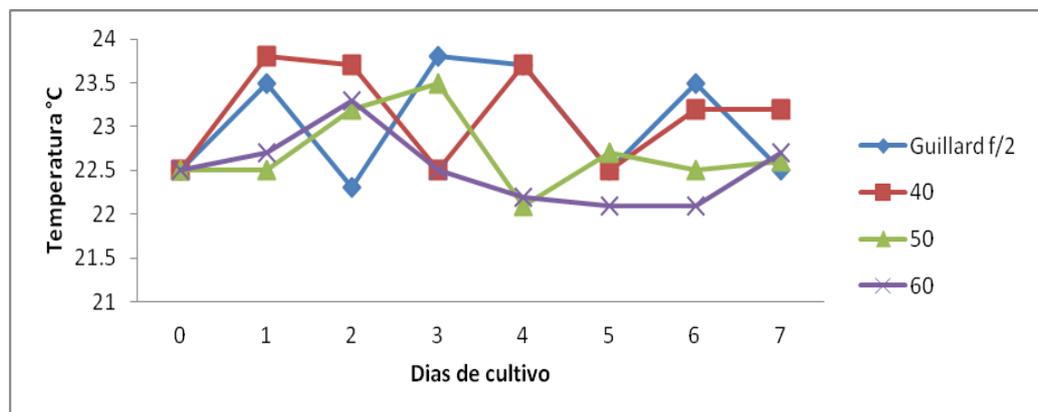


Fig. 8. Comportamiento de la temperatura de cultivo de *Tetraselmis* con diferentes concentraciones de extracto de ensilado biológico de *Ulva lactuca*.

Durante el desarrollo de la experiencia, la temperatura de los medios de cultivo, tanto del tratamiento control como de los tratamientos experimentales tuvieron un comportamiento normal al rango establecido para los cultivos algales lo cual permitió descartar a la temperatura como un factor limitante del crecimiento de *T. suecica* en este experimento.

3.1.2. pH

Durante el desarrollo de la experiencia se observó una ligera variación en el pH de los cultivos de *T. suecica* que oscilaron en un rango de 7,4 a 8,5 (tabla 5 y fig. 9).

Tabla 5. Registro del pH de cultivo de *Tetraselmis* con diferentes concentraciones de extracto de ensilado biológico de *Ulva lactuca*

Día de cultivo	Tratamiento EEUL (ml.l ⁻¹)			
	Guillard f/2	40	50	60
0	7,4	7,4	7,4	7,4
1	7,8	8,1	8,3	8,1
2	7,8	8,3	8,1	8,3
3	8,0	8,2	8,5	8,3
4	8,0	8,1	8,2	8,2
5	8,1	8,3	8,4	8,2
6	8,1	8,5	8,2	8,1
7	8,3	8,2	8,2	7,9

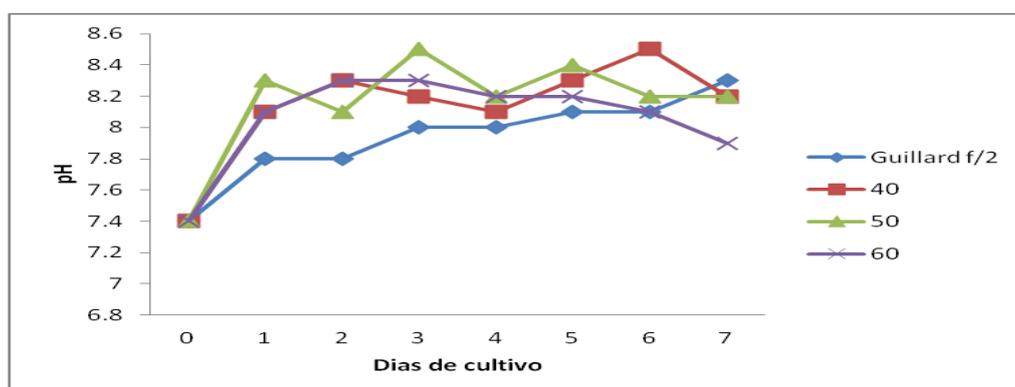


Fig. 9. Comportamiento del pH de cultivo de *Tetraselmis* con diferentes concentraciones de extracto de ensilado biológico de *Ulva lactuca*.

Durante el desarrollo de la experiencia, el pH de los medios de cultivo tanto del tratamiento control como de los tratamientos experimentales tuvieron un comportamiento normal al rango establecido para los cultivos algales lo cual permitió descartar al pH como un factor limitante del crecimiento de *T. suecica* en este experimento.

3.2. Crecimiento poblacional de *T. suecica*.

En la tabla 6 y fig. 10, se observa el crecimiento poblacional de *T. suecica*, en los diferentes medios de cultivos tanto en el medio Guillard f/2 como en las concentraciones de (0.4, 0.5 y 0.6 g.L⁻¹) del extracto de ensilado de *U. lactuca*, los cuales no muestran diferencias significativas (p>0.05) en los tres primeros días de cultivo. El cuarto día de cultivo, se alcanza el máximo crecimiento de *T. suecica*, con los tratamientos del medio Guillard f/2 y con 0.5 g.L⁻¹ de EEUL (2,0500 x 10⁶ cel.ml⁻¹ y 1,6825 x 10⁶ cel.ml⁻¹, respectivamente) con diferencias significativas (p < 0,05) con respecto a los tratamientos de (0.4 y 0.6 g.L⁻¹) de EEUL.

Tabla 6. Crecimiento poblacional (cel.ml⁻¹ x 10⁶) de *T. suecica*, con tres concentraciones (0.4, 0.5 y 0.6 g.L⁻¹) del extracto de ensilado de *U. lactuca*.

