

ARTÍCULO ORIGINAL

EFECTO DEL ENSILADO BIOLÓGICO DE BIOFOULING EN EL CRECIMIENTO POBLACIONAL, CONTENIDO DE CLOROFILA A Y CAROTENOS TOTALES DE *Tetraselmis suecica*

EFFECT OF BIOLOGICAL ENSILING OF BIOFOULING ON POPULATION GROWTH, CHLOROPHYLL A AND TOTAL CAROTENE CONTENT OF *Tetraselmis suecica*

Joel Yauri Pardo*, Fernando Merino Moya**, Gustavo Olivos Ramírez & Sorayda Mendoza Espinoza.

Laboratorio de Cultivos de Especies Auxiliares. Universidad Nacional del Santa, Chimbote, Ancash, Perú.
joelyauri5@gmail.com*, fmerino@uns.edu.pe**

RESUMEN

En esta investigación se evaluó el efecto del ensilado biológico de biofouling del cultivo de *A. purpuratus* "concha de abanico" (EBBFCA) en el crecimiento poblacional de *T. suecica* y su influencia en el contenido de clorofila a y carotenos totales. Para la elaboración del medio de cultivo experimental, se hirvió 100 g del ensilado en 1 L de agua potable por 10 minutos, del cual se extrajo el sobrenadante y se utilizó como medio nutritivo. Las dosis experimentales fueron de 55, 60 y 65 mL L⁻¹. Los mayores crecimientos poblacionales se obtuvieron con las concentraciones de 55 y 60 mL L⁻¹ (2.277 y 2.448 x 10⁶ cel mL⁻¹ respectivamente) siendo estadísticamente diferentes respecto a los tratamientos con 65 mL L⁻¹ y control ($p > 0.05$). No se observó diferencia significativa en el contenido de clorofila a y carotenos entre los tratamientos experimentales ($p > 0.05$), sin embargo, estos fueron diferentes y mejores al tratamiento control en el día 5 de cultivo. Se concluye que *T. suecica* tiene capacidad para crecer y sintetizar pigmentos utilizando residuos orgánicos y además representa una base técnica y científica para su producción masiva.

Palabras claves: ensilado biológico, biofouling, *Tetraselmis suecica*, clorofila, carotenos.

ABSTRACT

In this research, the effect of the biofouling silage of the *A. purpuratus* "fan shell" culture (EBBFCA) on the population growth of *T. suecica* and its influence on the content of chlorophyll a and total carotenoids was evaluated. For the elaboration of the experimental culture medium, 100 g of the silage was boiled in 1 L of drinking water for 10 minutes, from which the supernatant was extracted and used as a medium. The experimental doses were 55, 60 and 65 mL L⁻¹. The highest population growths were obtained with the concentrations of 55 and 60 mL L⁻¹ (2.277 and 2.448 x 10⁶ cells mL⁻¹ respectively) being statistically different with respect to the treatments with 65 mL L⁻¹ and control ($p > 0.05$). There was no significant difference in the content of chlorophyll a and carotenoids between the experimental treatments ($p > 0.05$), however, these were different and better than the control treatment on day 5 of culture. The results obtained demonstrate the ability of *T. suecica* to grow and synthesize pigments using organic waste and represent a technical and scientific basis for its mass production.

Key words: biological ensilage, biofouling, *Tetraselmis suecica*, chlorophyll, carotenoids.

Recibido: 30 agosto 2017.

Aceptado: 18 noviembre 2017.

Publicado online: 30 diciembre 2017.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de microalgas tiene un amplio rango de aplicaciones, desde la producción de biomasa para la alimentación humana y animal, su empleo en la acuicultura, su uso como biofertilizante, hasta la obtención de productos de valor terapéutico e industrial (Gómez *et al.*, 2011).

Dentro de las microalgas marinas, el género *Tetraselmis* destaca por sus características bioquímicas y su relativa facilidad de cultivo (Ulloa, 2011). Esta especie ha sido utilizada

convencionalmente en acuicultura; sin embargo, en los últimos años su producción se ha destinado para la obtención de metabolitos de interés comercial (Chisti, 2007). Los metabolitos presentes en las células de esta microalga pueden variar y están directamente relacionados a las condiciones de cultivo que se utilice (Carballo *et al.*, 2003).

