

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN

Facultad de Ciencias

Escuela Profesional de Biología - Microbiología

**“EFECTO DE MEDIOS DE CULTIVO ELABORADOS CON FERTILIZANTE
ORGÁNICO E INORGÁNICO EN EL CRECIMIENTO Y FIJACIÓN
DE DIATOMEAS BENTÓNICAS MARINAS CON
POTENCIAL ACUÍCOLA”**

Tesis

Presentada por

Bach. Jordan Ismael Huanacuni Pilco

Para optar el Título Profesional de:

Biólogo-Microbiólogo

Tacna – Perú

2016

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN – TACNA
FACULTAD DE CIENCIAS

Acta de sustentación de Tesis N° 274

En la ciudad de Tacna en el auditorium de la Facultad de Ciencias, de la Universidad Nacional JORGE BASADRE GROHMANN; siendo las 11:10 horas del día 05 de mayo del 2016, estando presentes el jurado calificador nominado por Resolución de Facultad N° 8455-2016-FACI- UN/JBG, conformado por los siguientes docentes:

Mgr. Daladier Miguel Castillo Cotrina (Presidente)

Mgr. Isabel Ancco Oliva (Secretaria)

MSc. Angela Choque Miranda (Miembro)

Acto seguido, se dio lectura a la Resolución correspondiente, y del mismo modo se dio lectura al Artículo 22 del Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad de Ciencias.

A continuación, el Presidente del Jurado instó al Bachiller: JORDAN ISMAEL HUANACUNI PILCO a exponer la tesis titulada “EFECTO DE MEDIOS DE CULTIVO ELABORADOS CON FERTILIZANTE ORGÁNICO E INORGÁNICO EN EL CRECIMIENTO Y FIJACIÓN DE DIATOMIAS BENTÓNICAS MARINAS CON POTENCIAL ACUÍCOLA” siendo las 11:50 horas, el tesista concluye su exposición, luego se procedió a la formulación de las preguntas por parte de los miembros del jurado calificador.

Terminando este proceso, se invitó a que los miembros del jurado emitan su calificación de acuerdo a reglamento. El promedio de la calificación dio el siguiente resultado: Aprobado (por unanimidad, por mayoría, sea el caso), con el calificativo de dieciséis (16) de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad de Ciencias.

Siendo las 12:30 horas, se dio por concluido el acto de sustentación de la tesis, firmando los señores miembros del jurado calificador, en señal de Conformidad.



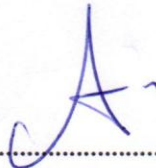
.....
Mgr. DALADIER MIGUEL CASTILLO COTRINA

(Presidente)



.....
Mgr. ISABEL ANCCO OLIVA

(Secretaria)



.....
MSc. Angela Choque Miranda

(Miembro)

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la UNJBG por darme la oportunidad de estudiar la carrera y conocer a personas maravillosas.

A mis maestros de la universidad que me apoyaron y estuvieron conmigo resolviendo mis dudas con gran paciencia.

Se agradece al Fondo de Desarrollo Pesquero (FONDEPES) que me facilitaron las instalaciones del Centro Acuícola Morro-Sama (CAMOSA) para el desarrollo del proyecto.

Agradezco a mi asesor de tesis, el Mblgo Luis Lloja Lozano por su amistad, su manera tan sabia de brindar sugerencias y correcciones en la tesis. A mi co-asesor el Ing. Luis Rodríguez RUIRO que a pesar de las dificultades que se presentaron a lo largo del desarrollo del proyecto supimos sobrellevar el trabajo en buenos términos, y gané un buen amigo.

A mis amigos de generación, sobre todo a mis compañeros de la Carrera Biología-Microbiología por su amistad y apoyo en todo momento.

DEDICATORIA

El presente trabajo está dedicado a mi familia, siendo mis padres el pilar de mi crecimiento como persona, quienes siempre han estado en cada momento de mi vida, les agradezco todo el esfuerzo que han hecho por mí y sé que seguirán haciéndolo por mí y mis triunfos, todo se lo debo a ustedes, me convirtieron en la persona que soy y nunca se los podré pagar.

A mis hermanas que son mis compañeras y amigas incondicionales que me han ayudado en momentos difíciles y compartieron mis momentos de alegría.

¡Los amo!

Su hijo y hermano mayor...

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
ABREVIATURAS.....	2
GLOSARIO	3
I. INTRODUCCIÓN.....	5
II. OBJETIVOS.....	7
1.1. Objetivo general.....	7
1.2. Objetivos específicos.....	7
III. MARCO TEÓRICO.....	8
3.1. MICROALGAS EN LA ACUICULTURA.....	8
3.1.1. Microalgas.....	8
3.1.2. Cultivo de microalgas para la acuicultura.....	9
3.2. MEDIOS DE CULTIVO	11
3.2.1. Medio Guillard f/2.....	12
3.2.2. Fertilizantes inorgánicos.....	13
3.2.3. Fertilizantes orgánicos	14
3.3. DIATOMEAS BENTÓNICAS.....	15
3.3.1. Formación de Biopelículas	17
3.4. CRECIMIENTO POBLACIONAL	17
3.5. PARÁMETROS DE CRECIMIENTO	19
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	23
4.1. MATERIALES	23
4.1.1. Limpieza y esterilización de materiales.....	24

4.2. MÉTODOS:	24
4.2.1. Captación de Diatomeas	25
4.2.1.1. Elaboración de un sistema de Captación	25
4.2.1.2. Colecta de muestras	25
4.2.2. Aislamiento e Identificación de Diatomeas	26
4.2.2.1. Preparación de medio Guillard f/2 en placas	26
4.2.2.2. Siembra en placa	26
4.2.2.4. Tratamiento con antibiótico	28
4.2.2.5. Selección de las Diatomeas	28
4.2.2.6. Identificación de las Diatomeas Bentónicas	28
4.2.3. Aumento progresivo de volumen.	30
4.2.4. Comparación de los medios de cultivo	32
4.2.4.1. Medio Guillard f/2	32
4.2.4.2. Medio con Fertilizante Inorgánico	32
4.2.4.3. Medio con Fertilizante Orgánico	32
4.2.5. Primera serie experimental	33
4.2.5.1. Tamaño y conteo de muestra	35
4.2.5.2. Cálculos Poblacionales	36
4.2.6. Segunda serie experimental	39
4.2.6.1. Conteo de muestras	41
V. RESULTADOS	43
5.2. PRIMERA SERIE EXPERIMENTAL	45
5.2.1. Parámetros de crecimiento de microalgas en los tres medios de cultivo	45
5.2.2. Análisis estadístico del crecimiento de diatomeas	57
5.3. SEGUNDA SERIE EXPERIMENTAL	62
5.3.1. Parámetros de adhesión de diatomeas al sustrato.	62
5.3.2. Análisis estadístico para la fijación de diatomeas	65

VI. DISCUSIÓN	70
VII. CONCLUSIONES.....	74
VIII. RECOMENDACIONES	76
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
X. ANEXOS	86

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Diagrama general de producción de microalgas	10
Gráfico 2	Medios de cultivo.....	12
Gráfico 3	Curva de crecimiento.....	18
Gráfico 4	Reglilla de la cámara de Neubauer de 9 mm ²	36
Gráfico 5	Diseño de la segunda serie experimental.....	40
Gráfico 6	Medidas del contenedor de vidrio y láminas de policarbonato	41
Gráfico 7	Curva de crecimiento de <i>Navicula</i> sp1. en los tres medios evaluados	47
Gráfico 8	Curva de crecimiento de <i>Nitzschia</i> sp1. en los tres medios evaluados	50
Gráfico 9	Curva de crecimiento de <i>Navicula</i> sp2. en los tres medios evaluados	53
Gráfico 10	Curva de crecimiento de <i>Nitzschia</i> sp2. en los tres medios evaluados	56
Gráfico 11	Curva de fijación de diatomeas en la formación de biopelículas multiespecíficas en los tres medios evaluados.....	64

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Lista de Materiales.....	23
Tabla 2	Volúmenes utilizados en el aumento progresivo de los cultivo (Batch) 31	
Tabla 3	Diseño de la primera serie experimental.....	34
Tabla 5	Parámetros de crecimiento de <i>Navicula</i> sp1. en medio Guillard f/2.....	45
Tabla 6	Parámetros de crecimiento de <i>Navicula</i> sp1. en medio foliar	46
Tabla 7	Parámetros de crecimiento de <i>Navicula</i> sp1. en medio humus	46
Tabla 8	Parámetros de crecimiento de <i>Nitzschia</i> sp1. en medio Guillard f/2	48
Tabla 9	Parámetros de crecimiento de <i>Nitzschia</i> sp1. en medio foliar	49
Tabla 10	Parámetros de crecimiento de <i>Nitzschia</i> sp1. en medio humus.....	49
Tabla 11	Parámetros de crecimiento de <i>Navicula</i> sp2. en medio Guillard f/2... 	51
Tabla 12	Parámetros de crecimiento de <i>Navicula</i> sp2. en medio foliar	51
Tabla 13	Parámetros de crecimiento de <i>Navicula</i> sp2. en medio humus	52
Tabla 14	Parámetros de crecimiento de <i>Nitzschia</i> sp2. en medio Guillard f/2 ..	54
Tabla 15	Parámetros de crecimiento de <i>Nitzschia</i> sp2. en medio foliar	54
Tabla 16	Parámetros de crecimiento de <i>Nitzschia</i> sp2. en medio humus.....	55
Tabla 17	Resumen de densidades finales.....	57
Tabla 18	Anova para Log10 (Densidad final) por medio de cultivo	58
Tabla 19	Medias por mínimos cuadrados para Log10 (Densidad final) con intervalos de confianza del 95 %	59
Tabla 20	Pruebas de múltiple rangos para Log10 (Densidad final) por cada medio de cultivo.....	60
Tabla 21	Diferencias estimadas entre cada par de medias.....	61
Tabla 22	Densidad de diatomeas fijadas en la formación de biopelículas multiespecíficas en los tres medios de cultivo evaluados.	63
Tabla 23	Resumen de densidades finales de fijación	65
Tabla 24	Anova para Log10 (Densidad final) por medio de cultivo	66
Tabla 25	Tabla de medias para Log10 (Densidad final) por medio de cultivo con intervalos de confianza del 95 %	67
Tabla 26	Pruebas de múltiple rangos para Log10 (Densidad final) por medio de cultivo	68
Tabla 27	Diferencias estimadas entre cada par de medias.....	69

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1	Limpieza y esterilización de materiales.....	86
Anexo 2	Acondicionamiento del cepario.....	87
Anexo 3	Preparación de reactivos	87
Anexo 4	Elaboración del sistema de captación.....	88
Anexo 5	Colecta de muestras	88
Anexo 6	Preparación de medio Guillard en placas	89
Anexo 7	Mantenimiento de cepas	89
Anexo 8	Diagrama de Flujo de la producción de microalgas (SISTEMA BATCH)	90
Anexo 9	Formulación del medio Guillard f/2	92
Anexo 10	Preparación de medio Guillard f/2	94
Anexo 11	Formulación del fertilizante inorgánico	95
Anexo 12	Formulación del fertilizante orgánico	96
Anexo 13	Preparación del medio con fertilizante orgánico.....	97
Anexo 14	Cultivo experimental.....	98
Anexo 15	Dispersión de biopelícula en cultivo	99
Anexo 16	Toma de muestra de las unidades experimentales	100
Anexo 17	Conteo de células	101
Anexo 18	Fichas de registro de crecimiento diatomeas	102
Anexo 19	Ficha de registro de fijación de diatomeas.....	103
Anexo 20	Acondicionamiento de acuario y láminas de policarbonato para la fijación de diatomeas.....	104
Anexo 21	Conteo de diatomeas fijadas en láminas de policarbonato.....	105
Anexo 22	Limpieza de diatomeas.....	106
Anexo 23	Diatomeas bentónicas marinas.....	107
Anexo 24	Diatomeas bentónicas marinas para la producción de <i>Hyalotis rufescens</i> en el Centro de Acuicultura Morro Sama - Fondepes	108

RESUMEN

Se realizó el aislamiento de diatomeas bentónicas marinas de origen local en el Centro de Acuicultura Morro-Sama en la Región de Tacna, durante la estación de otoño – invierno del 2015, las cuales fueron colectadas mediante un sistema de captación, se seleccionó cuatro cepas de diatomeas bentónicas nativas para los cultivos experimentales: *Navícula* sp1, *Nitzschia* sp1, *Navícula* sp2, *Nitzschia* sp2.

La primera serie experimental consistió en desarrollar experimentalmente a las diatomeas bentónicas marinas en monocultivos axénicos estáticos de 800mL frente a 3 medios de cultivo: Medio Guillard f/2 (blanco), Nitrofoska foliar (nutriente inorgánico) y Humus de Lombriz *Eisenia foetida* (nutriente orgánico) para determinar el efecto en su productividad en condiciones controladas de temperatura ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$), salinidad 35 ups, fotoperiodo 24 h, iluminación 4000 lux, y aireación de $15,8\text{ ml}\cdot\text{s}^{-1}$, se determinó los parámetros poblacionales en con el fin de obtener cepas caracterizadas. El medio elaborado a base de humus de lombriz fue el mejor en el crecimiento de microalgas produciendo una mayor densidad celular.

La segunda serie experimental consistió en determinar el efecto de los medios de cultivos en la formación de biopelículas multiespecíficas de diatomeas bentónicas en láminas de policarbonato, provenientes de los cultivos monoespecíficos desarrollados en los 3 medios de cultivo evaluados. Los medios elaborados a base de humus de lombriz y nutriente foliar presentaron mejores resultados en la adhesión al sustrato.

ABREVIATURAS

MG:	Medio Guillard f/2
NF:	Nutriente Foliar
HL:	Humus de Lombriz
ups.:	Unidades prácticas de salinidad
D:	Densidad celular
μ :	Tasa de crecimiento específico
TD:	Tiempo de duplicación
K:	Divisiones por día
P.D.:	Producción diaria
V.P.:	Variación porcentual de densidad

GLOSARIO

Diatomeas: Clase de algas unicelulares de caparazón silíceo formado por dos valvas de tamaño desigual.

Cepario de microalgas: Lugar donde se almacenan una gran mayoría de especies de microalgas.

Medio de cultivo: Sustrato o Solución de nutrientes que permite el desarrollo de microorganismos

Fotoperíodo: Tiempo de exposición a la luz

Sustrato: Superficie en la que un organismo vive, puede incluir materiales bióticos o abióticos.

Biopelícula microalgal: Organizaciones microalgales que se adhieren a las superficies gracias a la secreción de exopolímeros.

Biopelícula microalgal monoespecífica: *biopelícula* compuesta por una sola especie de microalga.

Biopelícula microalgal multiespecífica: biopelícula compuesta por una mezcla de distintas microalgas.

Láminas de Policarbonato: Es un es un termoplástico con buena resistencia al impacto, resistencia al calor y transparencia óptica.

Cultivo axénico: Cultivo de una especie de organismo sin contaminantes.

I. INTRODUCCIÓN

El medio marino presenta una amplia variedad microbiológica, algunas de ellas conocidas y otras más totalmente desconocidas. De las especies conocidas, se encuentra un reducido grupo de microalgas marinas utilizadas como alimento vivo en la acuicultura para todos los estadios de crecimiento de los moluscos, para los estadios larvales de crustáceos, para algunas especies de peces y en la producción de zooplancton; por ello es de gran interés, producir alimento con el perfil nutricional adecuado para los organismos de explotación, que permita al mismo tiempo mantener la calidad del agua en las unidades de cultivo, asimismo, la importancia del cultivo de microalgas radica en su papel como productores primarios de la cadena trófica, y por lo tanto, se constituyen en las primeras formadoras de materia orgánica y son de fácil captura y digestión por multitud de organismos que se alimentan en forma directa o indirecta del fitoplancton.

En la actualidad se consideran a las microalgas bentónicas, con especial referencia a las diatomeas, son un grupo poco estudiado y muy rico en diversas formas, géneros y especies, con un alto potencial para ser usado como fuente de alimento vivo para los organismos que se cultivan con interés comercial y que

presenten hábitos bentónicos al menos en alguna fase de su ciclo de vida; La producción de microalgas en muchas granjas y laboratorios comerciales son muy costosos y es por ello que se requieren alternativas económicas para la producción de microalgas.

Con el objetivo de optimizar el cultivo de especies marinas en nuestro país, se ha desarrollado el presente experimento con la posibilidad de incluir microalgas bentónicas autóctonas como suplemento alimentario de animales acuáticos con potencial acuícola. El rango de la aplicación del presente trabajo es nacional.

II. OBJETIVOS

1.1. Objetivo general

Determinar el efecto de los medios de cultivo elaborados con fertilizantes orgánicos e inorgánicos en el crecimiento y fijación de diatomeas bentónicas marinas.

1.2. Objetivos específicos

- Aislar e Identificar las diatomeas bentónicas para el trabajo experimental.
- Determinar la curva de crecimiento de cada especie de diatomea.
- Establecer los parámetros poblacionales de crecimiento de cada especie de diatomea.
- Determinar la densidad de fijación de biopelículas multiespecíficas.

III. MARCO TEÓRICO

3.1. MICROALGAS EN LA ACUICULTURA

3.1.1. Microalgas

Las microalgas son algas unicelulares, eucariotas, generalmente, son células aisladas, pero pueden formar colonias o cadenas más o menos largas e incluso, tener un aspecto dendroide. El tamaño puede variar entre 2 micras y 2 milímetros (en las especies marinas generalmente entre 50 - 500 micras). El número de especies aceptadas es igualmente muy variable, algunos autores establecen 10 000 – 12 000 (**Hasle & Syvertsen, 1997**), otros estiman aproximadamente 100 000 (Round & Crawford, 1989).

Las microalgas representan un porcentaje muy notable del fitoplancton de los océanos y aguas dulces, que es donde se lleva a cabo no menos del 50 % del total de la fotosíntesis que se realiza en nuestro planeta. Son muy importantes especialmente las diatomeas, dinoflagelados y clorofitas unicelulares porque son los principales productores de alimentos del ecosistema marino, que es donde se encuentra la principal reserva de alimentos y fuente renovadora del oxígeno de la atmósfera

terrestre (**Gama, 2004**).

3.1.2. Cultivo de microalgas para la acuicultura

Las microalgas juegan un papel preponderante en el desarrollo de la acuicultura, ya que constituyen el primer alimento vivo que soporta el crecimiento de las fases tempranas de vida de casi todos los organismos cultivados (**Brown *et al.*, 1989, 1997**), tales como moluscos (durante todas las etapas de su vida), crustáceos y peces en las primeras etapas de su desarrollo. Las microalgas son empleadas también para producir cantidades masivas de zooplancton (rotíferos, copépodos, camarones, artemias y otros) los cuales a su vez sirven de alimento a larvas y etapas juveniles de peces y crustáceos (**Coutteau, 1996**).

