

UNIVERSIDAD RICARDO PALMA
Facultad de Ciencias Biológicas

CRECIMIENTO Y CICLO DE VIDA DE LA MICROALGA
Dunaliella salina Teodoresco (CLHOROPHYTA, VOLVOCALES)
DE LAS SALINAS DE LOS CHIMUS (ANCASH)
Y LAS SALINAS DE CHILCA (LIMA)

Tesis para optar el título de Licenciada en Biología

CARLA PATRICIA AGUILAR SAMANAMUD

LIMA-PERU

1995

INDICE

RESUMEN.....	1
1 INTRODUCCION.....	3
2 ANTECEDENTES.....	6
3 MATERIAL Y METODOS.....	10
3.1 AREA DE ESTUDIO.....	10
3.2 FACTORES FISICO-QUIMICOS.....	11
3.3 CLASIFICACION TAXONOMICA DE LA ESPECIE <i>Dunaliella salina</i>	12
3.4 TECNICAS DE COLECCION ALGAL.....	12
3.5 TRATAMIENTO DE LA MUESTRA EN ESTUDIO.....	13
3.5.1 Limpieza y esterilización del material	
3.5.2 Agua de mar	
3.5.3 Medio de cultivo	
3.5.4 Acondicionamiento de la muestra	
3.6 AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE LAS MICROALGAS..	17
3.6.1 Método de la micropipeta	
3.6.2 Método de la placa con agar	
3.6.3 Purificación	
- Por antibióticos	
- Por sedimentación celular	
3.7 MANTENIMIENTO DE LA CEPA.....	21
3.8 CRECIMIENTO ALGAL.....	22

3.8.1	Conteo en cámara de Newbauer	
3.8.2	Conteo en Espectrofotómetro	
3.8.3	Velocidad de crecimiento algal	
3.9	CICLO DE VIDA.....	27
3.10	TOLERANCIA A LA SALINIDAD.....	28
3.11	PROCESAMIENTO DE DATOS.....	29
4	RESULTADOS.....	31
5	DISCUSION.....	55
6	CONCLUSIONES.....	66
7	RECOMENDACIONES.....	68
8	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	69
	FIGURAS	
	TABLAS	

Cuando nos trazamos metas en la vida, tenemos inquietudes, ilusiones, en el camino conocemos a mucha gente, observamos, aprendemos, reímos, lloramos, maduramos, al final comprendemos que sólo se vive una vez y sólo una vez en la vida tenemos la oportunidad de hacer lo que realmente deseamos hacer por ello, debemos tratar de hacerlo bien.

Con todo mi cariño, a
mi familia, lo más
importante.

AGRADECIMIENTOS

Un especial agradecimiento a mi asesora Haydee Montoya T. por sus consejos, su apoyo y aliento en la culminación de éste trabajo.

A la Facultad de Ingeniería Pesquera y de Alimentos de la Universidad Nacional del Callao, por permitirme usar sus laboratorios. Al Area de Fitoplancton y Producción Primaria y al Area de Oceanografía Química del Instituto del Mar del Perú (IMARPE), por apoyarme en la realización del presente trabajo. Al Centro de Investigación para el desarrollo de la acuicultura: AQUA, por sus consejos y el apoyo para continuar realizando trabajos de investigación en nuestro país.

A las numerosas personas que de un modo u otro contribuyeron a que éste trabajo se culminara, en especial a Ursula y Carlos Aguilar.

Quiero agradecer muy en especial a mis padres, hermanas y hermanos por la paciencia y su gran apoyo brindado en la culminación de ésta tesis, lo que me impulsa a superarme día a día.

RESUMEN

Para el estudio de la microalga *Dunaliella salina* Teodoresco, se colectaron muestras de 2 lagunas hipersalinas; las Salinas de los Chimus y las Salinas de Chilca.

La metodología usada fue la técnica de micropipeta, tratamiento con antibiótico y la técnica de sedimentación algal, obteniéndose cultivos unialgales y axénicos.

El medio usado fue medio Johnson modificado en agua de mar, utilizando concentraciones de NaCl (1-5M), éste permitió evaluar el crecimiento, densidad y velocidad algal a través de conteo en cámara de Neubauer y lecturas de absorbancia en espectrofotómetro. La relación entre los métodos de conteo, se realizó con el análisis de regresión potencial.

Las mejores densidades algales se observaron en cultivos de concentraciones 1M, 1,5M y 3,5M de NaCl, para

las cepas de las salinas de Chimus y Chilca. La mayor densidad algal ($4,603 \times 10^6$ cels.ml⁻¹ equivalente al 56,4% para la cepa de Chimus) se observó en el cultivo de 1,5M de NaCl.

La velocidad de crecimiento durante la fase exponencial para ambas cepas, estuvieron entre 0,56-0,83 div.día⁻¹, con un Td de 29-43 horas, en cámara de Newbauer como en espectrofotómetro y a las mismas concentraciones de cultivo.

El ciclo de vida en ambas estaciones, evidenció una fase asexual con amplia diversidad morfológica, demostrando la plasticidad fenotípica de la especie. El estado palmeloide se observó sólo en ambiente natural de la Salina de Chilca y la formación de aplanosporas se observó durante la adaptación de la microalga en el laboratorio para la misma estación.

La tolerancia a la salinidad, que toleró el alga estuvo entre 35-327,2 ‰.

INTRODUCCION

Las microalgas, organismos capaces de formar a partir de elementos simples, sustancias orgánicas complejas. Estos vegetales inferiores constituyen los elementos primarios en la producción de materia orgánica de los ecosistemas acuáticos considerándoseles en muchos casos como indicadores biológicos de cuerpos de agua.

Se encuentran distribuidos mundialmente, presentando diversidad de tamaño, pigmentación, mecanismos reproductivos, tasa de reproducción elevada, siendo muchas de ellas comestibles por ser fuente de vitaminas, proteínas y minerales.

Los lagos salinos o áreas con sistemas acuáticos salinos se presentan en todos los continentes y en términos de volúmenes absolutos y porcentual del agua total de la biosfera, son menos importantes que las aguas

dulces, (VALLENTYNE, 1972).

En Sud-América se encuentran gran cantidad de cuerpos de agua salados, definidos como aquellos que presentan una concentración de sólidos disueltos totales mayores a un 3% (WILLIAMS, 1981). En nuestro país los lagos hipersalinos son sistemas acuáticos continentales la mayoría cercanos a la costa, que albergan en sus aguas organismos adaptados a un desarrollo de condiciones extremas.

Dunaliella es uno de estos organismos adaptados a tales condiciones que pertenece a las Chlorophyta, es un organismo unicelular eucariótico, alimento principal del braquiópodo crustáceo *Artemia sp* "camarón de salmuera", (BOWEN, 1980).

En la actualidad el cultivo de microalgas tiene gran importancia para acuicultores, biotecnólogos, ecólogos, etc., produciéndose cultivos en forma masiva con la finalidad de utilizar el producto como suplemento en la dieta alimenticia para animales (larvas de crustáceos, moluscos, peces), como fertilizante de tierras de cultivo ó materia prima en la obtención de productos químicos (pigmentos, lípidos, glicerol).

En especial *D. salina*, motivo del presente trabajo, además de su importancia como fuente alimenticia, como alga verde unicelular extremadamente halofílica, se le

considera fuente potencialmente comercial en la extracción de glicerol y por sus soluciones osmoreguladoras y de pigmentos carotenoides como β -caroteno, formadores de la pro-vitamina A. (MASSYUK, 1968).

El presente trabajo, centró sus investigaciones a diferentes aspectos biológicos de la microalga *D. salina* como morfología, ciclo de vida y mantención de la cepa. Esto nos permitió establecer las condiciones óptimas para el manejo y reproducción de la especie, con el fin de incentivar investigaciones futuras, en el campo de la acuicultura y la biotecnología, ya que contamos con la materia prima, base fundamental para el desarrollo en este campo.

Los ecosistemas salinos en el mundo contienen algas halofílicas como clorofitas unicelulares y cianobacterias constituyéndose en los productores primarios, conviene así conservar tales ambientes y darles el uso adecuado para su debida explotación.

ANTECEDENTES

El género *Dunaliella*, alga verde, unicelular fue descrita por primera vez por Teodoresco en 1905, en honor a M.F. Dunal, quien fue el primero que reconoció y certificó que el color rojo de los reservorios salinos los producía un alga (DUNAL, 1837; citado en LOEBLICH, 1982).

Hasta hoy, muchas especies han sido descritas dentro de un amplio rango de habitat y aun, cuando no todas las formas de dicha alga registren un alto contenido de β -caroteno, muchas pueden ser reportadas como de color rojo al medio natural sin contener grandes cantidades del pigmento. Algunas células de *Dunaliella*, las cuales no son capaces de tornarse rojo-naranja pueden no ser considerados como *D. salina* (LOEBLICH, 1982).

Muchos organismos en cultivo, han sido mal nombrados

y a algunas especies innecesariamente se les puso otro nombre. Por ejemplo *D. bardawil* (e.g. BEN-AMOTZ & AVRON, 1983a), que es un nombre nulo y es actualmente un organismo de *D. salina* Teod., como todo organismo que aparece rojo debido a la gran acumulación de β -caroteno bajo condiciones extremas de desarrollo (MASSYUK, 1973).

Dunaliella es tradicionalmente colocada en el orden Volvocales, familia Polyblepharidaceae; aunque Ettl (1983), propone un nuevo orden Dunaliellales con la familia Dunaliellaceae (CHRISTENSEN, 1962). Sin embargo la taxonomía del género es aun incierta, muy variada en especies, subespecies, ecotipos y variedades (MASSYUK, 1973; GINSBURG, 1987). La posición taxonómica de varias formas reconocibles no es precisa (BOROWITZKA & BOROWITZKA, 1986).

Debido a su elevado contenido proteico, *D. salina* comenzó a ser considerada como fuente alimenticia y fuente bioquímica hacia la década del 40, realizándose el primer Symposium sobre Cultivo Masivo de Microalgas en 1952. Desde entonces hasta la actualidad un sin número de trabajos se vienen realizando en torno a la especie.

Con los avances y estudios realizados empiezan a surgir otros organismos algales como fuente de explotación comercial tales como: *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Chaetoceros* y *Spirulina*.

La competencia entre especies por sobrevivir dentro de un mismo ecosistema, las obliga a desarrollar ciertas adaptaciones en su constitución fisiológica y hasta morfológica, haciéndolas organismos resistentes a condiciones extremas.

En Australia desde 1978, se viene estudiando la factibilidad de los cultivos a gran escala como fuente comercial sólo de β -caroteno, ese mismo año los Laboratorios ROCHE establecen la planta de biotecnología algal en Australia (BOROWITZKA, *et al.*, 1984). Sin embargo operaciones de prueba fueron establecidas en Rusia (MASSYUK, 1968), e Israel (BEN-AMOTZ, 1980).

El interés por la explotación de *D. salina*, está en la utilización de los colorantes naturales en vez de los sintéticos (BEN-AMOTZ, *et al.*, 1982; BOROWITZKA *et al.*, 1984). Esta alga tiene la habilidad para acumular grandes cantidades de β -caroteno, a veces más del 10% de su peso seco, tanto en forma natural como a condiciones de laboratorio (BEN-AMOTZ *et al.*, 1987).

En el Perú a lo largo de la zona costera, existen varias lagunas hipersalinas, cuya importancia radica en la producción de sal, al igual que otras lagunas de este tipo en el mundo, tienen como constituyente principal del zooplancton al crustáceo *Artemia sp*, muy utilizado en acuicultura (SORGELOOS, 1980). Algunas de estas lagunas

en nuestro país son: Virrilá (Piura); Los Chimus (Ancash); Huacho y Chilca (Lima); Caucato y Otuma (Ica); etc.

El estudio en nuestro país del fitoplancton de cuerpos de agua salinas es muy limitado, sólo se han realizado investigaciones en cultivo de *D. salina* Teodoresco y *Nannochloris bacillaris* (Naumann) (RODRIGUEZ, *et al.*, 1986) y *D. viridis* de las Salinas de Huacho (BARBERENA Y MONTOYA, 1990).

MATERIAL Y METODOS

3.1 AREA DE ESTUDIO

Los ambientes hipersalinos se encuentran comúnmente a lo largo de nuestra zona costera, en algunos casos cercanos al mar y son de orígenes variados (marinos, fluviales, etc).

El material algológico estudiado, se colectó en las Salinas de los Chimus, al norte de la provincia de Chimbote entre los $78^{\circ}27'59''$ Longitud Oeste y los $09^{\circ}19'20''$ Latitud Sur, en el departamento de Ancash y en Las salinas de Chilca, ubicada a la altura del Km 67 de la antigua Carretera Panamericana Sur (Km 86 de la actual Panamericana Sur), entre los $76^{\circ}42'38''$ Longitud Oeste y los $12^{\circ}32'45''$ Latitud Sur, provincia de Lima, departamento de Lima, (Fig. 1a).

Las Salinas de los Chimus, localizada en suelo llano

salitroso cercano al mar. Está conformado por varias lagunas (4 ó más) grandes, juntas una de otra. El pueblo de Chimus pequeño junto a las lagunas produce contaminación evidente en la zona. Las lagunas de origen marino, se alimentan de aguas subterráneas que ascienden por capilaridad hasta la superficie, (Fig. 1b).

Las Salinas de Chilca localizada en terreno llano salitroso, se extiende a 2 Km frente al mar conformada por un conjunto de cuerpos de agua entre las que se cuenta una grande y cuatro pequeñas que, no evidencian mayor contaminación. A unos cuantos metros de las lagunas se observan montículos de costra de sal, propias de las zonas y un poco más alejado se halla la población del lugar. El nivel hídrico está gobernado por filtraciones de origen fluvial a través de aguas del río Chilca (CHACON, 1980), (Fig. 1c).

3.2 FACTORES FISICO-QUIMICOS

Se tomaron en cuenta tres factores físico-químicos: a) temperatura: tomada con un termómetro de mercurio (-10 a 110°C); b) pH: medido con varillas de papel pH alcalino (7,5-14), pH ácido (1-7,5) y pH neutral (5,5-9); c) salinidad: se registró empleando un salinómetro AO T/C, para los ambientes naturales y a través de la curva

standard, que se obtuvo graficando las salinidades correspondientes a las diferentes concentraciones de NaCl (QP).

3.3 CLASIFICACION TAXONOMICA DE LA ESPECIE *Dunaliella salina*

DIVISION	CHLOROPHYTA
Clase	Chlorophyceae
Orden	Volvocales
Familia	Dunaliellaceae
Género	Dunaliella
Especie	<i>Dunaliella salina</i> (teodoresco)

3.4 TECNICA DE COLECCION ALGAL

El muestreo se realizó, colectando muestras líquidas lo más concentradas posible, directamente dentro del cuerpo de agua tanto de las zonas superficiales como de las profundas. Para las muestras bentónicas fue necesario la ayuda de una espátula ó cuchara raspando las comunidades algales en forma de natas adheridas a las formaciones rocosas de sal. Las muestras obtenidas se depositaron en frascos transparentes previamente rotulados y otras envueltas en papel periódico para

conservar las muestras secas. Además se colectó aproximadamente 500 ml de muestras de agua.

Las muestras, fueron trasladadas directamente al laboratorio de Biología de la Facultad de Ingeniería Pesquera y de Alimentos de la Universidad Nacional del Callao, para su posterior estudio.

3.5 TRATAMIENTO DE LA MUESTRA EN ESTUDIO

Las muestras colectadas de la microalga fueron aisladas y cultivadas en medio de cultivo adecuado con la finalidad de obtener las concentraciones óptimas para su mejor desarrollo.

3.5.1 Limpieza y esterilización del material;

El material de vidrio utilizado en el trabajo se separó en dos grupos según las estaciones en estudio (Chimus y Chilca). La limpieza se realizó con detergente por 24 horas, para luego ser enjuagado con abundante agua potable y por último con agua destilada repetidas veces (3-4).

La esterilización del material se realizó en estufa, por el período de una hora a 180°C., después de un tiempo que el material se enfriase se retiraba con la ayuda de

unos guantes de asbesto.

Los erlemeyers y probetas fueron cubiertos en la parte superior con papel de aluminio y se les colocaba en un armario cerrado; los tubos con tapa rosca eran colocados inmediatamente en una cámara secante estéril y cerrada; Las placas petri se colocaban en bolsas gruesas y herméticas de polietileno; las pipetas de diversos volúmenes: 0,01-10 ml. y las pipetas Pasteur, se colocaron en depósitos de vidrio según el tamaño, tapados con papel de aluminio; Los cubre y porta objetos, lunas de reloj y placa excavada fueron mantenidas estériles para su uso.

3.5.2 Agua de Mar;

El agua de mar fue colectada en la playa "Cantolao" ubicado en el distrito de la Punta, provincia del Callao, a cierta distancia de la costa donde la turbidez del agua es mínima, se almacenó en Bidones de 35 litros de capacidad, por un período aproximado de 3 meses favoreciendo la muerte y descomposición de los organismos presentes, su sedimentación y posterior filtrado. El agua de mar envejecida como base para la preparación de los medios de cultivo favorece en gran medida el desarrollo algal.

El envejecimiento del agua se realizó en oscuridad por tres meses, filtrándose dos veces con papel filtro

(0,45 μ) luego se repartió en matraces de 500 ml, y se le esterilizó (autoclavó) por un período de 45 minutos a 15 libras y 121°C. Posteriormente se enfriaba y refrigeraba hasta su utilización.

3.5.3. Medio de Cultivo

Los componentes del medio Johnson modificado se encuentran en la tabla 16.

La preparación del medio se realizó en un matraz de 2 litros, al que se le adicionaron por cada 973 ml de agua de mar los siguientes componentes:

- 1 ml de cada macro nutriente
- 10 ml de solución de fierro
- 10 ml de trazas de metales

El cloruro de sodio, se adicionó primero en cantidades de acuerdo a la concentración con la que se trabajó, posteriormente se agregaron los macronutrientes, la solución de fierro y las trazas de metales.

El medio se esterilizó a 15 libras de presión por 15' a 121°C, se registró el pH y la salinidad antes y después de autoclavado.

- Medio Johnson Modificado (J/1) Agarizado

El medio semisólido se preparó agregando agar al 1,8 % y acetato de Sodio al 0,027 % al medio Johnson (J/1),

en baño maría hasta que el agar estuviese completamente disuelto, luego se repartió en forma aséptica en placas petri de 15 x 100 mm. Estas fueron distribuidas en bolsas de polietileno herméticamente cerradas guardándose en refrigeración hasta su utilización.

3.5.4 Acondicionamiento de las Muestras;

Tratando de mantener las condiciones similares al de su medio natural, las muestras colectadas y llevadas al laboratorio se trabajaron de la siguiente manera:

Las muestras colectadas (5) por estación, se colocaron en el cuarto de cultivo provisto de estantes con 4 fluorescentes (Phillips) de 40 watts cada uno, en la parte superior de cada estante.

Se colectaron por cada estación 5 muestras algales en frascos de colección de 50 ml cada uno, adicionalmente se colectó 500 ml de muestra de agua, para evitar la desecación de las muestras algales luego, dichas muestras se trasladaron al laboratorio y fueron observadas al microscopio.

Se les suministró iluminación artificial continua durante 24 horas, adicionado al de la luz natural durante el día a través de una ventana. La distancia del fluorescente a los recipientes de cultivo fue de 30 cm.

Con la finalidad, que el alga se adapte a su nuevo

ambiente, no se le trató con medio inorgánico sino hasta después de 2 días, tiempo necesario para el estudio de su comportamiento en su medio natural y a la liberación de natas adheridas a las rocas de sal de la laguna.

A la muestra natural más concentrada, después del tiempo de adaptación se le designó como "muestra madre", y sirvió para realizar los inóculos de 1 ml de muestra en tubos de cultivo (15x100 mm.) con 9 ml de medio inorgánico (J/1). En total se inocularon 9 tubos, con concentraciones de NaCl de 4M, 4,5M, 5M, por triplicado para cada zona de muestreo.

Los tubos se incubaron en el cuarto de cultivo y las observaciones microscópicas se realizaron después de un mes, se seleccionó el tubo que mostró mejor crecimiento y de él se realizó el aislamiento algal.

3.6 AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE LAS MICROALGAS

Una vez seleccionado el medio al cual se adaptó mejor el alga, se realizó el proceso de aislamiento, que tiene por finalidad purificar la muestra obteniéndose cultivos clonales.

3.6.1 Método de la micropipeta;

Mediante éste método la utilización de micropipetas

y su acción de capilarización permite capturar células algales individuales.

La colocación de una gota con muestra del alga de interés proveniente de los tubos citados con (J/1) en una luna de reloj, fue seguida por la observación al estereoscopio para tratar de separar y capturar las células y vertirlas en otras gotas del medio de cultivo hasta que se obtenga una célula en cada gota.

Cada célula fue capturada con una micropipeta y fue lavada por desplazamiento en medio líquido varias veces. Posteriormente cada célula algal limpia, se inoculó en un tubo con 5 ml de medio (J/1) fresco y estéril, en condiciones favorables de laboratorio, observándoseles periódicamente.

3.6.2 Método de placa con agar;

La aplicación de éste método, permite obtener muestras clonales unialgales, donde la progenie vegetativa provenga de un sólo individuo.

Placas petri con medio (J/1) agarizado fueron sembrados con 1 a 2 gotas de la muestra madre que fueron esparcidas suavemente con el asa de siembra de vidrio (Dragasky) en movimiento continuo en toda la placa y frente al mechero para evitar todo tipo de contaminación.

Las placas sembradas se colocaron en bolsas de

polietileno herméticamente cerradas y fueron colocadas invertidas en los estantes para su incubación.

Posteriormente evidenciado el crecimiento algal, se observaron las colonias al estereoscopio y se seleccionó la mejor aislada, la que se colocó en una lámina excavada diluyéndola en medio estéril, se verificó el crecimiento algal al microscopio. Se sembró nuevamente 1 ó 2 gotas de la muestra diluida en placas con medio agarizado y acetato de sodio repitiendo el proceso hasta obtener el aislamiento completo del alga.

3.6.3 Purificación;

Obtenidos los cultivos unialgales, para completar la asepsia de los mismos, se realizó la purificación.

-Por antibióticos

Esta técnica consta de una mezcla de antibióticos, de tal forma que, las algas quedan libres de bacterias y se obtenga una muestra clonal axénica (GUILLARD, 1973), (HOSHAW y ROSOWSKI, 1973).