Días de Muestras	Tratamientos EEUL (ml. L ⁻¹)			
	GUILLARD f/2	40	50	60
0	0,2500 ^a	0,2500 ^a	0,2500 ^a	0,2500 ^a
1	0,5150±0,0115 ^a	0,5125±0,0563 ^a	0,5900±0,1918 ^a	0,4100±0,1489 ^a
2	0,5683±0,0052 ^a	0,6700±0,1009 ^a	0,6525±0,2179 ^a	0,5700±0,0829 ^a
3	1,7975±0,4333 ^a	0,7100±0,5457 ^a	0,9975±0,4714 ^a	0,8075±0,3691 ^a
4	2,0500±0,9049 ^b	0,9800±0,1353 ^a	1,6825±0,0938 ^{ab}	1,0075±0,0354 ^a
5	2,3000±0,5879 ^b	1,4100±0,3398 ^{ab}	1,8648±0,1517 ^a	1,4400±0,0922 ^{ab}
6	2,4325±0,0488 ^a	1,3480±0,3911 ^a	1,1575±0,5239 ^a	1,6475±0,5921 ^a
7	2,4075±0,6001 ^a	1,0275±0,2513 ^a	1,0150±0,8509 ^a	1,5225±0,5102 ^a

*Los datos con letras diferentes, presentan diferencias significativas para Tukey (p < 0,05).

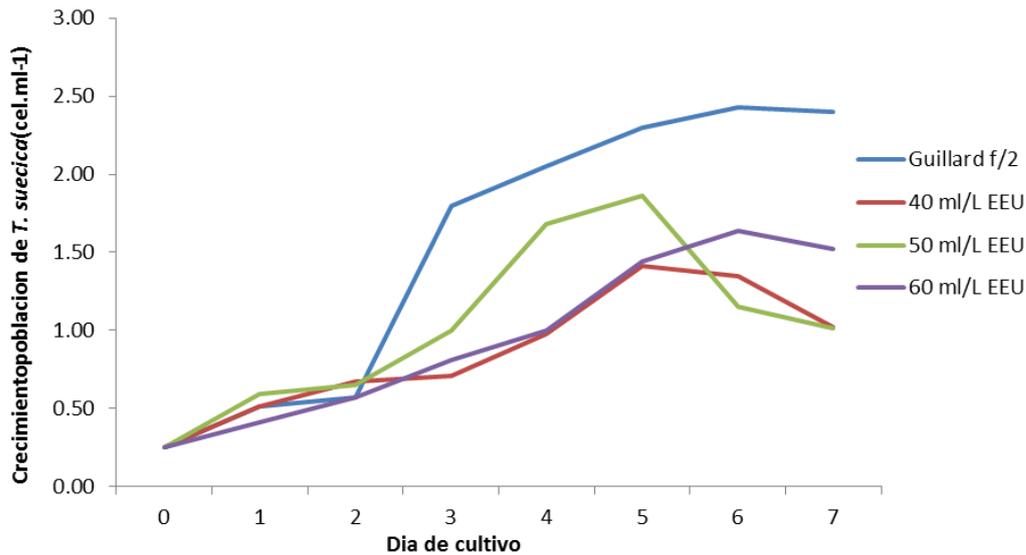


Fig. 10. Crecimiento poblacional ($\times 10^6$ cel.ml⁻¹) de *T. suecica*, con las diferentes concentraciones del extracto de ensilado de *U. lactuca*.

3.3. Constante de crecimiento y tiempo de duplicación de *T. suecica*.

En la tabla 7, se observan los parámetros poblacionales del crecimiento de *T. suecica*, en los diferentes medios de cultivos tanto en el medio Guillard f/2 como con las diferentes concentraciones de extracto de ensilado de *U. lactuca*, los cuales muestran diferencias significativas ($p < 0,05$) (Anexo 4); apreciándose que con el tratamiento de 0.5 g.L⁻¹ EEUL y el control se obtienen las mejores velocidades de crecimiento en *T. suecica*, y las menores, con (0.4 y 0.6 g.L⁻¹) EEUL. Un comportamiento similar con el tiempo de duplicación algal (TD), siendo los tratamientos de 0.5 g.L⁻¹ EEUL y el control que reportan los mejores valores TD; con lo que esta concentración del EEUL demuestra superioridad en los parámetros poblacionales en relación a los demás tratamientos empleados en este trabajo.

Tabla 7. Parámetros poblacionales de *T. suecica* cultivadas en diferentes concentraciones extracto de ensilado de *U. lactuca*.

	Tratamientos EEUL (ml. L ⁻¹)			
	Guillard f/2	40	50	60
Densidad inicial (cel.ml ⁻¹ x 10 ⁶)	0,2500±0,0001 ^a	0,2500±0,0001 ^a	0,2500±0,0001 ^a	0,2500±0,0001 ^a

Densidad final (cel.ml ⁻¹ x 10 ⁶)	2,0500±0,9049 ^a	0,9800±0,1353 ^b	1,6825±0,0938 ^{ab}	1,0075±0,0354 ^b
Constante de crecimiento (μ)	0,2285±0,0159 ^a	0,1486±0,0075 ^b	0,2067±0,0186 ^{ab}	0,1512±0,4338 ^b
Tiempo de duplicación (TD)	0,6413±0,0769 ^a	0,8294±0,0390 ^b	0,6867±0,0766 ^{ab}	0,8215±0,3801 ^b

*Los datos con letras iguales, no presentan diferencias significativas para Tukey (p > 0,05).