La selección de la microalga depende de características como: tamaño, calidad bioquímica, mayor crecimiento con altas densidades (**Becker, 2004**). Se ha comprobado que las microalgas verdes son ricas en carbohidratos y que las diatomeas contienen más lípidos, los cuales son aprovechados por los organismos en cultivo (**Medina *et al.*, 2012**).

Según la **FAO (2011)** las microalgas más utilizadas en los laboratorios de

acuicultura son *Phaeodactylum* (diatomea), *Skeletonema* (diatomea), *Dunaliella* (clorofícea), *Chlorella* (Clorofícea), *Tetraselmis* (clorofícea), *Monochysis* (Crisofícea) e *Isochysis* (crisofícea).

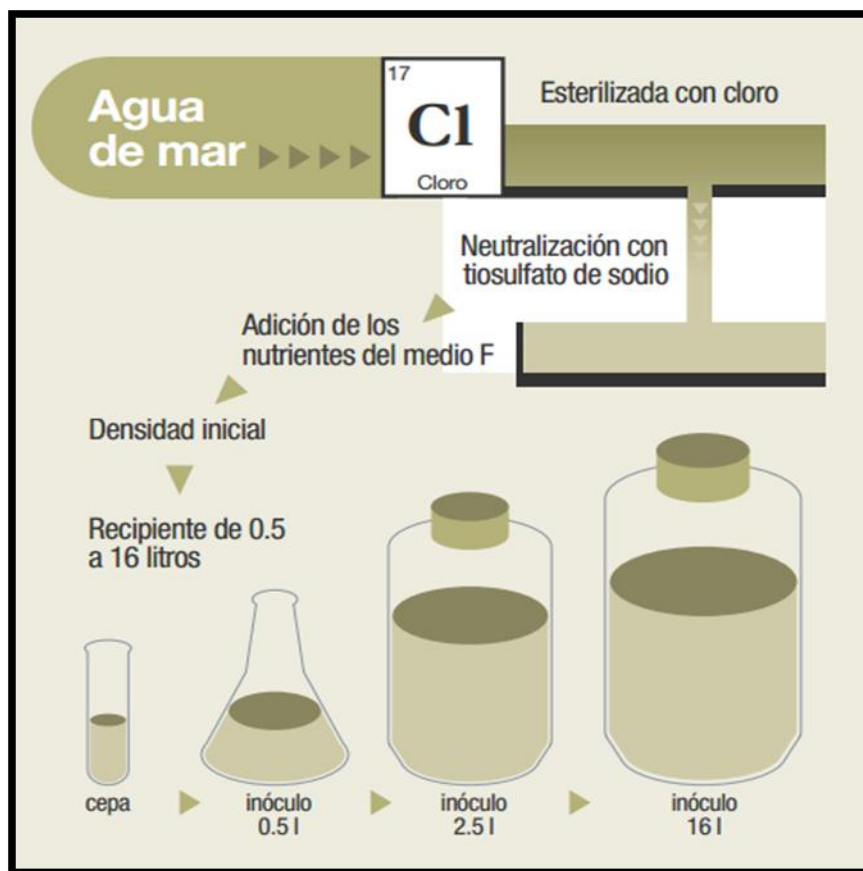


Gráfico 1 Diagrama general de producción de microalgas

Fuente: Medina et al., 2012

3.2. MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo utilizados comúnmente para el cultivo de microalgas tienden a ser muy costosos y laboriosos, lo cual evidencia la necesidad de evaluar medios nutritivos más económicos, entre los cuales están los fertilizantes agrícolas comerciales (**Fulks, 1991**). La producción de microalgas en grandes volúmenes es una de las actividades que ocupan el mayor porcentaje de los gastos de operación en los laboratorios de los larvicultores, llegando a constituir más del 30 % - 35 % del costo total de producción de las especies cultivadas (**Lango-Alemán, 1999**).

Se han desarrollado diferentes medios para el cultivo de microalgas que van desde las fórmulas para enriquecer el agua de mar natural, hasta el uso de medios artificiales, la selección de un medio químico adecuado es el primer paso y el más importante para el éxito del cultivo (**Paniagua-Michell *et al.*, 1989**).

La importancia de seleccionar el medio de cultivo para producir determinada especie de microalga radica en que el uso de un sustrato adecuado puede optimizar el valor nutricional de estos (**Nieves-Soto *et al.*, 1994**).

3.2.1. Medio Guillard f/2

El medio Guillard f/2 es mundialmente utilizado por ser un medio completo e idóneo para el mantenimiento de las cepas en el laboratorio, e incluso para la producción en grandes volúmenes (Almaguer *et al.* 2004), sin embargo, se han ensayado diferentes variantes de este medio y otros alternativos cuando ya se trata de cultivos masivos, con vista a abaratar los costos de producción (Leal, *et al.*, 2010).

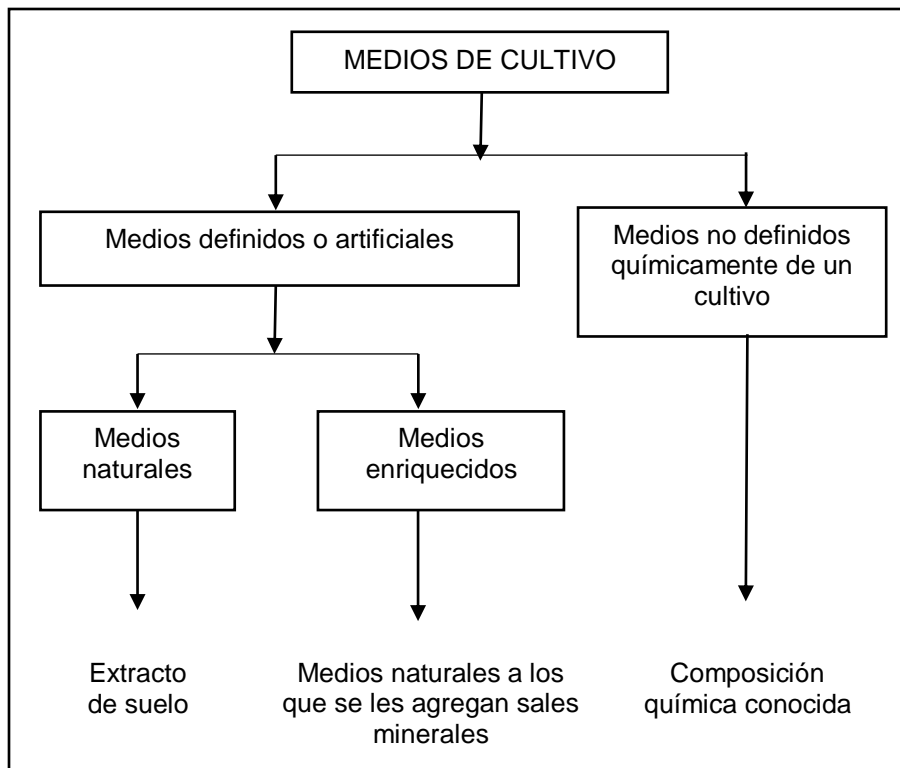


Gráfico 2 Medios de cultivo

(Fuente: Alveal, 1995)

3.2.2. Fertilizantes inorgánicos

Como una alternativa económica y viable para reducir los altos costos en la producción de microalgas en laboratorios comerciales, autores como **Peraza (1997)** y **González (1999)**, sugieren la utilización de fertilizantes agrícolas.

Estudios previos han demostrado que con el uso de fertilizantes agrícolas se obtiene un mayor crecimiento, una similar composición proximal y un menor costo que con aquellos medios que son específicos para el cultivo de microalgas como el f/2 (**Valenzuela et al., 2005**).

Los ensayos con fertilizantes agrícolas han permitido obtener altas cantidades de biomasa microalgas de una adecuada calidad nutricional. Las formulaciones basadas en fertilizantes agrícolas han sido ensayadas en especies planctónicas y más recientemente en especies bentónicas (**Leal et al., 2010**).

Según **BASF (1978)** en **Brito et. al., (2006)**, menciona que Nitrofoska Foliar presenta mayor solubilidad que los demás fertilizantes foliares, proporcionándole a los vegetales los nutrientes necesarios para su desarrollo. Los nutrientes, en este fertilizante se encuentra en forma quelatizado, lo que permite una absorción rápida y

directa por las microalgas.

3.2.3. Fertilizantes orgánicos

Los fertilizantes orgánicos son de composición química variable, al igual que su disponibilidad y algunos tienen posibilidades de contaminantes en su contenido, se han desarrollado diversos estudios con el propósito de evaluarlos como medios de cultivo de microalgas marinas producidas en laboratorios. **Chebil y Yamasaki (2000)**.

Chebil y Yamasaki (2000) evaluaron la excreta de gallina y la harina de tiburón para la producción masiva de la microalga *Nannochloropsis sp.*, **Muñoz et al., (2009)**, evaluaron la eficiencia del humus de lombriz y la equinaza, sobre el crecimiento y contenido proteico de *Chlorella vulgaris*.

Guerra (2011) utilizó el extracto líquido de humus de lombriz roja californiana *Eisenia foetida* como un nuevo medio alternativo de cultivo de las microalgas *Tetraselmis tetrathele* y *Chaetoceros muelleri*.

Los biofertilizantes líquidos como el vermicompost, fabricado a base de humus

líquidos (té de humus) de lombriz de tierra fueron recomendados por **Ruiz. (2011)**.

Según **Reinés, et al., (2006)** mencionado por **Guerra (2011)**, el humus es un estado de descomposición de la materia orgánica, es insoluble en agua. Es una fuente importante de nutrientes. Entre los componentes más esenciales del humus de lombriz están el nitrógeno, fósforo, potasio y el calcio. Esta composición de los nutrientes es altamente variable, dependiendo del tipo y proporción del material presente en el sustrato que se utilice como alimento para las lombrices, así como los factores abióticos, fundamentalmente la temperatura, pH, grado de humedad que inciden en la calidad del humus.

3.3. DIATOMEAS BENTÓNICAS

Las diatomeas en general son microalgas que se encuentran en todos los ambientes y tienen una elevada tasa de reproducción si las condiciones son adecuadas. La intensa velocidad de división que puede alcanzarse cuando las condiciones son óptimas llega a producir densas floraciones. La presencia de sílice es una necesidad absoluta para la división celular de las diatomeas, de modo que el número de células se mantiene proporcional a la cantidad de dióxido de silicio existente, siempre y cuando los demás nutrientes no sean limitantes (**Sabbe et al., 2004**).

Estas diatomeas segregan al exterior de su frústulo un mucílago péctico, sustancia viscosa con función protectora. Este les permite agruparse en colonias formando una película después de la división o estar fijadas aisladamente. (**Kawamura & Hirano, 1992**) y presentan dos tipos de reproducción, asexual por bipartición y sexual. Las diatomeas son diplontes y se multiplican vegetativamente por división celular mitótica durante la mayor parte del ciclo de vida (**Sabbe et al., 2004**).

A nivel mundial el estudio de las diatomeas bentónicas marinas ha sido limitado, debido principalmente a las dificultades inherentes a la identificación de las especies. Sin embargo, este grupo de microalgas es uno de los más conspicuos, abundantes (**Hernández & Siqueiros, 2008**), con un alto potencial para ser usado como fuente de alimento vivo para los organismos que se cultivan con interés comercial y que presenten hábitos bentónicos, al menos, en alguna fase de su ciclo de vida. Las especies más estudiadas están representadas por los géneros *Navicula* y *Nitzschia*, seguidas de *Amphora* (**Siqueiros, 1994**). Además, según **Griffith et al. (1992)**, el valor nutricional más importante de estas diatomeas es el alto contenido de lípidos que poseen.

3.3.1. Formación de Biopelículas

Las diatomeas bentónicas en cultivo tienen la capacidad de colonizar toda la superficie del reservorio donde habitan y forman biopelículas, que al aumentar su concentración, crean pequeños grumos de células que se desprenden y suspenden en el agua y constituyen partículas de diferentes tamaños, de las que se pueden alimentar algunos organismos. (Leal, 2012).

No todas las especies tienen la misma adhesión al sustrato o entre ellas, cuando forman colonias (Kawamura & Tanaki, 2000).

3.4. CRECIMIENTO POBLACIONAL

Según Arredondo & Voltolina (2007) mencionan que una fase típica de crecimiento posee 7 fases:

- A. **Fase lag:** Fase de adaptación de la célula

- B. **Fase de aceleramiento:** Fase de ligero incremento en la concentración celular

- C. **Fase exponencial:** Fase de Incremento de la división celular y crecimiento de la biomasa.
- D. **Fase de desaceleración:** Fase donde disminuye la división celular.
- E. **Fase estacionaria:** Fase de Crecimiento neto de la población, las condiciones de cultivo son limitantes y la natalidad es igual a la mortalidad.
- F. **Fase de muerte:** Fase donde la tasa de mortalidad es superior a la de natalidad, por lo cual la densidad celular disminuye.

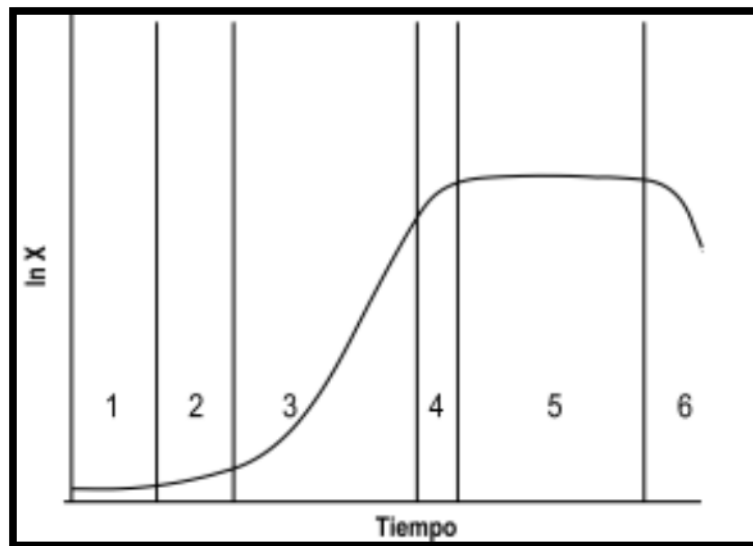


Gráfico 3 Curva de crecimiento

1 fase lag; 2 fase de aceleramiento; 3 fase exponencial; 4 fase de desaceleración del crecimiento; 5 fase estacionaria; 6 fase de muerte.

(Fuente: Arredondo y Voltolina, 2007)

3.5. PARÁMETROS DE CRECIMIENTO

Al igual que cualquier otro organismo vivo, las condiciones físicas tienen gran influencia en el crecimiento de la microalga. Cada especie presenta un particular intervalo de temperatura, intensidad de luz, preferencias espectrales, salinidad, bióxido de carbono y oxígeno para la producción de un máximo crecimiento. Adicionalmente, podemos mencionar que más que la influencia de un solo parámetro es el conjunto de parámetros lo que da lugar a una determinada respuesta en el crecimiento de las microalgas (**Cañizares et al., 1994**).

A. Iluminación

Con respecto a la luz, las microalgas son fotoautótrofas encargadas de convertir la energía luminosa en metabólica por medio de la fotosíntesis y sus periodos de exposición a ésta. Los periodos de iluminación pueden ser continuos (mediante luz artificial), discontinuos (periodos de iluminación alternados con periodos de oscuridad, también con luz artificial) o en el ciclo natural día y noche (**Richmond, 1986**).

En la mayoría de microalgas el crecimiento se lleva a cabo durante el periodo de luz debido a que a través de la fotosíntesis generan material orgánico y energía suficiente para este proceso, mientras que la división celular se da en el periodo de oscuridad, sin embargo, en las diatomeas la división celular también se realiza en luz continua (**López et al., 2009**)

B. Aireación

La aireación, además de proporcionar oxígeno, asegura la distribución homogénea de las células y los nutrientes dentro del cultivo, dejándolos disponible para su mejor aprovechamiento, mejora la distribución de la luz entre las células asegurando que permanezcan fotosintéticamente activas, evitando que se sedimenten, y previene una estratificación térmica (**Richmond, 1986**). Además, afirma que este elemento es de gran importancia en las diferentes especies, sin embargo, en especies bentónicas se mejora la tasa de crecimiento debido a que se favorece la permanencia de células sin formar colonias, lo que puede retardar el crecimiento en especies bentónicas.

C. Temperatura

Generalmente, la temperatura óptima es superior a la temperatura máxima a la cual se encuentra la microalga en el medio natural (**Abalde et al., 1995**) y

varía según la especie (**Laing & Ayala, 1990**) y su hábitat (**Adenan *et al.*, 2013**).

D. Salinidad

Las microalgas tienen un rango de tolerancia muy alto a la concentración de sales, lo cual no implica que crezcan bien a las diferentes salinidades (Brown y col., 1996), además la salinidad óptima para una microalga dependerá de la especie. Generalmente, para el cultivo en interiores, este parámetro no es controlado y se maneja la salinidad presente en el agua de mar. En un cultivo a exterior la salinidad se convierte en el parámetro control en el crecimiento de la microalga (**Abalde *et al.*, 1995**).