Se preparó 5 tubos con 9 ml de medio de cultivo estéril y se añadió a cada uno de los 4 tubos la mezcla de antibióticos siguientes: Se diluye 100 mg de penicilina G sódica ($C_{16}H_{12}N_2NaO_4$) 1 millón UI y 500 mg de sulfato de streptomina ($C_{42}H_{84}N_{14}O_{36}S_3$), todo en 10 ml de

agua destilada estéril, se repartió en los siguientes volúmenes: 0,4, 0,6, 0,7 y 0,8 para las muestras de Chimus y en volúmenes de: 0,05, 0,1, 0,2 y 0,4 para las muestras de Chilca, quedando el quinto tubo como control. Posteriormente se repartió 1 ml de muestra algal seleccionada a cada uno de los tubos y se incubó a condiciones de laboratorio para observar el desarrollo algal.

A las 48 horas, se comparó las muestras tratadas con el tubo control en apariencia y motilidad, se seleccionó el tubo con la mezcla antibiótica inhibitoria de contaminantes y se procedió a la transferencia aséptica de las células algales purificadas a tubos con medio de cultivo estéril sin antibiótico, se obtuvo la cepa clonal axénica del alga.

-Por sedimentación celular;

Es favorable cuando se trata de purificar cultivos clonales viejos, es decir, cultivos que por acción de algún agente externo se contamine o por el tiempo de mantención las células se concentran en el fondo del tubo.

Con la ayuda de una pipeta Pasteur se extrajo el sedimento del fondo y se colocó en un tubo con medio nuevo y estéril, se homogenizó y se esperó hasta que las

natas se diluyeron luego, se tomó una gota del homogenizado y se observó al microscopio para la verificación de presencia celular.

Los tubos se mantuvieron en los estantes a condiciones de laboratorio, en algunos casos fue necesario sellarlos con parafilm, para evitar algún otro tipo de contaminación, el procedimiento se repitió hasta obtener cultivo libre de contaminantes.

3.7 MANTENIMIENTO ALGAL

El mantenimiento de las células algales clonales con la finalidad de contar con un stock de cultivo de la microalga se realizó a través de inoculaciones seriadas que permitieron la renovación constante de la cepa. La cepa, se mantuvo tanto en medio líquido como semisólido con poca iluminación artificial o luz indirecta natural.

El medio usado para el mantenimiento fue (J/1), distribuido 9 ml de éste, en tubos de 15 x 100 mm con 1 ml de inóculo. En placas petri de 100 x 15 mm aproximadamente con 15 ml de medio agarizado se inoculó 1 ó 2 gotas de muestra diluida, que se extendió con un asa de siembra de vidrio por toda la placa.

La inoculación de cultivos stock para mantenerlos se realizó en base a los datos de crecimiento algal, según las necesidades que puedan servir para futuras

investigaciones, esto implica que varíe de acuerdo a la concentración y el tiempo de repique.

3.8 CRECIMIENTO ALGAL

La población algal aumenta a medida que se incrementa el número de células por división, es decir, la densidad celular es proporcional al número de células presentes (COLL, 1986). Para determinar el crecimiento algal se empleó los métodos de conteo celular con hemocitómetro (cámara de Newbauer) y la determinación de la absorbancia mediante el uso del espectrofotómetro.

3.8.1 Método de conteo celular con hemocitómetro;

Este método permite un conteo adecuado de las microalgas, distribuidas al azar, donde el número de células en un volumen conocido se pueda determinar y la concentración celular pueda ser calculada.

El hemocitómetro empleado fue: SPENCER BRIGHT-LINE, con una profundidad de 0,1 mm y una regla de Newbauer, está dividida en dos cámaras, cada una de las cuales consta de 9 cuadrados de 1 mm de lado. A su vez cada cuadrado está subdividido en cuadraditos de 0,25 mm de lado. El volumen de suspensión algal en un cuadrado de 1 mm de lado es de $0,1 \text{ mm}^3$ (10^{-4} cc).

La fórmula empleada para contar la densidad celular por mililitro con la ayuda del hemocitómetro es:

$$d=Q \times 10^4$$

donde: d =número total de cel. ml^{-1}

Q =promedio de conteo por cara en 4 cuadrantes.

El procedimiento para realizar el conteo fue el siguiente:

- Limpieza de la cámara de conteo y su cubre objeto respectivo con un algodón humedecido en alcohol.
- Homogenización de la muestra a evaluar y obtención de una pequeña porción con la pipeta pasteur que se virtió en viales.
- Fijación con lugol (una pequeña gota) con agitación simultánea.
- Obtención de un volumen determinado de la muestra fijada y su distribución en la cámara del hemocitómetro tratando que la gota se extienda en forma uniforme al colocar el cubre objeto.
- Observación microscópica con el conteo celular por triplicado, se llena la cámara respectiva en cada caso contando los cuadrados de las esquinas, calculándose la media aritmética de los registros hechos.
- El promedio de los datos que se obtienen se multiplican por 10^4 y la densidad del cultivo se calcula

como el número de células por mililitro (cels.ml^{-1}).

3.8.2 Conteo en espectrofotómetro;

Con el fin de evaluar el crecimiento, se consideró el uso del espectrofotómetro, a través de las lecturas de absorbancia del cultivo algal determinando la densidad celular.

Las lecturas de absorbancia, se llevaron a cabo en un espectrofotómetro: BECKMAN DU-62 del laboratorio de Análisis Químicos del área de Oceanografía Química del Instituto del Mar del Perú (IMARPE).

Las lecturas se efectuaron diariamente a la misma hora por un período de 21 días, los resultados de las lecturas de absorbancia se traducen en porcentaje (%). Las cubetas deben de contener un mínimo de volumen de 2,5 ml y un máximo de 3 ml de solución para la lectura.

El proceso de lectura fue realizado de la siguiente manera:

- Verificación del funcionamiento óptimo del aparato encendido una hora antes de empezar las lecturas.
- Registro de la temperatura del ambiente donde se hallan las muestras a leer 30 minutos antes de pasar por el espectrofotómetro.
- Calibración del aparato con estimación del rango de error, si existe alguna variación en la calibración para

la muestra o el blanco.

- Medición de 3 ml de muestra, previa homogenización de ésta y su distribución en el respectivo vial previamente rotulado para su posterior lectura.
- Obtención del volumen determinado de muestra con pipeta graduada estéril frente a un mechero en condiciones completamente asépticas.
- Lectura por triplicado de las muestras para la obtención de absorbancia promedio y procesamiento de datos.
- Fijación de la muestra con lugol para su conteo en la cámara de Newbauer.

3.8.3 Velocidad de crecimiento algal;

La velocidad de crecimiento algal, que representa el número de divisiones celulares en un determinado tiempo con un tiempo de duplicación o generación (Td). Este se calcula a partir de la velocidad de crecimiento específica (K), como sigue:

fórmula de la fase exponencial del crecimiento:

$$K = 3,322 / (t_2 - t_1) \times \log(N_2 / N_1)$$

donde: $t_2 - t_1$ = Intervalo de tiempo.

N_1 = Concentración celular o tamaño de la población al iniciar el período del tiempo evaluado (t_1).

N_2 = Concentración celular o tamaño de la población al iniciar el período del tiempo evaluado (t_2).

$$Td=1/K \text{ (día/div)} = 24/K \text{ (horas/div)}$$

Para la determinación del crecimiento a diferentes salinidades se realizó lo siguiente:

- Se seleccionó un tubo de muestra algal por estación trabajada con crecimiento en fase exponencial, replicándose en matraces, a la misma concentración inicial para aumentar el volumen de las muestras, por que se trabajará a diferentes concentraciones para evaluar la tolerancia a la salinidad.
- Determinación de la densidad celular por conteo en la cámara de Newbauer que presenta cada tubo.
- En condiciones asépticas se preparó matraces de 100 ml de capacidad con 45 ml de medio (J/1) al que se inocula 5 ml de muestra algal. A estos matraces se les denominó matraces stock.
- Determinación de la densidad celular que presenta cada matraz por conteo, para ver como se presenta la población a la batería.
- Inoculación por duplicado de matraces con 45 ml de medio conteniendo la respectiva cantidad de cloruro de

sodio de acuerdo a la concentración estimada con 5 ml de muestra por matraz.

- Los matraces para la lectura se colocaron en el cuarto de cultivo con fotoperíodo continuo (24 horas) a una distancia de 30 cm de los fluorescentes además de la luz natural durante el día.

- Se tomaron diariamente 2,5 ml de muestra de cada matraz, para ser leídas en espectro y luego las mismas se fijaron con lugol en sus viales respectivos para su conteo celular, la hora y la temperatura se registraron cuando se realizó la extracción de muestra.

- Las lecturas como el conteo de cada muestra se hicieron por triplicado obteniéndose los respectivos promedios para el procesamiento de datos.

3.9 CICLO DE VIDA

El estudio del ciclo de vida, se realizó con muestras clonales purificadas de tubos de cultivo de 15 x 100 mm con tapa rosca y matraces de 100 ml de las diferentes concentraciones de cloruro de sodio, que contenían 9 ml y 45 ml de medio (J/1) respectivamente.

Las muestras clonales se mantuvieron en la sala de cultivo con fotoperíodo continuo las 24 horas, además de la luz natural suministrada durante el día. Las muestras

fueron agitadas diariamente en forma suave de 2 a 3 veces al día.

Las observaciones diarias de las muestras se obtuvieron con registros de datos morfométricos, utilizando microscopio compuesto con un micrométrico ocular, microfotografías y dibujos simultáneos de los estadios y de las fases de reproducción, de acuerdo a las concentraciones de NaCl sometidas utilizadas.

3.10 TOLERANCIA A LA SALINIDAD

La salinidad es un factor limitante en el desarrollo de las microalgas y para determinar el rango de tolerancia a la salinidad del alga, se realizó un tratamiento a diferentes concentraciones de cloruro de sodio como sigue:

- Se preparó un conjunto de concentraciones de NaCl por estación (Chimus y Chilca), con la finalidad de comparar el comportamiento de las cepas algales.
- Se prepararon 10 concentraciones; 1 sin cloruro de sodio y 9 con cloruro de sodio, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 y 5 M las que se agregaron por separado al medio de cultivo (J/1).
- Se vertieron 45 ml de medio en matraces de 100 ml y se agregó 5 ml de inóculo.

- Los matraces fueron rotulados para diferenciar las concentraciones y la estación respectiva y colocadas en los estantes de la sala de cultivo en condiciones ya citadas.
- Las observaciones del crecimiento algal fueron continuas y simultáneas para ambas estaciones.

3.11 PROCESAMIENTO DE DATOS

Los datos obtenidos durante el desarrollo de la microalga se ajustaron a una función logística $[N(t)=k/\{1+((k-N_0)/N_0)*\exp(-rt)\}]$, con variables como el tiempo (t) expresado en días, la densidad celular (N) expresada en cels.ml^{-1} ó absorvancia expresado en porcentaje (%), según el método usado, (k) que representa la máxima concentración que puede alcanzar el cultivo; se obtuvo la tasa de crecimiento instantánea (r) expresada en $\text{cels.ml}^{-1}.\text{dia}^{-1}$. Para la curva de crecimiento encontrada hasta el primer día de la fase de declive celular.

Para efecto de comparación de las dos técnicas usadas (cámara de Neubauer y espectrofotómetro), se realizó el análisis de regresión potencial, determinando así la correspondencia que existe entre ambos resultados.

Los datos de la función logística, se procesaron con

el paquete computacional FISHPARM (Saila *et. al*, 1988);
el análisis de regresión, las gráficas y tablas en Q-pro
5,0; el desarrollo del texto en Work perfect 5,1.

RESULTADOS

4.1 AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE LAS CEPAS DE *Dunaliella salina*

Luego del análisis de las muestras colectadas, se escogió la más concentrada de células de *D. salina*, denominándosele "muestra madre" a partir de la cual se obtuvieron alícuotas para inoculaciones posteriores.

La adaptación y crecimiento del alga luego de la inoculación de tubos de cultivo con medio Johnson modificado (J/1), a tres molaridades diferentes; 4, 4,5 y 5M de NaCl se observó a simple vista después de 11 días, una coloración rojiza pálida en los tubos de cultivo. Posteriormente a los 30 días la observación microscópica permitió reconocer que, los tubos de cultivo mejores y más concentrados con *D. salina* fueron los de 4,5M de NaCl para las localidades de Chimus y Chilca.

Esta concentración fue seleccionada para trabajar durante la parte preliminar, debido a la reducción de los contaminantes asegurando un manipuleo eficaz de la microalga.

El aislamiento algal en placa petri no permitió mayores resultados de purificación siendo el crecimiento lento (2-3 meses) y de fácil contaminación.

El aislamiento algal por la micropipeta, permitió el crecimiento de las cepas de Chimus (4 tubos) y Chilca (8 tubos) con buen crecimiento algal.

La purificación por antibióticos de la cepa de Chimus fue de 0,6 a las 48 horas de inoculación demostrando la mayor contaminación comparada con la cepa de Chilca la cual fue de 0,4 luego de 48 horas de incubación sin alteración de su morfología y motilidad.

4.2 CRECIMIENTO DE LAS CEPAS DE *D. salina*

El cultivo de la Clorofita *D. salina*, se realizó en medio J/1 enriquecido con agua de mar a un pH de 7,5 y una temperatura promedio de 29,9 \pm 1°C. y con 10 diferentes concentraciones de NaCl (la concentración 0M, fue la trabajada sólo con agua de mar).

Los datos de la densidad algal, obtenidos experimentalmente por conteo sucesivos, en un período de 21 días en cámara de Newbauer y lecturas en espectrofotómetro,

se muestran en las tablas del 1 al 4, las que variaron de acuerdo a la concentración de NaCl a la que fue expuesta el alga.

Las curvas de crecimiento de *D. salina*, desde su adaptación hasta su máximo desarrollo en las diferentes concentraciones de NaCl tratadas, se muestran en las figuras del 3 al 6 y tablas del 5 al 8.

D. salina, de las Salinas de los Chimus presentó una fase de adaptación un poco larga, hasta el 5^{to} día para las concentraciones bajas (0-2,5M de NaCl) y hasta el 10^{mo} día para las concentraciones altas (3-5M de NaCl), (Fig.3 y 4; tabla.5). Para las salinas de Chilca la fase de adaptación duró los 3 primeros días de conteo para los 5 cultivos de concentraciones bajas (0-2,5M de NaCl), extendiéndose hasta el 9^{no} día de conteo para los 5 cultivos de concentraciones altas (3-5M de NaCl), (Fig.5 y 6; Tabla.7). Para la cepa de Chimus la fase exponencial en cultivos de concentraciones iniciales de 0, 1 y 1,5M de NaCl, estuvieron dentro del 3^{er} al 7^{mo} día de conteo con una duración de 2 a 3 días como máximo, estas variaciones fueron observadas tanto en los conteo con cámara de Newbauer como en las lecturas con espectrofotómetro, (Fig.3 y 4; tablas.5 y 6). Para la cepa de Chilca en cultivos de las mismas concentraciones de NaCl, tuvieron una fase exponencial bien marcada;

Dentro del 3^{er} al 10^{mo} día de conteo esta fase tuvo una duración de 2 a 6 días como máximo. Posteriormente el crecimiento algal fue lento hasta alcanzar su máxima concentración celular durante la fase estacionaria, la que tuvo una duración aproximada de 4 a 6 días en ambas cepas, para luego terminar con la fase de muerte celular.

Para ambas cepas los cultivos de bajas concentraciones 2 y 2,5M de NaCl, experimentan un crecimiento poco diferenciado entre una fase y otra, con valores bajos y paralelos entre si. En las concentraciones más altas 4,5 y 5M, donde la densidad celular aumenta muy lentamente se llegó a obtener su desarrollo máximo hacia el penúltimo ó último día de conteo (Fig. 3 - 6).

Los cultivos de concentraciones 3, 3,5 y 4M de NaCl, muestran un aumento en la densidad celular con diferenciación de fases no tan marcadas como en los cultivos de concentraciones bajas, (1 y 1,5M). Las fases de adaptación para ambas cepas fueron largas (hasta el 8^{vo} día), la fase exponencial empieza hacia el 8^{vo} día de conteo, teniendo una duración en la cepa de Chimus (4-8 días) mayor a la cepa de Chilca (4-5 días), en cultivos cuyas concentraciones de NaCl fueron de 3M y 3,5M. La fase estacionaria para la cepa de Chimus (3 días) fue más corta que para las cepas de Chilca (5-6 días), alcanzando

su máximo desarrollo celular para luego terminar en la fase de muerte celular. Lo observado se evidenció tanto durante los conteos en cámara de Newbauer como durante las lecturas en espectro.

La velocidad de crecimiento (K) de las cepas de *D. salina*, obtenidas para los cultivos con un crecimiento algal gradual y elevado; sus valores inmediatos superiores y posteriores, se muestran en las tablas del 9 al 12.

Para ambas salinas estudiadas, los cultivos cuyas concentraciones estuvieron en el rango de 1M y 1,5M de NaCl, presentaron un desarrollo gradual y elevado. Sin embargo el cultivo tratado con agua de mar (0M de NaCl) presentó el desarrollo celular más alto entre las concentraciones bajas, (tablas 9 y 11). Los resultados con cámara de Newbauer fueron semejantes a los del espectrofotómetro. Para cultivos con concentración 3,5M de NaCl, entre las concentraciones altas, presentó un desarrollo gradualmente elevado diferenciándola de las otras concentraciones (3 y 4M), (tablas. 10 y 12).

Las mejores velocidades de crecimiento celular (K) se observaron en cultivos de concentraciones 1M, 1,5M y 3,5M de NaCl, tanto para las cepas de Chimus como Chilca y con ambas técnicas (cámara de newbauer y espectrofotómetro). Aunque la velocidad más elevada se

presentó en cultivos tratados sólo con agua de mar (0M de NaCl).

La velocidad de crecimiento (K) para la cepa de *Chimus* la cual presentó un crecimiento gradual y elevado, tanto para cámara de Newbahuer como para espectrofotómetro en forma decreciente fue la siguiente: 0M:1,53- 0,94; 3,5M:0,79; 1,5M:0,83 y a 1M:0,78- 0,65 div.día⁻¹, con un Td (horas.div⁻¹) de 16 a 26, 30, 29 y de 31 a 37 para las concentraciones de NaCl de 0M, 3,5M, 1,5M, y 1M respectivamente (Tabla.9 y 10).

Los valores de (K) para Chilca con las mismas características, en orden decreciente fueron tanto con cámara de newbahuer como con espectro, como sigue: 0M:1,02- 0,79; 3,5M:0,78- 0,60; 1M:0,60- 0,56 div.día⁻¹, con un Td (horas.div⁻¹) de 24 a 30 para 0M; de 31 a 40 para 3,5M y de 40 a 43 para 1M (Tabla.11-12).

Los valores de las densidades iniciales para las salinas de *Chimus* y Chilca el primer día de conteo fueron de un promedio de $1,5 \times 10^4$ cels.ml⁻¹ en cámara de newbahuer y de un promedio de 1,9 % del desarrollo celular para las lecturas en espectrofotómetro.

4.3 TOLERANCIA A LA SALINIDAD

El efecto de la salinidad, como factor limitante en el crecimiento de *D. salina*, permitió establecer la

tolerancia algal para su desarrollo.

Del análisis de la función logística, para las diferentes curvas de crecimiento en condiciones de laboratorio, se pudo observar los diferentes períodos de tiempo que la microalga pasa para su máximo desarrollo.

La tolerancia a la salinidad evidenciado por la tasa de crecimiento instantáneo (r), permitió, determinar la concentración óptima de NaCl para *D. salina*. Los datos obtenidos tanto en cámara de Newbahuer como en espectrofotómetro, fueron para la cepa de los Chimus en 1^{ro} y 2^{do} lugar para Newbahuer a 3,5M:0,70 y 1M:0,64 y para espectro el 1^{ro} y 2^{do} lugar fue para 1M:0,64 y 1,5M:0,50 respectivamente. En Chilca los valores de (r) fueron de 0,84 y 0,72 para 1M, de 0,63 para 3,5M, mientras que en espectro para 1,5M el (r) fue de 0,59.

La relación establecida a través del grado de tolerancia a la salinidad y el máximo desarrollo celular alcanzado por el alga determinó la tasa de crecimiento instantáneo (r) (tablas 13-14).

Ambas cepas (Chimus y Chilca), toleraron un amplio rango de concentraciones de sal entre 35 y 327,2 ‰. aproximadamente.

Con el fin de establecer una relación entre las técnicas usadas para los conteo (cámara de Newbahuer y lecturas en espectrofotómetro), se realizó el análisis de

regresión potencial, se observó la correspondencia de los resultados y la variabilidad de ambos (Tabla.15). Las curvas correspondientes a la cepa de las Salinas de los Chimus y las Salinas de Chilca se presentan en Fig. 7 y 8 respectivamente.

La relación entre densidades de *D. salina*, de las salinas de los Chimus utilizando las 2 técnicas usadas dan como resultado una regresión potencial del 97% de correspondencia. Para las salinas de Chilca el porcentaje obtenido del análisis es del 96% de correspondencia, lo que determina que ambas técnicas se acercan a los valores reales de proximidad uno del otro.

4.4 CICLO DE VIDA

Las observaciones realizadas durante el cultivo y mantenimiento de la cepa algal, permitieron reconocer los diferentes estadios vegetativos y reproductivos de la fase asexual como de la sexual y establecer el diagrama del ciclo de vida para cada una de las cepas.

4.4.1 Cepa de *Dunaliella salina* de las Salinas de

Chimus.

-Estado vegetativo motil:

La forma de las células biflageladas mótils presentaron forma oval, piriforme, elongada (0M) hasta la forma oval, esférica (5M) de color verde a rojo ladrillo. El tamaño de las células observadas varió de 12,5 - 34 μ m de largo por 5 - 17,5 μ m de ancho. Los flagelos midieron entre 5 - 30 μ m.

-Reproducción Asexual:

En éste proceso de reproducción que sufre la célula en condiciones normales y/o extremas se observaron cambios en su estructura celular para dar lugar a nuevas células hijas mediante el proceso de división celular tipo gemación y fisión.

a) Gemación lateral;

Se observó en cultivos de concentraciones 1M, 2M y 4.5M de NaCl. La forma celular es típicamente piriforme elongada, el color celular varia de acuerdo a las concentraciones de NaCl, las más bajas verde amarillento (1-2M) y las altas rojo ladrillo (4,5M).

