UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA PESQUERA

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO PROTEICO DE BIOMASA HÚMEDA Y HARINA DE TRES ESPECIES DE MICROALGAS MARINAS: *Chlorella vulgaris, Nannochloropsis oculata y Tetraselmis striata,* EN EL LABORATORIO DE LA UNAM – FILIAL ILO, DURANTE EL 2017.

TESIS

PRESENTADO POR:

YESICA ALVAREZ MEZA

Para optar el Título Profesional de:

INGENIERO PESQUERO

MOQUEGUA – PERU

2017

ACTA DE SUSTENTACIÓN

El jurado suscribiente, ha calificado el trabajo de TESIS:

TITULADO "DETERMINACION DEL CONTENIDO PROTEICO DE BIOMASA HÚMEDA Y HARINA DE TRES ESPECIES DE MICROALGAS MARINAS: Chlorella vulgaris, Nannochloropsis oculata y tetraselmis striata, en EL LABORATORIO DE LA UNAM - FILIAL ILO.

PRESIDENTE ING. ALEJANDRO MARCELO GONZALES VARGAS

MIEMBROS ING. MARIO RUIZ CHOQUE

ING. PERCY OMAR VELASQUEZ CHIRINOS

ASESOR DRA. SHEDA MENDEZ ANCCA

Presentado por el (la) Bachiller: YESICA ALVAREZ MEZA

Participando en calidad de asesor (es): DRA. SHEDA MENDEZ ANCCA

BLGO. ISABEL DEL CARMEN ESPINOZA REYNOSO

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

SE DECLARA APROBADO (APROBADO/DESAPROBADO)

por UNANIMIDAD (UNANIMIDAD/MAYORÍA), con el calificativo de BUENO (EXCELENTE/MUY BUENO/BUENO/REGULAR/DEFICIENTE), equivalente a CATORCE, quedando expedito para que se le confiera el Título Profesional de :

Ilo, 27 de Diciembre del 2017

INGENIERO PESQUERO

Presidente de Jurado

1er Miembro

2do Miembro

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA
CERTIFICA: Que el presente documento ES COPIA FIEL DEL ORIGINAL, al que me remito para los fines pertinentes.
Moquegua 06 JUL. 2018
CP. Deisy Raquel Chipana Begazo
FEDATARIO ADSCRITO

DEDICATORIA

A Dios por llenarme de bendiciones, demostrándome que con esfuerzo, dedicatoria y valentía se pueden vencer todos los obstáculos, y sobre todo agradecerle por permitir que mi padre hoy en día se encuentra vivo y pueda acompañarme en esta nueva etapa de mi vida.

A mis padres y hermanas quienes me han acompañado en este largo caminar brindándome su apoyo incondicional y confianza durante toda mi vida, quienes me animaron a seguir adelante a pesar de las adversidades que transcurrieron.

Y en especial a la persona que me acompaño durante estos últimos 7 años, quien con sus ocurrencias siempre me saca una sonrisa, gracias a mi novio que siempre me acompaña en los momentos buenos y malos sobre todo por los consejos que día a día me brinda.

Gracias a todos por todo.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de Moquegua por el financiamiento con fondos de Canon minero, Sobre canon y Regalías mineras por permitir la ejecución de la presente investigación.

A las señoritas Lucia y Yenni personal de la oficina de la Dirección de Gestión de la Investigación, por su apoyo incondicional, ya que sin ellas hubiera sido imposible culminar la investigación.

Al Laboratorio Costero de IMARPE - Ilo, por las facilidades logísticas brindado para el cumplimiento de la presente investigación.

Al biólogo Yhordan Gianfranco Vizcarra Piérola por su tiempo y apoyo incondicional, brindado en el transcurso del proyecto. Ya que sin él hubiera sido imposible ejecutar la investigación.

A la Dra: Sheda Méndez Ancca, asesora de mi tesis, por su orientación y apoyo en el desarrollo de la investigación y el tiempo dedicado.
A la Blga. Isabel del Carmen Reynoso Espinoza por su apoyo en las innumerables revisiones de esta tesis.

A Luis Enrique Sosa Anahua, quien me acompaño desde el principio de la ejecución de la investigación y me alentó a no rendirme. Y a todos mis amigos que me acompañaron e hicieron que este año sea inolvidable.

RESUMEN

La investigación se desarrolló en el laboratorio de microalgas de la Universidad Nacional de Moquegua – Filial Ilo, su propósito fue determinar el contenido proteico de biomasa húmeda y harina de tres especies de microalgas marinas *Chlorella vulgaris, Nannochloropsis oculata* y *Tetraselmis striata*. Las especies fueron cultivadas en agua de mar enriquecida con el medio F/2 Guillard, se elaboró la curva de crecimiento y se determinó el día de máxima concentración celular; se obtuvo biomasa por centrifugación del cultivo y harina por liofilización de la biomasa, posteriormente los productos fueron analizados proximalmente. Observándose que la especie *C. vulgaris* presentó su mayor concentración celular en un lapso de 3 a 4 días de cultivo y la especie *N. oculata* obtuvo la menor concentración celular y su máximo crecimiento de 4 a 5 días. El análisis proximal de biomasa húmeda mostró que la *C. vulgaris* y *T. striata* presentó el contenido más alto de proteína 30,52% y 27,73%; mientras que *N. oculata* obtuvo 9.59%; En el análisis proximal de harina se encontró que la *N. oculata* obtuvo el más alto contenido proteico de 30.30%, *T. striata* y *C. vulgaris* presentaron 23.76% y 16.93% de proteína respectivamente. Sin embargo, al obtenerse mayor cantidad de biomasa y harina de *C. vulgaris* se concluyó que esta microalga sería la especie más conveniente a cultivar como insumo húmedo en la elaboración de “pellets” para peces.

Palabras claves: Microalgas, Biomasa húmeda, Inoculo, Liofilizado

ABSTRACT

The research was developed in the microalgae laboratory of the National University of Moquegua - Subsidiary Ilo, its purpose was to determine the protein content of wet biomass and flour of three species of marine microalgae *Chlorella vulgaris, Nannochloropsis oculata* and *Tetraselmis striata.* The species were cultivated in sea water enriched with the Guillard F / 2 medium, the growth curve was elaborated and the day of maximum cell concentration was determined; biomass was obtained by centrifugation of the crop and flour by lyophilization of the biomass, later the products were analyzed proximally. Observing that the species *C. vulgaris* presented its highest cellular concentration in a period of 3 to 4 days of culture and the species *N. oculata* obtained the lowest cell concentration and its maximum growth of 4 to 5 days. The proximal analysis of humid biomass showed that *C. vulgaris* and *T. striata* had the highest protein content 30.52% and 27.73%; whereas *N. oculata* obtained 9.59%; In the proximal flour analysis, it was found that the *N. oculata* obtained the highest protein content of 30.30%, *T. striata* and *C. vulgaris* presented 23.76% and 16.93% protein respectively. However, when obtaining greater amount of biomass and flour of *C. vulgaris* it was concluded that this microalgae would be the most convenient species to be cultivated as a wet input in the elaboration of pellets for fish.

Keywords: Microalgae, Wet Biomass, Inoculum, Lyophilized

CONTENIDO

PÁGINA DEL JURADO.....ii

DEDICATORIA.....iii

AGRADECIMIENTO.....iv

RESUMEN.....v

ABSTRACT.....vi

INTRODUCCIÓN..... 1

CAPITULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA…….....4

1.1 DESCRIPCION DE LA REALIDAD PROBLEMÁTICA.....4

1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....5

1.2.1 Interrogante general.....……...5

1.3 JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACION.....5

1.4 OBJETIVOS…….....….....6

1.4.1 Objetivo general.....6

1.4.2 Objetivos específicos.....7

1.5 FORMULACIÓN DE HIPÓTESIS.....7

1.5.1 Hipótesis general.....7

CAPITULO II: MARCOTEÓRICO.....8

2.1 ANTECEDENTES DEL ESTUDIO.....8

2.2 BASES TEÓRICAS.....10

2.2.1 Microalgas…….....10

2.2.2 Tipo de condiciones e cultivo de microalgas.....11

2.2.3 Forma de cultivo…….....……..……11

2.2.4 Descripción de la *Chlorella vulgaris*…….....12

2.2.5 Descripción de la *Nannochloropsis oculata*…….....13

2.2.6 Descripción de la *Tetraselmis striata*……....13

2.2.7 Microalgas con mayor contenido de proteínas…….....14

2.2.8 Biomasa de microalgas…….....15

2.2.9 Crecimiento de microalgas……15

2.2.10 Reproducción de microalgas……..….17

2.2.11 Fases de cultivo microalgal, IMARPE – Sede Ilo……19

2.3 DEFINICION DE TERMINOS……....22

2.3.1 Microalgas……..……....22

2.3.2 Contenido proteico total de microalgas……22

2.3.3 Biomasa húmeda de microalgas……23

2.3.4 Liofilizado de microalgas……..……....23

2.3.6 Centrifugación……..23

2.3.7 Cámara Neubauer……..……..……24

CAPÍTULO III: MARCO METODOLOGICO.....25

3.1 LUGAR DE EJECUCIÓN.....25

3.2 TIPO Y DISEÑO.....26

3.3 NIVEL DE INVESTIGACION.....27

3.4 OPERACIONALIZACION DE VARIABLES.....27

3.4.1 Variable independiente.....27

3.4.2 Variable dependiente.....27

3.5 POBLACIÓN Y/O MUESTRA DE ESTUDIO.....27

3.5.1 Población.....27

3.5.2 Muestra.....28

3.6 TECNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCION DE DATOS…….....28

3.6.1 Técnicas.....28

3.6.2 Diseño cuasi experimental.....28

3.7 MATERIALES Y EQUIPOS…….30

3.7.1 Materia prima...…….30

3.7.2 Equipos…….…….30

3.7.3 Materiales de laboratorio……...…….……...32

3.7.4 Insumos…….33

3.7.5 Indumentaria de trabajo…….…34

3.7.6 Otros……..34

3.8 MÉTODOS Y TÉCNICAS PARA LA PRESENTACIÓN Y ANALISIS DE DATOS.....35

3.8.1 Metodología para la determinación del contenido proteico de biomasa y harina de microalgas…….35

3.8.2 Cultivo de microalgas marinas en el laboratorio; en condiciones semi controladas…….36

3.8.2.1 Obtención y acondicionamiento de las cepas de microalgas……..36

3.8.2.2 Abastecimiento de aguas de mar……37

3.8.2.3 Preparación del medio F/2 modificado Guillard…….38

3.8.2.4 Limpieza y desinfección de materiales……39

3.8.2.5 Esterilización de materiales y agua de mar……40

3.8.2.6 Fase ceparios……41

3.8.2.7 Fase inicial……..…….43

3.8.2.8 Fase intermedio…….……45

3.8.2.9 Fase masivo…….……47

3.8.2.10 Determinación del crecimiento de las tres especies de microalgas marinas en laboratorio……..……...……...49

3.8.2.11 Obtención de biomasa húmeda……..……51

3.8.2.12 Obtención de la harina de microalgas……..…..53

3.8.2.13 Determinación del análisis proximal como biomasa húmeda y como harina de microalgas comparando los valores obtenidos de proteínas por cada una de las especies de microalgas……55

3.8.2.14 Análisis estadístico de datos…….55

CAPITULO IV : RESULTADO Y DISCUSÏON……..57

4.1 RESULTADOS……57

4.1.1 Cultivo de microalgas marinas en laboratorio de microalgas; en condiciones semi controladas hasta la obtención de biomas húmeda y harina de microalgas…….....57

4.1.1.1 Condiciones del cultivo de microalgas desde la fase Cepario y hasta la Fase Masiva ……..…….57

4.1.1.2 Obtención de biomasa húmeda……....62

4.1.1.3 Obtención de la harina de microalgas…….....66

4.1.2 Evaluación del crecimiento de las tres especies de microalgas marinas en laboratorio…….....67

4.1.2.1 Fase inicial……..……..……..67

4.1.2.2 Fase intermedia…….....……68

4.1.2.3 Fase masiva…….....……...70

4.1.3 Determinación el análisis proximal como biomasa húmeda y como harina de microalgas comparando los valores obtenidos de proteínas por cada una de las especies de microalgas.....72

4.1.3.1 Análisis proximal.....72

4.1.3.2 Determinación del porcentaje de proteínas.....75

4.2 DISCUSION.....79

4.2.1 Cultivo de microalgas marinas en laboratorio; en condiciones controladas.....79

4.2.2 Evaluación del crecimiento de las tres especies de microalgas marinas en laboratorio.....80

4.2.2.1 Fase masiva.....80

4.2.3 Determinar el análisis proximal como biomasa húmeda y como harina de microalgas comparando los valores obtenidos de proteínas por cada una de las especies de microalgas.....82

4.2.3.1 Análisis proximal.....82

4.2.3.1.1 Determinación del porcentaje de proteínas.....83

CAPÍTULO V :CONCLUSION Y RECOMENDACIONES…….....87

5.1 CONCLUSIONES……...87

5.2 RECOMENDACIONES…….89

REFERENCIAS.....91

ANEXOS..... 97

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Curva representativa de crecimiento de un cultivo estático de microalgas……..17

Figura 2. Macro localización del proyecto……..…25

Figura 3. Micro localización del proyecto…..……..26

Figura 4. Ubicación Universidad Nacional de Moquegua (Laboratorio)……..….27

Figura 5. Diseño cuasi experimental……...29

Figura 6. Diagrama de flujo de la metodología para la determinación del contenido proteico de biomasa y harina de microalgas…….....35

Figura 7. Cepas del laboratorio costero de Ilo del Instituto del Mar del Perú……...37

Figura 8. Bombeo de agua de mar……..38

Figura 9. Medio F/2 modificado (Guillard 1975)……39

Figura 10. Autoclave (Marca: BOECO Germany)…..……41

Figura 11. Acondicionamientos de cepas……...42

Figura 12. Preparación del medio solido……..43

Figura 13. Matraces de 250 ml inoculados con microalgas……..45

Figura 14. Matraces de 500 ml inoculados con microalgas……..45

Figura 15. Matraces de 1000 ml y 7L inoculados con microalgas……..47

Figura 16. Fotobiorreactor vertical del Invernadero de microalgas de la UNAM – FILIAL ILO……49

Figura 17. Recuento de microalgas……..51

Figura 18. Extracción de la biomasa húmeda producida..…..53

Figura 19. Pesado de la biomasa seca……...54

Figura 20. Relación de biomasa húmeda y crecimiento de microalgas……..63

Figura 21. Curva de crecimiento de microalgas (Fase Inicial)……..……...68

Figura 22. Curva de crecimiento de microalgas (Fase Intermedia de 1L)…….69

Figura 23. Curva de crecimiento de microalgas (Fase Intermedia de 7L)…….....70

Figura 24. Curva de crecimiento de microalgas (Fase Masiva)……71

Figura 25. Contenido proteico de la biomasa húmeda de las tres especies de microalgas……75

Figura 26. Contenido proteico de la harina de las tres especies de microalgas……..76

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Condiciones estandarizadas para el cultivo de las tres especies de microalgas……..……58

Cuadro 2. Parámetros físico químicos de la fase intermedio de las tres especies de microalgas…….……60

Cuadro 3. Parámetros físico químicos de la fase Masiva de las tres especies de microalgas……..……61

Cuadro 4. Obtención de biomasa húmeda de las tres especies de microalgas……...62

Cuadro 5. Tabla ANOVA por bloques de biomasa húmeda..……..63

Cuadro 6. Relación de biomasa húmeda y crecimiento de microalgas……....63

Cuadro 7. Tabla ANOVA por bloques de biomasa seca o harina……..….....65

Cuadro 8. Obtención de Harina de las tres especies de microalgas……..66

Cuadro 9. Tabla ANOVA para la curva de crecimiento……..71

Cuadro 10. Comparación de medias para la concentración celular entre especies……..……72

Cuadro 11. Análisis Proximal Biomasa húmeda de microalgas……73

Cuadro 12. Análisis Proximal Harina de microalgas……74

Cuadro 13. Tabla ANOVA por bloques de porcentaje de proteína……76

Cuadro 14. Tabla ANOVA por bloques de determinación proteica de harina de microalgas…….……...77

Cuadro 15. Comparación de medias para la determinación proteica de harina de microalgas, entre especies……..…..78

Cuadro 16. Contenido de proteínas de biomasa húmeda……83

Cuadro 17. Contenido de proteínas de la Harina de microalgas……..…..85

INDICE DE ECUACIONES

Ecuación [1]. Concentración celular……...50

Ecuación [2]. Obtención de Biomasa Húmeda……..52

Ecuación [3]. Obtención de Biomasa Húmeda……..54

INDICE DE ECUACIONES

Tabla I. Contenido de proteínas en microalgas……14

INDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. Matriz de consistencia…….....97

ANEXO 2. Preparación del medio F/2 modificado (Guillard 1975) para microalgas marinas…….……...98

ANEXO 3. Diagrama del cultivo de microalgas en el laboratorio microalgas de la UNAM – Filial Ilo..…….....99

ANEXO 4. Diagrama del proceso del lavado de materiales de vidrio…100

ANEXO 5. Proceso de preparación del medio líquido……101

ANEXO 6. Proceso de preparación del Medio Solido……102

ANEXO 7. Formato Nº 01 Control del cultivo de microalgas……103

ANEXO 8. Formato Nº 03 Control de parámetros de cultivo……..104

ANEXO 9. Formato Nº 02 Recuento de microalgas…….……..105

ANEXO 10. Formato Nº 04 Obtención de biomasa húmeda y liofilizada)…….……..106

ANEXO 11. Producción del cultivo microalgas en el laboratorio microalgas de la UNAM – Filial Ilo…….....107

ANEXO 12. Identificación microscópica de microalgas……112

ANEXO 13. Cosecha de as microalgas……...114

ANEXO 14. Biomasa húmeda y harina de las microalgas……115

INTRODUCCION

Es conocido que uno de los cuellos de botella para el desarrollo de la acuicultura es la alimentación de los peces con “pellets”, que son producidos con elevadas proporciones de harina de pescado, insumo que no sólo es costoso sino que contribuye a incrementar la presión de la pesquería de la anchoveta (*Engraulis ringens*), recurso cuya biomasa está disminuyendo drásticamente. Por ello, surge la necesidad imperante de buscar alternativas equivalentes a la harina de pescado, que tengan similares cualidades proteicas, y económicas que la reemplacen (FAO., 2013).

Con ese propósito el presente estudio investigó si es posible reemplazar total o parcialmente la harina de pescado, en la fabricación de los “pellets”, con biomasa húmeda y seca de tres especies de microalgas: *Chlorella vulgaris, Nannochloropsis oculata* y *Tetraselmis striata*, Objetivo que se dilucidó determinando el análisis bioquímico de las biomasas obtenidas en la investigación.

Las microalgas representan una fuente proteínica con posibles aplicaciones en la nutrición humana y como complemento de piensos animales, debido básicamente a sus elevados contenidos proteicos, lípidos, almidón, glicerol, pigmentos naturales o biopolímeros y bajos valores de ácidos nucleicos en comparación con otras fuentes de proteína unicelular. (Morris, 1999), (Gómez, 2007).

El género *Chlorella* se comercializa como suplementos alimentarios, también algunas especies se comercializan por su valor medicinal, protege contra la insuficiencia renal y promoción del crecimiento de *Lactobacillus* intestinales. Además favorece la disminución en concentraciones de colesterol sanguíneo. (Morris, 1999), (Brennan, L., & Owende, P, 2010), (Mendoza, H., Jara, A., & Portillo, E, 2011).

Morris, Quintana, Almarales, & Hernandez, (1999), Andrade, Torres, Montes, & Fernández, (2007) estudiaron la composición bioquímica de la biomasa seca (harina), de la microalga *Chlorella vulgaris*, cultivada en régimen autotrófico, evidenciándose un elevado contenido de proteína bruta y verdadera, entre 30 %, y 56,25 %, y concluyeron que puede ser utilizada como suplemento nutricional por tener un buen nivel de aminoácidos esenciales, digestibilidad de la biomasa, con un valor de 75,9 %, y el contenido relativamente bajo de aminoácidos sulfurados. Asimismo, Morris et al., (1999) menciona ser una alternativa de fácil accesibilidad, bajo costo y alto rendimiento,

Según Morris et al., (1999) la utilización de la biomasa autotrófica de *Chlorella vulgaris* como materia prima en la formulación de suplementos dietéticos y preparados bioestimulantes, en virtud de su composición bioquímica y calidad proteica. (Rincón et al., 2012), sugiere que la harina de pescado puede ser sustituida parcialmente por la harina de la microalga

Spirulina máxima hasta en un 30% en la elaboración de dietas para la alimentación de alevines de tilapia roja.

