

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



**CULTIVO DE LA MICROALGA *Chaetoceros gracilis* UTILIZANDO COMO
MEDIO DE CRECIMIENTO AGUA DE COCO MODIFICADA**

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR
EDUARDO ALEXANDER PARRA BARRIENTOS

PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADO EN QUIMICA Y FARMACIA

OCTUBRE, 2015

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTROAMERICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

ING. MARIO ROBERTO NIETO LOVO

SECRETARIA GENERAL

DRA. ANA LETICIA ZA VALETA DE AMAYA

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANA

LIC. ANABEL DE LOURDES AYALA DE SORIANO

SECRETARIO GENERAL

LIC. FRANCISCO REMBERTO MIXCO LOPEZ

DIRECCION DE PROCESO DE GRADUACION

DIRECTORA GENERAL

Lic. María Concepción Odette Rauda Acevedo

TRIBUNAL CALIFICADOR

**COORDINADORA DE AREA DE APROVECHAMIENTO DE RECURSOS
NATURALES**

MSc.Q. Sonia Maricela Lemus Martínez

**COORDINADORA DE AREA DE CONTROL DE CALIDAD DE PRODUCTOS
FARMACEUTICOS Y COSMETICOS**

MSc. Rocío Ruano de Sandoval

DOCENTES ASESORES

Dra. Tania Ethel Cuadra Zelaya

MSc. Mirna Lorena Sorto Álvarez

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a mi Dios Todopoderoso por haberme permitido llegar hasta este momento.

A mí amada Familia por apoyarme siempre en todas las etapas de mi vida, especialmente a mis padres y hermanos.

A mis Docentes Asesores, por su paciencia, confianza, ayuda y cariño.

A mis amigos, que siempre estuvieron a mi lado apoyándome y ayudándome a crecer en todas las etapas de mi vida, especialmente a Susana Salazar quien siempre ha sido como un ángel guardián en mi camino.

A todos los miembros de la Comunidad Universitaria de la Universidad de El Salvador, especialmente a los Laboratoristas del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química y Farmacia. A la Lic. Sandra Peraza por su ayuda y colaboración técnico y científico. Y al Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador, por su apoyo técnico y científico brindado.

A la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, especialmente a la MSc. Olga Lidia Tejada, al Lic. Rodolfo Menjívar y a la Lic. Gudelia Portillo por su ayuda técnico científico y más aún por su muy valiosa amistad.

A todos los miembros de la Estación Acuícola Puerto El Triunfo del Centro de Desarrollo de la Pesca y la Acuicultura (CENDEPESCA) y a los miembros de la Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA) por su apoyo incondicional y su muy valiosa amistad.

Eduardo Alexander Parra Barrientos.

DEDICATORIA

Como fruto de mi esfuerzo este Trabajo de Graduación es dedicado en primer lugar a mi Dios Todopoderoso, quien me ha ayudado todos los días de mi vida, y a mi amada Familia, especialmente a mis Padres José Ricardo Parra Espinoza y Sonia Barrientos de Parra; a mis hermanos Sonia Maribel Parra Barrientos, Reina Lissette Parra Barrientos y José Ricardo Parra Barrientos; y a mis cuñados Jorge Ortiz y Oscar Serrano.

Eduardo Alexander Parra Barrientos

	INDICE	Pág.
Resumen		
Capítulo I		
1.0 Introducción		xvi
Capítulo II		
2.0 Objetivos		
Capítulo III		
3.0 Marco Teórico		21
3.1 Acuicultura internacional e importancia de las microalgas		21
3.2 Acuicultura en El Salvador		23
3.3 Cultivos de microalgas a nivel de laboratorio		24
3.3.1 Infraestructura y equipo		26
3.3.2 Limpieza, esterilización y contaminantes		28
3.3.3 Medios de cultivo		29
3.3.4 Cinética de crecimiento algal		39
3.4 Microalga, <i>Chaetoceros gracilis</i>		41
3.5 Agua de coco, Recurso Natural		44
Capítulo IV		
4.0 Diseño Metodológico		51
4.1 Tipo de estudio		51
4.2 Investigación bibliográfica		51
4.3 Investigación de campo		52
4.4 Parte experimental		52
4.4.1 Condiciones de laboratorio y cultivo preliminar de la microalga		54
4.4.2 Obtención de la Cepa		54
4.4.3 Procedimientos		55

4.4.3.1	Aislamiento y purificación de la microalga por medios químicos (con antibióticos)	55
4.4.3.2	Aislamiento y purificación de la microalga por medio físico	55
4.4.3.3	Cultivo semilla	57
4.4.3.4	Cultivo preliminar	57
4.4.3.5	Cultivo a escala pre-masiva	59
4.4.3.6	Medición de parámetros cinéticos	59
4.4.3.7	Análisis Estadístico	63
Capítulo V		
5.0	Resultados y Discusion de resultados	65
Capítulo VI		
6.0	Conclusiones	87
Capítulo VII		
7.0	Recomendaciones	90
	Bibliografía	
	Anexos	

INDICE DE FIGURAS

FIGURA N°	Pág.
1. Dibujo de vista microscópica de <i>Chaetoceros gracilis</i> .	42
2. <i>Cocos nucifera</i> L.	44
3. Esquema general de la metodología de la investigación	53
4. Purificación de la microalga <i>Chaetoceros gracilis</i> por métodos químicos y físicos.	56
5. Cámara de Neubauer.	60
6. Cuadrantes de Cámara de Neubauer.	60
7. Imagen microscópica (40x) de la microalga <i>Chaetoceros gracilis</i> purificada.	65
8. Cinéticas de los cultivos preliminares de la microalga <i>Chaetoceros gracilis</i> en MACM al 10% (◆) 20% (■), 30% (▲) y 40% (●).	67
9. Cinéticas de los cultivos preliminares de la microalga <i>Chaetoceros gracilis</i> en MACM al 10% (◆) 20% (■), 30% (▲) y 40% (●) reformulados.	70
10. Cinéticas de los cultivos de microalga <i>Chaetoceros gracilis</i> en MACM 10% (◆) y medio F2 de Guillard (—).	74
11. Estructura molecular de la clorofila a y b	80
12. Cinéticas de producción de pigmentos fotosintéticos en el cultivo microalga <i>Chaetoceros gracilis</i> en MACM 10% (◆) y medio F2 de Guillard (—).	81

INDICE DE TABLAS

TABLA N°	Pág.
1. Preparación de 1L de Medio F2 de Guillard.	37
2. Concentraciones de Soluciones Stock y concentración final del Medio F2 de Guillard.	38
3. Composición química del microalga <i>Chaetoceros gracilis</i> a partir de medio F2 de Guillard, en condiciones específicas de estudio.	43
4. Información nutricional del agua de coco, perteneciente al <i>Cocos nucifera</i> L. Composición química del agua de coco, tabla modificada.	46
5. Medios de Cultivo de Agua de Coco Modificada (MACM).	49
6. Comparación de la concentración del MACM al 10%, con respecto al medio F2 de Guillard, para un volumen de 1 L de medio.	49
7. Reformulación de los Medios de Cultivo de Agua de Coco Modificada (MACM).	69
8. Análisis de Varianza de Muestras Aleatorias Independientes (ANOVA) de las densidades celulares obtenidas de los MACM.	71
9. Diferencia Mínima Significativa (LSD) de las densidades celulares obtenidas de los MACM	72
10. Análisis de Varianza de Muestras Aleatorias Independientes (ANOVA) de las densidades celulares obtenidas de los medios de cultivo MACM 10% y medio comercial F2 de Guillard.	75

TABLA N°	Pág.
11. Diferencia Mínima Significativa (LSD) de las densidades celulares obtenidas de los medios de cultivo MACM 10% y medio comercial F2 de Guillard, según los días de cultivo.	76
12. Diferencia Mínima Significativa (LSD) de las densidades celulares obtenidas de los medios de cultivo MACM 10% y medio comercial F2 de Guillard.	77
13. Comparación de los aumentos de la densidad celular en unidades logarítmicas, de resultados de diferentes investigaciones, utilizando <i>Chaetoceros gracilis</i> .	79
14. Análisis de Varianza de Muestras Aleatorias Independientes (ANOVA) para clorofilas a, obtenida de <i>Chaetoceros gracilis</i> cultivada en los medios de cultivo MACM 10% y medio comercial F2 de Guillard.	82
15. Diferencia Mínima Significativa (LSD) de clorofila a, obtenida de <i>Chaetoceros gracilis</i> cultivada en los medios de cultivo MACM 10% y medio comercial F2 de Guillard.	83
16. Análisis de Varianza de Muestras Aleatorias Independientes (ANOVA) para clorofila b, obtenida de <i>Chaetoceros gracilis</i> cultivada en los medios de cultivo MACM 10% y medio comercial F2 de Guillard.	83
17. Análisis de Varianza de Muestras Aleatorias Independientes (ANOVA) para carotenoides totales, obtenidos de <i>Chaetoceros gracilis</i> cultivada en los medios de cultivo MACM 10% y medio comercial F2 de Guillard.	84
18. Diferencia Mínima Significativa (LSD) para carotenoides totales, obtenidos de <i>Chaetoceros gracilis</i> cultivada en los medios de cultivo MACM 10% y medio comercial F2 de Guillard.	85

INDICE DE ANEXOS

ANEXO N°

1. Materiales, equipo, medios y reactivos.
2. Promedios de los datos experimentales.
3. Solicitudes, peticiones y certificados.

ABREVIATURAS

ANOVA: Análisis de Varianzas de Muestras Aleatorias Independientes.

CENDEPESCA: Centro de Desarrollo de la Pesca y la Acuicultura.

CENTA: Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal.

EDTA: Acido EtilenDiaminoTetraAcético.

FUSADES: Fundación Salvadoreña para el Desarrollo Económico y Social.

JICA: Agencia de Cooperación Internacional del Japón.

LGAP: Ley General de Actividades Pesqueras.

LSD: Diferencia Mínima Significativa.

MACM: Medio de Agua de Coco Modificado.

MAG: Ministerio de Agricultura y Ganadería.

PIB: Producto Interno Bruno.

TRISMA BASE: Tris-(Hidroximetil)-aminometano.

UES: Universidad de El Salvador.

RESUMEN

El Ministerio de Agricultura y Ganadería a través del Centro de Desarrollo de la Pesca y la Acuicultura y con el apoyo de la Agencia de Cooperación Internacional del Japón realiza diferentes proyectos como el de “Desarrollo de la Acuicultura de Moluscos en la República de El Salvador”. En este proyecto se cultivan microalgas para la alimentación de los moluscos, las cuales son cultivadas en el medio de cultivo comercial F2 de Guillard, el cual es adquirido por medio del convenio, por lo que su adquisición una vez terminado este, podría convertirse en una problemática para el Ministerio, por lo que se debe gestionar a otras instancias.

Una medida para contrarrestar o minimizar esta problemática podría ser utilizar recursos propios con los que cuente El Salvador, uno de estos recursos es el agua de coco, la cual presenta gran similitud con el medio comercial F2 de Guillard, ya que posee muchos de los nutrientes como fosfatos, fuentes de nitrógeno, metales traza, vitaminas del complejo B, entre otros, lo cual lo hace comparable con el medio comercial, además que es un recurso altamente disponible en El Salvador.

Por esto se propuso el objetivo de cultivar la microalga *Chaetoceros gracilis* utilizando como sustrato un Medio de Agua de Coco Modificada, se formularon medios a concentraciones de 10%, 20%, 30% y 40% de agua de coco, obteniéndose mejores resultados a una concentración del 10%. Luego se realizó una comparación del medio al 10%, con el medio comercial F2 de Guillard obteniéndose una producción máxima de biomasa de *Chaetoceros gracilis* para el día 5 en los dos medios de cultivos. Los valores promedio máximos de densidad celular fueron de 3.19×10^6 cel/mL en el Medio de Agua de Coco Modificado al 10% y de 5.25×10^6 cel/mL en el medio comercial F2 de

Guillard, estos resultados reflejan que en el Medio de Agua de Coco Modificado al 10% es posible obtener aproximadamente un 61% de la densidad celular de *Chaetoceros gracilis* de lo obtenible en el medio comercial F2 de Guillard.

Por otro lado, los resultados cinéticos de °Brix, salinidad, pH y pigmentos fotosintéticos sugieren que existe la necesidad de seguir investigando a otras condiciones y con otras microalgas, aprovechando la factibilidad de uso del agua de coco en estos cultivos.

CAPITULO I
INTRODUCCION

1.0 INTRODUCCION

En El Salvador el desarrollo de la Acuicultura es creciente, como fuente de trabajo y recursos para la población salvadoreña. Por esta razón el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), a través del Centro de Desarrollo de la Pesca y la Acuicultura (CENDEPESCA) y con el apoyo de la Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA), desarrolla diferentes proyectos como el de “Desarrollo de la Acuicultura de Moluscos en la República de El Salvador”. Este proyecto se desarrolla en la zona de la bahía de Jiquilisco, departamento de Usulután. En el desarrollo de este proyecto se cultivan además de moluscos, microalgas, las cuales son utilizadas para la alimentación de los moluscos, desde larva hasta semilla para engorde ^(10; 11; 13).