El tamaño de las células fue de 10 a 15 μ m de largo por 5-7,5 μ m de ancho, el flagelo presentó una longitud entre 5 - 10 μ m.

El desarrollo de la gemación lateral empieza con el ensanchamiento de la célula en el lado latero-posterior proporcionándole inicialmente a la célula un aspecto de bota. La elongación lateral se va incrementando como (yema) seguida de una constricción con formación de un puente citoplasmático que gradualmente se adelgaza reconociéndose por un cordón o hilo citoplasmático corto y delgado que luego se rompe liberándose la célula hija semejante a la parental aunque más pequeña. Los flagelos de la célula hija se evidenciaron cuando ésta adquiere su forma definida, el proceso se observó en células jóvenes y pequeñas por ello sus flagelos fueron pequeños, el tiempo que dura el proceso en cultivos de concentraciones bajas (1 y 2M) fue de 10' y de 30' en las concentraciones altas (4,5M) (Fig.9a).

b) Fisión transversal;

Los cultivos cuyas concentraciones de NaCl fue frecuente observar éste tipo de fisión son las correspondientes a 0M, 1M y 4,5M; La forma celular que predomina fue piriforme y elongada, el color celular varió de acuerdo a las concentraciones de sal las más bajas verdes, aunque en muchas de éstas células, los glóbulos de β -caroteno se observaron acumulados hacia la parte apical de la misma (Fig.11A-C), mientras que los cultivos

de concentraciones altas se mantuvieron con un color rojo ladrillo.

El tamaño celular varió de 10 - 25.5 μ m de largo por 5 - 12.5 de ancho, la longitud de los flagelos fue de 7,5 - 20 μ m.

El desarrollo de la fisión transversal empieza con la elongación apical de la célula formando una constricción en la parte central o en el tercio superior que originó un puente citoplasmático cada vez más largo y delgado. Durante el proceso la célula sufre estiramientos que la hacen más larga con la formación de dos células hijas unidas por un cordón o hilo citoplasmático que se adelgaza a medida que se separaron las células y definieron su forma típica. La separación ocurrió rápidamente liberándose ambas células una de las cuales conserva los flagelos de la célula parental y la otra célula hija tarda unos minutos en evidenciar sus flagelos más pequeños. Las células hijas pueden ser del mismo tamaño o diferentes, en éste caso la que conserva los flagelos es casi siempre la más grande (Figs. 9b; 11D-H), el proceso tuvo una duración de 1 hora 30' a bajas concentraciones y de 3 - 6 horas y aun un poco más en la concentración alta.

c) Fisión longitudinal con incisión posterior;

Este tipo de fisión se observó en la mayoría de los cultivos de concentraciones tratadas más frecuentemente en las concentraciones 1, 1,5 y 4,5M. La forma celular puede ser redonda u ovalada, en general grandes o pequeñas, el color celular varió desde el verde, verde amarillento (Fig.11 I), anaranjado pardusco (Fig.12A-B), hasta el clásico rojo ladrillo en las concentraciones altas.

El tamaño celular fue de 7,5 - 27,5 μ m de largo por 5 - 17,5 μ m de ancho; El diámetro de las células redondeadas fue de 7 - 17,5 μ m, el flagelo varió en longitud siendo mayormente más largo que la célula, (17.5-30 μ m).

El desarrollo de la fisión longitudinal con incisión posterior, empezó con un ensanchamiento latero-posterior de la célula seguida de una incisión por la parte posterior, ésta se hace evidente en dirección hacia la parte anterior. Las células hijas en formación van adquiriendo la forma aovada con un flagelo parental cada una. Las células definen su forma a medida que se separan permaneciendo unidas entre sí, por un hilo citoplasmático, en ésta parte del proceso se evidencian los otros flagelos más pequeños uno de cada célula hija reconociéndose un flagelo grande y otro pequeño, finalmente el hilo citoplasmático se rompe quedando las

células libres. El proceso tiene una duración de 2 horas en las concentraciones bajas (0-2,5M) y 5 horas para la concentración alta (3-5M), (Fig.9c).

d) Fisión longitudinal con incisión anterior;

Se observó en la mayoría de cultivos de concentraciones 3 - 5M de NaCl (Fig.12C-F), la forma celular fue típicamente aovada u oval, el color fue de anaranjado pardusco hasta el rojo ladrillo, el tamaño celular durante el proceso varió de 15 - 34 μ m de largo por 8 - 17.5 μ m de ancho. Durante el inicio de ésta fase se evidenció una incisión inicial en la parte anterior que en forma gradual se acentúa presentando 4 variaciones (Fig: 9d'-9d''):

d') Cuando la célula madre adoptó la forma cordiforme con cada flagelo en la parte anterior lobulada, la incisión anterior se hace cada vez más notoria con la apariencia de 2 células hijas pegadas una a la otra por la constricción celular y con un flagelo parental grande y el otro en formación. Paralelo a ello se observaron el puente citoplasmático que se hace más largo y delgado para luego romperse y dar lugar a 2 nuevas células hijas. El tamaño de las células fue de 9,5 - 17.5 μ m de largo por 10-15 μ m de ancho. Las células hijas tuvieron un promedio

de $17.5\mu\text{m}$ de largo por $10\mu\text{m}$ de ancho. Esta fase duró 2 horas en cultivos de concentraciones bajas y 20 horas en cultivos de concentraciones altas (Fig.9d').

d") Cuando las células vegetativas adquieren forma cordiforme por la incisión seguida por la separación de la parte anterior adquiriendo una apariencia en forma de "V", seguida de la forma fusiforme con células hijas en formación y los flagelos se reconocieron en los polos observándose una tenue división interna de separación del contenido citoplasmático, posteriormente ésta fase en división incrementó sus dimensiones y luego adopta la forma de "8", separándose luego por completo con una constricción originando generalmente células hijas de diferentes dimensiones. El tamaño de las células durante el proceso fue de $22-27.5\mu\text{m}$ de largo por $10-20\mu\text{m}$ de ancho, las células hijas tuvieron un diámetro de $10-17,5\mu\text{m}$, (Fig:9d'').

d''') Las células en división siguieron el mismo patrón que en el caso anterior aunque se volvieron cada vez más elongadas fusiformes ($20-62.5$ por $10-20\mu\text{m}$). En uno de los extremos la célula parental se proyecta en forma notoria desarrollando en forma de una pequeña yema que crece rápidamente quedando unida por un hilo citoplasmático que luego se acorta y se rompe dando lugar a una nueva célula hija. Las células hijas tienen una

dimensión de $5\mu\text{m}$ de largo por $3\mu\text{m}$ de ancho. El proceso tuvo una duración de 36 horas y se observó en cultivos de concentración 4,5M de NaCl (Fig.9d'').

d''')El proceso se inició como en el caso d'' aunque la separación inicial anterior formó un ángulo de 90° . En la parte lateral interna de la separación interior de la célula parental se formó una elongación semejante a una yema que incrementa en tamaño en forma gradual y definir su forma ovalada como célula hija de $6\mu\text{m}$. La célula parental inicial luego de la escisión de la yema permaneció hasta después de un tiempo prolongado en que sucedió la última gemación. Las dimensiones de las células parentales durante ésta fase fue de $20-30\mu\text{m}$ de largo por $10-15\mu\text{m}$ de ancho. La fase duró de 20 - 30 horas y solo se observó en cultivos de 4,5M de NaCl, (fig:9d''').

e) Gemación en células con mucílago;

Se observó en cultivos viejos (3 meses) de concentración 4,5M de NaCl. Las células típicamente ovals de color rojo ladrillo, sin flagelos, de 20 - $30\mu\text{m}$ de largo por 10 - $12.5\mu\text{m}$ de ancho. Cubiertas de mucílago de un espesor de $3\mu\text{m}$. El diámetro de las células hijas fue de 5 - $12,5\mu\text{m}$.

Esta fase se inició cuando las células vegetativas

pierden sus flagelos y liberan a su alrededor mucílago originando células latentes. Estas células empieza a elongarse por uno de sus extremos (el más delgado) tomando apariencia piriforme que luego desarrolla una constricción profunda delgada formando un puente citoplasmático que adelgaza hasta originar una yema que constituye la célula pequeña, redondeada sin mucílago. El tiempo en que sucedió esta fase fue de aproximadamente 30' (Fig.9e).

-Fase Sexual:

Proceso por el cual 2 células adultas que, generalmente están sometidas a condiciones extremas, se unen formando una unidad, sufriendo una serie de cambios que darán lugar a varias células hijas semejantes a la parental.

a) Formación de grupos de apareamientos y zigosporas;

Se observó en cultivos de concentraciones extremas siendo más frecuente en 4,5M de NaCl. Las células observadas fueron de forma ovoide, grandes, de color típico rojo ladrillo.

La formación de grupos de células que se fueron uniendo cada vez más no les impidió su desplazamiento en

el medio líquido. La unión de 2 células sucedió desde que éstas se unen por los polos donde se hallan los flagelos, continuando el proceso hasta que se fusionan como en una sola. El tiempo de desarrollo fue de 30' a 1 hora.

La reproducción sexual se inició con la unión por la parte latero anterior de las células hacia la parte posterior fusionándose en una sola unidad, redondeada constituyendo el cigoto cuadriflagelar mótil. El tiempo que demoró la fusión de las 2 células para formar el cigoto fue de 30' a 1 hora. Posteriormente al perder los flagelos se forma la zigospora esta desarrolla y alcanza de 20-21 μ m de diámetro (Fig.9).

4.4.2 Cepa de *Dunaliella salina*, de las Salinas de Chilca.

-Estadio Vegetativo:

Las células biflageladas móviles se presentaron semejante a las de Chimus, los colores también se apreciaron desde el verde hasta el rojo ladrillo; El tamaño de las células observadas varió de 12,5 a 27,5 μ m de largo por 7,5 a 17,5 μ m de ancho, siendo pequeñas en cultivo de concentraciones bajas y grandes en cultivos con altas concentraciones de NaCl.

-Reproducción Asexual:

a) Gemación lateral;

Se observó en concentraciones extremas de 1M, 2M y 5M de NaCl, la forma celular se mantiene igual que para la observada en Chimus, de color verde a verde amarillento en las concentraciones bajas (1-2M) a un rojo ladrillo en las concentraciones más alta (5M).

El tamaño de las células varió de 10 a 18,2 μ m de largo por 7,5 a 9,5 μ m de ancho, el flagelo mide entre 5 y 10 μ m. Las células aumentan de tamaño con el incremento de las concentraciones de NaCl.

El desarrollo de la gemación fue similar a la observada en Chimus. El proceso tuvo un tiempo de duración de aproximadamente 15' en las concentraciones bajas y de 40' en las concentraciones altas (Fig.10a).

b) Fisión transversal;

Al igual que para Chimus, se observó en cultivos de concentraciones extremas como 0M, 1M, 1,5M y 4.5M de NaCl, la forma celular se mantiene igual, la células de color intensamente verde en las concentraciones bajas (0M-1,5M), (Fig.13E-F) y rojas en las concentraciones altas (4,5M), (Fig. 14D-G). En la mayoría de las células verdes, los glóbulos de β -caroteno se observaron acumulados en la parte apical de la misma.

El tamaño celular observado fue de 12,5 - 25 μ m de largo por 7,5 - 17,5 μ m de ancho. El flagelo tiene una longitud de 12,5 - 30 μ m.

El desarrollo de la fisión transversal fue la misma descrita para *Chimus*. El diámetro para la más grande fue de 10 a 12,5 μ m y de 7,5 a 10 μ m la otra célula. El proceso tuvo una duración aproximada de 1 hora con 30' en las concentraciones bajas y de 2 a 5 horas en las concentraciones altas, (Fig.10b).

c)Fisión longitudinal con incisión posterior;

La presencia de éste tipo de fisión se observó en casi todos los cultivos y en forma frecuente los de concentraciones extremas como 1M y 4,5M de NaCl. La forma celular es la misma descrita para *Chimus* (Fig. 13G-I) y el color va desde el verde, amarillo verdoso, anaranjado pardusco hasta el rojo ladrillo.

El tamaño celular fue de 12,5 - 27,5 μ m de largo por 7,5 - 17,5 μ m de ancho. El diámetro de las células redondeadas fue de 10 - 17,5 μ m los flagelos tuvieron una longitud de 12,5 - 25 μ m.

El desarrollo de la fisión longitudinal con incisión posterior sucede tan igual como la observada en *Chimus*. El tiempo del proceso también varió de acuerdo a las observadas en *Chimus*, (Fig.10c).

d) Fisión longitudinal con incisión anterior;

Este tipo de fisión se observó en los cultivos con casi todas las concentraciones, mayormente en las de 3 a 5M de NaCl, la forma celular fue la misma descrita para la cepa de Chimus, variando el color de las células desde el tono anaranjado pardusco hasta el rojo ladrillo.

El tamaño celular durante el proceso varió desde 10-20 μ m de largo por 10-25 μ m de ancho. El proceso se inicia con una incisión anterior evidenciándose la célula en forma cordiforme con los flagelos en la hendidura central, que van alejándose hacia los lados lobulados. Los glóbulos de β -caroteno concentrados en el tercio superior de la célula parental gradualmente desaparecen. La incisión se hace cada vez más profunda al plano longitudinal hasta alcanzar la parte posterior. Los nuevos flagelos pequeños se reconocen uno a cada lado del flagelo grande. Simultáneamente se hizo evidente una constricción en la parte posterior de la célula que le proporcionó a la célula en división forma de "8". Estas células se definen a medida que se alejan una de otra manteniéndose siempre unidas por un puente citoplasmático, a partir del cual se observó 2 variaciones:

d') Observado en cultivos de concentración 4,5M NaCl, la forma de las células es casi siempre aovada, el

color celular en todos los casos es rojo ladrillo. El tamaño de las células varió de 12,5 - 20 μ m de largo por 7 - 15 μ m de ancho. El desarrollo de éste proceso se evidenció cuando las células hijas quedan unidas por el puente citoplasmático en el cual se observó una elongación central, que creció lentamente formó una nueva célula hija pequeña. Esta a su vez estuvo unida a las otras 2 por un hilo citoplasmático llegando a medir 5-7 μ m de largo en el momento de su lenta separación. El proceso tiene una duración de 25 a 28 horas aproximadamente, posteriormente las 2 células hijas se aislaron hacia la vida independiente (Fig.10d' y 14A-C)

d") Cuando las células quedan unidas por el puente citoplasmático, éste se adelgaza originando el hilo citoplasmático que luego se rompe y libera por completo cada célula hija. El diámetro de las células hijas fue de 12,5-15 μ m. A bajas concentraciones de sal el proceso tiene una duración aproximadamente de 2 horas 30', mientras que en concentraciones elevadas el tiempo de duración es mucho más largo aproximadamente de 24 horas, (Fig.10d").

- Estado palmeloide:

Sólo fue observado en poblaciones naturales, con formación de natas mucilaginosas de color rojo oscuro ó

anaranjado con células sin flagelos, rojizas y redondeadas u ovoides rodeada por mucílago colonial en capas densas algunas uniformes o de bordes irregulares (Fig.10).

- Formación de Aplanosporas:

Este proceso se observó en concentraciones saturadas de sal, 4,5 y 5M. La forma celular es típicamente redondeada y pequeña, de un color rojo ladrillo. El tamaño de la aplanospora varió de 7 a 11 μ m de diámetro. En cultivos viejos (6 meses) se observaron rodeadas por una pared celular y musílago como una capa envolvente en toda la célula alcanzando un diámetro de 12,5 - 20 μ m.

El desarrollo del proceso se observó en cultivos cuyas muestras se sacaron de las partes en forma de natas acumuladas en el fondo del tubo, la mayoría de las células estaban rodeadas por una definida pared y musílago. Al remover las aplanosporas en medio líquido fresco, quedaron libres pequeñas células redonditas con flagelo y casi verdosas, se movían muy de prisa hacia los lados y alrededor de su propio eje. En cultivos más antiguos (hasta 1 año) se observaron bordes indefinidos con mucílago y la pared definida ó lisa da la apariencia de una célula redonda y grande, que se dividen en forma sucesiva liberando varias células hijas cuando se les

trata en medio fresco.

Estos cultivos provienen de cultivos madres que sólo fueron replicados más no clonados y adecuados a las condiciones de laboratorio, el tiempo para la formación de aplanosporas demoró alrededor de 6 meses a 1 año aproximadamente, pero cuando a éstas se les traslada a medio nuevo, la liberación de las nuevas células es rápido aproximadamente dentro de las primeras 48 horas después de ponerlas en medio fresco, (fig:10).

-Reproducción Sexual:

- a) Formación de grupos de apareamientos y zigosporas;

Se observó en cultivos de concentraciones bajas de NaCl; 0, 2 y 2,5M la forma celular fue ovoide, color verde en la concentración 0M y verde amarillento en las otras (Figs. 13I; 15A-E).

La formación de grupos de apareamientos sucedió tal como se describió para *Chimus*, (Fig.15A-C).

Los cigotes, de forma esférica u ovoide, presentaron 4 flagelos isocontos y apicales (Fig.14E), los pirenoides se observaron bien definidos y en número de dos, el tiempo en que demora la fusión de las 2 células para formar el cigote fue de 1 - 10', sin embargo en esa posición permanece por varias horas hasta que pierde los

flagelos y forma la zigospóra, el diámetro de esta fue de 22µm, (fig.10).

4.5 MANTENIMIENTO DE LA CEPA

Una vez logrado cultivos unialgales axénicos de *D. salina*, la cepa se replicó varias veces en medio J/1 líquido y semisólido, las concentraciones a las que se mantiene los cultivos algales son 1,5, 3,5 y 4,5M de NaCl. El esquema del diagrama de flujo desde la adaptación de la microalga en el laboratorio hasta su mantenimiento en tubos y placas se muestra en la Fig.2.

DISCUSION

La microalga *Dunaliella salina*, típica de ambientes hipersalinos, ha demostrado una gran capacidad de adaptación para desarrollar en cuerpos de agua cuyos rangos de concentración de cloruro de sodio van desde las concentraciones mínimas hasta las extremas obligando a desarrollar mecanismos para la supervivencia.

La dinámica de distribución entre el agua de mar y el agua dulce, permite al agua de mar la intromisión de partes usables a un acuífero; éste fenómeno a sido reportado en varias partes del mundo incluyendo Holanda, Israel y E.U.A, (DOMENICO, *et al.* 1990), donde al evaporarse dejan ciertas sales entre las que se encuentran altas concentraciones de cloruro de sodio.

Las cepas de *D. salina* aisladas, provienen de dos salinas cercanas al mar, las SALINAS DE LOS CHIMUS y las

SALINAS DE CHILCA con características propias que permite su desarrollo en competencia mínima. Por consiguiente, con el presente trabajo de investigación se ha ampliado la distribución de *D. salina* para ambientes extremos como los áridos costeros.

BEN-AMOTZ (1981), menciona que *Dunaliella* puede desarrollar en medio conteniendo entre 0.1 M de NaCl a soluciones saturadas de sal (>5 M de NaCl), debido a su habilidad para la osmoregulación con la producción y acumulación de glicerol intracelular. Por la distribución geográfica las zonas de estudio están sujetas a elevadas intensidades de luz que conduce al alga a producir grandes cantidades de β -caroteno como reacción o mecanismo de defensa ante la iluminación. La función fotoprotectora de los carotenoides es frecuente hallarlo en los ambientes naturales donde habita el alga debido a que los carotenoides acumulados por *D. salina*, se localizan en la periferie de los cloroplastos, específicamente los glóbulos que contienen el β -caroteno se localizan en los espacios intertilacoidales del cloroplasto, a diferencia de las plantas donde dichos glóbulos se hallan en la membrana tilacoidal, actuando como una capa protectora de radiación. (BOROWITZKA *et al.*, 1981 y 1984).

Las condiciones físico-químicas apropiadas para el

desarrollo de *D. salina*, incluye principalmente altas intensidades de luz, elevadas concentraciones de NaCl, y temperaturas extremas, (BEN-AMOTZ, 1982). En condiciones óptimas, *Dunaliella* crece en un tiempo récord de aproximadamente 5 horas. y si la concentración de NaCl es aumentada hasta la saturación el tiempo de generación se duplica siendo limitado por la salinidad a aproximadamente 3 días (BEN-AMOTZ, 1981). Durante el crecimiento de las cepas aisladas se evidenció que a bajas concentraciones de NaCl, el tiempo de generación fue de 15 horas.div⁻¹. (0,6 días), mientras que a concentraciones altas fue de casi 83 horas.div⁻¹. (3,5 días).

Según POST *et al.* (1983), en salinidades mayores de 25% (> 4.5M), el único predador de *D. salina* es el protozoo *Bodo sp.*, a salinidades entre 20 y 25 % (3-4M), el flagelado *Heteroamoeba sp.* y el ciliado *Cladotrichia sigmoidea*, a salinidades inferiores pueden desarrollar ciliados como la *Fabrea salina* y el camarón de salmuera *Artemia sp*, éstas pueden limitar severamente a las poblaciones de *D. salina*, (MASSYUK, *et al.* 1970; BOROWITZKA *et al.* 1984). A bajas salinidades, la predación es un factor limitante, según estudios realizados por STEPHENS & GILLESPIE, (1976); POST, (1977) y BOROWITZKA *et al.* (1984)., El dominio de *Dunaliella*, en

cuerpos de agua hipersalinos es en parte por la reducción de predadores, (BROCK, 1975). Durante el desarrollo inicial del trabajo de investigación, se presentaron algunos predadores amoeboides en los cultivos de *Dunaliella*, sobre todo en los de 4M y 4,5M de NaCl, con aproximadamente 3 a 4 meses de antigüedad.

Las especies de *Dunaliella* no están distribuidas en toda la columna de agua. *D. salina* y *D. parva*, tienden a permanecer en la parte superior de la columna de agua formando distintas capas en la superficie (MASSYUK, 1961; OREN & SHILO, 1982 y BOROWITZKA *et al.*, 1985). *Dunaliella viridis*, coloniza las capas profundas de la columna de agua y la superficie del sedimento. Observaciones en charcas y posas poco profundas demuestran que *D. viridis* y *D. parva*, migran verticalmente en la columna de agua. A 25 % de salinidad y elevadas intensidades de luz, *D. parva* tiende a migrar al fondo, mientras que *D. salina* permanece suspendida. En charcas salinas (aprox. 32 % de salinidad), *D. salina*, puede también migrar al fondo (BOROWITZKA, 1985). Las cepas estudiadas de *D. salina*, se presentaron en forma de natas, en el fondo como en toda la columna de agua en mayor porcentaje que otros organismos. Este patrón de migración relaciona las intensidades de luz para la fotosíntesis algal (LOEBLICH, 1982; BOROWITZKA *et al.*,

1984).