(IMARPE, 2008), (Aguilar, 2011), (Ynga Huamán, 2011), (Liza Sal y Rosas, 2015), (Méndez, 2017), desarrollaron el cultivo de varias cepas de microalgas: *Chaetoceros gracilis, Chaetoceros muelleri, Phaeodactylum tricornutum, Navicula salinicola, Chlorella ellipsoidea, Chlorella vulgaris, Tetraselmis striata, Isochrysis galbana, Pavlova lutherii (Monochrysis lutherii), Nannochloropsis maculata, Nannochloropsis oculata, Nannochloropsis spp.,* en sistemas controlados aplicando diversas técnicas de cultivo.

Por ello, el presente trabajo de investigación tiene como objetivo determinar el contenido proteico de la biomasa húmeda y de la harina de tres especies de microalgas en condiciones semi controladas, y obtener la microalgas con mayor contenido proteico, esta es una base que permitirá en el futuro usar como fuente nutritiva a las microalgas para la elaboración de alimento para peces “pellets” que tenga un alto contenido de proteínas que equipare a la harina de pescado.

CAPITULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. DESCRIPCIÓN DE LA REALIDAD PROBLEMÁTICA

Es conocido que uno de los punto críticos para el desarrollo de la acuicultura es la alimentación de los peces, y las empresas que producen “pellets” alimentos para peces, usan como insumo principal la harina de pescado, hecha en base a la anchoveta, recurso cuya biomasa está disminuyendo drásticamente por la pesca excesiva, por ello estamos frente a una realidad en la que ya no puede seguir usándose el recurso referido como materia prima primordial para la producción de harina de pescado.

Otro de los problemas del uso de la harina de pescado son sus costos elevados por ellos se debe investigar otras alternativas que tengan similar contenido proteico a la harina de pescado, esto como insumo principal para producir alimento para peces.

Ante esta realidad problemática surge la idea de complementar las dietas alimenticia de peces (pellets), por una harina alternativa hecha en base a la biomasa húmeda y seca de microalgas, pretendiendo con ello fortalecer la alimentación en la acuicultura, con esa intención el presente trabajo consiste en determinar el contenido proteico de la biomasa húmeda y seca procedente de un cultivo de tres tipos de

microalgas, que tienen un alto contenido proteico además de lípidos insaturados de alta calidad como son el omega 3 y omega 6, requerimientos nutricionales necesarios que permiten el crecimiento óptimo de los peces en un cultivo.

1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

1.2.1 INTERROGANTE GENERAL

¿Cuál es el Contenido proteico de la biomasa húmeda y de la harina de tres especies de microalgas marinas; *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oculata* y *Tetraselmis striata* cultivada en el laboratorio de la Universidad Nacional de Moquegua durante el año 2017?

1.3. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN

La acuicultura es una actividad que está en apogeo, mostrando una tendencia en su crecimiento cada vez más acelerada, por ello se viene desarrollando en forma exitosa en diferentes países, no solo porque genera mayores ingresos para las empresas dedicadas a esta actividad sino puestos de trabajo directo e indirecto para las personas. Para que el grado de rentabilidad de estas empresas sea el máximo, los costos en la producción deben reducirse al máximo, sobre todo en los precios del alimento “pellets”,

por cuanto este insumo representa el 50% del gasto total de las empresas piscícolas. Y siendo que el alimento para peces “pellets” está hecho con harina de pescado, insumo costoso, es preciso buscar una alternativa de insumo de similar contenido proteico que aporte a la elaboración de alimentos para peces. La producción de fuentes alternativas de alimentos es de suma importancia y el cultivo de las microalgas *Spirulina* representa una de esas alternativas, puesto que su velocidad de crecimiento es mayor a la de los cultivos agrícolas y muy similar a la de microorganismos como levaduras y bacterias, duplicando su biomasa de 3 a 5 días. (Jourdan, 1999).

Por ello, el presente trabajo de investigación es una base que permitirá en el futuro usar como fuente nutritiva a las microalgas para la elaboración de alimento para peces “pellets” que tenga un alto contenido de proteínas que equipare a la harina de pescado.

1.4. OBJETIVO

1.4.1 Objetivo General

Determinar el contenido proteico de biomasa húmeda y harina de tres especies de microalgas marinas; *Chlorella vulgaris, Nannochloropsis oculata y Tetraselmis striata,* cultivadas en el laboratorio de la Universidad Nacional de Moquegua – filial Ilo, durante el 2017.

1.4.2 Objetivos Específicos

a) Cultivar las microalgas marinas en laboratorio de Microalgas en la UNAM - Filial Ilo hasta la obtención de biomasa húmeda y harina de microalgas.
b) Evaluar el crecimiento de las tres especies de microalgas marinas en laboratorio.
c) Determinar el análisis proximal como biomasa húmeda y como harina de microalgas comparando los valores obtenidos de proteínas por cada una de las especies de microalgas

1.5. FORMULACIÓN DE HIPÓTESIS

1.5.1 Hipótesis general

Las especies de microalgas seleccionadas presentan diferente contenido proteico tanto en las condiciones de biomasa húmeda como en la harina cultivadas en el laboratorio de Microalgas de la Universidad Nacional de Moquegua - Filial Ilo.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 ANTECEDENTES DEL ESTUDIO

El análisis proximal de la microalga *Spirulina* se encuentra bien estudiado, es notorio su enorme porcentaje proteico entre 65 y 71%, además de la presencia de aminoácidos esenciales necesarios para la dieta de cualquier individuo vivo en desarrollo (El-Sayed AM, 1991).

Se estudió la composición bioquímica de la microalga *Chlorella vulgaris,* cultivada en régimen autotrófico, donde se evaluó la calidad de proteína de la biomasa seca, se evidenció un elevado de contenido de proteína bruta y verdadera, superiores al 40 y 30 %, concluyendo que puede ser utilizada como suplemento nutricional. (Humberto J. Morris Quevedo, 1999).

Pequeñas cantidades de *Spirulina* en la dieta de peces produce efectos significativos sobre el crecimiento, la utilización del alimento, la condición fisiológica, la respuesta al estrés, la resistencia a enfermedades, así como en la calidad de la carne en cuanto al contenido de grasa y coloración (Coverti A, Lodi A, Del Borghi A, Solisio C., 2006), (Ramírez L, 2006).

En la investigación de obtención de harina a partir del cultivo de *Chlorella vulgaris* y su análisis proteico; así mismo la obtención de proteína a partir organismos unicelulares es una alternativa de fácil accesibilidad, bajo costo y alto rendimiento. Cultivando la microalga *Chlorella vulgaris* a nivel de laboratorio, transformándola en harina, determinando la composición bioquímica y las características del perfil de aminoácidos esenciales. Las mediciones de concentración de proteína bruta revelaron valores relativamente altos, 56,250%, con un buen nivel de aminoácidos esenciales. (Ricardo D. Andrade, 2006).

IMARPE – Ilo 2008. Informe anual "Condicionamiento de reproductores y obtención de semillas de concha de abanico *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819), en un sistema controlado experimental en el puerto de Ilo", las cuales contiene la aplicación de técnicas de cultivo de microalgas donde se trabajaron con 07 cepas de microalgas: *Chaetoceros gracilis, C. muelleri* (México), *Phaeodactylum tricornutum* (España), *Isochrysis galbana var. tahitiana, Pavlova lutherii (Monochrysis lutherii), Nannochloropsis maculata y N. oculata*. (IMARPE, 2008).

Las microalgas presentan características atractivas para la obtención de proteínas. Están pueden cultivarse en dos tipos de sistema: sistemas abiertos, pueden ser viveros o estanques y sistemas cerrados, como el caso de los fotobioreactores,

proporcionan a las microalgas un ambiente controlado para su crecimiento; sin embargo, los costos de producción son más elevados, que podrían reducirse si se colocan cerca de industrias que emitan gran cantidad de CO_2, con la finalidad de favorecer el secuestro de carbono y paralelamente un incremento en el crecimiento. (Garibay-Hernández, 2009).

La harina de pescado puede ser sustituida parcialmente por la harina de la microalga *Spirulina máxima* hasta en un 30% en la elaboración de dietas para la alimentación de alevines de tilapia roja, según (Rincon DD, 2012).

2.2 BASES TEÓRICAS

2.2.1 Microalgas

Las microalgas pueden definirse como organismos unicelulares eucariotas y fotosintéticos. Las microalgas son esenciales en la producción primaria dentro de la cadena trófica, que es al mismo tiempo, 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 al de las plantas, por lo cual necesitan de la luz para desarrollarse y crear materia orgánica. (Morales & A, 2015).

2.2.2 Tipo de Condiciones de Cultivo de microalgas

Hay cuatro grandes tipos de condiciones de cultivo de microalgas siendo estas (Bermeo, 2011):

- **Fotoautróficos:** Los sistemas de cultivo fotoautróficos cuando se usa la luz solar como fuente de energía y el carbono inorgánico para formar energía a través de la fotosíntesis.
- **Heterótrofos:** Los cultivos en condiciones heterotróficas significa que ciertas especies de microalgas pueden crecer en presencia de carbono orgánico (como la glucosa, acetato, glicerol, fructosa, sacarosa, lactosa, galactosa) y bajo condiciones de oscuridad.
- **Mixotróficos:** Los cultivo de microalgas mixotróficos las microalgas son capaces de vivir en cualquiera de las condiciones fototróficas o heterótricas.
- **Fotoheterotróficos:** Los cultivos fotoheterotróficos necesitan la luz y compuestos orgánicos como fuente de carbono.

2.2.3 Formas de Cultivo

Existen dos tipos básicos de cultivo de microalgas y estas son:

- **Cultivos abiertos :** son los cuales la biomasa se encuentra expuesta a las condiciones del ambiente (Hernández-Pérez A. & Labbé, 2014).

- **Cultivos cerrados**: (también llamados fotobiorreactores) en los que es posible aislar la biomasa de factores ambientales tales como contaminación y la lluvia. (Hernández-Pérez A. & Labbé, 2014).

2.2.4 Descripción de *Chlorella vulgaris*

Es un género de alga verde unicelular, sus células tienen forma esférica y miden de 2 a 10 µm de diámetro, no poseen flagelo. Es una especie de microalga que se reproduce rápidamente a través de la fotosíntesis en medios autotróficos, heterotróficos y mixotróficos. La *Chlorella vulgaris* es una de las especies más estudiadas e investigadas como un recurso para reemplazar los combustibles fósiles y para alimento. (Bermeo, 2011).

Taxonomía

Imperio	:	Eukaryota
Reino	:	Plantae
Phylum	:	Chlorophyta
Clase	:	Trebouxiophyceae
Orden	:	Chlorellales
Familia	:	Chlorellaceae
Género	:	*Chlorella*
Especie	:	*Chlorella vulgaris* (Beyerinck)

Fuente: (Alagabase, 2017)**.**

2.2.5 Descripción de *Nannochloropsis oculata*

Nannochloropsis son algas marinas unicelulares de flotación libre, con células subesférica, de 2 - 4, micras del diámetro. O cilíndrica, 3 - 4 x 1.5 micras. Cloroplasto pariental amarillo – verde. (Antia, N. 3. & Cheng, J. Y, 1982).

Taxonomía

Imperio	:	Eukaryota
Reino	:	Chromista
Phylum	:	Ochrophyta
Clase	:	Eustigmatophyceae
Orden	:	Eustigmatales
Familia	:	Monodopsidaceae
Genero	:	*Nannochloropsis*
Especie	:	*Nannochloropsis oculata* (Droop) D.J.Hibberd

Fuente : (Algabase, 2017)**.**

2.2.6 Descripción de *Tetraselmis striata*

Tetraselmis striata es una microalga unicelular de color verde que forma pequeñas colonias, cada una cuenta con su propia envoltura y mucílago transparente, agrupándose en 2 células de forma sub esféricas, y su tamaño celular es de alrededor de 10 µm. de diámetro. (Ohse, y otros, 2008)**.**

Taxonomía

Imperio	:	Eukaryota
Reino	:	Plantae
Phylum	:	Chlorophyta
Clase	:	Chlorodendrophyceae
Orden	:	Chlorodendrales
Familia	:	Chlorodendraceae
Género	:	*Tetraselmis*
Especie	:	*Tetraselmis striata* (Butcher)

Fuente: (Algaebase, 2017).

2.2.7 Microalgas con mayor contenido de proteínas

En cuanto la información nutricional con mayor contenido proteico de microalgas, tenemos: (Cuadro 01)

Tabla I. Contenido de proteínas en microalgas

Especie	**Proteínas** (% en peso base seca)
1. *Espirulina máxima*	60 – 70
2. *Espirulina platensis*	46 – 63
3. *Chlorella vulgaris*	51 – 58
4. *Nannochloropsis sp.*	12 – 53
5. *Tetraselmis maculata*	52

Fuente: (Mata, 2010).

2.2.8 Biomasa de microalgas

La biomasa de las microalgas contiene tres componentes principales: las proteínas, cuyo porcentaje sobre el peso seco puede variar del 46-63%; los carbohidratos, con porcentajes generalmente entre el 10-17%; y los lípidos, con porcentajes que varían del 4-61%. En menor medida; se encuentran los ácidos nucleicos. De todas ellas, los lípidos son las biomoléculas de mayor interés en el proceso de obtención de biocombustibles. La biomasa que presentan los cultivos de microalgas, son para saber cuál es la proporción de alimento que se va a suministrar. (Richmond, 2004).

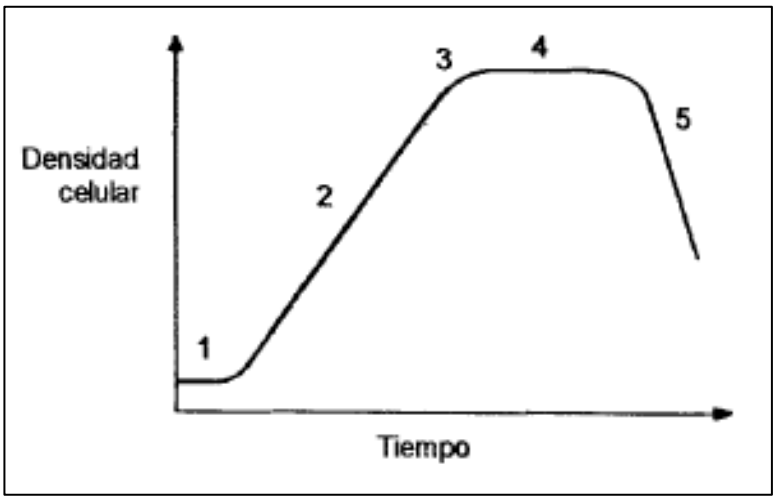
2.2.9 Crecimiento de microalgas

Esta plasticidad metabólica les permite adaptarse a diferentes ecosistemas y procesos biotecnológicos, generando biomasa que puede ser usada en la producción de alimentos, concentrados, compuestos bioactivos, biocombustibles, en la biorremediación y la producción de biofertilizantes.

En el cultivo de microalgas se hace necesario el conocimiento de la cinética de crecimiento de cada especie en cada determinado volumen independientemente de la especie y el volumen al que es cultivada se reconoce un patrón estándar de crecimiento indicado por las siguientes fases (Thake, Fogg G E and B, 1987). (Figura 1). Siendo estas:

- **Fase de adaptación**: En donde no ocurre incremento en el número de células pudiendo incluso llegar a disminuir en número con respecto al inoculo inicial. .
- **Exponencial:** Ya una vez adaptadas al medio de cultivo las microalgas comienzan a multiplicarse puesto que la división da lugar a nuevas células que son capaces de dividirse el aumento en número de microalgas se acelera continuamente en forma exponencial.
- **De declinación relativa de crecimiento**: En este caso conforme el cultivo va creciendo se da una disminución de nutrientes cambios de pH y alteración de otros factores como consecuencia del incremento de la población de ahí que las microalgas disminuyan su tasa de división celular.
- **Estacionaria:** Cuando ya no se aprecia una división celular neta esto es que el número de células alcanzado se mantiene constante por cierto periodo de tiempo debido al balance entre la natalidad y la mortalidad que presenta la población en cultivo.
- **De muerte:** Las células pueden durar en fa fase anterior semanas e incluso meses aunque lo más normal es que comiencen a morir es entonces cuando se presenta esta fase.

Figura 1. Curva representativa de crecimiento de un cultivo estático de microalgas (Modificado de Thake 1987)



1. Fase de adaptación **2**. Fase de crecimiento exponencial **3.** Fase de declinación relativa de crecimiento **4.** Fase estacionaria **5.** Fase de muerte

2.2.10 Reproducción de microalgas

La reproducción es la manera de asegurar la sobrevivencia de una especie a lo largo del tiempo, y en buena medida es responsable de la biodiversidad del planeta. Existen dos tipos de formas de reproducción: la asexual y la sexual. La primera es la más sencilla y se presenta entre organismos como las bacterias y las amebas; la segunda involucra la unión de células reproductivas o gametos a lo que se le conoce como fecundación. (Karim, 2001). Entre ellas tenemos:

- **Reproducción Asexual:** suele ser por división simple, originándose dos a mas células si están provistas de flagelos

tienen movilidad y se le denomina zoosporas y las que no tienen flagelos se les denomina aplanosporas.

Se mencionan las siguientes fases:

a) División mitótica
b) Formación de zoosporas o aplanosporas
c) Producción de autoesporas
d) Fragmentación
e) Acinetos

- **Reproducción sexual**; en este ciclo se unen dos células llamadas gametos para dar como producto una célula encargada de perpetuar a la especie. Se mencionan las siguientes fases:

a). Isogamia: Gametos morfológicamente idénticos

b). Anisogamia: (heterogamia), gametos diferentes en tamaño o en morfología interna.

c). Oogamia: Es un caso extremo de anisogamia,el gameto femenino no posee flagelos (oosfera), los gametos masculinos son móviles (anterozoidez).

d). Citogamia: Fusion de contenido celular por un puente de fusión.

2.2.11 Fases del Cultivo microalgal, IMARPE-Sede Ilo

- **Fase de Cepario**

Las cepas aisladas, serán mantenidas en medio líquido (contenidas en tubos de ensayo) y en medio sólido (placas petri), proporcionándoles nutrientes, condiciones de iluminación constante y temperatura (20 ±1 °C), factores necesarios para su crecimiento. Se transferirán 3 gotas de inóculo de la cepa antigua en tubos de 10 ml, utilizando una micropipeta estéril previamente flameada en el mechero y en condiciones de estricta asepsia. (IMARPE, 2008).

- **Fase Inicial**

En esta fase los cultivos se desarrollarán en matraces de 250 y 500 mL de capacidad, los cuales contienen 150 y 300 mL de agua de mar esterilizada y enriquecida, respectivamente. En los matraces de 250 mL, se inocularan 50 mL de la especie de interés, flameando la boca del matraz en el momento del repique. Se rotulará colocando el nombre de la especie, fecha y se tapará con papel aluminio.

Luego, serán colocados en la estantería bajo temperatura y luz constante y renovados dos veces por semana.

En los matraces de 500 mL se inocularan 50 a 100 mL de la especie de interés provenientes de la producción obtenida en los matraces de 250 mL, flameando la boca del matraz en el momento del repique,

teniendo cuidado de no transferir las células sedimentadas (concho). Se rotula (nombre de la especie y fecha) disponen de un tapón provisto de un capilar para el suministro de aire y son ubicados en su estantería con temperatura y luz constante. Su renovación depende de la producción requerida. (IMARPE, 2008).

- **Fase de Cultivo Intermedio**

Los cultivos de microalgas se desarrollaran en volúmenes que van desde 1 a 5 L. Estos se dispondrán en matraces de 1000 mL (con 800 mL de agua de mar esterilizada y enriquecida), en los cuales se adicionan 100 mL del inóculo de la especie de interés. Se rotularan y se les coloca el tapón y capilar para disponerlos en su estantería con temperatura y luz constante.

Las botellas de 5 L de capacidad, son “cebadas” con agua de mar esterilizada (3 repeticiones), para evitar la acumulación de residuos contenidos en el agua potable. En estas botellas se vierten 4 L de agua de mar filtrada (1µ), irradiada por UV y “envejecida”. Luego, se adicionan 0.13 mL de Proline F/2 AlgaeFood (Part A y Part B) por cada litro de agua de mar esterilizada. Posteriormente se inoculan con cultivos procedentes de los matraces de 1L. Finalmente, se colocan las tapas y el capilar para el suministro de aire y se colocan en estantería bajo temperatura y luz constante, se registrará

diariamente la temperatura, intensidad lumínica y semanalmente el oxígeno disuelto, pH y salinidad. (IMARPE, 2008).