La clorofila es uno de los compuestos bioactivos más destacables que se puede extraer de las microalgas, teniendo importantes aplicaciones como colorante natural con propiedades antioxidantes (Hosikian *et al.*, 2010). Los carotenos del mismo modo son de importancia económica por sus diferentes usos; en acuicultura, por ejemplo, se utilizan para colorar la piel de peces salmónidos quienes no pueden sintetizar estas moléculas y necesitan ingerirlas en la dieta (León *et al.*, 2003).

En el Perú, el cultivo de *A. purpuratus* es una actividad que genera importantes beneficios económicos, pero también importantes impactos ambientales en los ecosistemas marinos por causa del biofouling que se produce en los sistemas suspendidos durante las distintas etapas de cultivo (Encomendero *et al.*, 2006). El biofouling no solo causa daños a los ecosistemas, también afecta la productividad del cultivo debido a que reduce el crecimiento de *A. purpuratus* en los sistemas suspendidos. En ese sentido, urge realizar investigaciones e implementar tecnologías orientadas al mantenimiento y recuperación de los ecosistemas marinos (Rodríguez & Ruíz, 2010).

Se ha demostrado que la reutilización de residuos para la producción de ensilados minimiza los efectos de la contaminación ambiental (Parín & Zugarramurdi, 1997) por lo que, utilizar el proceso de ensilaje para transformar el biofouling en un medio de cultivo para la producción masiva de microalgas tiene un especial interés ecológico, ya que contribuiría a reducir los impactos negativos que la actividad maricultural está generando.

Adicionalmente, en numerosas investigaciones se destaca las cualidades nutricionales de los ensilados que pueden elaborarse a partir de residuos pesqueros y acuícolas (Encomendero & Uchpa, 2002; Mattos *et al.*, 2003; Saldaña, 2012; Arteaga & Rojas; 2015), además que su preparación es simple, requiere poca inversión y mínima mano de obra directa.

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto del ensilado biológico de biofouling del cultivo suspendido de *A. purpuratus* (EBBFCA) sobre el crecimiento poblacional, contenido de clorofila a y carotenos totales de *T. suecica*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Preparación del inóculo de *T. suecica*

La microalga procedió del cepario del Laboratorio de Cultivo de Especies Auxiliares de la Universidad Nacional del Santa (Chimbote-Perú). Esta cepa se mantuvo en crecimiento semicontinuo con medio Guillar F/2 en botellas de plástico de 1500 mL con volumen total de agua de mar de 1000 mL, la cual previamente se trató con hipoclorito de sodio (1 mL L^{-1}) y luego se neutralizó con tiosulfato de sodio (1 mL L^{-1}). Los cultivos se prepararon a partir de un inóculo de 250 mL de la microalga en fase de crecimiento exponencial. El inóculo se diluyó a un volumen efectivo de 1000 mL. con agua de mar tratada en botellas plásticas de 1500 mL. La densidad celular al inicio del experimento fue de $0.184 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$, determinada mediante contajes microscópicos utilizando cámara Neubauer.

Preparación del medio de cultivo experimental (EBBFCA)

El biofouling se colectó de los sistemas de cultivo suspendido de *A. purpuratus* de la empresa INTERCOLD S.A.C. ubicada en la Bahía de Samanco, Ancash-Perú y se transportó en un cooler acondicionado con hielo. Para preparar la harina de biofouling se pesó 3 Kg del mismo, se

sometió a cocción (100°C) durante 20 minutos y se secó en una estufa a 65°C por 48 horas. La biomasa seca obtenida (456 g) se molió y tamizo. El ensilado se preparó de acuerdo a la metodología de Berenz (1996) y Encomendero & Uchpa (2002), utilizando un cultivo de *Lactobacilos bulgaricus*. Para preparar el medio de cultivo se diluyó 100 g del ensilado en forma de harina en 1000 mL de agua destilada en una probeta. Se dejó sedimentar por un periodo de 6 horas y luego se obtuvo el sobrenadante, el cual se almaceno a una temperatura de 4°C.

