

**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AGRARIA LA MOLINA**

**FACULTAD DE PESQUERÍA**



**“USO DE ENSILADO A BASE DE RESIDUOS DE TRUCHA ARCOÍRIS  
(*Oncorhynchus mykiss*) COMO FERTILIZANTE ORGÁNICO PARA  
PRODUCCIÓN DE MICROALGA MARINA *Tetraselmis suecica*”**

Presentado por:

**JAIRO LUIS ZARE VERGARA**

**TESIS PARA OPTAR POR EL TITULO DE  
INGENIERO PESQUERO**

LIMA-PERÚ

2018

**UNIVERSIDAD NACIONAL**

**AGRARIA LA MOLINA**

**FACULTAD DE PESQUERÍA**

**“USO DE ENSILADO A BASE DE RESIDUOS DE TRUCHA ARCOÍRIS  
(*Oncorhynchus mykiss*) COMO FERTILIZANTE ORGÁNICO PARA  
PRODUCCIÓN DE MICROALGA MARINA *Tetraselmis suecica*”**

TESIS PARA OPTAR POR EL TITULO DE INGENIERO PESQUERO

Presentado por:  
JAIRO LUIS ZARE VERGARA

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado

---

Dra. Patricia Liliana Gil Kodaka

**Presidente**

---

Blgo. Juan Gabriel Juscamaita Morales

**Miembro**

---

Dr. Wilfredo Lorenzo Vásquez Quispesivana

**Miembro**

---

Mg. Sc. Jessie Marina Vargas Cárdenas

**Asesora**

LIMA – PERÚ

2018

**Para *Lennon Zare Vergara* (1997-2014)**

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres Liliana Vergara y Manuel Zare, mis hermanos Israel y Renato; y mi sobrino Benjamín, que estuvieron apoyándome desde el inicio de la carrera. Fueron tiempos de mucho trabajo donde sin ustedes no podría haberlo hecho; gracias por todo su amor y sabiduría.

A mis abuelas Isabel y Zarela; no hay más grande honor que ser su nieto. Las amo y aprecio.

A Gabriela, por darme todos los días un empuje, soportando mis malos ratos, aconsejándome y dándome tu amor en cada paso del camino. Ahora tenemos que seguir adelante. Espero poder apoyarte de la misma forma en cada paso que des.

A toda mi familia en general que me motivaban a seguir adelante.

A mi asesora Ing. Jessie Vargas, por toda su enseñanza, paciencia y apoyo en la realización de la tesis. Sus conocimientos estarán presentes a lo largo de toda mi vida profesional.

A mi Facultad de Pesquería y Promoción 2009 II; compañeros que dejaron una huella en mi corazón.

A todos los que de una forma u otra estuvieron conmigo, dándose una vuelta por el laboratorio o llamándome. Daniel Salazar, Liz Aguilar; Katherine Seminario, Ricardo Aguilar, Frida Callupe, Mauricio Cuadra, Daniela Ramirez, Emi Ramos y Cynthia Guerrero.

A Roxana Pillaca, sobrina, estuviste en cada paso, ayudándome, aconsejándome y divirtiéndonos en el camino. Espero que cumplas todas tus metas.

# ÍNDICE GENERAL

RESUMEN

ABSTRACT

I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA .....	3
2.1 CARACTERÍSTICAS Y DESCRIPCIÓN DE LA MICROALGA	
<i>Tetraselmis suecica</i> .....	3
2.2 FASES DEL CRECIMIENTO DE LAS MICROALGAS.....	4
a. Fase lag o adaptación .....	4
b. Fase log o exponencial.....	5
c. Fase de retardo o declinación relativa de crecimiento .....	5
d. Fase estacionaria.....	6
e. Fase de muerte .....	6
2.3 MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD CELULAR .....	7
2.4 CRECIMIENTO POBLACIONAL DE LA MICROALGA.....	8
2.5 REQUERIMIENTOS FÍSICOS Y QUÍMICOS DE LAS MICROALGAS .....	9
a. Luz .....	9
b. Temperatura.....	10
c. Salinidad .....	11
d. Nitrógeno .....	12
e. Fósforo .....	13
2.6 INDICADORES DE CONTAMINACIÓN BIOLÓGICA .....	13
a. Protozoarios .....	14
b. Bacterias .....	14
c. Virus.....	15
2.7 MEDIOS DE CULTIVO.....	15
2.7.1 Medios orgánicos.....	15
a. Ensilado a base de residuos de trucha (FBRT).....	16
2.7.2 Medios inorgánicos.....	18
a. Medio Yashima .....	18

b. Fertilizante agrícola BAYFOLAN® FORTE .....	19
III. MATERIALES Y METODOS.....	21
3.1 LUGAR Y PERIODO DE EJECUCIÓN .....	21
3.2 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS.....	21
3.2.1 Material biológico.....	21
3.2.2 Preparación de agua de mar .....	20
3.2.3 Cultivo de microalga.....	21
3.2.4 Evaluación de la microalga.....	22
3.3 PERIODO PRE-EXPERIMENTAL .....	23
3.3.1 Acondicionamiento y esterilización de materiales .....	23
3.3.2 Preparación de agua de mezcla.....	23
3.3.3 Obtención y mantenimiento de cepa.....	23
3.3.4 Obtención y preparación de los medios de cultivo .....	24
3.3.5 Instalación de los cultivos experimentales.....	25
3.4 PERIODO EXPERIMENTAL .....	25
3.4.1 Manejo y control del experimento .....	25
a. Control de parámetros ambientales .....	25
b. Determinación del crecimiento celular .....	25
c. Determinación del crecimiento de protozoarios.....	26
3.4.2 Determinación de la concentración óptima del fertilizante a base de residuos de trucha (FBRT) para el cultivo de microalga <i>T. suecica</i> .....	26
3.4.3Comparación del crecimiento de la microalga <i>T. suecica</i> utilizando el fertilizante a base de residuos de trucha (FBRT) frente al medio comercial(BAYFOLAN) y un medio inorgánico (Yashima).....	27
3.4.4Determinación de contaminación por protozoarios en el cultivo de la microalga <i>T. suecica</i> utilizando el fertilizante a base de residuos de trucha (FBRT) frente al medio comercial (BAYFOLAN) y un medio inorgánico (Yashima).....	28
3.4.5Análisis estadístico .....	28
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30

4.1 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DEL FERTILIZANTE ELABORADO A BASE DE ENSILADO DE RESIDUOS DE TRUCHA (FBRT) PARA EL CULTIVO DE MICROALGA <i>T. suecica</i> .....	30
4.1.1 Primera etapa experimental para la determinación de concentración del FBRT .....	30
4.1.2 Segundo etapa experimental para la determinación de concentración óptima del FBRT .....	35
4.2 COMPARACIÓN DEL CRECIMIENTO DE LA MICROALGA <i>T. suecica</i> UTILIZANDO TRES FERTILIZANTES DIFERENTES COMO MEDIO DE CULTIVO: EL FERTILIZANTE ELABORADO A BASE DE ENSILADO DE RESIDUOS DE TRUCHA (FBRT), UN MEDIO AGRÍCOLA (BAYFOLAN) Y UN MEDIO INORGANICO (YASHIMA).....	39
4.3 DETERMINACIÓN DE CONTAMINACIÓN POR PROTOZOARIOS UTILIZANDO TRES FERTILIZANTES DIFERENTES COMO MEDIO DE CULTIVO PARA EL CRECIMIENTO DE LA MICROALGA <i>T. suecica</i> .....	44
V. CONCLUSIONES .....	52
VI. RECOMENDACIONES .....	53
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	54
VIII. ANEXOS .....	66

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1; Requerimientos físico-químicos de las microalgas .....	9
Tabla 2; Análisis físico-químicos del ensilado de vísceras de trucha.....	17
Tabla 3; Análisis microbiológico del ensilado de vísceras de trucha .....	17
Tabla 4; Composición química del medio de Yashima .....	18
Tabla 5; Composición química del fertilizante líquido agrícola BAYFOLAN® FORTE .....	19
Tabla 6; Valores promedios del crecimiento celular de la microalga <i>T. suecica</i> (10 <sup>4</sup> cel/ml) en la primera etapa experimental con diferentes concentraciones de FBRT .....	31
Tabla 7; Valores promedios del crecimiento de la microalga <i>T. suecica</i> (10 <sup>4</sup> cel/ml) en la segunda etapa experimental para la determinación de concentración óptima del FBRT .....	37
Tabla 8; Valores promedios del crecimiento de la microalga <i>T. suecica</i> (10 <sup>4</sup> cel/ml) con los diferentes tratamientos utilizados como medio de cultivo (BAYFOLAN®, Yashima y FBRT) .....	41
Tabla 9; Valores promedios del crecimiento de protozoarios (10 <sup>4</sup> cel/ml) en los cultivos de <i>T. suecica</i> con diferentes medios (BAYFOLAN, Yashima y FBRT).....	45

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1; La microalga <i>Tetraselmis suecica</i> (a) y en división celular (b) .....	3
Figura 2; Curva representativa de crecimiento de un cultivo estático de microalgas.....	7
Figura 3: Cuadrícula de Hematocitómetro. A-Reglilla de Fuchs-Rosenthal B-Reglilla de Neubauer .....	7
Figura 4; Diferencia de coloración en los cultivos de la microalga <i>T. suecica</i> en la primera etapa experimental en la determinación de concentración del FBRT .....	30
Figura 5; Curva de crecimiento de la microalga <i>T. suecica</i> ( $10^4$ cel/ml) en la primera etapa experimental para la determinación de concentración del FBRT .....	33
Figura 6; Ecuación linealizada de la tasa de crecimiento en la primera etapa experimental para la determinación de concentración del FBRT .....	34
Figura 7; Diferencia de coloración en los cultivos de la microalga <i>T. suecica</i> en la segunda etapa experimental en la determinación de concentración óptima del FBRT .....	35
Figura 8; Curva de crecimiento de la microalga <i>T. suecica</i> ( $10^4$ cel/ml) en la segunda etapa experimental para la determinación de concentración óptima del FBRT .....	38
Figura 9; Ecuación linealizada de las tasas de crecimiento en la segunda etapa experimental para la determinación de concentración óptima del FBRT.....	38
Figura 10; Diferencia de coloración en los cultivos de la microalga <i>T. suecica</i> utilizando diferentes medios de cultivo (BAYFOLAN® FORTE, Yashima y FBRT).....	40
Figura 11; Curva de crecimiento celular de la microalga <i>T. suecica</i> ( $10^4$ cel/ml) con los diferentes tratamientos utilizados como medio de cultivo (BAYFOLAN® FORTE, Yashima y FBRT) .....	42
Figura 12; Ecuación linealizada de la tasa de crecimiento de la microalga <i>T. suecica</i> ( $10^4$ cel/ml) con los diferentes tratamientos utilizados como medio de cultivo (BAYFOLAN®FORTE, Yashima y FBRT).....	43
Figura 13; Diferencia de coloración en los cultivo de la Microalga <i>T. suecica</i> en la determinación de contaminación por protozoarios .....	44
Figura 14; Curva de crecimiento de protozoarios en los cultivos de <i>T. suecica</i>	

utilizando diferentes medios de cultivo .....	46
Figura 15; Comparación entre el crecimiento de la microalga <i>T. suecica</i> versus el crecimiento de protozoarios ( $10^4$ cel/ml).....	47
Figura 16; Protozario observado en los diferentes cultivos de <i>T. suecica</i> .....	49

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1; Instalación de las cepas de <i>Tetraselmis suecica</i> .....	62
Anexo 2; Siembra de la microalga en agar en tubo inclinado .....	67
Anexo 3, Cuadro de temperatura (°C) tomadas en la mañana y tarde para cada uno de los experimentos realizados .....	69
Anexo 4; Conteo de número de células utilizando el hematocitómetro con reglillas de Neubauer.....	69
Anexo 5; Análisis estadístico: diseño completamente al azar (D.C.A) de los tres experimentos realizados.....	70
Anexo 6; Equipo utilizados en el experimento.....	75
Anexo 7; Comparación entre la densidad celular de <i>T. suecica</i> y la densidad de protozoarios .....	78

## RESUMEN

La necesidad de obtener niveles masivos de microalgas conlleva a la búsqueda de nuevos medios de cultivo que aminoren su costo de producción. La presente investigación tuvo como objetivo evaluar un fertilizante orgánico elaborado a base de ensilado de residuos de trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* (FBRT) como medio de cultivo para el crecimiento de la microalga *Tetraselmis suecica*. El experimento se llevó a cabo en el área de Alimento Vivo del laboratorio de Acuicultura, de la Facultad de Pesquería de la Universidad Nacional Agraria la Molina. Todos los ensayos se realizaron a una salinidad de 30UPS, Temperatura de  $21\pm 2$  °C e intensidad luminosa de 3Klux. Inicialmente, a partir de varias concentraciones del fertilizante (0.5, 1, 2, 3, 4, 5 y 10 ml de fertilizante/L de agua marina), se determinó que la concentración óptima de FBRT para el crecimiento de la microalga era la de  $3\text{ml}_{\text{FBRT}}/\text{L}_{\text{Agua marina}}$  (3:1000) y en concentraciones mayores a 5ml ocasionaba mortalidad. Esta concentración fue comparada contra un fertilizante comercial (BAYFOLAN®FORTE) y un fertilizante inorgánico (medio Yashima). Fueron realizados en triplicado en recipientes de 300ml. Se evaluaron la densidad celular ( $\text{cel ml}^{-1}$ ) y contaminación por protozoarios. Al finalizar el experimento la mayor densidad celular se obtuvo con el fertilizante FBRT con una concentración de  $142.816 \times 10^4 \text{cel ml}^{-1}$ , seguido por el medio Yashima con  $65.95 \times 10^4 \text{cel ml}^{-1}$ ; siendo la concentración más baja la obtenida con el fertilizante BAYFOLAN®FORTE ( $35.63 \times 10^4 \text{cel ml}^{-1}$ ). Respecto a la contaminación por protozoarios, el medio FBRT obtuvo la mayor concentración de protozoarios sin afectar el crecimiento de la microalgas. Se concluye que el fertilizante FBRT puede ser utilizado como medio de cultivo para la microalga *Tetraselmis suecica*. Se recomienda evaluar su uso para cultivos masivos.

Palabras Clave:

Fertilizante, microalgas, *Oncorhynchus mykiss* (trucha arco iris), *Tetraselmis suecica*

## SUMMARY

The need to obtain massive cultures of microalgae on a cheaper way, leads to search for new culture media that should reduce their cost of production. In this way, the goal of this research was to evaluate an organic fertilizer made from the silage of by products of trout *Oncorhynchus mykiss* (FBRT) as a culture medium for growing the microalga *Tetraselmis suecica*. The present research was carried out in the area of Live Food in the Aquaculture laboratory, of the School of Fisheries of the National Agrarian University la Molina. All tests were performed at a salinity of 30UPS, temperature  $21 \pm 2^\circ\text{C}$  and 3Klux of luminosity. Initially, from several media concentration (0.5, 1, 2, 3, 4, 5 y 10 ml of fertilizer/L sea water ) it was determined that 3ml FBRT / L sea water (3: 1000) was the optimum concentration of FBRT for microalgae growth and higher concentrations than 5ml caused microalgae mortality. Concentration of 3ml was compared with a commercial fertilizer (BAYFOLAN®FORTE) and an inorganic fertilizer (Yashima medium), each made in triplicate in 300ml vessels. Cell density ( $\text{cel ml}^{-1}$ ) and protozoa contamination were evaluated. At the end of the experiment, the highest growth was obtained with FBRT fertilizer reaching  $142,816 \times 10^4 \text{cel ml}^{-1}$ , followed by the Yashima medium with  $65.95 \times 10^4 \text{cel ml}^{-1}$ ; and the less growth obtained with the BAYFOLAN®FORTE fertilizer ( $35.63 \times 10^4 \text{cel ml}^{-1}$ ). Regarding protozoa contamination, the culture FBRT medium obtained the highest concentrations of protozoa without affecting the growth of the microalgae. It was concluded that the FBRT fertilizer can be used as a culture medium for growth the microalga *Tetraselmis suecica*. It is recommended to evaluate its use for massive crops.

Keywords: Fertilizer, microalgae , *Oncorhynchus mykiss* (rainbow trout), *Tetraselmis suecica*

## I. INTRODUCCIÓN

El cultivo de microalgas tiene importancia a nivel mundial, debido a sus múltiples utilidades. Estas sirven principalmente como fuente de alimento larval para las diversas especies en la maricultura, utilidad en cosméticos y a nivel nutracéutico; además en los últimos años se están implementando en técnicas para el tratamiento de aguas residuales y como alternativa para el desarrollo de nuevos biocombustibles (biogás y biodiesel).

La microalga *Tetraselmis suecica* es muy utilizada en los diversos campos mencionados. Según Helm *et al.* (2006), es necesario su uso para el crecimiento óptimo de las grandes densidades de larvas y juveniles que se cultivan. Por otro lado debido a su alta tolerancia a las concentraciones de CO<sub>2</sub> se utilizan en el tratamiento en aguas residuales (Forero, 2007; Candela, 2016), y en la elaboración de biodiesel, por contar con una importante producción de lípidos (Bondioli *et al.*, 2012).

Las necesidades de obtener niveles masivos de microalgas, llevan a utilizar fertilizantes agrícolas o medios elaborados en laboratorio, como son el medio A-M (Alfonso y Martinez, 1988), Walne (Walne, 1970) o Guillard f (Guillard, 1975) (Piña *et al.*, 2007). De los primeros mencionados; Soeder (1980) nos dice, que estos no cuentan con nutrientes suficientes; además que desafortunadamente, su disponibilidad continua es a menudo cuestionable, y la contaminación bacteriana puede ser significativa. Por lo tanto, gran parte de la producción masiva de algas marinas reportada hasta ahora se refiere al uso de fuentes limpias de nutrientes, sin tener en cuenta el costo. Además, los medios son a menudo preparaciones de laboratorio (Laing y Helm, 1981; Guillard, 1975; WaIne, 1966). Se ha intentado el uso de fertilizantes agrícolas en la producción de algas marinas pero en pequeña escala (De Pauw *et al.*, 1983; Loosanoff y Engle, 1942). En la actualidad se trata de buscar alternativas económicas pero a la vez efectivas para abaratar sus costos en la producción. Siendo la especie con potencial para la producción de fertilizante, la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), por ser la especie

más cultivada en el Perú, reportando una producción de 30 939 toneladas (PRODUCE, 2016). Además su cultivo genera gran cantidad de subproductos entre vísceras, cabeza, piel, cola y espinazo; que los criadores optan por enterrarlos o devolverlos a los criaderos (*Radio Onda Azul*, 2016). Se sabe además que la eficiencia cárnica es del 50% aproximadamente, dejando un alto porcentaje de materia con altos niveles de proteínas, ácidos grasos, fósforo, entre otros compuestos que podrían utilizarse como nutrientes orgánicos para las microalgas. Según González y Marín (2005), los residuos del pescado pueden ser aprovechados si reciben un tratamiento para transformarlos en fertilizantes, esto mediante la fermentación ácido- láctica, que permite obtener un producto rico en nutrientes, de fácil elaboración y de bajo costo, con características idóneas para ser utilizado como fertilizante orgánico.

Por lo anteriormente descrito este trabajo tiene como objetivo principal evaluar el uso de ensilado a base de los residuos de la truchicultura como fertilizante orgánico para el crecimiento de la microalga *Tetraselmis suecica*, y como objetivos específicos determinar la concentración óptima del fertilizante, comparar el crecimientos de la microalga utilizando este fertilizante frente a un medio comercial y un medio inorgánico; y finalmente evaluar los niveles de contaminación por protozoarios bajo los diferentes medios de cultivo.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 CARACTERÍSTICAS Y DESCRIPCIÓN DE LA MICROALGA *Tetraselmis suecica*:

*Tetraselmis suecica*, pertenece a la clase *Prasinophyceae*, dentro de la división *Clorophyta*. Es una microalga marina unicelular de color verde, con forma generalmente oval con cuatro flagelos isodinámicos que salen de una invaginación apical que se observa en la porción anterior de la célula y que está ubicada en la misma dirección en la que avanza. Su tamaño celular es de alrededor de 10 micrómetros de diámetro, aunque regularmente, mediante granulometría láser se determinó que mide 8 micrómetros (Morineau *et al.*, 2001). En la figura 1, se observa las características mencionadas de la microalga *T. suecica*.



**Figura 1: La microalga *Tetraselmis suecica* (a) y en división celular (b) Fuente: Phyco Key, s.f**

Es un alga eurihalina que crece a temperaturas entre 18 y 30 °C, pH entre 7.5 y 8.0 y salinidades de 25 a 40 e iluminación constante con fotoperiodo natural. Esta especie ha sido empleada regularmente como alimento para moluscos bivalvos (larvas, semillas y adultos), así como en los estadios larvarios de peces y crustáceos. *Tetraselmis sp.* muestra un alto potencial como probiótico (Irianto y Austin, 2002), y por su alto contenido de vitamina E, ha sido propuesta como fuente de vitaminas para consumo humano y

animal (Carballo-Cárdenas *et al.*, 2003).

El género *Tetraselmis*, corresponde a microalgas marinas unicelulares móviles y con color verde, debido a la presencia de clorofila  $\alpha$  y  $\beta$ , está considerado como el flagelado marino más fácil de cultivar a gran escala y se utiliza como alimento para larvas de moluscos y crustáceos, con un valor nutritivo considerable (Morineau *et al.*, 2001).

## **2.2 FASES DEL CRECIMIENTO DE LAS MICROALGAS:**

Independientemente de la especie y el volumen al que es cultivada en la microalga se reconoce un patrón estándar de crecimiento indicado por las siguientes fases.

### **a. Fase lag o adaptación:**

Fase en donde no ocurre incremento en el número de células, pudiendo incluso llegar a disminuir en número con respecto al inóculo inicial (Romo, 2002; Fogg y Thake, 1987). La tasa de crecimiento específica está en el nivel sub-máximo. Este retraso en el crecimiento podría deberse a la presencia de células o esporas no viables en el inóculo, aunque también podría ser un período de ajuste fisiológico debido a cambios en las condiciones de nutrientes o de cultivo (Lee y Shen, 2004).

El estado fisiológico del inóculo es muy importante, este considera el número de células realmente viables (capaces de reproducirse) aunque no estén en condición de dividirse inmediatamente, muchas enzimas metabólicas llegan a ser inactivas y caen las concentraciones del material celular a niveles muy bajos evitando la división celular. Esto continúa hasta que la progenie de las células capaces de dividirse, alcanzan un número comparable con el inóculo inicial. Es por eso que toma un periodo corto de aclimatación para que las algas puedan acomodarse a su nuevo ambiente acuático antes de retomar el crecimiento. (Rodríguez, 2006; Morales y De Velotti, 1990; Richmond, 1986).

Por ejemplo, se puede observar retraso de crecimiento cuando las células adaptadas a la sombra se exponen a una mayor irradiación. La fase de retardo puede ser abolida cuando

las células en una fase de crecimiento exponencial posterior se usan como inóculo. (Lee y Shen, 2004).