En el Laboratorios de Producción de Moluscos de CENDEPESCA, se preparan medios de cultivo para microalgas, elaborados con kits comerciales comprados en el extranjero por JICA e importados y donados a El Salvador, los cuales tiene altos costos; estos poseen vitaminas, minerales y fertilizantes, combinados de tal forma que se obtengan medios de composición similar al medio F2 de Guillard ^(10; 11; 13).

En el presente trabajo de Investigación se evaluó la utilización de agua de coco como nutriente de alta disponibilidad para la elaboración de un medio de cultivo para el desarrollo de la microalga *Chaetoceros gracilis*.

Se realizaron experimentos en condiciones de laboratorio, en los cuales se formularon y pusieron a prueba los medios de agua de coco modificado (MACM) a concentraciones de 10%, 20%, 30% y 40% de agua de coco, con adición de metasilicato de sodio y Tris-(Hidroximetil)-aminometano.

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente utilizando ANOVA y LSD. Los resultados estadísticos demostraron que es posible cultivar la

microalga *Chaetoceros gracilis* en todos los medios de agua de coco modificado, pero que el MACM al 10% presento mejores resultados en el cultivo de la microalga, por esta razón se seleccionó para ser comparado con el medio comercial F2 de Guillard.

Se realizó un estudio comparativo entre el medio comercial F2 de Guillard y el MACM al 10%, se evaluaron parámetros de cinéticas de crecimiento, pH, °Brix, salinidad y pigmentos fotosintéticos (clorofila a, b y carotenoides totales).

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente utilizando ANOVA y LSD, se determinó que el día 5 fue el día de máxima producción de biomasa en los cultivos de *Chaetoceros gracilis* para los medios comparados. Obteniéndose valores promedio máximos de densidad celular de 3.19×10^6 cel/mL de *Chaetoceros gracilis* en el Medio de Agua de Coco Modificado al 10% y de 5.25×10^6 cel/mL de *Chaetoceros gracilis* en el medio comercial F2 de Guillard, estos resultados reflejan que en el Medio de Agua de Coco Modificado al 10% es posible obtener aproximadamente un 61% de la densidad celular de *Chaetoceros gracilis* de lo obtenible en el medio comercial F2 de Guillard.

Con estos resultados podemos decir que es posible cultivar la microalga *Chaetoceros gracilis* en medios de cultivo de agua de coco modificado, obteniéndose que el agua de coco es una posible alternativa para la elaboración y formulación de medios de cultivo para el desarrollo de microalgas.

Los experimentos se realizaron en las instalaciones del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química y Farmacia, de la Universidad de El Salvador (UES), durante el periodo de Enero 2014 a Agosto 2015.

CAPITULO II
OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

2.1.1 Cultivar la microalga *Chaetoceros gracilis* utilizando como medio de crecimiento agua de coco modificada.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

2.2.1 Sembrar la microalga *Chaetoceros gracilis*, en medios de cultivo de agua de coco modificada a concentraciones de 10%, 20%, 30% y 40%

2.2.2 Cuantificar el crecimiento de *Chaetoceros gracilis*, en los medios de cultivo propuestos, por medio de cámara de Neubauer.

2.2.3 Determinar los cambios en los parámetros de pH, salinidad y grados Brix en los cultivos de *Chaetoceros gracilis*.

2.2.4 Cuantificar la producción de clorofila a, b y carotenoides totales, obtenidos de *Chaetoceros gracilis*, por método espectrofotométrico UV/VIS, al ser cultivada en los medios de cultivo y condiciones propuestas.

2.2.5 Comparar la producción de biomasa, clorofila a, b y carotenoides totales obtenidos de *Chaetoceros gracilis*, al ser cultivada en el medio de cultivo de agua de coco modificada seleccionado y el medio F2 de Guillard.

CAPITULO III
MARCO TEORICO

3.0 MARCO TEORICO

3.1 ACUICULTURA INTERNACIONAL E IMPORTANCIA DE LAS MICROALGAS.

La producción, más o menos controlada, de especies acuáticas, aun cuando pueda dar la impresión de ser una práctica moderna, debido al uso – y abuso – que en los últimos años se está haciendo del término Acuicultura, tiene casi la misma antigüedad que los demás sistemas de producción de alimentos utilizados por el nombre: la agricultura y la ganadería ⁽⁹⁾.

El cultivo de microalgas y el uso práctico de su biomasa como fuente de algunos compuestos tiene su origen en Alemania durante la Segunda Guerra Mundial. La industria de las microalgas comenzó en los años 60 con el desarrollo de los procesos de *Chlorella*, siguiendo en los años 70 con *Spirulina* (una cianobacteria) y en los años 80 con *Dunaliella salina*. Desde la década de los noventa del pasado siglo se ha venido realizando las primeras investigaciones y cultivos de las microalgas diatomeas bentónicas en algunos países de Latinoamérica con el objetivo de ser usadas en el maricultivo ⁽³⁾.

Muchas de estas investigaciones, estudios y cultivos se han realizado buscando conocer más de las microalgas, sus diferentes características nutricionales, metabolitos que elaboran, formas y requerimientos para su cultivo, diferentes funciones en el medio ambiente, entre otras. Gracias a estos estudios se conoce una de las funciones ecológicas más llamativas de las microalgas, que es la de transformar la materia inorgánica presente en las aguas, en materia orgánica, la cual puede ser utilizada como alimento para otros organismos, de ahí su gran importancia en acuicultura y medio ambiente, ya que de esta manera ingresa mucho del material orgánico a las cadenas tróficas, o producción primaria.

Las microalgas y cianobacterias mayormente cultivadas para uso comercial son la *Chlorella*, *Spirulina*, *Dunaliella*, *Nannochloris*, *Scenedesmus*, *Nitzschia*, *Cryptocodinium*, *Schizochytrium*, *Skeletonema*, *Isochrysis* y *Chaetoceros* ⁽¹⁸⁾.

Las microalgas son la principal fuente de alimento para los primeros estadios larvales de varias especies de crustáceos y de peces y son el único alimento utilizado en los criaderos para alimentar a bivalvos y larvas ⁽⁴⁷⁾. Los cultivos de microalgas son conocidos como “cultivos de apoyo” o “cultivos anexos”, y son primordiales en el desarrollo de los “cultivos principales” esto es para los moluscos durante todo su ciclo de vida, crustáceos y peces en su etapa larvaria. Las altas concentraciones de proteínas, carbohidratos, ácidos grasos y vitaminas presentes en las microalgas las hace fundamentales para la alimentación del zooplancton, larvas y estadios juveniles de moluscos, crustáceos y ciertos peces herbívoros ⁽⁴³⁾.

Al hablar de microalgas nos referimos a aquellos microorganismos que contienen clorofila y otros pigmentos fotosintéticos, capaces de realizar fotosíntesis. Este término no tiene sentido taxonómico alguno y dentro del mismo se incluyen organismos con dos tipos celulares distintos (cianobacterias que tienen estructura celular procariota y las restantes microalgas con estructura celular eucariota). Pese a las grandes diferencias estructurales, fisiológicamente, ambos tipos de microalgas eucariota y procariota son similares, con un metabolismo fotosintético similar al de las plantas superiores. La reproducción es generalmente por división binaria con tiempos de duplicación de una hora o menos para los procariotas cianobacterias y de 8 a 24 horas o más para las eucariotas. Estos organismos fotosintetizadores son considerados como los productores primarios de biomoléculas sintetizadas a partir de la transformación de energía luminosa, a energía química. Son organismos unicelulares los cuales dependiendo de la composición de su pared

celular, el tipo de clorofila y de los pigmentos accesorios, entre otras características utilizadas para clasificarlas, permiten que de tal diversidad se puedan seleccionar aquellas que puedan cultivarse ⁽⁴⁵⁾.

No todas las especies de microalgas, son fotoautótrofas, algunas son heterótrofas, debido a que no requieren de luz y toman la energía de compuestos orgánicos tales como los azúcares y ácidos orgánicos, de igual forma muchas otras especies son mixotróficas, esto es que pueden reproducirse en presencia de luz o en la oscuridad ⁽⁴⁵⁾.

3.2 ACUICULTURA EN EL SALVADOR

Según el Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), en El Salvador el sector agropecuario ha sido uno de los más importantes en términos de aporte al Producto Interno Bruto (PIB), ya que más del 70% del valor agregado industrial es de origen agropecuario según datos de la Fundación Salvadoreña para el Desarrollo Económico y Social (FUSADES), en 1994, por esta razón es un área muy importante para el desarrollo económico de la nación ⁽²⁸⁾.

El país cuenta con dos instituciones oficiales dedicadas al desarrollo de la tecnología agropecuaria: el Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA) y el Centro de Desarrollo para la Pesca y la Acuicultura (CENDEPESCA), este último está orientado al desarrollo de la pesca y la acuicultura, mediante la conducción de investigaciones y prestaciones de asistencia a los pescadores artesanales ⁽²⁸⁾.

Dentro de las actividades de acuicultura que se desarrollan en El Salvador se tiene la extracción de moluscos, crustáceos y peces, dentro de las cuales la de moluscos representa la principal fuente de ingresos para numerosas familias, lo cual ha dado lugar a la sobre explotación de dicho recurso, disminuyendo las

producciones naturales, volviéndose no solo un problema de deterioro ambiental, sino también un problema social ⁽¹³⁾.

También hay que considerar que en El Salvador, hay buena aceptación del consumo de moluscos y crustáceos, comparado con otros países vecinos. En los años 80's durante el conflicto armado, hubo una gran migración hacia la costa de parte de la población salvadoreña y la primera actividad productiva fue la extracción de moluscos; luego con los años se empezó a ver rápidamente, la disminución de estos recursos ⁽¹³⁾.

Bajo esta situación, el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), a través del Centro de Desarrollo de Pesca y Acuicultura (CENDEPESCA), ha implementado diversos proyectos para el desarrollo de la acuicultura, dentro de los cuales está el Proyecto para el Desarrollo de la Acuicultura de Moluscos en la República de El Salvador desde enero de 2005 con una duración de 3 años y 2 años de tiempo de prórroga hasta enero de 2015, con el apoyo del gobierno japonés, a través de la Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA). Este Proyecto fue ejecutado en la Bahía de Jiquilisco, Departamento de Usulután y también en la zona costera del Departamento de La Unión, donde muchos ribereños se dedican a la pesca artesanal, principalmente en la recolección de conchas y ostras y el nivel de ingreso económico de las familias es más bajo que en otros lugares del país ^(10; 13). Este proyecto se realizó con el objetivo de “Proponer el modelo de mejoramiento de la calidad de vida por medio de las actividades de la acuicultura de moluscos principalmente, basadas en la conciencia de manejo de los recursos naturales” ⁽¹⁰⁾.

3.3 CULTIVOS DE MICROALGAS A NIVEL DE LABORATORIO

El cultivo de microalgas es primordial en el desarrollo de todo laboratorio acuícola, donde se tengan cultivos de especies marinas, como crustáceos,

moluscos y peces en etapa larvaria. Ya que las microalgas son las que mayoritariamente constituyen la biomasa de océanos, estuarios, lagos y reservorios, desempeñando en la naturaleza el papel de fuente primordial de alimentación natural de especies marinas, por esta razón son las más utilizadas para la alimentación de especies acuáticas ⁽⁴⁵⁾.

El desarrollo de los métodos de cultivos de microalgas comenzó a fines del siglo XIX (1870-1880), los primeros intentos por hacer crecer algas bajo condiciones artificiales comenzó a fines del siglo pasado, influenciado por el descubrimiento que las plantas superiores podrían crecer exitosamente en una mezcla de soluciones minerales (cultivos hidropónicos) ⁽²²⁾. De ahí se conoce que el crecimiento microalgal se rige por la ley del mínimo, es decir el factor limitante del crecimiento es aquel que está presente en cantidades más próximas al mínimo crítico necesario para la microalga. Es importante conocer las condiciones óptimas y los límites de tolerancia de una microalga, para todos o el mayor número de parámetros. Ahora bien estas condiciones o límites para un parámetro, generalmente cambian cuando un segundo parámetro fluctúa ⁽⁴⁵⁾.

En el cultivo de microalgas, el rendimiento alcanzado, depende tanto de la concentración de las células en el cultivo, como del grado en que las células pueden desarrollar su potencial de crecimiento. Por tanto para conseguir un cultivo de microalgas, en crecimiento activo, es necesario un inóculo viable de tamaño mínimo, suministro de nutrientes y micro elementos, adecuadas condiciones químicas y físicas, luz, aireación, temperatura, salinidad, energía, entre otras ⁽⁴⁵⁾.