- **Fase de cultivo masivo**

Los volúmenes de cultivo van de 20 a 150 L. Las bombonas de 20 L son cebadas 3 veces con agua de mar esterilizada, para evitar la acumulación de residuos contenidos en el agua potable. Se suministra 15 L de agua de mar filtrada (1µ), irradiada por UV y "envejecida" y se adicionan 0.13 mL de Proline F/2 Algae Food (PartA y Part B) por cada litro de agua de mar esterilizada y solo en el caso de diatomeas 0.01g de Metasilicato de Sodio. Posteriormente, se inocula con cultivos procedentes de las botellas de 5 L que presenten las mejores características de crecimiento (color característico y morfología óptima). Se coloca papel aluminio y el capilar para el suministro de aire. Inmediatamente se les ubica en la estantería bajo temperatura y luz constante. Los tanques verticales de fibra de vidrio (250 L de capacidad) son cebados con agua de mar micro filtrada hasta 1µ e irradiada con UV, con flujo bajo. Posteriormente se les agrega 130 L de agua esterilizada.

Luego, se adicionan 0.13 mL de Proline F/2 Algae Food (Part A y Part B) por cada litro de agua de mar esterilizada y 0.01g de Metasilicato de Sodio solo en el caso de diatomeas. Se suministra

aire constante y moderado para agitar la columna de agua y se inocula con la especie de interés procedente de las bombonas de 20L (02 bombonas por tanque). Las botellas de 20 L deben permanecer sin aire (1 hora aproximadamente) antes de su inoculación, para que sedimenten las células muertas (que conforman el “concho”) y no se transfirieran al tanque vertical. Se rotulan los tanques (especie objetivo y fecha de inoculación) y se mantienen bajo temperatura y luz constante. (IMARPE, 2008).

2.3 DEFINICIÓN DE TÉRMINOS

2.3.1 Microalga

Las microalgas son microorganismos unicelulares marinos o de agua dulce microscópicos, que tienen la capacidad de realizar la fotosíntesis. Además, tienen una mejor disponibilidad para asimilar Carbono en forma de Dióxido de Carbono y otros nutrientes del medio acuoso. Microalgas son fotoautótrofos (fotosintéticas). (Borowitzka, 2010).

2.3.2 Contenido proteico total de microalgas

Los componentes orgánicos principales de la biomasa microalgal son las proteínas los que varían, dentro de una misma

especie, según las condiciones de nutrición, y temperatura a las que se somete el cultivo. (MORRIS, 2002).

2.3.3 Biomasa húmeda de microalgas

La biomasa humedad es la cantidad de agua que contiene la microalga; es la diferencia entre el peso total de la microalga, y el contenido en agua.

Las microalgas están presentes en cualquier medio natural donde exista una fuente de carbono, nutrientes y luz suficiente, junto con un intervalo apropiado de temperatura. Hasta la fecha se han descrito más de 40.000 especies. (Elliott, 2012).

2.3.4 Liofilizado de microalgas

La liofilización consiste en desecar un producto previamente congelado, lográndose la sublimación del hielo bajo vacío. Por lo tanto el paso directo del hielo (solido) a gas (vapor), que en ningún momento aparezca el agua en su estado líquido. (Eider Eraza Moreno, 2017).

2.3.5 Centrifugación

Aparato diseñado para acelerar las separación de partículas sólidas suspendidas en líquidos, la velocidad la cual sedimenta depende del tamaño de partícula viscosidad de líquido y fuerza

gravitacional.. La célula se ve sujeta a dos fuerzas en sentido opuesto una al fondo del tubo y otra opuesta a la viscosidad del medio. (Rubio, 2001).

2.3.6 Cámara Neubauer

Es un instrumento de precisión hecho de vidrio óptico especial. Se utiliza para contar células u otras partículas en suspensiones bajo el microscopio. (GOMEZ CASTILLO, 2012)

Y esta presenta dos cámaras. En la cara superior del portaobjetos se encuentran cuatro canales longitudinales y un canal transversal central a cuyos lados superior e inferior existen grabados dos cuadros de 9 mm^2 de superficie subdivididos a su vez en una cuadricula más fina. (PIÑERA, 2002).

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

3.1 LUGAR DE EJECUCIÓN

El presente trabajo de investigación se desarrolló durante el año 2017, en el laboratorio de la Universidad Nacional de Moquegua– Filial Ilo ubicada en Ciudad Jardín s/n, distrito de Pacocha, provincia de Ilo, departamento de Moquegua, Perú; la posición de coordenadas georreferenciadas: latitud de sur 17°36.092 y longitud oeste 71°20.437 (Figura 2,3,4).

Figura 2. Macro localización del proyecto



Fuente: Google Maps (2017)

Figura 3. Micro localización del proyecto



Fuente: Google Maps (2017)

Figura 4. Universidad Nacional de Moquegua (Laboratório de Microalgas)



Fuente: Google hearth (2017)

3.2 TIPO Y DISEÑO

Descriptivo - Cuasi Experimental

El diseño de la investigación es cuasi experimental, puesto que para la obtención de los resultados finales, se controlan todos los factores y se realizará las observaciones de crecimiento de las microalgas.

Cuasi Experimental: Poseen aparentemente todas las características de los experimentos verdaderos. La principal diferencia con estos es según los casos, en la imposibilidad de manipular la variable independiente y/o asignar aleatoriamente los sujetos a las condiciones experimentales. (Stanley, 1966).

3.3 NIVEL DE INVESTIGACIÓN

Comparativo

3.4 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

3.4.1 Variable independiente

Especie de microalgas

Indicadores:

Peso de biomasa húmeda de microalgas (gr.)

Peso de harina de microalgas (gr.)

3.4.2 Variable dependiente

Contenido proteico

Indicadores:

3.5 POBLACIÓN Y/O MUESTRA DE ESTUDIO

3.5.1 La población

La población estará constituida por la población total de microalgas cultivadas en el laboratorio de las instalaciones de la

Universidad Nacional de Moquegua – Filial de Ilo, para tener tres poblaciones de microalgas comparativas en su crecimiento.

3.5.2 Muestra

Son todas las microalgas centrifugadas que constituyen la población

3.6 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS PARA RECOLECCIÓN DE DATOS

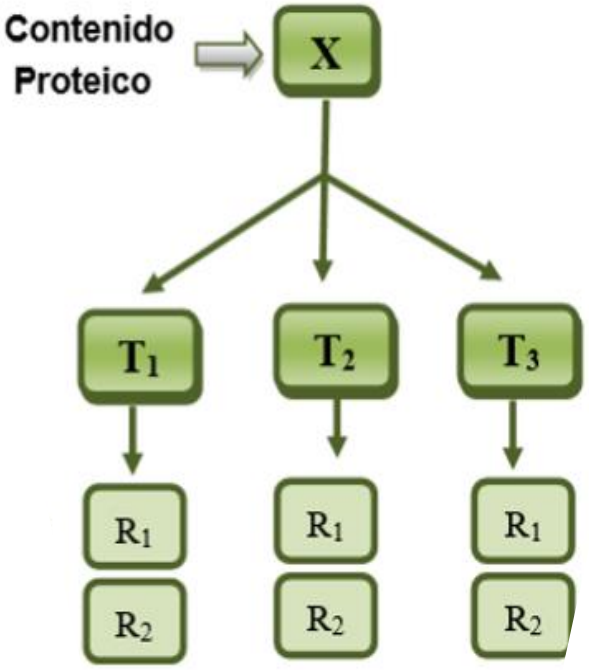
3.6.1 Técnicas

Para la recolección de información se realizó como técnicas de recolección de datos, el recuento celular y los análisis de determinación de porcentaje de proteínas

3.6.2 Diseño experimental

El diseño es cuasi experimental, para ello se aplicaron tres tratamientos cada uno con sus repeticiones respectivas, para determinar el análisis proximal de las tres especies de microalgas como biomasa húmeda y como harina de microalgas. Como se muestra en la siguiente (Figura 5).

Figura 5: Diseño cuasi experimental



Fuente: Elaboración propia (2017)

T_1: Cepa 1 (*Chlorella vulgaris*)

T_2: Cepa 2 (*Nannochloropsis oculata*)

T_3: Cepa 3 (*Tetraselmis striata*)

R_1, **R_2**, Cultivo en fotobiorrectores

3.7 MATERIALES Y EQUIPOS

3.7.1 Materia Prima

- Cepas de tres especies de microalgas (*Chlorella vulgaris, Nannochloropsis oculata y Tetraselmis striata)*
- Agua de mar esterilizada y enriquecida

3.7.2 Equipo

- Cámara de Neubauer de vidrio

  Marca : HBG/SUPERIOR (4mm x 30mm x 70 mm)

  Procedencia : Aleman

- Multiparámetro

  Marca : WTW

  Modelo : 3630 IDS

  Serie : 16370594

- Microscopio,

  Marca : MICROS AUSTRIA

  Modelo : MC20i

  Serie : 2-102935

- Centrifugadora

  Marca : GEA

  Modelo : OTC 3 - 02 - 137

  Serie : 9074 – 117

- Autoclave

  Marca : BOECO Germany

  Modelo : BTE - 23D

  Serie : E57074823D2B21110Y

- Luxómetro

  Marca : CONTROL COMPANY

  Modelo : 3251

  Serie : 170020752

- Sellador

  Marca : SAFARI IMPORT

  Modelo : PFS - 300

  Serie : KS – 300

- Blower

  Marca : RESUM

  Modelo : ACO - 003

  Potencia : 35 Watts

- Bomba de agua

  Marca : AQUAMAX

  Modelo : TCPI58

  Serie : AZ016030285

- Balanza de precisión

  Marca : A & D COMPANY, LIMITED

  Modelo : GR - 200

Serie : 14246028

Capacidad : Min 10 mg

Max 210 gr.

- Refrigerador

  Marca : BOSH

  Modelo : ECO – TT260

  Serie :656040078382000250

- Fluorescentes

  Marca : PHILIPS

  Potencia : 36 Watts

3.7.3 Materiales de laboratorio

- Matraz Erlenmeyer de 250 ml
- Matraz Erlenmeyer de 500 ml
- Matraz Erlenmeyer de 1000 ml
- Matraz Erlenmeyer de 2000 ml
- Botella transparente de 1000 ml
- Botella ámbar de 1000 ml
- Pipeta de 1 ml
- Pipeta de 10 ml
- Pipeta Pasteur
- Tubos de ensayo
- Placa Petri de 15 X 100

- Probeta de 250 ml
- Mechero de alcohol
- Parafilm 4``
- Asa kolle con mango de aluminio
- Piceta de 250 ml
- Aspersor de alcohol de 500 ml
- Mangueras silicona transparente
- Pali globos blanco
- Gradillas
- Papel aluminio
- Papel toalla
- Papel tisú
- Válvulas de plástico de 5 mm diámetro
- Uniones de manguera de 5 mm diámetro
- Algodón
- Ligas
- Escobillas
- Bombillas de jebe
- Chupones de jebe

3.7.4 Insumos

- Productos químicos (F/2 Medio Guillard)
- Agar Agar
- Lugol 5%

- Alcohol 70%
- Agua destilada
- Jabón neutro
- Detergente
- Hipoclorito de sodio 10%

3.7.5 Indumentaria de trabajo

- Guardapolvo
- Guantes de látex
- Mascarillas descartables
- Toca
- Botas

3.7.6 Otros

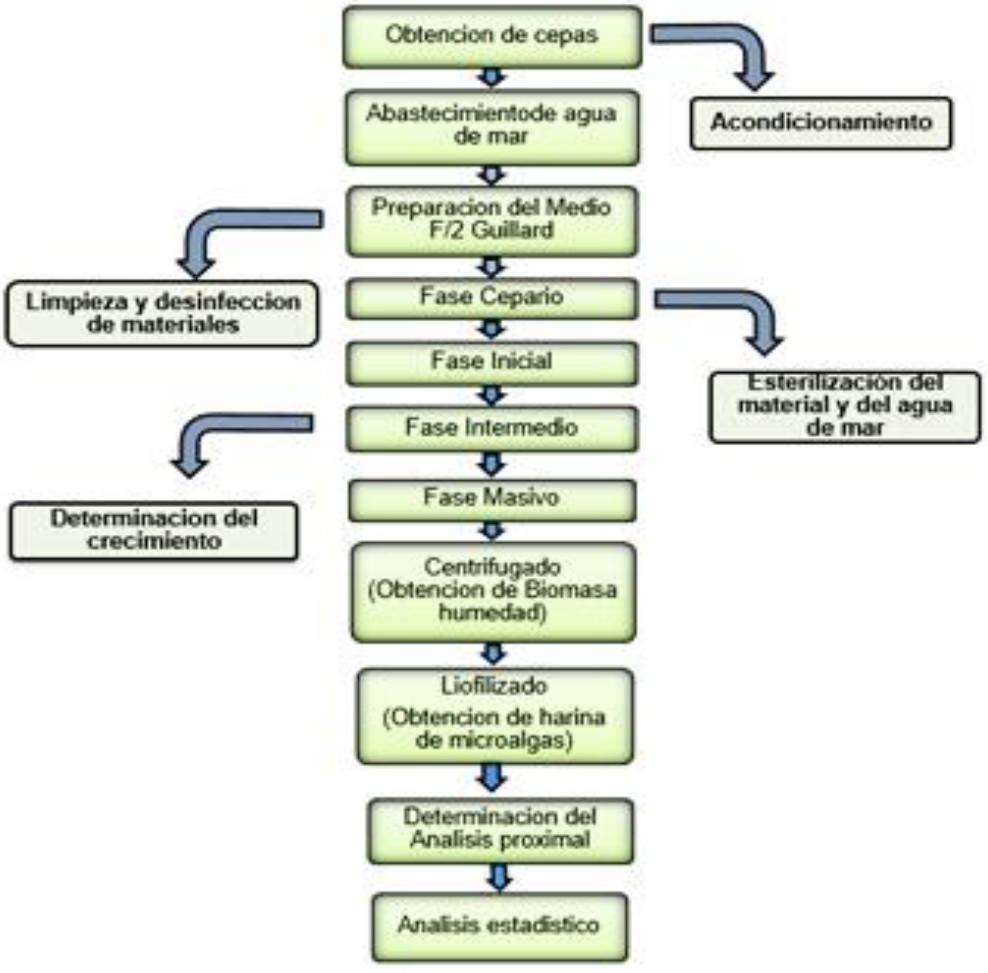
- Fotobioreactores metálicos
- Contador manual
- Andamio metálico
- Botellas de plástico transparente de 7 L
- Bolsas transparentes de polietileno de 35 cm de diámetro, 0.25 ml de grosor
- Tacho de 50 y 200 L
- Manquera de 1``

3.8 METODOS Y TECNICAS PARA PRESENTACION Y ANALISIS DE DATOS

3.8.1 Metodología para la determinación del contenido proteico de biomasa y harina de microalgas

En la Figura 6, se muestra la metodología utilizada para llevar a cabo esta prueba.

Figura 6. Diagrama de flujo de la metodología para la determinación del contenido proteico de biomasa y harina de microalgas.



Fuente: Elaboración propia (2017)

3.8.2 Cultivo de microalgas marinas en el laboratorio; en condiciones semi controladas (Ver Anexo 3)

3.8.2.1 Obtención y acondicionamiento de las cepas de microalgas

Las cepas de las especies de microalgas C. vulgaris y T. striata N. oculata fueron entregadas por el **Laboratorio Costero de Ilo del Instituto del Mar del Perú IMARPE** (Figura 7) en tubos de ensayo de 20 ml y se procedió a cubrir con el papel aluminio y acondicionándole ice pack, fue trasladado en cooler al laboratorio de Microalgas de la UNAM- Filial Ilo.

En el laboratorio se acondicionaron y se preservaron a temperatura de refrigeración por las mañanas y de noche se acondiciono en los estantes con iluminación artificial continua por tubos de fluorescentes de 36 Watts, cuya temperatura fue de 19±1ºC este proceso se mantuvo durante una semana con la finalidad de adaptar las microalgas a su nuevo ambiente.

Figura 7. Cepas del laboratorio costero de Ilo del Instituto del Mar del Perú

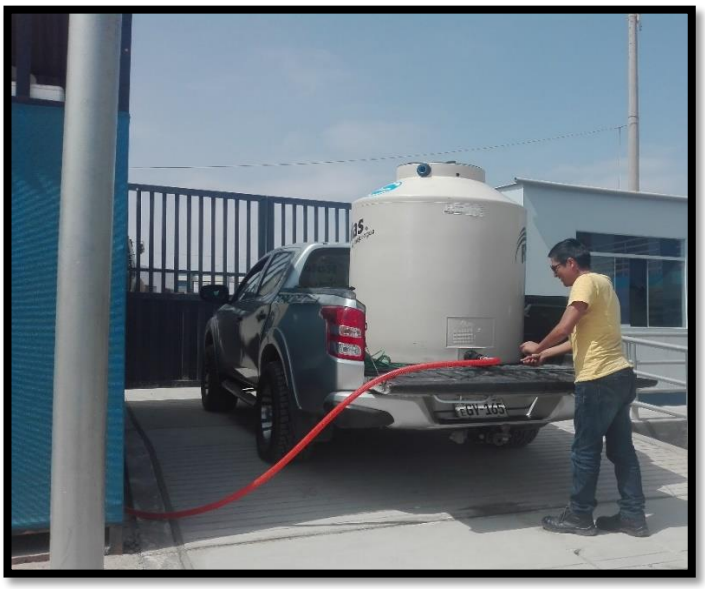


Fuente. Elaboración propia (2017)

3.8.2.2 Abastecimiento de agua de mar

El agua de mar es sumamente importante, por ello se obtuvo agua de mar esterilizada y enriquecida del **Laboratorio Costero de Ilo del Instituto del Mar del Perú IMARPE**, esto con la finalidad de obtener monocultivos. Una vez traslada el agua de mar a las instalaciones de la Universidad Nacional de Moquegua, se procedió a bombear el agua de mar utilizando una Bomba (Marca: AQUAMAX). Como se muestra en la (Figura 8).

Figura 8. Bombeo de agua de mar



Fuente. Elaboración propia (2017)

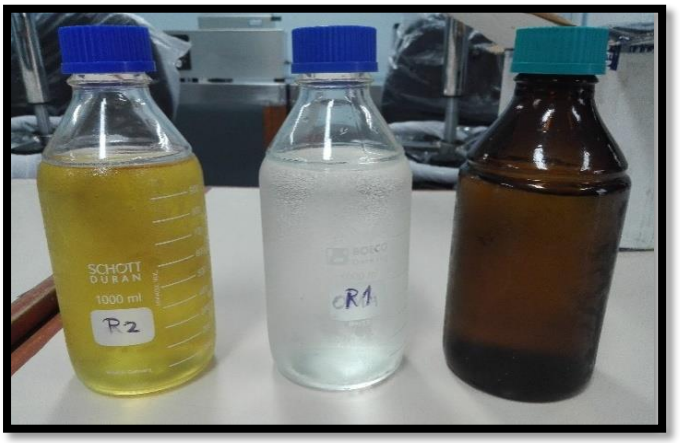
3.8.2.3 Preparación del medio F/2 modificado Guillard

Para ello se empleó el medio F/2 modificado Guillard (Guillard, 1975); que tiene una composición de macronutrientes, micronutrientes y vitaminas (ver composición en ANEXO 2), disueltas en agua destilada, previamente auto clavada.

Este proceso se realizó en condiciones asépticas. Para la preparación del medio se utilizó una balanza de precisión (Marca: A&D COMPANY, LIMITED), se inició con el pesado de los insumos, usando láminas de papel aluminio seguidamente se va agregando cada insumo directamente en la botella de 1000 ml (Marca: BOECO Germany) a la medida que se avance con el pesado, se va preparando el medio F/2 modificado Guillard y finalmente agitar

hasta notar su dilución completamente (Figura 9) y almacenándolos en refrigeración.

Figura 9. Medio F/2 modificado (Guillard 1975)



Fuente. Elaboración propia (2017)

3.8.2.4 Limpieza y desinfección de materiales

Todo el material utilizado en las diferentes áreas (laboratorio e invernadero), como material de vidrio, material de plástico, mangueras, deben ser lavados con abundante agua potable. En cuanto el lavado del material de vidrio, como matraz erlenmeyers de 250, 500 y 1000 ml, tubos de ensayo, así como probetas, pipetas, etc., se realizó de la siguiente manera (ver Anexo4):

Se enjuaga el material de vidrio con abundante agua potable, son depositados en recipiente con jabón neutro y agua potable en relación de (1ml /1L) este proceso se realiza por un día de reposo; al día siguiente se remueve y retira la suciedad con ayuda de las

escobillas para su posterior enjuague con abundante agua potable y finalmente con agua destilada; y siguiendo el proceso se realiza el auto clavado para ser almacenados en gavetas limpias para su posterior uso.

En cuanto las llaves tipo tee, uniones, válvulas, los capilares y mangueras usados para suministrar aire a los envases de diversos volúmenes son lavados con jabón neutro y agua potable (1ml /1L), posteriormente son enjuagados con abundante agua potable para ser almacenados y usados nuevamente. (Zeballos Feria, 2010) .

En caso de los materiales de plástico, son lavados con detergente y desinfectados con hipoclorito de sodio y se enjuagaba con abundante agua potable para retirar cualquier resto de detergente o residuo y finalmente con agua destilada.