**b. Fase log o exponencial:**

Las células se han ajustado al nuevo entorno y comienzan a crecer y multiplicarse (acelerando la fase de crecimiento), y finalmente entran en la fase de crecimiento exponencial (o logarítmico). Las células crecen y se dividen como una función exponencial del tiempo, siempre que los sustratos minerales y la energía de la luz esté saturada (Lee y Shen, 2004).

Es una fase ideal para la utilización e inoculación, pues es característica de cultivos en buenas condiciones de producción, es recomendado y puede substancialmente acortar el tiempo requerido para el escalamiento. Esta fase puede presentarse del segundo al tercer día después de inoculado el medio y prolongarse hasta cuatro días (Rodríguez, 2006; Coll, 1991; Morales y De Velotti, 1990).

**c. Fase de retardo o declinación relativa de crecimiento:**

Conforme el cultivo va creciendo ocurre una baja de nutrientes, cambios de pH y alteración de otros factores como consecuencia del incremento de la población, de ahí que las microalgas disminuyan su tasa de división celular (Romo, 2002; Fogg, 1987).

Al final de esta fase la densidad del cultivo alcanza su valor máximo. Esto es consecuencia de la disminución de nutrientes, aumento de la concentración de metabolitos y reducción de la actividad fotosintética por incremento de la densidad poblacional, la cual disminuye la luz disponible por unidad de célula. Asimismo es en esta fase donde las microalgas presentan su mayor valor nutritivo y mayor densidad poblacional, óptimo estado fisiológico y preferido para alimentar a invertebrados o larvas de organismos acuáticos que se encuentren bajo cultivo. Cuando se está en un cultivo *Batch*, las células son cosechadas durante esta fase. (Chinchayan 1996; Hoff y Snell, 1993).

**d. Fase estacionaria:**

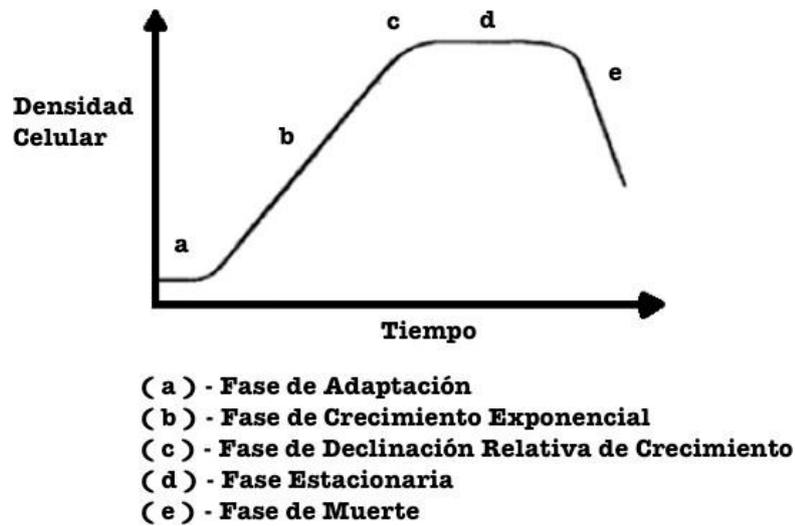
Ya no se aprecia una división celular neta, esto es que el número de células alcanzado se mantiene constante por cierto periodo de tiempo debido al balance entre natalidad y mortalidad que presenta la población en el cultivo. Puede durar semanas o meses en esta fase (Romo, 2002; Fogg y Thake, 1987).

El medio de cultivo se encuentra prácticamente agotado, sus nutrientes son consumidos sin reemplazo, es decir hay una limitación de nutrientes y un incremento del pH (8-9), además de una disminución del CO<sub>2</sub> que captan por fotosíntesis. Se acumula una serie de sustancias tóxicas como el NH<sub>3</sub>, además no pueden captar los fosfatos (por el pH elevado) y limita el fósforo como nutriente, y como presenta mayor densidad les llega menos luz, las divisiones celulares son esporádicas, entonces las densidades celulares permanecen relativamente constantes por un período de tiempo, es decir no hay un incremento neto de la población debido a los cambios fisicoquímicos ambientales y la tasa de crecimiento se compensa con la tasa de mortalidad celular (Richmond, 1986).

**e. Fase de muerte:**

Decae la población celular (Romo, 2002; Fogg y Thake, 1987). La calidad de agua se deteriora, el agotamiento de los nutrientes, la deficiencia de O<sub>2</sub> y la alteración en el pH, devienen en el envejecimiento de las células y los pigmentos fotosintéticos, que conllevan a la muerte de células, donde la densidad celular empieza a decrecer rápidamente. Una vez se da el cambio de color en el cultivo, su recuperación es virtualmente imposible. Las células algales de la población que declina también tiene poco valor nutricional para el zooplancton. Aquí la tasa de mortalidad supera la tasa de crecimiento (Chinchayán 1996; Hoff y Snell, 1993; Richmond, 1986).

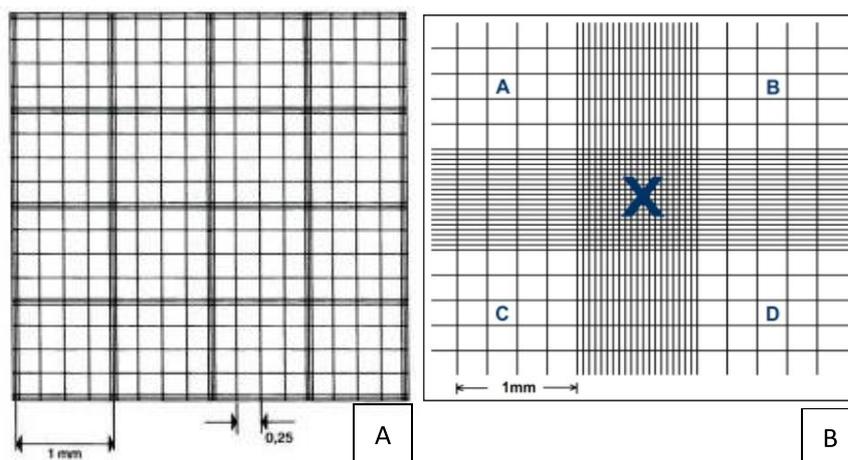
En la figura 2, podemos ver la curva de crecimiento que cumplen las microalga.



**Figura 2:** Curva representativa de crecimiento de un cultivo estático de microalgas. Modificado de Fogg y Thake, 1987.

### 2.3 MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD CELULAR:

El método que se usa con mayor frecuencia para cultivos de microalgas es el del hematocitómetro de 0.1mm de profundidad con reglilla de Neubauer (figura3, B). Para microalgas de mayores dimensiones, como muchos dinoflagelados, se utilizan más comúnmente la cámara de: Sedgwick-Rafter o el hematocitómetro de 0.2 mm de profundidad con reglilla de Fuchs-Rosenthal (figura 3, A).



**Figura 3:** Cuadrícula de Hematocitómetro. A- Reglilla de Fuchs-Rosenthal. B- Reglilla de Neubauer (Arredondo, 2007).

En la mayoría de los laboratorios, la cámara de recuento que se utiliza es el hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad con reglilla de Neubauer, la cual consta de 9 cuadrados con lados de 1 mm (área total de recuento = 0.9 mm<sup>2</sup>), cada uno de los cuales corresponde a un volumen de 0.1 µL. Los cuatro extremos están subdivididos en 16 cuadros pequeños. El cuadro central contiene 25 cuadros, cada uno con un área de 0.04 mm<sup>2</sup> (0.2 mm x 0.2 mm), a su vez divididos en 16 cuadros más pequeños. Para células más grandes de 6 µm y con cultivos relativamente poco concentrados, se aconseja que el recuento se haga en los cuatro cuadros marcados como A, B, C y D, aunque en varios laboratorios se prefiere contar por lo menos un cuadro adicional, seleccionado cada vez al azar. Cuando las células son pequeñas y la concentración de los cultivos es muy alta, es preferible utilizar cinco cuadros menores del cuadro central marcado con X (Arredondo, 2007).

#### **2.4 CRECIMIENTO POBLACIONAL DE LA MICROALGA:**

El crecimiento de las microalgas responde a la interacción de factores biológicos, físicos y químicos; como todo organismo viviente. Para determinar su crecimiento, se utiliza la siguiente ecuación:

$$N_{(t)} = N_{(0)} \times e^{r \cdot t}$$

Dónde:

\*N<sub>(t)</sub> = Número de células en el tiempo “t”

\*N<sub>(0)</sub> = Número de células iniciales

\*r = Tasa específica de crecimiento (días<sup>-1</sup>)

\*t = Tiempo (días)

La ecuación linealizada es:

$$\ln N_{(t)} = \ln N_{(0)} + r \cdot t$$

(Sparre, 1997)

## 2.5 REQUERIMIENTOS FÍSICOS Y QUÍMICOS DE LAS MICROALGAS:

En la tabla 1, se exponen los requerimientos principales de los cultivos de microalgas y sus valores aproximados. En cada caso habrá que estudiar los requerimientos particulares de la especie y de la variedad que se vaya a cultivar en las condiciones concretas de cultivo que se van a utilizar, por lo que estos datos son sólo orientación (Torrentera y Tacon, 1989; Kinne, 1979).

**Tabla 1; Requerimientos físico-químicos de las microalgas. (Torrentera y Tacon, 1989; Kinne, 1979)**

	Requerimientos	Compuestos Químicos	Valores
Físicos	Luz		2000-4000 lux
	Temperatura		15-22 °C
	Salinidad		0.37‰
	pH		7 a 9
Nutritivos	C	CO <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1g/100ml
	O, H	O <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	1g/100ml
	N	N <sub>2</sub> NH <sub>4</sub> +NO <sub>3</sub>	1g/100ml
	P	PO <sub>4</sub>	1g/100ml
	S	SO <sub>4</sub>	1g/100ml
	Na, K, Ca, Mg	Sales	1g/100ml
	Fe, Zn, Mn, B, Br, Si	Sales	1mg/100ml
	Cu, Co, Cl, I, Sr, Rb, Al,etc.	Sales	1µg/100ml
	Vitaminas	B <sub>12</sub> , tiamina, biotina	1µg/100ml

De los requerimientos principales de los cultivos de microalgas, los más importantes a mencionar son:

### a. Luz:

Los efectos de la luz sobre la composición bioquímica de las algas fotosintéticas se controlan en gran medida mediante el proceso denominado foto aclimatación o foto adaptación. En este proceso, las células de algas experimentan cambios dinámicos en la composición celular, junto con la alteración de las propiedades ultra estructurales, biofísicos y fisiológicos para poder aumentar la fotosíntesis y el crecimiento de las algas (Dubinsky *et al.*, 1995).

En respuesta a la alta intensidad de luz, la clorofila  $\alpha$  y otros pigmentos directamente implicados en la fotosíntesis disminuyen, mientras que los carotenoides secundarios (por ejemplo, zeaxantina, b-caroteno, astaxantina), que sirven como agentes fotoprotectores, aumentan. Los carotenoides; tienen como papel evitar que el exceso de energía lumínica llegue a la maquinaria fotosintética. La acumulación de carotenoides puede, en general, ser el resultado de la alternancia de flujos de carbono y nitrógeno dentro de las células bajo condiciones estresantes (Hu, 2004).

Entre las microalgas, las algas verdes tienen una menor afinidad por la luz blanca en comparación con otros grupos de microalgas, la constante de saturación de luz, disminuyen en el orden de clorofitas > diatomeas > dinoflagelados (Richardson *et al.*, 1983). Esto puede explicar la observación de que las diatomeas y los dinoflagelados son las especies predominantes en el agua de mar templada y tropical, respectivamente (Lee y Shen, 2004).

#### **b. Temperatura:**

El efecto de la temperatura sobre las reacciones bioquímicas lo convierte en uno de los factores ambientales más importantes que influyen en la composición bioquímica de las algas. Tjahjono *et al.* (1994), informaron que la formación de astaxantina en las células de *Haematococcus* aumentó tres veces cuando la temperatura de crecimiento aumentó de 20°C a 30°C. Liu y Lee (2000) confirmaron el mismo fenómeno con el alga verde *Chlorococcum sp.* El contenido total de carotenoides casi se duplicó (de 4: 4 mg a 8: 4 mg peso seco) cuando la temperatura de crecimiento aumentó de 20°C a 35°C. La temperatura también ejerce un efecto sobre la composición de carotenoides. Se obtuvo un aumento de tres veces en el contenido de astaxantina a expensas principalmente de b-caroteno y cantaxantina a 35°C a diferencia del obtenido a 25°C de cultivos de *Chlorococcum sp.* Se sugirió que las temperaturas más altas pueden inducir la formación de radicales de oxígeno activo en las células de algas, lo que resulta en carotenogénesis inducida por estrés oxidativo (Tjahjono *et al.*, 1994) y/o potenciar la reacción enzimática dependiente de la temperatura involucrada en carotenogénesis (Liu y Lee, 2000).

La temperatura influye en el crecimiento celular, en el patrón de cuotas celulares de carbono y nitrógeno, así como en el volumen celular, que se puede describir mejor como

una respuesta en forma de “U”. Una temperatura óptima para el crecimiento puede dar como resultado células de algas con un tamaño celular mínimo, contenido celular bajo en carbono y nitrógeno, mientras que una temperatura inferior o superior al nivel óptimo puede conducir a aumentos en el volumen celular y contenido bioquímico alto (Harris, 1988; Rhee, 1982; Goldman y Mann, 1980). En otras palabras, requiere más carbono y nutrientes para producir una célula a la misma tasa de crecimiento a una temperatura no óptima (Darley, 1982).

### **c. Salinidad:**

El aumento de la salinidad puede dar como resultado un contenido de lípidos totales ligeramente aumentado de las algas, como se observó en los cultivos de *Monodus subterraneus* (Iwamoto y Sato, 1986) y *Dunaliella spp.* (Borowitzka y Borowitzka, 1988).

La fotosíntesis de las algas es inhibida por el estrés osmótico (Endo *et al.*, 1995; Gilmour *et al.*, 1984; Kirst, 1989; Vonshak y Richmond, 1981). Tal disminución en la fotosíntesis puede estar asociada con la inhibición del PSII (fotosistema II) (Endo *et al.*, 1995; Gilmour *et al.*, 1984). Como en el caso de la *Dunaliella tertiolecta*, donde el estrés osmótico inhibió el transporte de electrones no cíclico y estimuló el transporte cíclico de electrones y la emisión de fluorescencia derivada de PS I, lo que sugiere que la inhibición de la actividad de PS II resulta de la regulación negativa dependiente del  $\Delta pH$  y la transición del PS II (Gilmour *et al.*, 1984). La microalga *Spirulina platensis* al ser sometido a alta salinidad (Lueta., 1999); causo que la microalga verde-azul pasara a un estado de fotoinhibición, respuesta inducida por el estrés de la salinidad.

En muchos de los sistemas de algas estudiados, se observa una disminución de la productividad una vez adaptada a una salinidad excesiva y claramente asociada con una disminución en su capacidad fotosintética (Baker, 1991). Jeanjean *et al.* (1993) informaron que no se observaron cambios significativos en la actividad del transporte de electrones PS II en *Synechocystis sp.* (PCC 6803) adaptada a 0,55 M de NaCl. Sin embargo, en las células adaptadas a un nivel más alto de salinidad (0,684 M), la actividad de la PS II disminuyó. Por lo tanto, parece que un aumento en la actividad de

PS I en células adaptadas a la sal puede proteger a la PS II de la energía de excitación excesiva bajo estrés salino. Por otro lado, los aumentos en la actividad de PS I y en la tasa respiratoria de células adaptadas a la sal pueden proporcionar más energía para la síntesis de osmolitos (afectan a la osmosis) orgánicos y para la extrusión de Na<sup>+</sup> en las células para mantener el equilibrio osmótico (Vonshak, et al.2004).

Fabregas *et al.* (1984) menciona que la salinidad es más importante para la tasa de crecimiento de *Tetraselmis suecica* cuando se relacionó con la concentración de nutrientes en el medio de cultivo. Las condiciones óptimas de crecimiento fueron entre 25 y 35 ‰ de salinidad y concentraciones de nutrientes de 2, 4 y 8 mM de NaNO<sub>3</sub>, resultando en 0.55 duplicaciones/día y una densidad celular máxima de 1.3×10<sup>6</sup> células/ml. Las variaciones en la salinidad y en la concentración de nutrientes tuvieron un efecto mayor en la biomasa final que en la velocidad de crecimiento. La proteína total del cultivo y la proteína por célula aumentaron cuando la salinidad aumentó para una concentración de nutrientes dada. La proteína total de los cultivos disminuyó cuando la concentración de nutrientes aumentó para una salinidad dada. La proteína por célula disminuyó al aumentar la salinidad hasta 20 ‰, pero desde este punto del proceso se revirtió.

#### **d. Nitrógeno:**

El nitrógeno, que generalmente representa alrededor del 7-10% del peso seco celular, es un constituyente esencial de todas las proteínas estructurales y funcionales en las células de algas. En general, las microalgas tienen una capacidad limitada para producir materiales de almacenamiento de nitrógeno cuando crecen en condiciones de suficiente nitrógeno. Las excepciones son la cianoficina (Simon, 1971) y la ficocianina (Boussiba y Richmond, 1980), que se encuentran compuestos de almacenamiento de nitrógeno en muchas cianobacterias. Cuando las microalgas crecen en condiciones de nitrógeno limitado, el efecto más llamativo es la degradación activa y específica de los ficobilisomas (Collier y Grossman, 1992). Hasta que el nitrógeno celular caiga por debajo de un valor umbral, la fotosíntesis aún continúa, aunque a un ritmo reducido. El flujo de carbono, fijado en la fotosíntesis, en estas circunstancias se desvía del camino de la síntesis de proteínas a la que conduce a la síntesis de lípidos o carbohidratos

Dentro de un solo género de *Chlorella*, por ejemplo, se descubrió que algunas cepas acumulan grandes cantidades de almidón, bajo la inanición de nitrógeno, mientras que otras acumulan lípidos neutros (Richmond, 1986).

La acumulación de carotenoides secundarios es otra característica principal de muchas algas cuando crecen en condiciones de nitrógeno limitado, que a menudo acompañado por una disminución en el contenido de clorofila de las células (Hu, 2004).

#### **e. Fósforo:**

El fósforo es otro macronutriente importante que desempeña un papel importante en los procesos metabólicos celulares mediante la formación de muchos componentes estructurales y funcionales necesarios para el crecimiento y desarrollo normal de las microalgas. Algunos de los síntomas de depleción de fósforo son similares a los observados en cultivos deficientes en nitrógeno. El contenido de clorofila  $\alpha$ , tiende a disminuir mientras que el contenido de carbohidratos aumenta en células eucariotas y procariotas (Healey, 1982).

El ortofosfato,  $\text{PO}_4^{3-}$ , es la única fuente importante de fósforo inorgánico para las algas, aunque la mayoría obtiene dicho elemento a partir de varios fosfatos orgánicos. Las fosfatasas alcalinas y ácidas limitadas por membrana, hidrolizan estos compuestos para liberar  $\text{PO}_4^{3-}$ , que es utilizada por la célula (Darley, 1987).

### **2.6 INDICADORES DE CONTAMINACIÓN BIOLÓGICA:**

Los tipos más comunes de contaminación biológica presenta excesivos niveles de bacterias, otras microalgas, protozoarios o macroalgas Si un cultivo después de 3 o 7 días cambia de color y eventualmente se aclara la causa más común se debe considerar provocada por protozoarios. Excesivo crecimiento de bacterias se manifiesta como agua turbia bajo crecimiento y colapso del cultivo (Romo, 2002).

### **a. Protozoarios:**

En el caso de los protozoos a pesar de ser unicelulares presentan una gran diversidad de formas y especies, con una estructura celular, a veces, compleja. Siendo las clases ciliados, flagelados y rizópodos las que se pueden encontrar prácticamente en cualquier muestra de agua (De Juan Herrera, *s.f.*).

La falta de pigmentos fotosintéticos en estos, al igual que su clasificación, son las formas más comunes para identificarlas. Se pueden observar en su mayoría al microscopio en 100X, todos los protozoos de vida libre y protozoos parásitos, en fresco, son móviles aunque algunos están unidos a partículas sólidas, se observan en su ambiente natural, los protozoos de vida libre rara vez son coloreados porque pierden su forma, mientras que en muchos protozoos parásitos es indispensable la coloración para su identificación (Rudo, 1969).

Para su observación y clasificación, el protozoario, se divide en tres regiones celulares:

- **Membrana:** Aquí se encuentran los cilios y flagelos. Ambos son proyecciones móviles de las células que facilitan su desplazamiento. La membrana celular separa la célula del exterior, y regula el interior de la célula para su funcionamiento óptimo, manteniendo las condiciones internas constantes y más o menos específicas. Es la encargada de controlar todo aquello que puede entrar o salir de la célula, la respuesta de ésta a los estímulos externos, selecciona el tipo de unión de unas células con otras o con el substrato, y el mantenimiento de la forma celular.
  - **Citoplasma:** Son orgánulos donde se almacenan diversas sustancias de reserva como grasas o glucógeno. Esto sirve para aumentar la flotabilidad.
  - **Núcleo:** Puede ser único o múltiple (Acosta, *et al.*, *s.f.*).

### **b. Bacterias:**

El rol de las bacterias que se asocian a los cultivos masivos de microalgas ha sido estudiado, ya que estos cultivos mixtos microalgas-bacterias son fácilmente ingeridos y digeridos por los organismos, provocando mayores crecimientos e incrementando la sobrevivencia de los organismos cultivables. Experiencias que se realizaron en larvas de bivalvos demostraron que las bacterias participan en procesos de digestión de las

microalgas mediante la producción de enzimas extracelulares como proteasas y lipasas (Prieur et al., 1990).

Por otra parte estudios desarrollados por investigadores japoneses han permitido elucidar que las interacciones bacteria-microalga son altamente específicas. Además de sugerir que diversas bacterias podrían actuar como algicidas o inhibidores del crecimiento microalgal, mediante la excreción de productos extracelulares o contacto directo con las bacterias- microalga. De esta forma, las bacterias serían uno de los agentes controladores de la sucesión y estructuras de las comunidades fitoplanctónicas en los ecosistemas marinos (Riquelme *et al.*, 2003).

### **c. Virus:**

Estos microorganismos son responsables del decaimiento de los "bloom" fitoplanctónico. Bratbak *et al.* (1990) al analizar las fluctuaciones de la abundancia de partículas virales durante un "bloom" de fitoplancton, detectaron un rápido incremento de la abundancia de partículas virales después de la máxima abundancia de bacterias. Ellos sugieren que una proporción de la población bacteriana ha sido lisada por las partículas virales. Este fenómeno ha sido confirmado en condiciones de laboratorio por Suttle *et al.* (1990) y Suttle (1992), quienes al adicionar un virus nativo en cultivos de fitoplancton observaron una significativa reducción de la biomasa fitoplanctónica, siendo atribuida la lisis microalgal a la alta concentración de partículas virales en el agua de mar ( $10^6$ - $10^9$  partículas/ml) (Riquelme *et al.*, 2003).