Para cultivar microalgas es necesario considerar la infraestructura, el equipo a utilizar, presencia de otros organismos, medios de cultivo y nutrientes, características de cada microalga, cinéticas de crecimiento, escalas y tipos de cultivos, entre otras cosas.

3.3.1 INFRAESTRUCTURA Y EQUIPO

Se necesitan diferentes condiciones para obtener un crecimiento óptimo de las diferentes especies de microalgas. También se debe mencionar que más que la influencia de un solo parámetro es el conjunto de parámetros lo que crea determinadas respuestas en el crecimiento de las microalgas, es decir que para evaluar un método de cultivo de microalgas es necesario considerar los diferentes parámetros físicos en los cuales se realizara en ensayo y/o el cultivo de las microalgas ^(11; 45).

Bajo condiciones de laboratorio el crecimiento de microalgas va a depender de si las condiciones ambientales son propicias o adecuadas. Por lo que es necesario contar con una infraestructura y equipamiento adecuado ^(10; 11; 21; 22).

A continuación se describen algunos aspectos preferentes para el cultivo de microalgas:

PIEZAS DE CULTIVO: Deben estar suficientemente aisladas térmicamente para mantener una temperatura estable dentro de un rango dado, dependiendo de los requerimientos de la investigación. Cualquier laboratorio puede ser útil para el cultivo de microalgas si existe un sistema central de aire acondicionado que mantenga el sitio escogido a una temperatura óptima ^(22; 45).

Las microalgas de interés para cultivo generalmente son especies tropicales que crecen óptimamente a temperaturas de 16 a 27 °C, hay que considerar que las temperaturas arriba de 35 °C provocarían que la mayoría de las microalgas colapsaran ⁽⁴²⁾. La tolerancia a altas temperaturas aumenta si esta enriquecido el medio con vitaminas o factores de crecimiento ^(21; 45).

ESTANTES: Deben ser en lo posible metálicos, con bandejas perforadas para permitir la libre circulación del aire, o de vidrio, susceptibles a ser limpiados con

facilidad periódicamente. Y así evitar problemas de contaminación, sin embargo un estante metálico soporta más recipientes de cultivo ^(10; 11; 22).

ILUMINACION: Cada bandeja donde van los cultivos deben estar iluminadas por tubos fluorescentes, los tubos que generalmente se utilizan para el cultivo de microalgas son de luz fría o luz día, ya que estos simulan mejor el rango de longitud de onda (300-700 nm) necesarios para la fotosíntesis. Las microalgas son organismos fotoautótrofos, encargados de convertir la energía luminosa en metabólica, por medio de la fotosíntesis. Los periodos de exposición a la luz pueden ser continuos o discontinuos. Los continuos usando luz artificial, o discontinuos por medio de luz natural, en el ciclo día noche o por luz artificial en ciclo con reloj control ^(10; 11; 21; 22; 45; 45; 47).

Al utilizar luz artificial hay que considerar que la luz aumenta la producción hasta la saturación pero esta disminuye cuando parte del cultivo se hace sombra a sí mismo. La calidad de la luz puede afectar al crecimiento, reproducción y morfología de una determinada clase de microalgas, en cada caso se busca el espectro más favorable hasta encontrar la cantidad de energía radiante óptima para el crecimiento de la especie, esta variara con la cantidad de nutrientes, densidad celular, profundidad, forma de cultivo, etc. algunas bibliografías hacen referencia a que para el cultivo en tubos es necesario 300-1000 lux, para cultivos a volúmenes de 100-200 mL de 1000-2000 lux, para cultivos a volúmenes de 1000-2000 mL o mayores de 5000 y 10,000 lux ^(11; 22; 45; 46; 47). Hay que considerar que la intensidad de luz podría ser un factor limitante si esta sobrepasa los niveles de saturación, esto podría producir fotoinhibición ⁽²¹⁾. Para cultivos rutinarios de microalgas generalmente se utiliza una densidad de flujo fotónico entre $60-70 \mu\text{m} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-2}$ y para mantención de $20 \mu\text{m} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-2}$ es necesario tener en mente que la eficiencia de los tubos fluorescentes decrece con el tiempo por esta razón es necesario cambiarlos periódicamente. Estudios

indican que al realizar cultivos con luz artificial, se obtienen mejores resultados de biomasa, y densidad celular al utilizar luz blanca (10; 11; 21; 22; 45; 46; 47).

CAMARAS DE TRANSFERENCIA: El principal propósito de estas cámaras es crear un espacio con el mínimo de polvo y contaminantes, para realizar los pases a los medios de cultivo. Ejemplo de estas son las cabinas de flujo laminar, limpiar las superficies con alcohol 70% (22).

RECIPIENTES DEL CULTIVO: En general los recipientes utilizados para los cultivos son de vidrio, y dentro de estos los de borosilicato son los preferidos. En el caso en particular para microalgas diatomeas que poseen impregnación de sílice, podrían usarse de otro material como poliestireno (11; 21; 22).

IMPLEMENTOS DE INOCULACION: Como implementos de inoculación pueden usarse implementos metálicos como pinzas de punta fina estéril, asa de siembra, y de vidrio espátulas, pipetas Pasteur y varillas (22).

Hay que considerar que todo el material a utilizar se debe de lavar bien, y si es necesario lavar con solución de ácido crómico, o sulfocrómico, todo el material debe estar estéril para evitar contaminación.

AIREACIÓN Y/O AGITACIÓN: Los parámetros presentan interacción entre sí, ya que tanto la aireación como la agitación aseguran la distribución homogénea de las células y de los nutrientes dentro del cultivo, dejándolos disponibles para su mejor aprovechamiento, mejora la distribución de la luz a las células, asegurando que permanezcan fotosintéticamente activas, evitando que se sedimenten y previene una estratificación térmica (11; 22).

3.3.2 LIMPIEZA, ESTERILIZACION Y CONTAMINANTES

Es necesario tener algunas precauciones al momento de realizar cultivo de microalgas, conocer la metodología y procedimiento de manejo, utilizar medios

y equipos estériles, trabajar en áreas desinfectadas, y siempre mantener la utilización de buenas prácticas de laboratorio.

Se recomienda lavar bien y esterilizar los equipos a utilizar, limpiar los estantes con alcohol o un agente desinfectante, no se recomienda utilizar cloro porque este podría inhibir el desarrollo de las microalgas. En el caso de las microalgas se recomiendan los 4 tipos de esterilización, tanto por calor húmedo (autoclave), calor seco, filtración y radiación ^(11; 22).

3.3.3 MEDIOS DE CULTIVO

En general un medio de cultivo debe proporcionar los requerimientos de la especie a cultivar, tales como agua, sales minerales (macro y micronutrientes) una fuente de nitrógeno, pH adecuado, y en algunos casos compuestos orgánicos o factores de crecimiento (vitaminas, hormonas).

Los componentes químicos para preparar el medio de cultivo deben de ser de buena calidad. Es necesario recordar que las cantidades de los nutrientes en el medio de cultivo juegan un papel crucial para el desarrollo de las microalgas.

Para que los medios de cultivo sean lo más efectivos posibles es necesario considerar los nutrientes necesarios que las algas necesitan para su desarrollo.

Una forma de clasificar los medios de cultivo es por su composición dentro de los cuales tenemos los medios definidos también conocidos como medios artificiales, los cuales su composición química es conocida, y también los medios no definidos dentro de los cuales tenemos los medios naturales, en estos es necesario controlar las características como el pH ya que muchas microalgas crecen solo a pH alcalinos. Los medios enriquecidos, son medios naturales a los que se le adicionan sales minerales, y en algunos casos factores de crecimiento que ayuden al crecimiento algal. Sin embargo si el medio posee

un alto contenido de material orgánico propicia la proliferación de bacterias ^(21; 45). Un ejemplo de medio de enriquecimiento tenemos el F2 de Guillard, fertilizantes, biodigeridos, aguas de desechos y residuos agroindustriales.

ESCALAS Y TIPOS DE CULTIVO DE MICROALGAS: Existen diferentes escalas en las cuales se cultivan las microalgas, normalmente se consideran dos principales, a escala de erlenmeyer o cultivo de matraces en que se considera que queda introducido el cultivo pre-masivo; y el cultivo masivo, el cual se realiza en tanques especiales de grandes dimensiones o estanques naturales. La producción masiva de microalgas para la alimentación de larvas de especies marinas en laboratorios comerciales representa una fracción considerable del costo total de operación de los laboratorios, debido a la necesidad de mano de obra calificada, de infraestructura adicional, y de varios productos químicos que se requieren para este proceso motivo por el cual es necesario investigar nuevas técnicas y nuevos medios de cultivo e influyan directa o indirectamente en la reducción de costos ^(21; 45).

Además el desarrollo de un medio de cultivo para microalgas depende de los requerimientos y exigencias de calidad de los elementos que lo componen, según su naturaleza los cultivos se pueden clasificar en cultivos intensivos en los cuales los factores de crecimiento se tienen bajo control de modo tal que se obtiene una máxima respuesta de la producción de la población algal. También en cultivos extensivos, estos son los cultivos en los cuales solo se controlan las variables más accesibles en el manejo técnico tales como las características químicas de los medios, la densidad del cultivo y la intensidad de la luz ⁽²¹⁾.

Independientemente de esta clasificación, también se puede clasificar según la forma de cosecharlas, así tenemos los cultivos discontinuos (BATCH) en los cuales las poblaciones van pasando por las distintas fases de crecimiento, ajustándose generalmente a una función logística. Esto produce cambios en la

población a medida que va transcurriendo el tiempo. Estos tienen la ventaja de ser más fáciles de manejar y son adecuados para estudiar las cinéticas de crecimiento y los parámetros que inciden en el crecimiento celular. Esta supone la recolección completa del cultivo y es la forma más simple de operar aunque supone también más trabajo que otros sistemas, la carga de nutrientes y la luz son proporcionadas al principio del cultivo aun cuando pueden realizarse ajustes de luz en las primeras fases del cultivo de microalgas. También tenemos en esta clasificación el cultivo continuo y el semi-continuo, donde el continuo es aquel en el que se mantiene la fase exponencial durante largo periodo de tiempo, así como las características químicas del medio, la temperatura y la luz son sostenidas en un valor constante. La ventaja de este tipo es que muestras tomadas en distintos tiempos son idénticas, para ello hay que añadir nutrientes en la misma medida en que son utilizados por las microalgas para mantener los parámetros de crecimiento y la población celular a nivel constante. Y en el caso de los semi-continuos, se presenta la combinación de los dos métodos anteriores, en este tipo de cultivo parte del volumen se recoge para su utilización, generalmente al final de la fase exponencial y la cantidad que se retira se reemplaza con el medio de cultivo fresco ^(21; 45).

También los podemos clasificar según la pureza del medio de cultivo en cultivos axénicos, donde las poblaciones algales se mantiene libres de bacterias, y cultivos monoespecíficos, en estos la población de microalgas se encuentran con una pequeña carga bacteriana, estos son los más utilizados industrialmente, debido a que es difícil mantener cultivos sin bacterias, en muchos casos los cultivos monoespecíficos son mejores porque existe una interacción alga/bacterias, aunque también hay que considerar que la existencias de bacterias genera mayor consumo de nutrientes, y podría ser que hiciera no aptas para su utilización a las microalgas ⁽²¹⁾.

NUTRIENTES Y REQUERIMIENTOS: Dentro de los requerimientos químicos necesarios para un buen crecimiento de las microalgas en cultivo, se encuentran entre otras cosas el balance entre los macronutrientes específicos y los micronutrientes. Un desbalance en la proporción suministrada de estos nutrientes, invariablemente se manifiesta ya sea como un descenso en el crecimiento o hasta la detención del mismo ⁽⁴⁵⁾.

Otro aspecto a considerar es la disminución de la fuente de nutrientes como factor importante limitativo en el cultivo y como control de calidad nutricional en los denominados cultivos masivos ⁽⁴⁵⁾.

Por macronutrientes se consideran la fuente de nitratos, fosfatos y en el caso de las diatomeas la adición de silicatos. Con respecto a los micronutrientes son aquellos que se suministran en poca cantidad, trazas en comparación con los macronutrientes, pero no por ello menos importantes. Se sabe que en soluciones alcalinas algunos metales se precipitan, agentes quelantes, tales como el Ácido Etilen-diamino-tetracético (EDTA) se utilizan para mantener los metales en solución, haciéndolos disponibles para las microalgas. Además de los macró y los micronutrientes existen otras sustancias que son requeridas por las microalgas para obtener mejor crecimiento. La mayoría de las microalgas son auxotróficas esto es que no son capaces de sintetizar todas las vitaminas necesarias y tienen que asimilarlas del medio. La tiamina (vitamina B₁), la cianocobalamina (vitamina B₁₂) y la biotina (vitamina B₆) son consideradas esenciales para la mayoría de las microalgas. De hecho se ha estimado que cerca del 70 de todas las microalgas planctónicas, requieren de cianocobalamina (vitamina B₁₂) ⁽⁴⁵⁾.