3.4. Contenido de Lípidos y Biomasa algal

En la tabla 8, se observa que no existe diferencias significativas en la biomasa en relación a los tratamientos empleados (p>0.05), no obstante el tratamiento con 0.5 g.L⁻¹ de EEUL, muestra mayor biomasa (470,266 mg L⁻¹), mientras que el tratamiento con 0.4 g.L⁻¹ de EEUL, presenta la menor biomasa (331,667 mg L⁻¹). Por otra parte, para el porcentaje (%) y contenido de Lípidos (mg L⁻¹), el tratamiento con 0.5 g.L⁻¹ de EEUL es el cual presenta el mayor contenido de lípidos (155,166 mg L⁻¹), mientras que el tratamiento con 0.6 g.L⁻¹ de EEUL es inferior (74,333 mg L⁻¹) a los demás tratamientos. (tabla 8 y fig. 11).

Tabla 8. Contenido de lípidos y Biomasa algal (ml.l⁻¹) de *T. suecica*, con tres concentraciones (0.4, 0.5 y 0.6 g.L⁻¹) del extracto de ensilado de *U. lactuca*

	Tratamientos EEUL (ml. L ⁻¹)			
	GUILLARD f/2	40	50	60
Biomasa (mg L⁻¹)	504,60±130,707 ^a	331,667±53,898 ^a	470,266±190,625 ^a	432,700±112,144 ^a
Lípidos (%)	22,09 ^b	31,23 ^a	32,99 ^a	17,18 ^b
Lípidos (mg L⁻¹)	111,467±26,712 ^{ab}	103,600±12,6123 ^{ab}	155,166±43,832 ^b	74,3333±24,4068 ^a

*Los datos con letras diferentes, presentan diferencias significativas para p < 0,05.

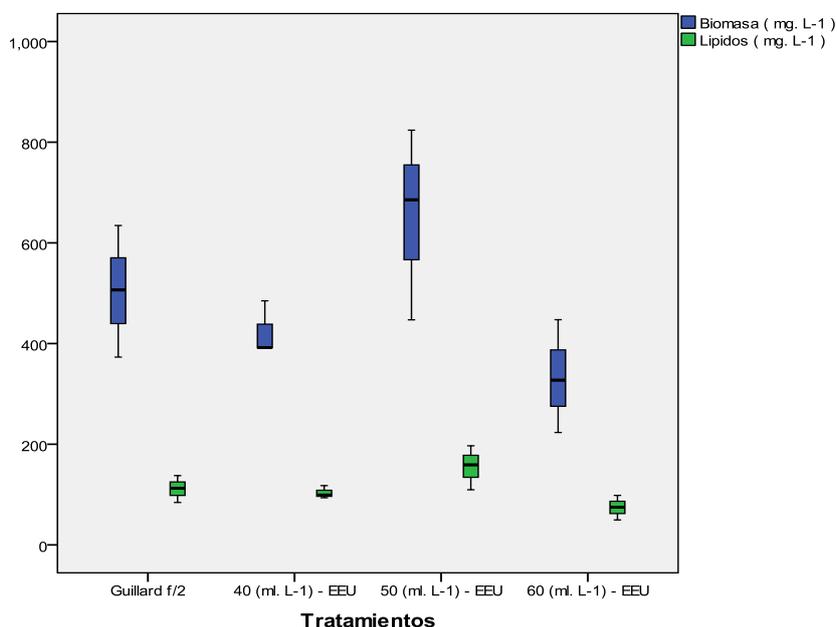


Fig. 11. Contenido de Lípidos y Biomasa algal (ml.l^{-1}) de *T. suecica*, con las diferentes concentraciones del extracto de ensilado de *U. lactuca*.

IV.DISCUSIÓN

La temperatura y el pH son dos de los factores importantes en la regulación del crecimiento de las microalgas. Se reporta experiencias de buen crecimiento de *Tetraselmis suecica* a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ (Serdar *et al.*, 2007). Laim & Helm (1981) mencionan que la productividad de *T. suecica* no es afectada por temperatura de 18-22°C, disminuyendo si la fuente de dióxido de carbono es insuficiente para mantener el pH igual o inferior a 7.8. Se reporta cultivos de *T. Suecica* en intervalos de pH de 7.3 a 8.5 (Millán-Núñez *et al.*, 2010). Por lo tanto, los valores de temperatura y pH registrados en este trabajo están dentro de los rangos establecidos para el crecimiento de las microalgas.

En relación a las fases de crecimiento algal, Arrendondo & Voltolina (2007) estiman que en la fase de adaptación el comportamiento inicial del cultivo depende de las condiciones metabólicas de las células del inóculo y que los cambios ambientales como la temperatura, la iluminación y el pH, también pueden causar un retardo del crecimiento en la fase inicial de un cultivo. De este modo, se puede explicar que los cultivos algales tienen un periodo de adaptación y que refleja un estado fisiológico de *Tetraselmis suecica* para adaptarse a un medio de cultivo nuevo como resulta el uso del extracto de ensilado de *Ulva lactuca*.

Alfonso & Leal (1999) describen que la duración de la fase de latencia depende de la concentración y edad del inóculo, cambios en el medio de cultivo y toxicidad del medio. En el caso específico de las diferentes diluciones de extracto líquido de *Ulva lactuca* evaluadas, se observa que esta fase de acondicionamiento fue corta por la adaptación rápida de las células al nuevo medio de cultivo. Al analizar el comportamiento de las curvas de crecimiento exponencial de cada tratamiento, se debería que la cinética algal pudo haber estado influenciada por la composición del

medio de cultivo y sobre todo por el agotamiento de los nutrientes. Al ser éste un medio de cultivo alternativo poco estudiado y variable, aún no se conoce con exactitud su composición química y los factores que la afectan.

Sánchez *et al.* (2008) encontraron que un ensilado de pescado no hidrolizado, proporciona buena productividad de la microalga *Nannochloropsis oculata*, en relación a la obtenida cuando se usan los medios de cultivo Yashima y Guillard F/2. El ensilado de pescado fue obtenido mediante un proceso de fermentación ácido láctico con melaza como fuente de carbono.