E. Nutrientes

Existen los macro y micronutrientes específicos, y deben tener un balance en la proporción suministrada. Su deficiencia, invariablemente se manifiesta ya sea como un descenso en el crecimiento o hasta la detención del mismo (**Hoff y Snell, 2001**), para proporcionar estos nutrientes se debe seleccionar el medio de cultivo que se va a utilizar. El agua marina es un medio de cultivo ideal para el crecimiento de las microalgas marinas; sin embargo, es necesario enriquecerla con nutrientes. Los medios de cultivo son muy diversos, pero todos coinciden

en una fuente principal de nitrógeno, fósforo y una mezcla de metales traza como soluciones quelantes y vitaminas (**Provasoli *et al.*, 1957; Stein, 1973**). El medio F/2 (**Guillard, 1975**) es considerado como el medio que reúne los requerimientos de nutrientes para las diversas especies de fitoplancton marino, por lo que es ampliamente utilizado y considerado como el medio estándar.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. MATERIALES

Tabla 1 Lista de materiales

REACTIVOS	MATERIAL BIOLÓGICO	MATERIALES DE LABORATORIO
NaCO ₃ NaH ₂ P ₄ NaSiO ₃ CuSO ₄ ZnSO ₄ CoCl ₂ MnCl ₂ Na ₂ MoO ₄ FeCl ₃ Na ₂ EDTA Vitamina B12 Agar Agar Penicilina procaínica Eritromicina G Ácido Clorhídrico H ₂ O ₂ 30 Vol. Agua destilada Ácido muriático Humus de Lombriz Nitrofoska Tiosulfato Hipoclorito de Sodio Alcohol de 70° y 96°	Diatomeas bentónicas	Pipetas graduadas de 1 mL, 5 mL y 10 mL. Tubos de Ensayo de 15mL Matraces de 100 mL, 250 mL, 500 mL, 1000 mL, 2 L y 5 L. Beakers de 100 mL y 500 mL. Matraz Erlenmeyer de 1000mL. Placas petri Láminas portaobjetos Láminas cubreobjetos Pipetas pasteur Frascos de vidrio Cámara de Neubauer Mechero de Alcohol Encendedor Pinzas de metal Papel filtro 0.45 µm y 0.2 µm Gradillas Asa de siembra Asa de drigalski Tubos de centrífuga Bagueta de vidrio Contómetro manual Probeta de bouyoucos
	EQUIPOS DE LABORATORIO	
	Autoclave Microscopio Compuesto Microscopio Invertido Microscopio Estereoscopio Microscopio Electrónico Bomba de vacío Destilador pH - metro Plancha calentadora Blower Termómetro digital Refrigeradora Refractómetro Centrífuga Estufa Lucómetro	

Fuente: Elaboración propia

4.1.1. Limpieza y esterilización de materiales

La limpieza de los materiales de vidrio como: tubos de ensayo, probetas, pipetas, matraces, beakers, etc. se lavaron con agua y detergente, se desinfectaron con ácido muriático, sumergiéndolos en él por 10 minutos aproximadamente, se enjuagaron constantemente en agua dulce y se secaron colocándolos a la estufa durante 30 minutos a 100 °C, se dejaron a enfriar, luego se cubrieron con papel kraft y pabilo, y se esterilizó en la estufa durante 90 minutos a 180 °C.

Los materiales de plástico como son las botellas, jarras, baldes, bombonas, etc. se lavaron con agua y detergente y desinfectaron con lejía, se enjuagaron vigorosamente con agua dulce y se secaron en un escurridor de plástico.

4.2. MÉTODOS:

Los experimentos del cultivo de diatomeas fueron realizados en el Laboratorio de Alimento vivo y en el Cepario de Microalgas del Fondo Nacional de Desarrollo Pesquero (FONDEPES), Tacna, durante los meses de abril a octubre de 2015. Pruebas auxiliares se realizaron en los Laboratorios de Química Orgánica, Fisicoquímica y Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann (UNJBG), Tacna, durante los meses de diciembre y enero.

4.2.1. Captación de Diatomeas

4.2.1.1. Elaboración de un sistema de captación

Las muestras de diatomeas bentónicas fueron obtenidas mediante un sistema de captación elaborada con láminas de fijación de policarbonato. El sistema consistió en el acondicionamiento de un tanque de fibra de vidrio, con suministro de agua de mar en forma de lluvia mediante tuberías en la parte superior dispuestas horizontalmente con circuito abierto; en cuyo interior estuvieron distribuidas láminas de policarbonato donde se realizó la fijación de las células.

4.2.1.2. Colecta de muestras

Las láminas de policarbonato con biopelículas se cosecharon a las 2 semanas. Con la ayuda de un cepillo dental estéril se procedió a desprender las células fijadas en la superficie de las láminas, en un vaso precipitado estéril. Las muestras fueron cerradas para evitar alteraciones en la muestra y fueron transportadas inmediatamente al Laboratorio de Microalgas.

Se observaron las muestras en fresco con la ayuda de un microscopio compuesto. La observación se realizó en cuestión de horas.

4.2.2. Aislamiento e identificación de Diatomeas

El aislamiento se realizó por el método de siembra en placa de agar, se utilizó la metodología propuesta por Leal (2007) con Guillard f/2 (Guillard, 1975).

4.2.2.1. Preparación de medio Guillard f/2 en placas

Para la elaboración del medio Guillard f/2 en placa se utilizó agua filtrada a 0,2 μm y esterilizada en autoclave; se añadió los componentes del medio Guillard: Nitratos, Fosfatos, Tris, Metales y Silicato en proporción de 1 ml/L de medio de cultivo, se añadió agar-agar a razón de 15 g/L, se homogenizó el medio y se llevó a la autoclave para ser esterilizado a 125 °C y 1 bar de presión por 30 minutos.

Luego de la esterilización se dejó enfriar a temperatura ambiente hasta llegar a 50 °C aproximadamente, se agregó la solución de Vitaminas (1 mL/L), se homogenizó y se procedió al llenado en placas estériles (20 mL/placa).

4.2.2.2. Siembra en placa

La siembra se realizó en un ambiente aséptico cerca de un mechero. Con la ayuda de una pipeta Pasteur se tomó una alícuota de la muestra, se colocó 1

gota en la placa con agar, con un asa de drigalski estéril se procedió a dispersar la gota sobre el medio Guillard f/2 solidificado, y finalmente, se cerraron las placas.

Las placas fueron selladas con cinta de parafina 3M, se rotularon colocando la muestra y fecha, y se llevaron a la cámara de frío (Cepario de Microalgas), donde se desarrollaron a temperatura e iluminación controlada hasta la diferenciación de colonias. Al cabo de una semana aproximadamente, se efectuó la extracción de colonias de las placas frente a un mechero de alcohol, las cuales fueron resembradas con un aza de siembra estéril en placas con Guillard f/2, la finalidad fue obtener cultivos monoespecíficos. Se realizó tres resiembras en estricta asepsia acompañadas de la observación de muestras en el microscopio compuesto.

4.2.2.3. Transferencia de muestra en placa a tubo de ensayo

En estricta asepsia, con un aza de siembra estéril se traspasó una azada de muestra de las colonias seleccionadas a tubos con medio Guillard f/2, se rotularon los tubos y fueron llevadas al cepario de microalgas y mantenidas a temperatura (>23 °C) y fotoperiodo (24 h).

4.2.2.4. Tratamiento con antibiótico

Con el fin de obtener cepas axénicas, se realizó un tratamiento con antibiótico en las cepas preseleccionadas en un volumen de 10 ml, El tratamiento consistió en baños con antibiótico en un período de 8 horas con una mezcla de penicilina G (100 ppm) y eritromicina (50 ppm) (Sánchez, 2002).

Con el fin de eliminar el antibiótico se realizaron diluciones seriadas en Medio Guillard f/2 en tubos hasta tres veces.

4.2.2.5. Selección de las Diatomeas

Las cepas de las diatomeas fueron preseleccionadas basadas en su morfología y la discriminación de especies ya obtenidas, una segunda preselección estuvo basada en la forma de crecimiento (bentónica o pelágica) y tasa de crecimiento en cultivos preliminares. Las diatomeas seleccionadas fueron codificadas como D1, D2, D3 y D4.

4.2.2.6. Identificación de las Diatomeas Bentónicas

A. Medición en fresco

Para la caracterización de las células se observaron detalladamente al

microscopio compuesto, y se efectuaron mediciones de 30 células con micrómetro ocular determinándose la longitud promedio para cada especie en la fase exponencial del cultivo.

B. Pre-tratamiento de Diatomeas

Las muestras de diatomeas seleccionadas fueron lavadas con una mezcla de ácido concentrado. La mezcla fue elaborada con H_2SO_4 y HNO_3 (1:2), dicha mezcla se agregó a la muestra de diatomea (1:1). Se utilizó 5 mL de muestra en matraces de 50 mL.

La adición de la mezcla de ácido fue gradual, los matraces con muestra de diatomea, se mantuvieron a 90 °C durante 3 horas, cubiertas con lunas de reloj.

Con el fin de eliminar los restos de ácido, las muestras de diatomeas se centrifugaron en 4 series a 4000 rpm durante 4 minutos con recambios de agua destilada.

Con la ayuda de una pipeta Pasteur, se cogió una muestra de cada diatomea y se colocó en láminas portaobjetos limpias, además se adicionó una gota de alcohol y otra de agua a la lámina. Se dejó secar (24 h) a

temperatura ambiente, se añadió una pequeña gota de un bálsamo elaborado a base de totuelo y tecnopor, y se cubrió con un cubreobjetos, finalmente, las láminas se colocaron a 60 °C durante 30 minutos a fin de dispersar el bálsamo. Una vez fría las muestras lavadas y fijadas, fueron observadas al microscopio compuesto y se realizó la medición de 50 células de cada diatomea con el micrómetro ocular determinándose la longitud promedio para cada especie en la fase exponencial del cultivo.

Las muestras fueron identificadas mediante manuales de identificación de diatomeas, además fueron enviadas a especialistas en taxonomía para la identificación correspondiente.

El mantenimiento periódico de las cepas purificadas de diatomeas consistió en la inoculación por triplicado en tubos de ensayo con medio f/2, manteniéndose en la cámara de frío con temperatura (>23 °C) e iluminación (24 h) controladas.

4.2.3. Aumento progresivo de volumen.

Para el desarrollo de los cultivos se utilizó el método de aumento progresivo de

volumen (Sistema Batch), estableciéndose tres volúmenes de crecimiento (10 mL, 200 mL y 800 mL). El trabajo experimental se desarrolló en monocultivos cerrados y estáticos en volúmenes de 800mL. El paso de un volumen a otro se realizó en la fase de crecimiento exponencial de estos cultivos para asegurar que las diatomeas estén en un estado fisiológico óptimo. En la Tabla 4 se especifican las cantidades volumétricas que se utilizaron en cada paso del experimento.

Tabla 2 Volúmenes utilizados en el aumento progresivo de los cultivo (Batch)

VOLUMEN INÓCULO	VOLUMEN DE MEDIO CULTIVO	VOLUMEN TOTAL
1 mL	9 mL	10 mL
10 mL	190 mL	200 mL
200 mL	600 mL	800 mL

Fuente: Elaboración propia

La salinidad del agua para todos los volúmenes fue de 35 ups. Los cultivos se mantuvieron en condiciones controladas con, temperatura ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$), iluminación 4000 lux, fotoperiodo de 24 h y aireación de $15,8\text{ ml}\cdot\text{s}^{-1}$. El pH fue tomado al inicio y al final de la prueba.

4.2.4. Comparación de los medios de cultivo

Se aplicó tres tratamientos que consistió en enfrentar dos medios de cultivos elaborados con diferentes fertilizantes: fertilizante agrícola (Nitrofoska) y extracto de líquido del humus de lombriz *Eisenia foetida*, ambos medios frente a un medio patrón: medio Guillard f/2 (**Guillard, 1975**).

4.2.4.1. Medio Guillard f/2

La preparación del medio Guillard F/2 consistió en agregar nitrato, fosfato, solución de metales, solución de vitaminas y silicato a razón de 1 mL/L de medio de agua de mar UV estéril. El contenido de micronutrientes y macronutrientes del medio Guillard f/2 se especifica en el **ANEXO 9**.

4.2.4.2. Medio con fertilizante inorgánico

La elaboración del medio a base de fertilizante agrícola se realizó con nitrofoska foliar. Se modificó el proceder de **Brito (2006)**, se utilizó agua de mar UV, filtrada y esterilizada, y se adicionó el Fertilizante de Grado Técnico (0,4 mL/L) para la elaboración del medio Inorgánico.

4.2.4.3. Medio con fertilizante orgánico

La elaboración del medio con fertilizante orgánico se realizó con el extracto

líquido del humus de lombriz *Eisenia foetida*, según el procedimiento mencionado por **Guerra et. al., (2012)**.

Para la elaboración de dicho extracto, se pesó el humus de lombriz (200 g/L) en una Balanza analítica de 0,001 g, se añadió agua de mar microfiltrada 0,2 μm y esterilizada, se homogenizó y colocó en un matraz para su esterilización en autoclave. Terminado el proceso, se dejó reposar la mezcla durante 24 horas para dejar sedimentar el material sólido, se separó el sobrenadante con filtros de membrana de 10 μm mediante una bomba de vacío.

Para la elaboración del medio Se empleó la proporción de 200 mL de extracto líquido de humus por cada 1 L de Agua de mar microfiltrada.

Los medios de cultivo antes de ser utilizados fueron previamente adicionados con solución TRIS (1 mL/L) para evitar precipitados y esterilizados en autoclave.

4.2.5. Primera serie experimental

Esta serie experimental se realizó con el fin de determinar el efecto de los tres

medios de cultivo en el crecimiento de las cuatro diatomeas bentónicas marinas.

El experimento realizado se ajustó a un Diseño en Bloques Completos al Azar con cuatro bloques (diatomeas), tres tratamientos (medios de cultivo) y tres repeticiones por tratamiento. Cada unidad experimental contenía 800 mL de cultivo.













Experimento

T0 (PATRÓN): Diatomeas cultivadas en medio Guillard f/2

T1 : Diatomeas cultivadas con medio agrícola (Nitrofoska)

T2 : Diatomeas cultivadas con medio humus de lombriz

Tabla 3 Diseño de la primera serie experimental

	Medio Guillard f/2	Medio agrícola	Medio humus
D1			
D2			
D3			
D4			

Fuente: Elaboración propia

La distribución de las unidades experimentales fue aleatorizada con la ayuda del

programa STATGRAPHIC Centurión XVI.I.

El crecimiento microalgal fue evaluado durante diez días, para ello se realizó recuentos de células diariamente (24 h).

4.2.5.1. Tamaño y conteo de muestra

Antes de tomar la muestra, se homogenizó el cultivo con la ayuda de un cepillo modificado para disgregar la biopelícula adherida al matraz, se tomó tres mL de muestra de cultivo y se depositó en un vial. Según el método establecido por **Leal (2012)**, se agregó n-pentano al 5 % para eliminar los grumos y facilitar el conteo.

La metodología de conteo celular se ajustó a la descrita por **Guillard (1973)**, con el uso de un hematocitómetro o cámara de Neubauer 0,1 mm de profundidad y un microscopio invertido. Se realizó conteos por cuadruplicado en las tres repeticiones, obteniéndose doce conteos finales por tratamiento, se obtuvo las medias para los cálculos estadísticos y la elaboración de la curva de crecimiento que sirvieron para la comparación entre los tres medios de cultivo.

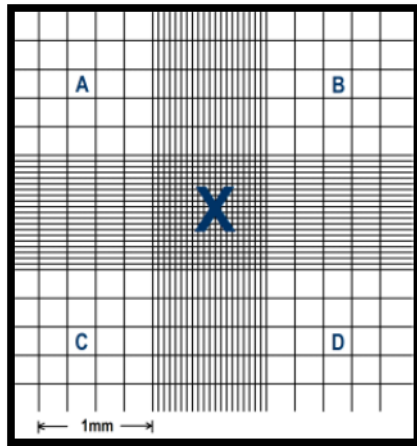


Gráfico 4 Reglilla de la cámara de Neubauer de 9 mm²

(Fuente: Arredondo y Voltolina, 2007)

4.2.5.2. Cálculos poblacionales

A. Cálculo de la densidad celular (D)

Según **Arredondo & Voltolina (2007)**, se contaron todas las células presentes en los 4 cuadros de 1 mm² marcados como **A, B, C** y **D**, la concentración celular se calculó de acuerdo a la fórmula:

$$D = N \times 10^4 \times dil$$

Donde:

N = promedio de células presentes en 1 mm² (0,1 µL)

dil = factor de dilución

B. Parámetros poblacionales

B.1. Tasa de crecimiento específico (μ)

Es la velocidad de crecimiento y se utilizó la fórmula siguiente propuesta por **Guillard (1973)**, citado en **Pérez Castro (1995)**.

$$\mu = \log_{10} (D_2 / D_1) / (t_2 - t_1)$$

Donde:

t_1 = primer día

t_2 = segundo día

D_1 = densidad de células al día t_1

D_2 = densidad de células al día t_2

B.2. Tiempo de duplicación (TD)

El tiempo de duplicación y/o de generación (TD) es el tiempo necesario para que se duplique la población, y se calculó según lo

recomendado por **Cruz y Alfonzo (1985)** citado en **Pérez Castro (1995)**

$$\mathbf{T.D. = (Iog_{10} 2) (t_2 - t_1) / (3,322) (log_{10} (X_2 / X_1))}$$

B.3. Divisiones por día (k)

Se obtiene el valor del número de divisiones por día y se calcula de acuerdo a **Guillard (1973)** y se calculó según lo recomendado por **Cruz y Alfonzo (1985)** citado en **Pérez Castro (1995)**.

$$\mathbf{K = 3,322 \times (log_{10} (D_2 / D_1)) / (T_2 - T_1)}$$

Donde:

3,322 es el factor de conversión del logaritmo base 2 a base 10

B.4. Producción diaria de microalgas (P.D)

Indica el incremento de células logrado en el cultivo por unidad de tiempo y se determinó según lo recomendado por **Cruz y Alfonzo (1985)** citado en **Pérez Castro (1995)**

$$\mathbf{PD = (D_2 - D_1) / (t_2 - t_1)}$$

B.5. Variación Porcentual de densidad (V.P)

Indica la variación diaria en la densidad del cultivo dada en porcentaje y se determinó según lo recomendado por **Cruz y Alfonzo (1985)** citado en **Pérez Castro (1995)**

$$(V.P.) = (100) (D_2 - D_1) / (t_2 - t_1)$$

4.2.6. Segunda serie experimental

Esta serie experimental se realizó con el fin de determinar el efecto de los medios de cultivos en la formación de biopelículas multiespecíficas de diatomeas bentónicas provenientes de los cultivos monoespecíficos desarrollados en tres medios de cultivo (f/2, Nitrofoska, y Humus de Lombriz).

El experimento realizado se ajustó a un Diseño Completo al Azar con tres tratamientos (Biomasa de los medios de cultivos) y cuatro repeticiones por tratamiento.

Experimento

T0 (PATRÓN): Diatomeas provenientes del medio Guillard f/2

T1 : Diatomeas provenientes del medio agrícola (Nitrofoska)

T2 : Diatomeas provenientes del medio humus de lombriz

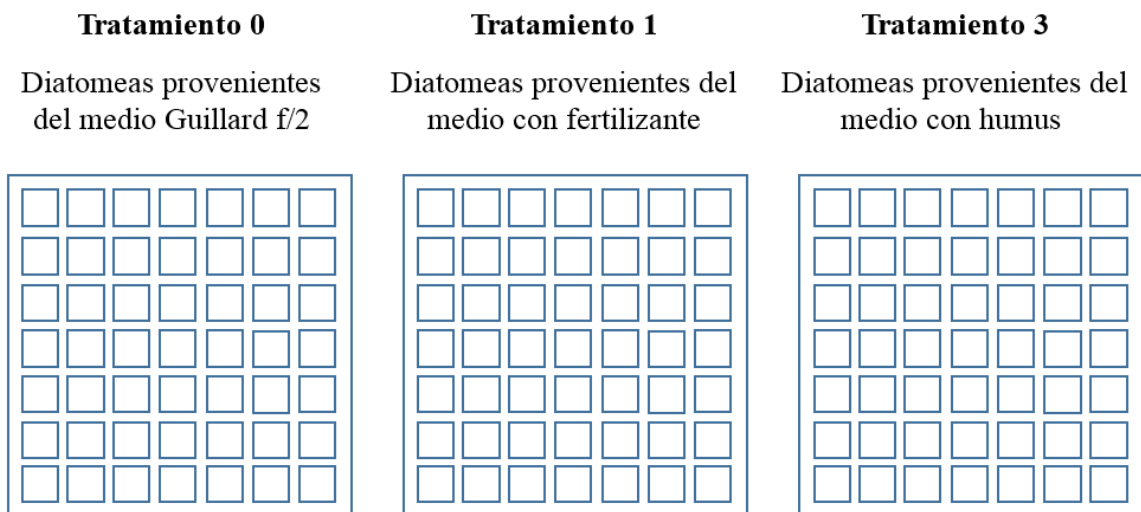


Gráfico 5 Diseño de la segunda serie experimental

Fuente: Elaboración propia

Se elaboró tres contenedores de vidrio de 20 L de capacidad y láminas de policarbonato de 25 cm² como sustratos de adhesión de las diatomeas.

