UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA PESQUERA

DETERMINACIÓN DE LA PRODUCTIVIDAD DE LA MICROALGA *Chaetoceros gracilis* CULTIVADA CON FERTILIZANTES INORGÁNICOS Y EL MEDIO F/2 GUILLARD

TESIS

PRESENTADO POR:

LUZ MARINA MAMANI CONDORI

Para optar el Título Profesional de:

INGENIERO PESQUERO

MOQUEGUA-PERÚ

2018

ESCUELA PROFESIONAL
INGENIERIA PESQUERA

ACTA DE SUSTENTACIÓN

El jurado suscribiente, ha calificado el trabajo de TESIS:

TITULADO: **" DETERMINACION DE LA PRODUCTIVIDAD DE LA MICRO ALGA CHAETOCEROS GRACILIS CULTIVADA CON FERTILIZANTES INORGANICOS Y EL MEDIO F/2 GUILLARD"**

.....

PRESIDENTE: DRA. SHEDA MENDEZ ANCCA

PRIMER MIEMBRO: ING.PEDRO ISIDORO MADUEÑO MAMANI

SEGUNDO MIEMBRO : ING. ELVIS ALBERTO PAREJA GRANDA

Presentado por el (la) Bachiller:

LUZ MARINA MAMANI CONDORI

Participando en calidad de asesor (es): WALTER MERMA CRUZ

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA
CERTIFICA: Que el presente documento ES COPIA FIEL DEL ORIGINAL al que me remito para los fines pertinentes.
Moquegua 20 JUN. 2019
CP. Deisy Raquel Chipana Begazo
FEDATARIO ADSCRITO

Después de las preguntas respectivas y habiendo el jurado tomado el tiempo para la deliberación de la misma.

SE DECLARA .....APROBADA.....(APROBADO/DESAPROBADO) por.....UNANIMIDAD.....(UNANIMIDAD/MAYORÍA), con el calificativo de .....BUENO.....(EXCELENTE/MUY BUENO/BUENO/REGULAR/DEFICIENTE), equivalente a .....14..... ., quedando expedito para que se le confiera el Título Profesional de .....Ing. Pesquero.....

Ilo, 20 de diciembre del 2018.

DRA. SHEDA MENDEZ ANCCA
Presidente de Jurado

ING. PEDRO ISIDORO MADUEÑO MAMANI
1ER. MIEMBRO

ING. ELVIS ALBERTO PAREJA GRANDA
2do. Miembro

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA PESQUERA

TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO PESQUERO

DETERMINACIÓN DE LA PRODUCTIVIDAD DE LA MICROALGA *Chaetoceros gracilis* CULTIVADA CON FERTILIZANTES INORGÁNICOS Y EL MEDIO F/2 GUILLARD

Tesis sustentado y aprobado el .....de ..... del 2018; estando el jurado calificador y asesor integrado por:

PRESIDENTE : .....
Dr. Sheda Mendez Annca

1ER MIEMBRO : .....
Ing. Pedro Isidoro Madueño Mamani

2DO MIEMBRO : .....
Ing. Elvis Alberto Pareja Granda

ASESOR : .....
Dr. Walter Merma Cruz

DEDICATORIA

A mis padres Dionisio y Yolanda por darme la vida y su confianza.

A mis hermanos David y Deisy por su apoyo en todo momento.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de Moquegua por acogerme en sus aulas, por la formación profesional.

A los Docentes de la Universidad Nacional de Moquegua por sus enseñanzas y conocimientos.

Al Dr. Walter Merma Cruz, por sus valiosos aportes y asesoramiento en la ejecución del trabajo de investigación.

RESUMEN

El presente trabajo de investigación consistió en el cultivo de la microalga marina *Chaetoceros gracilis* con tres tipos de fertilizantes inorgánicos agrícolas y el medio F/2 Guillard, en condiciones de laboratorio en la Universidad Nacional de Moquegua Filial Ilo, con la finalidad de determinar la productividad expresada en densidad celular (cel/ml). Los experimentos se realizaron en botellas PET de 5 litros, utilizando el medio de cultivo Guillard F/2 como control (T1) y los fertilizantes inorgánicos Kelpway en solución 10 ml/L (T2), Panteranitro en solución de 10 ml/L (T3) y Bayfolan en solución 10 ml/L (T4), cada tratamiento con tres réplicas. Del análisis de los resultados del estudio se observó que existen diferencias a un nivel de significancia de 5% en la cuantificación de las densidades celulares entre los T1 (control) y los tratamientos T2 y T3, sin embargo no se encontró diferencias a un nivel de significancia de 5% entre el T1 y T4. Encontrándose las mayores concentraciones celulares a los 5 días de cultivo con el fertilizante inorgánico Bayfolan (T4) con 1.75 x 10^6 cel/ml, seguido del medio F/2 Guillard (T1) con 1.60 x 10^6 cel/ml), fertilizante inorgánico Panteranitro (T3) con 8.50 x 10^5 cel/ml) y finalmente el fertilizante inorgánico Kelpway (T2) con3.93 X 10^5 cel/ml), éstos resultados demuestran que el fertilizante inorgánico agrícola Bayfolan (T4) puede usarse para el cultivo de *Chaetoceros gracilis.*

Palabras clave: Densidad celular, fertilizantes inorgánicos, microalgas, productividad

ABSTRACT

The present research work consisted of the cultivation of the marine microalga Chaetoceros gracilis with three types of inorganic agricultural fertilizers and the medium F / 2 Guillard, under laboratory conditions at the National University of Moquegua Ilo Subsidiary, in order to determine the productivity expressed in cell density (cel / ml). The experiments were carried out in 5 liter PET bottles, using Guillard F / 2 culture medium as control (T1) and Kelpway inorganic fertilizers in solution 10 ml / L (T2), Panteranitro in solution of 10 ml / L (T3)) and Bayfolan in solution 10 ml / L (T4), each treatment with three replicas. From the analysis of the results of the study it was observed that there are differences at a level of significance of 5% in the quantification of cell densities between T1 (control) and treatments T2 and T3, however no differences were found at a level of 5% significance between T1 and T4. The highest cell concentrations were found after 5 days of cultivation with the inorganic fertilizer Bayfolan (T4) with 1.75 x 106 cells / ml, followed by the medium F / 2 Guillard (T1) with 1.60 x 106 cells / ml), inorganic fertilizer Panteranitro (T3) with 8.50 x 105 cells / ml) and finally the inorganic fertilizer Kelpway (T2) with 3.93 X 105 cells / ml), these results show that the agricultural inorganic fertilizer Bayfolan (T4) can be used for the cultivation of Chaetoceros gracilis.

Key words: Cell density, inorganic fertilizers, microalgae, productivity

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN 1
CAPÍTULO I 2
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 2
1.1. DESCRIPCIÓN DE LA REALIDAD PROBLEMÁTICA 2
1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA 4
1.2.1. INTERROGANTE GENERAL 4
1.3. JUSTIFICACIÓN 5
1.4. OBJETIVOS 6
1.4.1. OBJETIVO GENERAL 6
1.4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 6
1.4.3. HIPÓTESIS 7
CAPÍTULO II 8
MARCO TEÓRICO 8
2.1. ANTECEDENTES DEL ESTUDIO 8
2.2. BASES TEÓRICAS 11
2.2.1. MICROALGAS 11
2.2.2. MEDIOS DE CULTIVO 13
2.2.2.1. MEDIO DE CULTIVO F/2 GUILLARD 15
2.2.2.2. FERTILIZANTE INORGÁNICO KELPWAY – TECNOLOGIA DE ALGAS S.A. 18
2.2.2.3. FERTILIZANTE INORGÁNICO PANTERANITRO – ARIS INDUSTRIAL S.A. 20
2.2.2.4. FERTILIZANTE INORGÁNICO BAYFOLAN - BAYER 22
2.2.3. CULTIVO DE LAS MICROALGAS 23
2.2.4. REQUERIMIENTOS PARA EL DESARROLLO DE MICROALGAS 24
2.2.4.1. Nitrógeno 24
2.2.4.2. Fósforo 25

2.2.4.3. Azufre 25
2.2.4.4. Magnesio 25
2.2.4.5. Calcio 26
2.2.4.6. Hierro 26
2.2.4.7. Cloro 27
2.2.4.8. Manganeso 27
2.2.4.9. Cobre 27
2.2.4.10. Molibdeno 28
2.2.4.11. Carbono, oxígeno e hidrógeno 28
2.2.4.12. Potasio 28
2.2.4.13. Zinc 28
2.2.4.14. Sodio 29
2.2.4.15. Boro 29
2.2.5. CONDICIONES NECESARIAS PARA EL CULTIVO DE MICROALGAS 30
2.2.5.1. Luz 30
2.2.5.2. Temperatura 30
2.2.5.3. Nutrientes 31
2.2.5.4. Agitación 31
2.2.5.5. Dióxido de carbono 31
2.2.5.6. Salinidad 32
2.2.5.7. Limpieza 32
2.2.6. *Chaetoceros gracilis* 32
2.2.6.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *Chaetoceros gracilis* 33
2.3. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS 34
2.3.1. Microalgas 34
2.3.2. Densidad celular 34
2.3.3. Oligoelemento 34
2.3.4. Quelatado 35
2.3.5. UPS 35

2.3.6. ARN 35
2.3.7. ADN 35
2.3.8. pH 36
2.3.9. Fertilizante foliar 36
2.3.10. Reactivo 1 36
2.3.11. Reactivo 2 36
2.3.12. Reactivo 3 36
2.3.13. Reactivo 4 36
CAPITULO III 37
MARCO METODOLÓGICO 37
3.1. TIPO Y DISEÑO 37
3.1.1. Tipo de investigación 37
3.1.2. Diseño de investigación 37
3.2. NIVEL DE INVESTIGACIÓN 38
3.3. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES 38
3.3.1. Variables independientes 38
3.3.2. Variables dependientes 38
3.4. POBLACIÓN Y MUESTRA 39
3.4.1. POBLACIÓN 39
3.4.2. MUESTRA 39
3.5. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS 40
3.5.1. TÉCNICAS 40
3.5.1.1. LUGAR DE ESTUDIO 40
3.5.1.2. TRATAMIENTOS 41
3.5.1.3. PREPARACIÓN DEL MEDIO DEL CULTIVO F/2 GUILLARD 43
3.5.1.4. CULTIVO DE LA MICROALGA *Chaetoceros gracilis* 47
3.5.1.5. DENSIDAD CELULAR 50
3.6. INSTRUMENTOS PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS 53

3.7. MÉTODOS Y TÉCNICAS PARA LA PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE DATOS 53
CAPÍTULO IV 56
RESULTADOS 56
4.1. Productividad de la microalga *Chaetoceros gracilis* cultivada con el medio F/2 Guillard 56
4.2. Productividad de la microalga *Chaetoceros gracilis* cultivada con el fertilizante inorgánico Kelpway 58
4.3. Productividad de la microalga *Chaetoceros gracilis* cultivada con el fertilizante inorgánico Panteranitro 61
4.4. Productividad de la microalga *Chaetoceros gracilis* cultivada con el fertilizante inorgánico Bayfolan 64
4.5. Comprobacion de la Hipótesis y Análisis de los Resultados 67
4.5.1. Análisis de Varianza 67
4.5.2. Comprobaciones múltiples-HDS Tukey 68
DISCUSIONES 71
CONCLUSIONES 73
RECOMENDACIONES 75
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS 76
ANEXOS 81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Fertilizante inorgánico Kelpway……..……..19
Figura 2: Fertilizante inorgánico Panteranitro……..21
Figura 3 : Fertilizante inorgánico Bayfolan……...23
Figura 4: Reactivo 1……43
Figura 5: Reactivo 2……44
Figura 6: Reactivo 3……45
Figura 7 : Reactivo 4 ……..46
Figura 8: Sistema de cultivo de *Chaetoceros gracilis*……..49
Figura 9: Cámara de Neubauer……50
Figura 10 : Zonas de conteo de la cámara de Neubauer…… 52
Figura 11: Crecimiento de *Chaetoceros gracilis* con F/2 Guillard ……...57
Figura 12: Cultivo de *Chaetoceros gracilis* con medio F/2 Guillard – 5L…... 58
Figura 13: Crecimiento de *Chaetoceros gracilis* con Kelpway ……59
Figura 14: Cultivo de *Chaetoceros gracilis* con fertilizante inorgánico Kelpway-5L…….. 61
Figura 15: Crecimiento de *Chaetoceros gracilis* con Panteranitro……...62
Figura 16: Cultivo de *Chaetoceros gracilis* con fertilizante inorgánico Panteranitro-5L……63
Figura 17: Crecimiento de *Chaetoceros gracilis* con Bayfolan……65
Figura 18: Cultivo de *Chaetoceros gracilis* con fertilizante inorgánico Bayfolan – 5L ……66
Figura 19: Crecimiento de *Chaetoceros gracilis* con fertilizante inorgánicos y el medio F/2 Guillard……70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Fases de crecimiento de microalgas……..12
Tabla 2: Preparación de macronutrientes del medio F/2 Guillard ……....16
Tabla 3: Preparación de micronutrientes del medio F/2 Guillard ……16
Tabla 4: Preparación de vitaminas del medio F/2 Guillard ……....17
Tabla 5: Preparación de reactivo 4 ……...17
Tabla 6: Preparación del medio de cultivo F/2 Guillard ……18
Tabla 7: Composición de Kelpway ……....19
Tabla 8: Composición de Panteranitro…….……..21
Tabla 9: Composición de Bayfolan……22
Tabla 10: Microalgas cultivadas en IMARPE ILO……....24
Tabla 11: Tratamientos……42
Tabla 12: Tratamientos y réplicas……...55
Tabla 13: Crecimiento de Chaetoceros gracilis con medio F/2 Guillard ……56
Tabla 14: Crecimiento de Chaetoceros gracilis con Kelpway …….……..59
Tabla 15: Crecimiento de Chaetoceros gracilis con Panteranitro ……....62
Tabla 16: Crecimiento de Chaetoceros gracilis con Bayfolan ……..64
Tabla 17: Análisis de varianza……67
Tabla 18: Comparaciones múltiples – HDS Tukey ……68
Tabla 19: Resultados generales de los tratamientos……..69