3.8.2.5 Esterilización de materiales y agua de mar

El material vidrio utilizado durante todas la fases en el cultivo, luego de haber sido lavado se realizó el esterilizado, para evitar posible contaminación cruzadas de un cultivo a otro. La esterilización del material se realizó en la autoclave (Marca : BOECO Germany) (Figura 10), poniendo todo el material que se va a esterilizar dentro de ella incluyendo el agua de mar que se utilizó en los cultivos, con una envoltura de papel aluminio, asegurado con ligas. El autoclave se cierra herméticamente y se enciende, una vez que el manómetro

ha alcanzado la zona de esterilización (121ºC) se le dan entre 20 y 30 minutos; al término de este tiempo se apaga el autoclave y se deja enfriar el material, después se retirar se cubre con papel aluminio y papel kraft; las pipetas y tubos de ensayo fueron envueltas en su totalidad con papel kraft y finalmente se almacenaron en gavetas limpias.

Figura 10. Autoclave (Marca: BOECO Germany)



Fuente: Elaboración propia (2017)

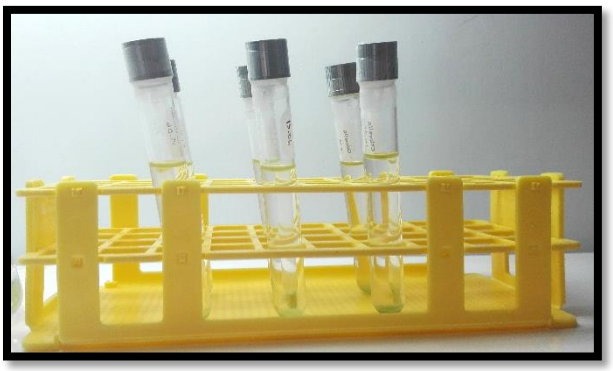
3.8.2.6 Fase Cepario

Las cepas fueron mantenidas en medio líquido (contenidas en tubos de ensayo de 10 ml) y en medio sólido (placas petri), (IMARPE, 2008).

Para el procedimiento del medio líquido (ver Anexos 5), se trabajó en 02 tubos de ensayo de 10 ml por cada especie,

agregándole agua de mar auto clavada, y enriquecida con el nutriente (medio F/2 modificado Guillard), utilizando una pipeta Pasteur estéril donde se transfirieron 3 gotas de inóculo de la cepa obtenidas del **Laboratorio Costero de Ilo del Instituto del Mar del Perú IMARPE**. Proporcionándoles las condiciones de iluminación constante y temperatura (19 ±1 ºC), factores necesarios para su crecimiento. Durante esta fase se realiza la renovación mensual de los tubos ensayo. (Figura11).

Figura 11. Acondicionamientos de cepas



Fuente: Elaboración propia (2017)

El mantenimiento de las cepas de microalgas en medio sólido, se realiza por periodos más extensos. Se emplean placas con 20 ml de Agar Agar preparado en agua de mar estéril y enriquecida con el Medio F/2 modificado Guillard (Zeballos Feria, 2010) (Figura 12).

Durante todo el proceso el mechero se mantuvo encendido (ver Anexos 6), se las acondiciono para su preservación y conservación de las cepas

Para estos dos tipos de medios es importante rotular los recipientes con el nombre y fecha de inoculación del cultivo. En esta fase de cultivo es necesario mantener las medidas asépticas y en el control del cultivo de microalgas.

Figura 12. Preparación del medio solido



Fuente: Elaboración propia (2017)

3.8.2.7 Fase Inicial

En esta fase el cultivo se desarrolló en matraces de 250 y 500 ml de capacidad, los cuales contienen 150 y 300 ml de agua de mar esterilizada y enriquecida, respectivamente. (IMARPE, 2008)

En los matraces de 250 ml, se inoculan con el cultivo anterior de la fase cepario de las tres especies, flameando la boca del matraz en el mechero encendido, esto en el momento del escalamiento y repique. Al término de esta fase se hace la rotulación colocando el nombre de la especie y la fecha y se tapa con papel aluminio asegurando con ligas. Luego son colocados en la estantería bajo temperatura ambiente e iluminación constantes, y están son renovadas después de 5 días. Los matraces de 250 ml deben ser agitados de forma manual, en forma diaria para evitar la sedimentación. (Figura 13).

Los matraces de 500 ml se inoculan 100 ml de cada una de la tres especies, procedentes de los matraces de 250 ml, flameando la boca del matraz en el momento del escalamiento y repique, teniendo cuidado de no transferir las células sedimentadas (concho). Al término se procede a rotularlos colocando el nombre de la especie y la fecha de inoculación; en este nivel se le agrega el capilar (paliglobo) para el suministro de aire permanente y son ubicados en su estantería con temperatura ambiente e iluminación constante, y estas son renovadas luego de 5 días, esto se dio cuando las microalgas alcanzaron su fase estacionaria. (Figura 14)

En esta fase se trabajó con el formato Nº 01 (control del cultivo de microalgas) (ver Anexo 7)

Figura 13. Matraces de 250 ml inoculados con microalgas



Fuente: elaboración propia (2017)

Figura 14. Matraces de 500 ml inoculados con microalgas



Fuente: elaboración propia (2017)

3.8.2.8 Fase Intermedio

Los cultivos se desarrollaron en matraz de 1000 ml a botellas de 7 L debidamente esterilizados, conteniendo 800 ml y 5 L de agua de mar, donde son transferidos el 90% del inóculo del cultivo anterior

agregando el medio F/2 Guillard. A los envases se le coloca el capilar (paliglobo) para el suministro de aire permanente y se cubren con papel aluminio asegurándolas con ligas y finalmente ubicarlos en estantes bajo temperatura ambiente de 19 ±1 ºC, e iluminación artificial y aireación permanente para evitar la sedimentación de las células. Se rotulan los envases consignando la fecha y la especie de cultivo. (Figura 15)

Solo en caso de botellas de 7 L se realiza un cebado con agua de mar, este proceso se da en tres repeticiones, y se procede con el escalamiento. Realizando el conteo celular en la cámara Neubauer para las tres especies, esto se realizó después de un día del escalamiento.

La aireación se realizó con 01 Blower (Marca: RESUM, Modelo: ACO – 003 y con una potencia de 35 Watts), esto para toda la fase inicial e intermedio; las cuales proporcionaban la cantidad de aire necesaria en el medio para evitar la sedimentación de las microalgas.

A partir de esta etapa se inició el control de los parámetros físico químicos tales como: pH, temperatura ambiente, temperatura del cultivo, O_2, salinidad y conductividad, donde se utilizó un multiparámetro de Marca: WTW, y para la intensidad lumínica se usó un luxómetro (Marca: CONTROL COMPANY).

En esta fase se trabajó con el formato Nº 01 (control del cultivo de microalgas) así mismo con el formato Nº 03 (Control de parámetros de cultivo) (ver Anexo8)

Figura 15. Matraces de 1000 ml y 7 L inoculados con microalgas



Fuente: elaboración propia (2017)

3.8.2.9 Fase Masivo

El cultivo masivo se realizó en el invernadero de cultivo de microalgas de la Universidad Nacional de Moquegua – Filial Ilo, bajo condiciones semi controladas, en fotobiorrectores verticales que están compuestos por una estructura metálica de 160 L de capacidad por cada fotobiorreactor, que constan de 8 bolsas de polietileno cada uno (Figura 16), selladas por la parte inferior utilizando una selladora manual (Marca: SAFARI IMPORT).

Donde se sembraron las diferentes especies de microalgas a partir de inóculos procedentes de las botellas de 7 L. Antes del escalamiento los inóculos de las botellas de 7 L deben de permanecer sin aire antes de su inoculación, con la finalidad de que se sedimente las microalgas muertas; luego se procede a agregar a cada bolsa 18.5 L de agua de mar estéril y enriquecida con F/2 Guillard, adicionándole 1.5 L de inoculo por cada bolsa; rotulándolas con sus respectivos nombres, fecha de inoculación y se le suministra aire constante, además estará sujeto a las condiciones ambientales locales, tales como temperatura, intensidad lumínica, y toma de sus respectivos parámetros físico químicos; los mismos que serán registrados en los formatos establecidos. Formato Nº 01 (control del cultivo de microalgas) (ver Anexo 7), así mismo con el formato Nº 03 (Control de parámetros de cultivo) (ver Anexo 8)

Para la aireación se utilizó 6 Blower (Marca: RESUM, Modelo: ACO – 003 y con una potencia de 35 Watts), por cada sistema de cultivo (Fotobiorreactor), suministrando la aireación necesaria para su crecimiento.

Se realizó el conteo celular en cámara de Neubauer para obtener la curva de crecimiento de cada especie.

Figura 16. Fotobiorreactor vertical del Invernadero de microalgas de la UNAM – FILIAL ILO



Fuente: Elaboración propia (2017)

3.8.2.10 Determinación del crecimiento de las tres especies de microalgas marinas en laboratorio.

Para realizar el recuento microalgal, se utiliza la cámara de Neubauer, esta cámara se encuentra dividida en 25 cuadrantes de 0,2 mm, sin embargo solo en 5 cuadrantes se efectúa el recuento de células (Figura 17) debido al registro de células muy similar en cada cuadrante; se obtiene el promedio de los 5 cuadrantes muestreados, que es multiplicado por 5 (número total de cuadrantes en que esta

seccionada la cámara) y por 10000 (volumen de la cámara $1*10^{-4}$ml), para obtener las concentraciones de microalgas en células por ml (Villafañe y Reid 1995) (Zeballos Feria, 2010)

La concentración celular se cuantifico de forma diaria, esto a partir del segundo día de inoculación, mediante la cámara Neubauer de vidrio (Marca :HBG/SUPERIOR) y un Microscopio Compuesto (Marca: MICROS AUSTRIA) sacando 1 ml. de muestra del cultivo de microalgas, fijándolas con una gota de lugol y con ayuda de una bombilla de pipeta Pasteur homogenizarlas, para ser observada y empezar con el recuento celular, para ello se realizó 06 repeticiones de conteo por cada especie de microalgas promediando el conteo utilizando la fórmula empleada por (R., Andersen, 2005)

Ecuación [1]. Concentración celular

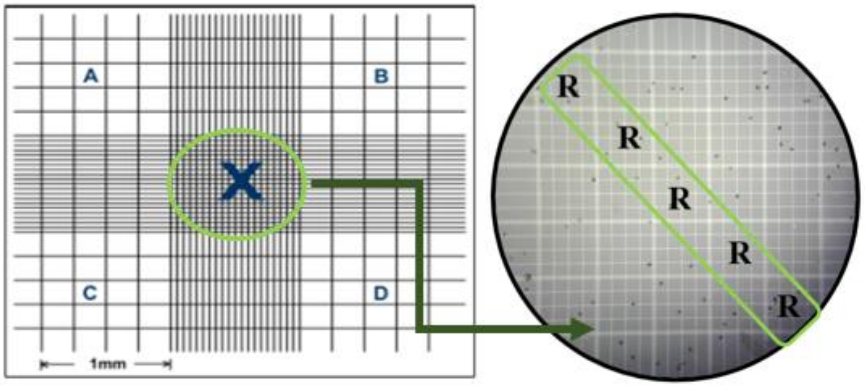
Concentración celular (cel/ml) = (Promedio del conteo X 5 X 10 000)

Nº de células en un volumen (cel / ml)

Media aritmética del recuento

Esta fase se trabajó con el formato Nº 02 (Recuento de microalgas) (Ver Anexo 9)

Figura 17. Recuento de microalgas



Fuente: Elaboración propia (2017)

3.8.2.11 Obtención de biomasa húmeda

La técnica consiste en concentrar el cultivo líquido a través de una centrífuga separadora de limpieza manual. Ésta se basa en separar el líquido del medio donde crecen las células con la mínima destrucción, a fin de obtener un alto contenido de la biomasa acumulada durante la etapa de cultivo. (IMARPE C. A., 2011)

Para la cosecha del cultivo de las tres especies de microalgas *(Chlorella vulgaris, Nannochloropsis oculata, Tetraselmis striata)*. La centrifugación se realizó a los 30 días (desde la fase inicial a la fase masiva), empleando una centrífuga separadora manual (Marca: GEA), la cual va conectada a una bomba de succión; colocando la manguera de entrada al tanque de cosecha, empleando un tacho de

200 L donde se deposita todo el inoculo de un fotobiorreactor, para ello se utilizó el medo gravimétrico para la determinación del volumen. Donde la centrífuga trabajo a una velocidad promedio de salida de 110 a 120L/h. al término del tiempo de centrifugado, se procede a retirar a biomasa húmeda con la ayuda de una espátula de plástico (Figura 18), colocándola en bandejas y sobre el papel aluminio esparciéndola de manera homogénea, formando una capa delgada. Para su posterior pesado, donde son rotuladas y etiquetadas. Para su envió al Laboratorio. Esta fase se trabajó con el formato Nº 4 (obtención de biomasa húmeda y liofilizada) (ver Anexo 10)

Finalmente la biomasa se calculó de la siguiente forma:

Ecuación [2]. Obtención de Biomasa Húmeda

$$BH = P1 - P2$$

Donde:

- **BH =**Biomasa húmeda (g)
- **P1 =**Peso total biomasa húmeda (biomasa húmeda + peso del papel aluminio) (g).
- **P2 =** Peso del papel aluminio (g).

Fuente: Elaboración propia (2017)

Figura 18. Extracción de la biomasa húmeda producida



Fuente: Elaboración propia (2017)

3.8.2.12 Obtención de la harina de microalgas

Para este proceso las muestras de biomasa húmeda fueron trasladadas a la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco Facultad de Ciencias Químicas, Físicas y Matemáticas para ser liofilizadas. Donde se esperó a que se alcancen las condiciones de -80 °C y alrededor, para poder retirar las muestras del medio refrigerante y colocarlas a liofilizar por 48 horas. Una vez culminado el liofilizado se retiró la biomasa seca (Harina) y se procedió a homogenizarlos de manera manual, Para su posterior pesado (Figura 19), almacenadas en bolsas herméticas, rotuladas y etiquetadas. Para su respectivo análisis proximal.

Esta fase se trabajó con el formato Nº 4 (obtención de biomasa húmeda y liofilizada) (ver Anexo 10)

Finalmente la biomasa seca (harina) se calculó de la siguiente forma:

Ecuación [3]. Obtención de Biomasa Húmeda

$$BS = P1 - P2$$

Donde:

- **BS =** Biomasa Seca (g)
- **P1 =** Peso total biomasa seca (biomasa seca + peso del papel aluminio) (g).
- **P2 =** Peso del papel aluminio (g).

Fuente: Elaboración propia (2017)

Figura 19. Pesado de la biomasa seca



Fuente: Elaboración propia (2017)

3.8.2.13 Determinación del análisis proximal como biomasa húmeda y como harina de microalgas comparando los valores obtenidos de proteínas por cada una de las especies de microalgas

Las muestras obtenidas durante las fases anteriormente mencionadas tanto de la biomasa húmeda como la harina de microalgas fueron analizadas en la Universidad Católica de Santa María de Arequipa, Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnología, correspondiente al Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad; en primera estancia para obtener el análisis proximal y finalmente obtener la determinación del porcentaje proteico de ambos productos, utilizando el método de Kjeldahl.

Este método se basa en la destrucción de la materia orgánica con ácido sulfúrico concentrado, formándose sulfato de amonio que en exceso de hidróxido de sodio libera amoníaco (A.O.A.C., 1995)

3.8.2.14 Análisis estadístico de datos

Los datos obtenidos se registraron en hojas de cálculo de Excel, para evaluar las concentraciones de crecimiento, del cultivo de las tres especies de microalgas (*Chlorella vulgaris, Nannochloropsis oculata y Tetraselmis striata*) a través del tiempo.

Y el porcentaje de proteínas de la biomasa húmeda y de la harina de microalgas. Fueron realizadas con dos repeticiones por tratamiento, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) (p=0.05), y si el análisis lo requiere se realiza la prueba de Tukey para seleccionar el mejor tratamiento.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 RESULTADOS

4.1.1 Cultivo de microalgas marinas en laboratorio de Microalgas en Filial Ilo de la UNAM hasta la obtención de biomasa húmeda y su respectiva harina.

La investigación se realizó durante el 2017, en Laboratorio de Microalgas de la Universidad Nacional de Moquegua – Filial Ilo. Las cepas empleadas fueron *Chlorella vulgaris*, *Tetraselmis striata* y *Nannochloropsis oculata* obtenidos del IMARPE – Ilo.

4.1.1.1. Condiciones del cultivo de microalgas desde la Fase Cepario hasta la Fase Masiva

Las condiciones en las cuales se logró estandarizar a las microalgas durante las diferentes fases del cultivo se observan en el Cuadro 1 obteniendo los siguientes resultados:

Cuadro 1. Condiciones estandarizadas para el cultivo de las tres especies de microalgas

Etapa	Parámetros físico químicos	Volumen	Tiempo de cultivo	Aireación
Fase ceparo	Intensidad lumínica	10 ml	5 días	No
	Temperatura ambiental			
Fase inicial	Temperatura ambiente	250 ml	5 días	Manual
	Intensidad lumínica			
	Temperatura ambiental	500ml	5 días	Blower
	Temperatura de cultivo			
Fase intermedio	Temperatura ambiental	1000ml – 7 L	5 días	Blower
	Temperatura de cultivo			
	Oxígeno disuelto			
	Salinidad			
	pH			
	Intensidad luminosa			
	Conductividad			
Fase masivo	Temperatura ambiental	160 L	5 días	Blower
	Temperatura de cultivo			
	Oxígeno disuelto			
	Salinidad			
	pH			
	Intensidad luminosa			
	Conductividad			

Fuente: Elaboración propia (2017)

En el Cuadro 1 se aprecia las condiciones realizadas durante todas las fases de cultivo, primero se observa la fase ceparo donde los únicos parámetros realizados fueron la temperatura ambiente siendo esta de 19 ±1 ºC y la intensidad lumínica se encontró en 3000 LUX, seguido de la fase inicial la cual consta de dos volúmenes que corresponden a los matraces de 250 ml y 500 ml en esta fase

se realiza los mismos parámetros que la fase cepario, posteriormente se aprecia la fase intermedia donde se realizaron la toma de parámetros establecidos en el Cuadro 1, en cuanto aireación se realizó mediante un Blower que abasteció a la Fase Inicial e Intermedio y de la misma forma se trabajó en la Fase Masiva realizando la toma de los parámetros y se trabajó con un Blower por cada fotobiorreactor

Los valores obtenidos en los controles físicos químicos durante las fases de cultivo fueron:

Cuadro 2. Parámetros físico químicos de la fase intermedio de las tres especies de microalgas

PARAMETREOS FISICO QUIMICO								
Especie	**Toma de Parámetros**	**pH**	**T° Cultivo (°C)**	**T° Ambiente (°C)**	**O2 (mg/L)**	**Salinidad (ppm)**	**Conductividad (mS/cm)**	**Intensidad Luminosa (Lux)**
Chlorella vulgaris	INICIO	8.34	18.9	20.1	7.77	33.5	50.2	3000
	FINAL	8.90	19.3	20	8.10	33.5	50.3	3000
Tetraselmis striata	INICIO	8.50	19.0	20.1	7.67	33.5	50.3	3000
	FINAL	8.73	19.3	20	8.20	33.3	50.3	3000
Nannochloropsis oculata	INICIO	7.61	18.9	20.1	7.70	33.3	50.2	3000
	FINAL	8.06	18.9	20.1	8.21	33.3	50.3	3000

Fuente: Elaboración propia (2017)

Del Cuadro 2 nos indica que el parámetro que más variación presento entre las tres especies es el pH, donde la *Chlorella vulgaris* fue la especie que trabajo con pH más alcalinos y la *Nannochloropsis oculata* fue la especie que tuvo el acercamiento a un pH más neutro.

Cuadro 3. Parámetros físico químicos de la fase Masiva de las tres especies de microalgas

PARAMETREOS FISICO QUIMICO								
Especie	**Toma de Parámetros**	**pH**	**T° Cultivo (°C)**	**T° Ambiente (°C)**	**O2 (mg/L)**	**Salinidad (ppm)**	**Conductividad (mS/cm)**	**Intensidad Luminosa (Lux)**
Chlorella vulgaris	INICIO	8.90	18.3	20.3	8.20	33.0	50.3	4000
	FINAL	9.80	19.8	21	9.21	33.1	51.02	3500
Tetraselmis striata	INICIO	8.82	18.1	20.3	8.15	33.0	50.4	4000
	FINAL	9.62	19.5	21	9.13	33.2	51.0	3500
Nannochloropsis oculata	INICIO	8.68	18.5	20.3	8.18	33.3	50.4	4000
	FINAL	9.51	19.4	21	9.05	33.3	50.8	3500

Fuente: Elaboración propia (2017)

En el Cuadro 3 se aprecia los parámetros de cultivo de la fase masiva, esta fase es la primordial ya que de esta fase depende la calidad de la harina, al igual que en la fase intermedio se observa que el pH para las tres especies fueron casi similares alcanzando datos muy alcalinos, en cuanto a los otros parámetros tuvieron la misma relación.