Rodríguez *et al.* (2007) investigaron el empleo del medio EM-Bokashi con *Tetraselmis suecica*, obteniendo un buen crecimiento poblacional en relación a los medios Yashima y Guillard modificado. Asimismo determinaron que el medio EM-Bokashi proporciona un menor costo de producción (98.8% menor que cuando se usa el medio Yashima). Este medio es un fertilizante orgánico, obtenido mediante fermentación de materia orgánica por acción de microorganismos eficaces (EM), confiriendo propiedades probióticas. Sostienen que la presencia de probióticos compite con las bacterias patógenas inhibiendo su desarrollo, lo que contribuye al equilibrio ecológico del medio.

Silva *et al.* (2011) evaluaron el crecimiento de *Tetraselmis suecica* en medios de cultivos basados agua de mar y el efluente sanguaza en el marco de la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) con un Diseño Central Compuesto Rotacional (DCCR) con dos factores; pH y concentración sanguaza/agua de mar, en los rangos de 7 - 9 y 2-5 % (v/v) respectivamente. Determinándose que a partir de un pH de 8.0 y una concentración de sanguaza/agua de mar de 3.5% se logra el crecimiento máximo de *T. suecica*. Un pH de 8.71 y una concentración de sanguaza/agua de mar de 4.56% permiten obtener un crecimiento máximo de *T. suecica* de 0.659. Estos valores obtenidos con el medio de cultivo sanguaza/agua de mar, superaron al medio de cultivo tradicionalmente usado (Guillard f/2 con agua de mar). Por lo que se demostró la potencialidad de uso del medio sanguaza/agua de mar en estudios escalables a nivel piloto de producción de *T. suecica*, con miras a la producción de biodiesel.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo se corroboran con aquellos obtenidos por Paniagua & Bückle (1985) quienes trabajaron con los extractos líquidos de biodegeridos anaeróbicos del alga *Macrocystis pyrifera* y del pasto marino *Zostera marina* como medio de cultivo para las microalgas *Monochrysis lutheri* y *Skeletonema costatum*. Encontrando el mayor crecimiento en ambas microalgas con concentraciones de 0.5 g.l⁻¹ del extracto líquido antes mencionado, inclusive las tasas de crecimiento algal fueron similares al control, el medio Johnston. Concluyendo que la digestión anaeróbica resultó eficiente para la recuperación de los nutrientes para el crecimiento algal. Estos autores asumen que la amplia variedad de nutrientes y sustancias tales como compuestos húmicos, vitaminas y factores de crecimiento (auxinas y giberelinas) eluidas y transformadas de las macroalgas marinas aumentaron las tasas de crecimiento de dichas microalgas, cultivadas con los medios experimentales. En tal sentido, el ensilado biológico de *Ulva lactuca* favoreció el crecimiento de *T. suecica* por los nutrientes y las sustancias bioactivas presentes y producidas por el proceso fermentativo a la que fue sometida la macroalga antes de ser usada como medio nutritivo para microalgas.

Converti *et al.* (2009) sostienen que el crecimiento de las microalgas puede ser limitado por bajos niveles de nutrientes inorgánicos, y estas alteraciones en la concentración de nutrientes alteran la composición bioquímica de las microalgas. En tal sentido, se demuestra que la cantidad y calidad de los lípidos dentro de la célula algal puede variar como resultado de cambios en las condiciones de crecimiento (temperatura e intensidad de luz) o las características de los medios nutritivos (concentración de nitrógeno, fosfatos y hierro).

Con respecto al contenido de lípidos, el tratamiento con 0.5 g.l⁻¹ de EEUL presenta el mayor contenido (155,166 mg l⁻¹, 32,99 %), mientras que el tratamiento con 0.6 g.l⁻¹ de EEUL es inferior (74,333 mg l⁻¹, 17,18 %) a los demás tratamientos (fig. 4). Los resultados encontrados concuerdan a lo mencionado por Chisti (2007), quien precisa que los niveles del 20 al 50 % de lípidos son bastante comunes en las microalgas, y específicamente la microalga *T. suecica* cultivada en condiciones autótrofas contiene entre 15 a 23 % de lípidos. *T. suecica* también ha sido cultivada heterotróficamente, mejorando la densidad celular del cultivo y la productividad, además de aumentar la cantidad de lípidos que contiene la célula (Azma *et al.*, 2011). Sin embargo, la

composición bioquímica de la célula se ve afectada por la fuente de carbono utilizada en el cultivo heterótrofo de *T. suecica* (Cid *et al.*, 1992). *T. suecica* es una de las especies más utilizadas en acuicultura y es considerada una excelente fuente de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (Fábregas *et al.*, 2001). Además, presenta una riqueza destacable en cuanto a su composición bioquímica, aunque ésta depende de las condiciones de operación, la composición del medio y el sistema de cultivo. Así se tiene que en cultivos heterotróficos, *T. suecica* tiene una composición celular proximal de proteína del 10.5%, carbohidratos 51.9% y de lípidos 14% (Azma *et al.*, 2009). Los datos reportados por el autor anteriormente mencionado están por debajo de lo encontrado en nuestra experimentación aplicando el extracto de ensilado de *Ulva lactuca*. Otros autores que han producido biomasa de esta microalga en sistema de cultivo semicontinuo, han reportado una composición de 45% de proteína, 13% de carbohidratos y 32% de lípidos (Chini-Zittelli *et al.*, 2006).