INTRODUCCIÓN

Las microalgas cumplen una función fundamental en el desarrollo de la acuicultura, debido a que constituyen el alimento vivo en las primeras fases del desarrollo de los organismos acuáticos en cultivo, son altamente nutritivas y de fácil ingesta dado el tamaño que tienen (Band, 2008).

Con la finalidad de realizar un aporte al desarrollo de la acuicultura en la región y el país, el presente estudio explora la posibilidad del uso de fertilizantes inorgánicos agrícolas para la producción de la microalga marina *Chaetoceros gracilis* en condiciones de laboratorio, como alternativa al medio de cultivo F/2 Guillard generalmente usado en el cultivo de microalgas, considerando que los fertilizantes inorgánicos agrícolas están disponibles en el mercado local y son económicamente más accesibles en relación al medio F/2 Guillard.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. DESCRIPCIÓN DE LA REALIDAD PROBLEMÁTICA

Para el desarrollo de la acuicultura como una actividad sostenible, uno de los factores que puede limitar es la producción de alimentos que cubran las necesidades y requerimientos para las especies de interés en cultivo y que sean costeables.

En la acuicultura las microalgas son usadas como alimento vivo para el cultivo de moluscos, para los estadios larvales de crustáceos y algunas especies de peces y en la producción de zooplancton (Prieto et. al; 2005).

Microalgas más utilizados en la alimentación de organismos acuáticos son del género: *Chlorella, Nannochloropsis, Tetraselmis,*

Thalassiosira, Dunaliella, Rhodomonas, Chaetoceros, Pavlova, Isochrysis y Nitzschia (Wikfors & Ohno, 2001).

La producción de microalgas como alimento vivo requiere de compuestos químicamente puros, los mismos que tienen un costo alto, en la acuicultura principalmente en la fase de hatchery. Teniendo en cuenta estas consideraciones, se han desarrollado técnicas de bajo costo, que plantean para la producción de microalgas con el empleo de fertilizantes agrícolas (Uribe, 1994).

El alto costo y la dificultad para la adquisición en el mercado local de los medios de cultivo tradicionales como el medio F/2 Guillard usados para la producción masiva de microalgas plantean la necesidad de usar medios de cultivo alternativos como los fertilizantes inorgánicos agrícolas que generalmente son de bajo costo y se encuentran disponibles en el mercado local podrían ser usados para la producción de microalgas como alimento vivo para el desarrollo de la acuicultura en nuestra región. En este contexto el presente trabajo de investigación plantea determinar la productividad de la microalgas *Chaetoceros gracilis* cultivada con tres diferentes fertilizantes inorgánicos agrícolas.

1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Las microalgas son fundamentales como alimento vivo en la acuicultura y lograr producir a un costo asequible es de vital importancia, si se desea desarrollar una acuicultura sostenible, teniendo en cuenta que las microalgas se cultivan tradicionalmente usando el medio de cultivo F/2 guillard, el presente trabajo de investigación pretende el cultivo de la *Chaetoceros gracilis* con tres tipos de fertilizantes inorgánicos agrícolas en comparación con el medio de cultivo F/2 Guillard, sin embargo se desconoce la productividad de *Chaetoceros gracilis* en cultivo con fertilizantes inorgánicos comerciales, con la finalidad de obtener las mayor cantidad posible de concentraciones celulares logrando disminuir los costos de producción.

1.2.1. INTERROGANTE GENERAL

¿Cuál es la productividad de la microalga *Chaetoceros gracilis* cultivada con fertilizantes inorgánicos y el medio F/2 Guillard?

1.3. JUSTIFICACIÓN

El alimento vivo como el fitoplancton y zooplancton es fundamental para el desarrollo larvario de crustáceos, moluscos y peces (Torrentera & Tacon, 1989).

Las microalgas nutricionalmente son fuente de macronutrientes, vitaminas y elementos traza; en el medio acuático son fuente proteínas, carbohidratos y, principalmente de ácidos grasos (Smith et al., 1993).

En la producción de microalgas una opción es el empleo de fertilizantes agrícolas comerciales; especialmente cuando se trabaja con volúmenes grandes de biomasa, pues estos son económicos y contienen en su composición macronutrientes, micronutrientes y vitaminas necesarios para el desarrollo de las microalgas (Richmond, 1999).

El medio F/2 Guillard es usado tradicionalmente para producción de microalgas especialmente como alimento vivo para la alimentación de organismos acuáticos en acuicultura, es costoso y no se encuentra en el mercado Local, lo que encarece la producción de las

microalgas que son usados en la acuicultura, sin embargo los fertilizantes agrícolas están disponibles en el mercado local y a un costo relativamente bajo, con lo que el presente trabajo de investigación contribuirá a la producción de microalgas *Chaetoceros gracilis* disminuyendo los costos, en beneficio del desarrollo de la acuicultura para la región y el país.

1.4. OBJETIVOS

1.4.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la productividad de la microalga *Chaetoceros gracilis* cultivada con fertilizantes inorgánicos y el medio F/2 Guillard.

1.4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Determinar la productividad de la microalga *Chaetoceros gracilis* cultivada con el medio F/2 Guillard.

- ✓ Determinar la productividad de la microalga *Chaetoceros gracilis* cultivada con el fertilizante agrícola comercial Kelpway.

- ✓ Determinar la productividad de la microalga *Chaetoceros gracilis* cultivada con el fertilizante agrícola comercial Panteranitro.

- ✓ Determinar la productividad de la microalga *Chaetoceros gracilis* cultivada con el fertilizante agrícola comercial Bayfolan

1.4.3. HIPÓTESIS

No existe diferencias en la productividad de la microalga *Chaetoceros gracilis* cultivada con fertilizantes inorgánicos y el medio F/2 Guillard.

H_0 : T1=T2=T3=T4, en el diseño completamente al azar (DCA), la hipótesis nula es que los efectos de tratamientos son todos iguales.

H_a : al menos un tratamiento es diferente de los demás.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES DEL ESTUDIO

Ortega-Salas & Reyes-Bustamante (2012), cultivaron las microalgas dulceacuícolas *Kirchneriella obesa, Scenedesmus quadricauda* y *Chlorococcum infusorium*, con el propósito comparar las tasas de crecimiento y su rendimiento en tres medios de cultivo, el F/2 de Guillard, Fert I y Fert II. Cada 24 h se obtuvieron tres muestras de 1 a 10 ml del cultivo, se preservaron en una solución de lugol y se calculó la concentración de las microalgas cada 24 h. El número total de células de las tres especies aumentó de manera exponencial hasta el final de los experimentos en los medios de cultivo F/2 Guillard y Fert I; ésto no fue así con el medio Fert II, en el cual la tasa de duplicación y el número total de divisiones fueron más bajas. El medio F/2 y el Fert I ofrecieron mejores resultados que el Fert II. Los medios Fert I y Fert II tienen un valor económico más bajo que el medio F/2. El crecimiento y el rendimiento fueron mejores con el medio F/2, seguido por FI y FII.

Silva-Benavides (2014), realizó la investigación denominado "Evaluación de fertilizantes agrícolas en la productividad de la microalga *Chlorella sorokiniana*", con el objetivo de evaluar la productividad de la microalga verde *Chlorella sorokiniana* UTEX 1230 con fertilizantes foliares usados en la agricultura y la comparación con el medio nutritivo Kolwitz (K3). Con cada fertilizante se diseñaron los siguientes tratamientos:

1) NPK 20-20-20 (1,00 g/l) + 0,27 g/l MgSO4.7H2O

2) NPK 22-10-7 (+2 MgO) (1,00 g/l) + 0,27 g/l MgSO4.7H2O

3) NPK 22-10-7 (+2 MgO) (1,00 g/l)

4) NPK 20-20-20 (1,00 g/l)

Utilizó el medio nutritivo Kolwitz (K3) como control. Las mayores concentraciones celulares, productividad, clorofila, fluorescencia, proteínas y carbohidratos, se cuantificaron en los medios provistos de sulfato de magnesio (NPK 20-20-20 (1,00 g/l) + 0,27 g/l MgSO4.7H2O, y NPK 22-10-7 (+2 MgO) (1,00 g/l) + 0,27 g/l MgSO4.7H2O). Los menores crecimientos de la biomasa se observaron en los tratamientos carentes de este compuesto. El sulfuro y el magnesio tuvieron efecto positivo en el crecimiento y rendimiento del cultivo; así como las cantidades de urea y amonio en la composición química del fertilizante.

Panta, Macay, Moncayo y Vélez (2016), evaluaron el crecimiento de dos especies de microalgas *Chaetoceros gracilis* e *Isochrysis galbana*, con dos tipos de fertilizantes agrícolas, en condiciones de laboratorio, con la finalidad de determinar la densidad celular (cel/mL), y otros parámetros de cada especie. Los bioensayos se realizaron en tubos de ensayos de 20 ml y botellas de 500 ml y 1 000 ml utilizando el medio de cultivo Guillard F/2 como control (T1) y los fertilizantes agrícolas Complefol -solución Complefol 5 g/L (T2), y solución Complefol 10 g/L (T3) y Stimufol -solución Stimufol 5 g/L (T4) y solución 10 g/L (T5)-, cada uno con tres réplicas. Durante el estudio no observaron diferencias significativas en las densidades celulares, observaron que las mayores densidades celulares, se obtuvieron en el medio Guillard/F2, seguido del Stimufol, lo que demuestra que los fertilizantes agrícolas son una alternativa adecuada para usarse en el cultivo de microalgas, en particular el Stimufol, con mayores rendimientos en comparación con Complefol.

2.2. BASES TEÓRICAS

2.2.1. MICROALGAS

Las microalgas son organismos unicelulares fotosintéticos y eucariotas, son productores primarios en la cadena trófica, por su tamaño de 5 y 50µm, son fácilmente digeribles por una gran variedad de organismos cuya principal fuente alimenticia es el fitoplacton, son lo coloración verdosa debido a que poseen clorofila y la luz es fundamental para que puedan desarrollarse y producir materia orgánica (Candela, 2016).

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos y de rápido crecimiento, poseen elevado contenido de lípidos y con mayor capacidad de fijación de CO_2 (Yusuf Chisti, 2007).

La denominación de microalgas agrupa a los microorganismos unicelulares que realizan el proceso de fotosíntesis. Dentro de este grupo se encuentran las microalgas eucariotas (verdes, doradas y rojas) y las cianobacterias (microalgas verdeazuladas) (Ruiz, 2011).