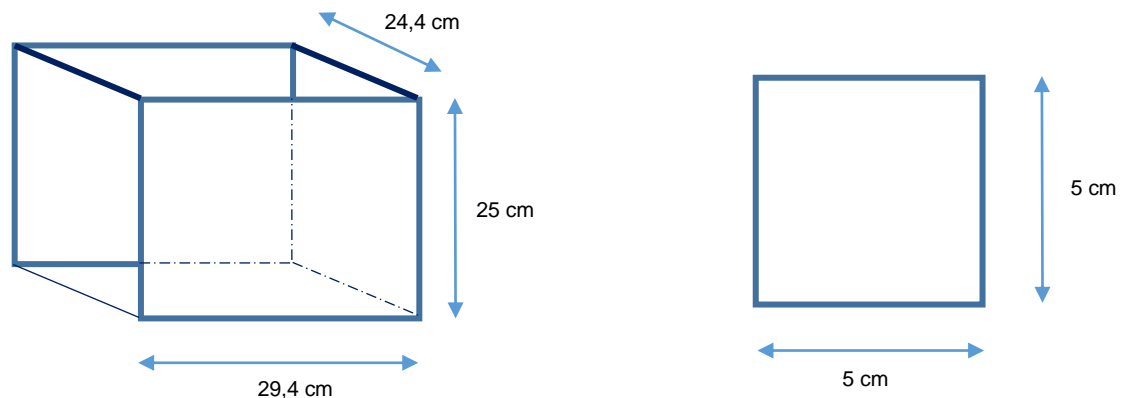


Gráfico 6 Medidas del contenedor de vidrio y láminas de policarbonato

(Fuente: Elaboración propia)

En el interior del contenedor se introdujeron láminas de policarbonato y se inocularon las cuatro diatomeas bentónicas para obtener una muestra homogénea (10×10^4 cel/mL), es decir $2,5 \times 10^4$ cel/mL de cada diatomea provenientes de los monocultivos de cada medio, fueron depositaron en tres contenedores con agua de mar UV, según el medio de cultivo del cual provienen.

El agua de mar fue desinfectada según lo mencionado en Araya (2010), fue microfiltrada a 10 μ m y desinfectada con hipoclorito de sodio 5 % a una concentración de 25 mg/L durante 24 h, luego se neutralizó el cloro activo con tiosulfato de sodio a 1 M.

4.2.6.1. Conteo de muestras

Se sacrificó cuatro láminas de policarbonato con diatomeas fijadas del contenedor, en lapsos de cada 6 horas. Con la ayuda de un cepillo modificado se disgregó la biopelícula adherida y se diluyó en 50 mL de agua de mar estéril, posteriormente, se depositó 3 mL de la muestra en viales para el conteo respectivo. Para el conteo de las diatomeas se utilizó la cámara de Neubauer de

0,1 mm de profundidad y un microscopio invertido. Se realizó conteos por duplicado en las cuatro repeticiones, obteniéndose ocho conteos por cada tratamiento.

V. RESULTADOS

5.1. DIATOMEAS AISLADAS

Se aislaron cuatro especies de diatomeas bentónicas.

- **D1:** *Navicula* sp1

Esta diatomea fue identificada dentro de género *Navicula*, presenta una longitud promedio de 20 μm y un ancho promedio de 5 μm , en condiciones de cultivos presentó adhesión al sustrato, lo que caracteriza a una diatomea bentónica.

- **D2:** *Nitzschia* sp1

Esta diatomea fue identificada dentro de género *Nitzschia*, presenta una longitud promedio de 15 μm y un ancho promedio de 6,25 μm , en condiciones de cultivos presentó adhesión al sustrato, lo que caracteriza a una diatomea bentónica.

- **D3:** *Navicula* sp2

Esta diatomea fue identificada dentro de género *Navicula*, presenta una longitud

promedio de 22,5 μm y un ancho promedio de 8,95 μm , el tamaño es diferente a la anterior cepa de *Nitzschia*, lo que nos indica que se está frente a otra especie de diatomea, en condiciones de cultivos presentó adhesión al sustrato, lo que caracteriza a una diatomea bentónica.

- **D4:** *Nitzschia* sp2

Esta diatomea fue identificada dentro de género *Navicula*, presenta una longitud promedio de 6 μm y un ancho promedio de 2,5 μm , el tamaño es diferente a la anterior cepa de *Nitzschia*, lo que nos indica que se está frente a otra especie de diatomea, en condiciones de cultivos presentó adhesión al sustrato, lo que caracteriza a una diatomea bentónica.

5.2. PRIMERA SERIE EXPERIMENTAL

5.2.1. Parámetros de crecimiento de microalgas en los tres medios de cultivo

- *Navicula sp1.*

Tabla 4 Parámetros de crecimiento de *Navicula sp1.* en medio Guillard f/2

	D (cel/mL)	μ	TD (Días)	K (Div/Días)	P.D. (cel/mL)	V.P. (%)
DIA 0	22 083					
DIA 1	57 917	0,418	0,216	1,391 051	35 833,33	162,26
DIA 2	98 125	0,228	0,395	0,760 659	40 208,33	69,42
DIA 3	276 667	0,450	0,201	1,495 489	178 541,67	181,95
DIA 4	234 167	-0,072	-1,251	-0,240 618	-42 500,00	-15,36
DIA 5	223 333	-0,020	-4,404	-0,068 339	-10 833,33	-4,63
DIA 6	208 333	-0,030	-3,001	-0,100 307	-15 000,00	-6,72
DIA 7	171 875	-0,083	-1,084	-0,277 540	-36 458,33	-17,50
DIA 8	137 500	-0,096	-0,935	-0,321 935	-34 375,00	-20,00
DIA 9	174 583	0,103	0,873	0,344 492	37 083,33	26,97
DIA 10	157 083	-0,045	-1,975	-0,152 389	-17 500,00	-10,02

Fuente: Elaboración propia

Tabla 5 Parámetros de crecimiento de *Navicula* sp1. en medio foliar

	D (cel/mL)	μ	TD (Días)	K (Div/Días)	P.D. (cel/mL)	V.P. (%)
DIA 0	29 167					
DIA 1	59 792	0,311 754	0,290 669	1,035 646	30 625	105
DIA 2	163 750	0,437 541	0,207 106	1,453 51	103 958,33	173,87
DIA 3	304 583	0,269 525	0,336 211	0,895 361	140 833,33	86,01
DIA 4	457 292	0,176 487	0,513 449	0,586 29	152 708,33	50,14
DIA 5	580 208	0,103 391	0,876 453	0,343 464	122 916,67	26,88
DIA 6	373 125	-0,191 73	-0,472 63	-0,636 926	-20 7083,3	-35,69
DIA 7	349 583	-0,028 304	-3,201 607	-0,094 025	-23 541,67	-6,31
DIA 8	289 792	-0,081 465	-1,112 346	-0,270 626	-59 791,67	-17,1
DIA 9	226 458	-0,107 098	-0,846 117	-0,355 778	-63 333,33	-21,85
DIA 10	210 208	-0,032 338	-2,802 153	-0,107 428	-16 250	-7,18

Fuente: Elaboración propia

Tabla 6 Parámetros de crecimiento de *Navicula* sp1. en medio humus

	D (cel/mL)	μ	TD (Días)	K (Div/Días)	P.D. (cel/mL)	V.P. (%)
DIA 0	32 500					
DIA 1	66 042	0,307 935	0,294 274	1,022 959	33 541,67	103,21
DIA 2	137 500	0,318 485	0,284 526	1,058 006	71 458,33	108,2
DIA 3	216 458	0,197 072	0,459 818	0,654 672	78 958,33	57,42
DIA 4	305 208	0,149 222	0,607 263	0,495 716	88 750	41
DIA 5	410 417	0,128 629	0,704 486	0,427 304	105 208,33	34,47
DIA 6	348 125	-0,071 49	-1,267 553	-0,237 489	-62 291,67	-15,18
DIA 7	405 417	0,066 166	1,369 534	0,219 805	57 291,67	16,46
DIA 8	389 167	-0,017 766	-5,100 601	-0,059 019	-16250	-4,01
DIA 9	381 042	-0,009 163	-9,889 278	-0,030 44	-8125	-2,09
DIA 10	299 167	-0,105 059	-0,862 533	-0,349 007	-81875	-21,49

Fuente: Elaboración propia

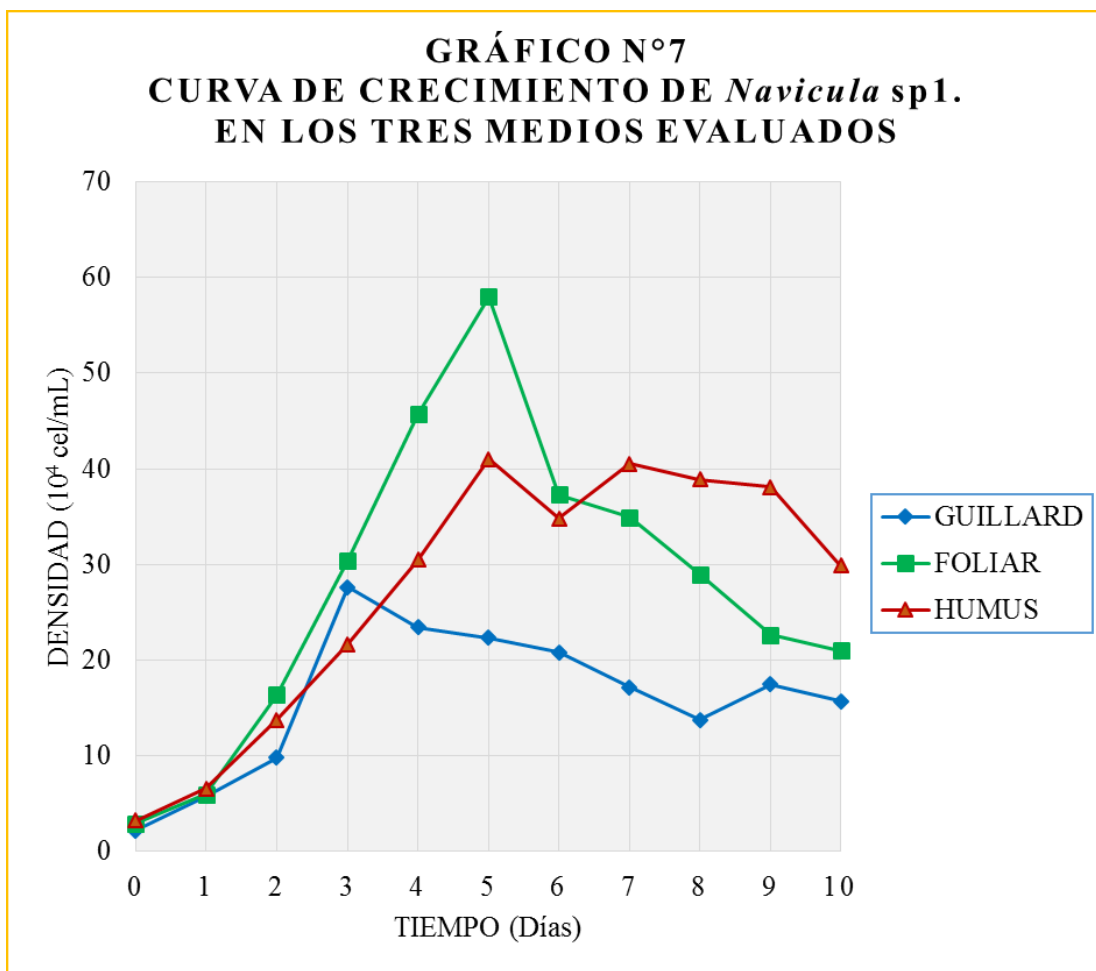


Gráfico 7 Curva de crecimiento de *Navicula* sp1. en los tres medios evaluados

Fuente: Elaboración propia

Para el cultivo de *Navicula* sp1., el valor más alto en la densidad de cultivo, al tiempo de cosecha, se obtuvo con el medio NF, 580 208 cel/mL en 800 mL. El valor más bajo corresponde al medio MG con 276 667 cel/mL.

- *Nitzschia* sp1.

Tabla 7 Parámetros de crecimiento de *Nitzschia* sp1. en medio Guillard f/2

	D (cel/mL)	μ	TD (Días)	K (Div/Días)	P.D. (cel/mL)	V.P. (%)
DIA 0	34 583					
DIA 1	141 458	0,611 762	0,148 125	2,032 272	106 875	309,04
DIA 2	246 458	0,241 115	0,375 825	0,800 984	105 000	74,23
DIA 3	314 167	0,105 417	0,859 609	0,350 194	67 708,33	27,47
DIA 4	175 000	-0,254 122	-0,356 589	-0,844 193	-139 166,6	-44,3
DIA 5	215 833	0,091 08	0,994 912	0,302 569	40 833,33	23,33
DIA 6	225 000	0,018 064	5,016 447	0,060 009	9 166,67	4,25
DIA 7	153 750	-0,165 367	-0,547 974	-0,549 35	-71 250	-31,67
DIA 8	95 417	-0,207 191	-0,437 36	-0,688 288	-58 333,33	-37,94
DIA 9	79 167	-0,081 082	-11,176	-0,269 354	-16 250	-17,03
DIA 10	64 167	-0,091 233	-0,993 25	-0,303 076	-15 000	-18,95

Fuente: Elaboración propia

Tabla 8 Parámetros de crecimiento de *Nitzschia* sp1. en medio foliar

	D (cel/mL)	μ	TD (Días)	K (Div/Días)	P.D. (cel/mL)	V.P. (%)
DIA 0	21 250					
DIA 1	183 750	0,936 868	0,096 723	3,112 277	162 500	764,71
DIA 2	389 792	0,326 605	0,277 451	1,084 982	206 041,67	112,13
DIA 3	371 458	-0,020 922	-4,331 095	-0,069 504	-18 333,33	-4,7
DIA 4	409 583	0,042 432	2,135 575	0,140 96	38 125	10,26
DIA 5	309 792	-0,121 273	-0,747 219	-0,402 867	-99 791,67	-24,36
DIA 6	295 000	-0,021 248	-4,264 793	-0,070 585	-14 791,67	-4,77
DIA 7	236 250	-0,096 45	-0,939 522	-0,320 408	-58 750	-19,92
DIA 8	147 083	-0,205 808	-0,440 298	-0,683 695	-89 166,67	-37,74
DIA 9	205 000	0,144 19	0,628 454	0,479 001	57 916,67	39,38
DIA 10	169 792	-0,081 837	-1,107 281	-0,271 864	-35 208,33	-17,17

Fuente: Elaboración propia

Tabla 9 Parámetros de crecimiento de *Nitzschia* sp1. en medio humus

	D (cel/mL)	μ	TD (Días)	K (Div/Días)	P.D. (cel/mL)	V.P. (%)
DIA 0	26667					
DIA 1	101 875	0,582 099	0,155 673	1,933 733	75 208,33	282,03
DIA 2	388 333	0,581 137	0,155 931	1,930 537	286 458,33	281,19
DIA 3	573 333	0,169 203	0,535 554	0,562 091	185 000	47,64
DIA 4	867 292	0,179 758	0,504 106	0,597 156	293 958,33	51,27
DIA 5	457 083	-0,278 17	-0,325 762	-0,924 08	-410 208,3	-47,3
DIA 6	406 667	-0,050 757	-1,785 319	-0,168 614	-50 416,67	-11,03
DIA 7	350 208	-0,064 912	-1,395 997	-0,215 638	-56 458,33	-13,88
DIA 8	482 292	0,138 983	0,652	0,461 702	132 083,33	37,72
DIA 9	290 000	-0,220 912	-0,410 196	-0,733 869	-192 291,6	-39,87
DIA 10	312 917	0,033 031	2,743 421	0,109 728	22 916,67	7,9

Fuente: Elaboración propia

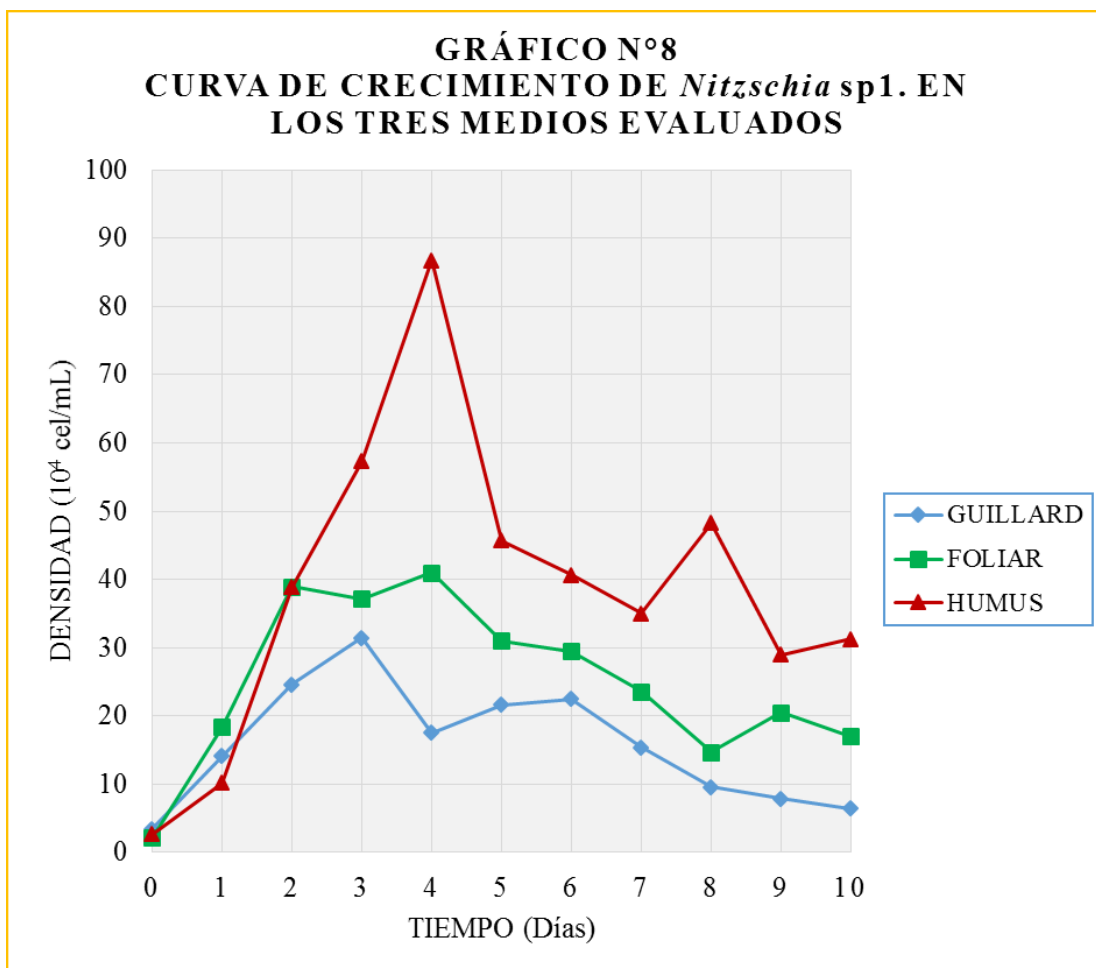


Gráfico 8 Curva de crecimiento de *Nitzschia* sp1. en los tres medios evaluados

Fuente: Elaboración propia

Para el cultivo de *Nitzschia* sp1., el valor más alto en la densidad de cultivo, al tiempo de cosecha, se obtuvo con el medio HL, 867 292 cel/mL en 800 mL. El valor más bajo corresponde al medio MG con 314 167 cel/mL.