Estudios sobre competencia entre especies de *Dunaliella*, del lago HUTT (Australia), demostraron que *D. salina*, desarrolla a salinidades elevadas mejor que *D. viridis*, diferenciándose ambas especies por su conducta como respuesta a altas salinidades. *D. viridis*, tiende a permanecer en el fondo de la laguna de 250 grs.l⁻¹. de salinidad, mientras que *D. salina*, permanece activa en la columna de agua y en salinidades por encima de los 310 grs.l⁻¹. de saturación que presenta el lago HUTT, (MOULTON *et al*, 1987).

La salinidad óptima bajo condiciones de laboratorio, para el desarrollo de *D. salina* resultó ser del 12% (1,5-2M de NaCl), (LOEBLICH, 1972). En el presente trabajo de investigación y bajo condiciones del laboratorio, no obstante la salinidad óptima varió de 3,7-12,5% (0- 2M de NaCl), las células rojo ladrillo alcanzaron su máximo crecimiento a 3,5M (25%).

Existe confusión acerca de que sí las típicas células rojas de *Dunaliella*, son capaces de tornarse verde bajo condiciones específicas (bajas intensidades de luz), corresponden a *D. salina* o *D. bardawil*. De acuerdo con BOROWITZKA *et al.*, (1984), la *D. salina*, de Australia es idéntica a *D. bardawil* por lo que posteriormente a ésta especie se le considero "nombre nulo" (BOROWITZKA &

BOROWITZKA, 1988 y MONTOYA *et al.*, 1993).

ROUBICEK *et al.*, (1986), realizó estudios sobre las características de desarrollo de varias cepas de *D. salina*, y observó que, bajo las condiciones de fotoperiodo de luz y luz continua, la óptima concentración de NaCl está de 1,5M a 2M, con algunas pequeñas variaciones en los rangos. Sin embargo *D. salina*, expuesta a luz continua exhibe un desarrollo elevado. En el presente trabajo de investigación la óptima concentración de NaCl se encuentra dentro de ese rango, aunque la concentración de NaCl de 3,5M es adecuada. Además, ROUBICEK *et al.*, (1986), observaron que, *D. salina* var. Laskar (Scripp Institution, University of San Diego), mostró el mejor desarrollo, siendo la única cepa que creció en tubos con agar en plano inclinado. En el presente trabajo de investigación, el crecimiento en agar se realizó en placas y se observó que, el desarrollo más rápido fue a bajas salinidades.

Los estudios de caracterización biológica para *D. salina*, de la zona norte de Chile, realizados por PARRA *et al.*, (1990), describen células de *D. salina* con su tamaño celular variable entre 10-29um de longitud y de 8-21um de ancho, con variaciones en su color desde el amarillo-verdoso al rojo intenso, tanto en el laboratorio como en ambiente natural. La cepa chilena obtiene mayor

similitud en sus características morfológicas con la cepa de Chilca (12,5-27,5 μ m long.x 7,5-17,5 μ m de ancho), mientras que la diferencia con la cepa de Chimus fueron mayores (12,5-34 μ m long. x 7,5-17,5 μ m de ancho).

Variaciones marcadas de acuerdo a las concentraciones de sal a las que fue sometida el alga, se evidenció con la gradiente de pigmentación que van desde el verde claro, verde amarillento, anaranjado parduzco y el rojo ladrillo en las concentraciones más elevadas.

Sobre *D. salina*, de ambientes salinos de la costa central del Perú, se describe a la especie, para la salinas de Huacho, como organismos unicelulares biflagelados de forma variable: elipsoidal, elongada, ovoide o piriforme. El final de la parte anterior fue agudamente redondeada o ampliamente redonda, la parte posterior fue redondeada. El diámetro de la célula fue de 5,5 a 12,5 μ m, y el largo estuvo entre 11,3 a 20 μ m, el largo del flagelo abarcó entre 12 a 20 μ m, la especie con un prominente pirenoide y un periplasto delgado y flexible; la reproducción vegetativa por fisión binaria; se observa la formación de aplanospora (cisto), días después que fueron colocadas en el laboratorio en su medio natural. Las células esféricas de color rojo intenso, rodeadas por una densa capa estratificada de mucílago (6,3 - 17,5 μ m de diámetro), pueden encontrarse

individuales o en grupo y cambian de color del rojo al naranja y luego al verde en el laboratorio, ellas pueden liberar su contenido como células libres o dividirse en 4 ó 5 células. También observó estados palmeloides bentónicos sobre sustratos minerales (cloruro de sodio, cloruro de magnesio, calcio, sulfato), en profundidades de hasta 1m y principalmente en invierno (Agosto y principios de Setiembre), llegando a medir hasta 0,3 cm de diámetro y originalmente en la confluencia de agregaciones celulares embebida en un denso mucílago. Las formas vegetativas y reproductivas, están morfológicamente adaptadas a condiciones extremas, a bajas salinidades (165 ‰) están rojas y libres mientras que, a elevadas salinidades (punto de saturación), siguen siendo rojas pero forman el estado palmeloide adherido al sustrato, (MONTROYA Y OLIVERA, 1993). Las características morfológicas de las cepas estudiadas en el presente trabajo de investigación coinciden con las descripciones anteriores para las cepas de Huacho.

La formación de cistos resistentes, la reproducción sexual y de estados palmeloides en *D. salina* que, reducen en su conjunto la producción de biomasa algal fue observada en invierno durante períodos de bajas temperaturas, días cortos y períodos de dilución por precipitaciones (BOROWITZKA *et al.*, 1984).

MOULTON *et al.* (1987), consideran a todas las formas que contengan relativamente altas cantidades de β -caroteno como *D. salina* Teodoresco. Sin embargo las formas celulares oval a casi rectangular (22 x 18 μ m), las formas piriformes (12 x 8 μ m)., y otras formas con elongación final anterior y protuberancias pueden resultar formas diferentes por las condiciones de cultivo. Algunas de estas formas (oval, piriformes, con elongación), en determinado momento de la fase vegetativa se observaron durante el presente trabajo de investigación.

Las formas celulares para *D. salina*, varían desde la esférica (a 42 g/l de NaCl), la ovoide (> 50 g/l de NaCl) a la irregular (< 25 g/l de NaCl) en esta última situación las células presentan proyecciones a modo de apéndices. Las dimensiones fueron variadas (11,5 - 23,8 μ m long. x 5,9 - 13,9 μ m ancho). El estado de cisto cuya formación es como lo describen los anteriores autores alcanza un diámetro de 10,9 - 13,9 μ m, el protoplasma cambia de verde a rojo-naranja y aparece granulaciones de color café homogéneamente dispersos, normalmente los cistos se encuentran adheridos entre ellos y a las paredes del tubo mediante mucílago. En la fase sexual la formación de cigotos tienen forma ovoide o casi esférica (con 4 flagelos isocontos aunque observaron con 6 y 8

flagelos), la inserción de los flagelos puede ser apical o en grupos de a 2 en extremos opuestos. La formación de cigosporas (13,9 - 15,8 μ m diámetro) las observaron casi esféricas y todavía conservan los flagelos, son verdes oscuros impidiendo distinguir organelos (CARVAJAL, 1991). En el presente trabajo de investigación se observó 4 flagelos isocontos en la parte apical de la célula, durante la formación de las cigosporas las que midieron entre 20 y 22 μ m de diámetro, pudiendo ser verde o roja dependiendo de la concentración de NaCl.

Estudiando los requerimientos de cultivo y la utilización eficiente de luz de algunas microalgas de desiertos salinos del oeste de California y Nevada (U.S.A), se observó que la utilización eficiente de luz está generalmente reportada como el porcentaje (%) de la radiación fotosintéticamente actividad (luz en la región del espectro 400-700 nm (PAR)) que es fijada como energía celular (calorías) (THOMAS *et al.*, 1986).

WAYNE *et al.*, (1991), Determinaron que las respuestas fotomóviles de las células flageladas incluye 1) Respuesta fototáctica, en la cual la célula nada siguiendo el sentido de la dirección de la luz; 2) Respuesta fotofóbica, en la que la célula cambia de sentido en el nivel de irradiación con respecto al tiempo, por cualquier causa en aparente parada ó giro de

90°, dependiendo si hay un incremento ó un decrecimiento en la influencia de la luz; 3) Respuesta fotocinética, en la cual la velocidad de natación esta influenciada por la luz. Determina también que la acción del espectro para todas las respuestas mostraron un pico a 490 nm. En el presente trabajo de investigación, se usó la longitud de onda de 490 nm. como rango medio para expresar el porcentaje de desarrollo celular en virtud a que el alga se mantuvo a condiciones de influencia de luz y por lo tanto de las respuestas fotomóviles durante el desarrollo de toda la investigación.

En la región azul de la acción del espectro para ambas células (verdes ó rojas), se sugirió un pico activo común, a saber entre 375, 440 y 480 nm. Los picos entre 375 y 380 nm. fueron reportados por HALLDAL (1964). Los picos entre 440, 480 y 490 nm. están dentro de los límites razonables con picos en la absorción del espectro para los carotenoides. Casi siempre la significancia de éstos picos permanecen constantes (LOEBLICH, 1982). Esto también se pudo observar en el presente trabajo de investigación, donde se trabajó dentro de la región visible del espectro y a 490 nm.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos durante el presente trabajo de investigación nos permitieron llegar a las siguientes conclusiones:

-La cepa de *Dunaliella salina* de los Chimus alcanzó mayores dimensiones celulares, comparadas con las observadas para la cepa de Chilca.

-Las densidades algales óptimas de *D. salina*, se observaron en los cultivos de concentraciones 1M, 1,5M y 3,5M de cloruro de sodio y el valor más alto ($4,6 \times 10^6$ cels.ml⁻¹) se observó en la cepa de Chimus.

-El menor tiempo de generación (1-60') se observó en concentraciones bajas de cloruro de sodio (1-2,5M), ésta aumenta (2-36 horas) cuando se incrementa la concentración de cloruro de sodio (3-5M).

-Los diferentes estadios del ciclo de vida de las cepas observadas, evidencian su variedad morfológica y demuestran la plasticidad fenotípica de la especie.

-La mayor variabilidad morfológica se observó durante la reproducción asexual y con mayor frecuencia en cultivos de concentraciones bajas de NaCl (0M-2,5M).

-La reproducción sexual se presentó con frecuencia en cultivos con concentraciones extremas de cloruro de sodio (0M, 1M, 4,5M y 5M), por lo que se observaban verdes y rojas.

-Se comprobó que la especie *Dunaliella salina* toleró amplios rangos de concentración de cloruro de sodio (35-327,2 %), en condiciones de laboratorio.

RECOMENDACIONES

- Continuar en nuestro país con los estudios sobre *Dunaliella salina*, con el fin de darle un uso adecuado, orientado hacia la acuicultura y la industria química.
- Experimentar con otros medios que permitan realizar cultivo masivo de *D. salina*.
- Seguir estudiando los cuerpos hipersalinos extendidos a lo largo de nuestra costa, permitiendo reconocer los recursos presentes en esos ambientes, que puedan servir como materia prima en la industria química o como fuente alimenticia en el campo de la acuicultura.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Barberena C. L., 1989 Crecimiento y ciclo de vida de microalgas en cultivo de las Salinas de Huacho. Tesis para optar el grado de licenciada en Biología, Universidad Ricardo Palma, LIMA - PERU.

- 2) ----- y H. Montoya 1990. Crecimiento, ciclo de vida y tolerancia a la salinidad de la microalga *D. viridis* Teodoresco. Anales del Segundo Congreso Latinoamericano de Ficología Marina, Lima (5-9, Feb. 1990). 2:34-57.

- 3) Ben-Amotz A. & M. Avron 1980. Glycerol, β -carotene and dry algal meal production by cultivation of *Dunaliella*. In: G. Shelef & CJ Soeder (eds), Algae Biomass. Elsevier North-Holland Biomedical,

msterdam:603-610.

- 4) -----, & M. Avron 1981. Glycerol and β -Carotene metabolism in the halotolerant alga *Dunalliella*: a model system for biosolar energy conversion. Trends Biochem. Sci. 6(11):297-299.
- 5) -----; A. Katz & M. Avron 1982. Accumulation of β -carotene in halotolerant algae: purification and characterization of β -carotene-rich globules from *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae). J. Phycol. 18:529-537.
- 6) -----, & M. Avron 1983. On the factors which determine massive β -carotene accumulation in the halotolerant algae *Dunaliella bardawill*. Plant Physiol. 72:593-597.
- 7) -----.; J. Gressel & M. Avron 1987. Massive accumulation of phytoene induced by norflurazon in *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae) presents recovery from photoinhibition. J. Phycol. 23:176-181.

- 8) Borowitzka L.J 1981. Solute accumulation and regulation of cell water activity. In LG Paleg & D Aspinall (eds.). Physiology and Biochemistry of drought Resistance in Plants. Academic Press. New York.
- 9) -----, M. A. Borowitzka & T. P. Moulton 1984. The mass culture of *Dunaliella salina* for fine chemical: From laboratory to pilot plant. Hydrobiologia 116/117. 115-134.
- 10) -----, L.J., Moulton, T.P. & Borowitzka, M.A 1985. Salinity and the commercial production of beta-carotene from *Dunaliella salina*. In Algal Biomass: An Interdisciplinary Perspective, ed., W.J. Barclay & R. McIntosh. pp. 217-22. Verduz:J. Cramer Verlag.
- 11) ----- L. J. & M. A. Borowitzka 1986. *Dunaliella* In M. A Borowitzka & L. J. Borowitzka (eds), Micro-Algal Biotechnology. Cambridge Univ. Press:27-58.

- 12) ----- M. A 1988. Algal growth media and sources of algal cultures. In Micro-Algal Biotechn. Cambridge Univ. Press:456-465.
- 13) Bowen, S. T., 1980 Simblin species of *Artemia*. The brigne shirp *Artemia*, vol(1):150-167p.
- 14) Brock, T., 1975 Salinity and the ecology of *Dunaliella* from the Great Salt Lake. J. Gen. Microbiol. 89:285-292.
- 15) Carvajal A. M. A.,1991 Estudio del ciclo de vida de una cepa Chilena de *Dunaliella salina* (DUNAL) TEOD. tesis para optar el grado de magister en ciencias con mención en botánica, Universidad de Concepción, CONCEPCION - CHILE.
- 16) Chacón, G., 1980 *Chlorella peruviana* sp. nov. y su ambiente altamente salino. Bol. Soc. Per.Vot. VIII (1-2):83-96.
- 17) Christensen, T., 1962 Alger. In Systematik Botanik, vol. 2, no. 2. ed. T. W. Böcher, M. Lange, & T. Sörensen, pp. 1-178. Kopenhagen:

Munksgaard.

- 18) Coll M. J., 1986 Acuicultura marina animal. segunda edición. Edición Mundi-Prensa. 663p.
- 19) Domenico, P. A. & F. W. Schwartz., 1990 Physical and Chemical Hydrogeology. Chapter 6.
- 20) Dunal F. 1837. Note sur les algues qui colorent en rouge certaines eaux des marais salants méditerranées. Compte rendu hebdomadaire de l'Académie des sciences. 15:585-587.
- 21) Ettl, H., 1983 Taxonomische Bemerkungen zu den Phytomonadina. Nova Hedwigia, 35, 731-6.
- 22) Guillard, R., 1973 Handbook of Phycological Methods- Culture Methods and Growth Measurements. edited by Janet R. Stein. Cambridge Univ. press: London. ch: 4 and 19.
- 23) Gynsburg M. 1987. *Dunaliella* a Green Alga adapted to salt. Adv. Bot. Reserch. 14:93-198.

- 24) Halldal, P. 1964. Ultraviolet action spectra of photosynthesis and photosynthetic inhibition of a green and red alga. *Physiologia plantarum*, 17:414-421.
- 25) Hoshaw, R, y Rosowsky, K., 1973. Methods for microscopic algae. In Stein, J. (ed) Culture methods and growth measurements. Handbook of phycological methods, pp:53-68.
- 26) Loeblich, L.A. 1972. Studies on the brine flagellate *Dunaliella salina*. Ph.D. thesis, University of California, San Diego.
- 27) ----- 1982. Photosynthesis and pigments influenced by light intensity and salinity in the halophile *Dunaliella salina* (Chlorophyta). *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 62:493-508.
- 28) Massyuk N.P., 1961 Carotene containing alga *Dunaliella salina*, teod. in saline basing of Crimca. *Ukranskyia Botanichnya Zhournal*, 18:100-9.

- 29) -----, 1968. Mass culture of the carotene bearing algae *Dunaliella salina*. Urk. Bot. Zh.23:12-19.
- 30) -----, Abdulah, YH & Radchenko, M.L, 1970. Effects of some outside organisms on culture of *D. salina*, teod. Culture. Urk. Bot. Zh. 27:456-6.
- 31) -----, 1973. Morphology, taxonomy, Ecology and Geography distribution of the genus *Dunaliella* Teodoresco and prospects for it's potencial utilitacion. Naukova Dumka, Kiev.
- 32) ----- 1980. *Dunaliella*, edición original en ruso, traducido por N.P. massyuk.
- 33) Montoya T. H., Olivera A.,1993. *Dunaliella salina* from saline environments of the central coast of Perú. hydrobiología 267:155-161.
- 34) Moulton T. P.; T. R. Sommer; M. A. Burford y L. J. Borowitzka 1987. Competition between *Dunaliella* species at high salinity.

Hydrobiologia 151/152:107-116.

- 35) Oren, A. & M. Shilo., 1982 Population dynamics of *Dunaliella* parva in the dead Sea. Limnology and Oceanography, 27:201-11.
- 36) Parra O. O.; M. Gonzalez; V. Dellarosa; A. S. Cifuentes y M. Conejeros 1990. Caracterización biológica de una cepa Chilena de *Dunaliella salina* potencialmente comerciable. Arch. Biol. Med. Exp. 23:141-146.
- 37) -----; G. Floyd; y L. W. Wilcox 1990. Taxonomic identification and ultrastructural characterization of a Chilean strain of *Dunaliella*. Rev. Chilena de Hist. Nat. 63:239-245.
- 38) Post. F. 1977 The microbial ecology of the Gread Salt Lake. Microbial ecol. 3:143-165.
- 39) -----, L. J. Borowitzka, M. A. Borowitzka, B. Mackay & T. Moulton., 1983 The protozoa of a western Australia hypersaline

lagoon. *Hydrobiologia*, 105:95-113.

- 40) Rodriguez A.; F. Merino; A. Fernandez 1986. Cultivo de *Dunaliella salina* (Dunal) Teodoresco y *Nanochloris basillaris* (Naumann). *Hidrobios X*, 2:14-21.
- 41) Roubicek R.V., G. Cunningham, L. White-Hosford, and J.T. Patton, 1986. Growth characteristics of *Dunaliella salina*. *Beihefte zur Nova Hedwigia* 83:70-74.
- 42) Saila, S. B; C.W. Recksiek & M.H. Prager, 1988. Basic fishary Science programs. A compendium of microcomputer programs and manual of operation. Elsevier, New York 230p.
- 43) Soorgeloos P. 1980. The use of the brine shimp *Artemia sp.* in aquaculture. *The Brine Shimp. Artemia.* vol 3:25-46. Universa press. Welteren.
- 44) Stephens, D. W. & D. M. Gillespie., 1976. Phytoplankton production in the Gread Salt Lake, Utah, and a laboratory study of

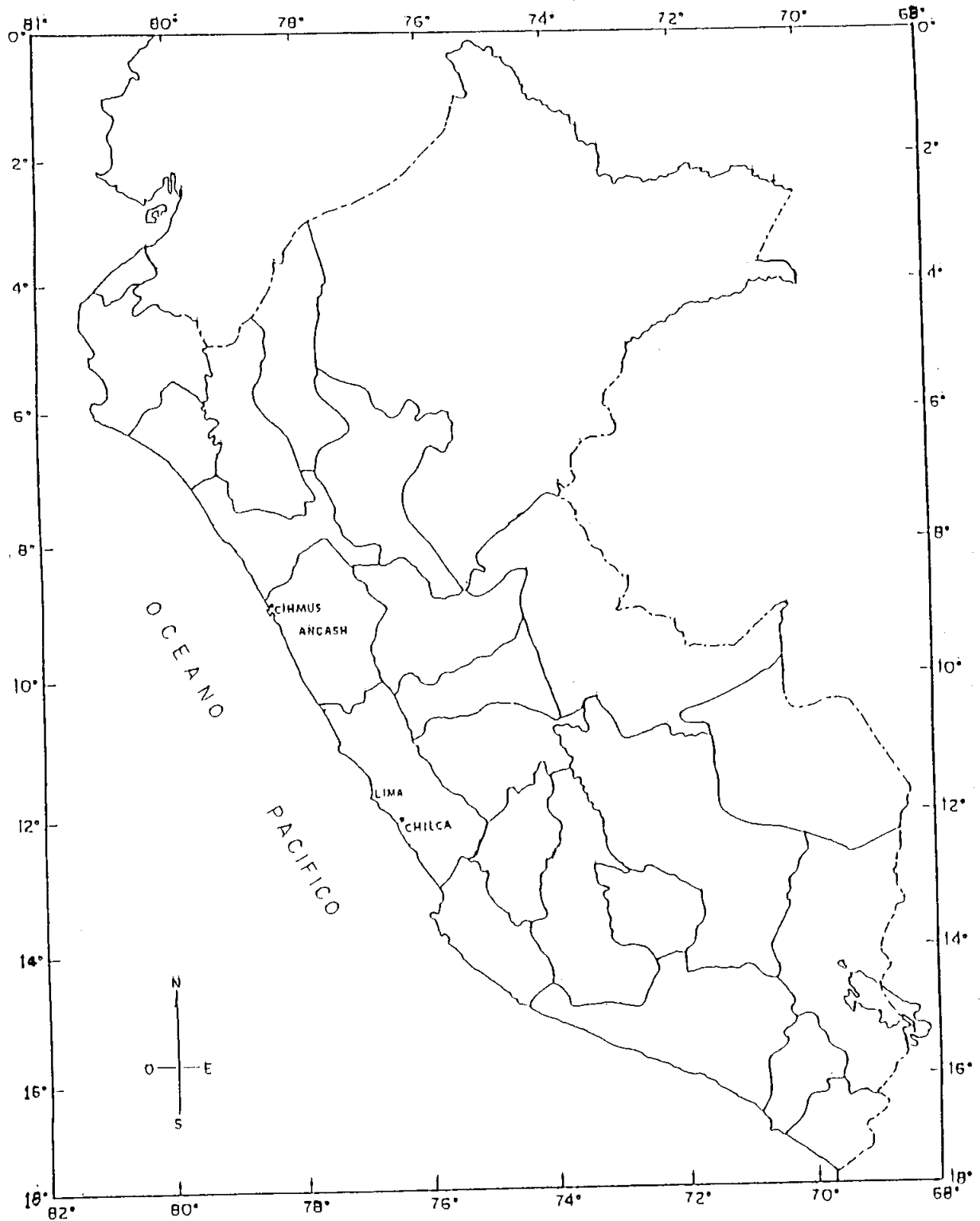
algal response to enrichment. *Limnology and Oceanography*, 21:74-87.