Tabla 1: Fases de crecimiento de microalgas

Fase	Duración	Características
Inducción	1-3 días	Comienza la absorción de nutrientes por parte de las células, además del proceso de adaptación al medio ambiente en el que se han desarrollado. En este estado, las células no tienden a dividirse, debido a que no existe todavía un contexto apropiado para este proceso, pues aún es necesario que se den ajustes en cuanto a las condiciones bioquímicas de los cultivos.
Exponencial	4 días	Se inicia cuando las células ya han logrado adaptarse, por lo que se multiplicarán. Durante la fase exponencial, la división celular es mucho más rápida que en el resto de fases.
Estacionaria		La población algal se vuelve constante, sin llegar a aumentar. Su duración tiende a ser demasiado corta como para ser perceptible.
Declinación relativa del crecimiento	1 - 2 días	Durante esta fase disminuye la división celular, pues se dan factores desfavorables en los cultivos, además de agotamiento de los nutrientes, desajustes en el pH, disminución de irradiaciones solares, entre otros.
Muerte		Por el aumento en el número de bacterias, hongos y espumas presentes en el cultivo, las condiciones comienzan a hacerse cada vez más desfavorables para el desarrollo de microalgas, Produciéndose la muerte del cultivo.

Fuente: Candela (2016)

2.2.2. MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo deben proveer los requerimientos necesarios para la especie que se desea cultivar en cuanto a agua, macro y micronutrientes, nitrógeno, un adecuado pH, en ciertos casos vitaminas y hormonas. Los compuestos químicos usados en la preparación deben ser de buena calidad. Las proporciones de nutrientes en el medio de cultivo son de mucha importancia para el desarrollo de las microalgas. Es necesario considerar que para que sean efectivos los medios de cultivo se debe precisar las cantidades que necesitan las microalgas para su desarrollo (Parra, 2015).

Para un buen desarrollo y crecimiento de las microalgas es necesario considerar un adecuado balance de macro y micronutrientes específicos. Una proporción inadecuada es decir un desbalance de nutrientes suministrados se manifiesta en descenso o detención del crecimiento (Romo, 2002).

Los macronutrientes son fuente de nitratos y fosfatos, para las diatomeas además se considera la adición de silicatos. Y los micronutrientes se consideran en pocas cantidades y trazas en relación a los macronutrientes. En soluciones alcalinas ciertos metales

precipitan en este caso se puede usar agentes quelantes como el EDTA (ácido etilen-diamino-tetrcetico) para mantener los metales en solución, haciéndolos disponibles para el cultivo de las microalgas. Algunos vitaminas son consideradas esenciales para el crecimiento de las microalgas (Romo, 2002).

Existe una diversidad grande de medios de cultivo, sin embargo todos coinciden en fuentes de nitrógeno, fósforo, metales traza con solución quelante y vitaminas (Romo, 2002).

Durante la producción de microalgas es muy importante seleccionar un medio de cultivo química y económicamente adecuado para su utilización en diferentes volúmenes de producción, cuando se trabaja en volúmenes grandes se puede usar fertilizantes de bajo costo que aseguren concentraciones celulares altas sumadas a una calidad nutricional alta para ser usado como alimento vivo (Gómez, Rodríguez y Subero (2011).

2.2.2.1. MEDIO DE CULTIVO F/2 GUILLARD

La composición química de las microalgas no es constante, especialmente las que se cultivan. Los niveles en su composición dependerán del tipo y contenido de nutrientes empleados en el medio de cultivo, de la condición de la cepa de microalga, de la iluminación, temperatura, calidad de agua empleada. Anormalidad en algunos de éstos factores variarán la composición química de las microalgas cultivadas (Álvarez, 1994).

Para el cultivo de microalgas marinas en la etapa de cepario e intermedio en medio de cultivo empleado es el Medio F/2 modificado (Guillard 1975), debido a que provee los requerimientos mínimos como macro y micronutrientes, vitaminas. En cultivo masivo se usa el Proline F/2 Algae Food Part A y Part B y adicionalmente metasilicato de sodio en caso de cultivo de diatomeas (Zevallos, 2010).

Tabla 2: Preparación de macronutrientes del medio F/2 Guillard

Macronutrientes (Reactivo 1)	g/L
KNO_3	75
NaH_2PO_4. 2 H_2O	5.65

Fuente: Zevallos (2010)

Tabla 3: Preparación de micronutrientes del medio F/2 Guillard

Micronutrientes (Reactivo 2)	g/L
EDTA Na_2	4.36
$FeCl_3$. 6 H2O	3.15
$CuSO_4$. 5 H_2O	0.01
$ZnSO_4$. 7 H_2O	0.022
$CoCl_2$. 6 H_2O	0.01
$MnCl_2$. 4 H_2O	0.18
Na_2MoO_4. 2 H_2O	0.006

Fuente: Zevallos (2010)

Tabla 4: Preparación de vitaminas del medio F/2 Guillard

Vitaminas (Reactivo 3)	g/L
Cyanocobalamina	0.002
Tiamina HCl	0.1
Biotina	0.001

Fuente: Zevallos (2010)

Tabla 5: Preparación del reactivo 4

Reactivo 4	ml/L
$Na_2SiO_3.5H_2O$	10
H_3ClO_4	5

Fuente: Zevallos (2010)

Ajustar a pH 8.0 con 1 M NaOH o HCl

Tabla 6: Preparación del medio de cultivo F/2 Guillard

	En 1 Litro de agua de mar
Reactivo 1	1.00 ml
Reactivo 2	1.00 ml
Reactivo 3	1.00 ml

Fuente: Zevallos (2010)

Para el cultivo de diatomeas adicionalmente agregar 1 ml/L de Reactivo 4.

2.2.2.2. FERTILIZANTE INORGÁNICO KELPWAY – TECNOLOGÍA DE ALGAS S.A.

Es un fertilizante líquido formulado con una fuente NPK (20-20-20) y microelementos quelatados. El extracto de algas cuenta con la presencia de compuestos bioactivos y cumple una función de carrier, potencializando la absorción y movilización de los nutrientes (Tecnología de Algas S.A., 2018).

Tabla 7: Composición de Kelpway

Componente	Concentración
ELEMENTOS MAYORES	
Nitrógeno Total	20%
Fósforo Disponible	20%
Potasio Soluble	20%
Extracto de Algas	10%
ELEMENTOS MENORES	
Hierro (Fe)	200 ppm
Manganeso (Mn)	200 ppm
Boro (B)	150 ppm
Cobre (Cu)	100 ppm
Zinc (Zn)	200 ppm
Molibdeno (Mo)	10 ppm
Cobalto (Co)	40 ppm

Fuente: Tecnología de Algas S.A. (2018)

Figura 1: Fertilizante inorgánico Kelpway



Fuente: Elaboración propia (2018)

2.2.2.3. FERTILIZANTE INORGÁNICO PANTERANITRO – ARIS INDUSTRIAL S.A.

Panteranitro es una fertilizante que aporta nitrógeno fácilmente asimilable para aplicación vía foliar y al suelo. Las cuatro fuentes de nitrógeno presentes amínico, nítrico, amoniacal y uréico, contribuyen a proporcionar una excelente fuente de nitrógeno al cultivo. Panteranitro estimula la división celular y la morfogénesis de órganos vegetativos como brotes laterales, ramas y hojas en las etapas de crecimiento más intensas en todos los cultivos. Panteranitro aporta también micronutrientes, los cuales ayudan a complementar la correcta formación del nuevo material vegetal de los cultivos. Panteranitro contiene Bio A Complex, el cual aumenta la absorción y transporte de nutrientes, además de ser un complejo bioestimulante completo (Aris industrial, 2018).

Tabla 8: Composición de Panteranitro

Componentes	Concentración
Nitrógeno(N)	200 g/L
Fosforo (P_2O_5)	100 g/L
Potasio (K_2O)	50 g/L
Magnesio (Mg)	500 mg/L
Zinc* (Zn)	300 mg/L
Manganeso* (Mn)	230 mg/L
Cobre (Cu)	460 mg/L
Boro (B)	122 mg/L
Molibdeno	3 mg/L

Fuente: Aris Industrial (2018)

*Totalmente quelatado con EDTA

Figura 2: Fertilizante inorgánico Panteranitro



Fuente: Elaboración propia (2018)

2.2.2.4. FERTILIZANTE INORGÁNICO BAYFOLAN - BAYER

Nutriente foliar multipropósito que además de aportar N, P y K aporta nutrientes, fitohormonas, vitaminas y regula el pH a neutro en el caldo de aspersión.

Tabla 9: Composición de Bayfolan

Componente	Concentración
ELEMENTOS MAYORES	
Nitrógeno total (N)	110 g/L
Anhídrido Fosfórico (P_2O_5)	80 g/L
Óxido de Potasio (K_2O)	60 g/L
ELEMENTOS MENORES	
Hierro (Fe)	190 mg/L
Manganeso (Mn)	162 mg/L
Boro (B)	102 mg/L
Cobre (Cu)	81 mg/L
Zinc (Zn)	61 mg/L
Molibdeno (Mo)	9 mg/L
Cobalto (Co)	3.5 mg/L
Vitaminas, Hormonas de crecimiento	4 ppm

Fuente: Bayer CropScience (2018)

Figura 3: Fertilizante inorgánico Bayfolan



Fuente: Elaboración propia (2018)

2.2.3. CULTIVO DE LAS MICROALGAS

Se cultivan y se usan en criaderos una diversidad amplia de especies de microalgas las más frecuentes son las diatomeas y flagelados. Estas microalgas son reconocidas por su fase de cultivo y valor nutricional elevado que presentan mundialmente (Zevallos, 2010).

Tabla 10: Microalgas cultivadas en IMARPE ILO

Grupo	Clase	Especie
Diatomeas	Bacillarophyceae	*Chaetoceros gracilis* *Chaetoceros muelleri (México)* *Phaeodactylum tricornutum(España)*
Flagelados	Prymnesiophyceae	*Isochrysis galbana var. Tahitiana* *Pavlova lutherii (Monochrysis lutherii)*
Verdes	Chlorophyceae	*Nannochloris maculata* *Nannochloropsis oculata*

Fuente: Zevallos (2010)

2.2.4. REQUERIMIENTOS PARA EL DESARROLLO DE MICROALGAS

Se describen los requerimientos principales para el desarrollo de las microalgas (Gonzales, 2000 y Lepez et al., 2003).

2.2.4.1. Nitrógeno

Constituyente de compuestos orgánicos como: proteínas, aminoácidos, coenzimas, clorofila y ácidos nucleicos, probablemente sea el componente de mayor importancia.

2.2.4.2. Fósforo

Componente de un gran número de compuestos orgánicos como ATP. Glucosa, fosfolípidos, ácidos nucleicos y algunas coenzimas, probablemente su función sea estructural y participa en la transferencia de energía.

2.2.4.3. Azufre

Constituyente de una gran numero de compuestos orgánicos como proteínas, aminoácidos, coenzima A, vitaminas como la tiamina y biotina, probablemente tenga función estructural y activa enzimas y coenzimas.

2.2.4.4. Magnesio

Constituyente esencial de la clorofila, requerido para la actividad de un gran número de coenzima, es importante para la estabilidad de la estructura de la ribosoma, probablemente

tenga función en los pigmentos fotosintéticos, transporte iónico, activación de enzimas y estabilidad ribosomal.

2.2.4.5. Calcio

Es importante por que influye en la permeabilidad de la membrana, se encuentra en las vacuolas precipitado como pectato cálcico u oxalato de cálcico en la pared celular, probablemente tenga función estructural, transporte iónico y en la activación de las enzimas.

2.2.4.6. Hierro

Es requerido en la síntesis de la clorofila, es componente del citocromo que cumple función como portador de electrones en la fotosíntesis y en la respiración, probablemente activa moléculas de coenzimas y porfirinas.

2.2.4.7. Cloro

En la fotosíntesis activa las enzimas para la síntesis de oxígeno a partir de agua.

2.2.4.8. Manganeso

En la síntesis de ácidos grasos participa en la activación de enzimas, en la formación de ARN y ADN activa la respectiva enzima responsable. Juega un papel importante en la producción oxígeno a partir de agua.

2.2.4.9. Cobre

Componente de algunas enzimas y actúa como portador de electrones, puede participar en la fijación de nitrógeno, probablemente participe en el transporte de electrones (fotosíntesis).

2.2.4.10. Molibdeno

Es portador de electrones durante la conversión de NH_4 a NO_3, y juega un papel fundamental en la fijación de nitrógeno, probablemente cumpla la función de reducción de nitrato.

2.2.4.11. Carbono, oxígeno e hidrógeno

Son componentes de todos los compuestos orgánicos.

2.2.4.12. Potasio

Probablemente participa en la regulación osmótica, conformación y estabilidad iónica y control de pH.

2.2.4.13. Zinc

Probablemente cumple una función estructural ribosomal, en el metabolismo de auxinas.

2.2.4.14. Sodio

Es importante en la activación de enzimas y el balance hídrico.

2.2.4.15. Boro

Participa en la regulación de la utilización de carbono, ARN metabólico.