## **2.7 MEDIOS DE CULTIVO:**

### **2.7.1 Medios orgánicos:**

Se caracteriza por utilizar agua de mar a la que se adiciona fertilizante orgánico como la harina de pescado, soya, lombriz de tierra, gallinaza, entre otros; en distintas proporciones (Chinchayan, 1996; De la Cruz y Millares, 1974).

Recientemente se ha ensayado el uso de sustratos alternativos y no convencionales como residuos pesqueros, gas, aceite y exudados gomosos para el crecimiento y desarrollo de microalgas (Sánchez, 2007; Vera *et al.*, 2006).

Para el uso de los residuos pesqueros se utiliza ensilado biológico de pescado (Fertilizante), el cual consiste en adicionar 5% de cultivo iniciador (bacterias ácido lácticas), 15% de azúcar blanca refinada 0.25% de ácido sórbico y pescado. El pescado fue fileteado, lavado con agua fría estéril, congelado (-20°C por 24h) y triturado en molino de carne con criba de 1.5 mm de diámetro. Todos los ingredientes se mezclaron y se colocaron en un contenedor estéril, llenado hasta topar con la tapa y cerrado herméticamente. Este permaneció en incubación a 30°C durante 72 horas. El producto resultante se guardó en refrigeración hasta su utilización y análisis; características físicas, químico proximal, pH, acidez láctica y de viabilidad de las bacterias ácido lácticas (García, 2010).

Para utilizar el material en microalga esta debe ser transformado en un fertilizante líquido. Su composición de este fertilizante líquido de pescado contiene nutrientes como nitrógeno, fósforo y potasio, en proporción 3:3:3, así como muchos minerales. Estos productos también contienen agua, proteínas, grasas y diversos productos bioquímicos de peces. (ORGANIC International Perú S.A.C. ,2016). De acuerdo con varias hojas de datos y seguridad de materiales, los productos de pescado líquido se caracterizan como líquidos marrones gruesos, con un fuerte olor a pescado (USDA, 2006).

Se puede mencionar como un medio orgánico al:

**a. Ensilado a base de residuos de trucha:**

Este ensilado líquido fue elaborado con vísceras de trucha (*Oncorhynchus mykiss*) mediante una hidrólisis enzimática seguido de una fermentación homoláctica. Mostrando mayores niveles en macronutrientes (N, P y K) que un fertilizante de residuos hidrolizados de pescado pero menor cantidad que el fertilizante de pota hidrolizada. (Florez, 2017).

El flujo de proceso para la elaboración del biofertilizante de vísceras de trucha fue: vísceras de trucha - molido - mezclado - hidrólisis enzimática - inactivado - colado – hidrolizado enzimático - mezclado de melaza y Biolac - incubado – colado – envasado (Florez, 2017).

La composición físico química y los análisis microbiológicos del ensilado de residuos de trucha se muestran en las siguientes tablas.

**Tabla 2; Análisis físico-químicos del ensilado de vísceras de trucha. Fuente: Florez, 2017.**

Parámetro	Biofertilizante
pH	4.01
Conductividad eléctrica CE (dS/m)	21.1
Sólidos en suspensión (g/L)	200.47
Materia orgánica en suspensión (g/L)	130.84
Nitrógeno total (mg/L)	12057
Fósforo total (mg/L)	953
Potasio total (mg/L)	4230
Calcio total (mg/L)	663
Magnesio total (mg/L)	550
Sodio total (mg/L)	2817
Hierro (mg/L)	52
Cobre (mg/L)	25.17
Zinc (mg/L)	48.08
Manganeso (mg/L)	1.47
Boro (mg/L)	2.59

**Tabla 3; Análisis microbiológico del ensilado de vísceras de trucha. Fuente: Florez, 2017.**

Análisis Microbiológico	Biofertilizante
Recuento de <i>Lactobacillus sp.</i> (UFC/ml)	$1.5 \times 10^7$
Recuento de mohos y levaduras (UFC/ml)	$5.9 \times 10^3$
Recuento de aerobios mesófilos (UFC/ml)	$5.6 \times 10^6$
Recuento de aerobios termófilos (UFC/ml)	$1.5 \times 10^5$
Enumeración <i>Staphylococcus aureus</i> (NMP/ml)	< 3
Enumeración de coliformes totales (NMP/ml)	< 3
Enumeración de coliformes fecales (NMP/ml)	< 3
Enumeración de <i>Escherichia coli</i> (NMP/ml)	< 3
Enumeración de <i>Pseudomonas sp.</i> (NMP/ml)	< 3
Detección de <i>Salmonella sp.</i> en 25 ml	Ausencia

\*Nota: Los valores < 3 indica ausencia de microorganismos

### **2.7.2 Medios inorgánicos:**

Se caracteriza por utilizar agua de mar a la cual se le adiciona fertilizantes inorgánicos comerciales agrícolas como urea, nitrato de amonio, superfosfato simple, superfosfato triple, sulfato de amonio, entre otros, en diferentes concentraciones (Chinchayán, 1996; Alfonso y Martínez, 1987).

Hay para cultivos masivos como:

#### **a. Medio Yashima:**

Se usan principalmente para cultivos marinos, ya que brinda resultados constantes, en contraste con los resultados tan variables que brinda el uso del agua de mar natural que entre otros factores depende del lugar donde se colecta ésta, y el tiempo de almacenamiento de la misma. Aunque existen algunas especies que no crecen en medios artificiales por factores desconocidos que afectan su crecimiento (Torretera *et al.*, 1989).

Para la elaboración del medio de Yashima se preparó inicialmente el extracto de suelo también llamado solución mineral o micronutrientes. Este consiste en la obtención de los minerales esenciales por medio de la tierra, para ello se recolecto 100gr. de suelo que fue mezclado con 500ml de agua destilada en un matraz. Esta fue autoclavada a 121°C por 20min. Luego se dejó enfriar para ser filtrada con la ayuda de una bomba de vacío y un embudo Kitasato, teniendo sumo cuidado de solo vaciar el agua con minerales (la tierra se asentará en el fondo del matraz). Del extracto de suelo obtenido se mezcló 50ml de este con 1L de agua marina. Luego con ayuda de un agitador magnético se depositó los siguientes insumos en el orden mencionado (no depositar el siguiente hasta que no esté totalmente homogenizado el anterior):

- Sulfato de Amonio
- Urea
- EDTA
- Superfosfato de Potasio

Terminada la mezcla esta es autoclavada y almacenada (Modificado de Torretera y Tacon., 1989).

La tabla 4, muestra los compuestos que lleva la preparación de este medio.

**Tabla 4; Composición química del medio Yashima. Fuente: Torrentera *et al.*, 1989.**

Componentes	Valores
Sulfato de Amonio (para la agricultura 21% de N)	100 g/t
Superfosfato de Potasio (para la agricultura 21%)	15g/t
Urea (para la agricultura 21%)	15g/t
Clewat 32	30 a 50g/t
<u>Componentes de Clewat 32:</u>	
FeCl <sub>2</sub> (como fuente de Fe)	0.39%
ZnCl <sub>2</sub> (como fuente de Zn)	0.17%
MnCl <sub>2</sub> (como fuente de Mn)	0.78%
CoCl <sub>2</sub> (como fuente de Co)	0.02%
CuSO <sub>4</sub> (como fuente de Cu)	0.01%
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> (como fuente de Mo)	0.63%

**b. Fertilizante agrícola BAYFOLAN<sup>®</sup>FORTE:**

Es una fórmula especial concentrada de nutrimentos que contiene vitaminas y fitohormonas, actúa estimulando los procesos metabólicos de las plantas, vigorizándolas al proporcionarles los nutrimentos indispensables para su buen desarrollo, la planta los aprovecha íntegramente y su efecto se manifiesta en cultivos vigorosos y cosechas más abundantes y de calidad.

BAYFOLAN<sup>®</sup>FORTE ayuda a resolver deficiencias de microelementos, frecuentes en zonas con aguas duras. Para optimizar los resultados del producto, aplíquelo cuando los cultivos estén en etapa de desarrollo vegetativo o en producción intensiva (Bayer CropScience, s.f.). En la tabla 5 se muestra la composición nutricional del BAYFOLAN<sup>®</sup>FORTE.

**Tabla 5; Composición química del fertilizante líquido comercial BAYFOLAN® FORTE. Fuente: Bayer CropScience, s.f.**

<b>Compuestos</b>	<b>Porcentaje en Peso/volumen</b>
Nitrógeno total (N)	11.470
Fósforo (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	8.000
Potasio (K <sub>2</sub> O)	6.000
Boro (B)	0.036
Cobre (Cu)	0.040
Hierro (Fe)	0.050
Molibdeno (Mo)	0.005
Zinc (Zn)	0.080
Clorhidrato de tiamina	0.004
Azufre (S)	0.230
Calcio (CaO)	0.025
Cobalto (Co)	0.002
Manganeso (Mn)	0.036
Magnesio (MgO)	0.025
Ácido indolacético	0.003

### **III. MATERIALES Y METODOS**

#### **3.1 LUGAR Y PERIODO DE EJECUCIÓN:**

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de acuicultura, en el área de Alimento Vivo de la Facultad de Pesquería de la Universidad Nacional Agraria la Molina. El periodo experimental tuvo una duración de 45 días (desde el 27 de abril hasta el 10 de junio del 2017).

#### **3.2 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS:**

##### **3.2.1 Material biológico:**

- Se utilizó una cepa de la microalga *Tetraselmis suecica*, que fue donada por el laboratorio Unidad de Investigación en Acuicultura del Instituto del Mar del Perú (IMARPE).

##### **3.2.2 Preparación de agua de mar:**

- Agua de mar (salinidad a 30‰)
- Agua desionizada
- Bomba de vacío de 1/6 HP (Marca GE motors; Anexo 6.a).
- 4 Matraces de 2L de capacidad. (Marca Pyrex®).
- Refractómetro (marca ATAGO; Anexo 6.b).
- Papel filtro de 0,5µm.
- Vaso beaker y probeta de 500ml.
- Embudo Kitasato.

##### **3.2.3 Cultivo de microalga:**

- Matraces de 300ml (10unid.), 1L (10 unid.) y 2L (4 unid.) de capacidad. (Marca Pyrex®).
- Pipetas de capacidad de 1ml, 2ml y 5ml.

- Vasos beakers y probetas de capacidad de 500ml.
- Tubos de ensayo de 10ml.
- Fiola de 1L (2unid).
- Agua de mar y agua destilada.
- Alcohol al 70%.
- Hipoclorito de sodio al 0.2%.
- Termómetro de alcohol escala de 0-50°C ( $\pm 0.1^\circ\text{C}$ ).
- Balanza analítica (Marca Pionner™ – OHAUS; Anexo 6.c).
- Agar (Marca Scharlau AG0020)
- Agitador magnético (Marca CORNING strirrer, Anexo 6.d).
- Medio de Yashima (Modificado de Torrentera *et al.*, 1989).
- Fertilizante agrícola comercial BAYFOLAN® FORTE.
- Fertilizante elaborado a base de ensilado de residuos de trucha (FBRT).
- Autoclave de 50L (Anexo 6.e).
- Mechero Bunsen.
- Blower de 1/3HP (Marca Sweetwater™, Anexo 6.j)
- Manguerillas de plástico 5mm de diámetro.
- Válvulas de aireación.
- Fluorescentes de 40watts.
- Aire acondicionado (Marca ALFANO, Anexo 6.f).

#### **3.2.4 Evaluación de la microalga:**

- Ácido acético al 10%.
- Lugol al 2.2%.
- Cámara de Neubauer (Marca MARIENFELD; Anexo 6.g).
- Microscopio binocular (Marca NIKON ALPHAPHOT-2 YS2; Anexo 6.h)
- Mechero Bunsen.
- Pipetas de capacidad de 1ml.
- Pipeta Pasteur.
- Bomba de succión.
- Fotómetro (Marca EXTECH intruments modelo 401025; Anexo 6.i).

### **3.3 PERIODO PRE-EXPERIMENTAL:**

#### **3.3.1 Acondicionamiento y esterilización de materiales:**

Con ayuda del fotómetro se pudo evaluar la intensidad de luz aportada por los fluorescentes de 40 W (2 tubos de luz blanca). Estos contaban con una luminosidad de 3Klux además de encontrarse en muy buen estado.

Para realizar la desinfección de los materiales plásticos y de vidrio, se utilizó hipoclorito de sodio diluido (lejía) al 0.2% de concentración, luego los materiales plásticos como manguerillas, válvulas de aire, tapas, entre otros fueron secados y almacenados en envases plásticos limpios. Los instrumentos de plásticos y de vidrio que soportan temperaturas elevadas fueron envueltos en papel kraft para llevarlos a la esterilización en autoclave a 120 °C, 15 psi de presión por 20 minutos. Todos los materiales estériles fueron almacenados cuidadosamente para evitar su contaminación.

#### **3.3.2 Preparación de agua de mezcla:**

El agua de mar se obtuvo del laboratorio de Alimento Vivo de la Facultad de Pesquería. Dicha agua se encontraba almacenada a una salinidad de 90‰, la cual fue diluida con agua dulce hasta 30‰. Según Helm *et al.* (2006); menciona en la FAO que las especies de microalgas pertenecientes al grupo de flagelados se cultivan mejor en agua marina con una salinidad de 30‰. La salinidad fue medida con el refractómetro. Luego fue filtrada al vacío con ayuda de una bomba de 0,5 HP y equipo Kitasato con filtros de 0,5µ. El agua fue colocada en matraces de 2L para poder llevarla a su esterilización. Se utilizó una autoclave de 50 litros.

#### **3.3.3 Obtención y mantenimiento de cepa:**

La cepa de microalgas proveniente del IMARPE. Tuvo un volumen de 10 ml de la microalga *Tetraselmis suecica* con una densidad de  $180 \times 10^4$  cel/ml.

Esta cepa fue duplicada en dos tubos a un volumen de 10ml ( $158.3 \times 10^4$  cel/ml). Se utilizó como fertilizante el BAYFOLAN a una concentración de 0.2ml/l de agua marina. Uno de los tubos se utilizó para el plaqueado en agar, con el fin de contar con un respaldo de la microalga. Se realizó en 20 tubos de ensayo de 10ml de volumen; donde

se aplicó la técnica de siembra en agar en tubo inclinado (Santambrosio *et al.*, 2009) (Anexo 2). Con el otro tubo de 10ml se realizó el escalamiento de la microalga utilizando el fertilizante BAYFOLAN (concentración de 0.2ml/L), iniciándose la siembra a una densidad de  $158.3 \times 10^4$  cel/ml, en un volumen de 50ml. Una vez llegado a una densidad celular similar ( $163 \times 10^4$  cel/ml), se traspasó en un matraz de 250 ml, a un volumen de 100 ml, aumentado su volumen luego a 200 ml (cuando su densidad llegó a  $155.6 \times 10^4$  cel/ml) y por último se trasladó en un matraz de 1L, a un volumen de 500 ml, hasta obtener una densidad de  $165 \times 10^4$  cel/ml.

Se utilizaron 300ml de estos últimos para la prueba de determinación de la concentración óptima del medio utilizando como fertilizante el ensilado a base de residuos de trucha (FBRT).

### **3.3.4 Obtención y preparación de los medios de cultivo:**

Se utilizaron 3 medios de cultivo: medio Yashima, FBRT (medio experimental) y por último el fertilizante agrícola BAYFOLAN® FORTE.

El FBRT, fue elaborado en el Laboratorio de Ingeniería de la Facultad de Pesquería y el Laboratorio de Biorremediación de la Facultad de Ciencias, de la Universidad Nacional Agraria La Molina a través de un trabajo de tesis (Florez, 2017).. Este ensilado biológico fue obtenido por el proceso de hidrólisis, que luego es fermentado con bacterias ácido-lácticas y melaza como fuente de carbono. El flujo de proceso (anexo 7) fue el siguiente: recepción de vísceras de trucha - molido - mezclado - hidrólisis enzimática con proteasa a 0,33 % (p/v) y 60 °C - inactivado a 85 °C por 20 minutos - colado - mezclado de 10 % (p/p) melaza, 10 % (p/p) de Biolac y 80 % de hidrolizado - incubado a 40 °C por 5 días - colado - envasado. El contenido de nitrógeno, fósforo y potasio fue de 12057 mg/L, 953 mg/L, 4230 mg/L respectivamente. Mientras el contenido total de aminoácidos y proteína fue de 3,8g / 100g y 6,2g / 100g respectivamente. El biofertilizante no contuvo coliformes totales, coliformes fecales, *E. coli*, *Pseudomonas sp.*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella sp.* El producto final fue embotellado y almacenado en la refrigeradora para ralentizar el proceso bacteriano.

El fertilizante líquido BAYFOLAN® FORTE, es un fertilizante agrícola comercial. Este fue comprado y almacenado en un lugar fresco.

### **3.3.5 Instalación de los cultivos experimentales:**

En todos los casos se procedió con el protocolo descrito en el Manual para el Cultivo de Microalga escrito por Romo (2002). En el anexo 1 se presenta de forma detallada los pasos que se siguió para llevar a cabo los cultivos experimentales.

## **3.4 PERIODO EXPERIMENTAL**

### **3.4.1 Manejo y control del experimento:**

#### **a. Control de parámetros ambientales:**

Los cultivos fueron mantenidos a una temperatura de  $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Se monitorio la temperatura con un termómetro de marcación para asegurar su rango. La iluminación en los estantes se realizó mediante dos fluorescentes de luz blanca de 40watts. Con el fotómetro de marca EXTECH instruments, se tomaron las medidas a diario, las cuales resultaron de 3KLux dentro del área de cultivo.

En todos los experimentos se utilizó agua a una salinidad de 30‰; para su medición en cada caso se utilizó un refractómetro marca ATAGO. Las mediciones se realizaron al momento de preparar el agua de mezcla.

#### **b. Determinación del crecimiento celular:**

Para evaluar la densidad celular, se empleó el método de conteo directo mediante el uso del hemocitómetro con rejillas o cámara de Neubauer y con fondo de espejo. Cada día se realizaban 2 conteos (mañana y tarde). Para llevarlo a cabo se tomó 1ml de muestra de cada unidad experimental. Al poseer la microalga *Tetraselmis suecica* flagelos (células móviles), a las muestras obtenidas se les adiciona tres gotas de ácido acético, esto con la finalidad de fijarla (matar la células). Completada la fijación, con la ayuda de una pipeta Pasteur la muestra se depositaba en el hemocitómetro. Luego se colocaba este al microscopio (aumento de 10X) para realizar el conteo directo. El volumen total de cada cuadrícula principal de la cámara es de  $0,1\text{ mm}^3$ ; por lo que al tener el promedio total esta es multiplicada por  $10^4$  quedando la densidad en células/ml.

### c. Determinación del crecimiento de protozoarios:

El método empleado fue el de conteo directo, como en el caso anterior, se utilizó el hematocitómetro con rejillas de Neubauer. Esta vez se adicionó a la muestra lugol (1 gota), que sirvió para teñir la membrana de estos organismos y así poder visualizarlos al microscopio. Se observó las características físicas del protozoario para tratar de determinar el género de estos. No se propone con esta tesis el identificar de una manera precisa a estos organismos ya que solo es necesario saber el efecto que los medios puedan tener al estar estos contaminados.

### 3.4.2 Determinación de la concentración óptima del fertilizante elaborado a base de ensilado de residuos de trucha (FBRT) para el cultivo de microalga *T. suecica*

El experimento se realizó en 2 etapas, en ambas ocasiones se procedió de la misma forma. Ambas etapas se realizaron a una salinidad de 30‰ en matraces de 300 ml, a un volumen efectivo de 250ml.

Con la finalidad de determinar la mejor concentración de fertilizante se realizó una prueba preliminar. Esta tuvo una duración de 6 días. El inóculo inicial de microalga fue de 30ml ( $32 \times 10^4$  cel/ml) por matraz. La temperatura estuvo entre  $21 \pm 3^\circ\text{C}$  (Anexo 3) y la intensidad luminosa fue de 3Klux. Se evaluaron 5 tratamientos (concentración de fertilizante) y 2 repeticiones por tratamiento:

\* Concentración 1 (C1):  $0.5\text{ml}_{\text{fertilizante}} / L_{\text{agua marina}}$  (0.5:1000).

\* Concentración 2 (C2):  $1\text{ml}_{\text{fertilizante}} / L_{\text{agua marina}}$  (1:1000).

\* Concentración 3 (C3):  $2\text{ml}_{\text{fertilizante}} / L_{\text{agua marina}}$  (2:1000).

\* Concentración 4 (C4):  $5\text{ml}_{\text{fertilizante}} / L_{\text{agua marina}}$  (5:1000).

\* Concentración 5 (C5):  $10\text{ml}_{\text{fertilizante}} / L_{\text{agua marina}}$  (10:1000).

De ser el caso que la concentración de 10:1000 se obtuviera el mejor resultado en la prueba. Se realizarían pruebas posteriores con mayores concentraciones de fertilizante (sea 15:1000 y 20:1000).

Se trabajó con 10 matraces, estos fueron colocados de manera aleatoria, quedando distribuidos en el siguiente orden:

C4R2	C1R2	C4R1	C2R1	C3R2	C5R1	C1R1	C3R1	C5R2	C2R2
------	------	------	------	------	------	------	------	------	------

\*C=Tratamientos \*R=Repeticiones

Con la finalidad de afinar la mejor concentración (mayor densidad celular) de la primera etapa, se utilizó un rango de la mejor respuesta de concentración de FBRT obtenida en esta etapa (en este caso fue 2ml), para poder formular la segunda fase. La duración fue de 5 días. El inóculo inicial fue de 20ml ( $18.5 \times 10^4$  cel/ml) por matraz. La temperatura se mantuvo en un rango de  $21 \pm 2^\circ\text{C}$  (Anexo 3) y la intensidad luminosa fue de 3Klux. El experimento contó con 3 tratamientos y 3 repeticiones:

- \* Concentración 1 (C1): 2ml<sub>fertilizante</sub> / L<sub>agua marina</sub> (2:1000).
- \* Concentración 2 (C2): 3ml<sub>fertilizante</sub> / L<sub>agua marina</sub> (3:1000).
- \* Concentración 3 (C3): 4ml<sub>fertilizante</sub> / L<sub>agua marina</sub> (4:1000).

Dando un total de 9 matraces, estos fueron colocados de manera aleatoria, quedando en el siguiente disposición:

C3R2	C1R3	C2R2	C3R1	C2R3	C1R1	C3R3	C1R2	C2R1
------	------	------	------	------	------	------	------	------

\*C=Tratamientos                      \*R=Repeticiones

### **3.4.3 Comparación del crecimiento de la microalga *T. suecica* utilizando el fertilizante elaborado a base de ensilado de residuos de trucha (FBRT) frente al medio comercial (BAYFOLAN) y un medio inorgánico (Yashima)**

Esta fase experimental tuvo una duración de 7 días y se realizó en erlenmeyer de 1L, con aireación constante e intensidad luminosa de 3Klux. Cada tratamiento se realizó por triplicado. Para ellos se mantuvo los parámetros ambientales (en las mismas condiciones.