Para proporcionar estos nutrientes se debe seleccionar el medio de cultivo que se va a utilizar. El agua marina es un medio de cultivo ideal para el crecimiento de las microalgas marinas, sin embargo es necesario enriquecerla con

nutrientes. Los medios de cultivo son muy diversos pero todos coinciden en una fuente principal de nitrógeno, fósforo y una mezcla de metales traza, con solución de quelante y vitaminas ^(11; 45). En un cultivo a exterior la salinidad se convierte en el parámetro control en el crecimiento de la microalga. Para la mayoría de las microalgas la tolerancia a la salinidad es bastante amplia entre 12 - 40%. Con un óptimo hacia 20%, dependiendo la respuesta a sus variaciones de la concentración relativa de algunos iones, de la concentración total de iones. La salinidad afecta la composición química y por tanto al valor nutritivo, por esta razón es recomendable la utilización de agua de mar estéril para la preparación de los medios de cultivo ^(21; 45).

Existen diversas formulaciones de medios de cultivo algunos de estos han sido seleccionados de diferentes por sus diferentes nutrientes y rendimientos de desarrollo. De igual forma se han formulado medios específicos para algunas especies de microalgas. Además es práctica común que a partir de un medio formulado, se realicen modificaciones empíricamente hasta que se satisfagan los requerimientos de diversas microalgas, utilizadas para investigación.

La tasa de oxígeno (O_2) y bióxido de carbono (CO_2) suministrado al cultivo puede convertirse en un factor limitativo en el cultivo, ya que las microalgas utilizan el CO_2 para realizar la fotosíntesis ^(22; 45; 46).

El pH también es un valor a controlar para el buen cultivo de microalgas, valores de 7-9 son adecuados, dependiendo de la especie. Por el mismo crecimiento del cultivo (fotosíntesis) se llegan a valores superiores a 9 y esto repercute en el crecimiento del cultivo, para controlar el pH se pueden hacer adiciones de CO_2 vigilando que no sea excesivo porque podría bajar demasiado el pH y esto podría ser fatal para la microalga ^(21; 46).

El bióxido de carbono (CO_2) y el bicarbonato de sodio (NaHCO_3) pueden afectar el pH del cultivo así que este debe ser revisado periódicamente para mantenerlo en condiciones óptimas. Como se ha mencionado, las microalgas utilizan bióxido de carbono para la fotosíntesis y liberan oxígeno. A escala comercial el bióxido de carbono es inyectado en los cultivos durante los periodos de luz. Sin embargo en cultivos utilizados para acuicultura, una aireación moderada es suficiente ⁽⁴⁵⁾.

Un alta o baja excesiva en el pH disminuye el crecimiento de la microalga por el rompimiento de muchos procesos celulares. Si el nitrógeno no es suministrado al cultivo como sal de amonio la mayoría de las microalgas selectiva mente tomaran el ion amonio provocando una baja en el pH. Si los iones nitratos son eliminados por el alga, el pH tiende a incrementarse ⁽⁴⁵⁾.

En el caso de las diatomeas, al ser bentónicas, es necesario la adición de silicatos ya que estas microalgas los necesitan para su desarrollo.

Además de los factores físicos y químicos mencionados anteriormente otro aspecto importante a considerar en el cultivo de microalgas es la asociación de estas con las bacterias, la cual comienza a ser mejor entendida. Se ha sugerido que el mejor crecimiento se da en cultivos libres de bacterias, condiciones que son difíciles y costosas de conseguir. Sin embargo parece ser que muchas especies de microalgas crecen mejor en asociación con las bacterias. En los casos en los que esto se ha podido observar se sabe que se debe a la producción de cianocobalamina (vitamina B_{12}) que lleva acabo la bacteria y que la proporciona a la microalga ⁽⁴⁵⁾.

Uno de los aspectos más importantes a tener en cuenta en la producción de microalgas, es el de seleccionar el medio de cultivo química y económicamente apropiado para utilizar en los diferentes volúmenes del sistema de producción

masiva. Cuando se trabaja con volúmenes grandes, el interés radica generalmente en el uso de fertilizantes de bajo costo y que, a su vez, aseguren altas densidades de los cultivos y buena calidad nutricional de las células que van a constituir el alimento de las larvas ^(24; 45).

Las principales consideraciones que se deben tener en cuenta para formular medios de cultivo para microalgas son:

Primero la salinidad del medio de cultivo; principalmente depende de origen ecológico de las microalgas, buscando adaptar el medio a las condiciones naturales de desarrollo de las microalgas. Segundo la fuente de nitrógeno, (nitratos, amonía y urea son ampliamente usados como fuente de nitrógeno), tercero la composición y concentración de minerales como potasio, magnesio, sodio, calcio, sulfato y fosforo. En el caso del carbono inorgánico, este es normalmente provisto como bióxido de carbono (CO_2), del 1 – 5 % mezclado con aire, o bien a partir de bicarbonato de sodio (NaHCO_3). Quinto el pH, normalmente se usan pH óptimos para el desarrollo propio de cada microalga. Sexto los elementos traza se estabilizan por medio de la utilización de agente quelantes como el EDTA o citratos. Y por último las vitaminas: principalmente tiamina y cobalamina.

MEDIO F2 DE GUILLARD: Es un medio de cultivo de microalgas que se prepara en agua de mar común y filtrada. Es utilizado especialmente para el cultivo de diatomeas. La concentración de la formulación original, denominada "F Medium" o medio F, se ha reducido a la mitad y realizaron algunos cambios, porque se comprobó que esto era mejor para el cultivo adecuado de microalgas, dicha composición se encuentra en la Tabla N° 2.

- El Medio F2 de Guillard se prepara de la siguiente manera:

Preparar las siguientes soluciones Stock:

Soluciones Stock de Macronutrientes

1. NaNO ₃	7.5 g / 100 mL
2. NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0.5 g / 100 mL
3. NaSiO ₃ .9H ₂ O	1.0 g / 100 mL

Solución Stock elementos en traza (= Micronutrientes)

4. CuSO ₄ .5H ₂ O	0.98 g
5. ZnSO ₄ .7H ₂ O	2.20 g
6. CoCl ₂ .6H ₂ O	1.05 g
7. MnCl ₂ .4H ₂ O	18.0 g
8. Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.63 g

Diluir y completar con agua destilada hasta 100 mL.

Solución Stock de metales en traza utilizando Na₂EDTA y FeCl₃.6H₂O.

Disolver 3.15 g de FeCl₃.6H₂O y 4.36 g de Na₂EDTA en 900 mL de agua destilada, adicione un mL de cada solución stock de metales traza, y lleve a 1 L, El pH de esta solución es de alrededor de 2.0. La solución permanecerá clara si es dejada a este pH.

Solución stock primario de vitaminas del complejo B

9. Biotina	0.1 mg / mL
10. Cianocobalamina (B ₁₂)	1.0 mg / mL

Esterilizar por filtración por membrana y guardar en refrigeración.

Soluciones de trabajo de Vitaminas: Tomar 1.0 mL de solución stock de Biotina y 0.1 mL de solución stock de Cianocobalamina a 100 mL de agua destilada. Agregue 200 mg de Tiamina HCl.

Para obtener 1 L de Medio F2 de Guillard (Tabla N° 1).

- 1 mL de solución stock de macronutrientes
- 1 mL de solución stock de micronutrientes
- 0.5 mL de solución de trabajo de vitaminas
- Agua de mar filtrada hasta completar 1 L.
- Esterilizar en autoclave.

Tabla N° 1: Preparación de 1L de Medio F2 de Guillard. (10; 18; 21; 22).

COMPOSICION	SOLUCION STOCK	CANTIDAD A USAR
NaNO ₃	75 g/L	1 mL
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	5 g/L	1 mL
NaSiO ₃ .9H ₂ O	30 g/L	1 mL
CuSO ₄ .5H ₂ O	9,8 g/L	1 mL
ZnSO ₄ .7H ₂ O	22 g/L	1 mL
CoCl ₂ .6H ₂ O	10 g/L	1 mL
MnCl ₂ .4H ₂ O	180 g/L	1 mL
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	6,3 g/L	1 mL
Na ₂ EDTA	..	4,36 g
FeCl ₃ .6H ₂ O	..	3,15 g
Biotina	1 g/L	1 mL
Cianocobalamina	1 g/L	1 mL
Tiamina	..	200 mg

Tabla N° 2: Concentraciones de soluciones Stock y concentración final del Medio F2 de Guillard ^(10; 18; 21; 22).

COMPOSICION	CONCENTRACION DE STOCK (g/mL)	CONCENTRACION FINAL EN EL MEDIO
NaNO ₃	0,075 g/mL	7,5 x 10 ⁻⁵ g/mL
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	0,005 g/mL	0,5 x 10 ⁻⁵ g/mL
NaSiO ₃ .9H ₂ O	0,01 g/mL	1,0 x 10 ⁻⁵ g/mL
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,0098 g/mL	0,98 x 10 ⁻⁵ g/mL
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,022 g/mL	2,2 x 10 ⁻⁵ g/mL
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0105 g/mL	1,05 x 10 ⁻⁵ g/mL
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,18 g/mL	18,0 x 10 ⁻⁵ g/mL
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,0063 g/mL	0,63 x 10 ⁻⁵ g/mL
Na ₂ EDTA	4,36 g	0,00436 g/mL
FeCl ₃ .6H ₂ O	3,15 g	0,00315 g/mL
Biotina	0,001 g/mL	0,1 x 10 ⁻⁵ g/mL
Cianocobalamina	0,001 g/mL	0,1 x 10 ⁻⁵ g/mL
Tiamina	0,0002 g/mL	0,02 x 10 ⁻⁵ g/mL

Para prepararse, se debe comenzar con 950 mL de agua de mar natural filtrada y agregar los componentes como se expresa en la tabla anterior (Tabla N° 1).

Si el alga que se cultivará no requiere de sílice, entonces se recomienda que la sílice se omita, ya que mejora la precipitación de los demás componentes. Luego esterilizar en Autoclave. Algunos estudios reflejan que el costo del medio F2 de Guillard es de \$18.98/L ⁽²¹⁾.

OTROS MEDIOS ⁽²²⁾

Tenemos también los medios de fertilizantes: que se pueden preparar de dos formas: agregando el fertilizante en agua destilada y agitando por 20 – 30 minutos y pasando directamente a un recipiente; o bien, filtrándolo con papel Whatmann y pasando al recipiente. Una vez preparado se procede a esterilizar.

Se ha visto que la utilización de fertilizantes es una fuente barata de nutrientes, para la producción masiva de las microalgas y que ha tenido resultados exitosos, por tal razón algunas veces se prefiere utilizar esta técnica de cultivo como método de experimentación de bajo costo.

Biodigeridos: Para elegir los recursos orgánicos necesarios para hacer el medio de cultivo, estos deben ser abundantes en la región, sub-utilizados, y contener la mayoría de los elementos requeridos por las microalgas para su crecimiento. Algunos de los recursos orgánicos que se pueden utilizar son excretos de gallina, de vaca, macroalgas, etc. **Medios de aguas de desechos:** la razón por la cual es factible que se utilicen aguas de desecho como materia orgánica para elaborar medios de cultivo es su contenido de nitrógeno, fosforo y carbono orgánico. En las últimas décadas se han realizado estudios sobre la manera de remover los nutrientes de aguas residuales, industriales, urbanas, agrícolas y ganaderas, para que estas puedan ser utilizadas en la formulación de medios de cultivo.

Medios Químicamente definidos: en este tipo de medios se conocen todas las sales y nutrientes que contengan, se preparan con mezclas sintéticas y con sales deshidratadas (como la INSTANT OCEAN y DAYNO); en general son muy variables en salinidad, y en las concentraciones de calcio y magnesio, y siempre contienen un buffer.

3.3.4 CINETICA DE CRECIMIENTO ALGAL (21; 22; 45)

En el cultivo de microalgas se hace necesario el conocimiento de la cinética decrecimiento de cada especie en cada determinado volumen independientemente de la especie y el volumen al que es cultivada se reconoce un patrón estándar de crecimiento indicado por las siguientes fases:

Fase Lag, Fase de adaptación o Fase inicial: En donde no ocurre o es muy poco el incremento células de microalgas, pudiendo incluso llegar a disminuir en número con respecto al inoculo inicial. Es una fase de adaptación de las células microalgales al medio. En el cultivo de microalgas esta fase normalmente dura de 1 a 3 días, dependiendo del tamaño y del estado del inoculo, así como del medio de cultivo.

Fase Logarítmica o Exponencial: Ya una vez adaptadas al medio de cultivo las microalgas comienzan a multiplicarse puesto que la división da lugar a nuevas células que son capaces de dividirse, el aumento en número de microalgas se acelera continuamente en forma exponencial.