Las condiciones ambientales estresantes en un cultivo algal cambian el uso de la absorción de nitrógeno en el crecimiento celular hacia el almacenamiento de energía en forma de aceite, tal como ocurre en la mayoría de especies algales de los géneros *Chlorella* (Jiang *et al.*, 2012) y *Chlamydomonas* (Bono *et al.*, 2013). En el presente trabajo se demuestra que la limitación de nitrógeno es el factor que estimula un mayor contenido de lípidos en *T. suecica*, de acuerdo a lo observado con los tratamientos de 0.4 y 0.5 g.l⁻¹ de EEUL (tabla 3).

Richardson *et al.* (1969) afirma que una vez que en el medio se agota el nitrógeno, todo el nitrógeno celular es aparentemente utilizado en las enzimas y estructuras celulares esenciales. El carbono subsecuentemente fijado es convertido en lípidos más que proteínas. González-Rodríguez & Maestrini (1984), han demostrado que existe una relación inversa entre la tasa de crecimiento y la cantidad de nitrógeno celular, esto es reforzado por Fábregas *et al.* (1985), afirmando que la deficiencia de nitrógeno reduce la tasa de crecimiento de las microalgas. Esto podría ser la explicación de las bajas tasas específicas de crecimiento algal obtenidas en los medios con las menores concentraciones de extracto de ensilado de *U. lactuca*. Además que hay otros factores tales como las hormonas vegetales y vitaminas contenidas en el EEUL, que también promoverían la acumulación de lípidos en *T. suecica*, tal y conforme lo demostraron Do Nascimento *et al.* (2013) al obtener un mayor rendimiento de lípidos (superior al

30%) en el alga *Ankistrodesmus* promovido por la presencia de ácido indol acético y/o vitamina B12 en el medio de cultivo.

No obstante el contenido de lípidos depende de la especie, ya que las microalgas producen diferentes tipos de lípidos, hidrocarburos y otros aceites complejos (Guschina & Harwood, 2006), y el contenido de aceite en microalgas puede exceder el 80 % de peso de biomasa seca (Kyle, 1991; Brown *et al.*, 1993; Spolaore *et al.*, 2006); asimismo, los triglicéridos son los lípidos de reserva por excelencia, pudiendo llegar a constituir hasta el 80% del total de la fracción lipídica total (Borowitzka, 1988). Los ácidos grasos presentes en la célula se muestran en el siguiente orden de abundancia: 16:0 (palmítico) > 18:1 ω -9 (oleico) > 18:3 ω -3 (linolénico) > 16:4 ω -3 > 18:2 ω -6 (linoleico) > 20:5 ω -3 (ácido eicosapentanoico, EPA) > 18:4 ω -3 (estearidónico), siendo el 16:0 el ácido graso saturado más abundante y el 18:3 ω -3 el ácido graso poliinsaturado más abundante (Mendoza *et al.*, 2010; Otero & Fábregas, 1997).

Las otras clases de lípidos están representadas principalmente por lípidos polares que son componentes importantes de la membrana citoplasmática y la membrana tilacoidal que constituyen los cloroplastos. Entre los lípidos polares encontramos los fosfolípidos y galactolípidos en porcentaje variable según la especie. La cantidad total de lípidos, así como la tipología de los ácidos grasos presentes, además de ser específica para cada especie, está ligada a factores ambientales como la intensidad luminosa, pH, salinidad, temperatura, concentración de nitrógeno y otros nutrientes en el medio de cultivo (Álvarez, 1989). De tal manera que modificando uno o más de estos parámetros, el alga reacciona modificando su perfil químico. Generalmente se tiene un aumento más substancial de los triglicéridos con respecto a los lípidos de membrana (Schneider & Roessler, 1994). En tal sentido se puede afirmar que el incremento en el contenido de lípidos en el tratamiento 0.5 g.l⁻¹ de EEUL se podría a ver visto influenciada por la composición de nutrientes del medio alternativo usado.

Las condiciones que debe cumplir un medio no convencional para ser considerado como una alternativa viable a los medios tradicionales que se emplean para la producción de microalgas, aparte de contener los nutrientes esenciales para el crecimiento de las microalgas, deben ser fácilmente asimilables, que exista la disponibilidad de las materias primas, que sean de bajo costo y finalmente que el medio

sea de fácil preparación (Ormaza-González & De la Torre, 1999). Estas condiciones se ajustan al medio de cultivo alternativo evaluado en el presente estudio, no obstante se necesitan otros estudios para corroborar tal afirmación.

V. CONCLUSIONES

- El extracto de ensilado de *U. lactuca* (0.4, 0.5 y 0.6 g.l⁻¹) tiene influencia en el crecimiento poblacional (cel.ml⁻¹) de *T. suecica* bajo condiciones de laboratorio, mostrándose los mayores crecimientos poblacionales con la concentración de ensilado de 0.5 g.l⁻¹, incluso relativamente similares al control Guillard F/2.
- El extracto de ensilado de *U. lactuca* (0.4, 0.5 y 0.6 g.l⁻¹) tiene influencia en la velocidad de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (TD) de *T. suecica* bajo condiciones de laboratorio, evidenciándose las mayores velocidades y tiempo de duplicación con la concentración de ensilado de 0.5 g.l⁻¹, incluso relativamente similares al control Guillard F/2.
- El extracto de ensilado de *U. lactuca* (0.4, 0.5 y 0.6 g.l⁻¹) tiene influencia en el contenido de lípidos (ml.l⁻¹) de *T. suecica* bajo condiciones de laboratorio, demostrándose los mayores niveles lipídicos algales con la concentración de ensilado de 0.5 g.l⁻¹, aunque es mayor que los valores obtenidos con el control Guillard F/2.