Acondicionamiento de las unidades experimentales

Los cultivos controles fueron dosificados con medio Guillard F/2 y los experimentales con el medio EBBFCA a diferentes concentraciones. (55, 60 y 65 mL L⁻¹). Todos los tratamientos fueron realizados por triplicado. La iluminación y aireación fue suministrada constantemente.

Determinación del crecimiento poblacional

El crecimiento poblacional de los cultivos algales fue determinado por conteos diarios con cámara Neubauer. Los conteos fueron utilizados para elaborar las curvas de crecimiento poblacional. La tasa de crecimiento específico (*u*) y el tiempo de duplicación diaria (TD) se determinaron con las fórmulas de Guillard (Guillard, 1975).

Determinación de clorofila a y carotenoides

La determinación de clorofila a y carotenoides totales se realizó mediante método espectrofotométrico utilizando absorbancias de 470, 645 y 662 nm, conforme a la metodología de Lichtenthaler & Wellburn (1985).

Análisis estadístico.

Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar la diferencia significativa entre los tratamientos. También se empleó la prueba de Tukey HDD, para identificar los promedios significativamente diferentes (*p*>0.05) Todo el proceso estadístico fue desarrollado utilizando el software SPSS versión 21.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Crecimiento poblacional

El empleo de residuos generados por la actividad maricultural para la formulación de medios de cultivo alternativos implica la incorporación de carbono y nitrógeno orgánico los que son eficientemente aprovechados por las microalgas. En esta investigación *T. suecica* creció óptimamente con el medio experimental debido al aporte de nutrientes que suministra el ensilado (EBBFCA).

Tabla 1. Crecimiento poblacional (x10⁶ cél mL⁻¹) de *T. suecica* dosificados con diferentes concentraciones del EBBFCA.

Día	Control	EBBFCA mL L ⁻¹		
		55	60	65
0	0.184 ±0.000 ^a	0.184 ±0.000 ^a	0.184 ±0.000 ^a	0.184 ±0.000 ^a
1	0.293 ±0.033 ^c	0.381 ±0.048 ^{ab}	0.408 ±0.004 ^a	0.315 ±0.032 ^{bc}
2	0.845 ±0.228 ^a	0.797 ±0.349 ^a	0.704 ±0.106 ^a	0.635 ±0.109 ^a
3	1.067 ±0.182 ^a	1.096 ±0.062 ^a	1.083 ±0.149 ^a	1.085 ±0.213 ^a
4	1.496 ±0.103 ^a	1.541 ±0.162 ^a	1.725 ±0.082 ^a	1.635 ±0.151 ^a
5	1.897 ±0.174 ^b	2.277 ±0.121 ^a	2.448 ±0.094 ^a	2.205 ±0.168 ^{ab}
6	1.690 ±0.203 ^{ab}	1.440 ±0.0.190 ^b	1.933 ±0.205 ^a	1.740 ±0.132 ^{ab}

*Letras diferentes por fila indican diferencia significativa (*p*>0.05).

Los cultivos dosificados con 60 mL L⁻¹ de EBBFCA (2.448 cél mL⁻¹) fueron los que mostraron mejores crecimientos poblacionales; sin embargo, en el día 5, no se evidenció diferencia significativa ($p>0.05$) entre los tratamientos de 55 y 60 mL L⁻¹, del mismo modo no se observó diferencia entre el tratamiento de 55 mL L⁻¹ y el control (Tabla 1).

Es importante resaltar que todos los cultivos experimentales y controles presentaron densidades más bajas en el día 6, lo que puede ser atribuido al consumo de nutrientes y a la fase de declive que se presenta en el crecimiento microalgal (García *et al.*, 2015).