En este caso conforme el cultivo va creciendo se da una disminución de nutrientes, cambios de pH y alteración de otros factores como consecuencia del incremento de la población, de ahí que las microalgas disminuyan su tasa de división celular. En el cultivo de microalgas generalmente se presenta del 2º al 4º día, desde su inoculación en el medio.

Fase Estacionaria: Cuando ya no se aprecia una división celular neta esto es que el número de células alcanzado, se mantiene constante por cierto periodo de tiempo debido al balance entre la natalidad y la mortalidad que presenta la población en cultivo.

Fase de muerte: Las células pueden durar en la fase anterior semanas e incluso meses aunque lo más normal es que comiencen a morir es entonces cuando se presenta estafase.

La medición de la biomasa es importante en el cultivo de microalgas para tener un recuento directo de la población celular y se puede hacer a través de diferentes métodos como son: 1) el conteo celular a través de una cámara de conteo, este es uno de los métodos más comunes, para los cuales se utilizan

técnicas de microscopia. 2) La medición de la densidad óptica o absorbancia con ayuda de un espectrofotómetro que tiene la ventaja de poder leer varias muestras en un corto tiempo y es un método de alta precisión ⁽²¹⁾.

Muchas veces resulta difícil conseguir una muestra homogénea para cuantificar su crecimiento a través de la numeración directa en cámaras de conteos. Esto ha hecho que para conocer la evolución del cultivo se haya implementado la técnica de extracción de pigmentos con acetona en el cual se determina la absorbancia por medio de espectrofotometría lo que permite la determinación de las concentraciones de clorofilas a y c presentes en las diatomeas

Otro método es el de fluorimetría que mide la concentración de clorofilas a través de un fluorímetro, la desventaja de este método radica en que la concentración de clorofila a, no permanece constante durante toda la curva de crecimiento del alga por lo que los valores no son constantes. También se puede cuantificar la biomasa a través del peso seco, el cual es muy utilizado.

3.4 MICROALGA, *Chaetoceros gracilis*

Clasificación taxonómica actual ⁽²⁾.

REINO: *Eukaryota*
FILO: *Chromista*
CLASE: *Ochrophyta*
ORDEN: *Coscinodiscophyceae*
FAMILIA: *Chaetocerotales*
GENERO: *Chaetocerotaceae*
ESPECIE: *Chaetoceros gracilis*

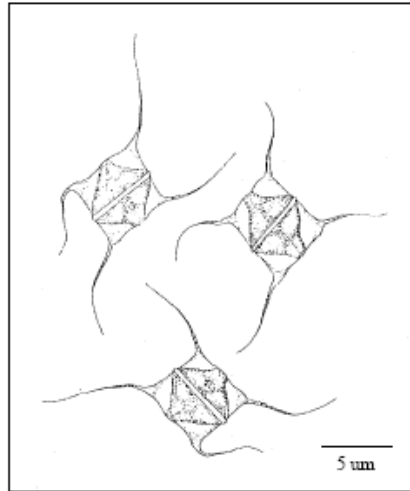


Figura N° 1 Dibujo de vista microscópica de *Chaetoceros gracilis*

Chaetoceros gracilis es una microalga marina céntrica y microscópica, normalmente solitaria, sus células se presentan individuales de forma rectangular cuyas dimensiones son de 8-12 x 7-10 μm . al verla desde vista lateral y elíptica desde vista valvar. Posee dos setas por valva, una en cada uno de los extremos del eje apical. Puede tolerar hasta de 40°C. Sus valores nutricionales presentan un 23,94% de proteínas, 8,69% de lípidos y 19,01% de carbohidratos, su composición química al ser cultivada en medio F2 de Guillard, en condiciones específicas la podemos encontrar en la Tabla N° 3 (10; 21; 24; 33).

Esta microalga, morfológicamente posee paredes ligeramente rígidas que pueden presentar láminas que cubren su parte exterior. Normalmente presentan organelos pigmenticos llamados cloroplastos, que indica que su color predominante es el verde, otros organelos pigmenticos son los llamados cromatóforos, estos sistemas poseen sistemas enzimáticos relacionados con la fotosíntesis. Es uno de los mayores representantes de las diatomeas las cuales son variadas y elegantes, estas presentan características muy importantes que residen en su pared celular llamada frústula, la cual no contiene celulosa, sino

pectina impregnada de sílice. La frústula no forma una pieza completa, sino está constituida de dos valvas que se embonan una dentro de la otra (10; 22; 24; 33).

Las diatomeas presentan dos tipos de reproducción, una sexual por fusión de gametos y la asexual por medio de división celular. En el caso de la reproducción normal de *Chaetoceros gracilis* su frústula, compuesta de dos valvas (conchas) estas se separan para formar células nuevas durante la mitosis. Las diatomeas en el medio natural producen agrupaciones masivas de organismos esto por factores fisicoquímicos y principalmente por incrementos en los nutrientes. Estas agrupaciones son ocasionadas por la reproducción asexual de los organismos, conocidas comúnmente como floraciones. En el medio acuacultural se inducen grandes producciones de estas microalgas con la adición de fertilizantes, mejorando las condiciones fisicoquímicas y alimenticias de los estanques. En el caso de *Chaetoceros gracilis* puede ser cultivada en ciclos de luz oscuridad (ciclo natural) o bajo luz continua, obteniéndose resultados comparables de crecimiento y biomasa (1, 47).

Tabla N° 3: Composición química del microalga *Chaetoceros gracilis* a partir de medio F2 de Guillard, en condiciones específicas de estudio (33).

Microalga	Composición Química	Cuantificación
<i>Chaetoceros gracilis</i>	Densidad celular	$8.442 \pm 7.07 \times 10^6$ cel/L
	Proteína soluble	$0,58 \pm 0,02$ mg/L
	pH	7,7 - 9,5
	Valor de clorofila	$7,12 \pm 0,61$ mg/L
	Nitrato	$0,13 \pm 0,04$ mg/L
	Sodio	0,07 mg/L
	Potasio	0,02 mg/L
	Fosforo	$2,09 \pm 0,02$ mg/L
	Magnesio	$14,78 \pm 0,08$ mg/L
	Sulfatos	0,03 mg/L

3.5 AGUA DE COCO, RECURSO NATURAL

Clasificación taxonómica actual ⁽⁵¹⁾

REINO:	<i>Plantae – Plants</i>
SUB-REINO:	<i>Tracheobionta</i>
SUPERDIVISION:	<i>Spermatophyta</i>
DIVISION:	<i>Magnoliophyta</i>
CLASE:	<i>Liliopsida – Monocotiledonia</i>
SUB-CLASE:	<i>Arecidae</i>
ORDEN:	<i>Arecales</i>
FAMILIA:	<i>Areaceae – Palmae</i>
GENERO:	<i>Cocos L.</i>
ESPECIE:	<i>Cocos nucifera L.</i>



Figura Nº 2 *Cocos nucifera L.*

El coco o cocotero perteneciente a la familia *Arecaceae - Palmae*, y de nombre científico *Cocos nucifera* L., El cocotero es una planta monoica (en su inflorescencia presenta flores masculinas y femeninas) la sucesión de inflorescencias es mensual, monocotiledónea. La duración de la fase masculina es de 20 días, pero varía con el tipo de cocotero y la época, la fase femenina tiene una duración de tres a cinco días en las variedades altas y hasta ocho días en promedio en las variedades enanas, el fruto es una drupa. Es una palmera, de tronco largo y elástico, con hojas pinnadas ubicadas solamente en la copa de la planta. El fruto de esta palma es el coco, una drupa de tamaño similar a la de un melón pequeño, cubierto de una capa gruesa y fibrosa. En la parte interna del fruto se encuentra un compartimiento cerrado de capadura, llamado nuez de coco; dentro de ésta, se descubre la semilla conformada por una pulpa blanca comestible y un líquido ligeramente opaco, conocido como aguade coco. La composición del coco muestra que el fruto está constituido por un 35 % de cáscara, 60 % de pulpa y un 8 % de agua. El *Cocos nucifera* L., conocido comúnmente como coco, palma de coco y coconut palm, es tal vez uno de los árboles tropicales mejor reconocidos y uno de los más importantes económicamente. El coco crece a lo largo de las costas arenosas a través de los trópicos y en la mayoría de las regiones subtropicales ⁽⁴⁰⁾.

Dentro de los recursos aprovechables del coco tenemos su agua, la cual es un líquido natural contenido dentro del endospermio del coco (Líquido suelto sin la pulpa de coco incluyendo las proteínas solubles y azúcares) sin la adición de una porción significativa de sólidos del endospermio. El agua de coco es naturalmente clara o ligeramente turbia Es una emulsión grasa en agua ⁽³⁵⁾. La información nutricional del agua de coco la podemos encontrar en la Tabla N° 4.

Tabla N° 4: Información nutricional del agua de coco, perteneciente al *Cocos nucifera* L. Composición química del agua de coco, tabla modificada ⁽⁵²⁾.

Componentes	Agua de coco tierno (U. Santoso y col. 1996 and USDA*)	Agua de coco maduro (U. Santoso y col. 1996)
Contenido de Agua	94,18 g/100 g	94,45 g/100 g
Contenido Proteico	0,12 g/100 g	0,52 g/100 g
Lípidos totales (grasa)	0,07 g/100 g	0,15 g/100 g
Sucralosa	0,06 g/100 g	0,51 g/100 g
Glucosa	2,61 g/100 g	1,48 g/100 g
Fructosa	2,55 g/100 g	1,43 g/100 g
Calcio, Ca	27,35 mg/100 g	31,64 mg/100 g
Hierro, Fe	0,02 mg/100 g	0,02 mg/100 g
Magnesio, Mg	6,40 mg/100 g	9,44 mg/100 g
Selenio, Se	0,001 mg/100 g*	n/r
Fosforo, P	4,66 mg/100 g	12,77 mg/100 g
Potasio, K	203,70 mg/100 g	257,52 mg/100 g
Sodio, Na	1,70 mg/100 g	16,10 mg/100 g
Zinc, Zn	0,07 mg/100 g	0,02 mg/100 g
Cobre, Cu	0,01 mg/100 g	0,03 mg/100 g
Manganeso, Mn	0,12 mg/100 g	0,08 mg/100 g
Azufre, S	0,58 mg/100 g	n/r
Aluminio, Al	0,07 mg/100 g	0,06 mg/100 g
Boro, B	0,05 mg/100 g	0,08 mg/100 g
Vit. C (Ácido ascórbico total)	0,0741 mg/L	0,0708 mg/L
Tiamina (B ₁)	0,0001 mg/L	0,0001 mg/L
Riboflavina (B ₂)	0,0001 mg/L	0,0001 mg/L
Niacina (B ₃)	0,08 mg/100 g*	n/r
Ácido Pantoténico (B ₅)	0,043 mg/100 g*	n/r
Piridoxina (B ₆)	0,032 mg/100 g*	n/r
Biotina	n/r	n/r
Alanina	1,13 mg/g	3,88 mg/g
Arginina	0,13 mg/g	0,81 mg/g
Ácido aspártico	1,60 mg/g	0,76 mg/g

Tabla N° 4: Información nutricional del agua de coco, perteneciente al *Cocos nucifera* L. Composición química del agua de coco, tabla modificada ⁽⁵²⁾. (Continuación).

Componentes	Agua de coco tierno (U. Santoso y col. 1996 and USDA*)	Agua de coco maduro (U. Santoso y col. 1996)
Cistina	0,014 g/100 g*	0,00 mg/g
Ácido glutámico	3,44 mg/ng	3,75 mg/ng
Glicina	0,43 mg/g	0,11 mg/g
Histidina	0,39 mg/g	0,67 mg/g
Isoleucina	0,26 mg/g	0,27 mg/g
Leucina	0,66 mg/g	0,58 mg/g
Lisina	4,72 mg/g	3,41 mg/g
Metionina	0,22 mg/g	0,21 mg/g
Fenilalanina	0,26 mg/g	0,00 mg/g
Prolina	0,52 mg/g	0,95 mg/g
Serina	0,64 mg/g	1,06 mg/g
Tirosina	0,022 mg/g*	0,00 mg/g
Triptófano	0,008 mg/g*	0,00 mg/g
Treonina	0,20 mg/g	0,33 mg/g
Valina	0,91 mg/g	0,82 mg/g
Ácido tartárico	1,6 mg/100 DM	2,4 mg/100 DM
Ácido málico	317 mg/100 DM	307 mg/100 DM
Ácido cítrico	n/r	24,8 mg/100 DM
Ácido acético	n/r	1,3 mg/100 DM

n/r = no reportado por la bibliografía

* Reportado por la USDA

El cultivo de coco se encuentra ampliamente distribuido en las costas e islas de El Salvador, las plantaciones de cocotero de mayor extensión en El Salvador se encuentran ubicadas en las islas de la bahía de Jiquilisco y sus alrededores, departamento de Usulután, y en la planicie costera de Sonsonate, ejemplo de los lugares están las Islas de Méndez, también es cultivado por la Cooperativa el Jobal, ubicada en la Isla Espíritu Santo donde se produce aceite de coco,

donde también se observan residuos del prensado luego de la obtención de aceite como residuo agroindustrial, así como la estopa de coco ^(16; 17; 27).