VI. RECOMENDACIONES

- Evaluar las rutas metabólicas involucradas en la asimilación del extracto de ensilado biológico de *Ulva lactuca* para el crecimiento y composición bioquímica de *Tetraselmis suecica*.
- Evaluar algunos factores ambientales (salinidad, temperatura, etc.) que pudieran estar afectando la solubilidad y asimilación del extracto de *Ulva lactuca* en el crecimiento y composición bioquímica de *Tetraselmis suecica*.
- Realizar cultivo masivo al aire libre de *Tetraselmis suecica* usando como medio nutritivo al extracto de ensilado biológico de *Ulva lactuca*.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Acleto, C. 1986. Algas marinas del Perú de importancia económica. *Ser. Divul. Mus. Hist. Nat.* “Javier Prado” (5). Lima, Perú. 107 p.
- Aldon D, Juscamaita J, Gil P (2008) Aprovechamiento de la macroalga *Ulva lactuca* en la producción de bioabono líquido a través del proceso de ensilaje. *Boletín de Sociedad Española de Ficología Algas* 39: 13-15.
- Alfonso, E. & L. Martínez. 1988: Medio de cultivo para microalgas marinas. *Rev. Invest. Mar.* 9: 39-46.
- Alfonso, E & Leal, S. 1999. Manual para la creación y mantenimiento de un cepario de microalgas, Universidad de La Habana, Cuba, 23 pp.
- Alvarez C, M. 1989. Lipids in Microalgae. A review II. Environment. *Grasas y Aceites.* Vol.40, fasc. 3: 213-223.
- Arredondo, V & Voltolina, D. 2007. Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. pp. 21-24, En: Manual de métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. Manual de Prácticas, La Paz, Baja California Sur, México, 25 pp.
- Azma M., R. Rahim R., R. Mohames & A. Ariff . 2009. Heterotrophic cultivation of microalga *Tetraselmis suecica* in stirred tank bioreactor for biomass and biofuel production. International Advanced of Technology Congress. Malaysia.
- Azma M., M. Mohamed., R. Mohamad., R. Abdul-Rahim & A. Ariff. 2011. Improvement of medium composition for heterotrophic cultivation of green microalgae, *Tetraselmis suecica*, using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal* 53:187–195.
- Barnabé G. 1996. Bases Biológicas y Ecológicas de la Acuicultura. Editorial ACRIBIA S.A. España.

- Bono M, Ahner B, Kirby B (2013) Detection of algal lipid accumulation due to nitrogen limitation via dielectric spectroscopy of *Chlamydomonas reinhardtii* suspensions in a coaxial transmission line sample cell. *Bioresource Technology* 143: 623–631.
- Borowitzka M.A., 1988. Fats, Oils and Hydrocarbons. *Micro-Algal Biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge, UK. p.257-287.
- Brown, L.M., S. Sprague., E. Jarvis., T. Dunahay., P. Roessler & K. Zeiler.1993. *Biodiesel From Aquatic Species Project Report: FY*.
- Brown M. 2002. Nutritional Value and Use of Microalgae in Aquaculture. In: Cruz-Suárez L., Ricque-Marie D., Tapia-Salazar M., Gaxiola-Cortés M. & Simoes N. (Eds). *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo. México. : 281-292.
- Castro, T., R, Andrade & G., Castro. 2003. Alimento vivo en la acuicultura. Departamento El Hombre y su Ambiente. División de CBS. UAM Unidad Xochimilco. p. 1-7.
- Cid A., J. Abalde & C. Herrero.1992. High yield mixotrophic cultures of the marine microalga *Tetraselmis suecica* (Kyllin) Butcher (Prasinophyceae). *Journal of Applied Phycology* 4: 31-37.
- Coll J. 1991. *Acuicultura Marina Animal*. Ediciones Mundi - Prensa. Tercera Edición. España.
- Converti A, Casazza A, Ortiz E, Perego P, Del Borghi M (2009) Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing* 48: 1146–1151.
- Chini-Zittelli G., L. Rodolfi., N. Biondi & N. Tredicci. 2006. Productivity and photosynthetic efficiency of outdoor cultures of *Tetraselmis suecica* in annular columns. *Aquaculture* 261:932-943
- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 25: 294-306.
- Dante Aldon, C., Juscamaita, J., & Gil, P. 2008. Aprovechamiento de la macroalga *Ulva lactuca* en la producción de bioabono líquido a través del proceso de ensilaje Facultad de Pesquería. Universidad Nacional Agraria La Molina - UNALM (Lima, Perú).

- Dawes, C. 1991. Botánica Marina. Primera edición. Edit. Limusa, S.A. de C.V. Mexico D.F. Mexico. 637 p.
- Day J. G., and A. J. Tsavalos. 1996. An investigation of the heterotrophic culture of the green algae *tetraselmis*. Journal of Applied Phycocoly. Volumen 8. N° 1.
- Delaunay, F., Marty, Y., Moal, J. y Samain, J.F. 1993. The effect of monoespecific algal diets on growth and fatty acid composition of *Pecten maximus* (L) larvae. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 173, 163-179.
- Do Nascimento M, Dublan M, Ortiz J, Curatti L (2013) High lipid productivity of an *Ankistrodesmus*–*Rhizobium* artificial consortium. Bioresource Technology 146: 400–407.
- Etcheverry , H . 1986. Algas Marinas Bentónicas de Chile. Instituto de Oceanología Universidad de Valparaíso Viña del Mar – Chile.
- Fábregas J, C. Herrero & C. Abalde. 1985. Growth, chlorophyll a and protein of the marine microalga *Isochrysis galbana* in batch cultures with different salinities and high nutrient concentrations. *Aquaculture*. 50:1-11.
- Fábregas J, A. Otero., A. Domínguez & M. Patiño. 2001. Growth rate of the microalga *Tetraselmis suecica* changes the biochemical composition of *Artemia species*. J Mar Biotechnol 3:256–263.
- FAO. 2005. Estado Mundial de la pesca y Acuicultura 2008. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Roma. p. 228.
- Farías A. & Uriarte I. 2002. Nutrición en Larvicultura de Pectínidos: Relevancia de Proteínas y Lípidos. In: Cruz- Suárez L.E., Ricque-Marie D., Tapia-Salazar M., Gaxiola-Cortés M. G. & Simoes N. (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium internacional de nutrición acuícola. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México.
- Garibay, A., R, Vázquez., M, Sánchez., L, Serrano & A, Martínez. 2009. Biodiesel a partir de microalgas, 13 (3) 46 – 48.