Los tratamientos para esta fase fueron:

- \* Tratamiento 1 (T1): 0.2ml<sub>BAYFOLAN</sub> / L<sub>agua marina</sub> (0.2:1000).
- \* Tratamiento 2 (T2): 1ml<sub>Medio Yashima</sub> / L<sub>agua marina</sub> (1:1000).
- \* Tratamiento 3 (T3): 3ml<sub>FBRT</sub> / L<sub>agua marina</sub> (3:1000).

Se sembró un inóculo inicial de 20ml ( $5.3 \times 10^4$  cel/ml) por matraz. Al utilizar una densidad celular mucho menor en esta etapa experimental, lo que se busca es ver como el FBRT puede afectar este en todas las fases de crecimiento de la *T. suecica*.

Las temperaturas durante el experimento estuvieron entre  $21\pm 1^{\circ}\text{C}$  (Anexo 3). Estos fueron colocados de manera aleatoria, quedando en el siguiente orden:

T1R2	T3R1	T2R1	T3R2	T2R3	T1R3	T3R3	T2R2	T1R1
------	------	------	------	------	------	------	------	------

\*T=Tratamientos \*R=Repeticiones

### 3.4.4 Determinación de contaminación por protozoarios en el cultivo de la microalga *T. suecica* utilizando el fertilizante elaborado a base de ensilado de residuos de trucha (FBRT) frente al medio comercial (BAYFOLAN) y un medio inorgánico (Yashima)

El experimento se llevó a cabo durante 6 días, contando con 3 tratamientos y con 3 repeticiones por cada uno de ellos. El inóculo inicial para cada uno fue de 15mL ( $7.2 \times 10^4$  cel/ml) por matraz, se tuvo temperaturas entre  $20\pm 1^{\circ}\text{C}$  (Anexo 3). Se utilizaron matraces de 1L. Para el análisis se tomó una alícuota de 1ml/cultivo los cuales fueron teñidos con lugol y colocados en cámaras de Neubauer para su conteo diario. Los tratamientos fueron:

\* Tratamiento 1 (T1):  $0.2\text{ml}_{\text{BAYFOLAN}} / \text{L}_{\text{agua marina}}$  (1:5000).

\* Tratamiento 2 (T2):  $1\text{ml}_{\text{Medio de Yashima}} / \text{L}_{\text{agua marina}}$  (1:1000).

\* Tratamiento 3 (T3):  $3\text{ml}_{\text{FBRT}} / \text{L}_{\text{agua marina}}$  (3:1000).

Dando un total de 9 matraces, estos fueron colocados de manera aleatoria, quedando en el siguiente orden:

T3R1	T1R3	T2R1	T2R2	T2R3	T3R3	T1R3	T1R2	T3R2
------	------	------	------	------	------	------	------	------

\*T=Tratamientos \*R=Repeticiones

### 3.4.5 Análisis estadístico:

En cada etapa experimental se aplicó un Diseño Completamente al Azar (DCA), iniciando por su verificación de supuestos (normalidad de errores y homogeneidad de varianza (homocedasticidad)). Luego se aplicó un ANVA de una sola vía para determinar si los tratamientos cuentan con diferencias significativas. De ser el caso, se aplicó la prueba LSD de Fisher ( $\alpha=5\%$ ).

En caso hubiese una posible heterogeneidad de varianza durante la verificación de supuestos, se utilizaron modelos lineales generales y mixtos (Di Rienzo *et al.* 2017). Luego se seleccionó el modelo más apropiado utilizando los valores del criterio de Akaike (AIC),

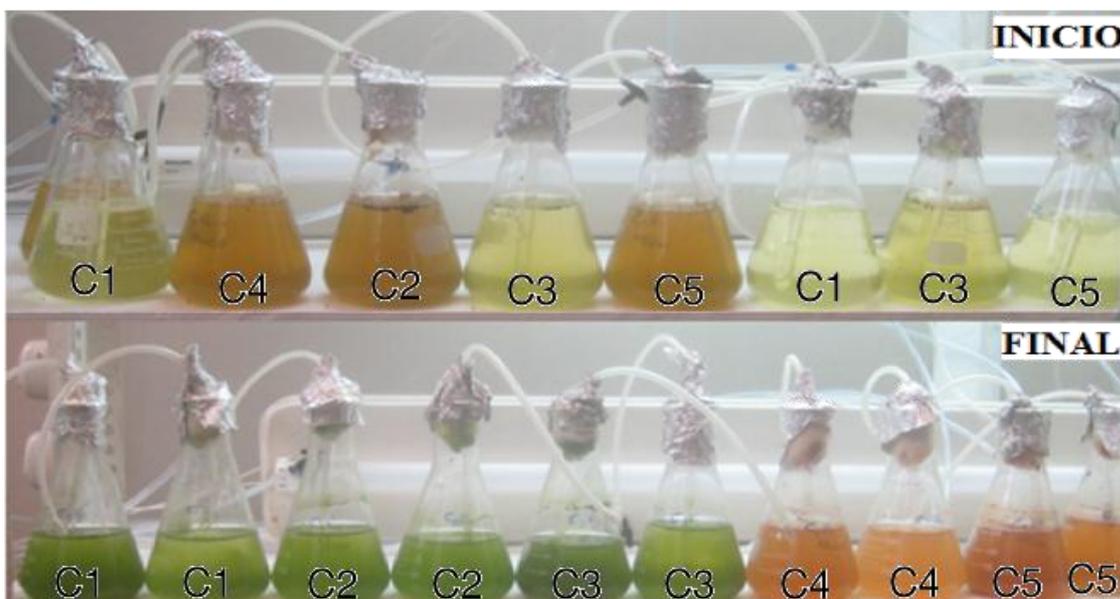
Schwarz (BIC) y la prueba de máxima verosimilitud (LRT) (Shapiro y Francia, 1972). ). Para todas las variables medidas se analizó la normalidad de los errores usando la prueba de Shapiro-Francia (Shapiro & Francia, 1972). Para analizar la homogeneidad de varianzas, se usó un gráfico de dispersión de residuos versus valores predichos, se debió observar una nube de puntos sin patrón alguno (Di Rienzo *et.al*, 2008). De encontrarse diferencias significativas entre los tratamientos, se aplicó la prueba LSD de Fisher ( $\alpha=5\%$ ).

Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa computacional InfoStat (versión 2017).

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DEL FERTILIZANTE ELABORADO A BASE DE ENSILADO DE RESIDUOS DE TRUCHA (FBRT) PARA EL CULTIVO DE MICROALGA *T. suecica*

**4.1.1 Primera etapa experimental para la determinación de concentración del FBRT:** Los cultivos de la microalga *T. suecica* fueron observados durante 6 días, donde se contabilizó la densidad microalgal (cel/ml) y se evaluaron los parámetros de temperatura y luz diariamente. Los matraces los diferentes tratamientos fueron dispuestos al azar en el estante de cultivo, tal como se muestra en la figura 4.



**Figura 4: Diferencia de coloración en los cultivos de la microalga *T. suecica* en la primera etapa experimental en la determinación de la concentración del FBRT.**

Al momento de inocular las diferentes concentraciones de FBRT correspondiente a cada tratamiento, lo primero que se observó fue una coloración marrón claro que se intensificó a medida que se incrementaba la concentración del fertilizante.

Se puede tomar esta ocurrencia como una posible dificultad para la captación de luz de las células algales. Según Dubinsky *et al.* (1995), esto podría ocasionar que las células de las algas experimenten cambios dinámicos en su composición celular, junto con la alteración de las propiedades ultra estructurales, biofísicas y fisiológicas para poder aumentar la fotosíntesis y consecuentemente el crecimiento de las algas.

En el día de la siembra se observó que los inóculos iniciales de microalgas de cada tratamiento tuvieron similares densidades celulares como se aprecia en la tabla 6, contabilizándose  $51.73 \pm 8 \times 10^4$  cel/ml. En el primer día de cultivo, los tratamientos C4 (5:1000) y C5 (10:1000), mostraron una ligera disminución en la densidad celular de 44.8 a  $32.9 \times 10^4$  cel/ml y de 59 a  $57.3 \times 10^4$  cel/ml respectivamente, lo cual no ocurrió con los tratamientos C1, C2 y C3. Esta disminución es aclarada por Romo (2002), que menciona que al encontrarse las células algales aún en la fase de adaptación; en ellas no ocurre incremento en el número de células, pudiendo incluso llegar a disminuir en número con respecto al inóculo inicial, en cambio los tratamientos C1, C2 y C3 lograron aclimatarse e incluso crecer al punto de duplicar su densidad inicial (C2 y C3), dando así inicio a su fase de crecimiento exponencial. Cabe mencionar que las mayores concentraciones de fertilizante en los tratamientos C4 y C5 podrían haber sido una limitante para esta fase adaptativa ya que las altas concentraciones de algunos macronutrientes podría haber causado un estrés al cultivo (Jad-Allah, 2012).

**Tabla 6; Valores promedios del crecimiento celular de la microalga *T. suecica* ( $10^4$  cel/ml) en la primera etapa experimental con diferentes concentraciones del FBRT.**

Tratamiento	C1 (0.5:1000)	C2 (1:1000)	C3 (2:1000)	C4 (5:1000)	C5 (10:1000)
Día					
0	59.236	52.500	42.986	44.875	59.028
1	76.250	111.806	124.722	32.986	57.361
2	92.094	113.403	139.861	0.000	0.000
3	96.866	132.986	146.350	0.000	0.000
4	124.100	174.722	154.889	0.000	0.000
5	136.100	182.550	195.311	0.000	0.000
6	162.981	211.650	272.708	0.000	0.000

Al segundo día de cultivo, se observó en los tratamientos C4 y C5 la muerte total de las células. Lo que da a entender que las altas concentraciones FBRT tuvieron un efecto negativo hacia estas. Un probable factor pudo haber sido la caída de pH en el cultivo, ya que sabemos que el FBRT cuenta con un pH de 4.01 y a concentraciones elevadas esta repercutiría en el medio; Chester (1990), observó en sus cultivos de *Chaetoceros sp.* y *Tetraselmis sp.* que los cambios de volumen o de dilución en los medios, dan como resultado cambios en el pH. Y Moheimani (2012), probó diversos rangos de pH para el crecimiento de *T. suecica*, demostrando que el rango óptimo de este era de un pH de 7.5. Por lo que si los tratamientos con FBRT a mayores concentraciones contenían pH menores a 7.5, esto podría haber causado la muerte de los cultivos. En este experimento no se realizó toma de este parámetro por lo que no se puede asegurar si la muerte se pudo deber a esto.

Por otro lado, similares resultados a los tratamiento C4 y C5 se obtuvieron por Kaippilliparambil y Aikkarakunnath (2016), al utilizar ensilado de pescado en el cultivo de la microalga de agua dulce *Scenedesmus sp.*, sus resultados demostraron que una menor concentración (3% y 6%) del ensilado de pescado fue más adecuado para el cultivo de *Scenedesmus*, y en concentraciones más altas (15% y 18%), ocasionó la muerte total de las mismas. Los autores indican que esta pudo ser debido al aumento de coloración del cultivo el cual restringía la penetración de la luz y por lo tanto, disminuyó la capacidad de fotosíntesis (Hena *et al.*, 2015; Jad-Allah, 2012).

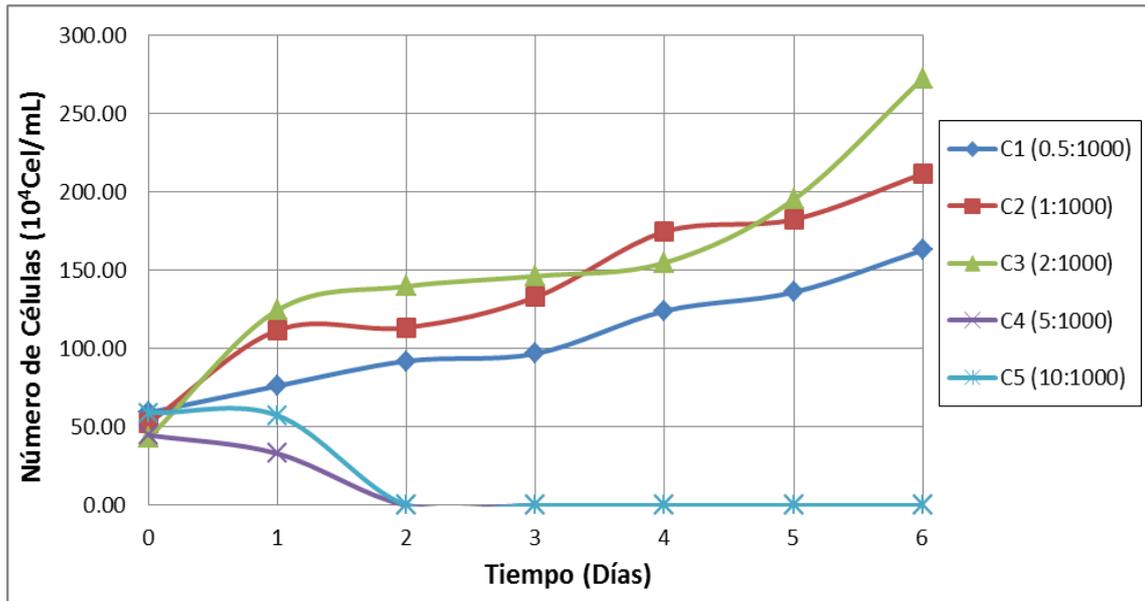
Otras probables causas de la mortalidad en las mayores concentraciones (C4 y C5) pueden ser explicada por el estrés o grado de toxicidad que el medio podría haber causado por el alto contenido de algunos nutrientes. Según Fernández y López (2015); indican que el suplemento de nutrientes debe satisfacer a un determinado consumo de la biomasa. Así, desde el punto de vista de ingeniería tiene sentido estudiar lo que un medio de cultivo debe tomar en cuenta: es decir la composición de la biomasa y su nivel de nutrientes. La biomasa microalgal (y muchas otras biomasas) está conformada principalmente de hidrógeno, oxígeno, carbono y nitrógeno (azufre y fósforo también aparecen en cantidades sustanciales) con muchos otros micronutrientes en pequeñas cantidades. Es así que los micronutrientes deben agregarse con cuidado debido a que

algunos son tóxicos en altas concentraciones, esto sucede por ejemplo con el cobre. Los micronutrientes no deben ser agregados en exceso, de lo mencionado anteriormente se podría aplicar al caso, ya que al no contar con el conocimiento total de los compuestos, sobre todo de elementos traza que contiene el fertilizante, estos podrían estar en concentraciones que ocasionen un desequilibrio o estrés a la microalga.

Aun así los tratamientos C4 y C5 fueron monitoreados hasta el final del experimento. Se pudo observar que la coloración de estos tratamientos se tornó hacia un marrón rojizo en el segundo día y a partir de los días restantes no se observó ninguna microalga u ser viviente (sea microalgas u otro organismo visible para el microscopio).

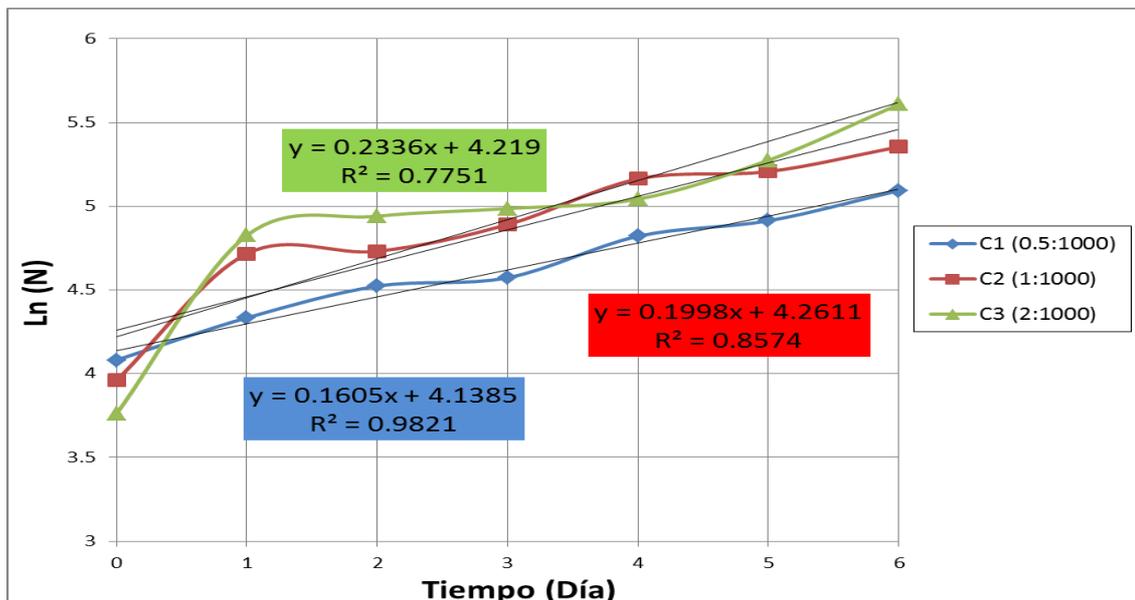
Respecto al tratamiento C1 (0.5:1000), se pudo observar una ligera disminución del crecimiento en comparación a los demás tratamientos. La razón podría ser por un déficit de nutrientes esenciales para su desarrollo (como el fósforo, nitrógeno o elementos minerales traza), ya que al ser la concentración más baja de FBRT todos estos se encontrarán en concentraciones insuficientes. Jad-Allah (2012), en su estudio con *Nannochloropsis sp.*, evaluó diferentes nutrientes (sulfato de amonio, urea, superfosfato de calcio, potasio (K), fósforo (P) y nitrógenos (N)), para enriquecer el medio (obteniendo cinco tratamientos y un control). En los dos mejores tratamientos los componentes del medio fueron los mismos. Estos contenía sulfato de amonio, urea y superfosfato de calcio, sin embargo estuvieron a diferentes concentraciones (tratamiento A 150: 7.5: 25 mg/L y en el tratamiento B 100: 5: 15 mg/L respectivamente). Como resultado se obtuvo que la densidad celular máxima en el primero fue 1.35 veces mayor que en el segundo, concluyendo que el primero contaba con mayor concentración de nutrientes necesarios para la microalga. Resultados parecidos fueron reportados para el cultivo de *Dunaliella sp* (Becerra-Dórame *et al.*, 2010), en el que se determinó una correlación positiva entre la concentración de nutrientes y la densidad celular.

En el caso del tratamiento C3 (2:1000), aquí se obtuvo las mayores densidades de microalgas, llegando a tener en el sexto día  $272.7 \times 10^4$  cel/ml, tal como lo muestra la figura 5.



**Figura 5: Curva de crecimiento de la microalga *T. suecica* (10<sup>4</sup> cel/ml) en la primera etapa experimental para la determinación de concentración del FBRT a partir de cinco concentraciones.**

En la figura 6 se aprecia las ecuaciones linealizadas del crecimiento celular de los tratamientos C1, C2 y C3. No se ha tomado en cuenta las concentraciones C4 y C5, debido a que no se cuenta con datos a partir del segundo día.



**Figura 6: Ecuación linealizada de la tasa de crecimiento en la primera etapa experimental para la determinación de concentración del FBRT, para los tratamiento C1, C2 y C3.**

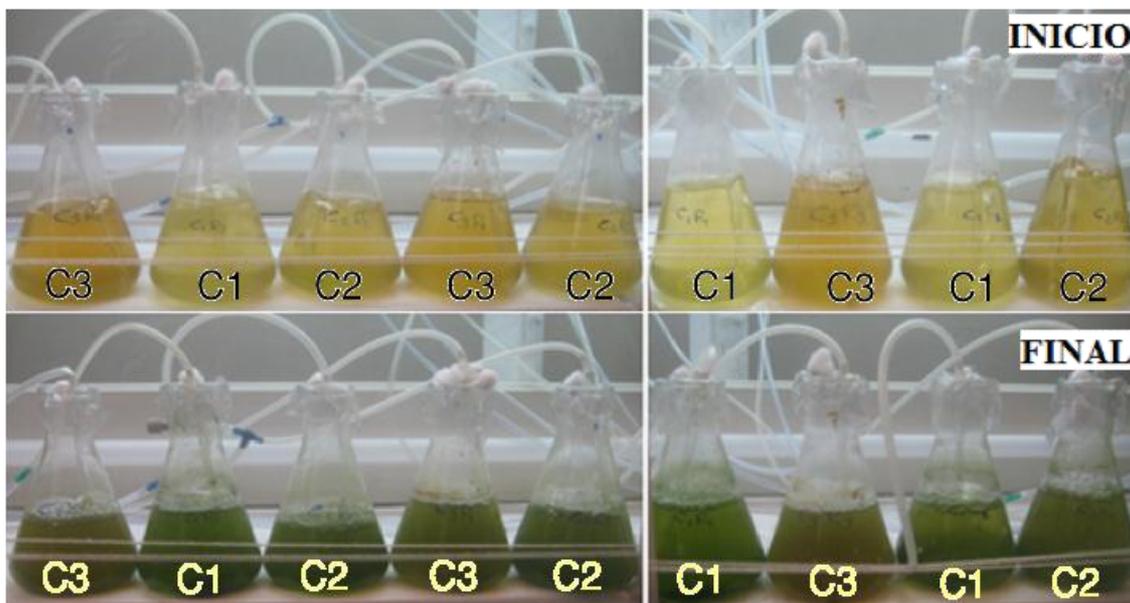
Se observa diferencias en las concentraciones respecto a sus tasas de crecimiento, siendo la concentración C3 (2:1000) la que muestra la tasa de crecimiento más alta (0.2336/día) respecto a las anteriores.

Al aplicar el análisis de variancia (Anexo 5.1.1), este arrojó diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0.05$ ). A través de una prueba de LSD de Fisher ( $\alpha = 0.05$ ), se determinó diferencias significativas entre el tratamiento C1 (con la menor concentración microalgal) y los tratamientos C2 y C3, guardando estos dos últimos relación estadística entre sí, por lo que se podría decir que causan el mismo efecto.

Al respecto se puede observar que aunque los tratamientos C2 y C3 no muestran diferencias estadísticas entre sí, se tiene que numéricamente los valores de densidad celular y crecimiento del tratamiento C3 son mayores y alcanzados en menor de tiempo. Se puede asumir que la concentración de nutrientes en C3 sería la mas adecuada, por lo cual este fue elegido como el mejor.

#### **4.1.2 Segundo etapa experimental para la determinación de concentración óptima del FBRT:**

Determinada la concentración C3 (2:1000) como la mejor concentración, se evaluaron las concentraciones de 2:1000, 3:1000 y 4:1000, con el fin de determinar la concentración óptima del FBRT para el cultivo de la microalga *Tetraselmis suecica*. Se estableció los mismos procedimientos y diseño experimental de la primera etapa. Es decir se distribuyeron los tratamientos por triplicado en el estante en forma aleatoria como se muestra en la figura 7, y se mantuvo los parámetros físicos como la incidencia de luz en todo el experimento en unos 3KLux, y la temperaturas en  $21 \pm 2^\circ\text{C}$  y salinidad de 30‰.