El boro es un elemento esencial para las plantas vasculares, diatomeas y algunas especies de algas verdes (Alarcon, 2001). Es absorbido por las plantas generalmente en forma de ácido bórico H_3BO_3.

En las dos últimas décadas, se ha descubierto que el boro es un oligoelemento nutricional esencial en la fisiología animal y humana. Principalmente dentro del metabolismo mineral y óseo (Crespo, 2001).

2.2.5. CONDICIONES NECESARIAS PARA EL CULTIVO DE MICROALGAS

El crecimiento de una población de microalgas, responde a la interacción mutua de factores biológicos, físicos y químicos, en general el cultivo de microalgas en sus diferentes etapas requiere de luz, temperatura, nutrientes, agitación, dióxido de carbono entre otros (Zevallos, 2010).

2.2.5.1. Luz

Generalmente es provisto mediante lámparas fluorescentes, el aumento de la intensidad de la luz propicia la velocidad de la división celular y en consecuencia la producción de alimento vivo (Laing, 1991).

2.2.5.2. Temperatura

Generalmente un gran número de especies de microalgas crecen entre temperaturas desde 17 a 22ºC. Las bajas

temperaturas no causan fenecimiento sin embargo retardan la tasa de crecimiento (Laing, 1991).

2.2.5.3. Nutrientes

Para el crecimiento de las microalgas lo nutrientes requeridos son las sales inorgánicas (Laing, 1991).

2.2.5.4. Agitación

El cultivo de microalgas son agitadas y mezcladas usando compresores de aire (Laing, 1991).

2.2.5.5. Dióxido de carbono

El carbono para el desarrollo de las microalgas son provistas en forma de dióxido de carbono CO_2, en cantidades menores (1 por 100), y manteniendo el pH 7.8 a 8 (Laing,1991).

2.2.5.6. Salinidad

Para los flagelados la salinidad es de 25 a 30 UPS, para las diatomeas es de 20 a 25 UPS (Laing, 1991).

2.2.5.7. Limpieza

El agua de mar en cantidades pequeñas puede ser tratada por mediante el autoclave. Los volúmenes grandes de agua de mar deben ser tratados mediante el filtrado hasta 2 µm e irradiada con luz ultravioleta (Laing, 1991).

2.2.6. *Chaetoceros gracilis*

La microalga *Chaetoceros gracilis,* es una diatomea solitaria cuya forma es rectangular y sus dimensiones pueden ser de 8 – 12 µm x 7 - 10 µm toleran aguas cuya temperatura pueden llegar hasta los 40°C en su composición nutricional presenta un 8.69% de lípidos, 23.94% de proteínas y 19.01% de carbohidratos (Cambefort Flores y Fernando, 2010).

Chaetoceros gracilis, es una diatomea marina que crece de manera solitaria, tiene forma rectangular cuyas dimensiones son de 4 a 6 µm sin considerar las setas. Su pared celular se caracteriza por estar compuesto por sílice, la que recibe el nombre de frústrulo que está formado por dos valvas, durante la división celular se separan para formar nuevas celulas. La gran mayoría de los chaetoceros soportan temperaturas elevadas, siendo 37°C la máxima temperatura de crecimiento, y entre 25°C a 35°C es el rango óptimo de crecimiento. En cuanto a la salinidad 6 UPS es la mínima para su crecimiento y el rango óptimo se encuentra entre 17 y 25 UPS (Gonzales, 2000).

2.2.6.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *Chaetoceros gracilis*

La clasificación taxonómica actual (Balmaceda, 2005).

División: Chrysophyta

Clase: Bacillariophyceae

Orden: Centrales

Fam: Chaetoceraceae

Género: Chaetoceros

Especie: *Chaetoceros gracilis*

2.3. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS

2.3.1. Microalgas: Las microalgas se definen como organismos unicelulares eucariotas y fotosintéticos. Las microalgas son esenciales en la producción primaria dentro de la cadena trófica, y es la primera formadora de materia orgánica. Poseen un tamaño promedio de entre 5 y 50 µm, lo que las hace fácilmente digeribles por muchos organismos cuya principal fuente alimenticia es el fitoplancton, poseen clorofila-a lo que les da un aspecto verdoso similar a las plantas, necesitan de la luz para desarrollarse y crear materia orgánica (Candela, 2016).

2.3.2. Densidad celular: Número total de células que se encuentran en un determinado volumen, incluyendo las células viables como las no viables que tengan integridad celular, es decir que no estén fragmentadas.

2.3.3. Oligoelemento: Elemento químico que se encuentra en pequeñas cantidades en las células de los seres vivos y es indispensable para el desarrollo normal del metabolismo.

2.3.4. Quelatado: Consiste en la formación de un complejo entre un ion de metal unidos a una molécula orgánica (ligando), los iones metálicos son minerales esenciales para el desarrollo y crecimiento de las plantas y sus deficiencias resultan en crecimiento retardado y cultivos de baja calidad. Los quelatos son compuestos de mayor estabilidad, y son ampliamente empleados en la agricultura como fertilizantes de micronutrientes para proveer con hierro, manganeso, zinc, cobre entre otros.

2.3.5. UPS: Unidades Practicas de Salinidad, referido al contenido del ion cloruro (Cl^-), expresado en partes por mil (‰), que es aproximadamente gramos de sal por litro de solución (g/L).

2.3.6. ARN: Ácido ribonucleico, es un ácido nucleico que interviene en el proceso de las proteínas y tiene la función de mensajero de la información genética.

2.3.7. ADN: Ácido desoxirribonucleico, determina las características y funciones de un organismo, se encuentran en su material genético.

2.3.8. pH: es una medida que indica la alcalinidad acidez o de una disolución, el pH es una medida de la concentración de iones de hidrógeno en la disolución acuosa.

2.3.9. Fertilizante foliar: son fertilizantes que aplican a la plantas en las hojas, generalmente en soluciones acuosas, pueden estar compuestos por minerales, vitaminas y macronutrientes (N, P y K).

2.3.10. Reactivo 1: En este trabajo de investigación se refiere a los macronutrientes del medio F/2 Guillard:

2.3.11. Reactivo 2: Se refiere a los micronutrientes del medio F/2 Guillard.

2.3.12. Reactivo 3: Se refiere a los Vitaminas del medio F/2 Guillard.

2.3.13. Reactivo 4: Fuente de metasilicato de sodio

CAPITULO III

MARCO METODOLÓGICO

3.1. TIPO Y DISEÑO

3.1.1 Tipo de investigación

Es una investigación experimental y aplicada, por que plantea el uso de fertilizantes inorgánicos para el cultivo y producción de microalgas como alimento vivo para la acuicultura o para otros usos.

3.1.2 Diseño de investigación

En este estudio experimental, el diseño de investigación corresponde a Diseño Completamente al Azar, en el cual se definen los tratamientos “t” que se van a aplicar a las “n”

unidades experimentales, de manera que a “r” unidades experimentales corresponde un tipo de tratamiento.

3.2. NIVEL DE INVESTIGACIÓN

El nivel de investigación es explicativa, dado que el tratamiento de la variable independiente es manipulado en el estudio, por lo tanto se tiene control y evidencia del efecto.

3.3. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

3.3.1. Variables independientes

- Medio de cultivo F/2 medio Guillard (Modificado por IMARPE).
- Medio de cultivo fertilizante inorgánico Bayfolan
- Medio de cultivo fertilizante inorgánico Panteranitro
- Medio de cultivo fertilizante inorgánico Kelpway

3.3.2. Variables dependientes

- Densidad celular (Cel/mL)

3.4. POBLACIÓN Y MUESTRA

3.4.1. POBLACIÓN

La población está constituida por el cultivo de *Chaetoceros gracilis* en el laboratorio de microalgas de la Universidad Nacional de Moquegua Filial Ilo.

3.4.2. MUESTRA

La muestra es no probabilística dado que no es aleatorio y está constituida por un inoculo de 10 ml de *Chaetoceros gracilis.*

3.5. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS

3.5.1. TÉCNICAS

3.5.1.1. LUGAR DE ESTUDIO

El trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de cultivo de microalgas de la Universidad Nacional de Moquegua Filial Ilo, que fue implementado por los proyectos "OBTENCIÓN DE BIODIESEL A PARTIR DE MICROALGAS NATIVAS CUANTIFICANDO SU POTENCIAL BIOENERGÉTICO EN EL LITORAL DE LA PROVINCIA DE ILO DEL AÑO 2014", aprobado mediante resolución C.O. Nº 405-2014-UNAM y "ESTUDIO DE TRES MICROALGAS NATIVAS A ESCALA EXPERIMENTAL PARA LA OBTENCIÓN DE BIOMASA COMO INSUMO POTENCIAL EN LA ELABORACIÓN DE BIODIESEL EN LA PROVINCIA DE ILO DURANTE EL 2015 – 2016" aprobado por RESOLUCIÓN C.O. N° 595-2014-UNAM y RESOLUCIÓN PRESIDENCIAL N° 0441-2016-UNAM;

el laboratorio cuenta con sistema de aireación constante, Iluminación y provisto de lo necesario para el cultivo inicial e intermedio de microalgas, además cuenta con aire acondicionado para mantener una temperatura constante.

En cuanto al agua de mar, ha sido donado por el Laboratorio Costero de Ilo del Instituto del Mar del Perú, que es filtrada hasta 1µm e irradiada con luz ultravioleta.

La cepa de la microalga *Chaetoceros gracilis* fue donada por la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, en un tubo de ensayo de 10 ml.

3.5.1.2. TRATAMIENTOS

En la presente investigación, se trabajó con 12 unidades experimentales, se consideró 4 tratamientos con 3 réplicas por cada tratamiento; el Tratamiento 1 (T1) consistió en la preparación del medio de cultivo F/2 Guillard, siendo este el Tratamiento control, el

Tratamiento 2 (T2) consistió en la preparación del medio de cultivo con el fertilizante inorgánico Kelpway, el Tratamiento 3 (T3) consistió en la preparación del medio de cultivo con el fertilizante inorgánico Panteranitro y finalmente el Tratamiento 4 (T4) consistió en la preparación del medio de cultivo con el fertilizante inorgánico Bayfolan, las proporciones en la preparación de los Tratamientos 1, Tratamiento2, Tratamiento 3 y Tratamiento 4, se detallan en la Tabla 11.

Tabla 11: Tratamientos

Tratamiento	Medios de cultivo
T1 (Control)	Medio F/2 Guillard (1ml/ L R1, 1ml/ L de R2, 1ml/ L de R3 y 1ml/ L de R4)
T2	Kelpway 10 ml/L y 1ml/L R4
T3	Panteranitro 10 ml/L y 1ml/L R4
T4	Bayfolan 10 ml/L y 1ml/L R4

Fuente: Elaboración propia (2018).

3.5.1.3. PREPARACIÓN DEL MEDIO DEL CULTIVO F/2 GUILLARD

PREPARACIÓN DE MACRONUTRIENTES, para efectos prácticos se le conoce como Reactivo 1, se preparó en una botella de vidrio con tapa (Figura 4) en 1 L de agua destilada, para lo cual se procede a pesar los componentes en las cantidades indicadas en la Tabla 2, con el apoyo de una balanza analítica, luego se procede agitar para la disolución de los compuestos posteriormente se procede a almacenar en condiciones de refrigeración.

Figura 4: Reactivo 1



Fuente: Elaboración propia (2018)

PREPARACIÓN DE MICRONUTRIENTES, se le conoce como Reactivo 2, se preparó en una botella de vidrio con tapa (Figura 5) en 1 L de agua destilada, para lo cual se procede a pesar los componentes en las cantidades indicadas en la Tabla 3, con el apoyo de una balanza analítica, luego se procede agitar para la disolución de los compuestos, posteriormente se procede a almacenar en condiciones de refrigeración.

Figura 5: Reactivo 2



Fuente: Elaboración propia (2018)

PREPARACIÓN DE VITAMINAS, denominado por efectos prácticos como Reactivo 3, se preparó en 1 L

de agua destilada, para lo cual se procede a pesar los componentes en las cantidades indicadas en la Tabla 4, con el apoyo de una balanza analítica, luego se procede agitar para la disolución de los compuestos, posteriormente se procede a almacenar en condiciones de refrigeración, en este caso el envase es una botella de vidrio con tapa de color ambar (Figura 6), por que las vitaminas son sensibles a la luz.

Figura 6: Reactivo 3



Fuente: Elaboración propia (2018)

PREPARACIÓN DEL REACTIVO 4, es la fuente de silicatos para el cultivo de diatomeas como *Chaetoceros gracilis,* y se preparó en una botella de vidrio con tapa

(Figura 7) en 1 L en agua destilada disolviendo los compuestos en los volúmenes indicados en la Tabla 5.