4.1.1.2. Obtención de Biomasa Húmeda

Se centrifugó por 1 hora y medio aproximadamente el cultivo de los fotobiorreactores que llegaron al término de la fase masiva, obteniéndose los siguientes valores:

Cuadro 4. Obtención de biomasa húmeda de las tres especie microalgas

OBTENCION DE BIOMASA HUMEDA DE MICROALGAS				
ESPECIE	**Nº de Repeticiones (R)**	**Volumen de cultivo (L)**	**Biomasa Húmeda (g)**	**Promedio de Biomasa Húmeda (g)**
Chlorella vulgaris	**R1**	160	167,40	**182,60**
	R2	160	197,80	
Tetraselmis striata	**R1**	160	168,50	**166,90**
	R2	160	165,30	
Nannochloropsis oculata	**R1**	160	140,70	**144,31**
	R2	160	147,92	

Fuente: Elaboración propia (2017)

En el Cuadro 4 se observa los valores promedio, más altos de producción de biomasa húmeda, en donde el cultivo de la *Chlorella vulgaris* ha obtenido 182.60 g; seguidamente de la *Tetraselmis striata* que obtuvo 166.90 g. y el cultivo de la *Nannochloropsis oculata* es el cultivo que más baja producción ha presentado con respecto a las dos especies teniendo solo 140.31 g. de biomasa húmeda.

Cuadro 5. Tabla ANOVA por bloques de biomasa húmeda

Source	*SS*	*df*	*MS*	*F*	*p-value*
Treatments (especies)	1,481.941	2	740.9747	5.01	.1664
Blocks (repetición)	197.4561	1	197.4567	1.34	.3673
Error	295.8081	2	147.9047		
Total	1,975.213	5			

Fuente: Elaboración propia (2017)

Del Cuadro 5 concluimos que, a un nivel de significancia de 0.05 no existe diferencia significativa entre especies (tratamientos) para la producción de biomasa de microalgas, es decir que las especies *Chlorella vulgaris, Tetraselmis striata* y *Nannochloropsis oculata* generan las mismas cantidades de biomasa húmeda. De igual forma, no existe diferencia significativa entre las réplicas de cosecha (bloque).

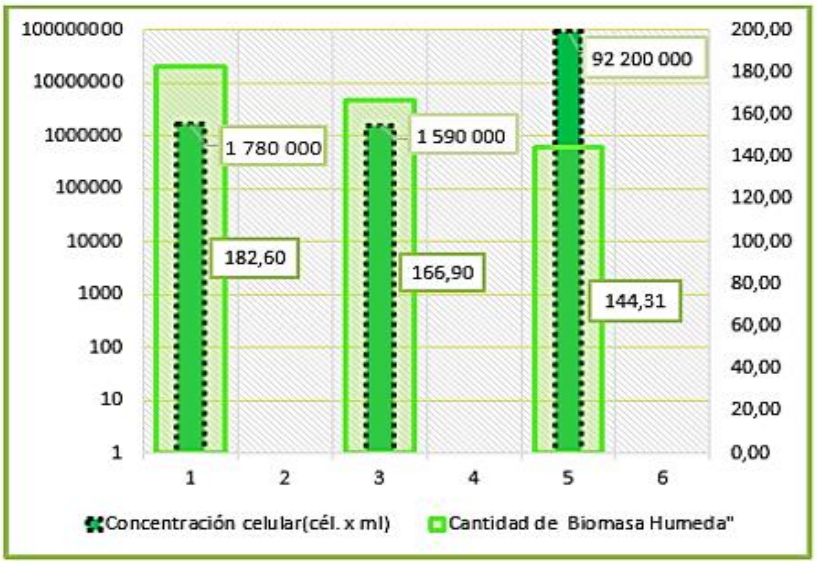
Cuadro 6. Relación de biomasa húmeda y crecimiento de microalgas

RELACION DE BIOMASA HUMEDA Y CRECIMIENTO DE MICROALGAS				
ESPECIE	**Volumen de cultivo (L)**	**Biomasa húmeda (g)**	**Promedio de Biomasa Húmeda (g)**	**Concentración Celular de Fase Masiva (fase estacionaria)**
Chlorella vulgaris	160	167,40	**182,60**	1780000
	160	197,80		
Tetraselmis striata	160	168,50	**166,90**	1590000
	160	165,30		
Nannochloropsis oculata	160	140,70	**144,31**	92200000
	160	147,92		

Fuente: Elaboración propia (2017)

En el Cuadro 6 se encuentra los datos obtenido de la biomasa húmeda y las concentraciones celulares de la fase masiva, en la Figura 20 se aprecia la relación de ambos datos.

Figura 20. Relación de biomasa húmeda y crecimiento de microalgas



Fuente: Elaboración propia (2017)

En la Figura 20 se observa las comparaciones del promedio de biomasa húmeda (g.) con la concentración celular del crecimiento de microalgas de la fase masiva, la cual fue centrifugada. De lo que se deduce que la especie que contiene mayor cantidad de biomasa húmeda es la especie de microalga *Chlorella vulgaris*, en cuanto a su crecimiento se dio al tercer día, es decir en menor tiempo a diferencia de las otras dos especies con una concentración de $1.78x10^6$ cel/ml y la que contiene menor cantidad de biomasa

húmeda es la especie de microalga *Nannochloropsis oculata* 144.31g; en un inicio se consideró que esta sea la especie presente la mayor producción de biomasa humedad debido a sus elevadas concentraciones celulares siendo esta de $9.22x10^7$ cel/ml, sin embargo, en la presente investigación se está demostrado que esto no es así, esto se deben al tamaño de las tres microalgas en caso de la *Chlorella vulgaris* esta llega a medir de 2 a 10 µm, la *Tetraselmis striata* cuenta con un tamaño este de 10 µm pero su crecimiento es más lento al de la *Chlorella vulgaris* y finalmente *Nannochloropsis oculata* solo llega a alcanzar los 2 a 4 µm esta es la especie que tiene menor tamaño, por ende se observa en la (Figura 20) las diferencias existentes entre las producciones de cada aun de ellas en relación a la biomasa húmeda con las concentraciones de crecimientos.

Cuadro 7. Tabla ANOVA por bloques de biomasa seca o harina

Source	*SS*	*df*	*MS*	*F*	*p-value*
Treatments (especies)	117.4203	2	58.71015	13.93	.0670
Blocks (repetición)	38.3548	1	38.35482	9.10	.0946
Error	8.4296	2	4.21482		
Total	164.2048	5			

Fuente: Elaboración propia (2017)

Del Cuadro 7 concluimos que, a un nivel de significancia de 0.05, no existe diferencia significativa entre especies (tratamientos) para la

producción de biomasa seca o harina, es decir que las especies *Chlorella vulgaris, Tetraselmis striata* y *Nannochloropsis oculata* generan las mismas cantidades de biomasa seca o harina. De igual forma, no existe diferencia significativa entre las réplicas (bloque).

4.1.1.3. Obtención de la harina de microalgas

El liofilizado se realizó en la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco Facultad de Ciencias Químicas, Físicas y Matemáticas.

En el laboratorio de la UNAM – Filial Ilo, solo se realizó el pesado, almacenado en bolsas herméticas, rotuladas y etiquetadas. En el (Cuadro 8) se presentan los resultados de la obtención de harina (gramos) de las tres especies de microalgas:

Cuadro 8. Obtención de Harina de las tres especies de microalgas

OBTENCION DE HARINA DE MICROALGAS					
ESPECIE	**Nº de Repeticiones (R)**	**Volumen de cultivo (L)**	**Biomasa Húmeda (g)**	**Biomasa Seca o Harina (g)**	**Promedio de Biomasa Seca o Harina (g)**
Chlorella vulgaris	**R1**	160	167,40	44,60	**48,75**
	R2	160	197,80	52,90	
Tetraselmis striata	**R1**	160	168,50	42,03	**44,11**
	R2	160	165,30	46,20	
Nannochloropsis oculata	**R1**	160	140,70	36,60	**37,95**
	R2	160	147,92	39,30	

Fuente: Elaboración propia (2017)

En el Cuadro 8 se observa que la especie que presenta mayor cantidad de harina debido a la alta producción de biomasa húmeda es la *Chlorella vulgaris* obteniendo 48.75 g; seguidamente de la *Tetraselmis striata* que presenta 44.11 g. y la *Nannochloropsis oculata* al contener la menor producción de biomasa húmeda solo alcanzo a 37.95 g. de harina de microalgas.

4.1.2 Evaluación del crecimiento de las tres especies de microalgas marinas en laboratorio

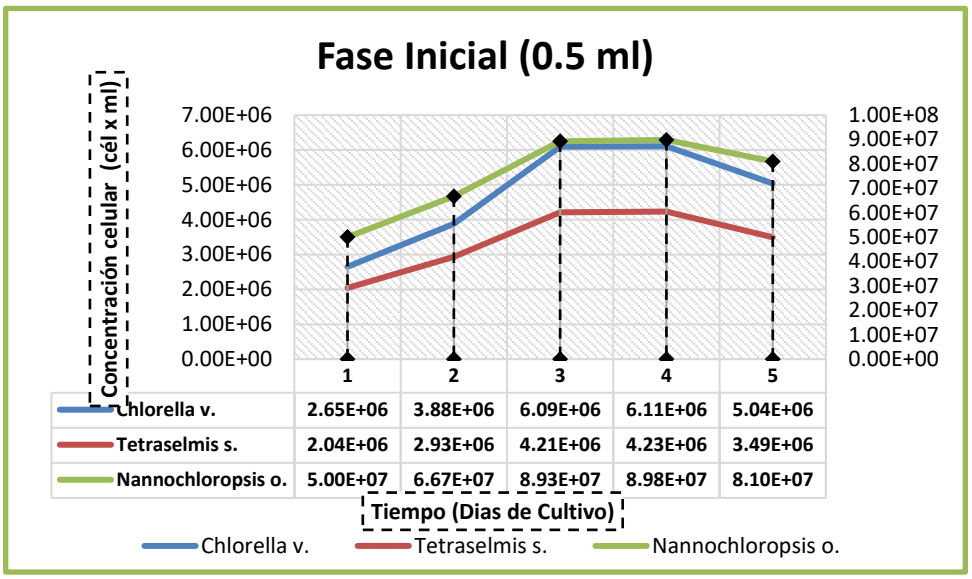
La curva de crecimiento se elaboró con los datos obtenidos por el recuento diario de las tres microalgas, en ella se observa las fases del crecimiento de las microalgas siendo estas las siguientes:

4.1.2.1 Fase inicial

La microalga con mayor producción en esta fase(volumen de 500ml),como se muestra en la (Figura 21) se encontró en la microalga *Nannochloropsis oculata,* siendo estas la que presentó mayor concentración celular promedio en la fase estacionaria, hasta un máximo de $8.98x10^7$ cel/ml, alcanzando su máximo crecimiento entre el tercer y cuarto día seguido de la especie *Chlorella vulgaris* con $6,11x10^6$ cel/ml; alcanzando su máximo crecimiento entre el

tercer y cuarto día y finalmente de *Tetraselmis striata* con un máximo de 4.23x10^{6} cél/ml. Esto se realizó en condiciones controladas.

Figura 21. Curva de crecimiento de microalgas (Fase Inicial)

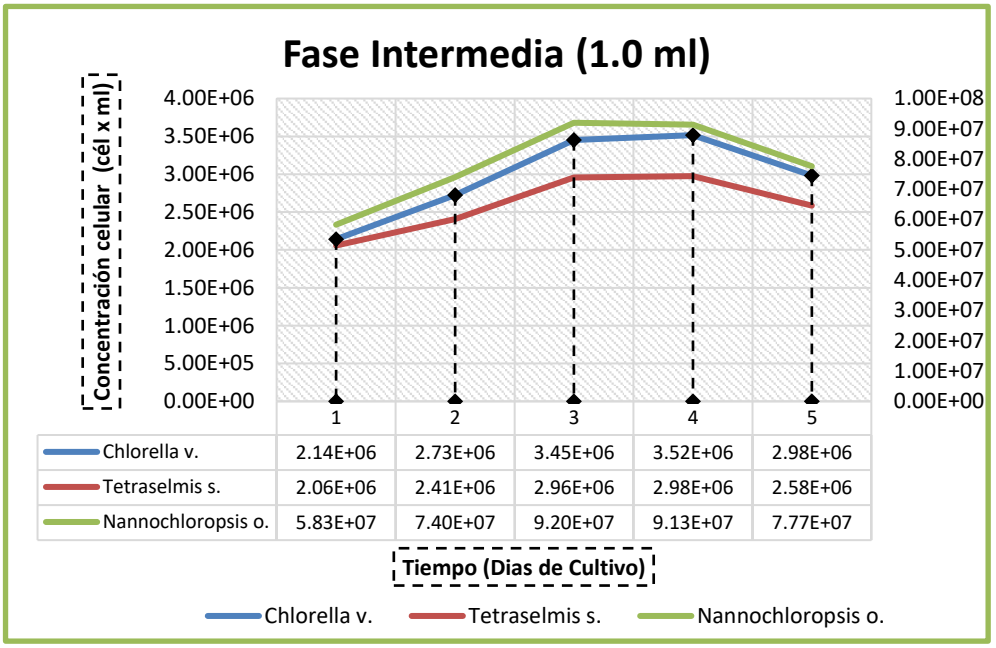


Fuente: Elaboración propia

4.1.2.2 Fase intermedia

En esta fase correspondiente al volumen (1L) (Figura 22) mostró que la especie de microalga *Nannochloropsis oculata* presento concentraciones promedio máximas de 9.20x10^{7} cél/ml, seguida por la *Chlorella vulgaris* con un 3.52x10^{6} cél/ml y finalmente la *Tetraselmis striata* que fue la que presento concentraciones promedio bajas de 2.98x10^{6} cél/ml. Alcanzando su máximo crecimiento entre el tercer y cuarto día, esto se dio para las tres especies..

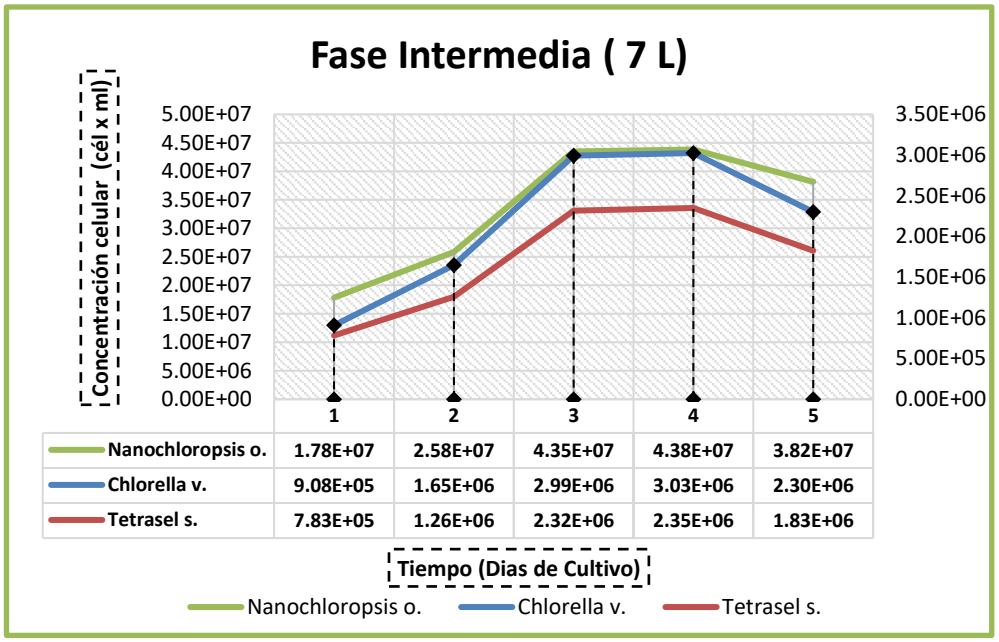
Figura 22. Curva de crecimiento de microalgas
(Fase Intermedia de 1L)



Fuente: Elaboración propia (2017)

Para cultivo de 7 L se determinó las siguientes concentraciones celulares promedio (Figura 23), de esta misma fase se mostró que la especie de microalga *Nannochloropsis oculata* obtuvo concentraciones máximas de $4.38x10^7$ cel/ml; seguida de la *Chlorella vulgaris* con una concentración promedio de $3.03x10^6$ cel/ml y finalmente la *Tetraselmis striata* con una concentración igual a $2.35x10^6$ cel/ml. Toda la fase se llevó a cabo en el laboratorio en condiciones controladas.

Figura 23. Curva de crecimiento de microalgas
(Fase Intermedia de 7L)



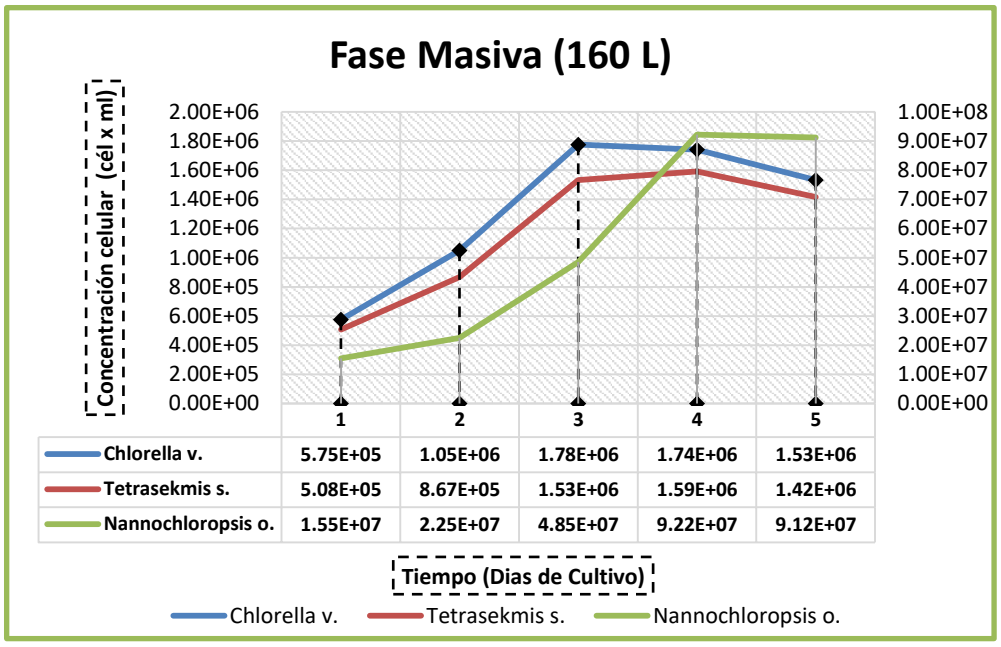
Fuente: Elaboración propia (2017)

4.1.2.3 Fase masiva

En esta fase la concentraciones celulares entre las tres especies fueron notablemente distintas (Figura 24); debido a que la especie *Nannochloropsis oculata* presento mayor concentración celular promedio de $9.22x10^7$cél/ml alcanzando su máximo crecimiento recién en el cuarto día esta especie tuvo una fase de adaptación de aproximadamente dos días; seguidamente la *Chlorella vulgaris* fue la especie que mostro el crecimiento en menor tiempo (al tercer día) con una concentración promedio de $1.78x10^6$ cél/ml indicando una rápida adaptación, finalmente la *Tetraselmis striata* alcanzó una

concentración celular promedio de 1.59x10^6 cél/ml esto al cuarto día. Esta fase se realizó en condiciones semi controladas.

Figura 24. Curva de crecimiento de microalgas
(Fase Masiva)



Fuente: Elaboración propia (2017)

Cuadro 9. Tabla ANOVA para la curva de crecimiento

Source	*SS*	*df*	*MS*	*F*	*p-value*
Treatment	9,259.44784	2	4,629.723922	10.40	.0024
Error	5,343.83453	12	445.319544		
Total	14,603.28237	14			

Fuente. Elaboración propia (2017)

Del Cuadro 9, concluimos que, a un nivel de significancia de 0.05, existe diferencia altamente significativa entre las especies para las concentraciones celulares, durante las fases de crecimiento. Estas diferencias se observa en el (Cuadro 10), donde la especie *Nannochloropsis oculata* es muy diferente a las demás. Esto se debe a su tamaño.