**Figura 7: Diferencia de coloración en los cultivos de la microalga *T. suecica* en la segunda etapa de concentración óptima del FBRT.**

Respecto a la coloración y debido que solo se utilizaron bajas concentraciones del FBRT (a diferencia de la primera fase), la coloración de los medios fue de marrón claro o verde traslúcido. No se observaron en el primer muestreo síntomas de estrés en la microalga; como la falta de movimiento de las células o presencia de aplanospora (pérdida de flagelo).

El crecimiento de todos los tratamientos en el día cero e inicio del día uno, fueron similares tal como se aprecia en la tabla 7. Las células algales entraron a su fase de adaptación; donde mostraron un crecimiento reducido. En el caso del tratamiento C3 (4:1000), la fase de adaptación tuvo un mayor tiempo de adaptación como se puede apreciar en la tabla 8. La densidad celular en este tratamiento fue ascendiendo lentamente hasta inicios del día tres, donde inició su fase logarítmica. Este hecho también fue reportado por Zubaidai (2017), quien cultivó *N. oculata* y *T. suecica*, utilizando agua residual como medio de cultivo y tuvo respuestas similares al experimento realizado. El fertilizante fue agua residual tratada e inoculada a diferentes concentraciones (0%, 25%, 50%, 75% y 100%) observando que los grupos control y el de 25% de agua residual iniciaron su fase logarítmica antes que los otros tratamientos en *T. suecica*. Este autor señaló que cuanto mayor era la concentración de aguas

residuales (fertilizante), mayor era su fase de adaptación. Esto también fue observado en este experimento con los resultados obtenidos en los tratamientos C1 y C2, siendo el primero (2:1000) el que mostró un mayor crecimiento inicial a comparación del C2 (3:1000). Sin embargo a partir del segundo día el C2 muestra el mayor crecimiento. Al respecto Gouveia (2011), explica que el crecimiento de *T. suecica* puede verse altamente afectado por los cambios en el nivel de nutrientes o condiciones de cultivo.

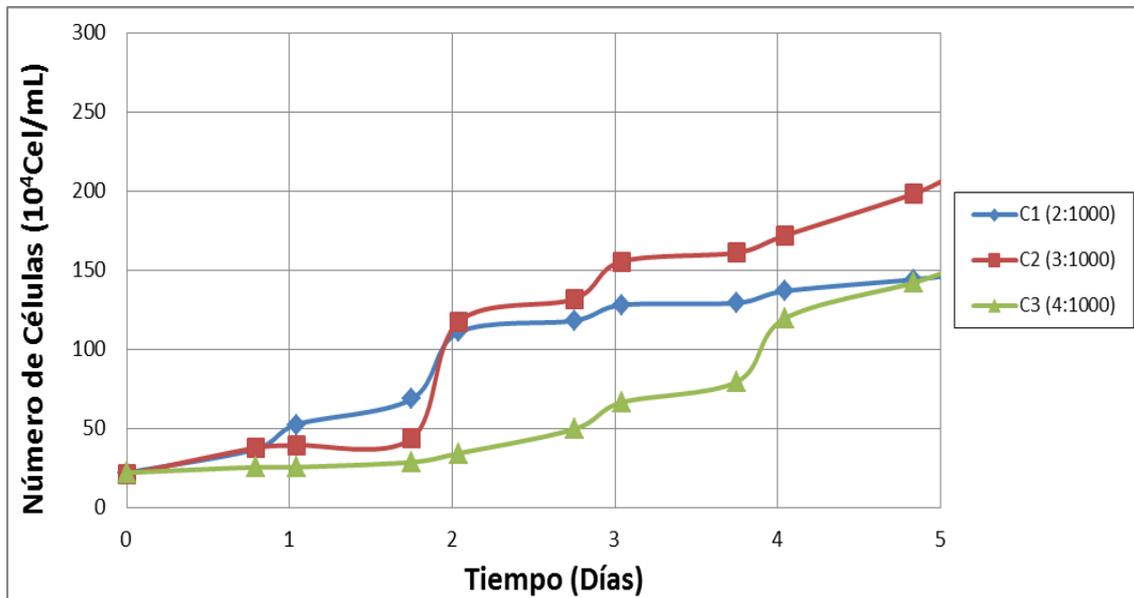
**Tabla 7; Valores promedios del crecimiento de la microalga *T. suecica* ( $10^4$ cel/ml) en la segunda etapa experimental para la determinación de concentración óptima del FBRT.**

<b>Tratamiento</b>	C1 (2:1000)	C2 (3:1000)	C3 (4:1000)
<b>Día</b>			
0.00	21.99	20.93	21.99
0.79	36.85	37.63	25.46
1.04	52.41	39.31	25.51
1.75	68.47	43.52	28.66
2.04	110.79	117.52	34.26
2.75	118.05	131.78	49.54
3.04	127.90	155.42	66.34
3.75	129.25	160.98	79.49
4.04	136.67	171.75	119.35
4.83	143.99	198.14	141.92
5.08	146.97	210.20	150.97

En la figura 8, se aprecia claramente que los tratamientos C1 y C2, empezaron su fase exponencial a partir del día uno, hasta el día tres donde continuaron su fase de retardo, que se prolongó hasta el día cinco que finalizó el experimento, debido a que dos de los tratamientos (C1 y C2) llegaron a su fase estacionaria.

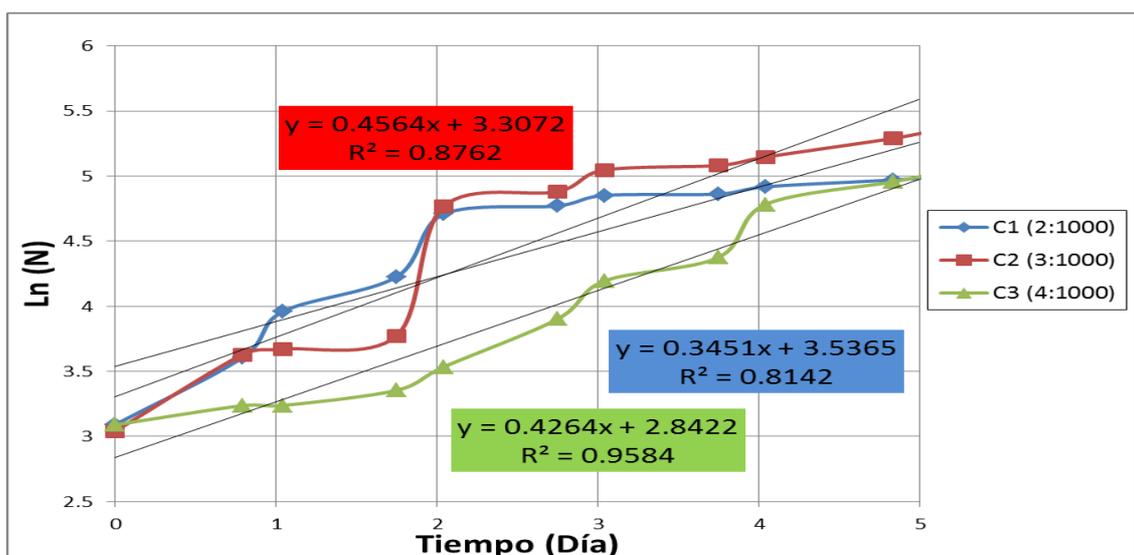
El tratamiento C2 tuvo un crecimiento acelerado al finalizar el día dos, esto pudo deberse a una tardía asimilación de sustratos inorgánicos o a la obtención de energía de la luz. Esta diferencia brusca a mayor densidad causó una diferenciación entre el número poblacional del tratamiento C2 y del C3.

Al final de esta parte experimental se determinó que la concentración C2 (3:1000) fue la que numéricamente obtuvo los mejores resultados, con una densidad final de  $210.20 \times 10^4 \text{ cel/ml}$ .



**Figura 8: Curva de crecimiento de la microalga *T. suecica* ( $10^4 \text{ cel/ml}$ ) en la segunda etapa experimental para la determinación de concentración óptima del FBRT.**

Al transformar los datos de densidad celular a logaritmos naturales, se obtienen las ecuaciones linealizadas de crecimiento celular de cada tratamiento, que se muestran en la figura 9.



**Figura 9: Ecuación linealizada de las tasas de crecimiento en la segunda etapa experimental para la determinación de concentración óptima del FBRT.**

Se observó en la figura que los tratamientos C2 y C3 presentaron similares tasas de crecimiento y mayores al tratamiento C1, encontrándose el mejor resultado en el tratamiento C2 (3:1000) con 0.4564/día.

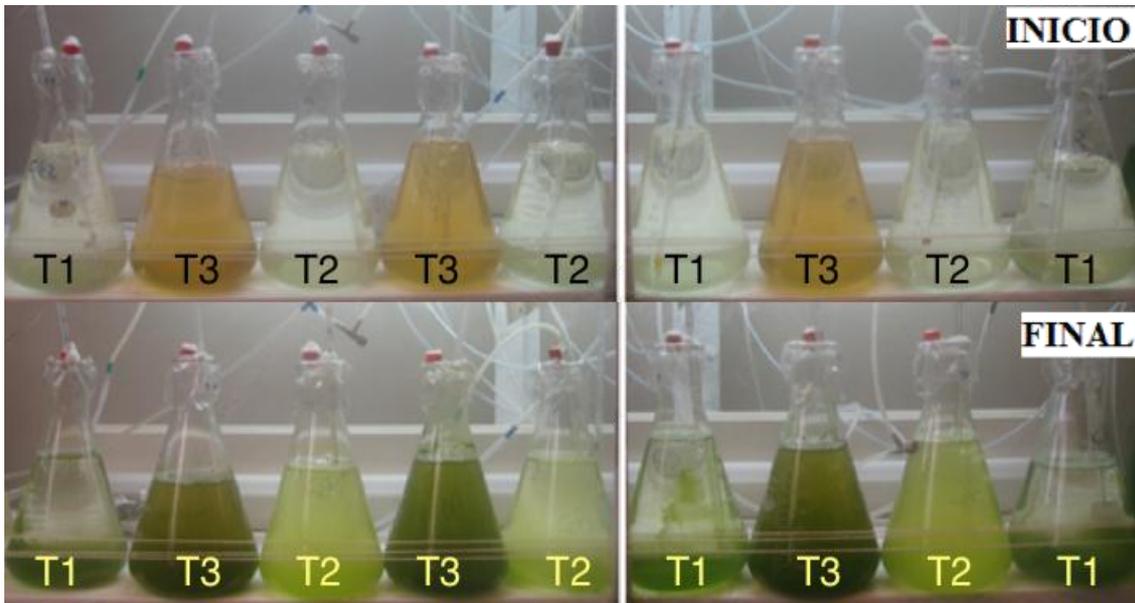
Al aplicar el análisis de varianza (ANVA) (Anexo 5.1.2), se obtuvo diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ), por lo que se realizó una prueba de LSD de Fisher ( $\alpha = 0.05$ ). A través de esta se encontraron diferencias entre los tratamientos C2 y C3; como también se observó que los tratamientos C1 y C2; y los tratamientos C1 y C3 guardaban relación estadística entre sí.

Aunque los tratamientos C1 (2:1000) y C2 (3:1000) no mostraron diferencias significativas, numéricamente las mayores densidades celulares al final del experimento fueron para el tratamiento C2, así también el tratamiento C2 mostró que a menor tiempo creció más rápido que el tratamiento C1. Este tratamiento fue elegido como la concentración óptima de fertilizante (3:1000).

#### **4.1 COMPARACIÓN DEL CRECIMIENTO DE LA MICROALGA *T. suecica* UTILIZANDO TRES FERTILIZANTES DIFERENTES COMO MEDIO DE CULTIVO: EL FERTILIZANTE ELABORADO A BASE DE ENSILADO DE RESIDUOS DE TRUCHA (FBRT), UN MEDIO AGRICOLA COMERCIAL (BAYFOLAN) Y UN MEDIO INORGANICO (YASHIMA)**

Obtenida la concentración optima de FBRT, este fue comparado frente al medio inorgánico Yashima y el fertilizante comercial BAYFOLAN® FORTE, los cuales son utilizados como medios masivos de cultivo para la producción de microalgas. Para ellos se diseñó un experimento de tres tratamientos con tres repeticiones dispuestas al azar en el estante de cultivo, como se muestra en la figura 10, utilizando las concentraciones normales de cada medio. Para el BAYFOLAN se usó 0.2:1000, para el medio Yashima 1:1000 y para el FBRT 3:1000.

La incidencia de luz en todo el experimento fue de unos 3KLux, y se contó con temperatura de  $20\pm 1^{\circ}\text{C}$  y salinidad de 30‰.



**Figura 10: Diferencia de coloración en los cultivos de la microalga *T. suecica* utilizando diferentes medios de cultivo (T1: BAYFOLAN® FORTE, T2: Yashima y T3: FBRT).**

En la figura 10, se observa diferencias marcadas en la coloración entre los diferentes tratamientos. Los tratamientos BAYFOLAN y Yashima presentan una coloración transparente a diferencia del FBRT en el que predomina una coloración marrón claro producto de la coloración del fertilizante. Debido a la disminución del inóculo inicial de la microalga ( $5.35 \times 10^4 \text{ cel/ml}$  frente a utilizada de  $23 \times 10^4 \text{ cel/ml}$  en la fase anterior), no mostró coloración verdosa. Las posibles causas que puedan originar la coloración del medio, se mencionaron en las páginas 32 y 33.

Respecto a las fases del cultivo, en la tabla 8 se tiene que los tres tratamientos tuvieron un comportamiento parecido en el día uno, para posteriormente mostrar diferentes concentraciones en la densidad celular.

**Tabla 8; Valores promedios del crecimiento de la microalga *T. suecica* ( $10^4$ cel/ml) con los diferentes tratamientos utilizados como medio de cultivo (BAYFOLAN®, Yashima y FBRT).**

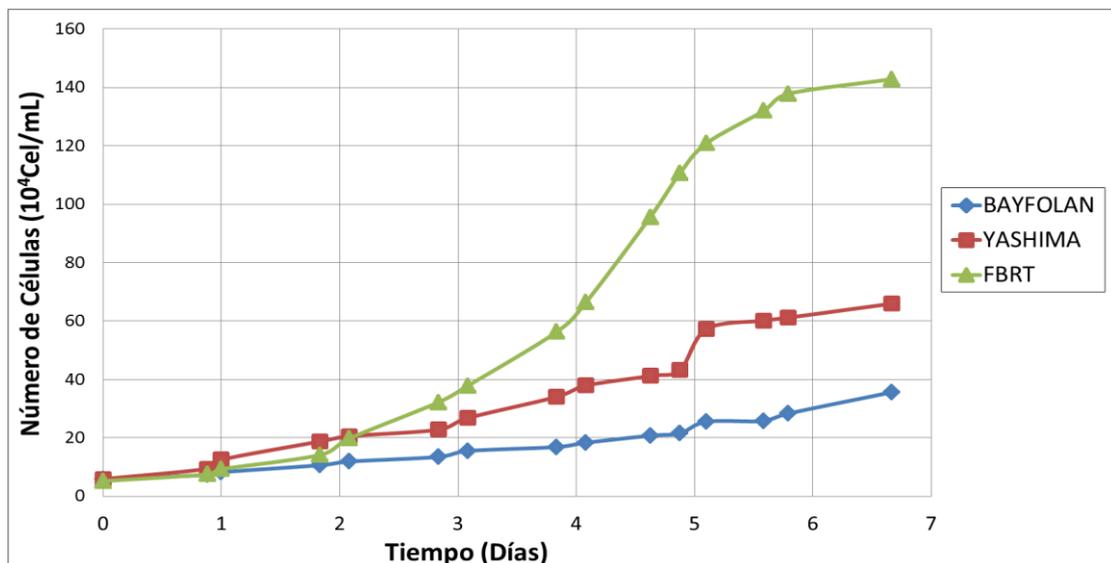
Tratamiento	BAYFOLAN	YASHIMA	FBRT
Día			
0.00	5.972	5.910	5.217
0.88	7.307	9.467	7.546
1.00	8.264	12.546	9.306
1.83	10.663	18.785	14.178
2.08	11.915	20.602	19.851
2.83	13.494	22.825	32.191
3.08	15.530	26.821	37.854
3.83	16.876	34.051	56.283
4.08	18.361	37.922	66.358
4.63	20.764	41.219	95.612
4.88	21.528	43.171	110.550
5.10	25.544	57.269	120.841
5.58	25.787	60.150	131.947
5.79	28.340	61.175	137.786
6.67	35.627	65.950	142.816

En los días subsiguientes el mayor crecimiento que había tenido el tratamiento Yashima, frente a los otros tratamientos, fue sobrepasado a partir del tercer día por el crecimiento del tratamiento FBRT, como se puede ver en la Figura 13 y la tabla 10. Así también el tratamiento con el fertilizante BAYFOLAN®FORTE, se mantuvo en densidades muy bajas. Esto probablemente debido a que este medio se utiliza mayormente en cultivos que aún estén en etapas de desarrollo vegetativo o en producción intensiva en plantas. (Bayer CropScience, s.f.), pudiendo producir el mismo efecto en cultivos de microalgas. En otra investigación, Fernández-Linares *et al.* (2017), enriquecieron los tratamientos con agua residuales adicionando BAYFOLAN debido al bajo contenido de nutrientes de los tratamientos con agua residuales, lo que podría haber limitado el crecimiento de la microalgas. Debido a esto se tomó al BAYFOLAN como control de la experimentación. Este mismo autor menciona que BAYFOLAN®FORTE es una fórmula concentrada de nutrientes que contiene vitaminas y fitohormonas que estimulan los procesos metabólicos de las plantas. Además, contiene ácido indolacético que es un estimulante del crecimiento en cultivos de plantas y podría producir el mismo efecto en cultivos de

microalgas. Esto ha sido reportado por De Bashan *et al.* (2003), que al adicionar concentraciones de ácido indolacético al cultivo de microalga *Chlorella vulgaris* causó un aumento en la población en comparación al cultivo de microalga sin tratamiento. Sin embargo el tratamiento con BAYFOLAN continuó con concentraciones bajas de microalgas durante todos los días que duró el experimento.

Por otro lado el tratamiento Yashima, tuvo una fase de adaptación de dos días, continuando con su fase exponencial hasta el final del experimento. Sin embargo como se ve en la Figura 11, y al compararlo con el tratamiento FRBT presenta menor crecimiento. Este comportamiento en el crecimiento celular fue similar al que obtuvo Rodríguez (2006), el cual utilizó el medio Yashima como control frente a su medio experimental para el cultivo de *T. suecica*. En esta, la densidad inicial fue de  $8.7 \times 10^4$  cel/ml y la que se obtuvo al sexto día fue de  $78.3 \times 10^4$  cel/ml.

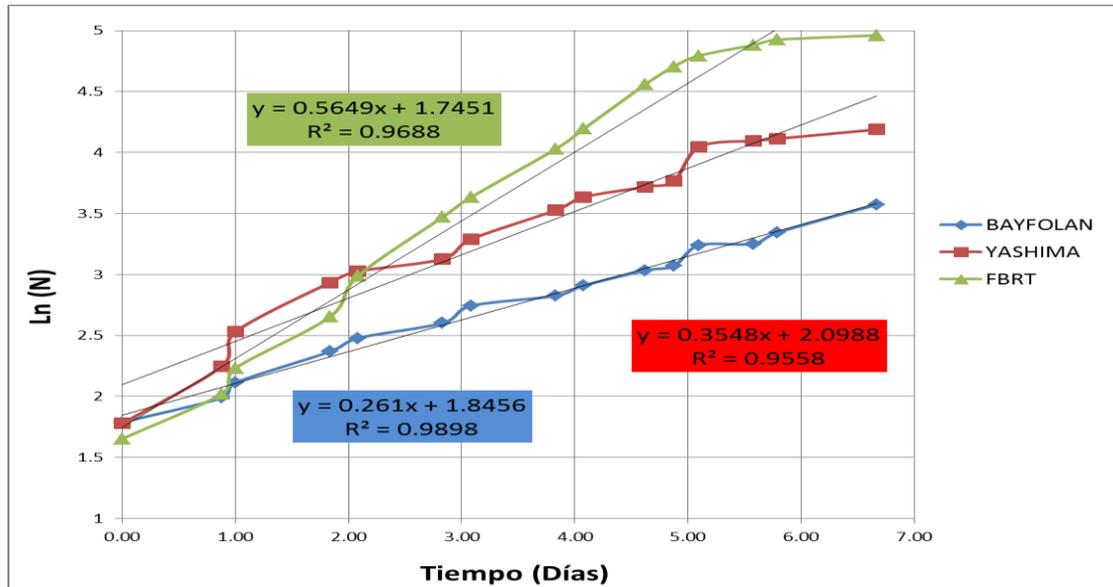
El tratamiento FBRT comienza su fase de crecimiento exponencial al iniciar el tercer día, la cual fue más pronunciada que en los tratamiento anteriores. Hacia el quinto día, se aprecia una disminución del crecimiento (fase de retardo) hasta el final del experimento.



**Figura 11: Curva de crecimiento de la microalga *T. suecica* ( $10^4$  cel/ml) con los diferentes tratamientos utilizados como medio de cultivo (BAYFOLAN® FORTE, Yashima y FBRT).**

El tratamiento FBRT fue el que obtuvo los mejores resultados en densidad celular, alcanzando valores de  $142.82 \times 10^4$  cel/ml al finalizar el experimento.

La figura 12, nos muestra la conversión en logaritmo natural del número de células de la microalga *T. suecica*, para obtener la ecuación linealizada para todos los tratamientos.



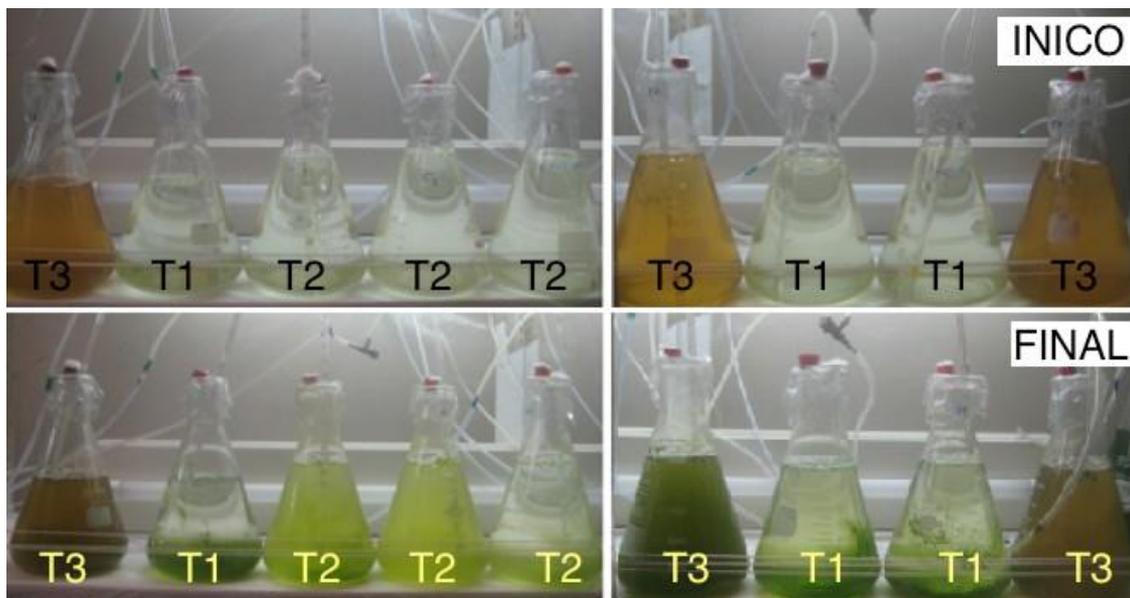
**Figura 12: Ecuación linealizada de la tasa de crecimiento de la microalga *T. suecica* ( $10^4$  cel/ml) con los diferentes tratamientos utilizados como medio de cultivo (BAYFOLAN@FORTE, Yashima y FBRT).**

Se puede observar que los diferentes tratamientos muestran tasas de crecimiento diferentes entre sí, esto debido al efecto de cada medio sobre el crecimiento de la microalga *T. suecica*. Siendo el mejor resultado el obtenido con el tratamiento FBRT (3:1000) con una tasa de crecimiento de 0.5649/día, este valor es superior al obtenido por Giordano *et al.* (2015), en *T. suecica*, de 0.19/día a la temperatura de 20°C bajo un flujo constante de luz, y al obtenido por Zubaidai (2017), que utilizó un 25% de aguas residuales como medio de cultivo, obteniendo una tasa de crecimiento de 0.4778/día. Lo que refleja que al usar FBRT como medio de cultivo, es muy favorable para el crecimiento de la microalga *T. suecica*.