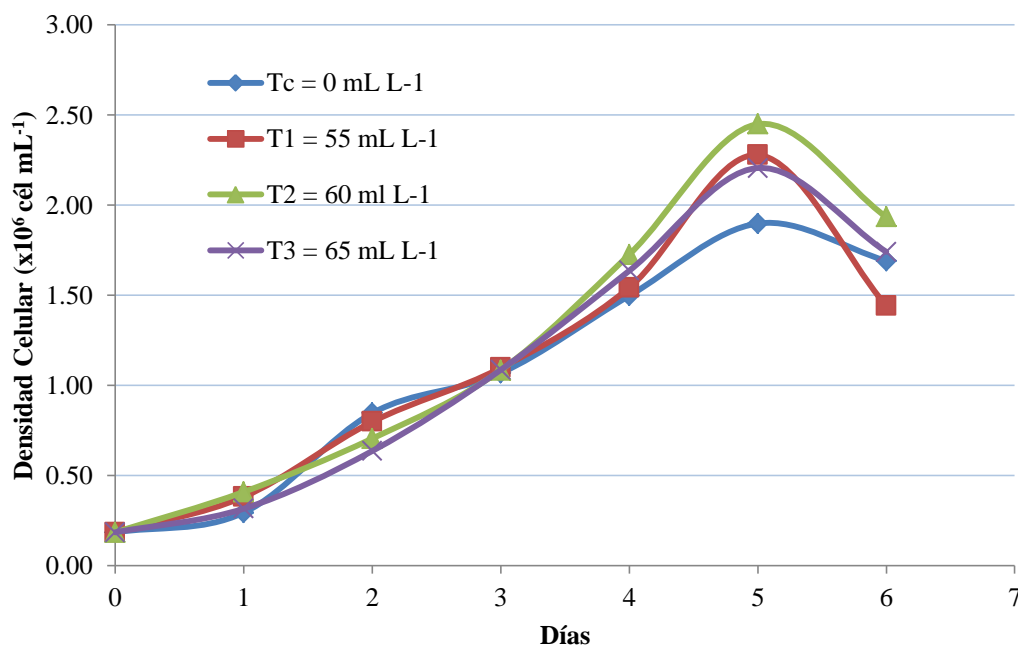


Fig. 1. Crecimiento población (cél mL⁻¹) de los cultivos de *T. suecica*.

Otros tipos de ensilado se han utilizado para el cultivo de microalgas con resultados positivos. Ipanaqué & Paredes (2009) obtuvieron un óptimo crecimiento utilizando 80 mL L⁻¹ de EDBCA (ensilado de desechos blandos de concha de abanico). Este ensilado es similar al utilizado ya que contiene nitrógeno y diversos nutrientes derivados de las proteínas, lípidos, carbohidratos, los cuales superan al medio Guillard F/2 que esta constituidos exclusivamente de sales minerales.

Otras investigaciones indican que el nitrógeno orgánico es mucho más provechoso que el inorgánico (Ponte & Ruiz, 2013). Es en este sentido, mientras el medio Guillard F/2 aportó 12.35 mg L⁻¹ de nitrógeno, el medio de cultivo experimental (EBBFCA) aportó mayores concentraciones de nitrógeno (39.05, 42.6 y 46.15 mg L⁻¹).

Tabla 2. Tasa de crecimiento poblacional (u) y tiempo de duplicación (TD) de *T. suecica*.

Día	Parámetro	Control	EBBFCA		
			40	60	80
5	u	0.466 ±0.018 ^b	0.503 ±0.011 ^a	0.518 ±0.008 ^a	0.496 ±0.015 ^{ab}
	TD	1.489 ±0.057 ^b	1.378 ±0.029 ^a	1.340 ±0.020 ^a	1.397 ±0.042 ^{ab}

*Letras diferentes por fila indican diferencia significativa ($p>0.05$).

El aporte de aminoácidos como fuente de nitrógeno, carbono y energía, posibilita la nutrición heterotrófica de *T. suecica* con los subsiguientes incrementos de tasas de crecimiento. La dosificación de los cultivos microalgales con nutrientes orgánicos, principalmente carbono y nitrógeno, conlleva a la optimización de la fotosíntesis y un alto grado de control del proceso, lo que promueve un rápido crecimiento, así como una mayor producción y fácil mantenimiento de un monocultivo (Barclay *et al.*, 1994).