Tabla 10 Parámetros de crecimiento de *Navicula* sp2. en medio Guillard f/2

	D (cel/mL)	μ	TD (Días)	K (Div/Días)	P.D. (cel/mL)	V.P. (%)
DIA 0	15 208					
DIA 1	65 833	0,636 364	0,142 398	2,114 002	50 625	332,88
DIA 2	92 083	0,145 735	0,621 793	0,484 132	26 250	39,87
DIA 3	92 292	0,000 981	92,329 168	0,003 26	208,33	0,23
DIA 4	86 667	-0,027 31	-3,318 044	-0,090 725	-5625	-6,09
DIA 5	91 875	0,025 345	3,575 308	0,084 197	5 208,33	6,01
DIA 6	64 792	-0,151 678	-0,597 43	-0,503 875	-27 083,33	-29,48
DIA 7	70 625	0,037 439	2,420 373	0,124 373	5 833,33	9
DIA 8	61 458	-0,060 378	-1,500 838	-0,200 575	-9 166,67	-12,98
DIA 9	59 375	-0,014 977	-6,050 354	-0,049 754	-2 083,33	-3,39
DIA 10	53 333	-0,046 605	-1,944 369	-0,154 821	-6 041,67	-10,18

Fuente: Elaboración propia

Tabla 11 Parámetros de crecimiento de *Navicula* sp2. en medio foliar

	D (cel/mL)	μ	TD (Días)	K (Div/Días)	P.D. (cel/mL)	V.P. (%)
DIA 0	22 083					
DIA 1	98 125	0,647 715	0,139 903	2,151 709	76 041,67	344,34
DIA 2	98 750	0,002 757	32,862 828	0,009 16	625	0,64
DIA 3	95 833	-0,013 021	-6,959 566	-0,043 254	-2 916,67	-2,95
DIA 4	99 375	0,015 761	5,749 616	0,052 357	3 541,67	3,7
DIA 5	91 250	-0,037 044	-2,446 184	-0,123 061	-8125	-8,18
DIA 6	87 083	-0,020 298	-4,464 374	-0,067 429	-4 166,67	-4,57
DIA 7	96 458	0,044 405	2,040 709	0,147 512	9375	10,77
DIA 8	75 833	-0,104 48	-0,867 319	-0,347 081	-20625	-21,38
DIA 9	101 458	0,1264 28	0,716 751	0,419 992	25625	33,79
DIA 10	91 042	-0,047 048	-1,926 076	-0,156 292	-10 416,67	-10,27

Fuente: Elaboración propia

Tabla 12 Parámetros de crecimiento de *Navicula* sp2. en medio humus

	D (cel/mL)	μ	TD (Días)	K (Div/Días)	P.D. (cel/mL)	V.P. (%)
DIA 0	18 542					
DIA 1	70 000	0,576 949	0,157 063	1,916 625	51 458,33	277,53
DIA 2	236 875	0,529 421	0,171 163	1,758 737	166 875	238,39
DIA 3	300 625	0,103 506	0,875 478	0,343 846	63 750	26,91
DIA 4	319 792	0,026 842	3,375 938	0,089 169	19 166,67	6,38
DIA 5	358 125	0,049 167	1,843 028	0,163 334	38 333,33	11,99
DIA 6	297 500	-0,080 548	-1,125 012	-0,267 579	-60 625	-16,93
DIA 7	251 042	-0,073 741	-1,228 854	-0,244 968	-46 458,33	-15,62
DIA 8	201 458	-0,095 561	-0,948 269	-0,317 452	-49 583,33	-19,75
DIA 9	189 167	-0,027 341	-3,314 375	-0,090 826	-12 291,67	-6,1
DIA 10	176 458	-0,030 202	-3,000 324	-0,100 332	-12 708,33	-6,72

Fuente: Elaboración propia

GRÁFICO N°9
CURVA DE CRECIMIENTO DE *Navicula* sp2.
EN LOS TRES MEDIOS EVALUADOS

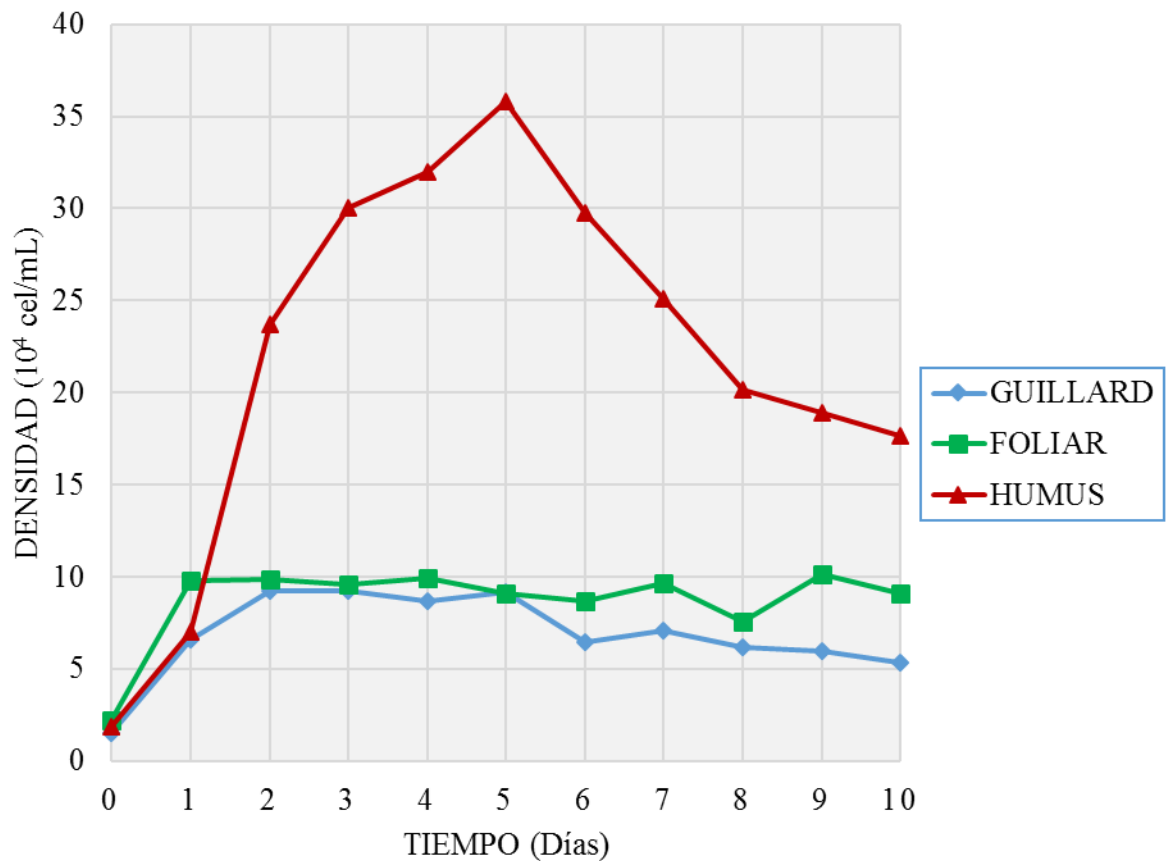


Gráfico 9 Curva de crecimiento de *Navicula* sp2. en los tres medios evaluados

Fuente: Elaboración propia

Para el cultivo de *Navicula* sp2., el valor más alto en la densidad de cultivo, al tiempo de cosecha, se obtuvo con el medio HL, 358 115 cel/mL en 800 mL. El valor más bajo corresponde al medio MG con 92 292 cel/mL.

Tabla 13 Parámetros de crecimiento de *Nitzschia* sp2. en medio Guillard f/2

	D (cel/mL)	μ	TD (Días)	K (Div/Días)	P.D. (cel/mL)	V.P. (%)
DIA 0	19 167					
DIA 1	40 625	0,326 247	0,277 756	1,083 792	21 458,33	111,96
DIA 2	120 000	0,470 388	0,192 643	1,562 629	79 375	195,38
DIA 3	269 792	0,351 847	0,257 547	1,168 837	149 791,67	124,83
DIA 4	409 583	0,181 314	0,499 781	0,602 324	13 9791,67	51,81
DIA 5	328 333	-0,096 027	-0,943 66	-0,319 003	-81 250	-19,84
DIA 6	300 000	-0,039 194	-2,312 031	-0,130 202	-28 333,33	-8,63
DIA 7	219 375	-0,135 934	-0,666 625	-0,451 573	-80 625	-26,88
DIA 8	149 583	-0,166 304	-0,544 888	-0,552 462	-69 791,67	-31,81
DIA 9	137 083	-0,037 899	-2,391 044	-0,125 899	-12500	-8,36
DIA 10	138 750	0,005 248	17,265 873	0,017 435	1 666,67	1,22

Fuente: Elaboración propia

Tabla 14 Parámetros de crecimiento de *Nitzschia* sp2. en medio foliar

	D (cel/mL)	μ	TD (Días)	K (Div/Días)	P.D. (cel/mL)	V.P. (%)
DIA 0	17 500					
DIA 1	40 625	0,365 755	0,247 753	1,215 039	23 125	132,14
DIA 2	156 042	0,584 447	0,155 048	1,941 534	11 5416,67	284,1
DIA 3	296 250	0,278 418	0,325 472	0,924 904	140 208,33	89,85
DIA 4	299 792	0,005 161	17,557 378	0,017 145	3 541,67	1,2
DIA 5	317 083	0,024 354	3,720 852	0,080 904	17 291,67	5,77
DIA 6	299 792	-0,024 354	-3,720 852	-0,080 904	-17 291,67	-5,45
DIA 7	280 417	-0,029 016	-3,123 033	-0,096 39	-19 375	-6,46
DIA 8	220 000	-0,105 381	-0,859 899	-0,350 076	-60 416,67	-21,55
DIA 9	170 208	-0,111 442	-0,813 133	-0,370 21	-49 791,67	-22,63
DIA 10	110 000	-0,189 588	-0,477 968	-0,629 812	-60 208,33	-35,37

Fuente: Elaboración propia

Tabla 15 Parámetros de crecimiento de *Nitzschia* sp2. en medio humus

	D (cel/mL)	μ	TD (Días)	K (Div/Días)	P.D. (cel/mL)	V.P. (%)
DIA 0	15 208					
DIA 1	66 042	0,637 736	0,142 092	2,118 56	50 833,33	334,25
DIA 2	300 208	0,657 605	0,137 799	2,184 563	234 166,67	354,57
DIA 3	1 099 167	0,563 641	0,160 771	1,872 415	798 958,33	266,13
DIA 4	1 598 750	0,162 717	0,556 9	0,540 546	499 583,33	45,45
DIA 5	1 899 375	0,074 83	1,21097	0,248 586	300 625	18,8
DIA 6	1 727 708	-0,041 14	-2,202 636	-0,136 668	-171 666,67	-9,04
DIA 7	1 309 375	-0,120 406	-0,752 594	-0,399 99	-418 333,33	-24,21
DIA 8	931 667	-0,147 803	-0,613 092	-0,491 003	-377 708,33	-28,85
DIA 9	732 292	-0,104 576	-0,866 515	-0,347 403	-199 375	-21,4
DIA 10	783 125	0,029 147	3,108 969	0,096 826	50 833,33	6,94

Fuente: Elaboración propia

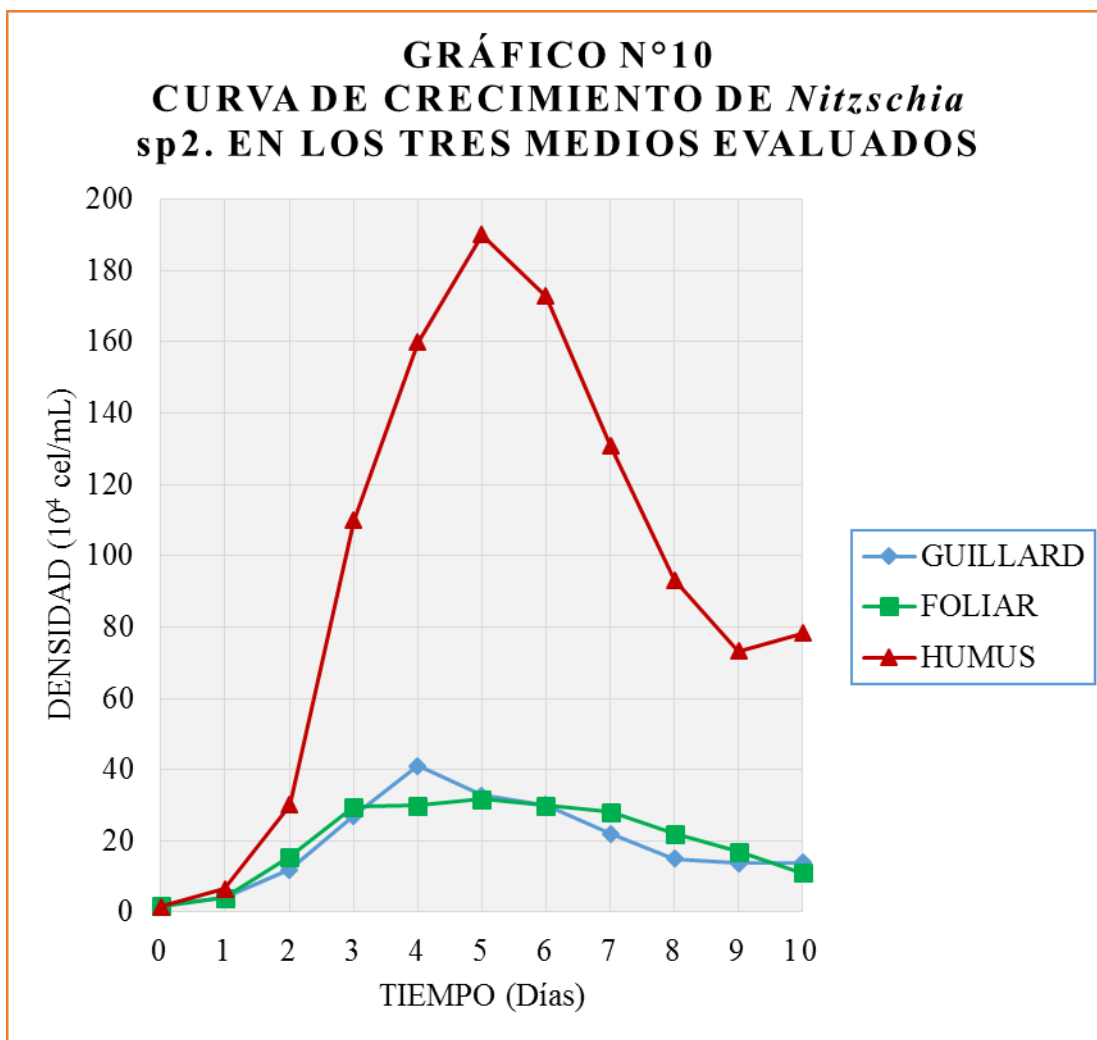


Gráfico 10 Curva de crecimiento de *Nitzschia* sp2. en los tres medios evaluados

Fuente: Elaboración propia

Para el cultivo de *Nitzschia* sp1., el valor más alto en la densidad de cultivo, al tiempo de cosecha, se obtuvo con el medio HL, 1 899 375 cel/mL en 800 mL. El valor más bajo corresponde al medio NF con 409 583 cel/mL.

5.2.2. Análisis estadístico del crecimiento de diatomeas

Se trabajó con el programa estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI.I

- Variable dependiente: Log10 (Densidad final)
- Variable independiente: Medios de Cultivo

Diatomeas bentónicas

- Número de observaciones: 12
- Número de niveles: 3

Tabla 16 Resumen de densidades finales

DENSIDADES FINALES				
		MEDIOS DE CULTIVO		
		MG	NF	HL
DIATOMEAS	D1	276 667	580 208	410 417
	D2	314 167	409 583	867 292
	D3	92 292	101 458	358 115
	D4	409 583	317 083	1 899 375

Fuente: Elaboración propia

Tabla 17 Anova para Log10 (Densidad final) por medio de cultivo

Fuente	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Medios de cultivo	0,489 468	2	0,244 734	6,20	0,0346
B: Diatomeas	0,664 489	3	0,221 496	5,62	0,0355
Residuos	0,236 679	6	0,039 446 4		
TOTAL (Corregido)	1,390 64	11			

(Nota: ^L indica datos para Log10 (Densidad final))

Fuente: Elaboración propia

Puesto que los 2 valores-P, Medio de cultivo = 0.0346 y Diatomeas = 0.0355 son menores a 0.05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre Log10 (Densidad final) con un 95 % de nivel de significancia.

Estos datos revelan que existe diferencia estadísticamente significativa entre medios de cultivo y diatomeas, ello nos confirman que se ha trabajado con medios de cultivos diferentes y diatomeas diferentes.