Al efectuar el análisis de la varianza (ANVA) (Anexo 5.2) se contó con una heterogeneidad de la varianza. Por lo que se procedió a ajustar la variabilidad de los tratamientos. Luego se realizó la prueba de LSD de Fisher ( $\alpha=0.05$ ). Donde se pudo observar que los tratamientos son estadísticamente diferentes entre sí. El tratamiento FBRT muestra la mayor media entre tratamientos con un valor de  $658.89 \times 10^4 \text{ cel/ml}$  (anexo 5.2).

#### 4.3 DETERMINACIÓN DE CONTAMINACIÓN POR PROTOZOARIOS UTILIZANDO TRES FERTILIZANTES DIFERENTES COMO MEDIO DE CULTIVO PARA EL CRECIMIENTO DE LA MICROALGA *T. suecica*

Para esta prueba se realizó el cultivo con el mismo procedimiento que en la fase experimental anterior, con la diferencia que al momento del conteo se agregó lugol, con la finalidad de teñir las células de los probables protozoarios en el cultivo, luego se agregó ácido acético para poder fijarlas. Los matraces se distribuyeron al azar en estante tal como se muestra en la figura 13.



**Figura 13: Diferencia de coloración en los cultivo de la Microalga Tetraselmis suecica en la determinación de contaminación por protozoarios .**

Los protozoarios, fueron contabilizados desde el día de la siembra, observándose diferencias en la densidad inicial por tratamiento, ya que su presencia fue un factor que no se pudo controlar. Aun así la concentración de protozoarios inicial fue baja ( $0.23 \pm 0.14 \times 10^4 \text{ cel/ml}$ ), siendo el tratamiento BAYFOLAN el que mostró mayor carga inicial

con  $0.37 \times 10^4$  cel/ml. A partir del día dos, cada tratamiento contó con una dinámica celular de protozoarios diferente entre sí. Estos valores se aprecian en la tabla 9.

**Tabla 9; Valores promedios del crecimiento de protozoarios ( $10^4$  cel/ml) en los cultivos de *T. suecica* con diferentes medios (BAYFOLAN®, Yashima y FBRT).**

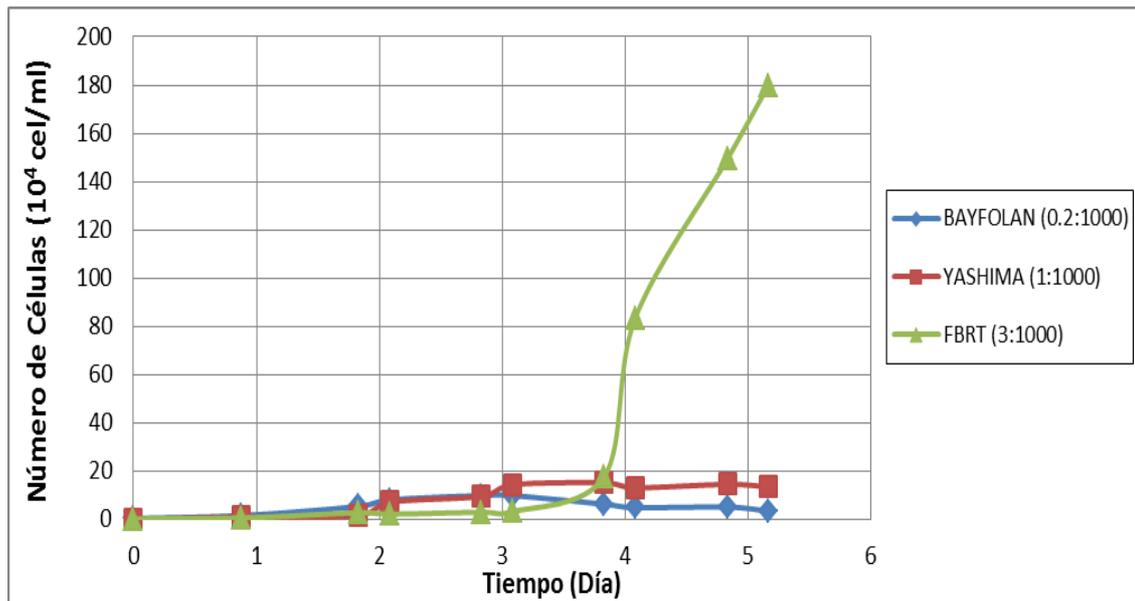
Tratamiento	BAYFOLAN	YASHHIMA	FBRT
Día			
0	0.370	0.093	0.185
0.875	1.574	0.880	0.556
1.833	5.370	1.574	2.731
2.083	8.082	7.130	2.183
2.833	9.861	9.537	2.963
3.083	9.861	14.352	3.148
3.833	6.263	15.139	17.870
4.083	4.861	13.102	83.426
4.833	5.093	14.491	149.352
5.167	3.472	13.519	179.815

Aunque el tratamiento BAYFOLAN, se inició con una carga mayor de protozoarios, esta se mantuvo en densidades bajas en comparación a los demás tratamientos, llegando hasta su máxima concentración el día tres con  $9.81 \times 10^4$  cel/ml, luego de ese día la concentración empezó a disminuir.

Por otro lado el tratamiento Yashima tuvo un crecimiento exponencial de protozoarios hasta finales del tercer día. Luego se observó que la carga comenzó a oscilar, aumentando y disminuyendo su cantidad ( $\pm 2 \times 10^4$  cel/ml) de protozoarios hasta el final del experimento.

En la figura 14, se observa el crecimiento particular por contaminación de protozoarios que se obtuvo en el tratamiento FBRT. En los primeros tres días, la dinámica de crecimiento era parecida a los demás tratamientos, cambiando notoriamente a finales del tercer día, donde se puede apreciar un aumento en la velocidad de crecimiento, llegando a alcanzar los mayores valores ( $179.82 \times 10^4$  cel/ml) respecto a los otros tratamientos. Wang (2012), menciona que todo cultivo contará con algún grado de contaminación, que inevitablemente entrarán en el cultivo por agua o el aire.

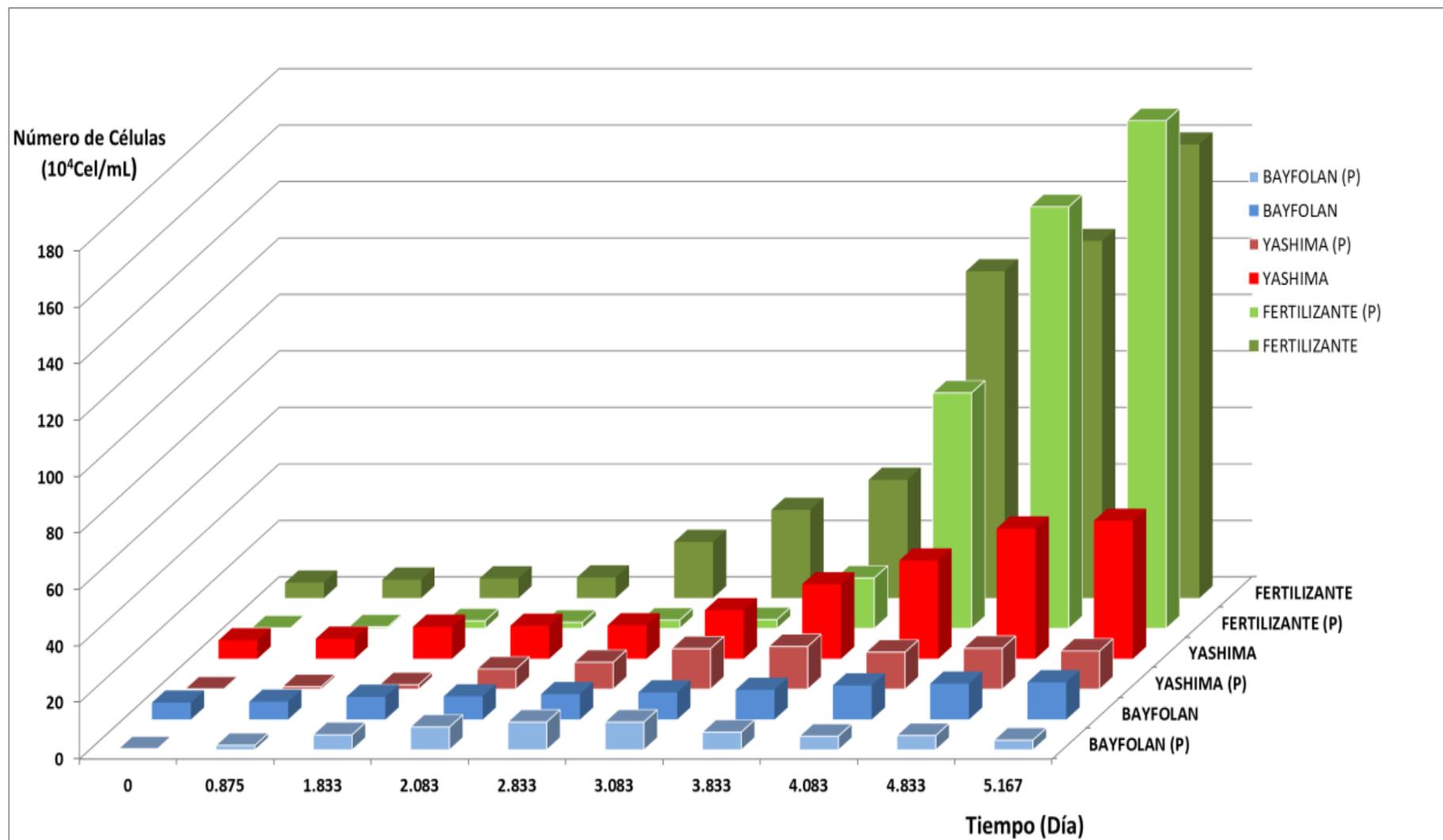
A pesar que todos los medios utilizados estuvieron contaminados, se sugiere que las infecciones por protozoarios pueden controlarse básicamente manteniendo el cultivo en niveles bajos de densidad (Moreno-Garrido *et al*, 2000). Recomendaciones de diferentes autores para prevenir la contaminación en cultivos de microalgas se limita a mantener los valores óptimos de pH, luz y temperatura, para aumentar la densidad de las algas y de esta manera superar el daño causado por los protozoarios (Richmond, 1986).



**Figura 14: Curva de crecimiento de protozoarios en los cultivos de *T. suecica* utilizando diferentes medios de cultivo.**

Las observaciones demostraron que el tratamiento FBRT mostró el mayor grado de contaminación, esto es entendible debido que se conoce que la conformación del ensilado contiene gran cantidad de bacterias y levaduras lo cual pudo favorecer el crecimiento de organismos heterotróficos como protozoarios (Florez, 2017) El tratamiento FBRT contó en el último día del experimento una densidades de  $179.82 \times 10^4 \text{ cel/ml}$  a diferencia de los tratamientos Yashima ( $13.52 \times 10^4 \text{ cel/ml}$ ) y el tratamiento BAYFOLAN ( $3.47 \times 10^4 \text{ cel/ml}$ ) que mantuvieron niveles bajos de protozoario durante el tiempo experimental.

A pesar de lo mencionado en la figura15, se puede observar las relaciones entre el crecimiento de la microalga *versus* el de protozoarios. Se aprecia que el tratamiento FBRT no solo cuenta con mayor densidad de protozoarios, sino también con la mayor



\*(P): número de protozoarios encontrado en cada tratamiento.

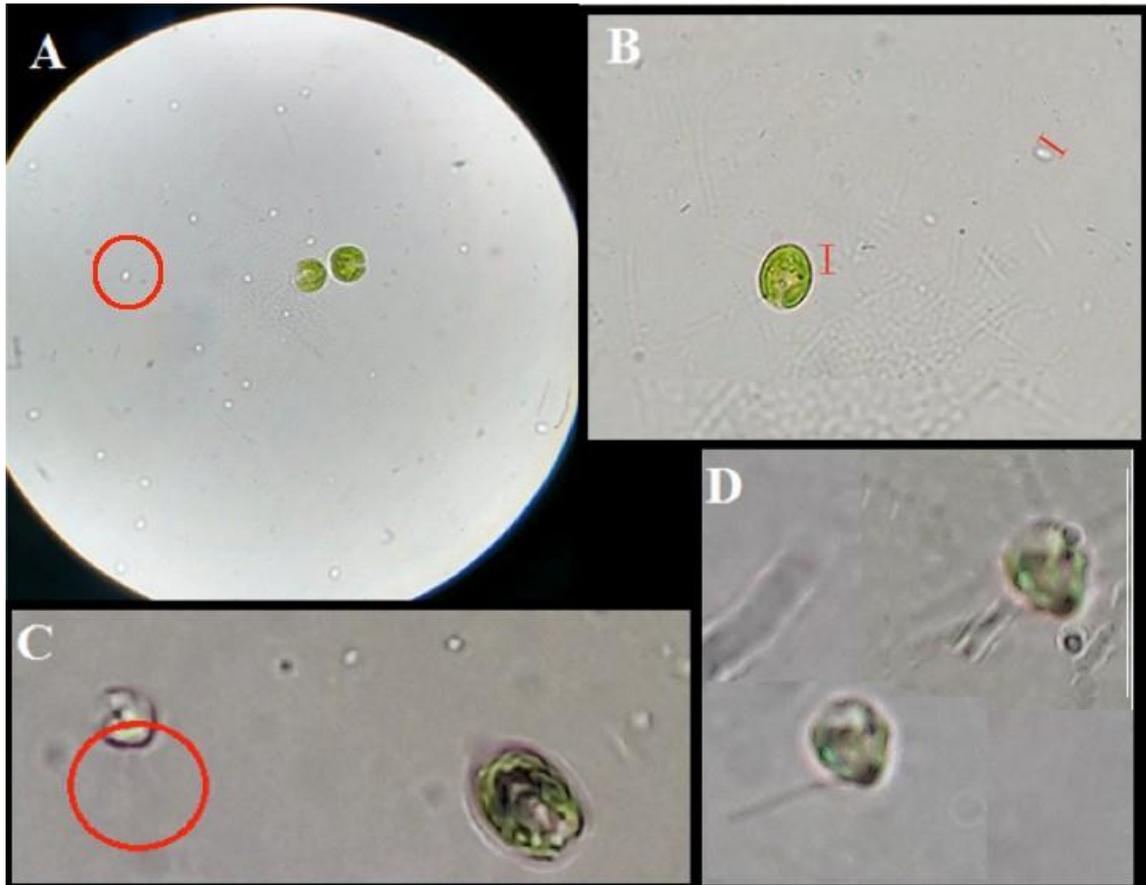
**Figura 15: Comparación entre el crecimiento de la microalga *T. suecica* versus el crecimiento de protozoarios (10<sup>4</sup>cel/ml).**

cantidad de microalga entre tratamientos. Esta inhibición de la depredación de la microalga por parte de los protozoarios, en el tratamiento FBRT, puede deberse a una auto protección de estas.

Day *et al.* (2017), indica que existen estudios sobre diversas formas químicas y físicas de auto protección de las microalgas, como el caso de la *C. einhardtii* en cultivos con presencia del rotífero *Brachionus calyciflorus*, donde el alga formó colonias mucoides, palmelloides en 25 horas (Lurling *et al.*, 2006). En *Scenedesmus subspicatus* y *S. acutus*, donde las formas coloniales son menos vulnerables a la depredación, se ha observado una respuesta similar, también atribuida a información química liberada por la presencia de los predadores (Dillon *et al.*, 2009). Otro ejemplo de producción de colonia mucilaginosa inducida por la depredación es con la *Phaeocystis globosa* que forman colonias por presencia de los dinoflagelados heterotróficos *Noctiluca scintillans* y *Gyrodinium dominans* (Jakobsen *et al.*, 2002). Aunque se necesita más trabajo de investigación en algas para obtener una mayor comprensión de la naturaleza y función química, como de su capacidad para inducir cambios fenotípicos protectores.

Al observar el protozoario encontrado en el cultivo, que se aprecia en la figura 16, este muestra una forma ovoide (esférica) con presencia de dos flagelos posicionados hacia uno de sus polos (figura16.C) que utiliza para la locomoción. Su tamaño es de aproximadamente tres veces menor que la microalga *T. suecica* (figura 16.B), por lo que se estima una medida de 3 a 5µm. Por ser de un tamaño tan pequeño no se pueden observar más características que ayuden a una identificación precisa, debido a la poca resolución del microscopio utilizado.

Por la descripciones observadas se podría asumir que el único protozoario encontrado en los cultivos podría pertenecer al orden de los *Criptomonadinos* al género *Monas sp.*, ya que se dice que estos son flagelados, sin plastos de muy pequeño tamaño entre 5 y 10 µm. Tienen forma esférica con dos flagelos uno más largo que otro que sale de su parte apical. Son heterótrofos y frecuentes en aguas con restos vegetales en desintegración. (Esperanza *et al.*, 2012).



**Figura 16: Protozario observado en los diferentes cultivos de *T. suecica*. A- Células algales rodeadas de protozoarios. B-Diferencia en tamaño de la célula algal y del protozario. C- Observación de flagelos en la célula del protozario (100x). D- Acercamiento de la célula de protozario (100X + zoom óptico).**

Cabe mencionar que mientras se realizaron los monitoreos de los cultivos, en ningún momento se observó depredación por parte de los protozoarios hacia las microalgas. Por lo observado, el tamaño de la microalga podría ser un factor de impedimento. Wang *et al.* (2017), estudió la interacción de dos especies de microalgas (*Chlorella sp.* y *Nannochloropsis oceánica*) al ser sometidos a diversos tipos de protozoarios (18 especies) colectados en el Mar Amarillo en China. Se observó que los cultivos de microalgas eran afectados (depredados) cuando el tamaño del protozario era cada vez mayor, indiferente a la densidad que esta podría tener en el cultivo. Demostrando así que el espectro del tamaño corporal de los protozoos puede ser utilizado como un indicador útil para identificar la defensa de las microalgas contra la depredación de protozoos. Este comportamiento también ha sido informado

por Yang *et al.* (2006), como respuesta a la depredación sobre *M. aeruginosa* por *Ochromonas sp.* Donde las colonias formadas excedieron el límite de tamaño superior para la ingestión por parte de los flagelados, protegiéndose así las algas de la depredación.

Se podría inferir que la causa más probable del crecimiento superior de protozoarios en el tratamiento FBRT, se puede deber que al contar con mayor crecimiento microalgal también cuenta con una mayor tasa de mortalidad de estas, aprovechando de esta forma el protozoario su alimentación. Además debemos recordar que el FBRT es un medio orgánico, por lo que cuenta con materia que puede ser aprovechada por organismos heterotrofos (en este caso el protozoario).

Otra particularidad del FBRT que debemos recordar es que cuenta con microorganismos como *Lactobacillus sp.*, levaduras, aerobios mesófilos y termófilos que aunque no pueden ser específicamente aprovechados por la microalgas si pueden serlos por las especies alimentadas con ellas. Gómez *et al.* (2000) nos menciona que dicho organismos pueden ser aprovechados por diversas especies como alimento enriquecido (artemias y rotíferos) o como fuente de probiótico. Otra particularidad del FBRT que debemos recordar es que cuenta con microorganismos como *Lactobacillus sp.*, levaduras, aerobios mesófilos y termófilos que aunque no pueden ser específicamente aprovechadas por la microalgas si pueden serlos por otras especies, como en este caso, por los protozoarios. Gomez *et al.* (2000) nos menciona que dicho organismos pueden ser aprovechados por diversas especies como alimento enriquecido (artemias y rotíferos) o como fuente de prebiótico.

Finalmente se puede decir que un cultivo monoespecífico siempre habrá posibilidad de contaminación por bacterias y protozoarios.

Se terminó el experimento realizando el análisis de la varianza (ANVA) (Anexo 5.3) donde se obtuvo diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ( $p < 0.05$ ), por lo que se realizó una prueba de LSD de Fisher ( $\alpha = 0.05$ ). A través de este se determinó que los tratamientos BAYFOLAN y Yashima guardaban relación estadística, mientras que se encontró diferencias entre el tratamiento FBRT con los tratamientos BAYFOLAN y Yashima, correspondiendo al primero las mayores concentraciones.

## V. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones experimentales descritas en este trabajo se concluye:

- La concentración óptima del FBRT que se obtuvo para el cultivo de la microalga *Tetraselmis suecica* fue de 3 ml<sub>FBRT</sub>/L<sub>agua marina</sub>.
- Concentraciones altas del fertilizante elaborado a base de ensilado de residuo de trucha mayor a 5ml<sub>FBRT</sub>/L<sub>agua marina</sub>, ocasiona estrés y mortalidad a la microalga *T. suecica*.
- A un nivel de 95% de confianza se obtuvo diferencias significativas de crecimiento microalgal entre los tres tratamientos siendo el FBRT el que alcanzó mayor densidad (142.82 x10<sup>4</sup>cel/ml), seguido por el Yashima (65.95 x10<sup>4</sup>cel/ml) y por último el BAYFOLAN (35.63 x10<sup>4</sup>cel/ml).
- La cantidad de protozoarios observados en el experimento demuestra que el FBRT contiene una carga mayor que los otros medios. Aunque esta no afectó al crecimiento de la microalga *T. suecica*.