Figura 7: Reactivo 4



Fuente: Elaboración propia (2018).

PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO F/2 GUILLAR, Para la preparación del medio de cultivo F/2 Guillard, se realizó en la siguiente proporción, en 1 L de agua de mar se procede a tomar 1 ml del Reactivo 1, 1 ml del Reactivo 2, 1 ml del Reactivo 3 según la Tabla 6 y para diatomeas como el *Chaetoceros gracilis* se agrega además 1 ml de Reactivo 4, como fuente de silicatos.

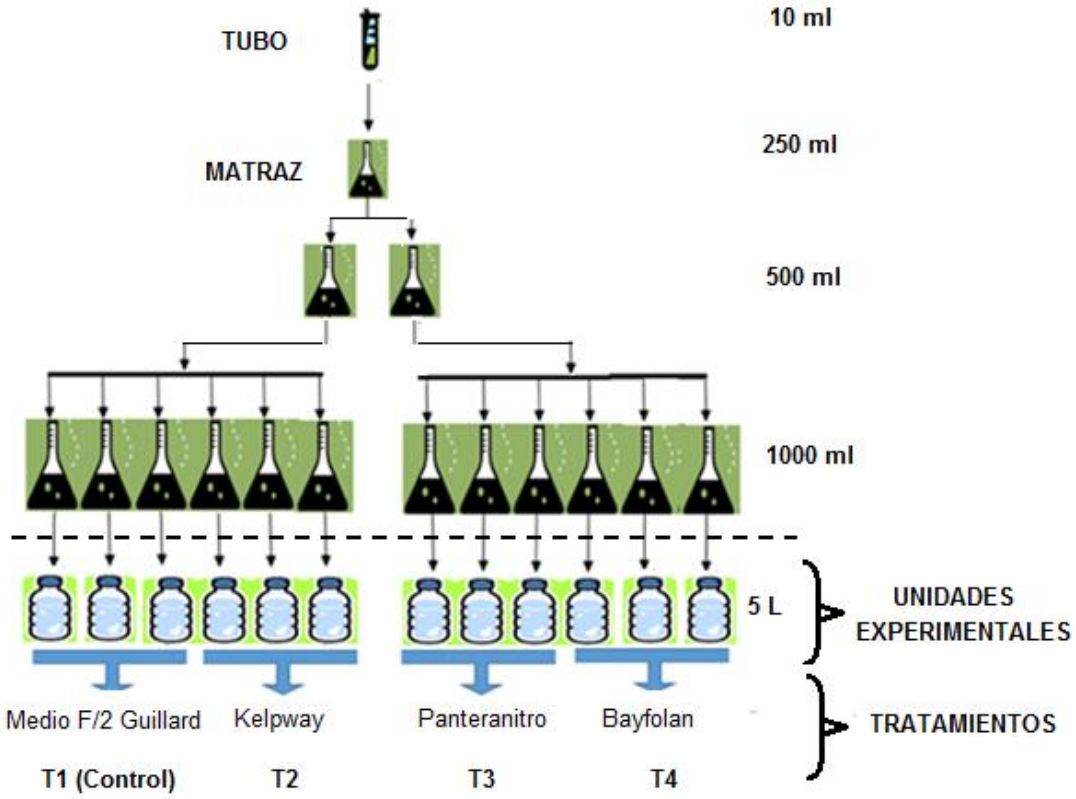
3.5.1.4. CULTIVO DE LA MICROALGA *Chaetoceros gracilis*

En este trabajo de investigacion el proceso de cultivo de *Chaetoceros gracilis* se realizó a lo indicado por Zevallos (2010), el estudio empezó con tubos de ensayo de 10 ml de inoculo de la microalga *Chaetoceros gracilis*, el cultivo se realizó en volumen creciente, inicialmente se transfirió el inoculo de 10 ml en un matraz de 250 ml y se aforó con el medio de cultivo F/2 Guillard previamente preparado y se cultivó por un periodo de 5 días; pasado este tiempo el cultivo en matraz de 250 ml se transfirió equitativamente a 2 matraces de 500 ml cada uno y se aforo con el medio de cultivo F/2 Guillard cada matraz y se procedió a cultivar por un periodo de 5 días; como paso siguiente los cultivos de 500 ml se transfirieron equitativamente en 12 matraces de 1L y se aforo con medio de cultivo F/2 Guillard y se cultivó por un periodo de 5 días.

Luego se procedió a preparar las 12 unidades experimentales en botellas PET de 5L, con los tratamientos, en cada uno de las unidades

experimentales se agregó 4 L de agua de mar y aleatoriamente se adicionó 50 ml de solución del fertilizante inorgánico Kelpway (Tratamiento 2) a 3 botellas, posteriormente se adicionó 50 ml de solución de fertilizante inorgánico Panteranitro (Tratamiento 3) a 3 botellas aleatoriamente, de la misma manera se adicionó 50 ml de solución del fertilizante inorgánico Bayfolan (Tratamiento 4) a 3 botellas aleatoriamente, finalmente a 3 botellas se adicionó el medio F/2 Guillard (Tratamiento 1 – control), es decir 5 ml de Reactivo 1, 5 ml de Reactivo 2 y 5 ml de Reactivo 3, asimismo por ser la microalga *Chaetoceros gracilis* una diatomea, se adicionó 5 ml de reactivo 4 a cada uno de las 12 unidades experimentales, luego a cada unidad experimental se procedió a transferir el cultivo realizado en matraces de 1L, y se cultivó por un periodo de 5 días, la cuantificación de la densidad celular cel/ml se realizó diariamente hasta finalizar el estudio (Figura 8).

Figura 8: Sistema de cultivo de *Chaetoceros gracilis*



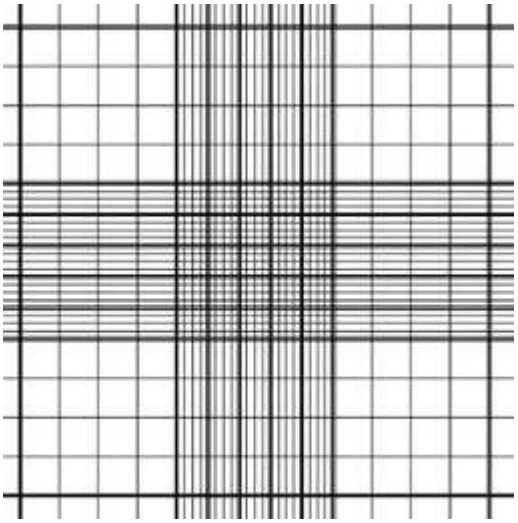
Fuente: Modificado de Zevallos (2010)

.

3.5.1.5. DENSIDAD CELULAR

La determinación de la densidad celular (cel/ml) en el cultivo experimental fue cuantificada diariamente en todas las unidades experimentales es decir en todos los tratamientos con sus respectivas réplicas empleando la técnica de numeración directa a través del microscopio usando la cámara de Neubauer (Figura 9).

Figura 9: Cámara de Neubauer



Fuente: Elaboración propia (2018).

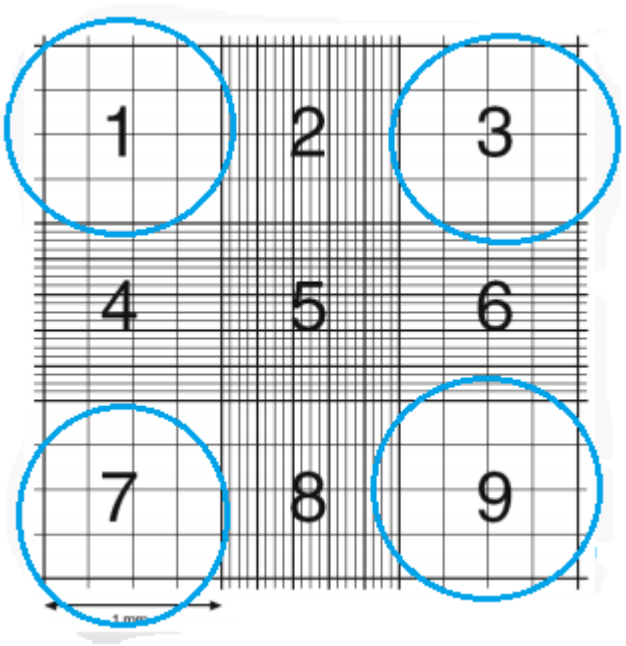
La cámara de Neubauer, es un material similar a un portaobjetos grueso que cuenta con una hendidura en la parte central, con una cuadrícula de conteo, por lo

general las cámaras tienes dos zonas de conteo a lo largo del eje longitudinal una superior y otra inferior y cuentan con 9 áreas de conteo.

Cada área de conteo de la cámara Neubauer tiene un área de $1mm^2$, al cubrirse con el cubreobjetos tiene un volumen de 0.1 mm^3 o 0.1µL.

Para determinar la densidad celular (cel/ml), el conteo celular se realizó en forma diaria en una cámara Neubauer de vidrio (Marca :HBG/SUPERIOR) y un microscopio compuesto (Marca: MICROS AUSTRIA) con 40 X de aumento, para lo cual se procedió a tomar una muestra 1ml de cultivo de microalgas de cada tratamiento y se fijó con una gota de lugol en un tubo de ensayo, con ayuda de una pipeta Pasteur se realizó la homogenización, luego se procedió tomar con una pipeta Pasteur una muestra homogenizada de 20 µl aproximadamente y se transfirió a la cámara Neubauer, luego se tapa con el cubre objetos la cámara y se llevó al microscopio para realizar la cuantificación en las áreas de conteo 1 y 9 (Figura 10).

Figura 10: Zonas de conteo de la cámara de Neubauer



Fuente: Elaboración propia (2018)

Para determinar la densidad celular de la microalga *Chaetoceros gracilis,* se usó la siguiente formula:

Densidad celular (cel/ ml) = promedio de conteos X 10000

3.6. INSTRUMENTOS PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS

- Cámara de Neubauer, marca HBG/Superior, de procedencia Alemana.
- Microscopio, marca Micros Austria, modelo MC20i, Serie 2-102935.
- Cuaderno de bitácora para colectar datos
- Multiparámetro, Marca WTW, modelo 3630 IDS.
- Luxometro, marca control company, modelo 3251 serie 17 0020752.

3.7. MÉTODOS Y TÉCNICAS PARA LA PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE DATOS

Para evaluar si existen diferencias significativas en la productividad de la microalga *Chaetoceros gracilis* cultivada con fertilizantes inorgánicos con respecto al medio de cultivo tradicional medio F/2 Guillard, se usó el diseño completamente al azar (DCA), que es uno de los más usados en el diseño de experimentos, esta prueba basada en el análisis de varianza, en el cual la variabilidad total se descompone en la "variabilidad de los tratamientos" y la "variabilidad del error". La finalidad es determinar si existe una diferencia significativa entre dos o más tratamientos, para lo cual se compara si la "variabilidad del

tratamiento" con respecto a la "variabilidad del error" y se determina si la primera es lo suficientemente alta según la distribución F.

En el caso de este estudio se definieron cuatro (4) tratamientos, el medio de cultivo control F/2 Guillard, fertilizante inorgánico Kelpway, fertilizante inorgánico Panteranitro y el fertilizante inorgánico Bayfolan, así mismo se consideró 12 la unidades experimentales que están constituidos por botellones transparentes de PET de 5 L, contenidos con agua de mar tratada y con inóculos de la microalga *Chaetoceros gracilis*, de tal forma que a tres (3) unidades experimentales aleatoriamente se asignan un tratamiento (Tabla 12). Las variables independientes son los fertilizantes inorgánicos y el medio F/2 Guillard y la variable dependiente es la productividad expresada en densidad de celular (cel/ml).

Tabla 12: Tratamientos y réplicas

Tratamientos	Repeticiones
T1 (Control)	3
T2	3
T3	3
T4	3

Fuente: Elaboración propia (2018).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1. Productividad de la microalga *Chaetoceros gracilis* cultivada con el medio F/2 Guillard.