- 45) Teodoresco E. C. 1905. Organization et développement du *Dunaliella*, nouveau genre de volvocacée-Plyblepharidee. Beihefte zum Botanischen Centralblatt Kassel 18:215-232.
- 46) Thomas W.H., D.L.R. Seibert, M. Alden, and P. Eldridge, 1986. Cultural requirements, yields, and light utilization efficiencies of some desert saline microalgae. Beihefte zur nova hedwigia 83:60-69.
- 47) Vallentyne, J. R., 1972 Freshwater supplies and pollution: effects of the demophoril explosion on water and man. In N. Polunim (ed), the environmental future. Mac Millan press: 181-211.
- 48) Wayne R.; A. Kadota; M. Watanabe y M. Furuya 1991. Photomovement in *Dunaliella salina*: Fluence rate-responce curves and action spectra. *Planta* 184:515-524.

- 49) Williams, W. D., 1981 Inland salt lake: An
introduction. *Hydrobiologia* 81:1-14.

FIGURAS Y TABLAS

FIGURA 1a: Localización de las Salinas de los Chimus (78°27'59" LO y 09°19'20" LS), en el departamento de Ancash y de las Salinas de Chilca (76°42'38" LO y 12°32'45" LS), en el departamento de Lima.



FIGURAS 1b: Laguna de las Salina de los Chimus.
1c: Laguna de las Salinas de Chilca.

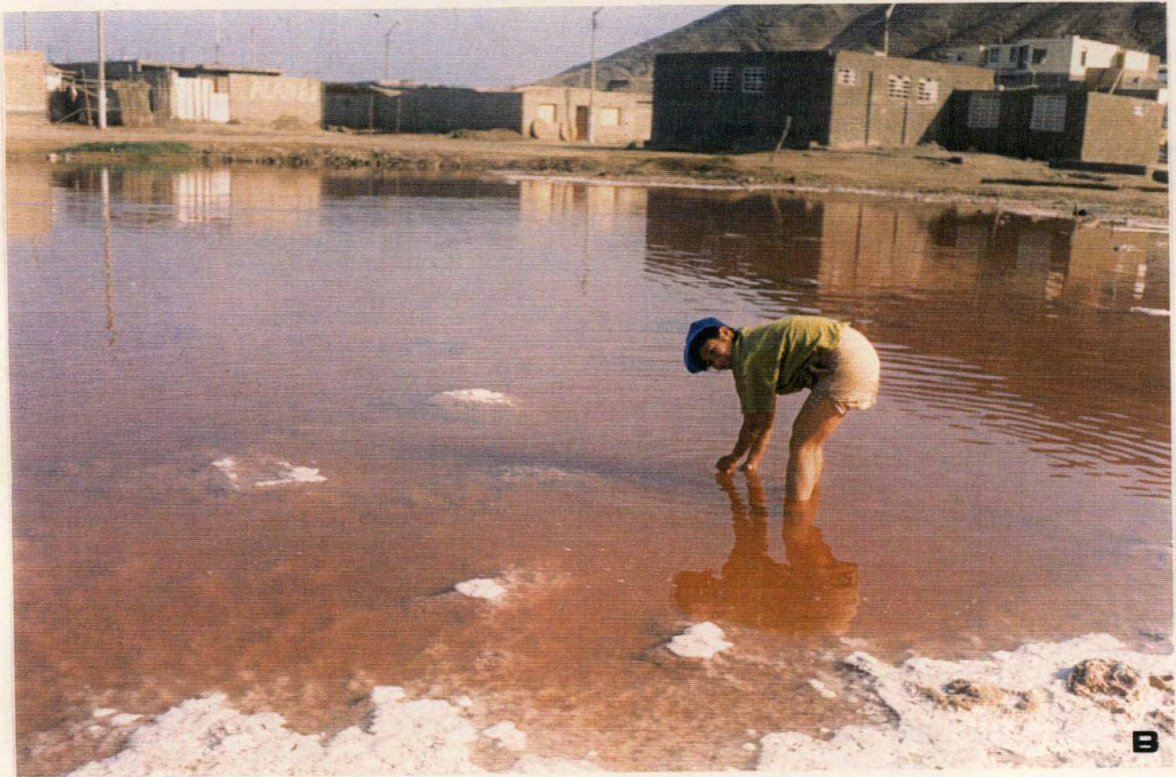


FIGURA 2: DIAGRAMA DE FLUJO PARA EL MANTENIMIENTO DE LAS CEPAS DE *Dunaliella Salina* (CHIMUS, CHILCA)

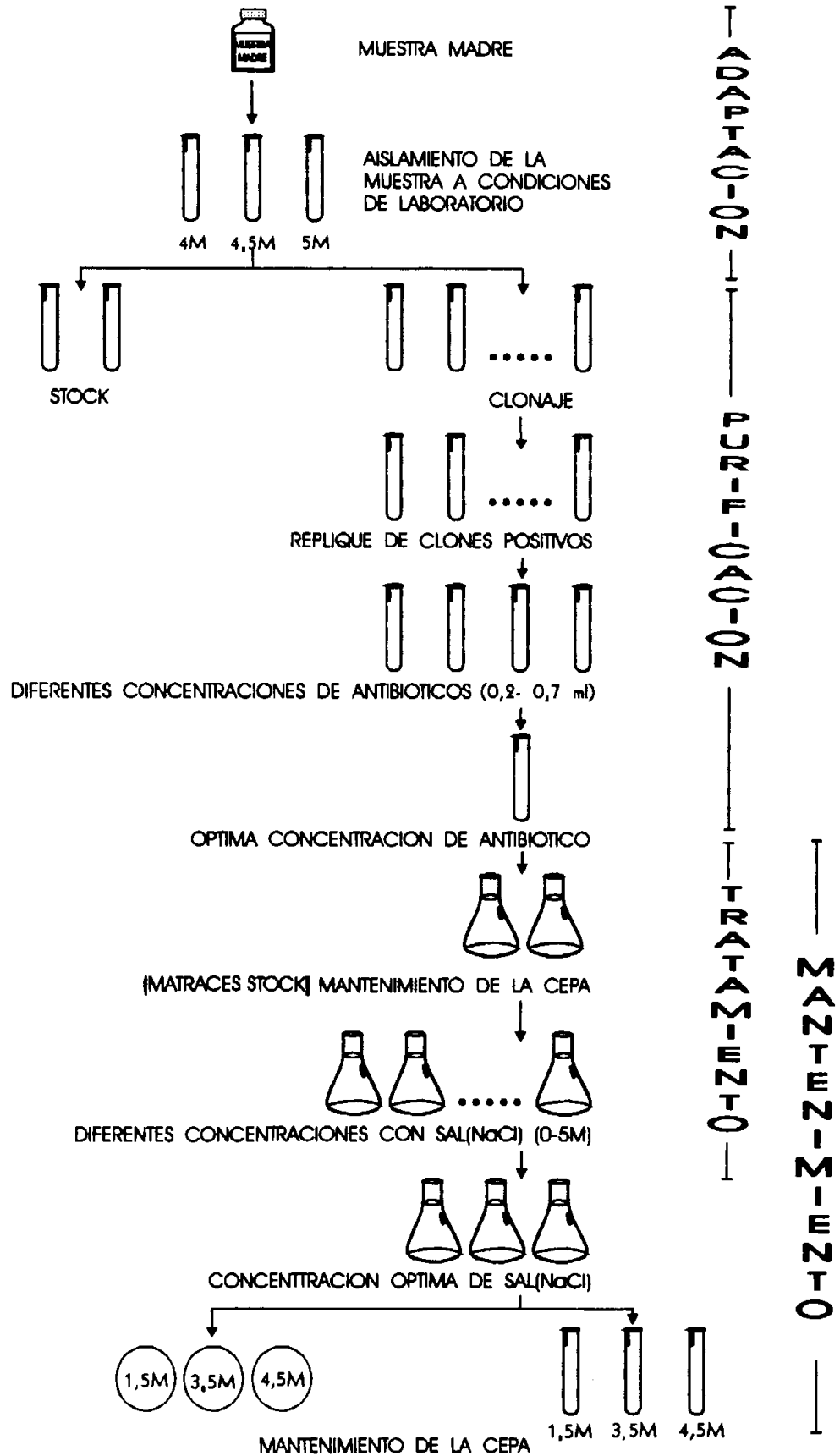


FIGURA 6: Crecimiento de *Dunaliella salina* de las Salinas de Chilca, en medio Johnson modificado, a diferentes concentraciones de NaCl; o(—), 1(▲), 1,5(*), 2(□), 2,5(---), 3(-+-), 3,5(■), 4(+), 4,5(⌘), 5(x), en espectrofotómetro.

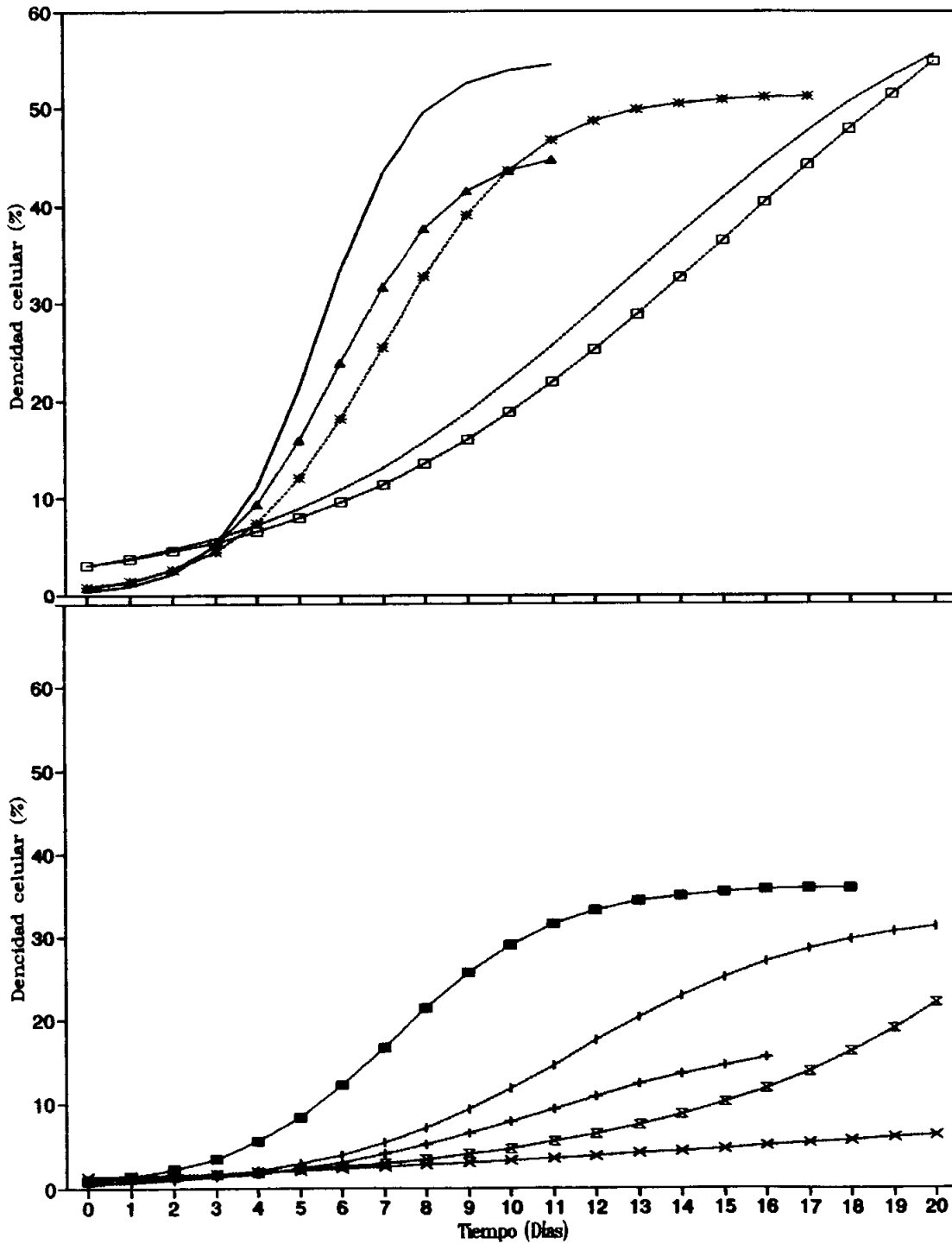


FIGURA 7: Curva del análisis de regresión potencial, comparando los valores obtenidos por los conteos en cámara de Newbahuer y en espectrofotómetro simultáneamente, para las curvas de crecimiento de *Dunaliella salina*, de las Salina de los Chimus.
(■)=valores de densidad celular y absorvancia, (*)=valor teórico.

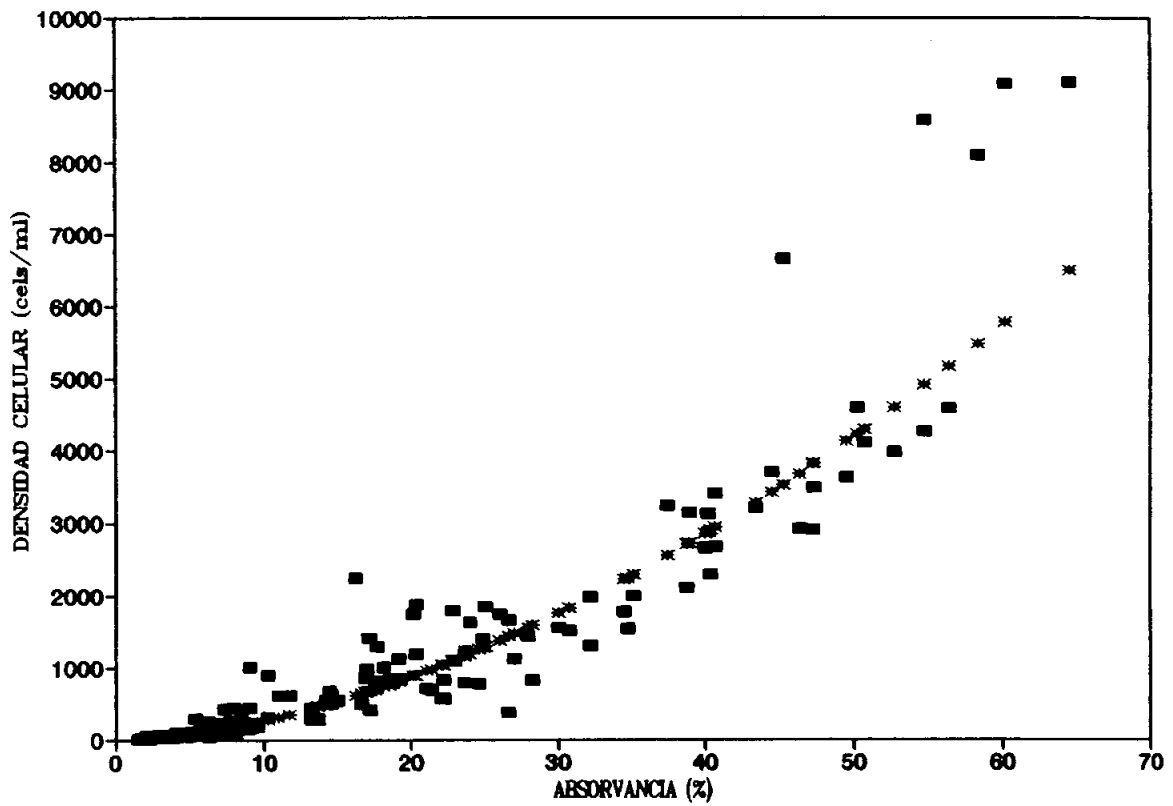


FIGURA 8: Curva del análisis de regresión potencial, comparando los valores obtenidos por los conteos en cámara de Newbahuer y en espectrofotómetro simultáneamente, para las curvas de crecimiento de *Dunaliella salina* de las Salinas de Chilca.
(■)=Valores de densidad celular y absorvancia, (*)=valor teórico.

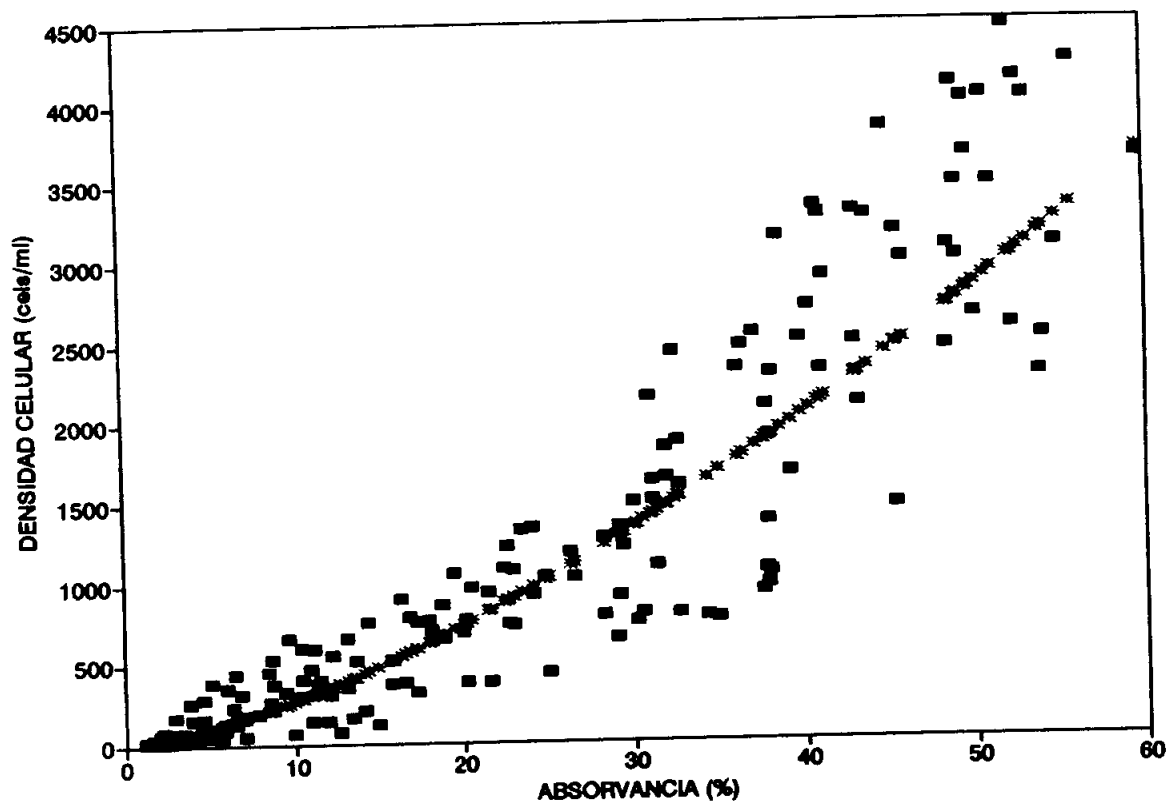


FIGURA 9: CICLO DE VIDA de *Dunaliella salina*, de las SALINAS DE LOS CHIMUS, diferenciación morfológica y reproductiva.

FASE ASEXUAL:

- a) Gemación lateral
- b) Fisión transversal; con formación de largos hilos citoplasmáticos, citocinesis con igual o desigual proporción de citoplasma.
- c) Fisión longitudinal con insición posterior.
- d) Fisión longitudinal con insición anterior y presenta 4 variaciones que siguiendo el orden ascendente son:
 - Con formación de un puente citoplasmático central.
 - Con simple constricción hasta la formación de células hijas.
 - Adquiriendo la forma fusiforme con formación posterior de hilo citoplasmático en cuyo extremo se libera una célula hija pequeña quedando una célula latente.
 - Con insición anterior incipiente y formación de yema lateral.
- e) Gemación transversal con musílagos; Células latentes rodeada de capa musilaginosas con formación de yema.

FASE SEXUAL:

Con formación de zigosporas.