## VI. RECOMENDACIONES

- Realizar ensayos con los mismos tratamientos variando la salinidad del experimento (rango óptimos de la *T. suecica* está entre 20 y 30‰). Para evaluar si este causa variaciones en el medio FBRT.
- Evaluar el uso del FBRT autoclavado, respecto al crecimiento de la microalga y la presencia de protozoarios.
- Utilizar el FBRT en cultivos masivo para determinar su grado de eficiencia a mayores volúmenes de microalgas.
- Evaluar y comparar la calidad nutricional de la microalgas provenientes del cultivo con FBRT y compararlos con los obtenidos con medios inorgánicos.
- Realizar tomas de pH y conductividad eléctrica en futuros experimentos con FBRT, para evaluar si hay cambios a diferentes concentraciones y como afecta esto al crecimiento de la microalga.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

-Acosta, B., Orozco, K., Rodriguez, C. s.f. Identificación de protozoos asociados a cuerpos en descomposición en medio ambientes acuáticos de tipo polisaprobios y mesosaprobios. International Law Assist. Bogotá D.C. Colombia. p17-18.

-Alfonso, E., Martinez, L. 1987. Comparación del volumen celular y del crecimiento de *Tetraselmis spp.* con diferentes fertilizantes. Revista de Investigaciones Marinas vol. 8 (3) p. 13-22.

-Alfonso, E. y L. Martínez. 1988. Medio de cultivo para microalgas marinas. Revista de Investigaciones Marinas vol. 9. p. 39- 46.

-Arredondo, B., Voltolina, D. 2007. Método y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. (En línea). La Paz, México. p. 21-25. Visto 17oct17. Disponible en [https://www.researchgate.net/profile/Domenico\\_Voltolina/publication/253237563\\_CONCENTRACION\\_RECUESTO\\_CELULAR\\_Y\\_TASA\\_DE\\_CRECIMIENTO/links/00b4953c92711ed8fb000000/CONCENTRACION-RECUESTO-CELULAR-Y-TASA-DE-CRECIMIENTO.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Domenico_Voltolina/publication/253237563_CONCENTRACION_RECUESTO_CELULAR_Y_TASA_DE_CRECIMIENTO/links/00b4953c92711ed8fb000000/CONCENTRACION-RECUESTO-CELULAR-Y-TASA-DE-CRECIMIENTO.pdf)

-Baker, N. 1991. A Possible role for photosystemII in environmental perturbations of photosynthesis. *Physiol. Plant.*, vol. 81. p. 563–70.

-Bayer CropScience. BAYFOLAN@FORTE. Nutriente vegetal foliar. (En línea). Visto 18nov17. Disponible en [http://www.tacsa.mx/DEAQ/src/productos/264\\_28.htm](http://www.tacsa.mx/DEAQ/src/productos/264_28.htm)

- Becerra, M., López, J., Enríquez, F., Huerta, N., Voltolina, D., Osuna, I., Izaguirre, G. 2010. The effect of initial cell and nutrient concentrations on the growth and biomass production of outdoor cultures of *Dunaliella* sp. *Annales Botanici Fennici*. vol. 47. p. 109-112.
- Bondioli, P., Della-Bella, L., Rivolta, G., ChiniZittelli, G., Bassi, N., Rodolfi, L., Casini, D., Prussi, M., Chiaramonti, D. y Tredici, M. 2012. Oil production by the marine microalgae *Nannochloropsis* sp. F& M-M24 and *Tetraselmis suecica* F& M-M33. *Bioresource Technology*. (En línea). Visto 24oct17. Disponible en <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852412003744?via%3Dihub>
- Boussiba ,S., Richmond, A. 1980. C-phycocyanionas a storage protein in the blue-green alga *Spirulina platensis*. *Archives of Microbiology* vol. 125. p. 143–47.
- Borowitzka, M., Borowitzka, L. 1988. *Dunaliella* In: microalgal biotechnology. Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido. p. 27–58.
- Bratbak, G., Heldal, M., Norland, S., Thingstad, T. 1990. Viruses as partners in spring bloom microbial trophodynamics. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 1400-1405.
- Candela, R. 2016. Las microalgas y el tratamiento de aguas residuales: conceptos y aplicaciones. Universidad Nacional Abierta y a Distancia. Escuela de Ciencias Agrícolas, Pecuarias y del Medio Ambiente. Bucaramanga, Colombia. p.26.
- Carballo-Cárdenas, E., Minh, P., Janssen, M., Wijffels, R. 2003. Vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol) production by the marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* and *Tetraselmis suecica* in batch cultivation. (En línea). Visto 30oct17. Disponible en <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389034403000406>
- Chinchayan, M. 1996. Cultivo de la microalga *Nannochloropsis oculata* y su consumo por el rotífero *Brachionus plicatilis* (línea S). Tesis. Universidad Nacional Agraria la Molina. Lima, Perú. p. 30-33

- Collier, J., Grossman, A. 1992. Chlorosis induced by nutrient deprivation in *Synechococcus sp.* strain PCC 7942: not all bleaching is the same. *J. Bacteriol*, vol. 174(14). p. 4718–26.
- Coll, J. 1991. Acuicultura marina animal. Edición MUNDI-PRENSA. Tercera Edición. España. p. 670.
- Chester, R., 1990. Cultivo masivo de *Chaetoceros sp.* y *Tetraselmis sp.* con diferentes fuentes de nitrógeno: nitrato de sodio y urea. *Marine geochemistry*. Unwin Hyman. Londres. pp. 233-269.
- Darley, W. 1982. *Algal Biology: a physiological approach*. Blackwell Science Inc. London.
- Darley, W. 1987. *Biología de las algas. Enfoque fisiológico*. Editorial Limusa. México. p. 236.
- Day, J., Gong, Y., Hu, Q. 2017. Microzooplanktonic grazers—A potentially devastating threat to the commercial success of microalgal mass culture. *Algal Research*, vol.27. p. 356–365.
- De Bashan, L., Bashan, Y. 2003. Bacterias promotoras de crecimiento de microalgas: una nueva aproximación en el tratamiento de aguas residuales. *Revista Colombiana de Biotecnología*, vol. 5 (2). p. 85-90.
- De la Cruz, A., Millares, M. 1974. Método de cultivo masivo de *Brachionus plicatilis* (rotífero) a escala experimental. *Ciencias. Investigaciones Marinas* vol. 8 (11). p.1-29.
- De Juan Herrera, J. Practica N°2: observación de moneras y protistas. Universidad de Alacant. Departamento de Biología. Guía de Practica. (En línea). Visto 30oct17. Disponible en <https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/13098/1/Moneras%20y%20protistas.pdf>

- De Pauw, N., Verboven, J., Claus, C. 1983. Large-scale microalgae production for nursery rearing of marine bivalves. *Aquacultural Engineering* vol. 2. p. 27-47.
- De Souza, R., Figueiredo, A. 2007. Apostila de aulas practica: bacteriologia nutricao. Departamento de Microbiologia e Parasitologia. Universidade Federal Fluminense. (En línea). Visto 20nov17. Disponible en [http://www.uff.br/labac/Apostila\\_Pratica\\_Nutricao.pdf](http://www.uff.br/labac/Apostila_Pratica_Nutricao.pdf)
- Di Rienzo, J., Macchiavelli, R., Casanoves, F. 2017. Modelos Lineales Mixtos Aplicaciones en InfoStat. Primera edición.
- Di Rienzo J., Casanoves F., Balzarini M., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C. 2008. InfoStat, versión 2008, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Dillon, A., PARRY, J. 2009. Amoebic grazing of freshwater *Synechococcus* strains rich in phycocyanin. *FEMS Microbiology Ecology*, vol.69. p. 106-112.
- Dubinsky, Z., Matsukawa, R., Karube, I. 1995. Photobiological aspects of algal mass culture. *Journal of Marine Biotechnology*. (2) p.61–65.
- Endo, T., Schreiber, U., Asada, K. 1995. Suppression of quantum yield of photosystem II by hyperosmotic stress in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant & Cell Physiology* vol. 36. p. 1253–58.
- Esperanza, B., Orozco, K., Rodriguez, C. 2012. Identificación de protozoos asociados a cuerpos en descomposición en medioambiental acuáticos de tipo Polisaprobios y Mesaprobios. Bogotá, Colombia.
- Fabregas, J., Abalde, J., Herrero, C., Cabeza, B., Veiga, M. 1984. Aquaculture. In: growth of the marine microalga *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations. *Facultades de Farmacia y Medicina, Universidad de Santiago. Santiago de Compostela, España.* vol. 42. p. 207-215.

- Fernandez- Linares, , L., Guerrero, C., Durán, E., Badillo, J. 2017. Assessment of *Chlorella vulgaris* and indigenous microalgae biomass with treated wastewater as growth culture medium. *Bioresource Technology*. Ciudad de México, Mexico. P 400-406.
- Fernandez, J., López, D. 2015. *Microalgal Biotechnology*. Universidad de Almería. (En línea). Almería, España. Visto el 22nov17. Disponible en <https://w3.ual.es/~jfernand/MBio70411204/Lesson1/Indice.html>
- Florez, M. 2017. Elaboración de biofertilizante líquido utilizando subproductos del procesamiento de trucha (*Oncorhynchus mykiss*). Universidad Nacional Agraria la Molina. Tesis de titulación. Lima, Perú.
- Fogg, G., Thake, B. 1987. *Algae cultures and phytoplankton ecology*. The University of Wisconsin Press. Tercera edición. Estados Unidos de Norteamérica. p. 126.
- García, A. 2010. Inclusión de ensilado de pescado como fuente de proteína y de probiótico en la dieta del camarón blanco. Universidad Autónoma de Baja California Sur. Tesis de titulación. La Paz B.C.S, México. p. 44.
- Giordano, M., Palmucci, M., Raven, J. 2015. Growth rate hypothesis and efficiency of protein synthesis under different sulphate concentrations in two green algae. *Plant, Cell & Environment* vol. 38 (11). p. 2313-2317.
- Gilmour, D., Hipkins, M., Boney, A. 1984. The effect of osmotic and ionic stress on the primary processes of photosynthesis in *Dunaliella tertiolecta*. *Journal of Experimental Botany* vol 35. p. 18–27
- Goldman, J., Mann, R.1980. Temperature influenced variations in speciation and the chemical composition of marine phytoplankton in outdoor mass cultures. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. p. 29–40, 46.
- Gómez, L. 2007. *Microalgas: aspectos ecológicos y biotecnológicos*. Universidad de Oriente. Santiago de Cuba, Cuba. *Revista Cubana de Química* vol. 19(2): p. 6,9-10.

- Gomez-Gil, B., Roque, A., Turnbull, J . 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *ELSEVIER, Aquaculture* 191. p. 259–270
- González, D.; Marín, M. 2005. Obtención de ensilados biológicos a partir de los desechos del procesamiento de sardina. *Red de Revista Científica de América Latina*. (15). p. 560
- Gouveia,L. 2011. Microalgaeas a feedstock for biofuels. *Microalgae As a Feed-stock for Biofuels*. Springer, Berlin, Alemania.
- Guillard, R.R.L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. *Culture Marine Invertebrate Animals*. New York, Estados Unidos de Norteamérica. pp: 29-60.
- Guillard, R., Sieracki, M. 2005. Counting cells in cultures with the light microscope. *Algal Culturing Techniques*. Andersen, R.A. Elsevier Academic Press, 239-252 pp.
- Harris, G. 1988. *Phytoplankton ecology*. Chapman & Hall, New York.
- Healey, F. 1982. *Phosphate. The Biology of Cyanobacteria*. Blackwell Scientific. Oxford, Reino Unido.
- Helm, M.M.; Bourne, N.; Lovatelli, A. 2006. Cultivo de bivalvos en criadero. Un manual práctico. *FAO Documento técnico de Pesca No. 471*. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Roma - Italia. p. 31-55.
- Hena, S., Fatmah, S., Tabassum., S. 2015. Cultivation of algae consortium in a dairy farm wastewater for biodiesel production. *Water Resources and Industry*, vol. 10. pp. 1–14
- Hoff, F., Snell, T. 1993. *Plankton culture manual*. Published Florida Aqua Farms. Ino. Florida. p. 579.
- Hu, Q. 2004. Environmental effects on cell composition. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Arizona State University. Estados Unidos

de Norteamérica. p. 83-90.

-Irianto, A. Austin, B. 2002. Probiotics in aquaculture. *Journal of Fish Diseases*. p. 633-642.

-Iwamoto, H., Sato, S. 1986. Production by freshwater algae (EPA). *Journal of the American Oil Chemists' Society* vol. 63. p.434.

-Jad-Allah, K. 2012. Development of cheap and simple culture medium for the microalgae *Nannochloropsis sp.* Based on Agricultural Grade Fertilizers Available in the Local Market of Gaza Strip (Palestine). *Revista de la Universidad Al Azhar de Gaza (Ciencias Naturales)*. Universidad Islámica de Gaza. Ciudad de Gaza, Gaza. pp. 61-76

-Jakobsen, H., Tang, K. 2002. Effects of protozoan grazing on colony formation in *Phaeocystis globosa* (Prymnesiophyceae) and the potential costs and benefits. *Aquatic Microbial Ecology*, vol.27. p. 261–273.

-Jeanjean, R., Matthijs, H., Onana, B., Havaux, M., Joset, F. 1993. Exposure of the *Cyanobacterium Synechocystis* PCC6803 to salt stress induces concerted changes in respiration and photosynthesis. *Plant and Cell Physiology*, vol. 34. p. 1073–1079.

-Kaippilliparambil, J., Aikkarakunnath, S. 2016. Effects of fish silage on growth and biochemical characteristics of fresh water microalga *Scenedesmus sp.* MB 23. *Agriculture and Natural Resources*. Cochin, India. vol. 51 (4).p 6-10

-Kinne O., 1976. Biological water treatment; culture water treatment, In: O. Kinne (Ed.) *Marine Ecology*, Vol. III, Cultivation, Part I, London. p. 122–134.

-Laing, I., Helm, M. 1981. Factors affecting the semi-continuous production of *Tetraselmis suecica* (Kyllin) Butch. *Aquaculture*, vol. 22. p. 137-148

- Lee, Y., Shen, H. 2004. Basic culturing techniques. Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. Blackwell Science. p. 48-50.
- Liu, B., Lee, Y. 2000. Secondary carotenoids formation by the green alga *Chlorococcum* sp. Journal of Applied Phycology, (12): p. 301–307.
- Loosanoff, V., Engle, J. 1942. Use of complete fertilizers in cultivation of microorganisms. Science, vol 95. p. 487-488.
- Lurling, M., Beekman, W. 2006. Palmelloids formation in *Chlamydomonas reinhardtii*: defence against rotifer predators International Journal of Limnology: Annales de Limnologie, vol.42. p.65-72.
- Ministerio de la producción (PRODUCE). 2016. Venta Interna. (En línea). Perú-Lima. Consultado 29mar16. Disponible en [http://rnia.produce.gob.pe/index.php?option=com\\_content&view=article&id=62&Itemid=80](http://rnia.produce.gob.pe/index.php?option=com_content&view=article&id=62&Itemid=80)
- Moheimani, N. 2012. Inorganic carbon and pH effect on growth and lipid productivity of *Tetraselmis suecica* and *Chlorella* sp (Chlorophyta) grown outdoors in bag photobioreactors. [Journal of Applied Phycology](#) (25). p.387–398.
- Morales, V., De Velotti, A. 1990. Fitoplacton. PRADEPESCA Unión Europea y OLDEPESCA. Cartilla (2): p. 1-21.
- Moreno-Garrido, Cañavate, J. 2000. Assessing chemical compounds for controlling predator ciliates in outdoor mass cultures of the green algae *Dunaliella salina*. Centro de Investigación y Cultivo de Especies Marinas "El Toruño". Aquacultural Engineering vol. 24. Cádiz, España. p. 107-114
- Morineau, T., Legentilhomme, P., Jaouen, P., Lepine, B., Rince, Y. 2001. Influence a swirl motion on the interaction between microalgal cells and environmental medium

during ultrafiltration of a culture of *Tetraselmis suecica*. *Biotechnology Letter*, (23): p. 1539-1545.

-ORGANIC International Perú S.A.C. 2016. Ficha tecnica: ORGANIC GEM liquid fish. (En línea). La Libertad, Perú. Consultado 8jun16. Disponible en <http://www.organicinternationalperu.com/productos/FTORGANIGEMLIQUIDFISH.pdf>.

-Phyco Key. AN Image-Based Key: Algae (PS Protista), Cyanobacteria, and other aquatic objects. Universidad of New Hampshire. (En línea). Consultado 31oct17. Disponible en [http://cfb.unh.edu/phycokey/Choices/Chlorophyceae/unicells/flagellated/TETRASELMIS/Tetraselmis\\_Image\\_page.html](http://cfb.unh.edu/phycokey/Choices/Chlorophyceae/unicells/flagellated/TETRASELMIS/Tetraselmis_Image_page.html)

-Piña; P, Mediana; M., Nieves; M., Leal; S., López; J., Guerrero; M. 2007. Cultivo de cuatro especies de microalgas con diferentes fertilizantes utilizados en acuicultura. *Revista de investigación Marina de Universidad de la Habana*. (3): 225-236.

-Prieur, D., Mével, G., Nicolas, J., Plusquellec, A., Vigneulle, M. 1990. Interactions between bivalve molluscs and bacteria in the marine environment. *Oceanography Marine Biological Annual Review*, vol. 28, p. 277-352

-*Radio Onda Azul*. 2016. Puno: Revelan que residuos de producción de trucha no tiene tratamiento. Noticia reportada el 04abr16. (En línea). Consultado 18nov16. Disponible en <http://www.radioondaazul.com/puno-revelan-que-residuos-de-produccion-de-trucha-no-tienen-tratamiento-incluso-estan-poniendo-en-riesgo-los-recursos-hidricos-58279.html>

-Rhee,G. 1982. Effects of environmental factors and their interactions on phytoplankton growth. *Advances in Microbial Ecology*, vol 6. p. 33–74.

-Richardson, K., Beardall, J., Raven, J. 1983. Adaptation of unicellular algae to irradiance: an analysis of strategies. *New Phycol.*, vol. 93. p. 157–91.

-Richmond, A. 1986. *CRC Handbook of microalgal mass culture*. Universidad de California. p. 117-144.

- Riquelme, C., Araya, R., Vergara, N., Rojas, A., Guaita, M., Candia, M., 1997. Potential probiotic strains in the culture of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Aquaculture* 154. p. 17–26.
- Riquelme, C., Avendaño-Herrera, R. 2003. Microalgae and bacteria interaction in the aquatic environment and their potential use in aquaculture. Santiago de Chile, Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* vol. 76 (4). p. 725-736.
- Romo, A. 2002. Manual para el cultivo de microalgas. Universidad Autónoma de Baja California Sur. Mexico, La Paz. p. 5-7.
- Rodríguez, L. 2006. Efecto de EM-Bokashi en el cultivo de la microalga *Tetraselmis suecica*. Tesis de titulación. Universidad Nacional Agraria la Molina. Lima, Perú. p. 11-18.
- Rudo, R. 1969. Protozoología. Editorial Continental S.A. Mexico, p. 27-39, 847-861.
- Santambrosio, E., Ortega, M., Garibaldi, P. 2009. Siembra y recuento de microorganismos. Facultad Reginal Rosario. Universidad Tecnológica Nacional. (En línea). Argentina. visto 20nov17. Disponible en [https://www.fro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5\\_anio/biotecnologia/practicoIII.pdf](https://www.fro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5_anio/biotecnologia/practicoIII.pdf)
- Sánchez, H. 2007. Optimización de la microalga *Nannochloropsis oculata* (Droop) hibberd como alimento vivo en acuicultura por enriquecimiento con ensilado biológico de pescado. Tesis. Universidad Nacional Agraria la Molina. Lima, Perú. p. 26-30.
- Shapiro, S., Francia, R. 1972. An approximate analysis of variance test for normality. *Journal of the American Statistical Association*, vol. 67. p. 215-216.
- Simon, R. 1971. Cyanophycin granules from the blue-green alga *Anabaena cylindrical*: a reserve material consisting of copolymers of aspartic and arginine. *Proceedings of the National Academy of Sciences. Estados Unidos de Norteamérica*, vol. 68. p. 265–67.

- Sparre P., Venema, S. 1997. Introducción a la evaluación de recursos pesqueros tropicales. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Impresos Universitaria. Santiago de Chile, Chile. p. 47-61
- Soeder, C. 1980. Massive cultivation of microalgae: Results and prospects. *Hydrobiología*, vol. 72. p. 197-209.-Tjahjono, A., Hayama, Y., Kakizono, T., Terada, Y., Nishio, N., NagaiS. 1994. Hyper-accumulation of astaxanthin in a green alga *Haematococcus pluvialis* at elevated-temperatures. *Biotech.Lett.*, vol. 16. p. 38–133.
- Torretera, L., Tacon, A. 1989. La producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura una diagnosis. Departamento de pesca. FAO (en línea). Brasilia, Brasil. Consultado 29nov16. Disponible en <http://www.fao.org/docrep/field/003/ab473s/AB473S00.htm#TOC>
- United States Department of Agriculture (USDA). 2006. Liquid fish products: technical evaluation report (En línea). Washington D.C, Estados Unidos de Norteamérica. Consultado 10dic16. Disponible en <https://www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/Liquid%20Fish%20Products%20TR%202006.pdf>
- Veral, A., Martínez, M., Morillo, K., Montes, S. 2006. Cultivo discontinuo de *Chlorella sp.* en medios enriquecidos con el exudado gomoso de *Acacia macracantha*. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas*, vol. 38 (2) p.109-119.
- Vonshak, A., Richmond, A. 1981. Photosynthetic and respiratory activity in *Anacystis nidulans* adapted to osmotic stress. *Plant Physiol*, vol. 68. p.504
- Vonshak, A., Torzillo, G. 2004. Environmental stress physiology. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. p. 57-77.
- Walne, P.R. 1970. Studies on the food value of nineteen genera of algae to juvenile bivalves of the genera *Ostrea*, *Crassostrea*, *Mercenaria* and *Mytilus*. *Fish. Invest. London*, Serie 2, vol 24 (5). p. 1-2.

- Walne, P. 1966. Experiments in the large-scale culture of the larvae of *Ostrea edulis*. Fish. Invest. Londres, Inglaterra. Vol 15, (4): p. 53.
- Wang, H., Zhang, W., Chen, L., Wang, J., Liu, T. 2012. The contamination and control of biological pollutants in mass cultivation of microalgae. Qingdao Institute Of Bioenergy & Bioprocess Technology Chinese Academy Of Sciences. Bioresource Technology, vol. 128 .Shandong Sheng, China. p. 745-750.
- Wang, Z., Xu, G., Zhao, L., Gao, Y., Abdullah, M., Xu, H. 2017. New method for evaluating defense of microalgae against protozoan grazing. Ecological Indicators, vol. 77. p. 261-266.
- Yang, Z., Kong, F., Shi, X., Cao, H. 2006. Morphological response of *Microcystis aeruginosa* to grazing by different sorts of zooplankton. Hydrobiologia vol. 563. p. 225–230.
- Zubaidai, D. 2017. Batch cultivation of marine microalgae *Nannochloropsis oculata* and *Tetraselmis suecica* in treated municipal wastewater toward bioethanol production. Journal of Cleaner Production. Estambul, Turquía. p. 40-46.

- ANEXOS

**Anexo 1; Instalación de las cepas de *Tetraselmis suecica***

Desinfección de mesa de trabajo.