Otras extensiones de cultivos de menor tamaño se reportan en departamentos como San Vicente, La Paz y La Libertad, las extensiones de cultivos superan las 8000 Mz. El cocotero es una de las plantas con mayor diversidad de productos y subproductos que existe en el mundo, en El Salvador son pocos los usos que se explotan ⁽²⁶⁾. Se considera que hay más de 9,800 Mz de cultivo de coco en todo El Salvador ⁽¹⁵⁾. En muchos países del mundo el agua de coco constituye actualmente un subproducto que no es utilizado por las industrias (solo en industrias de jugos) y es eliminado de los procesos, sin ningún tipo de tratamiento que permita reducirlos problemas de contaminación ambiental generando un problema serio de contaminación en corrientes de aguas ⁽⁴⁴⁾.

PARAMETROS FISICOQUÍMICOS DEL AGUA DE COCO ^(4; 49).

Rango de °Brix (a 20 °C): 4 – 6.

pH: 4.5 – 8.5.

Al ver la composición normal reportada del agua de coco, se puede ver que posee una gran cantidad de minerales, vitaminas, factores de crecimiento, entre otras cosas, esto hace al agua de coco, llamativa para compararla con el medio analítico nutritivo convencional F2 de Guillard, considerando esto se formularon medios de Agua de Coco Modificados (MACM) a concentraciones de 10%, 20%, 30% y 40%, utilizando como base agua de mar estéril. Dichas formulaciones las podemos encontrar en la Tabla N° 5.

Los Medios de Agua de Coco Modificados, poseen vitaminas, minerales, factores de crecimientos similares a los que posee el Medio comercial F2 de Guillard, en la Tabla N° 6 podemos encontrar una comparación del Medio comercial F2 de Guillard y el MACM al 10%.

Tabla N° 5 Medios de Cultivo de Agua de Coco Modificada (MACM).

COMPOSICION DEL MEDIO	CONCENTRACION AL 10%	CONCENTRACION AL 20%	CONCENTRACION AL 30%	CONCENTRACION AL 40%
AGUA DE COCO	10 mL	20 mL	30 mL	40 mL
AGUA DE MAR	90 mL	80 mL	70 mL	60 mL
NaSiO ₃ .9H ₂ O	0,3 g	0,3 g	0,3 g	0,3 g
para elaborar	100,0 mL	100,0 mL	100,0 mL	100,0 mL

Nota: Regular el pH con NaOH 0.1 N, a aproximadamente pH 8.0±0.2 y esterilizar en autoclave (121 °C, 15 minutos y 1 atmosfera de presión).

Tabla N° 6 Comparación de la concentración del MACM al 10%, con respecto al medio F2 de Guillard, para un volumen de 1 L de medio (usando datos de Tabla N° 4).

COMPOSICION	CONCENTRACION F2 de Guillard	Agua de coco tierno (U. Santoso y col. 1996 and USDA)	CONCENTRACION (para coco tierno)	Agua de coco maduro (U. Santoso y col. 1996)	CONCENTRACION (para coco maduro)
NaNO ₃	7,5x10 ⁻⁵ g/mL	Posee aminoácidos	1,064x10 ⁻¹ g/mL	Posee aminoácidos	1,31 x 10 ⁻¹ g/mL
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0,5x10 ⁻⁵ g/mL	Fosforo, (P)	4,66x10 ⁻⁴ g/mL	Fosforo, (P)	12,77 x 10 ⁻⁴ g/mL
NaSiO ₃ .9H ₂ O	1,0x10 ⁻⁵ g/mL	Se le adicionará	1,0x10 ⁻⁴ g/mL	Se le adicionará	1,0x10 ⁻⁴ g/mL
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,98x10 ⁻⁵ g/mL	Cobre, (Cu)	1,0x10 ⁻⁶ g/mL	Cobre, (Cu)	3x10 ⁻⁶ g/mL
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,2x10 ⁻⁵ g/mL	Zinc, (Zn)	7x10 ⁻⁶ g/mL	Zinc, (Zn)	2x10 ⁻⁶ g/mL
CoCl ₂ .6H ₂ O	1,05x10 ⁻⁵ g/mL	Cobalto, (Co)	--	Cobalto, (Co)	--
MnCl ₂ .4H ₂ O	18,0x10 ⁻⁵ g/mL	Manganeso, (Mn)	12x10 ⁻⁶ g/mL	Manganeso, (Mn)	8x10 ⁻⁶ g/mL
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,63x10 ⁻⁵ g/mL	Molibdeno, (Mo)	--	Molibdeno, (Mo)	--
Na ₂ EDTA	0,00436 g/mL	--	--	--	--
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,00315 g/mL	Hierro, (Fe)	0,00315 g/mL	Hierro, (Fe)	0,00315 g/mL
Biotina	0,1x10 ⁻⁵ g/mL	Biotina	--	Biotina	--
Ciano-cobalamina (B ₁₂)	0,1x10 ⁻⁵ g/mL	Ciano-cobalamina (B ₁₂)	--	Ciano-cobalamina (B ₁₂)	--
Tiamina	0,02x10 ⁻⁵ g/mL	Tiamina (B ₁)	1x10 ⁻⁹ mg/mL	Tiamina (B ₁)	1x10 ⁻⁹ mg/mL

-- = no posee esa sustancia.

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

4.0 DISEÑO METODOLOGICO

4.1 TIPO DE ESTUDIO: Según el análisis y el alcance de los resultados este estudio es del tipo:

EXPERIMENTAL: Porque es un estudio de laboratorio. Y existe una relación causal entre la variable independiente (agua de coco como medio de cultivo) y la variable dependiente (desarrollo del microalga).

DESCRIPTIVO: Ya que en él se describen los resultados obtenidos del uso de agua de coco como medio de cultivo para microalgas.

CUANTITATIVO: Porque se buscó cuantificar el desarrollo de la biomasa y demás parámetros del cultivo de la microalga.

PROSPECTIVO: Ya que es una investigación nueva, que se basa en el uso de agua de coco como sustrato para medios de cultivo de microalgas, y que puede indicar su utilidad en futuros tipos de cultivo.

4.2 INVESTIGACION BIBLIOGRAFICA: Se consultaron las bibliotecas y los recursos siguientes:

- Biblioteca de la Unidad Central de la Universidad de El Salvador (UES).
- Biblioteca Universidad Centroamericana “JOSE SIMEON CAÑAS” (UCA).
- Biblioteca Universidad “Dr. José Matías Delgado”.
- Recursos Bibliográficos de CENDEPESCA.
- Recursos del CBUES.
- Internet.

4.3 INVESTIGACION DE CAMPO: Se realizaron visitas a Laboratorio de Producción de Moluscos de CENDEPESCA, con la finalidad de conocer más sobre los procesos de cultivo de microalgas, así como soporte científico-técnico, además de algunos recursos como la cepa, el medio de cultivo comercial y otros recursos.

4.4 PARTE EXPERIMENTAL

Se realizó el procedimiento de purificación de la microalga, primero aplicando el método químico, utilizando antibióticos y medio F2 de Guillard, a continuación aplicando el método físico, mediante estriado en medio sólido de F2 de Guillard. Y así de esa manera se obtuvo una cepa de *Chaetoceros gracilis* pura.

Con la cepa pura se cultivó en medio F2 de Guillard líquido para obtener una cepa semilla para ser utilizada en la producción.

Con la cepa semilla se realizaron las pruebas preliminares, en las cuales se probaron los Medios de Agua de Coco Modificado (MACM) de 10%, 20%, 30% y 40%, con la adición de metasilicato de sodio, en condiciones de laboratorio, para identificar características del medio y del proceso del cultivo. Se realizaron diariamente las determinaciones de densidad celular, grados Brix, salinidad y pH. Del análisis y discusión de los resultados de los experimentos preliminares, se seleccionó la mejor composición de MACM para utilizarlo como medio de cultivo para la microalga.

Una vez seleccionado el MACM con mejores resultados de cultivo de microalga, se realizaron cultivos paralelos a escala de cultivos pre-masivo en medio F2 de Guillard y el MACM seleccionado, en condiciones de laboratorio. Y se determinaron diariamente los parámetros de densidad celular, salinidad, grados Brix, pH, producción de clorofilas a, b y carotenoides totales. El análisis de los

resultados fue útil para establecer conclusiones sobre la conveniencia de utilizar el MACM para el cultivo de esta microalga.

La metodología de investigación utilizada se expresa en el esquema presentado en la Figura N° 3.

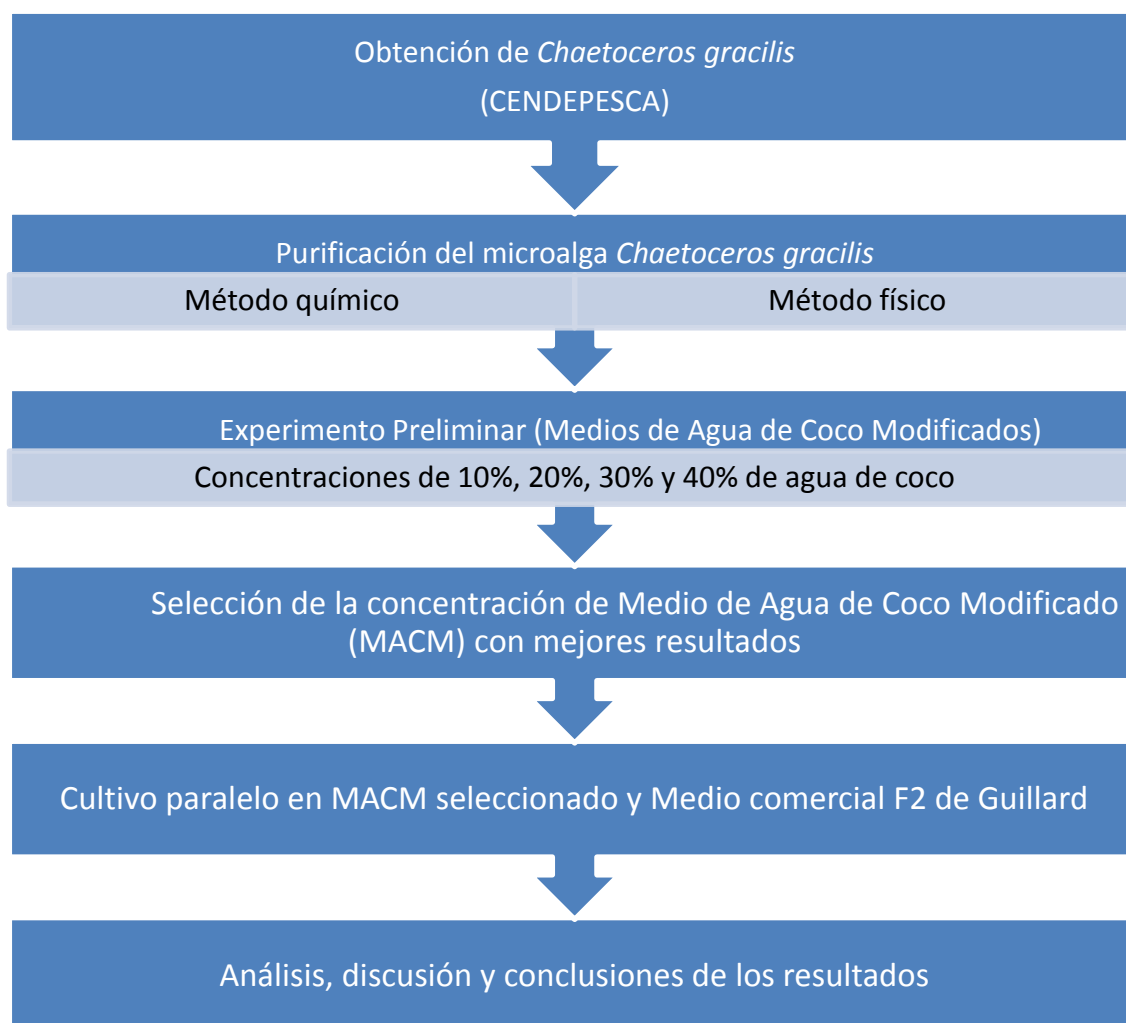


Figura N° 3: Esquema general de la metodología de la investigación

4.4.1 Condiciones de laboratorio y cultivo preliminar de la microalga.

- Estante metálico de 5 pisos, limpio y sanitizado con alcohol etílico 70° o alcohol isopropílico. Forrado con papel aluminio para minimizar la pérdida de luz.