Tabla 18 Medias por mínimos cuadrados para Log10 (Densidad final) con intervalos de confianza del 95%

Nivel	Casos	Media ^L	Error Estadístico ^L	Límite Inferior ^L	Límite Superior ^L
MEDIA GLOBAL	12	5,565 34			
MEDIO DE CULTIVO					
HL	4	5,846 01	0,099 305	5,603 01	6,089
MG	4	5,379 16	0,099 305	5,136 16	5,622 15
NF	4	5,470 85	0,099 305	5,227 85	5,713 84
DIATOMEA					
D1	3	5,606 26	0,114 668	5,325 67	5,886 84
D2	3	5,682 56	0,114 668	5,401 97	5,963 14
D3	3	5,175 16	0,114 668	4,894 57	5,455 74
D4	3	5,797 38	0,114 668	5,516 79	6,077 96

(Nota: ^L indica datos para Log10 (Densidad final))

Fuente: Elaboración propia

Esta tabla muestra la media de Log10 (DENSIDAD FINAL) para cada uno de los niveles de las variables independientes (Medios de cultivo y Diatomeas bentónicas). También nos mide la variabilidad del muestreo, representada por los errores estándar de cada media. Las dos columnas de la extrema derecha muestran intervalos de confianza del 95.0% para cada una de las medias.

Tabla 19 Pruebas de múltiple rangos para Log10 (Densidad final) por cada medio de cultivo

Método: 95 % porcentaje Duncan

MEDIOS DE CULTIVO	Casos	Media LS^L	Media (Cel/mL)	Sigma LS^L	Grupos Homogéneos
MG	4	5,379 16	239 420	0,0993056	X
NF	4	5,470 85	295 699	0,0993056	X
HL	4	5,846 01	701 471	0,0993056	X

(Nota: ^L indica datos para Log10 (Densidad final))

Fuente: Elaboración propia

En esta tabla se han identificado 2 medios de cultivo homogéneos: MG y NF según la alineación de las X's en columna, ello quiere decir que no existen diferencias estadísticamente significativas a 95 % de confianza entre ambos medios de cultivo, además señala que el medio HL es un grupo estadísticamente diferente al MG y NF.

Tabla 20 Diferencias estimadas entre cada par de medias

Contraste	Sig.	Diferencia de densidad Final^L
HL - MG	*	0,466 85
HL - NF	*	0,375 16
MG - NF		-0,091 690 2

(Nota: ^L indica datos para Log10 (Densidad final))

* Indica una diferencia significativa.)

Fuente: Elaboración propia

En una comparación por pares entre los diferentes medios de cultivo, la tabla nos muestra diferencias estadísticamente significativas con un nivel de 95 % de confianza. El asterisco que se encuentra al lado de los dos pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95 % de confianza. Los medios de cultivo MG y NF enfrentados al medio de cultivo elaborado a base de humus de lombriz HL presentan una gran diferencia en densidad, lo que nos indica que el medio HL es el mejor en el crecimiento de microalgas produciendo una mayor densidad celular en los cultivos estáticos de diatomeas bentónicas marinas.

5.3. SEGUNDA SERIE EXPERIMENTAL

5.3.1. Parámetros de adhesión de diatomeas al sustrato.

Tabla 21 Densidad de diatomeas fijadas en la formación de biopelículas multiespecíficas en los tres medios de cultivo evaluados.

	MG			NF			HL		
HORAS	Cel/mL	Cel/placa	Cel/cm2	Cel/mL	Cel/placa	Cel/cm2	Cel/mL	Cel/placa	Cel/cm2
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	27 187,5	1 359 375	54 375	3 1250	1 562 500	62 500	25 312,5	1 265 625	50 625
12	36 875	1 843 750	73 750	66 562,5	3 328 125	133 125	51 250	2 562 500	102 500
18	39 687,5	1 984 375	79 375	64 375	3 218 750	128 750	47 187,5	2 359 375	94 375
24	85 937,5	4 296 875	171 875	73 750	3 687 500	147 500	119 687,5	5 984 375	239 375
30	147 812,5	7 390 625	295 625	107 812.5	5 390 625	215 625	107 500	5 375 000	215 000
36	155 937,5	7 796 875	311 875	104 062.5	5 203 125	208 125	95 000	4 750 000	190 000
42	162 187,5	8 109 375	324 375	109 687.5	5 484 375	219 375	117 812,5	5 890 625	235 625
48	143 437,5	7 171 875	286 875	190 937.5	9 546 875	381 875	184 687,5	9 234 375	369 375
54	139 375	6 968 750	278 750	191 562.5	9 578 125	383 125	201 250	10 062 500	402 500
60	150 937,5	7 546 875	301 875	186 562.5	9 328 125	373 125	192 187,5	9 609 375	384 375

Fuente: Elaboración propia

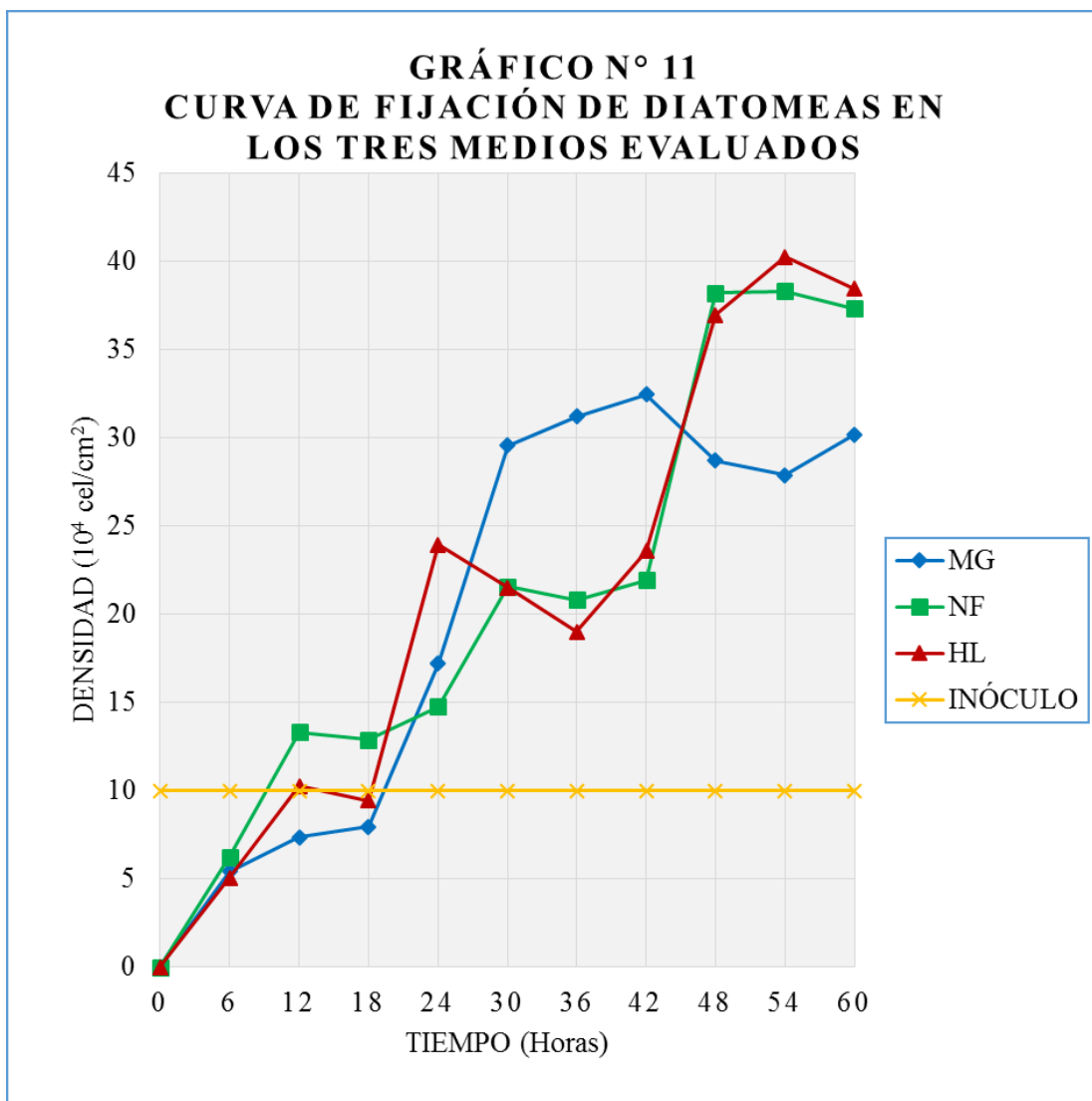


Gráfico 11 Curva de fijación de diatomeas en la formación de biopelículas multiespecíficas en los tres medios evaluados

Fuente: Elaboración propia

5.3.2. Análisis estadístico para la fijación de diatomeas

Se trabajó con el programa estadístico STATGRAPHICS Centurión XVI.I

- Variable dependiente: Log10 (Densidad final)
- Variable independiente: Medios de Cultivo
- Número de observaciones: 12
- Número de niveles: 3

Tabla 22 Resumen de densidades finales de fijación

DENSIDADES FINALES				
		MEDIOS DE CULTIVO		
		MG	NF	HL
REPETICIONES	R1	395 000	460 000	455 000
	R2	370 000	430 000	487 500
	R3	407 500	475 000	515 000
	R4	415 000	465 000	480 000

Fuente: Elaboración propia

Tabla 23 Anova para Log10 (Densidad final) por medio de cultivo

Fuente	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,015 891	2	0,007 945	18,09	0,000 7
Intra grupos	0,003 954	9	0,000 439		
Total (Corr.)	0,019 845	11			

(Nota: ^L indica datos para Log10 (Densidad final))

Fuente: Elaboración propia

La razón-F, que en este caso es igual a 18,09, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Log10 (DENSIDAD FINAL) entre un medio de cultivo y otro, con un nivel del 95,0% de confianza, esto nos confirma nuevamente que se trabajó con diferentes medios de cultivo.

Tabla 24 Tabla de medias para Log10 (Densidad final) por medio de cultivo con intervalos de confianza del 95,0%

MEDIO DE CULTIVO	Casos	Media^L	Media (Cel/mL)	Error Estadístico (S agrupada)^L	Límite Inferior^L	Límite Superior^L
HL	4	5,684 76	483 905	0,010 480	5,667 99	5,701 52
MG	4	5,598 24	396 497	0,010 480	5,581 48	5,615 01
NF	4	5,660 09	457 183	0,010 480	5,643 33	5,676 86
Total	12	5,647 7	444 324			

(Nota: ^L indica datos para Log10 (Densidad final))

Fuente: Elaboración propia

Esta tabla muestra la media de Log10 (DENSIDAD FINAL) para cada nivel de medio de cultivo (MG, NF y HL). También nos muestra el error estándar de cada media, el cual es una medida de la variabilidad de su muestreo. La tabla también muestra un intervalo alrededor de cada media de los medios de cultivo. Las dos columnas de la extrema derecha muestran intervalos de confianza del 95,0 % para cada una de las medias.

Tabla 25 Pruebas de múltiples rangos para Log10 (Densidad final) por medio de cultivo

Método: 95.0 porcentaje Duncan

NIVEL	Casos	Media LS^L	Media (Cel/mL)	Grupos Homogéneos
MG	4	5,598 24	396 497	X
NF	4	5,660 09	457 183	X
HL	4	5,684 76	483 905	X

(Nota: ^L indica datos para Log10 (Densidad final))

Fuente: Elaboración propia

En esta tabla se han identificado dos medios de cultivo homogéneos: NF y HL según la alineación de las X's en columna, ello quiere decir que no existen diferencias estadísticamente significativas a 95 % de confianza entre ambos medios de cultivo, además señala que el medio MG es un grupo estadísticamente diferente al NF y HL.

Tabla 26 Diferencias estimadas entre cada par de medias

Contraste	Sig.	Diferencia de densidades^L
HL - MG	*	0,086 515
HL - NF		0,024 665 4
MG - NF	*	-0,061 849 6

(Nota: ^L indica datos para Log10 (Densidad final))

* Indica una diferencia significativa.)

Fuente: Elaboración propia

En una comparación por pares entre los diferentes medios de cultivo, la tabla nos muestra diferencias estadísticamente significativas con un nivel de 95 % de confianza. El asterisco que se encuentra al lado de los 2 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95 % de confianza. Los medios de cultivo NF y HL enfrentados al medio MG presentan diferencia significativa en densidad de células fijadas, lo que nos indica que las diatomeas bentónicas cultivadas en NF y HL presentan mejores resultados en la adhesión al sustrato, mientras que las diatomeas bentónicas marinas cultivadas en MG presentan una reducida adhesión al sustrato.

VI. DISCUSIÓN

Una de las dificultades que se puede presentar al momento de aislar diatomeas por la técnica de placa es encontrarse con una diversidad de microorganismos, entre ellos algunas bacterias u otro tipo de contaminación presente, con esta técnica de debe repetir varias veces la réplica de las colonias, ello significa que debemos esperar a que aparezcan las colonias en las placas, es decir este método requiere tiempo y puede ser complicado si no se cuenta con mucho tiempo disponible.

Para la selección de las microalgas a trabajar, fue necesario considerar los comportamientos en condiciones de cultivo, así mismo, fue necesaria una revisión minuciosa mediante el enfoque y toma de imágenes de diferentes aumentos con los microscopios compuestos invertido. Las diatomeas fueron limpiadas previamente y enviadas a un Centro de Investigación para la identificación correspondiente por especialistas.

En la mayoría de microalgas el crecimiento se lleva a cabo durante el periodo de luz debido a que a través de la fotosíntesis generan material orgánico y energía suficiente para este proceso, mientras que la división celular se da en el periodo de

oscuridad, sin embargo, en las diatomeas la división celular también se realiza en luz continua, por lo tanto, las densidades celulares de las diatomeas bentónicas no se vieron afectadas por las condiciones de luz.

Al trabajar con diferentes especies, las especies dentro de los géneros presentan distintas cinéticas de crecimiento, según las condiciones y requerimientos del medio. **Curbelo et al. (2004)** trabajó con el género *Navicula* sp, y señala que éste tiene una cinética de crecimiento con una densidad máxima de $9,3 \times 10^5$ células/ml en el cuarto día. En el caso de las cepas de *Navicula* sp1 y *Navicula* sp2, se alcanzó una densidad máxima en el día 5 con $5,8 \times 10^5$ cel/mL en el medio NF y $3,5 \times 10^5$ cel/ml en el medio HL respectivamente.

Para la primera serie experimental, se obvió el periodo de adaptación de las diatomeas en los diferentes medios de cultivo, y se partió de un inóculo inicial desde un monocultivo axénico en fase exponencial con medio Guillard f/2, posiblemente la adaptación en los nuevos medios de cultivo NF y HL haya prolongado una fase de adaptación en los cultivos y producido un retraso en el crecimiento de la densidad.

Analizando el comportamiento y tendencia de las curvas de crecimiento exponencial de cada tratamiento en cada diatomea evaluada, nos sugiere que la

cinética algal pudo haber estado influenciada por la composición del medio de cultivo. En las curvas de crecimiento se evidencian fases de desaceleración, esto pudo haberse producido por el agotamiento de nutrientes, al ser nuevos medios de cultivos, no se conocen exactamente las cantidades químicas aprovechables por las diatomeas o presencia de algún elemento o sustancia que active la muerte del cultivo.

Que un cultivo se encuentre en la fase de muerte rápidamente, pudo deberse al efecto autosombreado debido a las altas concentraciones celulares alcanzadas y la ligera turbidez del medio empleado que impide la penetración homogénea de la luz (**Guerra, 2011**), Asimismo, con el medio HL se obtuvo grandes densidades, pero en cultivos masivos se tendría grandes dificultades por su turbidez que presentan.

Los medios de cultivo tradicionales para el cultivo de diatomeas, presentan fuentes de nitrógeno, fósforo, sílice y otros componentes utilizables para las microalgas. En el presente caso, los medios de cultivo elaborados con fertilizantes orgánico e inorgánico carecen del elemento sílice en su composición, por ello fue necesaria la adición de Sílice en la misma proporción descrito para el medio Guillard f/2.

Voltolina et al. (1991) concluye que el medio f/2, generalmente, produce

densidades por arriba de otros medios. En el experimento se consiguió densidades superiores al MG y posiblemente se debe a que los medios NF y HL fueron formulados según los antecedentes, pero ninguno menciona las cantidades óptimas, lo que nos lleva a suponer que las cantidades usadas en el cultivo fueron elevadas.

Leal (2012) indica que cada especie de diatomea presenta un grado de adhesión al sustrato y las cantidades de n-pentano pueden variar según la especie de diatomea, por lo que fue necesario realizar ensayos preliminares con n-pentano al 5 %, 10 % y 15 %. En las concentraciones 10 % y 15 % se observó gotas de aceite que dificultaron la observación y conteo, por lo que se usó n-pentano al 5 %.

Las diatomeas bentónicas fueron identificadas hasta género, donde se clasificaron dos especies dentro de cada género, para la identificación se obtuvo las medidas de tamaño y forma, hubo dificultad al momento de observar las diatomeas en el microscopio compuesto por su reducido tamaño, por ello fue necesario enviarlas al extranjero, porque no se contó con un microscopio de alta resolución y así observar las ornamentaciones del frústulo, que es característica de identificación.

La información sobre cultivo de microalgas, con especial referencia a las diatomeas a nivel nacional fue escasa, por lo que se tomó como referencia información publicada en el exterior.

VII. CONCLUSIONES

- Se determinó que el medio elaborado con fertilizante orgánico humus de lombriz *Eisenia foetida*, estadísticamente tuvo un efecto positivo, presentando las mayores concentraciones de densidad celular en el crecimiento y fijación de diatomeas bentónicas marinas en condiciones de cultivo.
- Se aisló e identificó cuatro diatomeas bentónicas marinas: *Navicula* sp1., *Navicula* sp2, *Nitzschia* sp1 y *Nitzschia* sp2; las cuales presentaron un tamaño adecuado para su uso en la acuicultura y fueron fácilmente cultivables bajo condiciones de laboratorio.
- Se determinó las curvas de crecimiento de las cuatro diatomeas en los diferentes medios de cultivo y se evidenció mayor crecimiento en las especies cultivadas con humus de lombríz, excepto en la diatomea *Nitzschia* sp1. la cual creció mejor con el nutriente foliar.
- Se estableció los parámetros poblacionales de crecimiento de cada especie de diatomea en los diferentes medios de cultivo y estadísticamente se obtuvo mayor

densidad celular en los monocultivos estáticos en el medio elaborado a base de humus de lombriz.

- Estadísticamente se obtuvo mayor densidad de fijación en la formación de biopelículas multiespecíficas con las diatomeas provenientes de monocultivos estáticos en medios de cultivos elaborados a base de humus de lombriz y nutriente foliar.