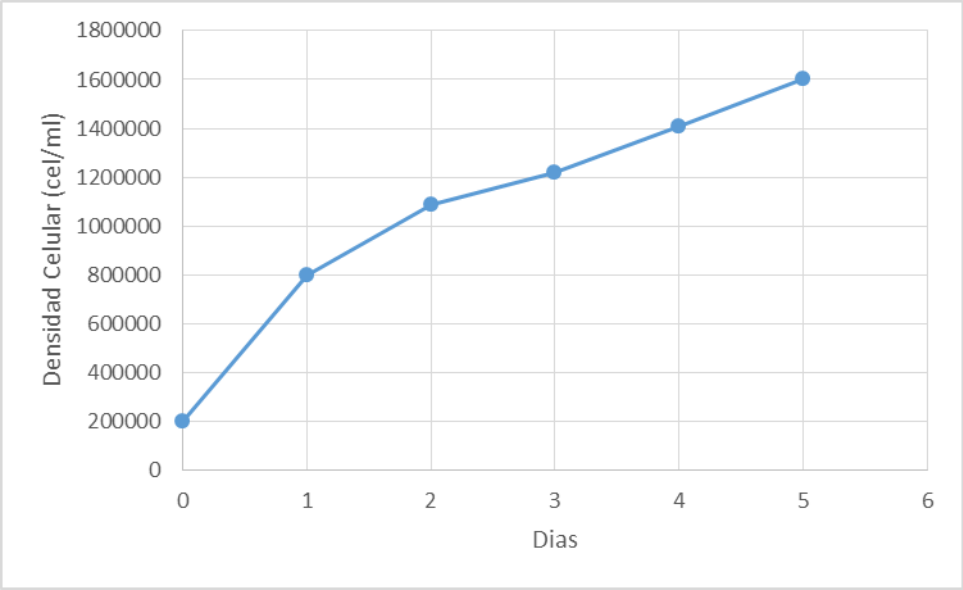
La productividad de la microalga *Chaetoceros gracilis* con el medio F/2 Guillard se determinó en el presente trabajo de investigación mediante la densidad celular (cel/ml), el cultivo tuvo un periodo de 5 días, la temperatura fue de 20 ± 0.5 °C, la intensidad lumínica de 3000 Lux, el pH promedio fue de 8.30 y la salinidad 33.2 UPS.

Tabla 13: Crecimiento de *Chaetoceros gracilis* con medio F/2 Guillard

Crecimiento de *Chaetoceros gracilis* con medio F/2 Guillard						
Días	0	1	2	3	4	5
Densidad celular cel/ml	2.00×10^5	7.97×10^5	1.09×10^6	1.22×10^6	1.41×10^6	1.60×10^6

Fuente: Elaboración propia (2018).

Figura 11: Crecimiento de *Chaetoceros gracilis* con F/2 Guillard



Fuente: Elaboración propia (2018).

La densidad celular se determinó diariamente siendo el crecimiento de *Chaetoceros gracilis* con el medio de cultivo F/2 Guillard el que se muestra en la Tabla 13, el cultivo inició con una densidad celular de 2.00 x 10^5 cel/ml, siendo el crecimiento de *Chaetoceros gracilis* exponencial llegando alcanzar densidades celulares promedio de 1.60 x 10^6 cel/ml a los 5 de cultivo (Figura 11), el cultivo se observa en la figura 12.

Figura 12: Cultivo de *Chaetoceros gracilis* con medio F/2 Guillard – 5L



Fuente: Elaboración propia (2018)

4.2. Productividad de la microalga *Chaetoceros gracilis* cultivada con el fertilizante inorgánico Kelpway.

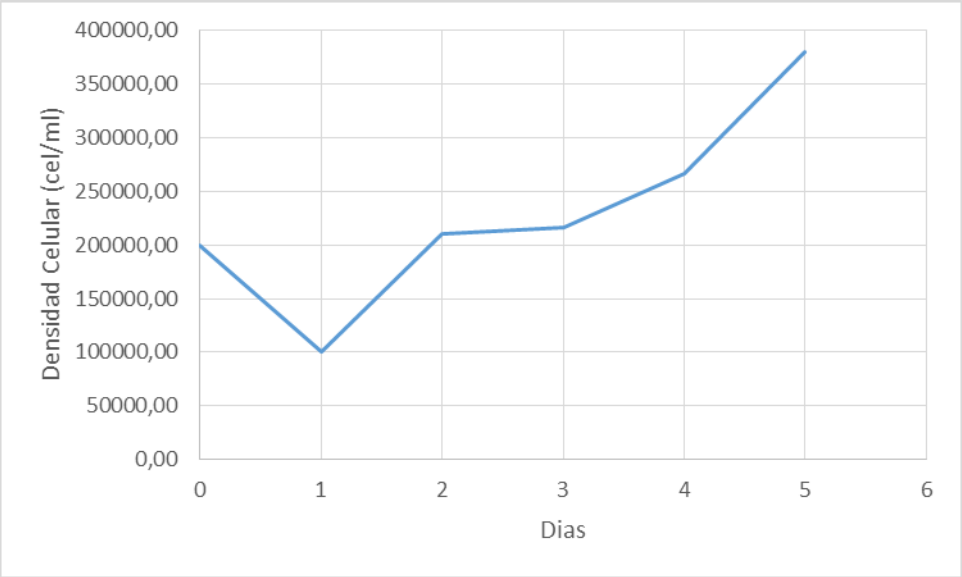
La productividad de la microalga *Chaetoceros gracilis* con el fertilizante inorgánico Kelpway, se determinó en el presente trabajo de investigación mediante la densidad celular (cel/ml), el cultivo tuvo un periodo de 5 días, la temperatura durante fué de 20 ± 0.5 °C, la intensidad lumínica de 3000 Lux, el pH promedio fue de 8.25, la salinidad 33.2 UPS.

Tabla 14: Crecimiento de *Chaetoceros gracilis* con Kelpway

Crecimiento de *Chaetoceros gracilis* con Kelpway						
Días	0	1	2	3	4	5
Densidad celular cel/ml	$2.00x10^5$	$1.00 x10^5$	$2.10 x10^5$	$2.17 x10^5$	$2.67 x10^5$	$3.93 x10^5$

Fuente: Elaboración propia (2018).

Figura 13: Crecimiento de *Chaetoceros gracilis* con Kelpway



Fuente: Elaboración propia

La densidad celular se determinó diariamente, el cultivo inició con una densidad celular de 2.00 x 10^5 cel/ml llegando alcanzar densidades en promedio de 3.93 x 10^5 cel/ml a los 5 de cultivo (Tabla 14), al cabo del primer día de cultivo mostró un descenso, esto puede ser debido a los componentes del fertilizante que no son adecuados para el crecimiento de *Chaetoceros gracilis,* sin embargo al cabo del segundo día de cultivo, se observó recuperación de la densidad celular (Figura 13), lo que indicaría que la microalga estaría adaptándose al medio de cultivo con el fertilizante inorgánico Kelpway, en los días posteriores se observó un crecimiento notable; asimismo, el cultivo de *Chaetoceros* se observa en el Anexo 2 y Figura 14.

Figura 14: Cultivo de *Chaetoceros gracilis* con fertilizante inorgánico Kelpway – 5L



Fuente: Elaboración propia (2018)

4.3. Productividad de la microalga *Chaetoceros gracilis* cultivada con el fertilizante inorgánico Panteranitro

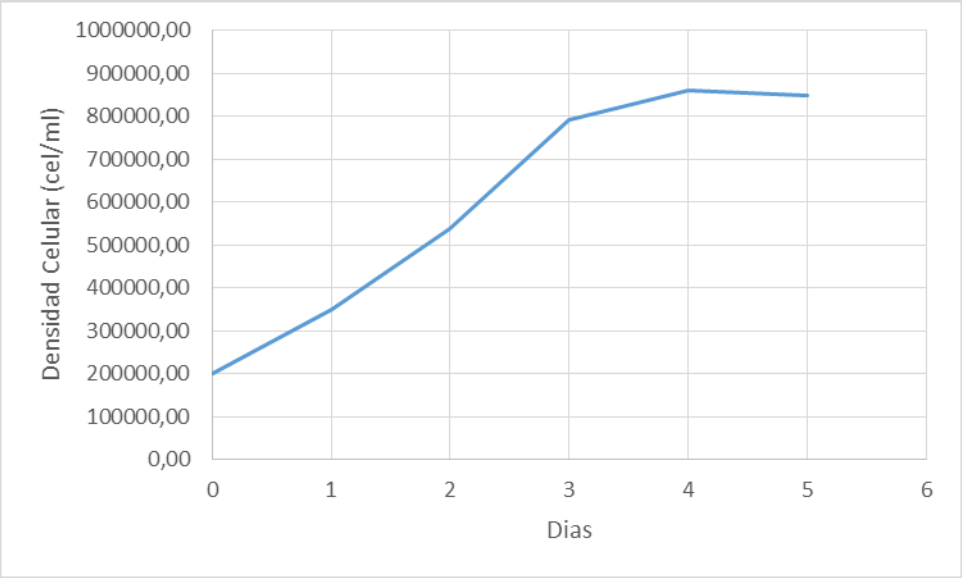
La productividad de la microalga *Chaetoceros gracilis* con el fertilizante inorgánico Panteranitro se determinó en el presente trabajo de investigación mediante la cuantificación de la densidad celular (cel/ml), el cultivo tuvo un periodo de 5 días, la temperatura durante fue de 20 ± 0.5 °C, la intensidad lumínica de 3000 Lux, el pH promedio fue de 8.50, la salinidad 33.2 UPS.

Tabla 15: Crecimiento de *Chaetoceros gracilis* con Panteranitro

Crecimiento de *Chaetoceros gracilis* con Panteranitro						
Días	0	1	2	3	4	5
Densidad celular cel/ml	2.00×10^5	3.50×10^5	5.37×10^5	7.93×10^5	8.60×10^5	8.50×10^5

Fuente: Elaboración propia (2018)

Figura 15: Crecimiento de *Chaetoceros gracilis* con Panteranitro



Fuente: Elaboración propia (2018)

Durante el cultivo de *Chaetoceros gracilis* con el fertilizante inorgánico Panteranitro, la densidad celular se determinó diariamente, el cultivo inició con una densidad celular de 2.00×10^5 cel/ml, llegando alcanzar densidades en promedio de 8.5×10^5

cel/ml a los 5 días de cultivo (Tabla 15), el cultivo de *Chaetoceros gracilis* con este fertilizante inorgánico Panteranitro mostró un crecimiento exponencial hasta los 3 días de cultivo (Figura 15), sin embargo a los días posteriores se observa que las microalgas estarían en la fase estacionaria, el cultivo de *Chaetoceros gracilis* se puede observar en el Anexo 3 y Figura 16.

Figura 16: Cultivo de *Chaetoceros gracilis* con fertilizante inorgánico Panteranitro - 5L



Fuente: Elaboración propia (2018)

4.4. Productividad de la microalga *Chaetoceros gracilis* cultivada con el Bayfolan

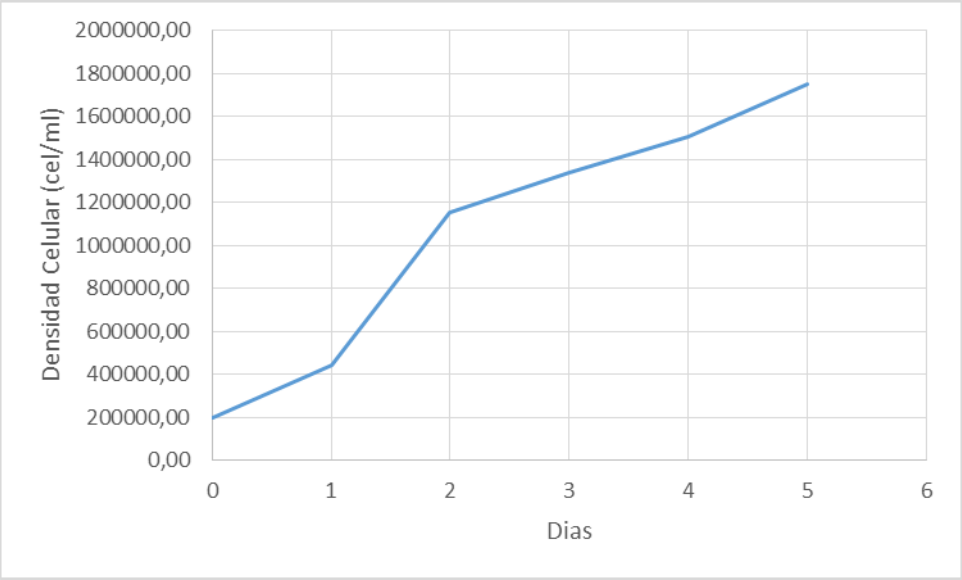
La productividad de la microalga *Chaetoceros gracilis* con el fertilizante inorgánico Bayfolan se determinó en el presente trabajo de investigación mediante la cuantificación de la densidad celular expresado en cel/ml, el cultivo tuvo un periodo de 5 días, la temperatura durante el cultivo fue de 20 ± 0.5 °C, la intensidad lumínica de 3000 Lux, el pH promedio fue de 8.340, la salinidad 33.4 UPS.