Prender el mechero bunsen.

Matraces con agua de mar autoclavada.

Quitar el pabalo.



Colocar todo los materiales a utilizar alrededor del mechero bunsen.

Colocar los medios a utilizar (dependiendo del experimento se utilizara solo el fertilizante o los 3 medios).



Con ayuda de una pipeta de 5 mL. y una bomba de succión, extraer de 0.5-10 mL(en el caso del experimento de concentración) o 3mL (en el caso del experimento de comparación) del fertilizante a base de residuos de trucha.

Acercar el pico del matraz al mechero bunsen y extraer la tapa de algodón. Con mucho cuidado depositar el fertilizante sin derramar el medio en el cuello del matraz.

Tapar y agitar para su homogenización.



Con una pipeta de 1mL. y una bomba de succión, extraer 0.2mL del medio BAYFOLAN.

Acercar el pico del matraz al mechero bunsen y extraer la tapa de algodón. Depositar el medio.

Tapar y agitar para su homogenización.



Con una pipeta de 2mL. y una bomba de succión, extraer 1mL del medio de Yashima.

Acercar el pico del matraz al mechero bunsen y extraer la tapa de algodón. Depositar el medio.

Tapar y agitar para su homogenización.



Ordenar los matraces con sus respectivos medios.

Realizar el sorteo de orden en estantería.

Enumerar los matraces con marcador aprueba de agua (rotular).



Separa en matraz esterilizado la cepa a utilizar.  
Acercar la cepa y un tubo medidor al mechero bunsen.



Colocar los matraces en el orden como se colocaran en el estante.  
Ir midiendo y depositando la cantidad de inculo de la microalga *Tetraselmis suecica* en cada matraz (mismo volumen).



Quitar la tapa de algodón.  
Colocar el tubo de aireación y  
una tapa (ambos previamente  
esterilizados) al matraz.



Colocar los matraces en el  
estante.  
Verificar que el orden asignado  
sea el correcto.  
Verificar que la concentración de  
luz y de temperatura sea la  
adecuada.  
Verificar que todos reciban  
aireación constante.



## Anexo 2; Siembra de la microalga en agar en tubo inclinado

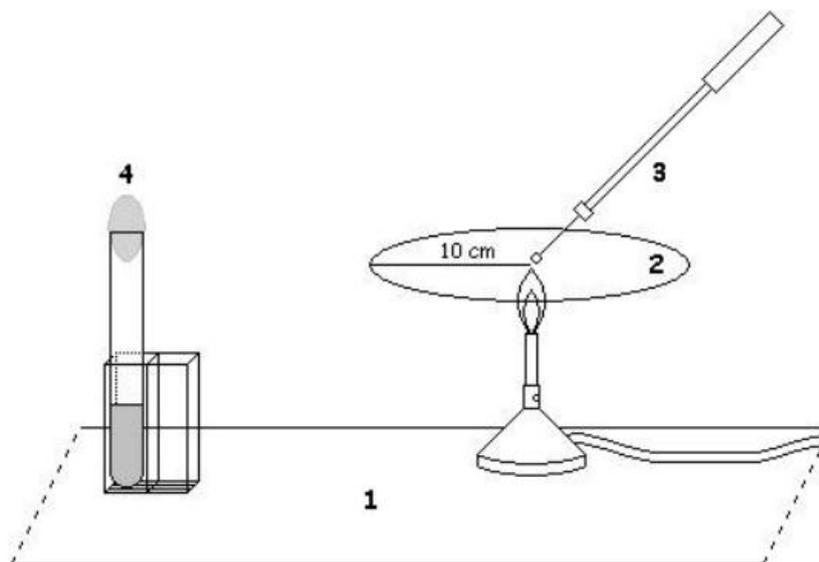
### 2.1. Preparación de agar:

Se siguen las instrucciones del rótulo del medio de acuerdo a la cantidad a preparar. Se transfiere el medio a un erlenmeyer y se agrega la cantidad de agua destilada establecida. Con ayuda de un agitador magnético se disuelven los grumos que puedan formarse y se lleva la suspensión a baño maría hasta que el medio se torne transparente, se cubre el erlenmeyer con un tapón de algodón (torunda) envuelto en gasa. Se cubre la torunda con material impermeable y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Si se utiliza de inmediato, dejar enfriar a temperatura alrededor de 45°C. En caso de que el medio solidifique, fundirlo nuevamente a baño maría antes de su uso (Santambrosio, 2009)



### 2.2. Técnica de siembra:

La técnica de siembra es el método por el cual se transfiere inóculos de un medio de cultivo o material a ser analizado (secreciones, alimentos) para otro medio de cultivo. Para garantizar que sólo se siembra el microorganismo deseado, se utilizan las técnicas asépticas: procedimientos que deben ser adoptados para la no contaminación de materiales, medios y cultivo.



Las técnicas de asepsia incluyen:

- (1) La desinfección del área de trabajo y antisepsia de las manos ANTES y DESPUÉS de cualquier trabajo.
- (2) Trabajar SIEMPRE en el área de seguridad: un área de aproximadamente 10 cm alrededor de la llama del pico de Bunsen.
- (3) Esterilizar adecuadamente todo el material (por ejemplo, tiradores y agujas bacteriológicas o asa de coli) ANTES y DESPUÉS de su uso, siempre calentarse de la base para la punta, evitando la formación de aerosoles.
- (4) Se flamea la boca de los frascos y tubos ANTES y DESPUÉS de las inoculaciones, evitando la contaminación del cultivo / material a ser analizado y garantizando que solamente el microorganismo se inoculará (De Souza, 2007).

### 2.3. Medio inclinado en tubos:

El inóculo se siembra, con ayuda de un asa de arco, de la siguiente manera: Se pica con el ansa el cultivo a sembrar y se esparce el mismo sobre la superficie en bisel en forma de zigzag. (Santambrosio, 2009)



**Anexo 3, Cuadro de temperatura (°C) tomadas en la mañana y tarde para cada uno de los experimentos realizados.**

Tratamiento Día	Concentración		Comparación	Protozoarios
	Fase 1	Fase 2		
0	25-23	22-23	21-22	20-19
1	25-22	19-20	22-20	20-19
2	25-21	20-22	22-20	21-19
3	22-19	19-23	20-19	19-19
4	23-19	23-23	20-21	21-20
5	24-19	22-22	21-20	20-21
6	24-20	-	20-19	20-21

**Anexo 4; Conteo de número de células utilizando el hematocitómetro con reglillas de Neubauer.**

Se contarán todas las células presentes en los 4 cuadros de 1 mm<sup>2</sup> marcados como A, B, C y D, la concentración celular se calcula de acuerdo a la fórmula:

$$C = N \cdot 10^4 \cdot \text{dil}$$

En donde: C = cél/mL

N = promedio de células presentes en 1 mm<sup>2</sup> (0.1 µL)

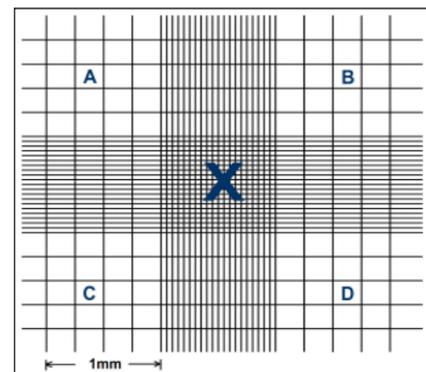
10<sup>4</sup> = factor de conversión de 0.1 µL a 1 mL

dil = factor de dilución

Para el factor de dilución, cuando se consideró necesario diluir la muestra. Es importante aclarar que si se usó 1 mL de muestra y 9 mL de agua sin células, el volumen total es 10 mL y el factor de dilución es = 10.

Esta dilución se define como uno en diez -1:10-.

NOTA: Esta aclaración se debe a nuestra observación que frecuentemente se agregan 10 mL de agua a 1 mL de muestra y se usa 10 como factor de dilución lo que esto no es correcto (Arredondo, 2007).



**Anexo 5; Análisis estadístico: diseño completamente al azar (D.C.A) de los tres experimentos realizados.**

**5.1. Determinación de la concentración óptima del Fertilizante elaborado a Base de ensilado de residuos de trucha (FBRT) para el cultivo de microalga *T. suecica***

**5.1.1 Primera Fase:**

**\*Normalidad de Errores:**

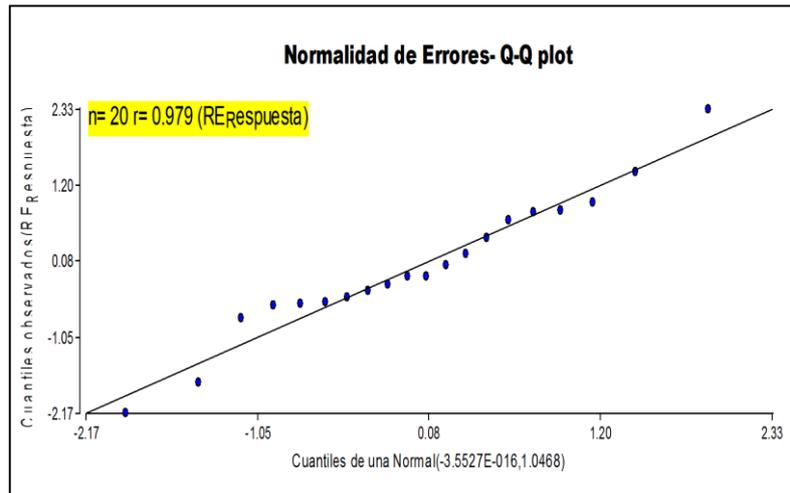
Ho = Los errores poseen distribución normal.

Hp= Los errores no poseen distribución normal.

$\alpha= 0.05$

Conclusión: a un nivel de significación de 0.05 y a un  $r=0.979$ ; no existe evidencia estadística para

rechazar Ho. Por lo que se puede afirmar que los errores poseen distribución normal.



**\*Homogeneidad de**

**Varianza:**

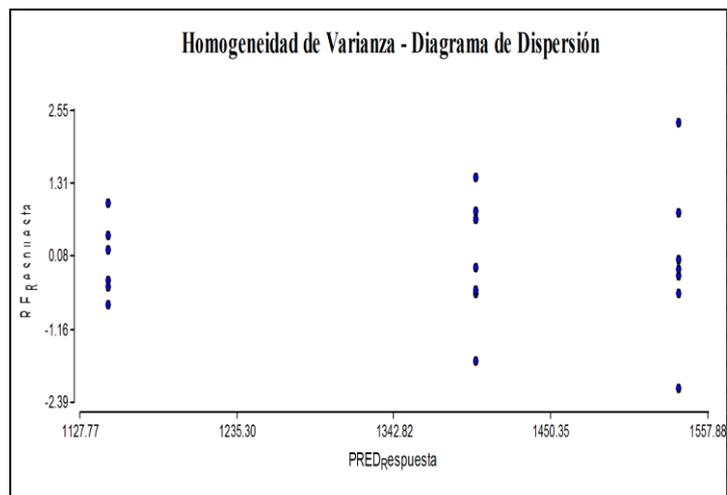
Ho = Las varianzas de los tratamientos son homogéneos.

Hp= Las varianzas de los tratamientos son heterogéneas.

$\alpha= 0.05$

Conclusión: a un nivel de significación de 0.05; no existe evidencia estadística para rechazar Ho. Por lo tanto se

puede afirmar que las varianzas de los tratamientos son homogéneas.



**\*Análisis de Varianza:**

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	817340.01	2	408670.01	1.35	0.2838
Tratamiento	817340.01	2	408670.01	1.35	0.2838
Error	5442077.50	18	302337.64		
Total	6259417.51	20			

**\*Prueba LSD Fisher:**

**Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=617.47871**

Error: 302337.6387 gl: 18

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
C1	1068.04	7	207.82	A
C2	1399.45	7	207.82	B
C3	1538.33	7	207.82	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

**5.1.2 Segunda Fase:**

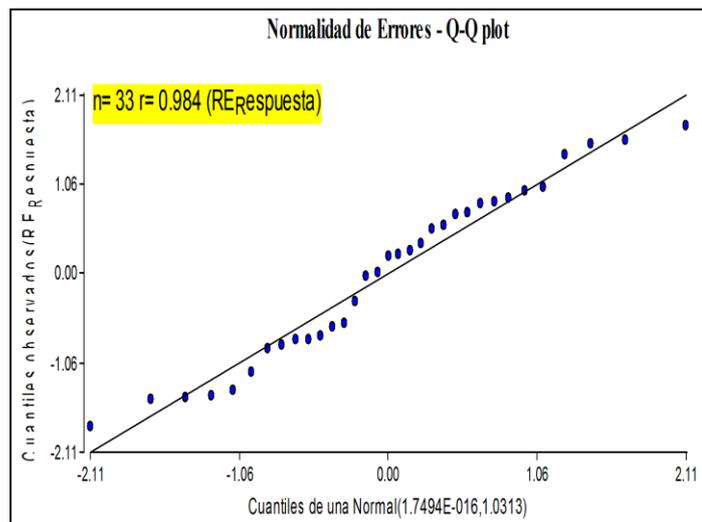
**\*Normalidad de Errores:**

Ho = Los errores poseen distribución normal.

Hp= Los errores no poseen distribución normal.

$\alpha= 0.05$

Conclusión: a un nivel de significación de 0.05 y a un  $r=0.984$ ; no existe evidencia estadística para rechazar Ho.



Por lo que se puede afirmar que los errores poseen distribución normal.

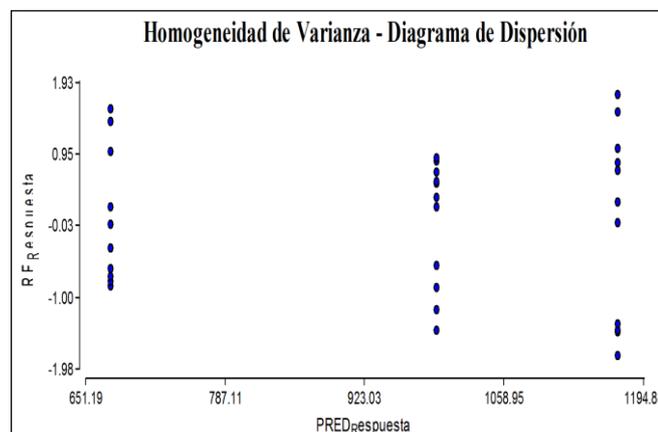
**\*Homogeneidad de Varianza:**

Ho = Las varianzas de los tratamientos son homogéneas.

Hp= Las varianzas de los tratamientos son heterogéneas.

$\alpha= 0.05$

Conclusión: a un nivel de significación de 0.05; no existe



evidencia estadística para rechazar  $H_0$ . Por lo tanto se puede afirmar que las varianzas de los tratamientos son homogéneas.

**\*Análisis de Varianza:**

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1380505.44	2	690252.72	2.21	0.1271
Tratamiento	1380505.44	2	690252.72	2.21	0.1271
Error	9362916.82	30	312097.23		
Total	10743422.26	32			

**\*Prueba LSD Fisher:**

**Test: LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=486.49369**

Error: 312097.2274 gl: 30

Tratamiento	Medias	n	E.E.		
C3	675.90	11	168.44	A	
C1	993.94	11	168.44	A	B
C2	1170.16	11	168.44		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

**5.2. Comparación del crecimiento de la microalga *T. suecica* utilizando tres fertilizantes diferentes como medio de cultivo: el fertilizante elaborado a base de ensilado de residuos de trucha (FBRT), un medio comercial (BAYFOLAN) y un medio inorgánico (Yashima)**

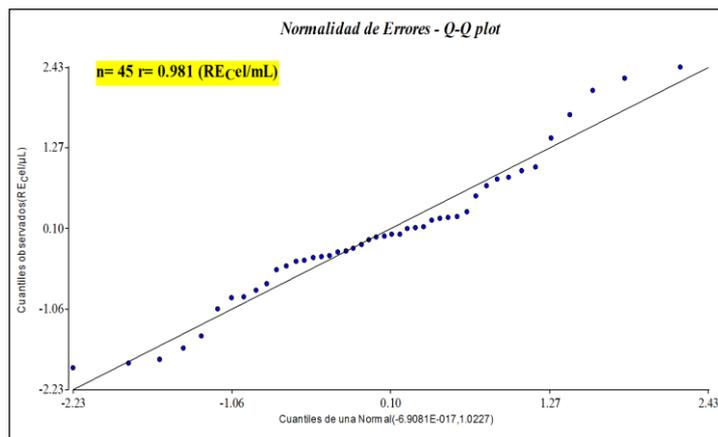
**\*Normalidad de Errores:**

$H_0$  = Los errores poseen distribución normal.

$H_p$  = Los errores no poseen distribución normal.

$\alpha = 0.05$

Conclusión: a un nivel de significación de 0.05 y a un



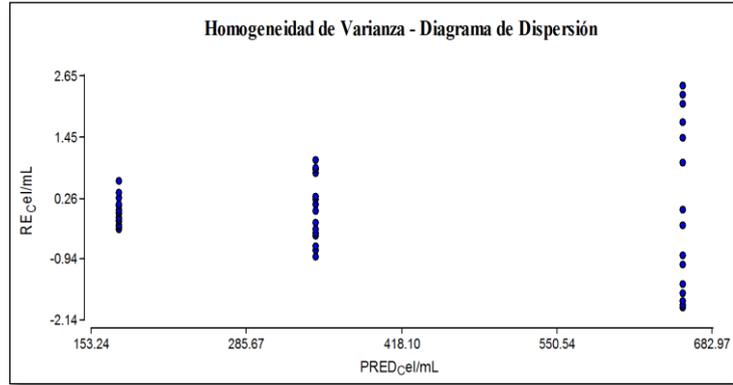
$r=0.981$ ; no existe evidencia estadística para rechazar  $H_0$ . Por lo que se puede afirmar que los errores poseen distribución normal.

**\*Homogeneidad de Varianza:**

$H_0$  = Las varianzas de los tratamientos son homogéneos.

$H_p$  = Las varianzas de los tratamientos son heterogéneas.

$\alpha = 0.05$



Conclusión: a un nivel de

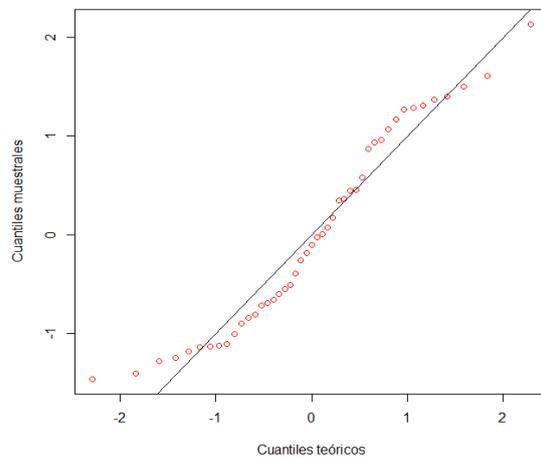
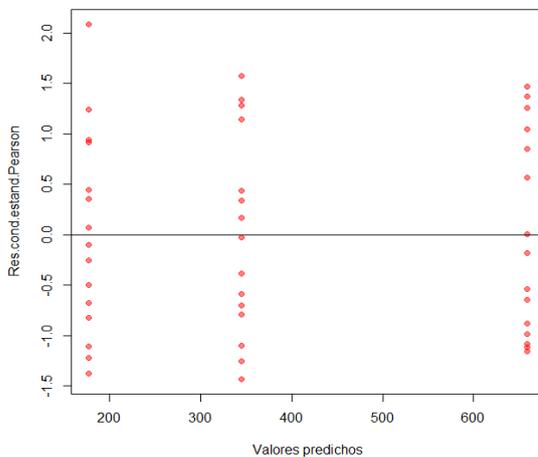
significación de 0.05; existe evidencia estadística suficiente para rechazar  $H_0$ . Por lo que se puede afirmar que las varianzas de los tratamientos son heterogéneas.

Dado que no se cumple con los supuestos de homogeneidad de varianza se procede a utilizar ajuste de modelo, utilizando los valores del criterio de Akaike (AIC), Schwarz (BIC) y la prueba de máxima verosimilitud (LRT).

**Medidas de ajuste del modelo**

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
45	587.52	597.94	-287.76	85.63	0.28	

*AIC y BIC menores implica mejor*



**\*Hipótesis Marginales:**

**Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)**

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	65.08	<0.0001
Tratamiento	2	10.03	0.0003

### \*Prueba LSD Fisher:

#### Cel.mL - Medias ajustadas y errores estándares para Tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

Tratamiento	Medias	E.E.	
FERTILIZANTE	658.89	135.30	A
YASHIMA	345.24	51.50	B
BAYFOLAN	177.32	22.11	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

### 5.3. Determinación de contaminación por protozoarios utilizando tres fertilizantes diferentes como medio de cultivo para el crecimiento de la microalga *T. suecica*

### \*Análisis de Varianza:

#### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
103*Cel/mL	30	0.18	0.12	203.59

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	918386.53	2	459193.26	2.90	0.0726
TRATAMIENTO	918386.53	2	459193.26	2.90	0.0726
Error	4282284.31	27	158603.12		
Total	5200670.84	29			

### \*Prueba LSD Fisher:

#### Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=365.43682

Error: 158603.1225 gl: 27

TRATAMIENTO	Medias	n	E.E.	
BAYFOLAN	54.81	10	125.94	A
YASHIMA	89.81	10	125.94	A
FERTILIZANTE	442.23	10	125.94	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

### Anexo 6; Equipo utilizados en el experimento

<p><b>a</b></p>	<p>Bomba de Vacío</p> <p>Marca: GE motors          HP: 1/6          V: 220          A: 1.45</p>	
<p><b>b</b></p>	<p>Refractómetro Óptico de Mano para Salinidad</p> <p>Marca: ATAGO          Modelo: S-10</p>	
<p><b>c</b></p>	<p>Balanza Analítica</p> <p>Marca: Pionner™ –OHAUS          Precisión: 0.0001g.          Estabilización: ≤ 3s.</p>	
<p><b>d</b></p>	<p>Agitador magnético</p> <p>Marca: CORNING stirrer          RPM: 60-1100          Capacidad: 75lb (34kg)</p>	

<p><b>e</b></p>	<p>Autoclave</p> <p>Capacidad: 50L</p>	
<p><b>f</b></p>	<p>Aire Acondicionado</p> <p>Marca: ALFANO</p> <p>BTU: 14000</p> <p>Área: 20m<sup>2</sup></p>	
<p><b>g</b></p>	<p>Cámara de Neubauer</p> <p>Marca: MARIENFELD</p> <p>Profundidad: 0.1mm</p>	

<p><b>h</b></p>	<p>Microscopio Binocular</p> <p>Marca: NIKON ALPHAPHOT-2 YS2</p>	
<p><b>i</b></p>	<p>Medidor Digital de Luz</p> <p>Marca: EXTECH intruments Modelo: 401025</p>	
<p><b>j</b></p>	<p>Blower</p> <p>Marca: Sweetwater™ HP: 1/3 Hz: 50 Filtro: 1</p>	

**Anexo 7; Flujograma para la elaboración del ensilado de vísceras de trucha**  
(Florez; 2017)