VIII. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar trabajos a posterior con nuevas especies de microalgas nativas con potencial para ser utilizadas en la acuicultura marina y dulceacuícola.
- Se recomienda más evaluaciones de la composición bioquímica de las cuatro diatomeas bentónicas marinas y ensayos de utilización como alimento vivo para determinar su completo potencial de uso acuícola.
- Se recomienda determinar las concentraciones óptimas y la composición química de los medios de cultivo formulados y evaluar su influencia en el crecimiento de otras especies de microalgas de importancia comercial.
- Se recomienda emplear otras fuentes orgánicas como aditivo para la formulación de nuevos medios de cultivos de origen orgánico y ser utilizados en la acuicultura.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Abalde, J., A. Cid, P. Fidalgo, E. Torres & C. Herrero. (1995).** Microalgas: Cultivo y Aplicaciones. Espana, Universidad de La Coruna, Monografia No.26, 210 p.
2. **Adenan, N. S., F. Md. Yusoff y M. Shariff. (2013).** Effect of salinity and temperature on the growth of diatoms and green algae. *Journal of Fisheries and Aquatic Science* 8: 397-403.
3. **Almaguer, Y.R., E. Alfonso & S. Leal (2004).** Aislamiento y cultivo de dos especies de diatomeas bentónicas. *Rev. Invest. Mar.* 25(1): 57-64.
4. **Arredondo-Vega B.O., Voltolina. D. Eds. (2007).** Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La Paz, B.C.S., México. ISBN 968-5715-51-3
5. **Alveal, K. (1995).** Manual de métodos ficológicos. Concepción Chile, 863p. Anibal Pinto. S.A.
6. **Becker, W. (2004).** Microalgae for Aquaculture: The Nutritional value of Microalgae for Aquaculture. En Richmond A. *Handbook of Microalgal culture: Biotechnology and Applied Phycology.* Blackwell Publishing. U.S.A. 380-391 pp.

7. **Brito, Diagnora, Nadia Milani, Guido Pereira, Mario González y Rodolfo Morán. (2006).** Crecimiento de microalgas de agua dulce, en dos medios de cultivo Guillard y un fertilizante comercial Nitrofoska. *CIENCIA* 14(4), 397-410.
8. **Brown, M. R., Jeffrey, S. W. y Garland, C. D. (1989).** *Nutritional Aspects of Microalgae used in Mariculture: A literatura review.* CSIRO Marine Laboratories Rep.205. CSIRO Australia. 42 pp.
9. **Brown, M. R., Jeffrey, S. W., J. K. Volkman y Dunstan, G. A. (1997).** «Nutritional properties of microalgae for mariculture». *Aquaculture* 151: 315-331.
10. **Cañizares, V. R., C. Casas C., A. R. Domínguez B y D. Voltolina L. (1994).** Las microalgas en la acuicultura. Cuadernos sobre fiotecnología. CINVESTAVIP. Departamento de biotecnología y bioingeniería. México. 44 pp.
11. **Chebil, L., Yamakasi, S. (2000),** Improvement of a rotifer ecosystem culture to promote recycling marine microalga, *Nannochloropsis sp.* *Aquac. Engin.;* 17: 1-10.
12. **Coutteau P. (1996).** Micro-algae. Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO. (Lavens, P and Sorgeloos, P, eds.),pp. 9 -60.
13. **Curbelo, R., Leal, S., Nuñez, N., Quintana, P., Benguela, I., Muñoz, D., Almaguer, Y. (2004).** Cultivo de la microalga Bentónica *Navicula sp.* Para la alimentación de las primeras postlarvas de camarón blanco. 148 pp.

14. **FAO. (2011).** Examen mundial de la pesca y la acuicultura. Disponible en:
<http://www.fao.org/docrep/013/i1820s/i1820s01.pdf>
15. **Fulks W., Main K. (1991).** The Design and Operation of Commercial – Scale Live Feeds Production. En Fulks, W. Y Main, K. (Eds). Rotifer and Microalgae Culture Systems. *Proceedings of a U.S. - Asia Work shop*. Honolulu. Hawaii, pp. 3 – 4.
16. **Gama Fuentes, María de los Ángeles, (2004).** Biología. Biogénesis y microorganismos. 2ª edición. Pearson educación. México.
17. **González, B. (1999),** Evaluación de medios nutritivos para el crecimiento de tres microalgas marinas de uso común en acuicultura. Fundación La Salle de Ciencias Naturales. Tomo LIX, No. 151, pp: 5 -10, enero/junio, 1999. Universidad del Zulia, Venezuela.
18. **Griffith, D.R.W., E. Laborde V. & J.M. Wigglesworth (1992).** Biological and economic of penaeid larval rearing using benthic diatoms. *Memorias I Congreso Ecuatoriano de Acuicultura*, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Ecuador, pp: 101 – 105.
19. **Guerra Aznay, Missael, Lourdes Pérez Jar, Sylvia Leal Lorenzo, Bárbarito Jaime Ceballos, Redney Jiménez Cabrera, Sunney Pérez Díaz y Jorge Bobadilla González. (2012).** Alternativa de biofertilizante como medio de

cultivo para el crecimiento poblacional de dos microalgas marinas empleadas en la camaronicultura. *Revista Cubana de Investigaciones Pesqueras* 29(1), 6-11

20. **Guillard, R. L. (1975).** *Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. Culture of marine invertebrate animals.* Plenum Preess, N.Y. p. 29-59.
21. **Hasle, G.R. & Syvertse N, E.E. (1997).** Marine Diatoms. En: Identifying Marine Phytoplankton Tomas, C.R. (Ed.), 5-385 páginas. Academic Press, Inc., San Diego.
22. **Hernández-Almeida, O. U. & D. A. Siqueiros-Beltrones. (2008).** Variations in the Structure of Epiphytic Diatom Assemblages in Subtropical Macroalgae, *Hidrobiológica* 18: 51-61.
23. **Hoff, F. & T. Snell. (2011).** Plankton culture manual. Florida aqua farm, inc. E.U.A. P:162.
24. **Kawamura, T. & Hirano, R. (1992).** Seasonal changes in benthic diatom communities colonizing glass slides in Aburatsubo Bay, Japan. *Diatom Research* 7 (2), 227-239.
25. **Lango-Alemán, J.A. (1999),** Análisis de costos para la producción masiva de microalgas en un laboratorio comercial de postlarvas de camarón del Sur de Sonora, México. Tesis de Maestría en Ciencias. División de Ciencias Biológicas

y de la Salud. Depto. de Invest. Científicas y Tecnológicas, Universidad de Sonora, Hermosillo, México. 72pp.

- 26. López Elías, José Antonio; Norma García Lagunas, Laura Rebeca Jiménez Gutiérrez, Nolberta Huerta Aldaz (2009).** Crecimiento de la diatomea *Thalassiosira pseudonana* en cultivos estáticos con iluminación continua y fotoperiodo a diferentes salinidades *BIOTecnia*, VOL. XI, NO. 1,
- 27. Leal, Sylvia, et al. (2010).** Las diatomeas bentónicas como fuente de alimento en el cultivo larvario de camarón y otros organismos acuáticos. En: Cruz- Suarez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J. (Eds), *Avances en Nutrición Acuícola X - Memorias del X Simposio Internacional de Nutrición Acuícola*, 8-10 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. ISBN 978-607- 433-546-0. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 598-619.
- 28. Leal Sylvia, Rafael Curbelo, Xiomara Vega, Nayivis Núñez, Joicye Hernández (2012)** Método de dispersión de biopelículas en cultivos de la diatomea bentónica *Amphora* sp. para facilitar el conteo directo. *Serie Oceanológica*. No. 10, 2012 . ISSN 2072-800x
- 29. Laing, I. y F. Ayala. (1990).** Commercial mass culture techniques for producing microalgae. pp. 447-477. En: Akatsuka, I. (Ed). *Introduction to applied phycology*. SPB Academic Publishing Bv., La Haya. 683 p.

- 30. Medina Jasso, A., P. Piña Valdez, M. Nieves Soto, J.F. Arzola González y M. Guerrero Ibarra. 2012.** La importancia de las microalgas. CONABIO. Biodiversitas, 103:1-5
- 31. Muñoz, M., Ramírez, J. M., Otero, A., Medina, V. M., Velasco, Y. M., Cruz, P. (2009),** Efecto de diferentes medios de cultivo sobre el crecimiento y el contenido proteico de *Chlorella vulgaris*. Rev. Colombiana de Ciencias Pecuarias; 22 (3): 487-508
- 32. Nieves-Soto M, Cortes-Altamirano R, Gutiérrez-Corona C, Pacheco-Marges M. (1994).** Producción de fitoplancton a bajo costo. 1. Aislamiento y cultivo de *Monoraphidium* sp. (Chlorophyceae) en un sistema estático en medio F y cuatro a base de fertilizantes agrícolas. An Inst Cienc del Mar y Limnol Univ Nal Auton México; 21:119-127.
- 33. Paniagua-Michell, J., Voltolina, L. D., Bückle- Ramírez L. F. (1989).** Manual de metodología y alternativas para el cultivo de microalgas.
- 34. Perez Castro, Donacio. Manzanillo. (1995)** Cultivo Experimental de las Diatomeas *Thalassiosira subtilis*, *Skeletonema costatum* y *Chaetoceros affinis* en condiciones de Laboratorio para fines de Acuacultura. Universidad de Colima, Tesis de Maestría en Ciencias.

35. **Peraza-Díaz, D. M. (1997)**, Cultivo de la diatomea *Chaetoceros* sp. con tres fertilizantes agrícolas. México. Universidad Autónoma de Sinaloa, Tesis de Técnico en Acuicultura, 24 pp.
36. **Provasoli, L; A. McLaughlin y M.R. Droop. (1957)**. The development of artificial media for marine algae. *Arch. Fur. Microbiologia*. P: 392-428.
37. **Richmond, A. (1986)**. Cell response to environmental factors. En: Richmond, A. (Ed). *Handbook of microalgal mass culture*. CRC Press. Inc., E.U.A.U.S.A. P: 69-99.
38. **Round, F.E. & Crawford, R.M. (1989)**. Phylum Bacillariophyta. En: *Handbook of Protoctista* L. Margulis, J. O. Corliss, M. Melkonian, & D. J. Chapman, (Eds.), 574-596 páginas. Jones and Barlett, Boston.
39. **Ruiz, M, F. (2011)**, Camaronicultura Orgánica. Proyecto Homeopatía Acuícola en la Producción de Camarón Orgánico, Disponible en: Portal de Silicio en los Sistemas Biológicos, <http://www.cesasin.com.mx/>, [Consulta: 10 de mayo de 2011]
40. **Sabbe, K., Chepurnov, V. A., Vyverman, W. y Mann, D. G. (2004)**. Apomixis in *Achnanthes* (Bacillariophyceae); development of a model system for diatom reproductive biology. *European Journal of Phycology*, 39, 327-341
41. **Sánchez S., M, P. (2002)** “optimización de cultivos de diatomeas bentónicas para la alimentación de postlarvas de abulón”, baja california, mexico. Dpto.

acuicultura (CICESE).

42. **Siqueiros, D. (1994).** Asociaciones de Diatomeas Bentónicas Marinas; Análisis de su estructura y aplicación. Universidad Autónoma de Baja California Sur, Tópicos Selectos sobre Microalgas, *Serie Científica* 2(1): 59-71.
43. **Stein, J.R. (1973).** Handbook of Phycological Methods. Culture methods and growth measurements. Cambridge University press. USA. 446 pp.
44. **Valenzuela-Espinoza E, Lafarga-de la Cruz F, Millán-Núñez R, Núñez-Cabrero F. (2005).** Crecimiento, consumo de nutrientes y composición proximal de *Rhodomonas* sp. cultivada con medio f/2 y fertilizantes agrícolas. *Cienc*; 31: 79-89.
45. **Voltolina, L. D.; Trujillo, V. M. y González, L. M. (1991).** *Colección de cepas de microalgas del Departamento de Acuicultura del Cicese*, Com. Acad. Cicese. México. 51pp.

ANEXOS

X. ANEXOS

Anexo 1 Limpieza y esterilización de materiales



Fuente: Elaboración propia

Anexo 2 Acondicionamiento del cepario



Fuente: Elaboración propia

Anexo 3 Preparación de reactivos



Fuente: Elaboración propia

Anexo 4 Elaboración del sistema de captación



Fuente: Elaboración propia

Anexo 5 Colecta de muestras



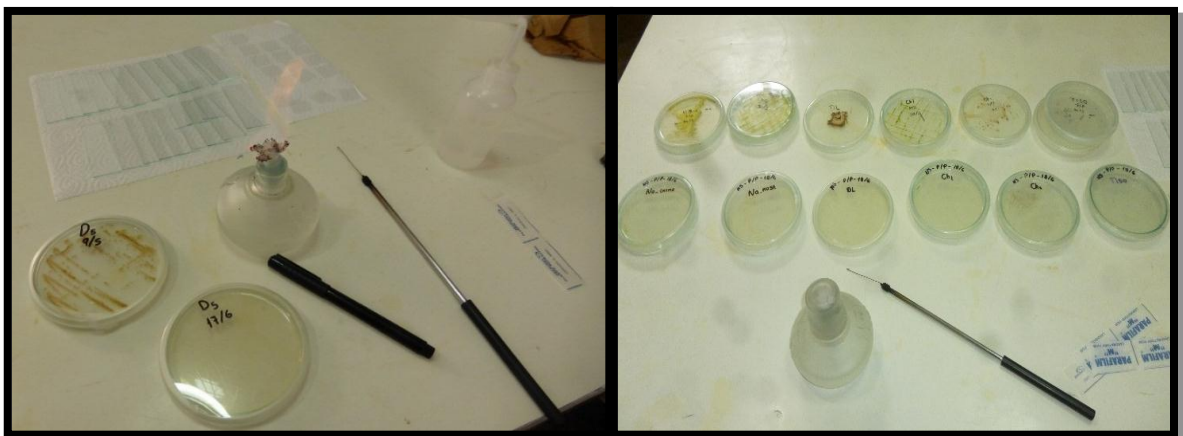
Fuente: Elaboración propia

Anexo 6 Preparación de medio Guillard en placas



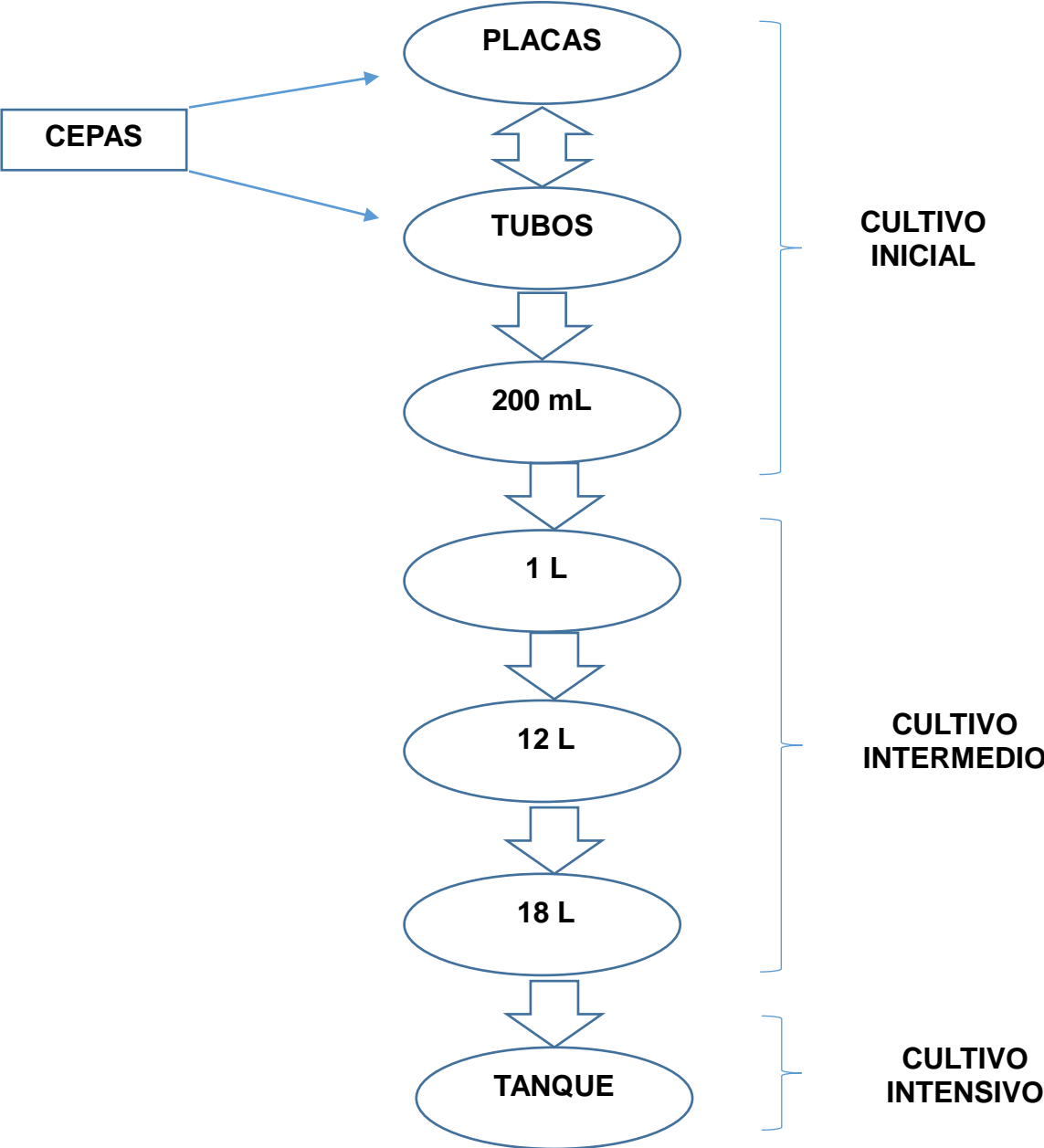
Fuente: Elaboración propia

Anexo 7 Mantenimiento de cepas



Fuente: Elaboración propia

Anexo 8 Diagrama de Flujo de la producción de microalgas (SISTEMA BATCH)





Fuente: Elaboración propia

Anexo 9 Formulación del medio Guillard f/2

- MEDIO F/2

Para 1 litro de Agua destilada.

CANTIDAD A USAR	COMPOSICIÓN	SOLUCIÓN STOCK
1,0 ml	NaNO ₃	75,0 gr/L
1,0 ml	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	5,0 gr/L
1,0 ml	Na ₂ SiO ₃ .9H ₂ O	30,0 gr/L + 5 mL de HCl
1,0 ml	F/2 Solución de metales trazas	
1,0 ml	F/2 Solución de Vitaminas	
1,0 ml	Tris	250,0 gr/L +147,5 mL de HCl

- F/2 Solución de Metales Trazas (Guillard & Rither 1962, Guillard 1975)

Para un volumen de 950 mililitros de agua destilada.