Tabla 16: Crecimiento de *Chaetoceros gracilis* con Bayfolan

Crecimiento de *Chaetoceros gracilis* con Bayfolan						
Días	0	1	2	3	4	5
Densidad celular cel/ml	2.00×10^5	4.43×10^5	1.15×10^6	1.34×10^6	1.51×10^6	1.75×10^6

Fuente: Elaboración propia (2018)

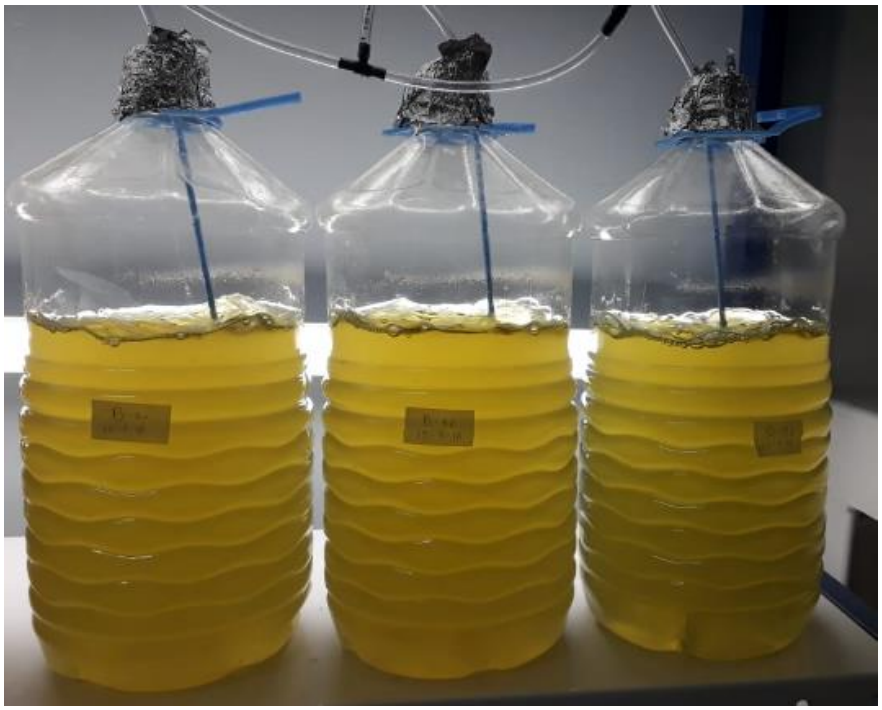
Figura 17: Crecimiento de *Chaetoceros gracilis* con Bayfolan



Fuente: Elaboración propia (2018).

La densidad celular se cuantifico diariamente en el cultivo de *Chaetoceros gracilis* con el fertilizante inorgánico Bayfolan, el cultivo inició con una densidad celular de 2.00 10^5 cel/ml llegando alcanzar densidades en promedio de 1.75 x10^6 cel/ml a los 5 de cultivo (Tabla 16), durante todo el periodo de cultivo, se observó un crecimiento exponencial de *Chaetoceros gracilis* (Figura 17), el cultivo de la microalga *Chaetoceros gracilis* se observa en la Figura 18 y Anexo 4.

Figura 18: Cultivo de *Chaetoceros gracilis* con fertilizante inorgánico Bayfolan 5 L



Fuente: Elaboración propia (2018)

4.5. Comprobación de la Hipótesis y análisis de resultados

4.5.1. Análisis de varianza

En este trabajo de investigación se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y se utilizó la prueba de comparación múltiple de Tukey con un nivel de significancia (α= 0.05) para evaluar si existen diferencias o no entre los entre tratamientos

Tabla 17: Análisis de varianza

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F Calculado*	*Probabilidad*	*Valor crítico para F*
Tratamientos	36871,58	3	12290,52	98,38	$1,18 \times 10^{6}$	4,07
Error	999,33	8	124,92			
Total	37870,92	11				

Fuente: Elaboración propia (2018)

De acuerdo a los datos mostrados en la tabla de análisis de varianza se puede observar el valor crítico (Tabla de valores críticos de distribución F 0.05) para "F" a 0.05 de significancia es 4.066 y el valor "F" calculado de acuerdo a la tabla es 98.38, por tanto:

$F_{0.05,3,8}$ =4.07

F calculado = 98.39

F calculado > $F_{0.05,3,8}$

Es decir:

98.39 > 4.07

Además considerando el diseño completamente al azar (DCA) empleado en el presente trabajo de investigación cuya hipótesis es:

H_0 = T1=T2=T3=T4
H_a = Al menos un tratamiento es diferente.

Por lo tanto F calculado es mayor que $F_{0.05,3,8,}$, se concluye que al menos un tratamiento es diferente de los demás.

Esto quiere decir entre los cuatro tratamientos considerados en la investigación al menos un tratamiento es diferente.

4.5.2. Comparaciones múltiples – HDS Tukey

En la tabla siguiente se presenta los resultados de comparaciones múltiples HDS Tukey

Tabla 18: Comparaciones múltiples – HDS Tukey

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intérvalo de confianza al 95% Límite inferior	Límite superior
T1	T2	120,6667*	9,12567	0,000	91,4431	149,8903
	T3	75,0000*	9,12567	0,000	45,7764	104,2236
	T4	-15,3333	9,12567	0,392	-44,5569	13,8903

Fuente: Elaboración propia (2018)

Analizando los datos en la tabla de comparaciones múltiples de HDS Tukey a un nivel de significancia de 0.05 (5%).

T1 (Medio F/2 Guillard) - T2 (Kelpway)

Entre el T1 y el T2 existen diferencias debido a 0.05> 0.000.

T1 (Medio F/2 Guillard) – T3 (Panteranitro)

Entre el T1y el T3, existen diferencias debido a 0.05> 0.000.

T1 (Medio F/2 Guillard) – T4 (Bayfolan)

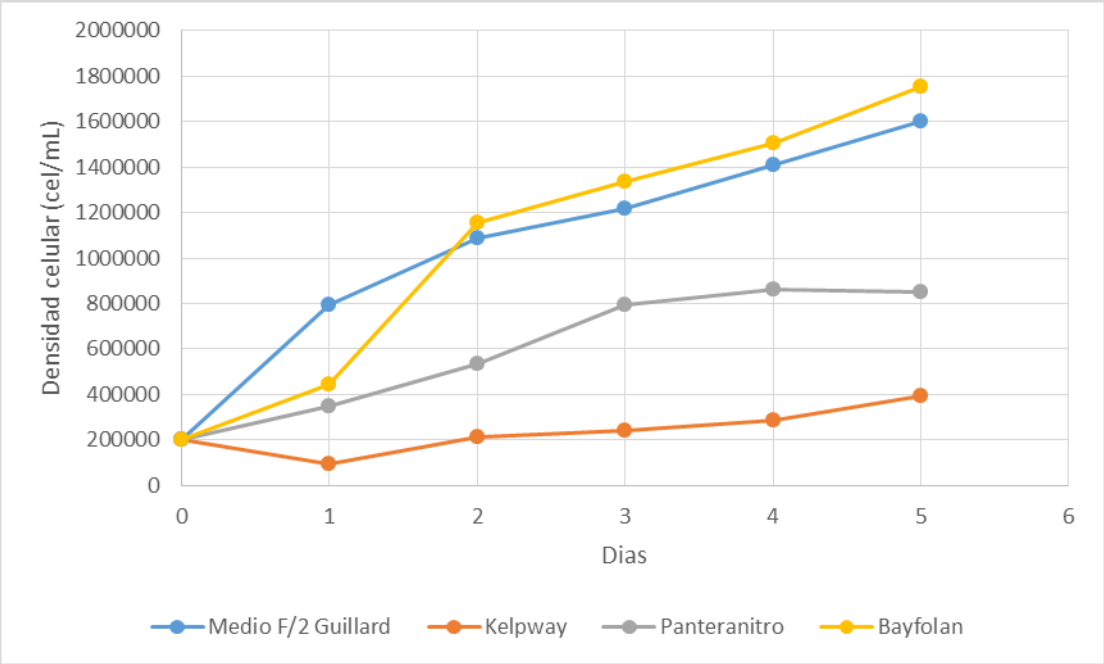
Entre el T1y el T4, no existen diferencias debido a 0.05< 0.392

Tabla 19: Resultados general de los tratamientos

Tratamiento	Repetición	Densidad celular Cel/Ml (al día 5 de cultivo)	Promedio
T1 (Medio F/2 Guillard - Control)	R1	1.55×10^6	1.60×10^6
	R2	1.66×10^6	
	R3	1.59×10^6	
T2 (Kelpway)	R1	4.20×10^5	3.93×10^5
	R2	3.60×10^5	
	R3	4.00×10^5	
T3 (Panteranitro)	R1	6.40×10^5	8.50×10^5
	R2	9.80×10^5	
	R3	9.30×10^5	
T4 (Bayfolan)	R1	1.65×10^6	1.75×10^6
	R2	1.87×10^6	
	R3	1.74×10^6	

Fuente: Elaboración propia (2018)

Figura 19: Crecimiento de *Chaetoceros gracilis* con fertilizante inorgánicos y el medio F/2 Guillard



Fuente: Elaboración propia (2018)

Del análisis de los resultados de observa que existen diferencias a un nivel de significancia de 5% entre el Tratamiento 1 (Control) y el Tratamiento 2 (Kelpway), de la misma manera se observa que hay diferencias a un nivel de significancia de 5% entre el Tratamiento 1 (Control) y el Tratamiento 3 (Panteranitro), sin embargo se observa que no hay diferencias a un nivel de significancia de 5% entre el Tratamiento 1 (Control) y el Tratamiento 4, estos resultados se pueden evidenciar en el crecimiento celular de *Chaetoceros gracilis* mostrado en la Figura 19 y Tabla 19.

DISCUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en el cultivo de *Chaetoceros gracilis* con los diferentes fertilizantes inorgánicos como Kelpway, Panteranitro, Bayfolan y el medio F/2 Guillard, se puede observar que los mejores resultados en densidad celular se obtuvieron con el fertilizante inorgánico Bayfolan seguido del medio F/2 Guillard, Panteranitro y Kelpway respectivamente, lo que nos indica que el fertilizante inorgánico Bayfolan se podría usar para el cultivo de la microalga *Chaetoceros gracilis* con mejores resultados, inclusive superando a los resultados obtenidos con el medio F/2 Guillard.

Ortega-Salas & Reyes-Bustamante (2012), observaron que los mayores densidades celulares de obtenien con el medio F/2 Guillard, seguido de fertilizantes, en este trabajo de investigacion se determinó que a un nivel de significancia de 0.05 no hay diferencias en la densidad celular en el cultivo de *Chaetoceros gracilis* con el medio F/2 Guillard y el el fertilizante inorganico Bayfolan.

Panta, Macay, Moncayo y Vélez (2016), evaluaron el crecimiento de dos especies de microalgas *Chaetoceros gracilis* e *Isochrysis galbana*, con dos tipos de fertilizantes agrícolas, durante el estudio no

encontraron diferencias significativas en las densidades celulares, sin embargo observaron que las mayores densidades celulares, se obtuvieron en el medio Guillard F/2 seguido de los fertilizantes; sin embargo en este trabajo de investigación se determinó que no existen diferencias significativas (0.05) entre el medio F/2 Guillard y fertilizante inorgánico Bayfolan, y se observó que los mayores densidades celulares se obtienen con el fertilizante inorgánico Bayfolan, superando al medio F/2 Guillard seguido de fertilizante inorgánico Panteranitro y Kelpway.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en la presente investigación se concluye que el crecimiento de *Chaetoceros gracilis* con F/2 Guillard, que en este caso es el tratamiento control, inició con una densidad celular de 2.00 x 10^5 cel/ml, llegando alcanzar densidades en promedio de 1.60 x 10^6 cel/ml a los 5 días de cultivo.

El crecimiento de *Chaetoceros gracilis* cultivado con el fertilizante inorgánico Kelpway, inició con una densidad celular de 2.00 x 10^5 cel/ml, llegando alcanzar densidades en promedio de 3.93 x 10^5 cel/ml a los 5 días de cultivo, la densidad celular alcanzada con este fertilizante inorgánico es la más baja registrada en este estudio, entre los medios de cultivo empleados, asimismo el análisis estadístico entre el medio F/2 Guillard y Kelpway en cultivo de *Chaetoceros gracilis,* indican que si existen diferencias a un nivel de significancia de 5%, por lo tanto no es recomendable realizar cultivo de *Chaetoceros gracilis* con el fertilizante inorgánico Kelpway, toda vez que se presenta bajas densidades celulares.