Contenido de pigmentos

Los resultados indicaron que conforme aumento la biomasa microalgal, aumentaron los contenidos de pigmentos clorofilianos (tabla 3). La mayor producción de clorofila *a* (6.31 mg L⁻¹) y carotenos totales (1.42 mg L⁻¹) ocurrió en los cultivos dosificados con 60 mL L⁻¹ del EBBFCA. Estos datos son similares a los obtenidos por Baek & Young (2002), quienes comprobaron que utilizar medios enriquecidos con nitrógeno y fósforo propicia una mayor acumulación de clorofila *a* en *T. gracilis* (4.68 mg L⁻¹). Por otro lado, cultivos experimentales utilizando Guallar como medio producen menor cantidad de pigmentos (Ulloa, 2011), demostrándose de esta manera la ventaja de utilizar EBBFCA para la producción de clorofila *a*.

Tabla 3. Contenido de pigmentos en *T. suecica* en el quinto día de cultivo.

Pigmento	Control	EBBFCA		
		40	60	80
Clorofila <i>a</i> (%)	0.62 ±0.03 ^b	0.79 ±0.02 ^a	0.87 ±0.04 ^a	0.80 ±0.05 ^a
Carotenos (%)	0.13 ±0.03 ^a	0.19 ±0.01 ^a	0.20 ±0.02 ^a	0.17 ±0.05 ^a
Clorofila <i>a</i> (mg L ⁻¹)	3.47 ±0.41 ^c	5.27 ±0.27 ^{ab}	6.31 ±0.43 ^a	5.20 ±0.50 ^b
Carotenos (mg L ⁻¹)	0.72 ±0.19 ^b	1.26 ±0.11 ^{ab}	1.42 ±0.14 ^{ab}	1.11 ±0.34 ^a

*Letras diferentes por fila indican diferencia significativa ($p > 0.05$).

El contenido de pigmentos en las microalgas depende de varios factores, siendo el factor nutricional uno de los más importantes (Jiménez & Prada 2012). Es así que, el alto contenido de nitrógeno orgánico (710 mg mL⁻¹) de la solución de EBBFCA permitió obtener altos valores de pigmentos.

En relación a la acumulación de pigmentos, Serpa & Calderón (2006) hallaron evidencias que sustentan que la cantidad de clorofila se correlaciona positivamente con la densidad o biomasa celular y que las fuentes de nitrógeno promueven la acumulación de clorofila. La acumulación de clorofila en la célula significa una reserva de nitrógeno que cumple una función vital durante la división celular (Liotenberg *et al.*, 1996).

Desde el punto de vista químico, una amplia gama de elementos inorgánicos tales como N, P, K, Mg, Ca, S, Fe, Cu, Mn y Zn es requerida para el crecimiento de las microalgas (Krauss, 1958; O'Kelly, 1968). Estos elementos estuvieron presentes en el ensilado biológico y fueron eficientemente metabolizados por la microalga *T. suecica*. Es importante destacar que el metabolismo de los macro y micronutrientes presentes en el EBBFCA por las células de *T. suecica* fue tan eficiente que todos los cultivos alcanzaron mayores contenidos de pigmentos en comparación al grupo control.

Parámetros del cultivo

Los valores de temperatura y pH pueden incidir directamente en el metabolismo de las microalgas; sin embargo, durante el experimento se determinó que los valores de estos parámetros fluctuaron dentro de los rangos normales para esta la especie (Silva *et al.*, 2011), desde 7.83 a 8.63 de pH y de 21.1 a 22.3 °C (tabla 4 y 5).

Tabla 4. Variación de la temperatura (°C) de los cultivos de *T. suecica*.