FIG 9:
CICLO DE VIDA DE
Dunaliella salina
 (Salinas de Chímus)

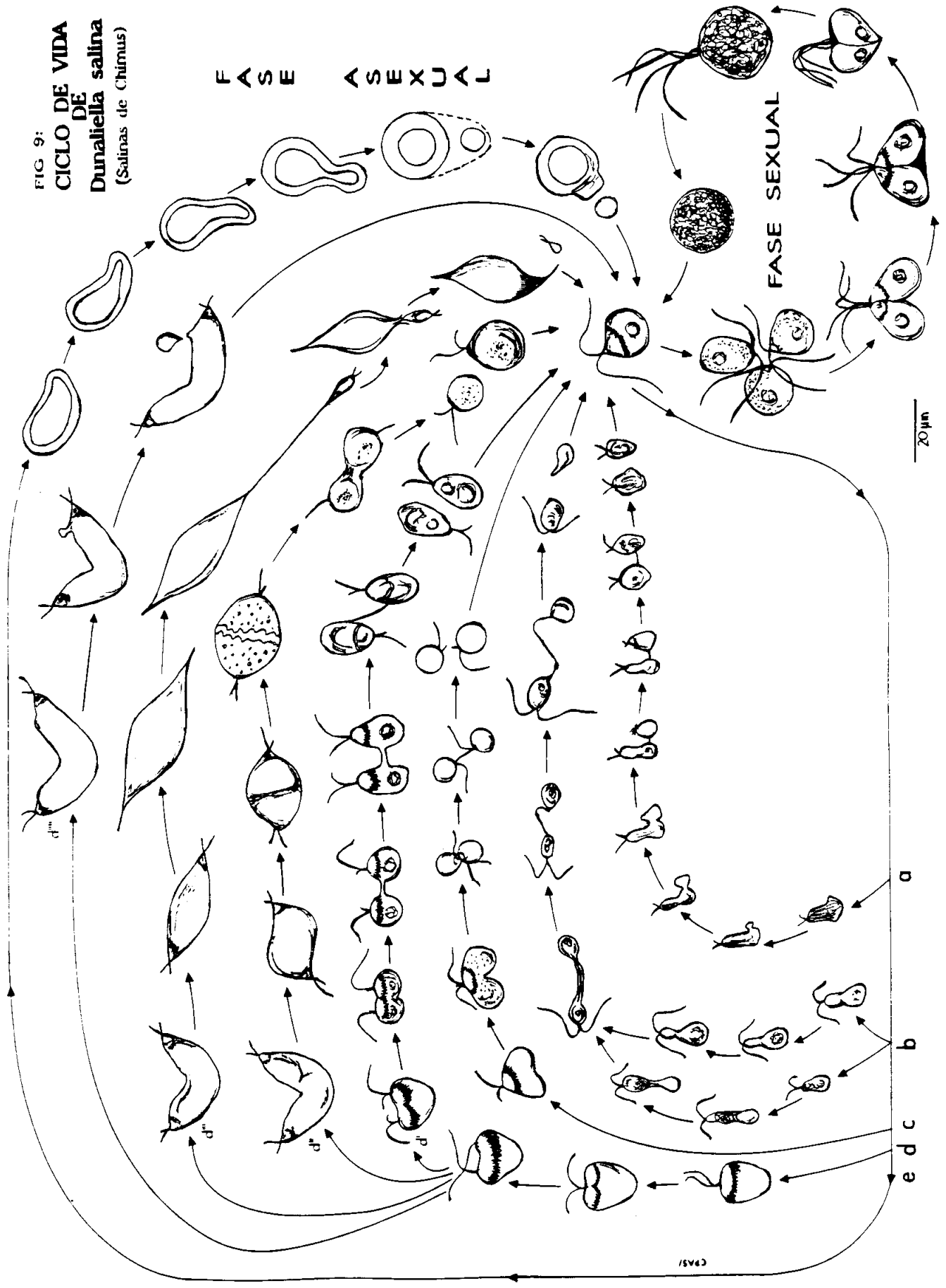


FIGURA 10: CICLO DE VIDA de *Dunaliella salina*, de las SALINAS DE CHILCA, diferenciación morfológica y reproductiva.

FASE ASEXUAL:

- a) Gemación lateral
- b) Fisión transversal; con formación de largos hilos citoplasmáticos, citocinesis con igual o desigual proporción de citoplasma.
- c) Fisión longitudinal con insición posterior.
- d) Fisión longitudinal con insición anterior y 2 variantes que en orden ascendente son:-Con formación de hilo citoplasmático central sobre el cual se desarrolla un segundo cordón pequeño dando origen a una célula hija pequeña en relación a las células en formación.
-Con formación de puente citoplasmático central.

FORMACION DE APLANOSPORAS:

Observado en la etapa de adaptación del ambiente natural a condiciones de laboratorio.

ESTADIO PALMELOIDE; observado sólo en ambiente natural en forma de natas.

FASE SEXUAL:

Con formación de zigosporas.

FIG. 40:
CICLO DE VIDA DE
Dunaliella salina
 (Salinas de Chitica)

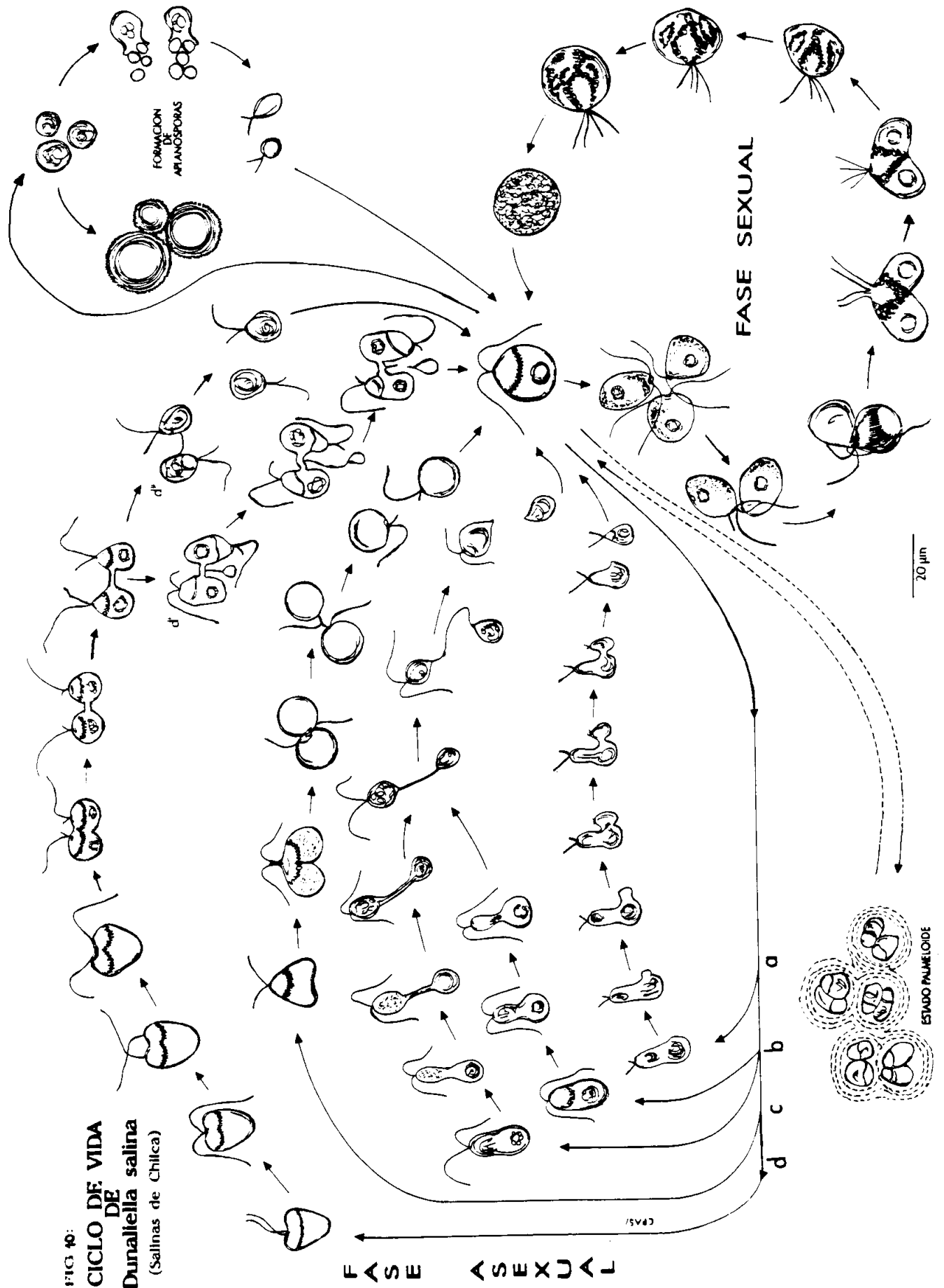


FIGURA 11. *Dunaliella salina*, Salina de los Chimus.

Fig.11A-C. Formas celulares, piriforme y oval en cultivos sin adición de NaCl.

Fig.11D-H. Reproducción asexual, fisión transversal en cultivos con adición de 1M de NaCl. **hc** hilo citoplasmático.

Fig.11I-K. Formas celulares, piriforme y redondeada en cultivos con adición de 1,5M de NaCl.

Fig.11J-K. Reproducción asexual, fisión longitudinal. **hc** hilo citoplasmático.

La escala de 20µm es válida para todas las fotos.

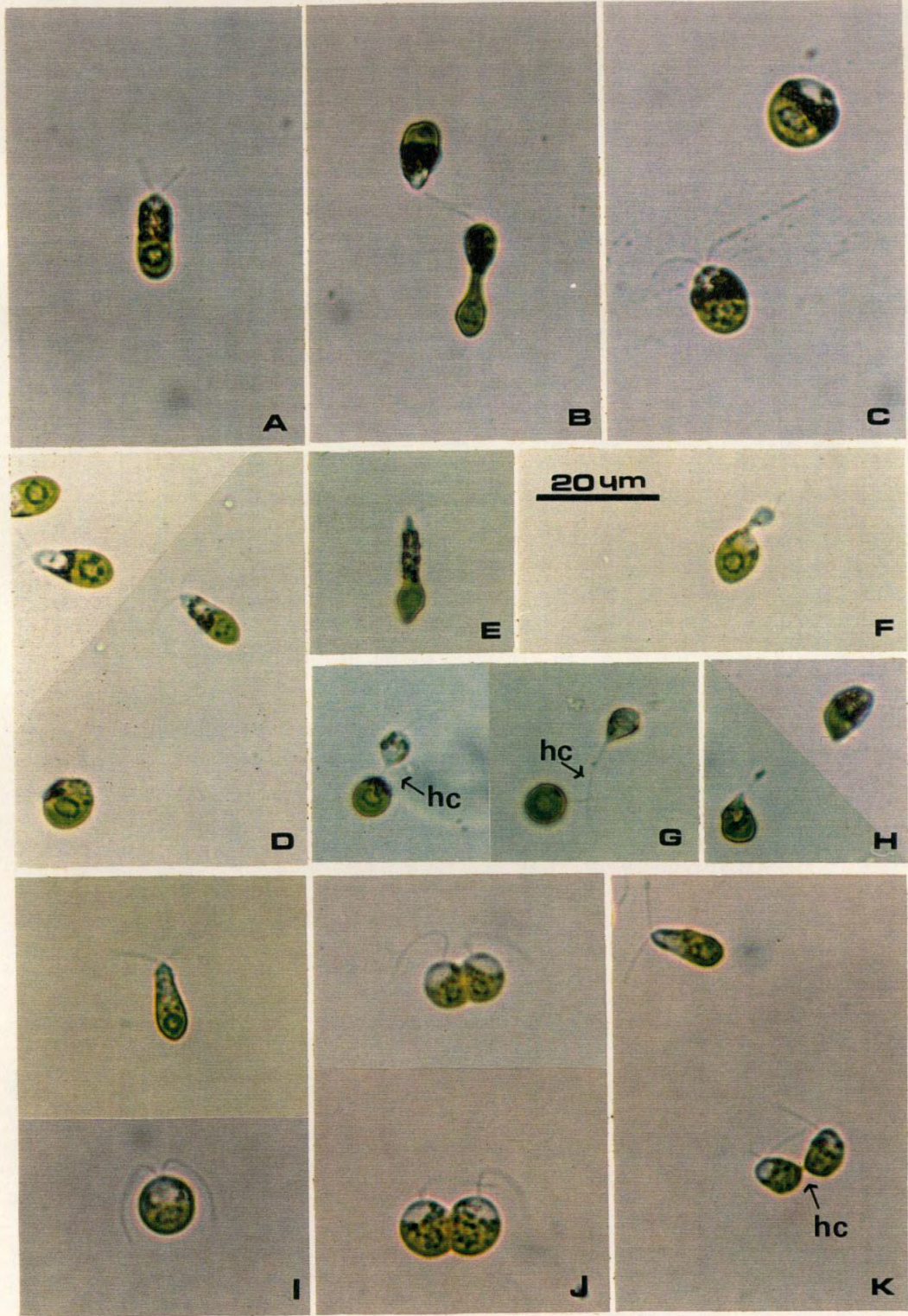


FIGURA 12. *Dunaliella salina*, Salina de los Chimus.

- Fig.12A-B. Formas celulares redondeadas en cultivos con adición de 2,5M de NaCl.
- Fig.12B. Reproducción asexual, fisión longitudinal.
- Fig.12C. Formas celulares redondeadas en cultivos con adición de 3M de NaCl. Obsérvese viraje de color en el mismo cultivo.
- Fig.12D. Formas celulares ovales en cultivos con adición de 4M de NaCl.
- Fig.12E-F. Formas celulares oval y redondeadas en cultivos con adición de 5M de NaCl.

La escala de 20µm es válida para todas las fotos.

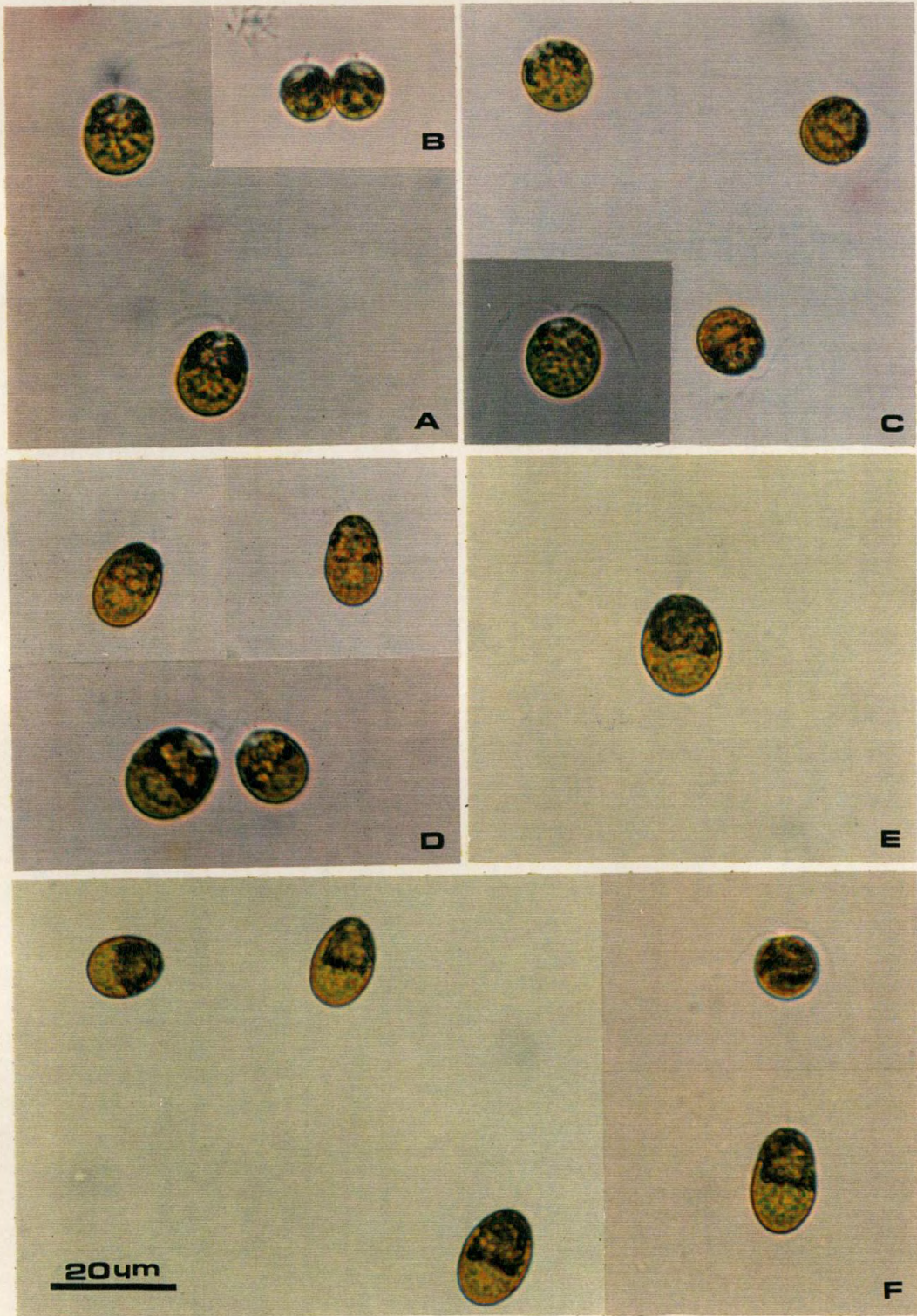


FIGURA.13. *Dunaliella salina*, Salinas de Chilca.

Fig.13A-D.Reproducción sexual, formación de zigospora, en cultivos sin adición de NaCl.

Fig.13E-F.Formas celulares, oval y piriforme en cultivos con adición de 1,5M de NaCl.

Fig.13G-H.Formas celulares, oval y redondeadas en cultivos con adición de 3M de NaCl. obsérvese el viraje de color en el mismo cultivo.

Fig.13I. Inicio de una reproducción sexual con el grupo de apareamiento por la unión de dos células.

La escala de 20 μ m es válida para todas las fotos.

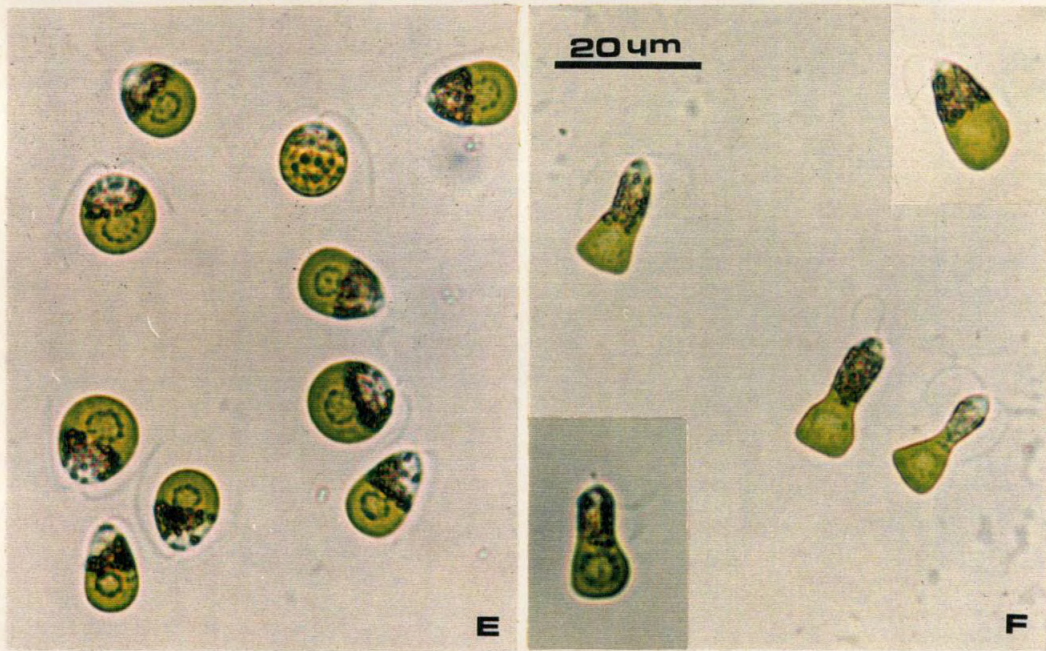
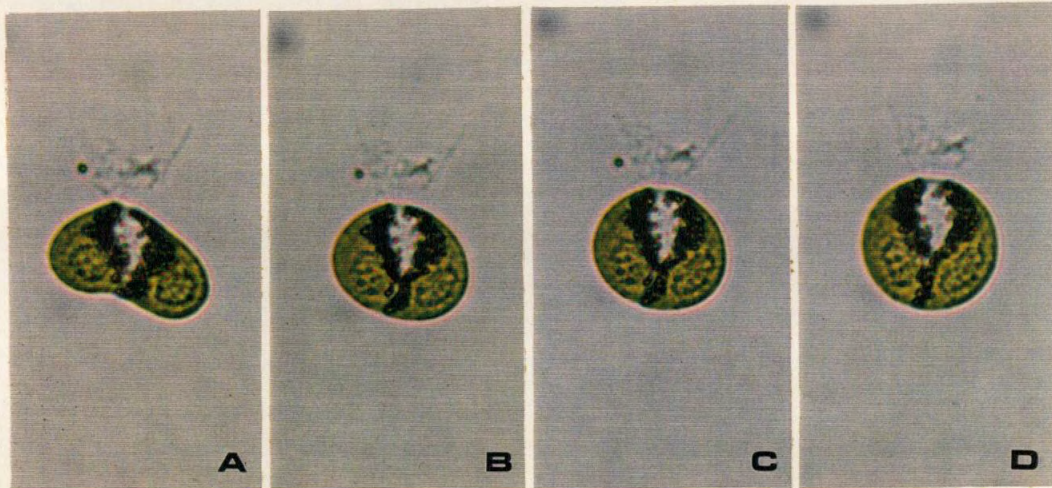


FIGURA.14. *Dunaliella salina*, Salinas de Chilca.

Fig.14A-C.Reproducción asexual por fisión longitudinal con variación por la elongación central en el puente citoplasmático de las células en formación para dar lugar a una nueva célula hija. Este proceso fue observado en cultivos con adición de 4,5M de NaCl.

Fig.14D-G.Formas celulares oval y redondeadas en cultivos con adición de 4,5M de NaCl.

La escala de 20µm es válida para todas las fotos.