- Luz artificial permanente, de lámparas 20w. Los cultivos se colocaron a tal distancia que reciban la intensidad de grados Lux necesarios para su crecimiento. Se utilizó un Luxómetro para determinar la distancia a la que se debían colocar los cultivos, buscando que estos cultivos recibieran la intensidad de luz necesaria según su volumen y requerimientos.

- Aireación y agitación manual diaria. (Agitación manual una vez al día para volúmenes de 100 mL o inferiores, burbujeo continuo para volúmenes de 1 L o superior por medio de bombas de aire).

El sistema de luz artificial y de aireación se respaldó con una batería de alimentación eléctrica ininterrumpida, para evitar fluctuación de energía o cambios en el proceso.

- Temperatura. Se realizaron los experimentos a temperatura ambiente del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador, la cual fue de aproximadamente 28 ± 2 °C.

4.4.2 Obtención de la Cepa

- La cepa de *Chaetoceros gracilis* fue donada por el Laboratorio de Producción de Microalgas de la Estación Acuícola Puerto El Triunfo, Jiquilisco, Usulután, CENDEPESCA. Y purificada en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química y Farmacia, de la Universidad de El Salvador. Además fue identificada por el Lic. Rodolfo Menjívar, Biólogo, Director de la Escuela de

Biología de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, de la Universidad de El Salvador (UES). (Anexo N° 3).

4.4.3 Procedimientos

4.4.3.1 Aislamiento y purificación de la microalga por medios químicos (con antibióticos) ⁽²²⁾.

1. Preparar 100 mL de medio líquido F2 de Guillard para purificación con antibiótico. (Ver composición Anexo N° 1)
2. Inocular 6.0×10^4 cel/mL de *Chaetoceros gracilis* donada por CENDEPESCA.
3. Incubar bajo condiciones de Laboratorio durante 48 horas, como se puede observar en la Figura N° 4.
4. Transferir una alícuota de 1.0 mL a 100 mL de medio F2 de Guillard sin antibiótico, e incubar bajo condiciones de Laboratorio por 7 días.

4.4.3.2 Aislamiento y purificación de la microalga por medio físico ⁽²²⁾.

1. Preparar medio F2 de Guillard sólido, y colocar 20 mL de medio en placas Petri. (ó 7 mL en tubos con rosca para hacer tubos inclinados).
2. Colocar 1 o 2 gotas de la muestra de microalgas (procedente del medio F2 de Guillard sin antibiótico del paso 4 de la sección 4.4.3.1) cerca de la periferia de la placa.
3. Esterilizar a la llama una aza de microm.
4. Poner la punta el aza sobre la gota y rayar suavemente en zig-zag sobre la superficie de la placa, a manera de estriado de tres sectores.
5. Cubrir la placa con su tapa, e invertirla.

6. Incubar por 4-8 días en condiciones de Laboratorio.
7. Observar en microscopio estereoscópico y seleccionar las colonias rojizas, características de *Chaetoceros gracilis*, que tienen 10 μm de diámetro o menos y que estén libres de otros organismos.
8. Utilizando aza de microm estéril, tomar las colonias seleccionadas y estriar en tubos con rosca, con medio F2 de Guillard sólido inclinado.
9. Incubar por 4-8 días a condiciones de Laboratorio, como se observa en la Figura N° 4.
10. Finalmente, trasladar las unidades algales a medio líquido o sólido, según sean los requerimientos de la investigación.

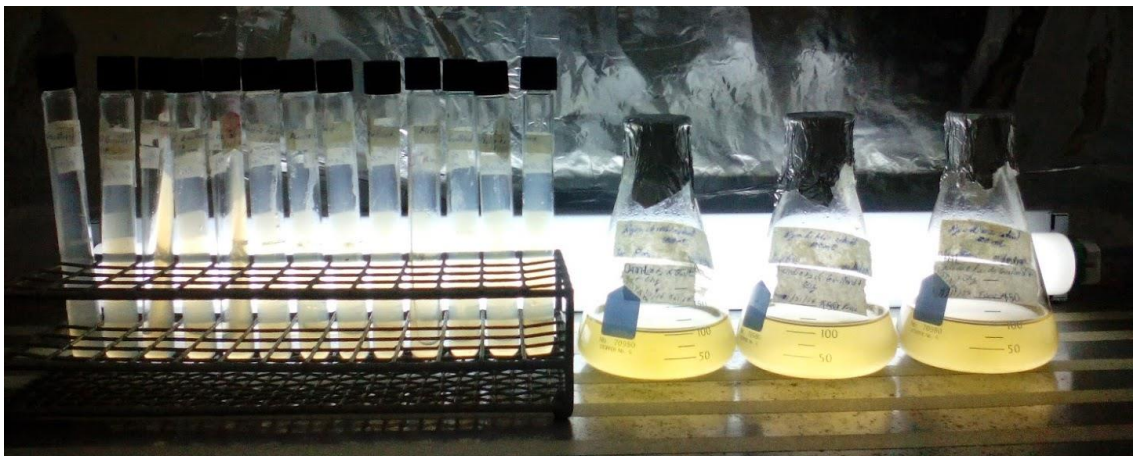


Figura N° 4 Purificación de la microalga *Chaetoceros gracilis* por métodos químicos y físicos

4.4.3.3 Cultivo semilla ⁽²²⁾.

1. Preparar 100 mL de medio líquido F2 de Guillard (Ver composición Anexo N° 1) en un erlenmeyer de 250 mL.
2. Tomar 30 mL del medio líquido preparado, y colocar 10 mL en cada uno de 3 tubos con rosca, con medio F2 de Guillard sólido inclinado conteniendo la microalga de la purificación del inóculo por medio físico de la sección 4.4.3.2.
3. Adicionar perlas de ebullición, y agitar suavemente el tubo buscando arrastrar la mayor cantidad de microalga.
4. Transferir cada uno de los 10 mL de medio líquido con *Chaetoceros gracilis* pura al erlenmeyer inicial.
5. Incubar bajo condiciones de Laboratorio durante 7 días.

4.4.3.4 Cultivo preliminar ^(10; 22).

1. Preparar 400 mL de cada uno de los Medios de Agua de Coco Modificado (MACM) al 10%, 20%, 30%, y 40% (Ver Tabla N° 5).
2. Distribuir 100 mL de cada uno de los medios en Erlenmeyers de 250 mL estériles. Uno de estos se utilizará como blanco, en cada concentración respectivamente.
3. Inocular con cultivo semilla de tal forma que cada cultivo preliminar inicie con aproximadamente 7.5×10^4 cel/mL de *Chaetoceros gracilis*.

- Ejemplo de cálculo: ¿Con que volumen de medio semilla se deben inocular 100 mL de MACM 10% para cultivo preliminar, si se desea que inicie con aproximadamente 7.5×10^4 cel/mL de *Chaetoceros gracilis*, si se

sabe que el cultivo semilla presenta una densidad celular de aproximadamente 2.3×10^6 cel/mL de *Chaetoceros gracilis*.

Se utiliza la Formula $C_1V_1 = C_2V_2$

Dónde:

C_1 : Concentración en cel/mL de *Chaetoceros gracilis* en el medio semilla,

V_1 : Volumen de medio semilla con el que se debe inocular,

C_2 : Concentración inicial deseada en cel/mL de *Chaetoceros gracilis*,

V_2 : Volumen de MACM 10% en el cultivo preliminar.

Despejando:

$C_1V_1 = C_2V_2$; se desea encontrar el volumen de medio semilla que se debe inocular (V_1), entonces tenemos $V_1 = (C_2V_2)/C_1$.

Sustituyendo:

$$V_1 = ((7.5 \times 10^4 \text{ cel/mL})(100 \text{ mL})) / (2.3 \times 10^6 \text{ cel/mL})$$

$$V_1 = 3.26 \text{ mL de medio semilla}$$

4. Homogenizar, y medir los parámetros iniciales (Biomasa, pH, salinidad, grados Brix siguiendo los procedimientos indicados en las secciones 4.4.3.6).
5. Incubar durante 7 días, bajo condiciones de Laboratorio.
6. Verificar los parámetros cinéticos de crecimiento microalgal, como las características del medio (Biomasa, pH, salinidad y grados Brix siguiendo los procedimientos indicados en la sección 4.4.3.6) todos los días de cultivo.
7. Graficar la evolución de cada uno de los parámetros respecto al tiempo.

4.4.3.5 Cultivo a escala pre-masiva (10; 22).

1. Preparar cuatro frascos Erlenmeyer de 1 L conteniendo 800 mL del MACM a la concentración que haya presentado mejores resultados de densidad celular y parámetros de medio de cultivo, en el cultivo preliminar, llevando uno de estos como blanco.
2. Inocular con cultivo semilla de tal forma que cada cultivo a escala pre-masiva inicie con aproximadamente 7.5×10^4 cel/mL de *Chaetoceros gracilis*. (Ver ejemplo de cálculo, en sesión 4.4.3.4)
3. Incubar durante 7 días, bajo condiciones de Laboratorio.
4. Verificar los parámetros cinéticos de crecimiento microalgal, como las características del medio (Biomasa, pH, salinidad, grados Brix y pigmentos fotosintéticos, siguiendo los procedimientos indicados en las secciones 4.4.3.6) todos los días de cultivo.

4.4.3.6 Medición de parámetros cinéticos

- Determinación de Biomasa por cámara de Neubauer.

Conteo por Cámara de Neubauer de 0.1 mm de profundidad.

La cámara recomendada para contar microalgas es la de 0.1 mm de profundidad, para contar algas de 2-30 μm .

1. Colocar el cubreobjetos (Laminilla) bien limpio sobre los pilares de soporte de la cámara.
2. Usando una pipeta Pasteur, deposite cantidad suficiente de la solución homogénea de microalgas, entre la cámara y el cubre objetos. (Ver Figura N° 5).

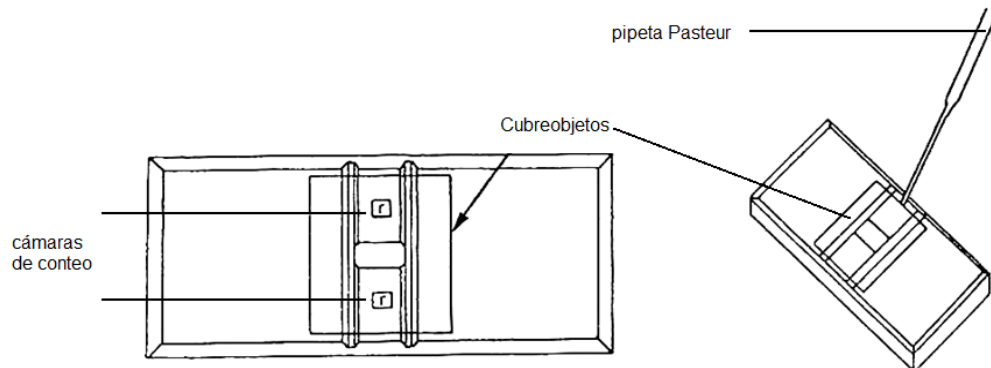


Figura N° 5 Cámara de Neubauer

3. Esperar 3 minutos antes de proceder al conteo al microscopio (para que las unidades algales se asienten debidamente).
4. Contar en el microscopio a 40x, todas las células en cada uno de 6 cuadrantes, excluyendo las células que se encuentran en las líneas bordes del lado izquierdo y superior de cada cuadrante, contando los cuadrantes en diagonal y el cuadrante superior derecho como se muestra en la Figura N° 6.

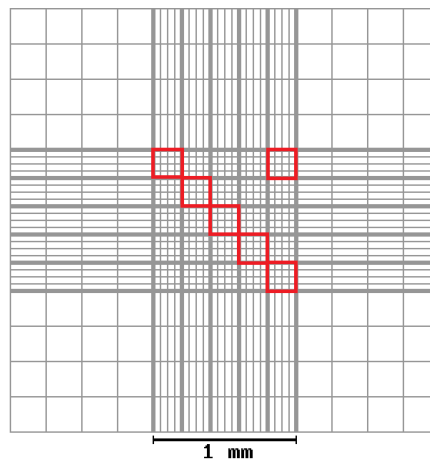


Figura N° 6 Cuadrantes de Cámara de Neubauer

5. Eliminar los valores extremos (máximo y mínimo) del conteo de microalga en la cámara de Neubauer, de los 6 cuadrantes.
6. Calcular el promedio de conteo de microalga, con los 4 cuadrantes restantes.
7. Utilizar la siguiente fórmula (Igual a la aplicada en estación acuícola Puerto El Triunfo) para determinar densidad celular:

$$\text{Densidad celular (cel/mL)} = (\text{Promedio del conteo} * 25 * 10.000)$$

- Cuantificación de pigmentos fotosintéticos: Clorofilas a, b y Carotenoides Totales. (28; 50).