Día	Control	EBBFCA		
		40	60	80
0	22.1 ±0.0 ^a	22.1 ±0.0 ^a	22.1 ±0.0 ^a	22.1 ±0.0 ^a
1	22.2 ±0.1 ^a	22.3 ±0.1 ^a	22.2 ±0.1 ^a	22.2 ±0.2 ^a
2	21.7 ±0.2 ^a	21.7 ±0.1 ^a	21.8 ±0.2 ^a	21.9 ±0.1 ^a
3	22.3 ±0.1 ^a	22.3 ±0.1 ^a	22.1 ±0.2 ^a	22.3 ±0.1 ^a
4	22.2 ±0.2 ^a	22.3 ±0.2 ^a	22.2 ±0.1 ^a	22.3 ±0.1 ^a
5	21.4 ±0.2 ^a	21.7 ±0.2 ^a	21.7 ±0.2 ^a	21.5 ±0.2 ^a
6	21.1 ±0.1 ^a	21.3 ±0.1 ^a	21.2 ±0.1 ^a	22.1 ±0.2 ^a

*Letras diferentes por fila indican diferencia significativa ($p>0.05$).

Tabla 5. Variación del pH en de los cultivos de *T. suecica*.

Día	Control	EBBFCA		
		40	60	80
0	7.83 ±0.00 ^a	7.83 ±0.00 ^a	7.83 ±0.00 ^a	7.83 ±0.00 ^a
1	8.13 ±0.09 ^a	8.26 ±0.24 ^a	8.38 ±0.12 ^a	8.26 ±0.08 ^a
2	8.53 ±0.18 ^a	8.36 ±0.24 ^a	8.37 ±0.06 ^a	8.34 ±0.11 ^a
3	8.49 ±0.10 ^a	8.31 ±0.12 ^a	8.48 ±0.16 ^a	8.61 ±0.09 ^a
4	8.55 ±0.21 ^a	8.38 ±0.13 ^a	8.47 ±0.05 ^a	8.37 ±0.06 ^a
5	8.17 ±0.13 ^b	8.63 ±0.17 ^a	8.36 ±0.03 ^{ab}	8.22 ±0.14 ^b
6	8.56 ±0.03 ^a	8.01 ±0.15 ^b	8.26 ±0.12 ^{ab}	8.32 ±0.13 ^a

*Letras diferentes por fila indican diferencia significativa ($p>0.05$).

CONCLUSIONES

- El aprovechamiento de los nutrientes obtenidos a partir del biofouling que crece en los sistemas suspendidos de *A. purpuratus*, mediante el proceso de ensilado, posibilita el cultivo de *T. suecica* con importantes beneficios en el crecimiento poblacional y contenido de pigmentos de esta especie.
- Se recomienda esta forma de cultivo porque representa una alternativa importante para reducir los costos de producción masiva; además que contribuye a minimizar los impactos negativos de las actividades mariculturales en el medio ambiente marino.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arteaga, M. & G. Rojas.** 2015. Efecto de cuatro concentraciones del extracto del ensilado de partes blandas de *Argopecten purpuratus* "concha de abanico", en el crecimiento poblacional y contenido de lípidos totales de *Scenedesmus sp.* cultivada en condiciones de laboratorio. Tesis Bachiller. Universidad Nacional del Santa. 26 p.
- Baek, J. & B. Young.** 2002. Growth characteristics of five microalgal species isolated from Jeju Island and four microalgal stock strains in hatchery. *ALGAE* 17: 117-125.
- Barclay, W. & K. Meager, J. Abril.** 1994. Heterotrophic production of long chain omega-3 fatty acids utilizing algae and algae-like. *Journal of Applied Phycology* 6: 123- 129.
- Berenz, Z.** 1996. Ensilado de residuo de pescado. XI Curso Internacional de procesamiento de productos pesqueros. Instituto Tecnológico Pesquero. Perú, Callao.
- Carballo, E.; P. Tuan; M. Janssen & R. Wijffels.** 2003. Vitamin (α -tocopherol) production by marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* and *Tetraselmis suecica* in batch cultivation. *Biomolecular Engineering* 20: 139-147.
- Chisti, F.** 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 25:294-306.
- Encomendero, L. & F. Uchpa.** 2002. Producción de ensilado biológico de subproductos de concha de abanico (*Argopecten purpuratus*). Tesis bachiller. Universidad Nacional del Santa. Chimbote (Perú) 292-298
- Encomendero, L.; F. Merino & F. Uchpa.** 2006. Efecto de los poliquetos epibiontes sobre la concha de abanico, *Argopecten purpuratus*, cultivada en el Dorado. Tesis bachiller. Universidad Nacional del Santa. Chimbote- Perú.
- García, C.; Z. Arbib & J. Perales.** 2015. Cinéticas de crecimiento y consumo de nutrientes de microalgas en aguas residuales urbanas con diferentes niveles de tratamiento. *Tecnol. Cienc. Agua Jiutepec* 6(1): 49-68.