Cuadro 10. Comparación de medias para la concentración celular, entre especies.

p-values for pairwise t-tests		***Tetraselmis striata*** **(millones)**	***Chlorella vulgaris*** **(millones)**	***Nannochloropsis oculata*** **(millones)**
		1.1830	1.3350	53.9640
Tetraselmis striata **(millones)**	1.1830			
Chlorella vulgaris **(millones)**	1.3350	.9911		
Nannochloropsis oculata **(millones)**	53.9640	.0019	.0020	

Fuente. Elaboración propia (2017)

4.1.3 Determinación del análisis proximal como biomasa húmeda y como harina de microalgas comparando los valores obtenidos de proteínas por cada una de las especies de microalgas

4.1.3.1 Análisis Proximal

En el Cuadro 11 y Cuadro 12 se muestran los componentes principales del análisis proximal tanto de la biomasa húmeda y harina de microalgas

Cuadro 11. Análisis Proximal Biomasa húmeda de microalgas

ANALISIS PROXIMAL						
ESPECIE	**Nº de Repeticiones (R)**	**Proteína (%)**	**Humedad (%)**	**Fibra Cruda (%)**	**Grasa (%)**	**Ceniza (%)**
Chlorella vulgaris	**R1**	**30,52**	73,40	0,04	0,12	8,18
	R2	**5,57**	74,37	0,09	0,23	2,31
Tetraselmis striata	**R1**	**27,73**	73,40	6,73	3,34	9,24
	R2	**5,72**	75,55	0,09	0,46	7,58
Nannochloropsis oculata	**R1**	**8,67**	73,87	0,04	0,43	5,74
	R2	**9,59**	0,57	0,74	0,57	6,93

Fuente. Laboratorio de la Universidad Católica Santa María (2017)

El Cuadro 11 se muestra que las especies *Chlorella vulgaris* y *Tetraselmis striata* son las que presentaron el contenido más alto de proteína 30,52% y 27,73% y los contenido más altos de grasa entre la réplica R_1 y R_2 de las dos especies en mención fue de 0.09% y 3.34 % respectivamente y se obtuvo una humedad máxima entre los dos meses siendo 74.37% y 75.55%. Mientras que la *Nannochloropsis oculata* mostro porcentajes menores de proteínas, con un 9.59%, así como el contenido más alto entre la réplica R_1 y R_2 de 0.57% de grasa respectivamente y esta especie es la que obtuvo menor porcentaje de humedad siendo esta de 0.57%,

Cuadro 12. Análisis Proximal Harina de microalgas

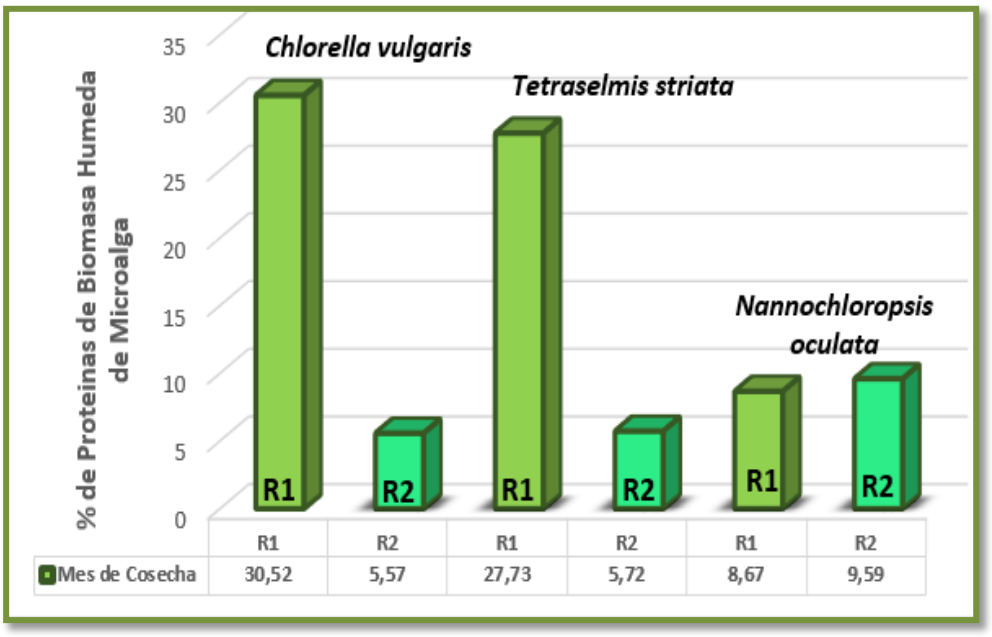
ANALISIS PROXIMAL					
ESPECIE	**Nº de Repeticiones (R)**	**Proteína (%)**	**Fibra Cruda (%)**	**Grasa (%)**	**Ceniza (%)**
Chlorella vulgaris	**R1**	**16,93**	0,07	0,19	21,25
	R2	**14,87**	26,60	2,11	28,32
Tetraselmis striata	**R1**	**23,76**	1,61	0,04	33,51
	R2	**18,39**	0,06	0,28	28,41
Nannochloropsis oculata	**R1**	**30,30**	22,10	2,40	22,75
	R2	**23,82**	23,90	2,80	27,53

Fuente: Elaboración propia (2017)

Como se detalla en el Cuadro 12 se muestra que entre las tres microalgas marinas que se trabajó, la especie que contiene alto contenido proteico en la harina de microalgas es la *Nannochloropsis oculata* con 30.30%, presentando también el mayor porcentaje de grasa con un 2.80, seguida de la *Tetraselmis striata* que presenta un 23.76% de proteína, con un máximo de grasas según lados réplicas de 0.28% y finalmente la especie que presento un bajo contenido de proteína es la *Chlorella vulgaris* con 16.93%, alcanzando un valor máximo de grasa de 2.11% respectivamente. Mientras que los valores del componente de ceniza máximos, para las tres especies fueron similares siendo estas 28.32% , 28.41% y 27.75%.

4.1.3.2 Determinación del porcentaje de proteínas

Figura 25. Contenido proteico de la biomasa húmeda de las tres especies de microalgas



Fuente: Elaboración propia (2017)

En la Figura 25 se observa que el porcentaje de proteína en la biomasa húmeda, según las dos replicas realizadas en caso de las especies *Chlorella vulgaris* y la *Tetraselmis striata* el contenido proteico más altos se dio en las réplicas R_1 siendo estas de 30.52% y 27.73% respectivamente; en caso de la réplica R_2 se presenciaron porcentajes similares para ambas especies estas de 5.57% y 5.72%. En cuanto la especie *Nannochloropsis oculata* llego alcanzar a 8.67% en R_1 y en R_2 9.59% siendo el máximo contenido proteico para esta especie.

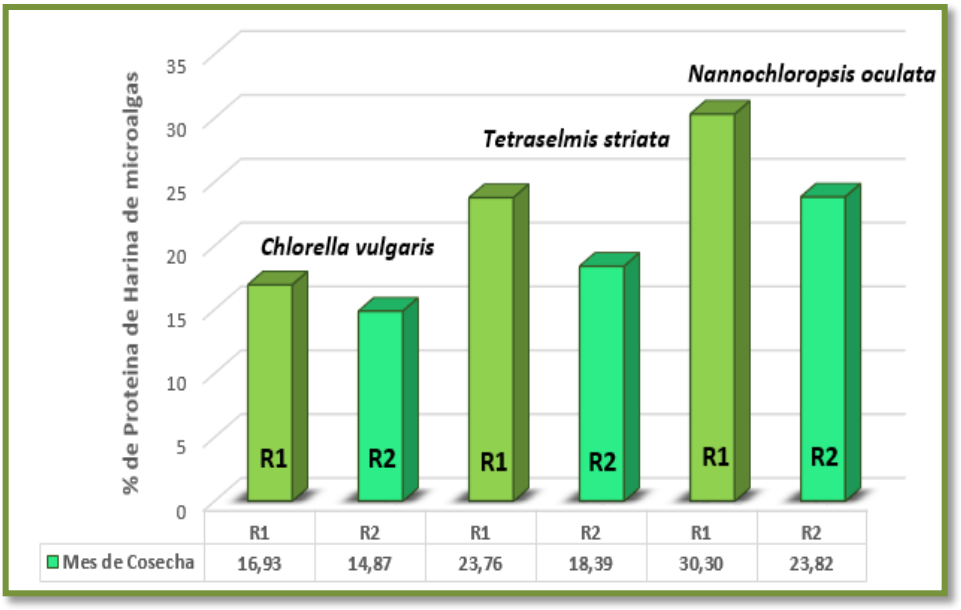
Cuadro 13. Tabla ANOVA por bloques de porcentaje de proteína

Source	*SS*	*Df*	*MS*	*F*	*p-value*
Treatments	92.6024	2	46.30122	0.46	.6842
Blocks	353.2803	1	353.28027	3.52	.2014
Error	200.6142	2	100.30712		
Total	646.4969	5			

Fuente. Elaboración propia (2017)

Del Cuadro 13 concluimos que, a un nivel de significancia de 0.05, no existe diferencia significativa entre especies (tratamientos) para la producción de proteína, es decir que las especies *Chlorella vulgaris, Tetraselmis striata* y *Nannochloropsis oculata* generan las mismas cantidades de proteína. De igual forma, no existe diferencia significativa entre las réplicas (bloque).

Figura 26. Contenido proteico de la harina de las tres especies de microalgas



Fuente: Elaboración propia (2017)

La Figura 26 se observa que en R1 se obtuvo la mayor concentración de proteínas en la harina de microalgas siendo la *Nannochloropsis oculata* quien presenta el máximo contenido proteico de 3.30%, a diferencia del contenido proteico de la biomasa húmeda quien era la que presentaba menor contenido; la *Tetraselmis striata* presenta 23.76% y finalmente se observa a la *Chlorella vulgaris* es la que presento resultados inferiores a las dos especies mencionadas siendo esta de 16.93%.

Durante el R2 se obtuvieron los datos más bajos y esto coincide con la temporada de clima donde la temperatura ambiente era inestable.

Cuadro 14. Tabla ANOVA por bloques de determinación proteica de harina de microalgas

Source	*SS*	*df*	*MS*	*F*	*p-value*
Treatments	124.7643	2	62.38215	23.60	.0407
Blocks	32.2480	1	32.24802	12.20	.0731
Error	5.2874	2	2.64372		
Total	162.2998	5			

Fuente. Elaboración propia (2017)

Del Cuadro 14, concluimos que, a un nivel de significancia de 0.05, no existe diferencia significativa entre las réplicas (bloque). Entre tanto, existe diferencia significativa entre especies (tratamientos) para la determinación proteica de harina de microalgas. Esta diferencia se observa entre la especie *Nannochloropsis oculata* y la *Chlorella vulgaris*, ver cuadro 5.

Cuadro 15. Comparación de medias para la determinación proteica de harina de microalgas, entre especies.

p-values for pairwise t-tests

		Chlorella o.	***Tetraselmis t.***	***Nannochloropsis o.***
		15.90000	21.07500	27.06000
Chlorella v.	15.90000			
Tetraselmis s.	21.07500	.0862		
Nannochloropsis o.	27.06000	**.0206**	.0665	

Fuente. Elaboración propia (2017)

4.2 DISCUSION

4.2.1 Cultivo de microalgas marinas en laboratorio de Microalgas en condiciones controladas

Los valores de los parámetros fiscos químicos medios con los cuales se trabajó durante todo el cultivo de la investigación son:

- El pH fue uno de los parámetros más inestables para las tres especies de microalgas que tuvo un rango mínimo de 7.61 a 9.80
- La temperatura se mantuvo entre 18 a 20 °C

Los valores publicados por (García Cubero, 2009) ha verificado que *C. vulgaris* presenta una significativa tolerancia al pH, con rendimiento óptimo a pH 7,5 y admitiendo valores de pH más extremos, como 6 o 9, sin que la productividad se redujera más del 20%.

Según la investigación realizada se obtuvo un pH en rangos fuera de lo que establece (García Cubero, 2009) ya que la *Chlorella vulgaris* mantuvo un pH de 8.34 a 9.80, siendo superiores.

Es por ello que se considera lo que dice (Hicks, 2001) donde menciona que el pH tiene un efecto muy marcado que afecta la configuración de la proteína, la mayoría de las enzimas presentan una actividad catalítica máxima a un determinado valor óptimo de pH, la mayoría tiene un pH óptimo entre 4 a 8, sobre o de bajo de

este la actividad disminuye, en general, los pH extremos inactivan las enzimas debido a la desnaturalización. Y de acuerdo a este autor es que se deduce lo reflejado en los porcentajes de proteína de la investigación.

4.2.2 Evaluación del crecimiento de las tres especies de microalgas marinas en laboratorio

En el transcurso de la investigación se tomaron los datos del recuento de microalgas, la cual como resultado nos dio las curvas de crecimiento.

4.2.2.1 Fase Masiva

La curva de crecimiento en la fase masiva, es el resultado final del cultivo, ya que este dato es sumamente importante la cual lleva a determinar cuánto de biomasa húmeda se obtiene de esta fase.

Las concentraciones celulares de la fase masiva obtenidas en la investigación fueron de:

- $1.78x10^6$cel/ml para la especie *Chlorella vulgaris*
- $1.59x10^6$cel/ml para la especie *Tetraselmis striata*
- $9.22x10^7$cel/ml para la especie de *Nannochloropsis oculata*

(Lesly Tejeda Benítez, 2015) Determino que los picos máximos de crecimiento, en la *Chlorella vulgaris* se presentó en un rango entre $2x10^7$ y $2.6x10^7$ células/mL^{-1}, esto bajo diferentes condiciones de concentraciones de nitrógeno y pH.

Según los resultados obtenidos en la *Chlorella vulgaris* presento $1.78x10^6$cel/ml, esto se debe a la falta de adición del CO_2 y nitrógeno. (Lesly Tejeda Benítez, 2015) También hace mención que a mayor valor de pH se presenta un bajo crecimiento celular. Es por ello que los resultados presentados en esta investigación son inferiores.

(Liza Sal y Rosas, 2015) Durante su investigación reporta un crecimiento de la *Tetraselmis striata* donde alcanzó una concentración celular de $1,21x10^6$ cel.mL-1 en el día 14.

En cuanto los resultados en la *Tetraselmis striata* fue de $1.59x10^6$ cel/ml. Demostrando que es recomendable trabajar en fotobiorreactores verticales, debido a la facilidad de recibir luz evitando áreas muertas, es por ello que en esta especie se encontró resultados favorables.

(López-Elías, 2003) Sostienen en su investigación que las concentraciones de las flageladas verdes *Tetraselmis suecica*, los resultados variaron de 0.2 a 0.6 x 10^6 cél·ml^{-1}.

El estudio realizado determino que *Tetraselmis striata* obtuvo 1.59x10^6 cel/ml. En este caso los resultados si son superiores a la que presenta (López-Elías, 2003)

4.2.3 Determinación el análisis proximal como biomasa húmeda y como harina de microalgas comparando los valores obtenidos por cada una de las especies de microalgas.

4.2.3.1 Análisis Proximal

(Humberto J. Morris Quevedo, 1999), según el desarrollo de su investigación titulada “Composición bioquímica y evaluación de la calidad proteica de la biomasa autótrofa de *Chlorella vulgaris*”, tiene como resultados, los componentes bioquímicos Fibra cruda con 8.20%, cenizas 8.90%;

Los análisis realizados a las tres especies de microalgas, en caso de la fibra cruda presento un rango de 0.04 a 0.09%, encontramos por debajo de sus rangos, a diferencia del porcentaje

de ceniza que son datos más próximos a nuestra investigación siendo esta de 8.18%.

4.2.3.1.1 Determinación del porcentaje de proteínas

Los resultados obtenidos del análisis de proteínas de la biomasa húmeda, el cual se muestra en el (Cuadro 16), se realizaron por duplicado, los análisis fueron obtenidos en la Universidad Católica de Santa Maria de Arequipa, Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnología, correspondiente al Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad.

Cuadro 16. Contenido de proteínas de biomasa húmeda

DETERMINACION DE PROTEINA		
ESPECIE	Nº de Repeticiones (R)	Proteína (%) Biomasa Húmeda de Microalga
Chlorella vulgaris	R1	30,52
	R2	5,57
Tetraselmis striata	R1	27,73
	R2	5,72
Nannochloropsis oculata	R1	8,67
	R2	9,59

Fuente: Elaboración propias (2017)

- En el Cuadro 16 se observa los resultados obtenidos del porcentaje de proteína máxima de la investigación siendo la especie *Chlorella vulgaris* la que presento mayor contenido proteico de

(Humberto J. Morris Quevedo, 1999) Reporta un contenido de proteína verdadera de 32.25 %, las cuales son próximos al valor desarrollado en la investigación siendo esta de 30,52% de proteína.

- Así también se aprecia en el Cuadro 16 que los resultados obtenidos en nuestra investigación de la especie *Tetraselmis striata* fue de un máximo de proteína de 27.73%.

(ACUINUGA, 2017), menciona que la *Tetraselmis striata* contiene 19% de proteína, sosteniendo entonces que el valor de las proteínas determinadas en el presente trabajo fueron superiores ya que los resultados presentados por esta investigación fueron de 27.73%.

Por lo contrario (Carolina Montoya Vallejo, 2016), en su investigación de "Producción de biomasa microalgal de *Tetraselmis sp* en fotobiorreactor tipo columna de burbujeo" reporta que la composición proteica es de 55%. Estos resultados indican que la microalga tiene una composición adecuada para ser utilizada como alimento en la acuicultura.

- Por último en el Cuadro 16 de los resultados obtenidos por la investigación, se aprecia la especie de *Nannochloropsis oculata* presento la menor cantidad de proteína de 9.59%.

(Richmond, A. y Becker, E. W., 1986) En el perfil bioquímico de las cepas marinas destinadas a la acuicultura con mayor contenido proteínico y lipídico. Nos dice que la *Nannochloropsis oculata* posee 40% de proteínas, sosteniendo así que el valor proteico de la investigación desarrollada se encuentra en rangos inferiores.

Debido a que los resultados obtenidos solo alcanzaron 9.59% de contenido proteico.

Cuadro 17. Contenido de proteínas de la Harina de microalgas

DETERMINACION DE PROTEINA		
ESPECIE	Nº de Repeticiones (R)	Proteína (%) Harina de Microalga (g)
Chlorella vulgaris	R1	16,93
	R2	14,87
Tetraselmis striata	R1	23,76
	R2	18,39
Nannochloropsis oculata	R1	30,30
	R2	23,82

Fuente: Elaboración propia (2017)

- En el (Cuadro 17) se observa el porcentaje máximo de la proteína de la investigación ejecutada donde la especie la *Chlorella vulgaris* presenta 16.93 % de contenido proteico.

Mientras que (Liza Sal y Rosas, 2015) reporta que el contenido de proteína del *Chlorella ellipsoidea*es es de 51.32% en

biomasa seca, el cual nuestro resultado obtenido de 16.93% no se encuentran dentro del rango mencionado por dicha autora.

- El porcentaje máximo de proteína según la investigación ejecutada de la especie *Nannochloropsis oculata* fue la mayor a diferencia de las otra dos especies presentando un 30.30%

- Como resultado de la investigación ejecutada se obtuvo que la especie de *Tetraselmis striata* presento un 23.76% como porcentaje máximo de la proteína.

Donde (Liza Sal y Rosas, 2015) durante su investigación determinó que el contenido de proteína de dicha especie presento 40.78% en biomasa seca, siendo esta superiores a la investigación ejecutada.

CAPÍTULO V

CONCLUSION Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

- Se cultivó las tres especies de microalgas marinas en condiciones semi controladas; en fotobiorreactores verticales lográndose concentraciones de biomasa significativas, por lo que se concluye que los sistemas de cultivo cerrado (fotobiorreactores) presentan ventajas en el desarrollo del cultivo microalgal. La especie *Chlorella vulgaris*, en comparación a las otras especies, obtuvo una mayor producción de biomasa húmeda llegando a una cantidad máxima de producción de 197.80 g., por cada 160 L de volumen de cultivo; en cuanto a la producción de biomasa seca (harina), obtuvo una producción de 52.90 g. superior las demás especies.

- Se evaluó el crecimiento de las tres especies de microalgas marinas determinando que la especie que presento una mayor concentración celular fue la *Nannochloropsis oculata* con $9.22x10^7$ cel/ml., no obstante fue la especie produjo menor cantidad de biomasa húmeda 144.31 g. a diferencia de la

especie *Chlorella vulgaris* que presento mayor cantidad de biomasa húmeda llegando hasta 197.80 g. esto se debe a su crecimiento la cual alcanzo su fase estacionaria en 3 a 4 días, con una concentración de 1.78 x 10^6 cel/ml.

- Se determinó el análisis proximal de la biomasa húmeda, obteniéndose un valor máximo de proteína para el caso de la *Chlorella vulgaris* llegando hasta 30.52% y en el caso de la harina microalgal se obtuvo un máximo de 30.30% de proteínas para la especie de la *Nannochloropsis oculata.*

- Comparando las tres especies de microalgas marinas en las condiciones del liofilizado (harina) de la microalga *C. vulgaris* por su mayor producción, valor proteico y económico en producciones a mayor escala y grado de digestibilidad, puede ser considerada como insumo potencial que reemplace parcialmente la harina de pescado, es decir, como un producto complementario en la elaboración de dietas alimenticias para peces, en tanto se mejora su tecnología

5.2 RECOMENDACIONES

- Realizar un trabajo de investigación aplicando la harina de microalgas como fuente de proteína microalgal en la elaboración de dietas para peces.