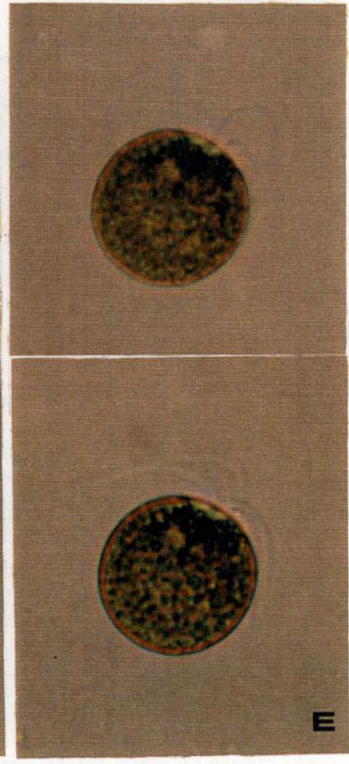
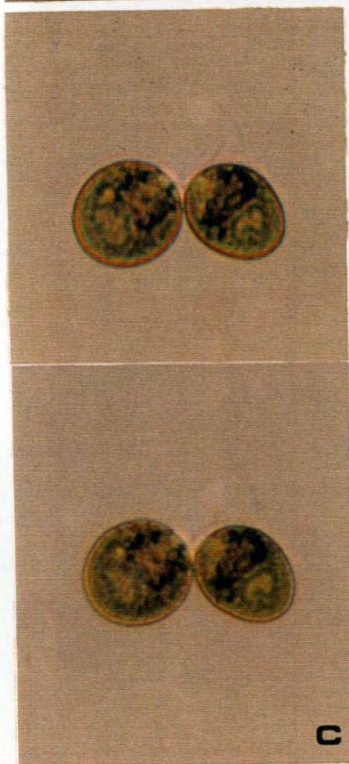
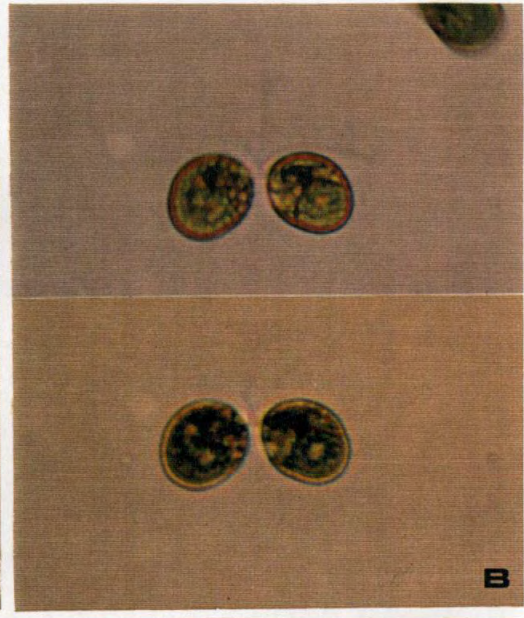
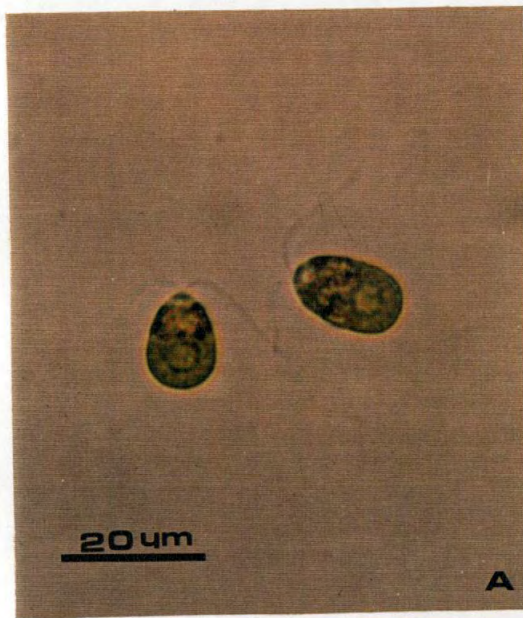


FIGURA.15. *Dunaliella salina*, Salinas de Chilca.

Fig.15A-E.Reproducción sexual en cultivo con
adición de 2,5M de NaCl.

Fig.15A-C.Formación de grupos de apareamiento.

Fig.15D. Formación de la zigospora.

Fig.15E. Zigospora tetraflagelar.

La escala de 20µm es válida para todas las
fotos.

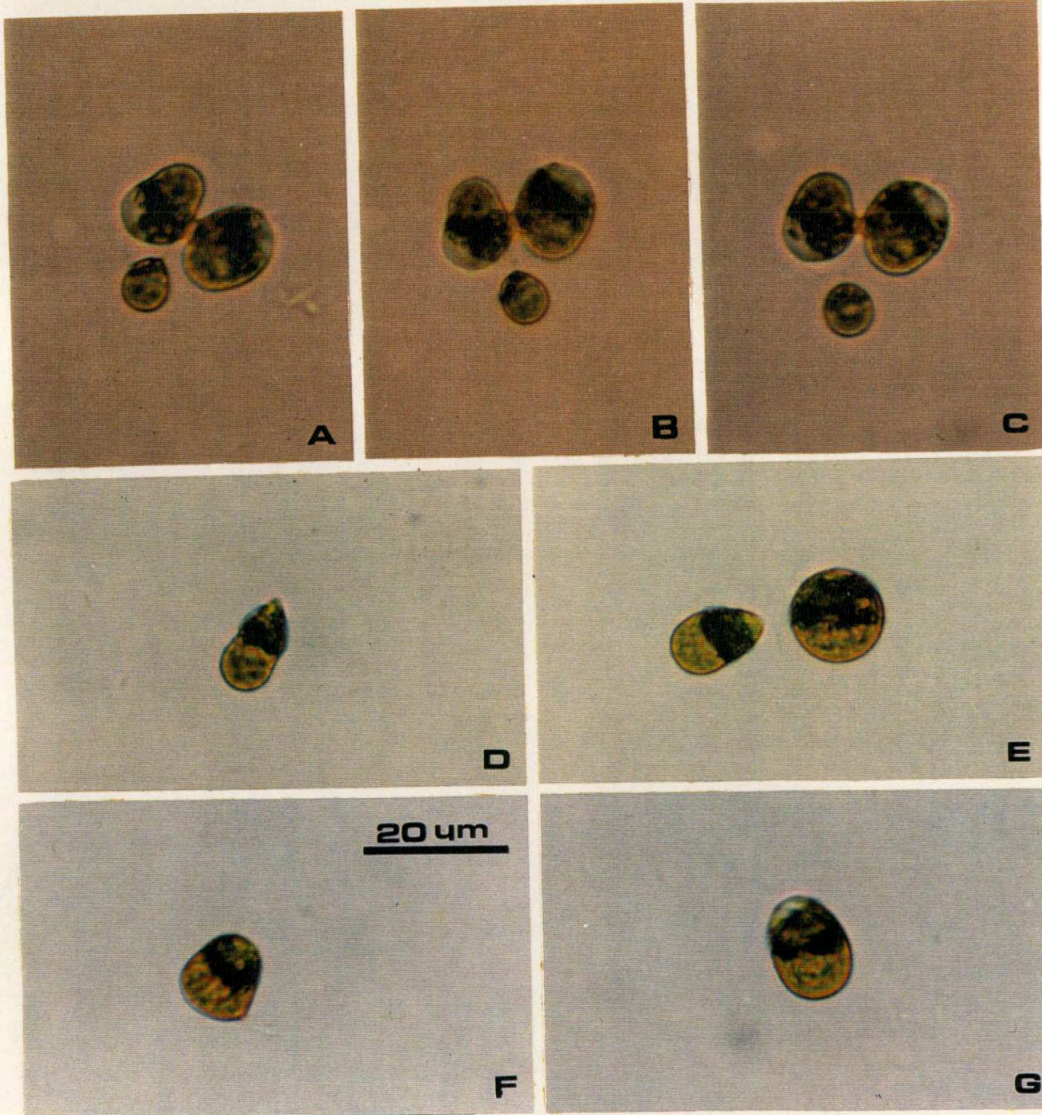


TABLA 1: Densidad algal de Dunaliella salina de las Salinas de los Chimus, evaluada por conteos en cámara de Newbahuer (cels/ml) cultivada en medio Johnson modificado con adición de diferentes concentraciones de NaCl (1-5M), por un período de 21 días. Los valores representa el promedio de 6 conteos (2 réplicas por concentración y 3 conteos por réplica).

# de Días	[NaCl] (en moles)									
	[0] x10 ³	[1] x10 ³	[1.5] x10 ³	[2] x10 ³	[2.5] x10 ³	[3] x10 ³	[3.5] x10 ³	[4] x10 ³	[4.5] x10 ³	[5] x10 ³
0	13,40	11,70	13,35	23,30	23,30	15,00	13,35	11,65	16,65	18,25
1	12,60	15,00	13,30	30,00	21,65	16,65	18,35	15,00	15,00	15,00
2	16,70	20,00	23,35	36,65	56,65	16,30	26,65	11,65	17,55	15,00
3	71,70	23,35	33,35	76,65	58,35	25,00	30,00	18,35	18,35	15,00
4	275,00	68,35	61,65	291,65	95,00	43,35	43,35	25,00	20,85	16,00
5	795,90	208,35	430,00	446,65	112,50	53,35	63,35	28,30	30,00	16,65
6	3145,00	438,35	976,70	601,65	133,35	61,65	71,30	28,35	33,35	17,55
7	6665,00	611,65	1100,00	853,15	262,60	78,30	80,85	33,35	40,00	18,30
8	8595,70	1406,65	1131,65	1008,30	280,00	95,00	96,65	42,50	45,00	18,35
9	9095,00	1633,30	1310,05	1128,30	438,35	144,20	233,35	44,65	51,65	20,00
10	9100,00	1993,35	1540,00	1198,00	486,65	193,35	226,65	48,35	60,00	20,00
11	8110,90	2676,65	2108,30	1231,65	545,00	230,00	271,65	51,65	71,65	23,35
12	4260,00	3130,00	2655,80	1398,80	586,70	261,65	416,70	55,00	80,85	24,20
13	2906,70	3414,15	3209,15	1446,65	628,35	395,00	572,50	54,20	105,00	26,65
14	2285,00	3698,30	4121,70	1564,15	680,00	233,35	783,30	58,35	113,35	35,00
15	1781,70	3503,35	4603,35	1665,00	838,35	231,65	1026,00	80,00	126,30	41,65
16	1506,65	3631,70	4583,30	1750,00	841,65	301,30	826,65	63,35	158,35	43,40
17	1186,65	3253,30	3975,00	1840,00	826,65	176,65	701,70	60,00	159,65	60,00
18	808,35	1980,00	2935,00	1876,65	689,30	73,35	486,65	58,30	159,55	61,55
19	541,65	1295,00	2248,35	1796,65	574,65	73,30	293,35	48,35	159,60	110,00
20	295,00	885,00	1016,65	1738,30	378,00	68,30	140,00	38,35	159,05	110,00

TABLA 2: Densidad algal de Dunaliella salina de las Salinas de los Chimus, evaluada por lecturas en espectrofotómetro (%), a una longitud de onda de 490 nm, cultivada en medio Johnson modificado con adición de diferentes concentraciones de NaCl (1-5M), por un período de 21 días. Los valores representan el promedio de 6 conteos (2 réplicas por concentración y 3 conteos por réplica).

# de Días	[NaCl] (en moles)									
	[0] (%)	[1] (%)	[1.5] (%)	[2] (%)	[2.5] (%)	[3] (%)	[3.5] (%)	[4] (%)	[4.5] (%)	[5] (%)
0	1,90	1,80	1,80	1,80	1,90	1,90	1,80	2,30	1,90	2,10
1	2,10	1,90	1,90	1,90	2,00	2,10	1,90	1,50	1,70	2,00
2	3,80	2,00	2,20	2,80	2,10	2,20	2,00	2,30	2,10	2,00
3	5,50	2,40	3,30	3,50	2,60	2,40	2,30	2,70	2,20	2,00
4	13,70	3,00	3,60	5,30	4,10	3,00	4,20	2,70	2,20	2,00
5	23,60	6,00	7,30	7,90	5,10	3,30	4,70	2,80	2,40	2,00
6	38,90	9,00	17,00	11,00	5,60	3,40	5,80	3,00	2,60	2,10
7	45,20	11,70	23,00	16,90	6,10	4,40	6,90	3,20	2,70	2,30
8	54,80	17,10	27,10	18,10	8,40	5,30	7,40	3,20	3,10	2,40
9	60,20	24,00	32,20	19,20	13,20	6,80	8,70	2,10	3,40	2,70
10	64,50	35,10	34,70	20,30	14,60	8,30	8,80	2,80	4,30	3,40
11	58,40	40,60	38,70	20,30	14,20	7,10	13,30	3,30	4,70	3,50
12	54,80	40,10	40,00	23,70	14,50	7,70	17,20	2,50	4,90	3,70
13	47,20	40,60	43,30	24,90	14,60	10,20	22,20	3,20	5,10	3,40
14	40,30	49,50	50,70	26,70	14,40	9,50	24,70	3,00	5,30	4,20
15	34,50	47,30	56,40	25,10	18,30	9,50	28,30	3,10	5,60	4,50
16	30,80	44,40	50,20	26,10	18,70	8,90	22,20	3,80	6,10	4,30
17	23,60	37,40	52,70	28,00	18,50	8,40	21,10	3,00	9,00	4,80
18	17,50	32,20	46,30	30,00	16,40	7,90	16,60	2,30	7,30	5,90
19	15,00	17,70	16,20	22,80	16,10	5,70	13,60	3,20	7,80	5,60
20	13,20	10,20	9,00	20,20	16,70	3,10	8,80	3,20	6,50	6,00

TABLA 3: Densidad algal de Dunaliella salina de las Salinas de Chilca, evaluada por conteos en cámara de Newbauer (cels/ml) cultivada en medio Johnson modificado con adición de diferentes concentraciones de NaCl (1-5M), por un período de 21 días. Los valores representan el promedio de 6 conteos (2 réplicas por concentración y 3 conteos por réplica).

# de Días	[ClNa] (en moles)									
	[0] x10 ³	[1] x10 ³	[1.5] x10 ³	[2] x10 ³	[2.5] x10 ³	[3] x10 ³	[3.5] x10 ³	[4] x10 ³	[4.5] x10 ³	[5] x10 ³
0	15,00	15,00	13,35	15,00	11,65	13,35	15,00	18,40	18,40	10,85
1	27,55	20,00	23,30	13,30	20,00	35,00	29,40	16,65	18,50	16,65
2	33,35	46,70	28,35	41,65	30,00	36,65	35,00	20,00	18,40	16,70
3	85,00	281,65	161,65	71,70	36,70	56,07	41,00	21,65	20,00	20,00
4	308,35	661,65	316,70	130,00	155,00	80,00	48,35	36,65	26,55	21,70
5	775,00	901,70	372,50	355,00	233,35	167,55	63,70	39,30	30,85	26,65
6	1832,50	1330,85	866,70	372,50	350,85	260,00	70,00	39,20	47,20	29,15
7	3176,70	2148,35	1032,50	395,00	520,00	390,00	116,65	39,70	48,40	31,70
8	4106,65	3148,30	1506,65	523,35	788,35	440,00	325,00	51,65	71,00	36,70
9	4136,65	3341,65	1673,35	761,70	971,65	530,00	433,30	93,30	74,30	45,00
10	4236,35	3827,50	2110,00	1060,00	1040,00	601,70	645,00	135,00	115,00	33,35
11	4456,65	3276,65	2455,00	1181,70	1221,65	760,05	785,00	137,20	173,30	36,65
12	3076,35	3311,65	3011,70	1270,85	1494,20	940,00	931,70	139,00	175,00	37,50
13	1463,35	3283,35	3485,85	1345,00	1600,05	1090,00	1068,30	160,00	191,65	41,65
14	1098,35	2713,35	3666,65	1630,00	2091,70	1231,65	1369,35	205,00	263,30	48,35
15	791,65	2546,65	4003,35	2431,70	2291,70	1080,00	1053,35	372,50	295,00	56,70
16	736,70	2328,30	4025,00	2468,35	2313,30	923,30	981,70	519,20	348,30	70,00
17	708,35	1868,35	4021,70	2903,30	2493,35	910,00	767,30	553,30	355,00	68,35
18	663,30	1645,00	3483,30	2583,35	2648,30	801,70	748,30	473,30	384,20	66,35
19	591,70	1340,00	3003,30	2511,70	3095,00	800,65	691,70	408,30	380,00	66,65
20	451,65	766,65	2508,35	2280,00	3648,35	750,67	653,65	326,70	380,00	123,35

TABLA 4: Densidad algal de Dunaliella salina de las Salinas de Chilca, evaluada por lecturas en espectrofotómetro (%), a una longitud de onda de 490 nm, cultivada en medio Johnson modificado con adición de diferentes concentraciones de NaCl (1-5M), por un período de 21 días. Los valores representan el promedio de 6 conteos (2 réplicas por concentración y 3 conteos por réplica).

# de Días	[NaCl] (en moles)									
	[0] (%)	[1] (%)	[1.5] (%)	[2] (%)	[2.5] (%)	[3] (%)	[3.5] (%)	[4] (%)	[4.5] (%)	[5] (%)
0	1,90	1,90	1,90	1,90	2,10	2,00	2,00	2,00	2,60	2,50
1	2,00	2,00	2,10	1,90	2,20	1,60	1,90	1,60	1,50	1,30
2	3,10	2,30	2,80	2,30	2,20	1,90	3,90	2,00	1,40	1,30
3	5,10	4,50	4,50	4,50	2,70	2,00	5,60	2,10	1,20	1,50
4	12,00	9,60	6,80	5,80	3,90	2,20	7,00	2,60	1,70	1,60
5	20,10	16,30	11,30	5,90	6,30	2,90	9,90	2,60	1,90	2,00
6	31,90	23,50	18,70	8,70	11,30	3,70	12,60	3,00	2,30	2,10
7	45,50	31,00	26,50	11,50	15,80	5,00	14,90	3,50	2,70	2,50
8	48,90	38,60	31,20	15,70	16,80	6,40	17,20	4,40	2,90	2,60
9	52,60	40,80	39,20	17,20	20,50	8,60	25,00	5,00	3,40	2,70
10	55,70	48,80	43,20	19,40	24,80	10,40	29,10	5,90	4,50	3,30
11	52,00	43,70	48,40	26,30	29,40	14,30	34,30	11,00	6,50	3,40
12	48,50	43,10	49,00	28,30	30,10	21,50	37,60	11,90	7,00	4,00
13	45,40	41,00	49,00	29,20	32,70	22,40	37,80	13,40	7,80	4,10
14	31,40	40,30	49,70	31,20	37,80	32,70	38,00	14,10	8,50	5,20
15	28,30	37,10	49,50	32,40	38,10	30,60	37,90	15,70	10,30	5,00
16	23,00	36,10	53,10	36,10	41,00	30,20	37,90	18,60	11,60	4,80
17	18,10	32,60	50,60	36,29	43,00	29,20	35,00	21,60	13,10	5,10
18	13,10	32,00	51,00	32,20	40,00	24,10	22,70	20,90	15,70	5,80
19	11,10	24,10	45,80	24,00	34,80	23,00	20,00	20,40	15,20	5,80
20	8,40	17,90	39,80	23,80	35,60	22,60	18,80	19,40	15,20	6,40

TABLA 5: Análisis de la función logística de la curva de crecimiento de *Dunaliella salina* de las Salinas de los Chimus, hasta el primer día de la fase de decadencia celular, cultivada en medio Johnson modificado. Los datos corresponden al promedio de concentración celular por día; OBS=valor observado; ESP=valor esperado; r=tasa de crecimiento instantáneo, r²=coeficiente de determinación, n=número de observaciones. Datos obtenidos por conteos e cámara de Newbauer.

x10 cels/m	OBS	ESP	OBS	ESP	OBS	ESP	OBS	ESP	OBS	ESP	OBS	ESP	OBS	ESP	OBS	ESP	OBS	ESP	OBS	ESP
Días/(NaCl)	0		1		1.5		2		2.5		3		3.5		4		4.5		5	
0	13,40	0,11	11,70	9,98	13,40	52,05	23,30	79,18	23,30	26,35	15,00	4,20	13,40	0,33	11,70	11,49	16,70	13,03	18,30	4,80
1	12,60	0,85	15,00	16,82	13,30	77,29	30,00	113,68	21,70	37,10	16,70	8,64	18,40	0,66	15,00	13,73	15,00	15,21	15,00	5,53
2	16,70	3,89	20,00	35,41	23,40	114,50	36,70	161,82	56,70	51,95	16,30	10,44	26,70	1,32	11,70	16,31	17,60	17,75	15,00	6,38
3	71,70	23,10	23,40	68,37	33,40	169,00	78,70	227,61	58,40	72,23	25,00	16,32	30,00	2,65	18,40	19,25	18,40	20,72	15,00	7,35
4	275,00	135,63	68,40	123,47	61,70	248,17	291,70	314,99	95,00	99,45	43,40	25,28	43,40	5,30	25,00	22,54	20,90	24,19	16,00	8,47
5	795,90	749,71	208,40	226,54	430,00	361,68	446,70	426,82	112,50	135,18	53,40	38,55	63,40	10,56	28,30	26,16	30,00	28,23	16,70	9,76
6	3145,00	3140,40	438,40	405,62	976,70	521,50	601,70	563,28	133,40	180,71	61,70	57,68	71,30	20,88	28,40	30,08	33,40	32,96	17,60	11,25
7	6665,00	6770,37	611,70	697,09	1100,00	740,88	853,20	720,48	262,60	236,59	78,30	83,49	60,90	40,72	33,40	34,24	40,00	38,47	18,30	12,98
8	8595,70	8403,60	1408,70	1124,45	1131,70	1031,60	1006,30	889,96	280,00	302,10	95,00	116,42	96,70	77,40	42,50	38,57	45,00	44,90	18,40	14,94
9	9095,00	8758,86	1833,30	1664,03	1310,10	1399,62	1128,30	1060,14	438,40	374,88	144,20	154,61	223,40	140,47	41,70	42,97	51,70	52,42	18,40	17,22
10	9100,00	8821,56	1993,40	2230,02	1540,00	1839,27	1198,00	1219,25	486,70	451,09	193,40	195,29	226,70	236,58	48,40	47,36	60,00	61,18	20,00	19,84
11	8110,90	8632,19	2676,70	2719,20	2108,30	2329,58	1231,70	1358,37	545,00	526,08	230,00	233,70	271,70	358,98	51,70	51,63	71,70	71,42	20,00	22,87
12			3130,00	3078,09	2655,80	2836,16	1398,80	1473,07	586,70	595,51	261,70	266,68	416,70	463,74	55,00	55,70	80,90	83,37	23,40	26,35
13			3414,20	3305,56	3209,20	3319,87	1446,70	1563,15	628,40	656,25	395,00	292,63	572,50	585,12	54,20	59,51	105,00	97,31	24,20	30,37
14			3698,30	3441,34	4121,70	3748,19	1564,20	1631,21	640,00	708,79	233,40	311,70	783,30	653,39	58,40	63,00	113,40	113,59	26,70	35,00
15			3503,40	3517,77	4803,40	4102,86	1665,00	1681,17	680,00	747,15			826,00	693,73	80,00	66,15	126,30	132,59	35,00	40,33
16			3831,70	3559,58	4583,30	4380,60	1750,00	1717,05	836,40	778,31			826,70	715,76	63,40	68,94	158,40	154,77	41,70	46,48
17			3253,30	3582,10	3975,00	4568,74	1840,00	1742,43	841,70	801,76			701,70	727,28			155,65	154,79	43,40	53,57
18							1876,70	1760,19	826,70	819,06			466,70	733,16					60,00	61,74
19							1796,70	1772,51											61,60	71,15
20							1736,30	1781,02											80,00	81,99
n	12		18		18		21		19		15		19		17		18		21	
r	1,76		0,64		0,40		0,96		0,97		0,46		0,70		0,24		0,18		0,14	
r ²	0,94		0,92		0,91		0,95		0,97		0,90		0,80		0,95		0,91		0,90	

TABLA 6: Análisis de la función logística de la curva de crecimiento de Dunaliella salina de las Salinas de los Chimus, hasta el primer día de la fase de decadencia celular, cultivado en medio Johnson modificado. Los datos corresponden al promedio de concentración celular por día; OBS=valor observado; ESP=valor esperado; r=tasa de crecimiento instantáneo, r^2 =coeficiente de regresión, n=número de observaciones. Datos obtenidos de las lecturas de absorbancia.