El crecimiento de *Chaetoceros gracilis* con Panteranitro el cultivo inició con una densidad celular de 2.00 x 10^5 cel/ml, llegando alcanzar densidades en promedio de 8.5 x 10^5cel/ml a los 5 días de cultivo, el análisis estadístico entre el medio F/2 Guillard y Panteranitro en cultivo de *Chaetoceros gracilis,* indican que existen diferencias a un nivel de significancia de 5%, es decir que no es

recomendable realizar cultivo de *Chaetoceros gracilis* con el Panteranitro, debido a que presenta bajas densidades celulares durante su cultivo.

El crecimiento de *Chaetoceros gracilis* cultivada con el fertilizante inorgánico Bayfolan, inició con una densidad celular de 2.00 x 10^5 cel/ml, llegando alcanzar densidades en promedio de 1.75 x 10^6 cel/ml a los 5 días de cultivo, la densidad celular alcanzada con este fertilizante inorgánico es el más alto inclusive superando al medio F/2 Guillard, asimismo el análisis estadístico entre el medio F/2 Guillard y Bayfolan en cultivo de *Chaetoceros gracilis,* indican que no existen diferencias a un nivel de significancia de 5%, concluyéndose que se podría usar indistintamente el medio F/2 Guillar o el Bayfolan para el cultivo de esta especie de microalga, obteniendo similar densidad celular.

RECOMENDACIONES

Realizar más investigaciones en cuanto a la producción de diferentes especies de microalgas con fertilizantes inorgánicos para evaluar su viabilidad y así lograr una contribución al desarrollo de la acuicultura.

En cuanto a las microalgas producidas con fertilizantes inorgánicos se recomienda evaluar composición química de la biomasa producida, a fin de determinar la calidad nutricional de la microalga en comparación a las microalgas cultivadas con el medio F/2 Guillard y así determinar su aplicación como alimento vivo en acuicultura.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ÁLVAREZ H. (1994) Introducción al método ficológico. Capitulo III. Folleto de Algas. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Ecuador.

ALARCÓN A.L. (2001) Tecnología de Producción. Universidad politécnica de Cartagena.

Aris industrial (04 de noviembre del 2018) Ficha técnica de Panteranitro. Recuperado de http://www.aris.com.pe/quimicos/wp-content/uploads/2013/10/HT-PANTERA-NITRO-2014.pdf

BALMACEDA H. (2005) Presencia de bacterias en cinco niveles de cultivo en tres especies de microalgas en ambiente controlado. Universidad Nacional Autonoma De Nicaragua – Leon.

BAND, S. C. (2008). Aislamiento, purificación y mantenimiento de cepas de microalgas. En B. O. Arredondo & D. Voltolina (Comp.), Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal (pp.1-16). Editorial Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.

Bayer CropScience (2018) Envase del fertilizante Bayfolan

CAMBEFORT FLORES, S., & FERNANDO, A. (2010). efecto de las microalgasChaetoceros gracilis, Tetraselmis sp. e Isochrysis galbana sobre la

reproduccion y desarrollo nauplar en Copepodos Calanoideos Marinos Tropicales, Acartia spp.

CANDELA R.(2016) Las microalgas y el tratamiento de aguas residuales: conceptos y aplicaciones. Una revisión bibliográfica. Bucaramanga.

CRESPO E. (2001) El boro, elemento nutricional esencial en la funcionalidad ósea. Revista Española de Cirugía Osteoarticular.

GONZALES A. (2000). Alternativas en el cultivo de microalgas. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Tesis de grado. Ecuador

GÓMEZ, O.; RODRÍGUEZ R. & SUBERO, S. (2011). Cultivo polialgal(Chaetoceros gracilis, Chlorella sp. Y Tetraselmis chuii) en medios de cultivo no convencionales. Saber, Universidad de Oriente, Venezuela.

LAING I. (1991). Cultivation of marine unicellular algae. Laboratory Leaflet Numbre67. Ministery of Agriculture and food directorate of fisheries research. Lowestoft (67): 31 pp.

LÉPEZ, I. & VEGA, A. (2003). Cultivo de Microalgas. Curso Internacional. Bases Metodológicas para la implementación de Sistemas Productivos en Acuicultura.Universidad de Concepción.

ORTEGA-SALAS, A., & REYES-BUSTAMANTE, H. (2012). Cultivo de las microalgas dulceacuícolas Kirchneriella obesa, Scenedesmus quadricauda y

Chlorococcum infusorium empleando tres medios de cultivo. Instituto de Ciencias del Mar y Limnologia - UNAM, Sinaloa, Mexico.

PANTA R., MACAY A. MONCAYO E. & J. VELEZ. (2016) Crecimiento de las microalgas Chaetoceros gracilis e Isochrysis galbana con fertilizantes agrícolas, en laboratorio. Revista La Técnica.

PARRA E. (2015). Cultivo De La Microalga *Chaetoceros Gracilis* Utilizando Como Medio de Crecimiento Agua De Coco Modificada. Universidad de el salvador.

PRIETO, M., MOGOLLON, M., CASTRO, A., & SIERRA, L.(2005). Efecto del medio y condiciones de cultivo en la productividad de tres diatomeas marinas con potencial acuícola. MVZCórdoba.

ROMO, A. (2002). Manual para el Cultivo de Microalgas [Memoria técnica de trabajo profesional.] La Paz: Universidad Autónoma de Baja California. Área Interdisciplinaria de Ciencias del Mar. Departamento de Biología Marina.

RUIZ A. (2011) Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente. Universidad Politécnica de Valencia.

SILVA-BENAVIDES, A. M. (2014). EVALUACIÓN DE FERTILIZANTES AGRÍCOLAS EN LA PRODUCTIVIDAD DE LA MICROALGA Chlorella sorokiniana. Instituto de Estudios para los Ecosistemas, Florencia, Italia.

Tecnología de algas S.A. (2018) Envase fertilizante Kelpway.

TORRENTERA L. & A. TACON. (1989). La producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura. Documento de Campo Nº 12. Programa Cooperativo Gubernamental. FAO – Italia.

URIBE, T. E. (1994). Cultivo de microalgas. En: Cultivo de peces marinos Facimar, Universidad Católica del Norte Coquimbo, Chile.

WIKFORS, G., & OHNO, M. (2001). Impact algae research in Aquaculture. Journal of phycology, 37, 968-974.

YUSUF CHISTI. (2007). Bio diésel from microalgae.Biotechnology advances

ZEVALLOS S. 2010. Tecnología de Cultivo de Microalgas Como Alimento de Moluscos. Instituto del Mar del Perú. Ilo – Perú.

ANEXOS

Anexo 1: Unidades experimentales - Medio F/2 Guillard en botellas PET – 5L



Fuente: Elaboración propia (2018)

Anexo 2: Unidades experimentales - fertilizante inorgánico Kelpway en botellas PET – 5L



Fuente: Elaboración propia (2018)

Anexo 3: Unidades experimentales - fertilizante inorgánico Panteranitro en botellas PET – 5L



Fuente: Elaboración propia (2018)

Anexo 4: Unidades experimentales - fertilizante inorgánico Bayfolan en botellas PET – 5L



Fuente: Elaboración propia (2018)

Anexo 5: Inoculación con el cultivo de C*haetoceros gracilis* en las unidades experimentales



Fuente: Elaboración propia (2018)

Anexo 6: Cultivo de *Chaetoceros gracilis* con fertilizantes inorgánicos en laboratorio



Fuente: Elaboración propia (2018)

Anexo 7: Cuantificación de la densidad celular



Fuente: Elaboración propia (2018)

MATRIZ DE CONSISTENCIA

PROYECTO DE TESIS: DETERMINACIÓN DE LA PRODUCTIVIDAD DE LA MICROALGA *Chaetoceros gracilis* CULTIVADA CON FERTILIZANTES INORGÁNICOS Y EL MEDIO F/2 GUILLARD

PROBLEMA DE LA INVESTIGACION	HIPÓTESIS	OBJETIVOS	VARIABLES	INDICADOR	MÉTODO
Las microalgas son fundamentales como alimento vivo en la acuicultura y lograr producir a un costo asequible es de vital importancia, si se desea desarrollar una acuicultura sostenible, teniendo en cuenta que las microalgas se cultivan tradicionalmente usando el medio de cultivo F/2 guillard, el presente trabajo de investigación pretende el cultivo de la *Chaetoceros gracilis* con tres tipos de fertilizantes inorgánicos agrícolas en comparación con el medio de cultivo F/2 Guillard, sin embargo se desconoce la productividad de *Chaetoceros gracilis* en cultivo con fertilizantes inorgánicos comerciales, con la finalidad de obtener las mayor cantidad posible de concentraciones celulares logrando disminuir los costos de producción. ¿Cuál es la productividad de la microalga *Chaetoceros gracilis* cultivada con fertilizantes inorgánicos y el medio F/2 Guillard?	**HIPÓTESIS** No existe diferencias en la productividad de la microalga *Chaetoceros gracilis* cultivada con fertilizantes inorgánicos y el medio F/2 Guillard. H_0 : T1=T2=T3=T4, en el diseño completamente al azar (DCA), la hipótesis nula es que los efectos de tratamientos son todos iguales. H_a : al menos un tratamiento es diferente de los demás.	**OBJETIVO GENERAL** -Determinar la productividad de la microalga *Chaetoceros gracilis* cultivada con fertilizantes inorgánicos y el medio F/2 Guillard. **OBJETIVOS ESPECÍFICOS** -Determinar la productividad de la microalga *Chaetoceros gracilis* cultivada con el medio F/2 Guillard. -Determinar la productividad de la microalga *Chaetoceros gracilis* cultivada con el fertilizante agrícola comercial Kelpway. -Determinar la productividad de la microalga *Chaetoceros gracilis* cultivada con el fertilizante agrícola comercial Panteranitro. -Determinar la productividad de la microalga *Chaetoceros gracilis* cultivada con el fertilizante agrícola comercial Bayfolan.	**VARIABLES INDEPENDIENTES:** -Medio de cultivo F/2 medio Guillard (Modificado por IMARPE). -Medio de cultivo fertilizante inorgánico Bayfolan -Medio de cultivo fertilizante inorgánico Panteranitro -Medio de cultivo fertilizante inorgánico Kelpway **VARIABLES DEPENDIENTES:** -Densidad celular (Cel/mL)	-Densidad celular (Cel/mL)	En este trabajo de investigación el proceso de cultivo de *Chaetoceros gracilis* se realizó a lo indicado por Zevallos (2010), el estudio empezó con tubos de ensayo de 10 ml de inoculo de la microalga *Chaetoceros gracilis*, el cultivo se realizó en volumen creciente, inicialmente se transfirió el inoculo de 10 ml en un matraz de 250 ml y se aforó con el medio de cultivo F/2 Guillard previamente preparado y se cultivó por un periodo de 5 días; pasado este tiempo el cultivo en matraz de 250 ml se transfirió equitativamente a 2 matraces de 500 ml cada uno y se aforo con el medio de cultivo F/2 Guillard cada matraz y se procedió a cultivar por un periodo de 5 días; como paso siguiente los cultivos de 500 ml se transfirieron equitativamente en 12 matraces de 1L y se aforo con medio de cultivo F/2 Guillard y se cultivó por un periodo de 5 días. Luego se procedió a preparar las 12 unidades experimentales en botellas PET de 5L, con los tratamientos, en cada uno de las unidades experimentales se agregó 4 L de agua de mar y aleatoriamente se adicionó 50 ml de solución del fertilizante inorgánico Kelpway (Tratamiento 2) a 3 botellas, posteriormente se adicionó 50 ml de solución de fertilizante inorgánico Panteranitro (Tratamiento 3) a 3 botellas aleatoriamente, de la misma manera se adicionó 50 ml de solución del fertilizante inorgánico Bayfolan (Tratamiento 4) a 3 botellas aleatoriamente, finalmente a 3 botellas se adicionó el medio F/2 Guillard (Tratamiento 1 – control), es decir 5 ml de Reactivo 1, 5 ml de Reactivo 2 y 5 ml de Reactivo 3, asimismo por ser la microalga *Chaetoceros gracilis* una diatomea, se adicionó 5 ml de reactivo 4 a cada uno de las 12 unidades experimentales, luego a cada unidad experimental se procedió a transferir el cultivo realizado en matraces de 1L, y se cultivó por un periodo de 5 días, la cuantificación de la densidad celular cel/ml se realizó diariamente hasta finalizar el estudio