- Usar la técnica del centrifugado por ser una de las técnicas rápida y eficiente que se puede usar de forma continua. Esta técnica del centrifugado juega un papel importante ya que con adecuado centrifugado se obtiene una pasta (biomasa húmeda), con menor porcentaje de humedad la que con lleva a determinar un mejor análisis de proteína.

- La conservación de la biomasa húmeda también influye para la extracción del liofilizado, es por ello que se recomienda trabajar con capas delgadas de biomasa humedad que facilita un adecuado liofilizado, evitando pérdidas para la obtención de harina.

- Desarrollar el cultivo de microalgas en temporada de invierno, para trabajar en condiciones semi controladas adecuadas, esto en cuanto a la temperatura, evitando así el estrés de las microalgas.

- Es importante a adicionar el CO_2 para poder tener un mejor control en cuanto al pH, y dejar que las microalgas completen su ciclo de crecimiento.

- Trabajar con Blower de mayor capacidad, para evitar la usencia de aireación en áreas muertas de las bolsas de cultivo.

- Realizar otras investigaciones en la cual se compruebe la tasa de crecimiento de especies que sean alimentadas con harina de microalgas y harina de pescado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A.O.A.C. (1995). *International Official Methods of Analysis of the Association of Official Analysis Chemist.16th Edition, 5th Revision, Gaithersburg, USA.*

ACUINUGA. (15 de Octubre de 2017). *Ficha Tecnica Numero/Ultima revision:476/220908. Certificacion ISO9001:2000 NºEC-364/08. Laboratorio autorizado Nº046/GA/SA680A*. Obtenido de www.file:///F:/OTRO/hoyyy/476_tetraselmis.pdf

Aguilar, C. C. (2011). Determinación De La Biomasa Microalgal Potencialmente Acumuladora De Lípidos Para La Obtención De Combustible, 1–20.

Alagabase. (01 de Diciembre de 2017). Obtenido de http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=27676

Antia, N. 3. & Cheng, J. Y. (1982). The keto-carotenoids of two marine coccoid members of the Eustigmatophyceae — Br. phycol. 3., 17: 39-50.

Bermeo, C. L. (2011). *“Estudio del cosechado de cultivos de microalgas en agua residual mediante técnicas de centrifugado.* Cadiz, españa.

Borowitzka, M. A. (2010). *"Sustainable biofuels from algae." Mitigacion and Adaptation Strategies for Global Change 18 (1): 13-25.*

Brennan, L., & Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels

and co-products. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 14(2), 557–577. https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.0.

Carolina Montoya Vallejo, A. A. (2016). Producción de biomasa microalgal de *Tetraselmis sp* en fotobiorreactor tipo columna de burbujeo.

Coverti A, Lodi A, Del Borghi A, Solisio C. (2006). *Cultivation of Spirulina platensis in a combined airlift-tubular reactor system. Bioch Eng J.. 32. P. 13-18.*

Eider Eraza Moreno, J. C. (junio de 2017). *Liofilización de microalgas por congelamiento lento y criogénico*. Obtenido de http://www.ms.gba.gov.ar/sitios/laboratorio/files/2012/08/LIOFILIZACION.pdf.

El-Sayed AM, T. S. (1991). *Tilapia nutrition in aquaculture.* Rev Aquat Sci ; 5: 247-265.

Elliott, L. G. (2012). *"Establishment of a bioenergy - focused microalgal culture collection." Algal Research 1(2):102-113.*

FAO. (2013). *Desarrollo de la acuicultura: Uso de peces silvestres como alimento en acuicultura.*

García Cubero, R. (2009). *Producción de biomasa de microalgas rica en carbohidratos acoplada a la eliminación fotosintética de co2.* Instituto de bioquímica vegetal y fotosíntesis universidad de Sevilla, Consejo Superior de Investigaciones Científica.

Garibay-Hernández, A. V.-D.-S.-J. (2009). *Biodisel a partir de microalgas. Sociedad Mexicana de Biotecnologia y Bioingenieria.13: 38 - 61.*

Gomez castillo, c. V. (2012). *Efecto del estres inducido por deficiencia de sales nutritivas en un sistema de cultivo raceway awl de las microalgas chlorella vulgaris y scenedesmus dimorphus.* Arequipa: universidad catolica de santa maria, facultad de ciencias farmaceuticas bioquimicas y biotecnologicas.

Gómez, L. M. (2007). Redalyc.microalgas: Apectos ecológicos y biotecnológicos.

Guillard, R. (1975). *Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith, W.L. and M.H. Chanley (ed.). Culture of marine invertebrates animals. Plenum Publishing Corp.* New York.

Hernández-Pérez A. & Labbé, J. (2014). *Microalgas, cultivo y beneficios. Revista de Biología Marina y Oceanografía, 49 (2).* Obtenido de Recuperado de: http://www.scielo.cl/pdf/revbiolmar/v49n2/art01.pdf.

Hicks, J. (2001). *Bioquimica Mc Graw Hill Interamericana editores. México, D.F. pp. .*

Humberto J. Morris Quevedo, M. M. (1999). Composiscion Bioquimica y Evaluacion de la Calidad Proteica de la Biomasa Autotrofica de Chlorella vulgais. *Centros de Investigacion de Energia Solar, Rev. Cubana*.

IMARPE. (2008). *Condicionamiento de reproductores y obtención de semillas de concha de abanico Argopectenpurpuratus (lamarck, 1819), Informe anual.* Ilo, Moquegua.

IMARPE, C. A. (Callao de Noviembre de 2011). Proyecto IMARPE - FINCyT “Determinación de la biomasa microalgal potencialmente acumuladora de lípidos para la obtención de combustible.

Jourdan, J. P. (1999). *Cultivez votre spiruline, manuel de culture artisanale de la spiruline.Ed. Antenna Technology.* París, Francia. 126 p.

Karim, R. P. (2001). *Manual para el Cultivo de Microalgas Memoria tecnica profesional UABCS 57pp.*

Lamarck. (1819). *Condicionamiento de reproductores y obtención de semillas de concha de abanico Argopecten purpuratus .*

Lesly Tejeda Benítez, D. H.-S. (2015). Caracterización y perfil lipídico de aceites de microalgas. *Revista Facultad de Ingeniería (Fac. Ing.), Mayo-Agosto 2015, Vol. 24. No. 39. pp. 43-54*.

Liza Sal y Rosas, C. R. (2015). *EFECTO DE DIETAS CON TRES MICROALGAS BENTÓNICAS EN EL CRECIMIENTO Y SUPERVIVENCIA POST LARVAL DEL Loxechinus albus, ERIZO VERDE.* Ilo.

López-Elías, J. V.-E.-S. (2003). *Producción comercial de larvas de camarón y microalgas en cuatro estados de la República Mexicana. Biotecnia, 5 (1): 42-50.*

Mata, T. C. (2010). *Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews 14, 217-232.*

Méndez, S. A. (2017). 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 .

Mendoza, H., Jara, A., & Portillo, E. (2011). Planta Piloto De Cultivo De Microalgas.

Morales, L., & A, C. M. (2015). *Microalgas y biodiesel. Proyecto de grado. Jalisco (México). Universidad de Guadalajara.* Obtenido de http://es.slideshare.net/AndyMejia/microalgas-47729027.

Morris, H. Q. (1999). Composición bioquímica y evaluación de la calidad proteica de la biomasa autotrófica de *Chlorella vulgaris.* En *Alimentación Y Nutrición,* (págs. 13, 99–111.).

Morris, H. y. (2002). Determinación del contenido de triptófano en suplementos nutricionales de microalgas mediante espectrofotometría derivativa. *Revista Cubana de Química.*, 16 (1): 65-70.

Ohse, S., Derner, R., Ozório, R., Braga, M., Cunha, P., & Lamarca, C. (2008). *Crescimento de microalgas em sistema autotrófico estacionário. Revista Biotemas, v. 21, n. 2, p. 7-18.*

R., Andersen. (2005). *Algal Culturing Techinques. Counting Cells in Culture with the Light Microscope.239-252.*

Ramírez L, O. R. (2006). *Uso tradicional y actual de Spirulina sp (Arthrospira sp).* Rev Interciencia; 31: 657-659.

Ricardo D. Andrade, R. T. (2006). *Obtención de harina a partir del cultivo de chlorella vulgaris y su analisis proteico.*

Richmond, A. (2004). *"Handbook of microalgal culture (Biotechnology and Applied Phycology).".* Ed. Blackwell Publishing.

Richmond, A. y Becker, E. W. (1986). «Technological aspects of mass cultivation, a general outline»; Handbook of Microalgal Mass Culture, Richmond, ed.: CRC Press Inc. Boca Ratón. Florida. pp. 245-263.

Rincon DD, V. H. (2012). *Niveles de sustitución de harina de pescado por harina de Arthrospira (Spirulina máxima), en dietas experimentales para alevines de Tilapia Roja (Oreochromis sp.). .* Rev Colombiana de Ciencias Pecuarias; 25:430 - 437.

Rubio, M. M. (2001). *Lecciones de microbiologia y medios de cultivos.* Lima: Laborales S.R.L.

Stanley, C. y. (1966). *Investigando con la realidad en psicosociologia del deporte:el uso de diseños cuasi experimentales.* Recuperado el 20 de Mayo de 2017, de http://www.efdeportes.com/.

Thake, Fogg G E and B. (1987). *Algae CuHures and Phytoplancton Ecology The University ofWiscoinsin Press Third.* Edition EU A 126 pp.

Ynga Huamán, G. (2011). “Cultivo Masivo de Microalgas en Biorreactores Verticales,” 61.

Zeballos Feria, S. (2010). Tecnologia de cultivo de microalgas como alimento de moluscos. En I. D. Moquegua, *Cultivo de Microalgas.* Ilo, Ilo, Moquegua. Recuperado el Enero de 2017.

6. ANEXOS

ANEXO 1. Matriz de consistencia

PROBLEMAS	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	VARIABLES E	INDICADORES	TECNICAS E INSTRUMENTO
¿Cuál es el Contenido proteico de la biomasa húmeda y de la harina de tres especies de microalgas marinas; Chlorella vulgaris, Nannochloropsis oculata y Tetraselmis striata cultivada en el laboratorio de la Universidad Nacional de Moquegua durante el año 2017?	**OBJETIVO GENERAL** Determinar el contenido proteico de biomasa húmeda y harina de tres especies de microalgas marinas; Chlorella vulgaris, Nannochloropsis oculata y Tetraselmis striata, cultivadas en el laboratorio de la Universidad Nacional de Moquegua – filial Ilo, durante el 2017. **OBJETIVO ESPECIFICO** a) Cultivar las microalgas marinas en laboratorio de Microalgas en la UNAM - Filial Ilo hasta la obtención de biomasa húmeda y harina de microalgas. b) Evaluar el crecimiento de las tres especies de microalgas marinas en laboratorio. c)Determinar el análisis proximal como biomasa húmeda y como harina de microalgas comparando los valores obtenidos de proteínas por cada una de las especies de microalgas	**Las especies de microalgas seleccionadas presentan diferente contenido proteico tanto en las condiciones de biomasa húmeda como en la harina cultivadas en el laboratorio de Microalgas de la Universidad Nacional de Moquegua - Filial Ilo.**	**INDEPENDIENTE** Especie de microalgas **DEPENDIENTE** Contenido proteico	**INDEPENDIENTE** Peso de biomasa húmeda de microalgas (gr.) Peso de harina de microalgas (gr.) **DEPENDIENTE** Porcentaje de proteínas (%)	**TECNICAS** Para la recolección de información se realizó como técnica de recolección de datos, el recuento celular y los análisis de determinación de porcentaje de proteínas. **METODOS Y TECNICAS DE PRESENTACION DE DATOS** Se realizó el análisis proximal para la determinación del porcentaje de proteínas utilizando el método espectrofotométrico (Kjeldahl). Los datos obtenidos se registraron en hojas de cálculos de Excel, para evaluar el crecimiento celular del cultivo de las tres especies de microalgas a través del tiempo. Y el porcentaje de proteínas de la biomasa húmeda y de la harina de microalgas. Fueron realizadas con dos repeticiones por tratamiento, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) (p=0.05). Posteriormente se realizó la prueba de Tukey para seleccionar el mejor tratamiento.

ANEXO 2

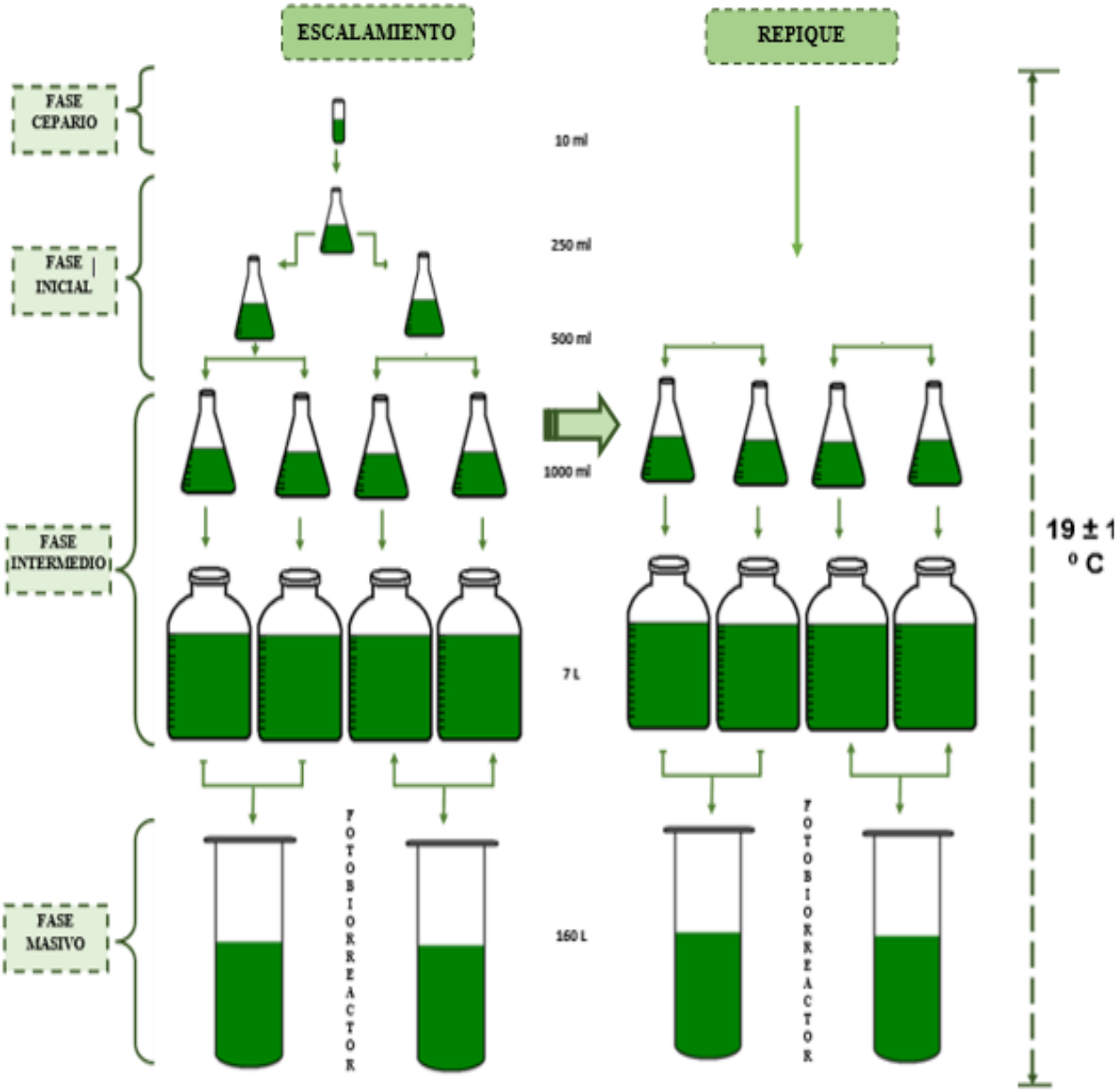
Preparación del medio F/2 modificado (Guillard 1975) para microalgas marinas

Macronutrientes	g/L
KNO_3	75.00
NaH_2PO_4 . 2 H_2O	5.65
Micronutrientes	**g/L**
EDTA Na_2	4.360
$FeCl_3$. 6 H_2O	3.150
$CuSO_4$. 5 H_2O	0.010
$ZnSO_4$. 7 H_2O	0.022
$CoCl_2$. 6 H_2O	0.010
$MnCl_2$. 4 H_2O	0.180
Na_2MoO_4 . 2 H_2O	0.006
Vitaminas	**g/L**
Cyanocobalamina	0.002
Tamina HCl	0.100
Biotina	0.001
Reactivo 4	**mL/L**
Na_2SiO_3 . 5 H_2O	10.00
H_3ClO_4	5.00
ajustar a pH 8.0 con 1 M Na OH or HCl	
Preparación del Medio	**En 1 Litro**
Reactivo 1	1.00 mL
Reactivo 2	1.00 mL
Reactivo 3	1.00 mL

Fuente: (Guillard, 1975)

ANEXO 3

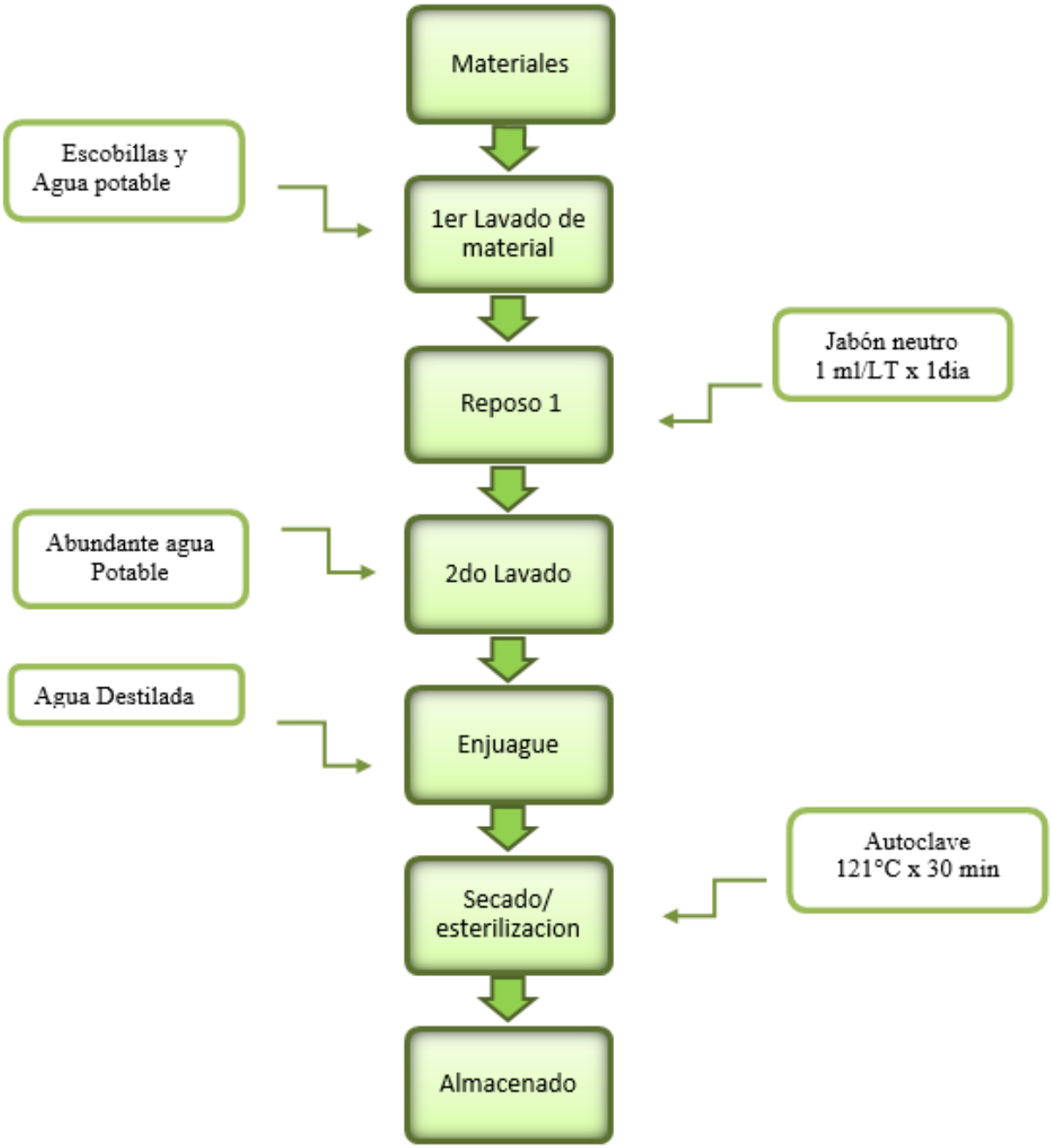
Diagrama del cultivo de microalgas en el laboratorio microalgas de la UNAM – Filial Ilo