CANTIDAD A USAR	COMPOSICIÓN	SOLUCIÓN STOCK
3,15 gr	FeCl ₃ .6H ₂ O	
4,36 gr.	Na ₂ SiO ₃ .9H ₂ O	
1,0 mL	CuSO ₄ .5H ₂ O	9,8 gr/L
1,0 mL	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	6,3 gr/L
1,0 mL	ZnSO ₄ .7H ₂ O	22,0 gr/L
1,0 mL	CoCl ₂ .6H ₂ O	10,0 gr/L
1,0 mL	MnCl ₂ .4H ₂ O	180,0 gr/L

Llevar a un volumen final de 1 litro con agua destilada.

- **F/2 Solución de Vitaminas.** (Guillard & Rither 1962, Guillard 1975)

CANTIDAD A USAR	COMPOSICIÓN	SOLUCIÓN STOCK
1,0 mL	Cyanocobalamina (B12)	1,0 gr/L
10,0 mL	Biotina	0,1 gr/L
0,2 gr	Thiamina HCl	

Disolver todas las concentraciones en 1 L de agua destilada y posteriormente congelar, por cada litro de agua de mar añadada ½ litro de solución de vitaminas.

Anexo 10 Preparación de medio Guillard f/2



Fuente: Elaboración propia

Anexo 11 Formulación del fertilizante inorgánico

- Nitrógeno 100 g/L
- Fósforo 40 g/L
- Potasio 70 g/L
- Magnesio 2 g/L
- Hierro 0,15 g/L
- Cinc 0,005 g/L
- Manganeso 0,015 g/L
- Boro 0,02 g/L
- Cobre 0,025 g/L
- Molibdeno 0,003 g/L



Anexo 12 Formulación del fertilizante orgánico

- Biohumus Composición química:

Nitrógeno total (N) contenido, (% en masa en base seca):	1,47
Fosfato disponible (P ₂ O ₅) contenido, (% en masa en base seca):	1,14
Potasio (K ₂ O) contenido, (% en masa en base seca):	0,52
Contenido de agua, (% en masa en base seca):	58,1
Contenido de materia orgánica, (% en masa en base seca):	38,80
PH de la solución de sal, pH:	7,6
Ca (% en masa en base seca):	0,86
Mg (% en masa en base seca):	0,30



Fuente: Google imágenes

Anexo 13 Preparación del medio con fertilizante orgánico



Fuente: Elaboración propia

Anexo 14 Cultivo experimental



Fuente: Elaboración propia

Anexo 15 Dispersión de biopelícula en cultivo



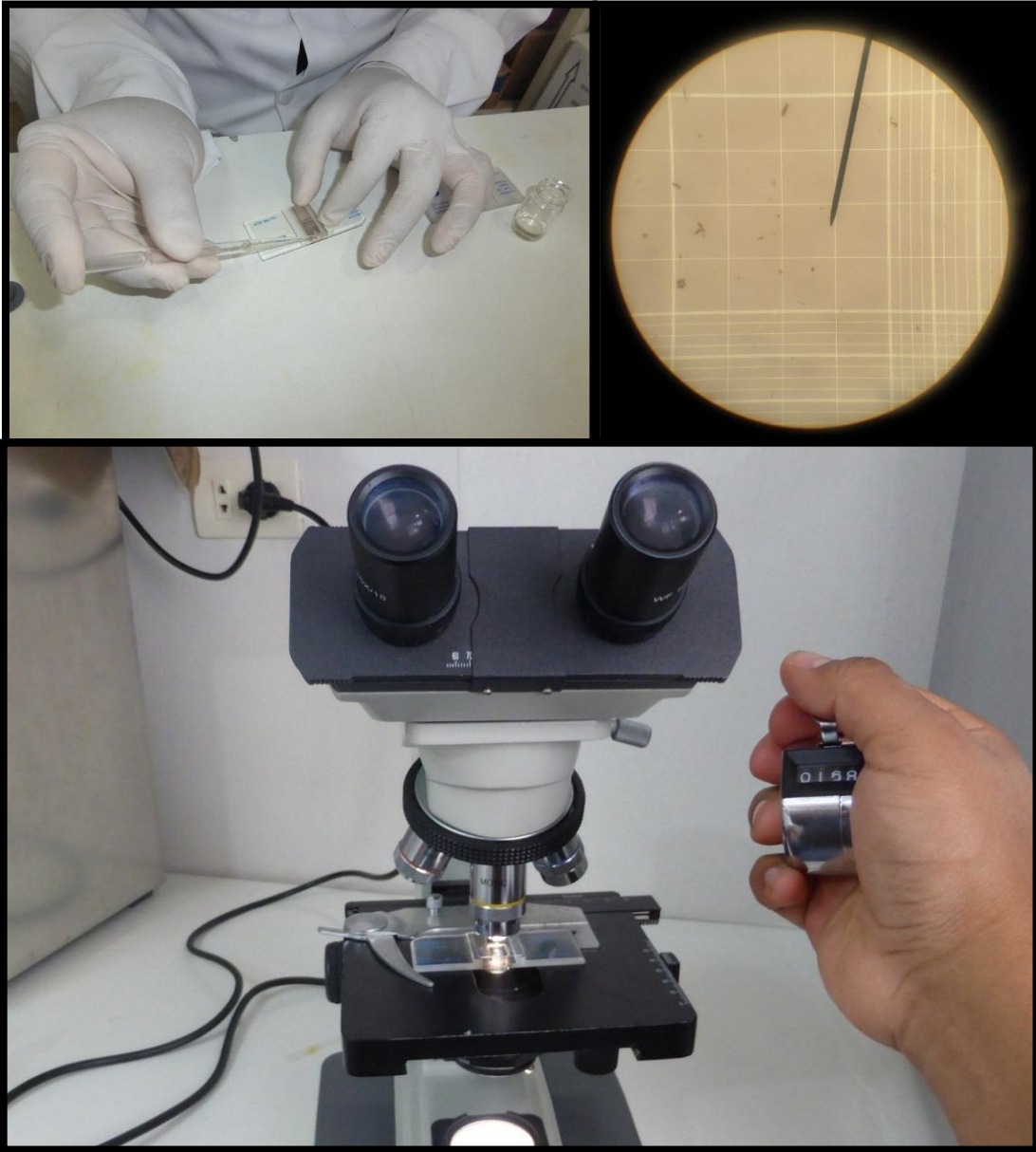
Fuente: Elaboración propia

Anexo 16 Toma de muestra de las unidades experimentales



Fuente: Elaboración propia

Anexo 17 Conteo de células



Fuente: Elaboración propia

Anexo 18 Fichas de registro de crecimiento diatomeas

Ficha de registro: CRECIMIENTO DE *Navicula* sp1.

		Repel	DIA 0	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 6	DIA 7	DIA 8	DIA 9	DIA 10	
QUILLARD	M1	1												
		2												
		3												
		4												
	M2	1												
		2												
		3												
		4												
	M3	1												
		2												
		3												
		4												
FOLIAR	M1	1												
		2												
		3												
		4												
	M2	1												
		2												
		3												
		4												
	M3	1												
		2												
		3												
		4												
HUMUS	M1	1												
		2												
		3												
		4												
	M2	1												
		2												
		3												
		4												
	M3	1												
		2												
		3												
		4												

Fuente: Elaboración propia

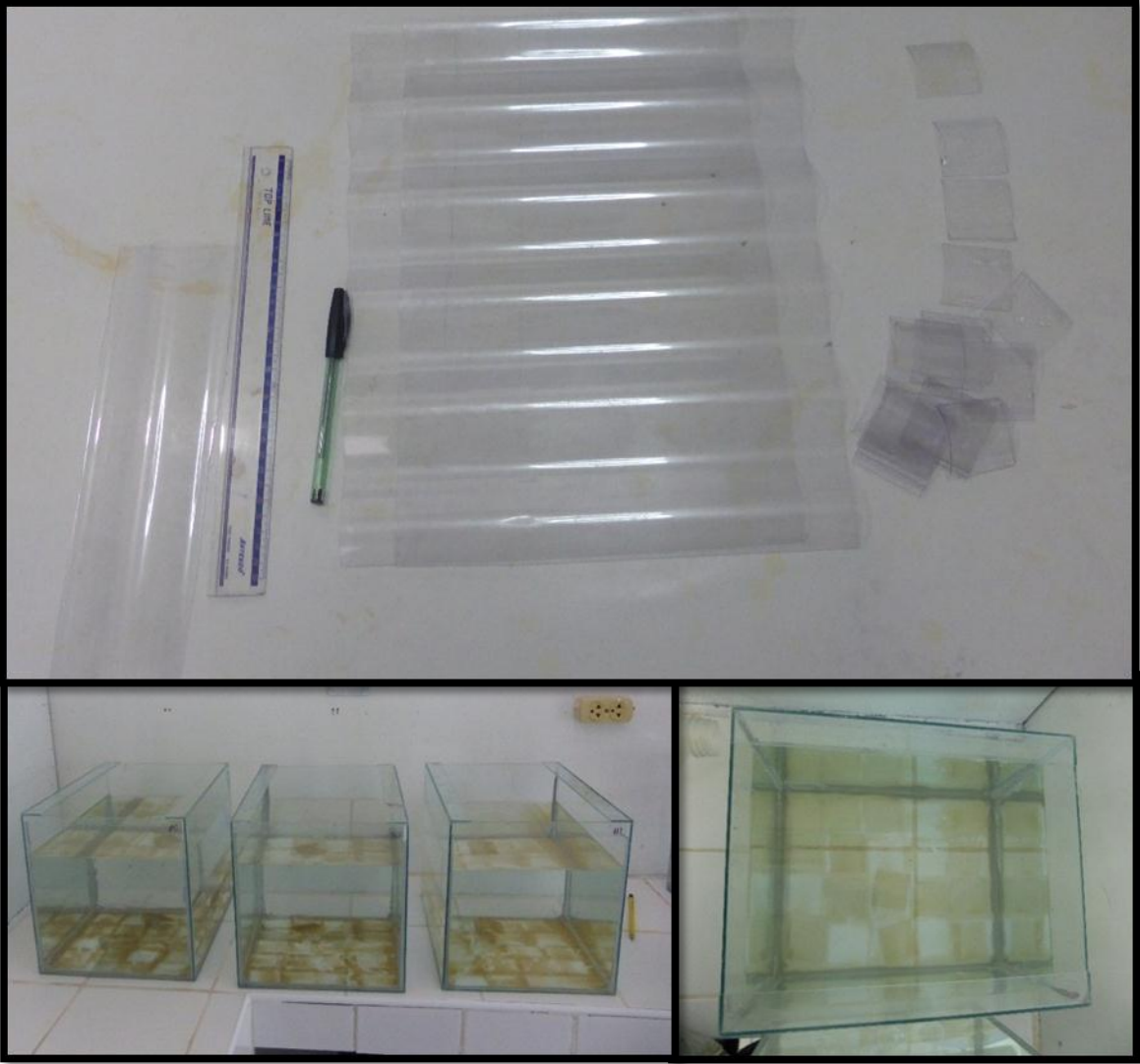
Anexo 19 Ficha de registro de fijación de diatomeas

FICHA DE REGISTRO DE FIJACIÓN

			DIA 0	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 6	DIA 7	DIA 8	DIA 9	DIA 10
GUILLARD F/2	R1	1											
		2											
	R2	1											
		2											
	R3	1											
		2											
	R4	1											
		2											
FOLIAR	R1	1											
		2											
	R2	1											
		2											
	R3	1											
		2											
	R4	1											
		2											
HUMUS	R1	1											
		2											
	R2	1											
		2											
	R3	1											
		2											
	R4	1											
		2											

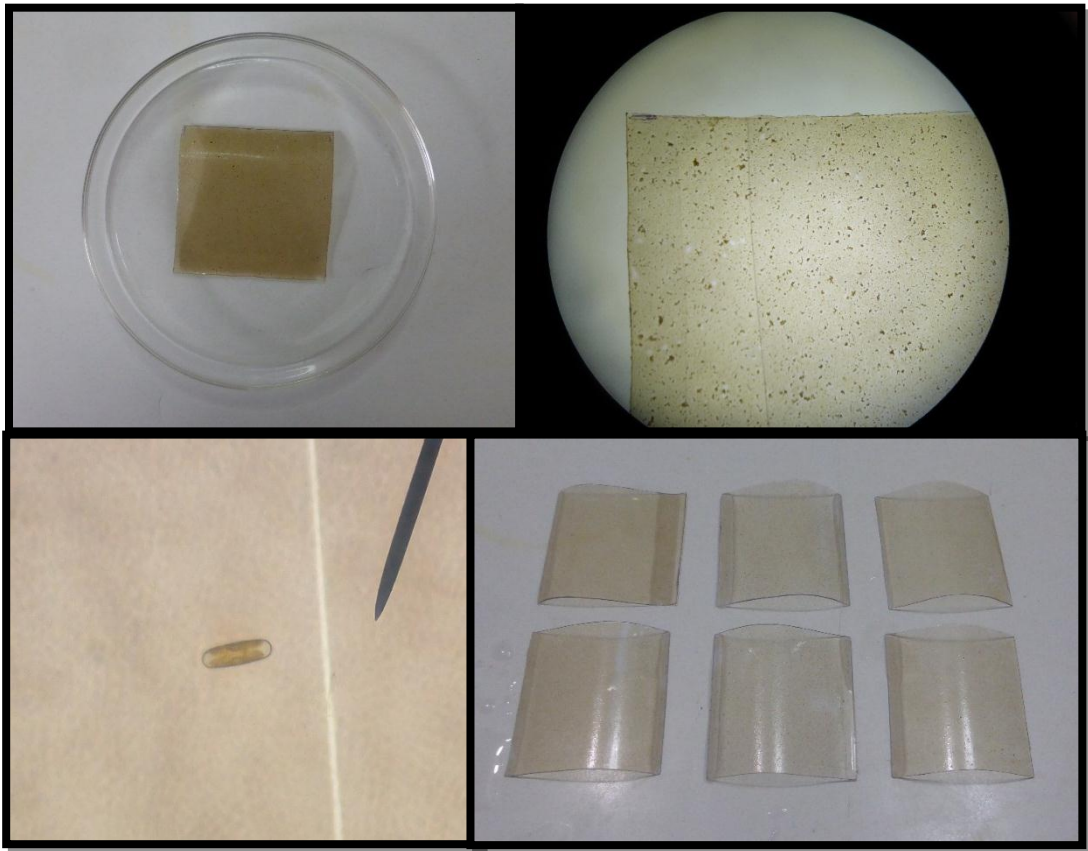
Fuente: Elaboración propia

Anexo 20 Acondicionamiento de acuario y láminas de policarbonato para la fijación de diatomeas



Fuente: Elaboración propia

Anexo 21 Conteo de diatomeas fijadas en láminas de policarbonato



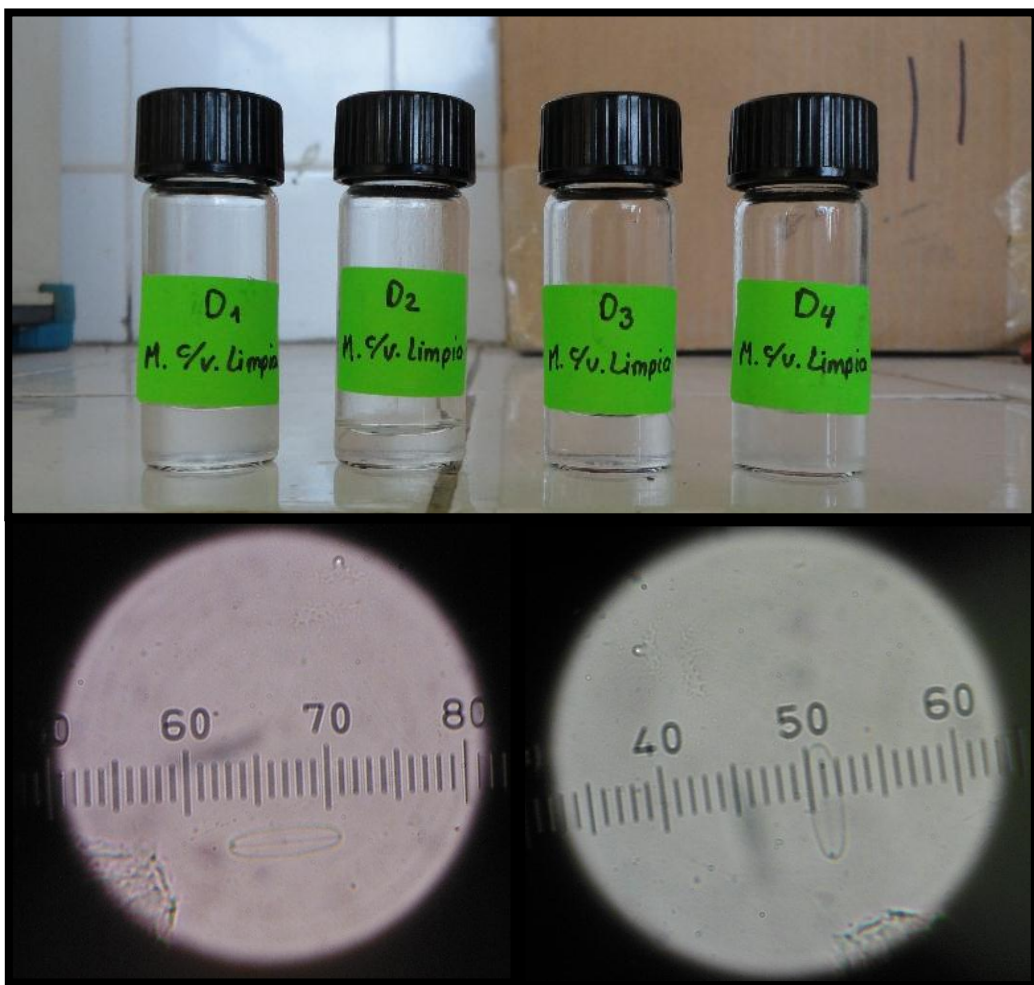
Fuente: Elaboración propia

Anexo 22 Limpieza de diatomeas



Fuente: Elaboración propia

Anexo 23 Diatomeas bentónicas marinas



Fuente: Elaboración propia

Anexo 24 Diatomeas bentónicas marinas para la producción de *Hialotis rufescens* en el Centro de Acuicultura Morro Sama - Fondepes



Fuente: Elaboración propia

Bach. Jordan Ismael Huanacuni Pilco
TESISTA

Mblgo. Luis Lloja Lozano
ASESOR

TACNA, MAYO DEL 2016