- Gil Kodaka, P., Mendo, J., Fernández, E., Ysla, L & Pinilla, F. 2000. Estudio de las praderas de macroalgas de importancia comercial como base para su manejo en la Reserva Nacional de Paracas. Lima, Perú. Proyecto UNALM - INRENA/GTZ. 108 p.
- Gómez, L. 2007. Microalgas: Aspectos Ecológicos y Biotecnológicos. Laboratorio de Ecotoxicología Marina, Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado, Universidad de Oriente. Vol. XIX, N° 2.
- Gonzales-Rodríguez E. & S. Maestrini. 1984. The use of some agricultural fertilizers for the mass production of marine microalgae. *Aquaculture*. 36:245-256.
- Guillard, R.R.L. (1975): Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. *In: Culture marine invertebrate animals* (L. Smith and M.H. Chanley, eds.), New York, pp: 29-59.
- Guschina IA & JL. Harwood JL. 2006. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Prog. Lipid Res.* 45: 160-186.
- Haaland, H. & L. Njaa. 1990. Fish silage prepared from raw materials of varying quality: chemical analysis related to balance experiments in rats. *Dir. Skri. Ver. Ernoering*. III. pp. 27-35.
- Herrero, C., Cid, A., Fabregas, J. & Abalde, J. 1994. Yields in biomass and chemical constituents of four commercially important marine microalgae with different cultura media. *Aquacultural Engineering*. 10:99-110.
- Hoff F. & Snell T. 1993 . *Plankton Culture Manual*. Published Florida Aqua Farms. Ino. Florida.
- Jiang Y, Yoshida T, Quigg A (2012) Photosynthetic performance, lipid production and biomass composition in response to nitrogen limitation in marine microalgae. *Plant Physiology and Biochemistry* 54: 70-77.

- Jimenez & Prada.2012. Efecto del ensilado de los desechos blandos de *Argopecten Purpuratus* “concha de abanico” como medio de cultivo en el crecimiento poblacional, contenido de clorofila a y carotenoides de *Tetraselmis Suecica*, en condiciones de laboratorio. Tesis. Universidad Nacional del Santa. Nuevo Chimbote.
- Kyle, D. J. 1991. Specialty oils from Microalgae: new perspectives. In: Biotechnology of Plant Fats and Oils. J. Rattray (ed) American Oil Chemists Society. Champaign, Illinois. Cap.8: 130-143.
- Laing, I.; Helm, M. 1981. Factors affecting the semi-continuous production of *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butch. in 200-l vessels. *Aquaculture* 22: 137-148.
- Mendoza H, A. De la Jara., D. Carmona & P. Freijanes. 2010. Estimate by means of flow cytometry of variation in composition of fatty acids from *Tetraselmis suecica* in response to culture conditions. *Aquaculture Int* 18:189-199.
- Millán-Núñez, R.; Valenzuela-Espinoza, E.; Trees, C.; Santamaría del Ángel, E.; Núñez, F. 2010. Efecto de la intensidad de luz en la razón de pigmentos de *Tetraselmis suecica*. *Revista Acuicultura*. Disponible en: <http://promepsol.sep.gob.mx/archivospdfs/produccion/Producto773306.PDF>.
- Morales V.V. & De Velotti A. 1990. Fitoplancton.Pradepesca. Union Europea y Oldepesca .Cartilla 2. : 1-21.
- Ormaza-González, K., C. Man-Hing & T. León-Hing. 1999. Cultivo masivo de *Chaetoceros* sp. y *Tetraselmis* sp. con diferentes fuentes de nitrógeno: Nitrato de Sodio y Urea. *Acuicultura del Ecuador*, 29: 13-17.
- Ortiz, J. 2011. Composición Nutricional y Funcional de las Algas Clorofíceas Chilenas: *Codium fragile* y *Ulva lactuca*. Laboratorio de Química y Análisis de Alimentos. Departamento de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química.
- Otero A & J. Fábregas.1997. Changes in the nutrient composition of *Tetraselmis suecica* cultured semicontinuously with different nutrient concentrations and renewal rates. *Aquaculture* 159:111-123.

- Padilla, M. 1975. Crecimiento poblacional de *Tetraselmis suecica* en ambiente controlado. Departamento de Oceanografía, Universidad de Chile, Valparaíso. Revista de Biología Marina. Vol. 15. N° 3. p. 287-296.
- 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. 233pp.
- Paniagua, J. & Bückle. F. 1985. Cultivo en condiciones controladas de *Monochrysis Lutheri* y *Skeletonema Costatum* con extractos de macrofitas marinas (Fitoplancton). AN. INST. CIENC. DEL MAR Y LIMNOL. UNIV.NAC.AUTON. MEXICO. 12 (1): 59-70.
- Perez, L. & L. Sylvia. 2011. Humus de lombriz *Eisenia foetida* para cultivar dos microalgas marinas como alimento de larvas de camaron. Tesis Master en Biología Marina con Mención en Acuicultura. Universidad de la Habana, Cuba. Centro de Investigaciones Marinas
- Pillay T. 1997. Acuicultura. Principios y Prácticas. Editorial LIMUSA. S.A. Primera Edición. México.
- Richardson B, Orcutt D, Schwertner H, Martinez C, Wickline A. 1969. Effects of Nitrogen Limitation on the Growth and Composition of Unicellular Algae in Continuous Culture. Applied Microbiology 18 (2): 245-250.
- Rodríguez, L; Juscamaita, J. Vargas, J. 2007. Efecto del medio EM-Bokashi en el cultivo de la microalga marina *Tetraselmis suecica* K. Ecología Aplicada 6: 111-116.
- Rosales, N., J, Bermúdez., R, Moronta & E, Morales. (2007) Gallinaza: Un residual avícola como fuente alternativa de nutrientes para producción de biomasa microalgal. Rev. Colomb. Biotechnol. 9(1): 41-48.