Fuente: Elaboración propia (2017)

ANEXO 4

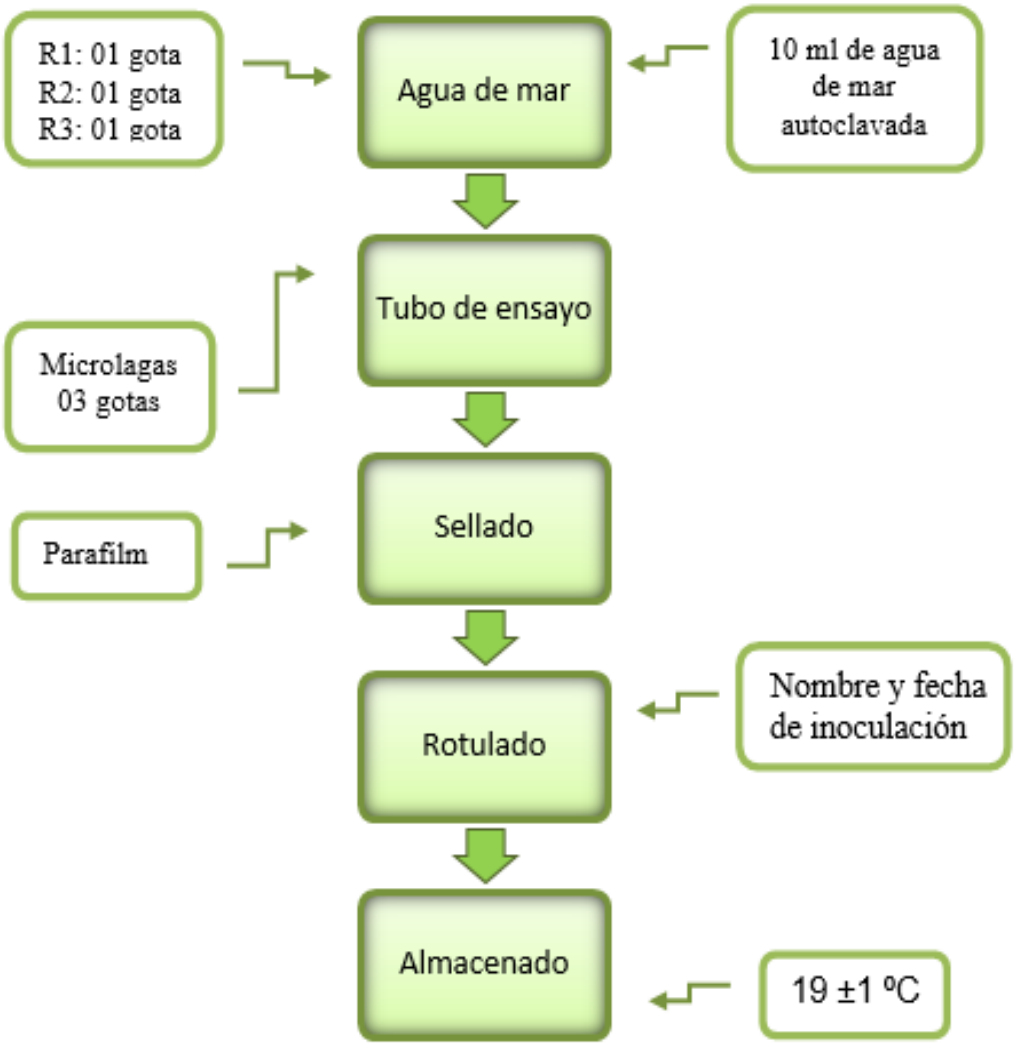
Diagrama del proceso del lavado de materiales de vidrio



Fuente: Elaboración propia (2017)

ANEXO 5

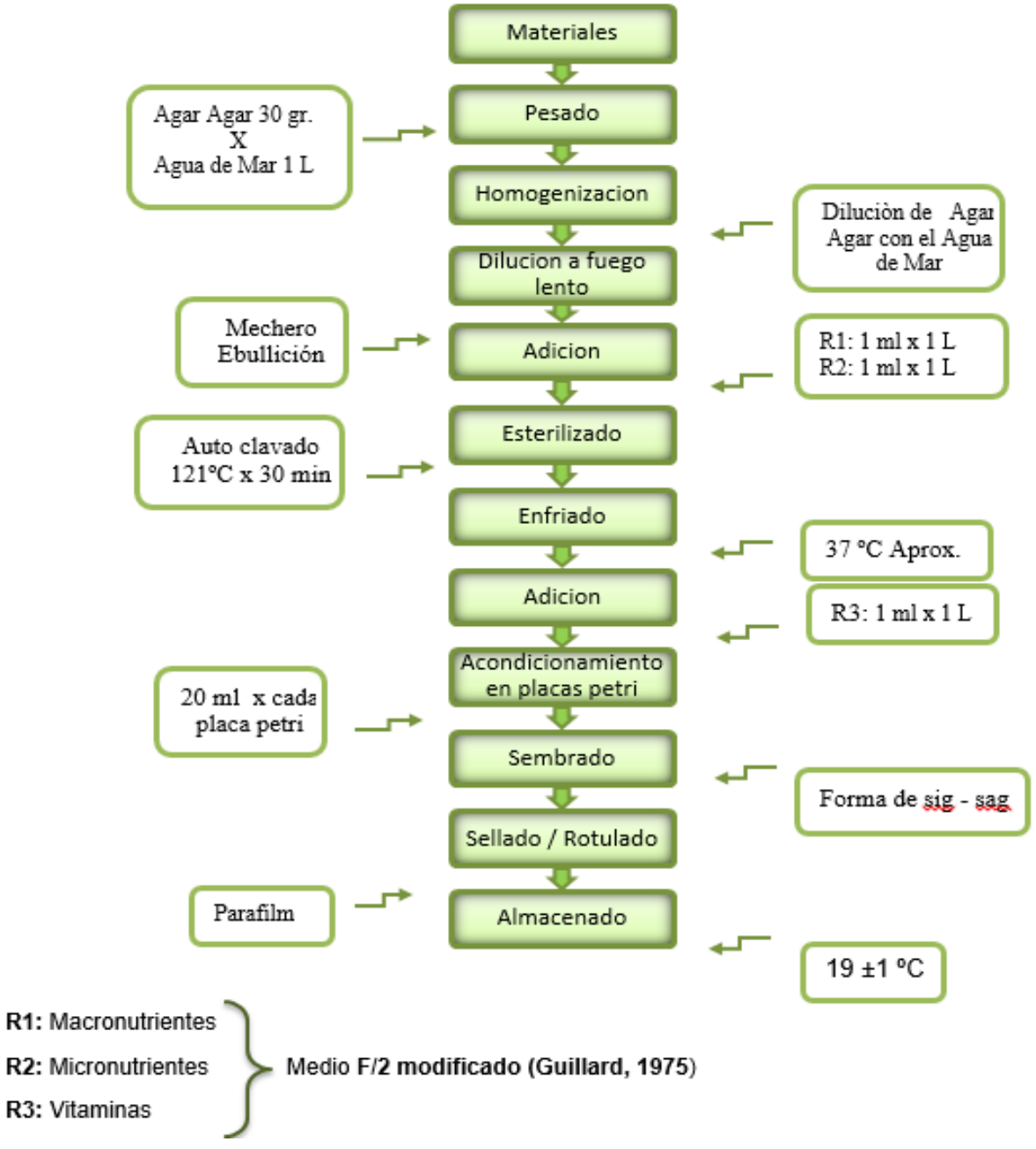
Proceso de preparación del medio líquido
(Contenidas en tubos de ensayo de 10 ml)



Fuente: Elaboración propia (2017)

ANEXO 6.

Proceso de preparación del Medio Solido



Fuente: Elaboración propia (2017)

ANEXO 7.

Formato Nº 01 Control del cultivo de microalgas

FORMATO N° 01|

CONTROL DEL CULTIVO DEL PROYECTO DE MICROALGAS – 2017

CARRERA PROFESIONAL: INGENIERÍA PESQUERA

FECHA	DETALLE DE LA ACTIVIDAD	MATERIALES	OBSERVACIONES	TURNO / HORA		
				MAÑANA	TARDE	NOCHE

Fuente: Elaboración propia (2017)

ANEXO 8.

Formato Nº 03 Control de parámetros de cultivo

FORMATO N° 03

CONTROL DE PARAMETROS DEL CULTIVO DEL PROYECTO DE MICROALGAS – 2017

CARRERA PROFESIONAL: INGENIERÍA PESQUERA

FECHA	ESPECIES	MUESTRA (L)	LOTE DEL CULTIVO	pH	T° CULTIVO (°C)	T° AMBIENTE (°C)	O_2 (mg/L)	SALINIDAD (ppm)	CONDUCTIVIDAD (mS/cm)	INTENSIDAD LUMINCA (LUX)
	Chlarella vulgaris									
	Tetraselmis striata									
	Nannochloropsis aculata									
	Chlarella vulgaris									
	Tetraselmis striata									
	Nannochloropsis aculata									
	Chlarella vulgaris									
	Tetraselmis striata									
	Nannochloropsis aculata									
	Chlarella vulgaris									
	Tetraselmis striata									
	Nannochloropsis aculata									
	Chlarella vulgaris									
	Tetraselmis striata									
	Nannochloropsis aculata									

Fuente: Elaboración propia (2017)

ANEXO 9.

Formato Nº 02 Recuento de microalgas

FORMATO N° 02|

RECUENTO DE MICROALGAS DEL PROYECTO DE MICROALGAS – 2017

CARRERA PROFESIONAL: INGENIERÍA PESQUERA

LOTE / FECHA	ESPECIE	N° DE REPLICAS	MUESTRA (L)	RECUENTO					TOTAL	PROMEDIO	CALCULO	RECUENTO TOTAL
	Chlorella vulgaris	1										
		2										
		3										
		4										
		5										
		6										
	Tetraselmis striata	1										
		2										
		3										
		4										
		5										
		6										
	Nannochloropsis oculata	1										
		2										
		3										
		4										
		5										
		6										
	Chlorella vulgaris	1										
		2										
		3										
		4										
		5										
		6										
	Tetraselmis striata	1										
		2										
		3										
		4										
		5										
		6										
	Nannochloropsis oculata	1										
		2										
		3										
		4										
		5										
		6										

Fuente: Elaboración propia (2017)

ANEXO 10.

Formato Nº 04 Obtención de biomasa húmeda y liofilizada)

FORMATO N° 04

REGISTRO DE OBTENCION DE BIOMASA HUMEDA Y LIOFILIZADO DEL PROYECTO DE MICROALGAS – 2017

CARRERA PROFESIONAL: INGENIERÍA PESQUER

FECHA	ESPECIES	LOTE DEL CULTIVO	MUESTRA (L)	HORA DE INICIO CENTRIFUGADO	HORA DE TERMINO CENTRIFUGADO	PESO DEL PAPEL ALUMINIO (gr)	PESO DE LA BIOMASA HUMEDA (gr)	PESO TOTAL (gr)	FECHA	PESO DE BIOMASA PARA EL LIOFILZADO (gr)	PESO DEL LIOFILIZADO (gr)
	Chlorella vulgaris										
	Tetraselmis striata										
	Nannochloropsis oculata										
	Chlorella vulgaris										
	Tetraselmis striata										
	Nannochloropsis oculata										
	Chlorella vulgaris										
	Tetraselmis striata										
	Nannochloropsis oculata										
	Chlorella vulgaris										
	Tetraselmis striata										
	Nannochloropsis oculata										
	Chlorella vulgaris										
	Tetraselmis striata										
	Nannochloropsis oculata										

Fuente: Elaboración propia (2017)

ANEXOS 11

Producción del cultivo microalgas en el laboratorio microalgas de la UNAM – Filial llo

✓ Fase Cepario

Foto 1. Preparación del medio líquido



Fuente: Elaboración propia (2017)

Foto 2. Medio liquido (tubos de ensayo de 10 ml)



Fuente: Elaboración propia (2017)

Foto 3. Preparación del medio Solido



Fuente: Elaboración propia (2017)

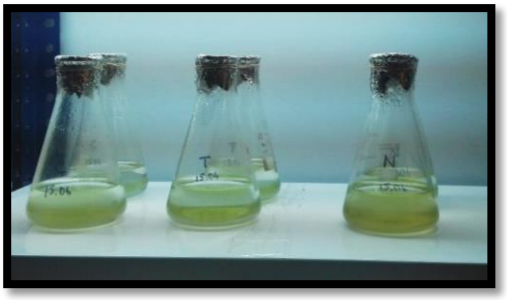
Foto 4. Medio solido



Fuente: Elaboración propia (2017

- ✓ Fase Inicial

Foto 5. Cultivo en matraz de 250 ml



Fuente: Elaboración propia (2017)

Foto 6. Escalamiento de matraz de 250 ml a 500 ml



Fuente: Elaboración propia (2017)

Foto 7. Cultivo en matraz de 250 ml



Fuente: Elaboración propia (2017)

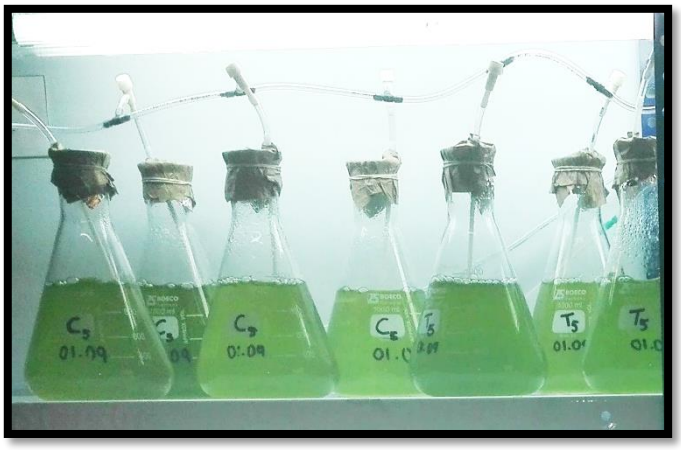
✓ Fase Intermedia

Foto 8. Escalamiento a matraz de 1000 ml



Fuente: Elaboración propia (2017)

Foto 9. Cultivo en matraz de 1000 ml



Fuente: Elaboración propia (2017)

Foto 10. Escalamiento a botellas de 7 L



Fuente: Elaboración propia (2017)

Foto 11. Cultivo en matraz de 7 L



Fuente: Elaboración propia (2017)

✓ **Fase masiva**

Foto 12. Escalamiento a fotobiorreactores



Fuente: Elaboración propia (2017)

Foto 13. Cultivo en fotobiorreactores (160 L)

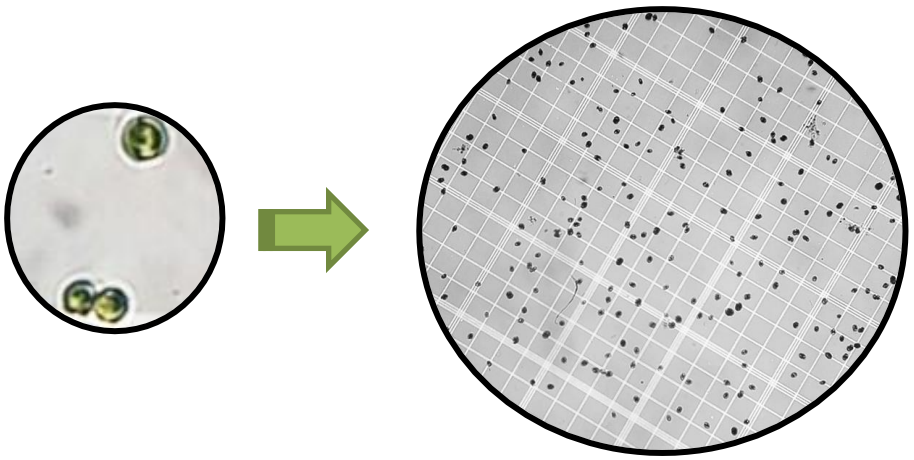


Fuente: Elaboración propia (2017)

ANEXO 14.

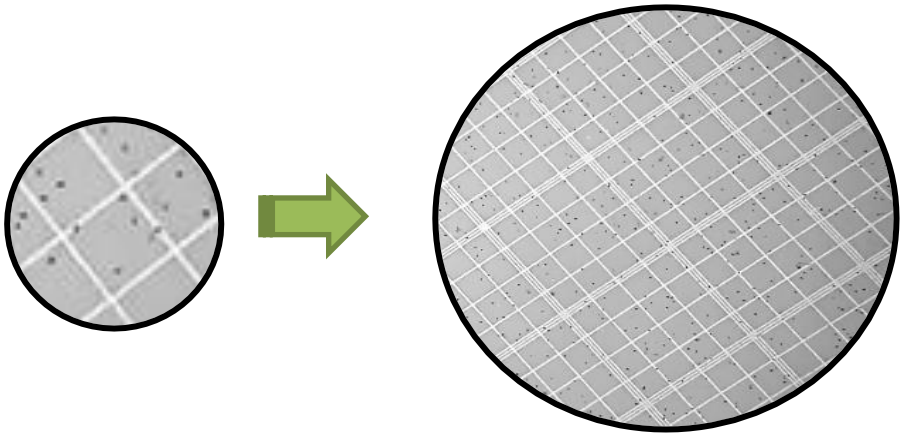
Identificación microscópica de microalgas

Foto 14. *Chlorella vulgaris*



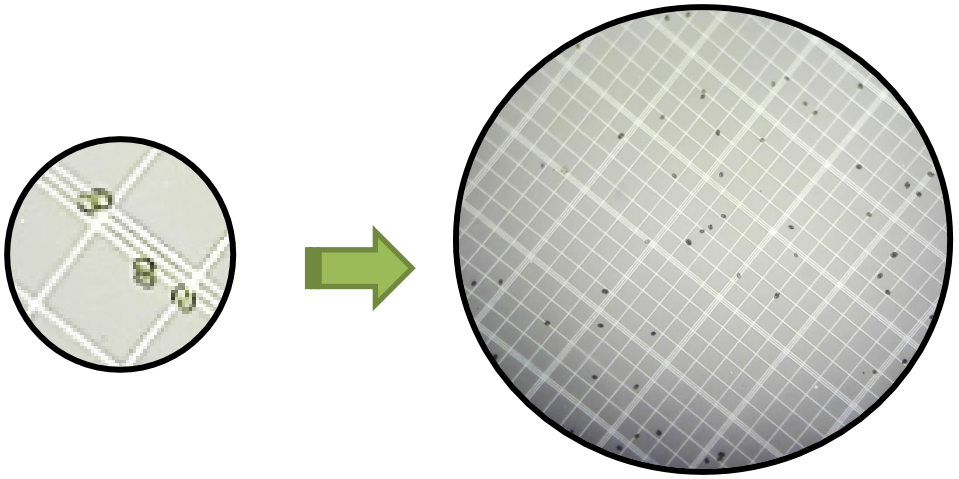
Fuente: Elaboración propia (2017)

Foto 15. *Nannochloropsis oculata*



Fuente: Elaboración propia (2017)

Foto 16. *Tetraselmis striata*



Fuente: Elaboración propia (2017)

ANEXO 13

Cosecha y centrifugado de microalgas

Foto 17. Cosecha de las microalgas



Fuente: Elaboración propia (2017)

Foto 17. Centrifugado de las microalgas



Fuente: Elaboración propia (2017)

ANEXO 14

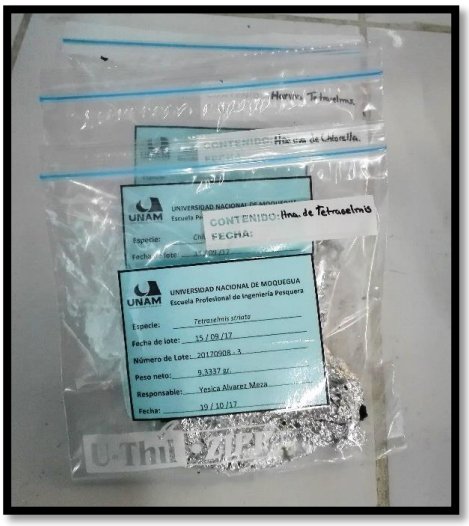
Biomasa húmeda y harina de microalgas

Foto 18. Biomasa húmeda de microalgas



Fuente: Elaboración propia (2017)

Foto 19. Harina de microalgas



Fuente: Elaboración propia (2017)