Val(%)	OBS	ESP	OBS	ESP	OBS	ESP	OBS	ESP	OBS	ESP	OBS	ESP	OBS	ESP	OBS	ESP	OBS	ESP	OBS	ESP
Días/(NaCl)	0		1		1.5		2		2.5		3		3.5		4		4.5		5	
0	1,90	0,65	1,80	0,19	1,80	1,01	1,80	1,54	1,90	2,08	1,90	1,36	1,80	0,89	2,30	1,61	1,90	1,69	2,10	1,51
1	2,10	1,45	1,90	0,38	1,90	1,85	1,90	2,23	2,00	2,52	2,10	1,88	1,90	1,19	1,50	1,82	1,70	1,84	2,00	1,63
2	3,80	3,19	2,00	0,89	2,20	2,88	2,80	3,19	2,10	3,08	2,20	2,08	2,00	1,59	2,30	2,05	2,10	1,99	2,00	1,75
3	5,50	6,79	2,40	1,29	3,30	4,25	3,50	4,50	2,80	3,71	2,40	2,51	2,30	2,12	2,70	2,31	2,20	2,17	2,00	1,88
4	13,70	13,54	3,00	2,39	3,80	6,84	5,30	6,22	4,10	4,48	3,00	3,01	4,20	2,81	2,70	2,59	2,20	2,35	2,00	2,02
5	23,60	24,09	6,00	4,34	7,30	10,05	7,90	8,39	5,10	5,33	3,30	3,58	4,70	3,70	2,80	2,89	2,40	2,56	2,00	2,17
6	38,90	36,71	9,00	7,59	17,00	14,80	11,00	10,98	5,80	6,32	3,40	4,20	5,80	4,82	3,00	3,22	2,80	2,77	2,10	2,33
7	45,20	47,75	11,70	12,54	23,00	20,11	16,90	13,87	6,10	7,43	4,40	4,86	6,90	6,22	3,20	3,57	2,70	3,01	2,30	2,50
8	54,80	55,05	17,10	19,07	27,10	26,08	18,10	18,88	6,40	8,68	5,30	5,53	7,40	7,91	3,20	3,95	3,10	3,27	2,40	2,69
9	60,20	59,03	24,00	26,27	32,20	31,73	19,20	19,74	13,20	9,99	6,80	6,21	6,70	9,92	2,10	4,34	3,40	3,55	2,70	2,89
10	64,50	60,97	35,10	32,78	34,70	36,54	20,30	22,31	14,80	11,40	8,30	6,87	8,80	12,19	2,80	4,75	4,30	3,85	3,40	3,10
11	58,40	61,87	40,60	37,88	38,70	40,23	23,70	24,48	14,20	12,85	7,10	7,48	13,30	14,69	3,30	5,17	4,70	4,16	3,50	3,33
12			40,10	40,87	40,00	42,85	24,90	26,17	14,50	14,32	7,70	8,05	17,20	17,30	2,50	5,61	4,90	4,54	3,70	3,58
13			40,60	42,78	43,30	44,61	28,00	27,48	14,60	15,77	10,20	9,71	22,20	19,93	3,20	6,04	5,10	4,92	3,40	3,84
14			44,60	43,87	50,70	45,75	30,00	28,41	14,40	17,18	9,50	9,98	24,70	22,45	3,00	6,48	5,30	5,34	4,20	4,13
15			47,30	44,48					18,30	18,48			28,30	24,78	3,10	6,92	5,60	5,79	4,50	4,44
16			49,50	44,77					18,70	19,70			22,20	26,80	3,80	7,34	6,10	6,28	4,30	4,77
17			37,40	44,94					18,50	20,80					3,00	7,76	9,00	6,80	4,80	5,12
18									16,40	22,83					2,30	8,18	7,30	7,37	5,90	5,50
19																	7,80	7,99	5,80	5,91
20																	6,50	8,65	6,00	6,35
n	12		18		15		15		19		15		17		19		21		21	
r	0,82		0,64		0,5		0,39		0,22		0,25		0,3		0,14		0,08		0,07	
r ²	0,94		0,90		0,96		0,96		0,69		0,91		0,87		0,94		0,89		0,90	

TABLA 7: Análisis de la función logística de la curva de crecimiento de Dunaliella salina de las Salinas de Chilca, hasta el primer día de la fase de decadencia celular, cultivada en medio Johnson modificado. Los datos corresponden al promedio de concentración celular por día; OBS=valor observado; ESP=valor esperado; r=tasa de crecimiento inmediato, r²=coeficiente de determinación, n=número de observaciones. Datos obtenidos por conteos en cámara de Neubauer.

x10 cells/ml	OBS	ESP	OBS	ESP	OBS	ESP	OBS	ESP	OBS	ESP	OBS	ESP	OBS	ESP	OBS	ESP	OBS	ESP	OBS	ESP
Días/[NaCl]	0		1		1.5		2		2.5		3		3.5		4		4.5		5	
0	15,00	0,47	15,00	18,84	13,40	88,17	15,00	81,28	11,70	101,34	13,40	25,50	15,00	2,38	18,40	2,69	18,40	5,88	10,90	12,68
1	27,50	2,09	20,00	38,70	23,30	102,31	13,30	103,94	20,00	129,53	35,00	37,59	29,40	4,45	16,70	3,87	18,50	8,13	15,70	14,09
2	33,40	9,31	46,70	88,27	28,40	152,94	41,70	132,77	30,00	165,24	36,70	54,93	35,00	8,29	20,00	5,57	18,40	11,21	16,70	15,66
3	85,00	41,20	281,70	197,89	161,70	227,30	71,70	169,35	36,70	210,28	56,70	79,97	41,00	15,41	21,70	8,00	20,00	15,42	20,00	17,41
4	308,40	177,47	661,70	427,59	316,70	334,92	130,00	215,62	155,00	268,78	80,00	115,40	48,35	28,50	36,70	11,48	26,60	21,13	21,70	19,35
5	775,00	687,06	901,70	858,72	372,50	487,49	355,00	273,93	233,40	337,17	187,60	164,49	63,70	52,24	39,30	16,43	30,90	28,83	26,70	21,51
6	1832,50	1928,98	1330,90	1522,91	866,70	697,52	372,50	347,01	350,90	424,12	260,00	230,58	70,00	94,24	39,20	23,47	47,20	39,07	29,20	23,90
7	3176,70	3243,53	2148,40	2288,58	1032,50	975,24	395,00	438,04	520,00	530,39	390,00	316,16	116,70	165,38	39,70	33,38	48,40	52,51	31,70	26,56
8	4106,70	3828,52	3148,30	2924,58	1506,70	1323,59	523,40	550,53	786,40	658,62	440,00	421,55	325,00	277,38	51,70	47,21	71,00	69,79	36,70	29,53
9	4136,70	3989,87	3341,70	3324,18	1673,40	1732,67	761,70	688,18	971,70	810,96	530,00	543,63	433,30	434,86	93,30	66,26	74,30	91,47	45,00	32,82
10	4456,70	4027,93	3827,50	3532,97	2110,00	2177,51	1080,00	854,63	1040,00	988,84	601,70	675,41	645,00	624,61	135,00	92,02	115,00	117,84	33,40	36,48
11	4236,40	4036,56	3276,70	3631,64	2455,00	2622,57	1181,70	1052,99	1221,70	1191,47	780,10	807,23	785,00	814,78	137,20	126,02	173,30	148,71	38,70	40,54
12					3011,70	3032,21	1270,90	1285,38	1494,20	1417,41	940,00	929,43	931,70	973,28	139,00	169,55	175,00	183,29	37,50	45,06
13					3485,90	3381,32	1345,00	1552,20	1800,10	1662,35	1090,00	1034,98	1068,30	1086,31	180,00	222,72	191,70	220,15	41,70	50,08
14					3666,70	3659,84	1630,00	1851,58	2091,70	1920,16	1231,70	1120,73	1369,35	1158,27	205,00	284,84	263,30	257,44	48,40	55,66
15					4003,40	3870,58	2431,70	2178,92	2291,70	2183,25	1080,00	1186,97	1053,35	1200,82	372,50	353,19	295,00	293,20	56,70	61,66
16					4025,70	4023,72	2468,40	2526,87	2313,30	2443,37					519,20	423,73	348,30	325,80	70,00	68,76
17					4021,00	4131,78	2903,30	2885,82	2493,40	2692,83					553,30	491,69	355,00	354,14	88,40	76,42
18									2848,30	2924,43				473,30	553,68	384,20	377,82	88,40	84,93	
19									3095,00	3134,63						380,00	396,93	86,70	94,40	
20									3648,40	3318,92								123,40	104,92	
n	12		12		18		18		21		16		16		19		20		21	
r	1,50		0,84		0,40		0,25		0,25		0,40		0,63		0,37		0,83		0,16	
r ²	0,69		0,92		0,97		0,96		0,94		0,94		0,86		0,94		0,91		0,90	

TABLA 8: Análisis de la función logística de la curva de crecimiento de *Dunaliella salina* de las Salinas de chilca, hasta el primer día de la fase de decadencia celular, cultivada en medio Johnson modificado. Los datos corresponden al promedio de concentración celular por día; OBS=valor observado; ESP=valor esperado; r=tasa de crecimiento instantáneo, r²=coeficiente de determinación, n=número de observaciones. Datos obtenidos de las lecturas de absorvancia.

Valores (%)	OBS	ESP	OBS	ESP	OBS	ESP	OBS	ESP	OBS	ESP	OBS	ESP	OBS	ESP	OBS	ESP	OBS	ESP	OBS	ESP
Días/(Naci)	[0]		[1]		[1.5]		[2]		[2.5]		[3]		[3.5]		[4]		[4.5]		[5]	
0	1,90	0,36	1,90	0,66	1,90	0,83	1,90	3,03	2,10	3,04	2,00	0,53	2,00	0,78	2,00	0,50	2,60	0,99	2,50	1,27
1	2,00	0,92	2,00	1,33	2,10	1,47	1,90	3,70	2,20	3,80	1,60	0,75	1,90	1,30	1,60	0,68	1,50	1,16	1,30	1,41
2	3,10	2,21	2,30	2,64	2,80	2,57	2,30	4,50	2,20	4,72	1,90	1,06	3,90	2,14	2,00	0,94	1,40	1,36	1,30	1,56
3	5,10	5,14	4,50	5,11	4,50	4,44	4,50	5,45	2,70	5,86	2,00	1,50	5,60	3,48	2,10	1,28	1,20	1,59	1,50	1,72
4	12,00	11,12	9,60	9,39	8,80	7,45	5,80	6,60	3,90	7,23	2,20	2,09	7,00	5,52	2,60	1,73	1,70	1,85	1,60	1,90
5	20,10	21,08	16,30	15,85	11,30	11,99	5,90	7,96	6,30	8,88	2,90	2,90	9,90	8,44	2,60	2,33	1,90	2,16	2,00	2,09
6	31,90	33,19	23,50	23,85	18,70	18,14	8,70	9,55	11,30	10,84	3,70	3,99	12,60	12,29	3,00	3,09	2,30	2,53	2,10	2,29
7	45,50	43,31	31,00	31,82	26,50	25,41	11,50	11,42	15,80	13,13	5,00	5,40	14,90	16,82	3,50	4,04	2,70	2,95	2,50	2,51
8	48,90	49,44	38,80	37,60	31,20	32,72	15,70	13,57	18,60	15,77	6,40	7,20	17,20	21,52	4,40	5,17	2,90	3,45	2,60	2,75
9	52,60	52,48	40,80	41,41	39,20	38,97	17,20	16,03	20,50	18,75	8,60	9,38	25,00	25,76	5,00	6,49	3,40	4,03	2,70	3,00
10	55,70	53,80	48,80	43,57	43,20	43,81	19,40	18,79	24,80	22,04	10,40	11,92	29,10	29,17	5,90	7,94	4,50	4,71	3,30	3,26
11	52,00	54,36	43,70	44,70	48,40	46,71	26,30	21,86	29,40	25,60	14,30	14,72	34,30	31,64	11,00	9,48	6,50	5,50	3,40	3,53
12					49,00	48,84	28,30	25,21	30,10	29,36	21,50	17,81	37,60	33,30	11,90	10,96	7,00	6,42	4,00	3,82
13					49,00	49,78	29,20	26,80	32,70	33,21	22,40	20,43	37,80	34,37	13,40	12,38	7,80	7,50	4,10	4,12
14					49,70	50,44	31,20	32,56	37,80	37,06	32,70	23,02	38,00	35,04	14,10	13,84	8,50	8,76	5,20	4,42
15					49,50	50,82	32,40	36,43	38,10	40,81	30,60	25,26	37,90	35,45	15,70	14,72	10,30	10,23	5,00	4,74
16					53,10	51,03	36,10	40,34	41,00	44,38	30,20	27,12	37,90	35,69	18,60	15,61	11,60	11,95	4,80	5,05
17					50,60	51,15	36,29	44,19	43,00	47,64	29,20	28,59	35,00	35,84	21,60	15,80	13,10	13,95	5,10	5,38
18							32,20	47,90	40,00	50,80	24,10	29,72	22,70	35,92			15,70	16,29	5,80	5,70
19											23,00	30,57					15,20	19,02	5,80	6,02
20											22,60	31,2					15,20	22,20	6,40	6,33
n	12		12		18		19		19		21		19		16		21		21	
r	0,90		0,72		0,59		0,21		0,23		0,40		0,53		0,39		0,16		0,12	
r ²	0,83		0,65		0,92		0,96		0,92		0,90		0,80		0,90		0,92		0,92	

TABLA 9: Velocidad de crecimiento (K) y tiempo de generación (Td), durante la fase exponencial, densidad celular final a diferentes concentraciones de NaCl (0, 1, 1,5, 3, 3,5, 4M) de Dunaliella salina de las Salinas de los Chimus, evaluadas por conteos en cámara de Newbahuer.

[ClNa] (M)	SALINIDAD (‰)	K (div/días)	Td (horas/div)	DENSIDAD CELULAR* (10 ³ cels/ml)
0	35,00	1,53	15,69	6665,00
1,00	58,44	0,78	30,77	611,70
1,50	87,66	0,67	35,82	1100,00
3,00	175,32	0,44	54,55	144,20
3,50	204,54	0,79	30,38	233,35
4,00	233,76	0,55	43,64	25,00

*Ultimo día de la fase exponencial, después de la inoculación. Densidad celular inicial promedio $1,5 \times 10^4$ cels/ml.

TABLA 10: Velocidad de crecimiento (K) y tiempo de generación (Td), durante la fase exponencial, densidad celular final a diferentes concentraciones de NaCl (0, 1, 1,5, 3, 3,5, 4M) de Dunaliella salina de las Salinas de los Chimus, evaluadas por lecturas en espectrofotómetro.

[ClNa] (M)	SALINIDAD (‰)	K (div/días)	Td (horas/div)	DENSIDAD CELULAR* (%)
0	35,00	0,94	25,53	46,78
1,00	58,44	0,65	36,92	9,00
1,50	87,66	0,83	28,92	23,00
3,00	175,32	0,33	72,73	8,30
3,50	204,54	0,45	53,33	22,20
4,00	233,76	0,29	82,76	4,80

*Ultimo día de la fase exponencial, después de la inoculación. Porcentaje celular inicial promedio 1,9 %.

TABLA 11: Velocidad de crecimiento (K) y tiempo de generación (Td), durante la fase exponencial, densidad celular final a diferentes concentraciones de NaCl (0, 1, 1,5, 3, 3,5, 4M) de Dunaliella salina de las Salinas de Chilca, evaluadas por conteos en cámara de Newbauer.

[CINa] (M)	SALINIDAD (‰)	K (div/días)	Td (horas/div)	DENSIDAD CELULAR* (10 ³ cels/ml)
0	35,00	1,02	23,53	3176,70
1,00	58,44	0,60	40,00	3148,30
1,50	87,66	0,42	57,14	2455,00
3,00	175,32	0,40	60,00	1090,00
3,50	204,54	0,78	30,77	325,00
4,00	233,76	0,47	51,06	137,20

*Ultimo día de la fase exponencial, después de la inoculación. Densidad celular inicial promedio $1,5 \times 10^4$ cels/ml.

TABLA 12: Velocidad de crecimiento (K) y tiempo de generación (Td), durante la fase exponencial, densidad celular final a diferentes concentraciones de NaCl (0, 1, 1,5, 3, 3,5, 4M) de Dunaliella salina de las Salinas de Chilca, evaluadas por lecturas en espectrofotómetro.

[CINa] (M)	SALINIDAD (‰)	K (div/días)	Td (horas/div)	DENSIDAD CELULAR* (%)
0	35,00	0,79	30,38	45,50
1,00	58,44	0,56	42,86	31,00
1,50	87,66	0,43	55,81	39,20
3,00	175,32	0,40	60,00	6,40
3,50	204,54	0,60	40,00	25,00
4,00	233,76	0,40	60,00	13,40

*Ultimo día de la fase exponencial, después de la inoculación. Porcentaje celular inicial promedio 1,9 %.

TABLA 13: Tolerancia a la salinidad y tasa de crecimiento instantáneo(r) de Dunaliella salina de las Salinas de los Chimus, a diferentes concentraciones de NaCl, evaluadas en cámara de Newbahuer y en espectrofotómetro.

[CINa] (M)	CAMARA DE NEWBAHUER		ESPECTROFOTOMETRO	
	(r)	(cels/ml) max	(r)	(%) max.
0	1,78	9100,00	0,82	64,50
1,00	0,64	3698,30	0,64	49,50
1,50	0,40	4603,35	0,50	56,40
2,00	0,38	1876,65	0,39	30,00
2,50	0,37	841,65	0,22	18,70
3,00	0,46	395,00	0,25	10,20
3,50	0,70	1026,00	0,30	28,30
4,00	0,21	63,35	0,14	3,80
4,50	0,18	159,65	0,08	9,00
5,00	0,14	110,00	0,07	6,00

TABLA 14: Tolerancia a la salinidad y tasa de crecimiento instantáneo(r) de Dunaliella salina de las Salinas de Chilca, a diferentes concentraciones de NaCl, evaluadas en cámara de Newbahuer y espectrofotómetro.

[CINa] (M)	CAMARA DE NEWBAHUER		ESPECTROFOTOMETRO	
	(r)	(cels/ml) max	(r)	(%) max.
0	1,50	4456,65	0,90	55,70
1,00	0,84	3827,50	0,72	48,80
1,50	0,41	4025,00	0,59	53,10
2,00	0,25	2903,30	0,21	36,29
2,50	0,25	3648,35	0,23	45,60
3,00	0,40	1231,65	0,40	32,70
3,50	0,63	1369,35	0,53	38,00
4,00	0,37	553,30	0,33	21,60
4,50	0,33	384,20	0,16	15,70
5,00	0,16	123,35	0,12	6,40

(cels/ml)max= máxima densidad celular durante el crecimiento.

(%)max= máximo porcentaje de crecimiento.

(r)= Tasa de crecimiento instantáneo.

TABLA 15: Resultado del análisis de regresión potencial, para Dunaliella salina de las SALINAS DE LOS CHIMUS y de las SALINA DE CHILCA, con su respectiva conversión de unidades para cada estación. Los números de observaciones corresponden a los datos obtenidos en los conteos en cámara de Newbahuer (NB), como en espectrofotómetro (ES), por un período de 21 días, para las diferentes concentraciones de NaCl (1-5M) incluyendo la tratada con agua de mar solamente.

REGRESION POTENCIAL	SALINA DE LOS CHIMUS			SALINAS DE CHILCA		
	REGRESION	LOG		REGRESION	LOG	
Constante (K)	0,715334084	5,19199283		0,966760557	9,26318969	
Error Estándar Est Y	0,196937351			0,220350444		
R cuadrado	0,941709731	0,9704173		0,920891083	0,9596307	
N° de Observaciones	210			210		
Grados de Libertad	208			208		
Coeficiente(s) X	1,711895337			1,464018625		
Error Estándar de Coef.	0,029531468			0,029752504		
CONVERSION DE UNIDADES	$Y = a \cdot x^b$ $U(NB) = (K) \cdot (X) \wedge U(ES)$ $U(NB) = 5,1919928 \cdot (1,7118953) \wedge U(ES)$			$Y = a \cdot x^b$ $U(NB) = (K) \cdot (X) \wedge U(ES)$ $U(NB) = 9,26318969 \cdot (1,46401863) \wedge U(ES)$		

TABLA 16: Medio Johnson modificado (J/1), (BOROWITZKA, 1988).

Macronutrientes	requerimiento
NaCl	262,98 g.l ⁻¹
MgCl ₂ .6H ₂ O	1,5 g.
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 "
KCl	0,2 "
KNO ₃	1,0 "
NaHCO ₃	0,043"
KH ₂ PO ₄	0,035"
Solución de Fierro*	10,0 ml.
Trazas de metales*	10,0 "

*Solución de Fierro	mg. ⁻¹ .
NaEDTA	189,0
FeCl ₃ .6H ₂ O	244,0
Autoclavar por 15' a 15 libras de presión y 120°C.	

*Trazas de Metales	mg. ⁻¹ .
H ₃ BO ₃	61,0
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	38,0
CuSO ₄ .5H ₂ O	6,0
CoCl ₂ .6H ₂ O	5,1
ZnCl ₂	4,1
MnCl ₂ .4H ₂ O	4,1

Se utilizó **NaCl** (QP), en concentraciones de acuerdo al esquema siguiente, adicionando al agua de mar, para 1 litro:

Molaridad (M)	g. de ClNa
0,0	----
1,0	58,44
1,5	87,68
2,0	116,88
2,5	146,12
3,0	175,32
3,5	204,56
4,0	233,92
4,5	263,00
5,0	292,20