- Gómez, J.; T. García; V. Gómez & I. Garbayo, C. Vílchez.** 2011. Las microalgas, nuevos caminos hacia alimentos funcionales. I Jornadas del Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario. Departamento de Química y CCMM, Facultad de CC. Experimentales, Universidad de Huelva, 4p.
- Guillard, R.** 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In Smith, L. & H. Chandley (eds.). Culture of marine invertebrates animals, Plenum Press, London, England. pp. 29–60.
- Jiménez, B. & C. 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 carotenos totales de *Tetraselmis suecica*, en condiciones de laboratorio. Tesis bachiller. Universidad Nacional del Santa. 48p.
- Hosikian, A.; S. Lim; R. Halim & M. Danquah.** 2010. Chlorophyll Extraction from Microalgae: A Review on the Process Engineering Aspects. International Journal of Chemical Engineering, 11p.
- 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 bachiller. Universidad Nacional del Santa. Chimbote, Perú. 48p.
- Krauss, R.** 1958. Physiology of the fresh-water algae. Annual Review of Plant Physiology 68: 439-442.
- León, R.; M. Vila & E. Quijón, D. González-Ballester, A. Galván y E. Fernández.** 2003. Manipulación genética de microalgas para su utilización en la alimentación de especies de interés acuícola. II Congreso virtual de Acuicultura. Departamento de Química, Área de Bioquímica, Universidad de Huelva (España).
- Lichtenthaler, H. & A. Wellburn. 1985. Determination of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf in different solvents. Biol. Soc. Trans. 11: 591-592.
- 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.
- Mattos, J.; L. Chauca; F. San Martín; F. Carcelén & T. Arbaiza.** 2003. Uso del ensilado biológico de pescado en la alimentación de cuyes mejorados. Rev. Inv. Vet. 14(2): 89-96.
- Parín, M. & A. Zugarramurdi.** 1997. Aspectos Económicos del Procesamiento y Uso de Ensilados de Pescado. Estudio FAO: Producción y Sanidad Animal (FAO), no. 134: 41-63.
- Ponte, G. & M. Ruiz.** 2013, Efecto del extracto acuoso de harina de pescado en el crecimiento poblacional y contenido de β -caroteno en *Dunaliella salina*, en condiciones de laboratorio. Tesis bachiller. Universidad Nacional del Santa. Chimbote, Perú. 59p.
- O’Kelly, J.** 1968. Mineral nutrition of algae. Annual Review of Plant Physiology 19: 89-1.
- Rodríguez, J. & J. Ruíz. 2010. Conservación y protección de ecosistemas marinos: conceptos, herramientas y ejemplos de actuaciones. Ecosistemas 19 (2): 5-23.
- Saldaña, G.** 2012. Efecto de dietas con diferentes concentraciones de *Lactobacillus sp.* enriquecido con proteína hidrolizada de vísceras de *Argopecten purpuratus*, sobre el crecimiento y supervivencia de alevines de *Oreochromis niloticus* en laboratorio. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional de Trujillo, 72 p.
- 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*. Ecología Aplicada, 5:93-99.
- Silva, J.; V. Vásquez & F. Merino.** 2011. Producción de biomasa de *Tetraselmis suecica* empleando agua de mar con sanguaza. Scientia Agropecuaria 2: 13-23.
- Ulloa R.** 2011. Inducción de Productos Bioactivos en la Microalga Marina *Tetraselmis suecica*. Universidad de Santiago de Compostela. Departamento De Ingeniería Química. 220p.