- Sánchez, H.; Juscamaita, J.; Vargas, J.; Oliveros, R. 2008. Producción de la microalga *Nannochloropsis oculata* (Droop) Hibberd en medios enriquecidos con ensilado biológico de pescado. *Ecología Aplicada* 7: 149-158.
- Serdar, S.; Lök, A.; Acarli, S.; Köse, A. 2007. The effect of two different culture media and five different salinities on growth of *Tetraselmis suecica*. *Rapp. Comm. int. Mer Médit.* 38: 394.
- Schneider, J. C & P. Roessler. 1994. Radiolabelling studies of lipids and fatty acids in *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae), oleaginous marine algae. *J. Phycol.* 30: 594-598.
- Silva J, Vásquez V, Merino F (2011) Producción de biomasa de *Tetraselmis suecica* empleando agua de mar con sanguaza. *Scientia Agropecuaria* 2: 13-23.
- Spolaore, P.; C. Joannis-Cassan.; E. Duran & A. isambert. 2006. Commercial applications of microalgae. *J. of Bioscience and Bioengineering.* Vol 101. : 87-96
- Tetterton, L. & M. Windsor. 1995. Fish silage. *Journal Sciences Food Agric.* 1(25): 369-379.
- Toledo, M., M, Ávila., A, Manríquez., G, Olivares., A, Soto., S, Saavedra., J, Zertuche & B Sungchul. 2009. Algas: Insumo alternativo para la alimentación de especies Acuícolas. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso- Escuela de Ciencias del Mar. Ediciones Universitarias de Valparaíso. Chile.
- Vonshak, A. 1986. Laboratory techniques for the cultivation of microalgae. In: *Handbook of Microalgal Mass culture*, CRC Press, Inc. Boca Raton, FL, PP: 117-145.

VIII. ANEXO

Anexo 1. Análisis de Varianza para el crecimiento poblacional en los diferentes tratamientos durante el periodo de experimentación

Días de muestreos		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Inter-grupos	0,075	3	0,025	1,607	0,263
	Intra-grupos	0,125	8	0,016		
	Total	0,200	11			
2	Inter-grupos	0,050	3	0,017	1,036	0,427
	Intra-grupos	0,129	8	0,016		
	Total	0,179	11			
3	Inter-grupos	1,025	3	0,342	1,619	0,260
	Intra-grupos	1,688	8	0,211		
	Total	2,713	11			
4	Inter-grupos	3,542	3	1,181	5,573	0,023
	Intra-grupos	1,695	8	0,212		
	Total	5,236	11			
5	Inter-grupos	2,456	3	0,819	6,646	0,015
	Intra-grupos	0,985	8	0,123		
	Total	3,441	11			
6	Inter-grupos	2,155	3	0,718	3,682	0,062
	Intra-grupos	1,561	8	0,195		
	Total	3,716	11			
7	Inter-grupos	3,566	3	1,189	3,377	0,075
	Intra-grupos	2,815	8	0,352		
	Total	6,381	11			

Anexo 2. Prueba de Tukey para el crecimiento poblacional en los diferentes tratamientos en el día cuatro de muestreo.

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
40 ml.L ⁻¹	3	0,880000	
60 ml.L ⁻¹	3	0,897500	
50 ml.L ⁻¹	3	1,112500	1,112500

Guillard f/2	3		2,200000
Sig.		0,923	0,077

Anexo 3. Prueba de Tukey para el crecimiento poblacional en los diferentes tratamientos en el día cinco de muestreo.

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
50 ml.L⁻¹	3	0,964833	
60 ml.L⁻¹	3	1,140000	
40 ml.L⁻¹	3	1,410000	1,410000
Guillard f/2	3		2,150000
Sig.		0,453	0,120

Anexo 4. Análisis de Varianza para Biomasa (mg L⁻¹), Lípidos (%) y Lípidos (mg L⁻¹)

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Biomasa (mg L⁻¹)	Inter-grupos	165750,856	3	55250,285	3,207	0,083
	Intra-grupos	137807,093	8	17225,887		
	Total	303557,949	11			
Lípidos (%)	Inter-grupos	11,940	3	3,980	10,954	0,003
	Intra-grupos	2,907	8	,363		
	Total	14,847	11			
Lípidos (mg L⁻¹)	Inter-grupos	10050,109	3	3350,036	3,953	0,053
	Intra-grupos	6779,200	8	847,400		
	Total	16829,309	11			

Anexo 5. Prueba de Tukey para el contenido de Lípidos (%) en los diferentes tratamientos.

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
Guillard f/2	3	22,1667		
60 ml.L⁻¹	3	22,3667	22,3667	
50 ml.L⁻¹	3		23,8667	23,8667
40 ml.L⁻¹	3			24,5333

Sig.	0,976	0,062	0,558
-------------	-------	-------	-------

Anexo 6. Prueba de Tukey para el contenido de Lípidos (mg L⁻¹) en los diferentes tratamientos.

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
60 ml.L⁻¹	3	74,3333	
40 ml.L⁻¹	3	103,6000	103,6000
Guillard f/2	3	111,4667	111,4667
50 ml.L⁻¹	3		155,1667
Sig.		0,448	0,211