1. Tomar 5 mL de muestra de microalgas, debidamente homogenizada y colocarla en un tubo para centrifuga, con capacidad superior a 30 mL.
2. Centrifugar a 5,000 rpm durante 5 minutos.
3. Remover el sobrenadante, utilizando pipetas Pasteur estériles. Dejando solo el contenido celular microalgal.
4. Adicionar 6.0 mL de acetona calidad reactivo, y agitar con vortex por 3 minutos.
5. Adicionar 10.0 mL de acetona calidad reactivo y agitar con vortex por 5 minutos.
6. Guardar en refrigeración por 1 hora.
7. Filtrar utilizando papel filtro Whatman poro grueso No. 40.

8. Leer en el espectrofotómetro el filtrado a las siguientes longitudes de onda: 470, 647 y 663.
9. Cuantificar Clorofilas a, b y Carotenos totales utilizando la siguiente fórmula:

Fórmula para calcular Clorofila a, b y Carotenoides totales ⁽⁵⁰⁾.

$$\text{Clorofila a (C}_a\text{)} = ((12.25A_{663} - 279A_{647}) * 5) / 16)$$

$$\text{Clorofila b (C}_b\text{)} = ((21.5A_{647} - 5.1A_{663}) * 5) / 16)$$

$$\text{Carotenoides totales} = (((1000A_{470} - 1.82C_a - 85.02C_b) / 198) * 5) / 16)$$

12. Tabular los resultados

- Determinación de pH

1. Tomar 5 mL de muestra, y colocarlo en cubeta de muestras de pH.
2. Ir al pHmetro y determinar pH, documentar el pH a 25 °C.

Nota: calibrar el pHmetro si es necesario.

- Determinación de °Brix

1. Tomar 2 gotas del medio de cultivo (Cultivo preliminar) ó 2 gotas de sobrenadante obtenido en cuantificación de pigmentos fotosintéticos (Cultivo a escala pre-masiva) y colocarlos en el lente el Brixometro.
2. A contra luz, determinar el valor de °Brix del medio.

Nota: calibrar el Brixometro si es necesario.

- Determinación de Salinidad

1. Tomar 2 gotas del medio de cultivo (Cultivo preliminar) ó 2 gotas de sobrenadante obtenido en cuantificación de pigmentos fotosintéticos (Cultivo a escala pre-masiva) y colocarlos en el lente el Salinómetro.
2. A contra luz, determinar el valor de % salinidad del medio.

Nota: calibrar el salinómetro si es necesario.

4.4.3.7 Análisis Estadístico

El procedimiento estadístico que se utilizó para el análisis de resultados, se basa en principio en la aplicación de medidas de tendencia central como la Media Aritmética y en la utilización de técnicas estadísticas como el Análisis de Varianza de Muestras Aleatorias Independientes (ANOVA) y la técnica estadística de Diferencia Mínima Significativa (LSD), para las cuales se implementó el programa STATGRAPHICS Centurión ⁽⁴⁸⁾.

Para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas en los resultados obtenidos en los experimentos preliminares, se aplicó el Análisis de Varianza de Muestras Aleatorias Independientes (ANOVA). Luego para verificar y cuál de los MACM presentaba mejores resultados, se aplicó la técnica estadística de Diferencia Mínima Significativa (LSD).

Finalmente, se realizó una comparación entre el MACM con mejores resultados y el medio comercial F2 de Guillard, aplicando el Análisis de Varianza de Muestras Aleatorias Independientes (ANOVA). Luego se aplicó la técnica estadística de Diferencia Mínima Significativa (LSD) para verificar cuál de los medios de cultivo presenta mejores resultados de densidad celular y pigmentos fotosintéticos.

CAPITULO V

RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

5.1 Experimento preliminar:

- Purificación del alga.

Con la finalidad de obtener un cultivo de microalga axénico se purificó la cepa de *Chaetoceros gracilis* obtenida del Ministerio de Agricultura y Ganadería, CENDEPESCA, El Salvador.

Se obtuvo un cultivo puro de *Chaetoceros gracilis*, como se puede observar en la imagen microscópica de la Figura N° 7.



Figura N° 7 Imagen microscópica (40x) de la microalga *Chaetoceros gracilis* purificada.

- Cultivo Preliminar en Medios de Agua de Coco Modificados (MACM)

Los resultados obtenidos de este experimento preliminar (datos crudos en Anexo N° 2) se presentan en la Figura N° 8, donde se observó que es posible obtener crecimiento de la microalga *Chaetoceros gracilis*, principalmente cuando se cultiva en el MACM al 10%. Los resultados muestran (Figura N° 8) que en los medios de cultivo de MACM al 20%, 30% y 40%, el crecimiento se desarrolló solamente durante el primer día, observándose disminución de los recuentos de biomasa microalgal durante los siguientes días. Dado que simultáneamente se verificaron los parámetros de pH, salinidad y grados Brix, se observaron mayores variaciones de esos parámetros durante el tiempo de cultivo, en los medios con mayor concentración de agua de coco que las observadas en el MACM 10%.

Los valores de salinidad se encontraban dentro de rango de tolerancia de las microalgas en todos los tiempos de cultivo (rango de tolerancia de las microalgas: salinidad 12-40%) en el caso del pH, los MACM del 20%, 30% y 40%, se encontraron fuera del rango de tolerancia de crecimiento de la microalga (rango de tolerancia de las microalgas: pH 7-9) desde el día cero del cultivo ^(21; 46).

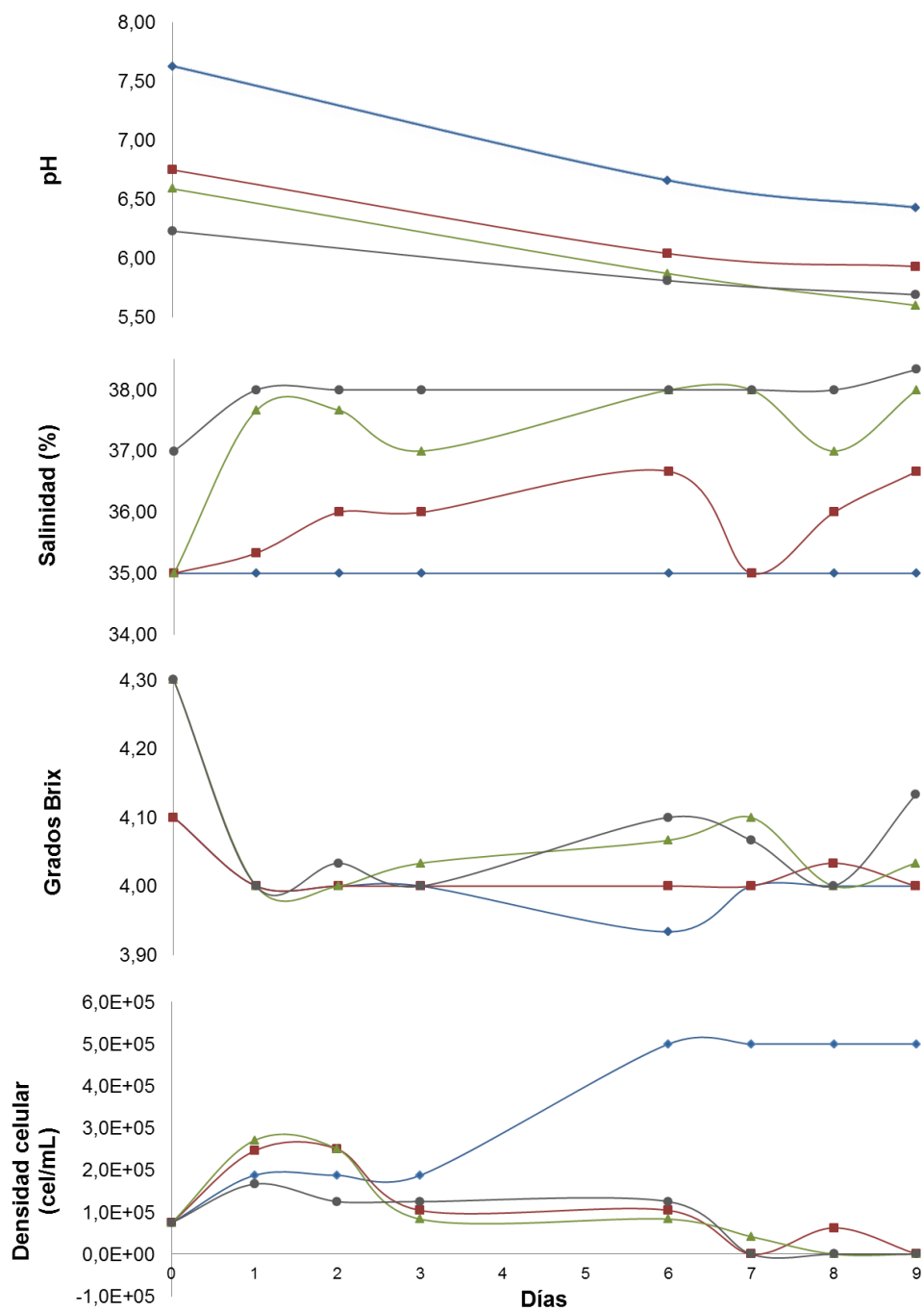


Figura N° 8 Cinéticas de los cultivos preliminares de la microalga *Chaetoceros gracilis* en MACM al 10%(♦) 20% (■), 30% (▲) y 40% (●)

En el MACM 10% se obtuvo un leve crecimiento microalgal el día 1, produciéndose a continuación una fase de cese del crecimiento que podría considerarse como una fase lag aparente, la cual se da desde el final del primer día hasta el final del tercer día de cultivo, después del día 3 se observa una fase de crecimiento exponencial de la microalga. Por otro lado, en este medio se observó un comportamiento, de los parámetros de salinidad y grados Brix, bastante estable durante todo el tiempo de cultivo, teniéndose valores de salinidad dentro del rango de tolerancia de las microalgas. En el caso del pH se observa que el día cero el MACM 10% se encontraba dentro del rango de tolerancia de pH de las microalgas, pero esto cambió con el tiempo, observándose para el día 6 un pH inferior a 7.0, lo cual coincidió con la detención del crecimiento. Por esta razón se decidió reformular los medios de cultivo adicionando un amortiguador de pH, para evitar la reducción drástica del pH de los medios y verificar el crecimiento de las microalgas bajo condiciones más estables de este parámetro.

Para la reformulación del medio se utilizó como amortiguador de pH el Tris-(Hidroximetil)-aminometano, mejor conocido como Tris Base, reconocido como uno de los mejores buffers para la aplicación en el área de la acuicultura ⁽²²⁾.

Se realizaron pruebas para determinar la concentración idónea de Tris base, buscando obtener un medio de cultivo con pH equivalente a 8.0 ± 0.2 , de acuerdo a las cuales se reformularon los MACM, dicha reformulación se encuentra en la Tabla N° 7.

Tabla N° 7 Reformulación de los Medios de Cultivo de Agua de Coco Modificada (MACM).

COMPOSICION DEL MEDIO	CONCENTRACION AL 10%	CONCENTRACION AL 20%	CONCENTRACION AL 30%	CONCENTRACION AL 40%
AGUA DE COCO	10 mL	20 MI	30 mL	40 mL
AGUA DE MAR	90 mL	80 MI	70 mL	60 mL
NaSiO ₃ .9H ₂ O	0.3 g	0.3 g	0.3 g	0.3 g
Tris base	0.001 g/mL	0.001 g/MI	0.001 g/mL	0.001 g/mL
para elaborar	100.0 mL	100.0 MI	100.0 mL	100.0 mL

Nota: Se obtienen medios con un pH de aproximadamente pH 8.0±0.2 y esterilizar en autoclave (121° C, 15 min y 1 atmosfera de presión).

Se prepararon los MACM a concentraciones de 10%, 20%, 30% y 40% con la modificación a sus condiciones de capacidad amortiguadora utilizando Tris base, se inocularon de tal forma de iniciar con un recuento de 7.5×10^4 cel/mL de microalga, y se cultivaron bajo condiciones de Laboratorio. Realizándose diariamente las determinaciones de pH, salinidad, grados Brix y la cuantificación de biomasa, por medio de la densidad celular. Los resultados obtenidos de este nuevo experimento (datos crudos en Anexo N° 2) se presentan en la Figura N° 9.

En este experimento se comprobó que es posible obtener crecimiento de *Chaetoceros gracilis* en todas las concentraciones del MACM, principalmente en el MACM 10%. Sin embargo, a pesar de la adición del amortiguador y que se logró comenzar (día 0) todos los cultivos con valores de pH dentro del rango de tolerancia de las microalgas; en los MACM de 20%, 30% y 40%, se observó que para el día 2 estos ya se encontraban fuera del rango requerido; dando lugar a que el crecimiento se desarrollara tanto en el MACM 20% aunque en menor grado del observado en el MACM 10%. Adicionalmente los parámetros de salinidad y grados Brix presentaron mayores fluctuaciones en los MACM al 20%, 30% y 40% en comparación con el MACM 10%.

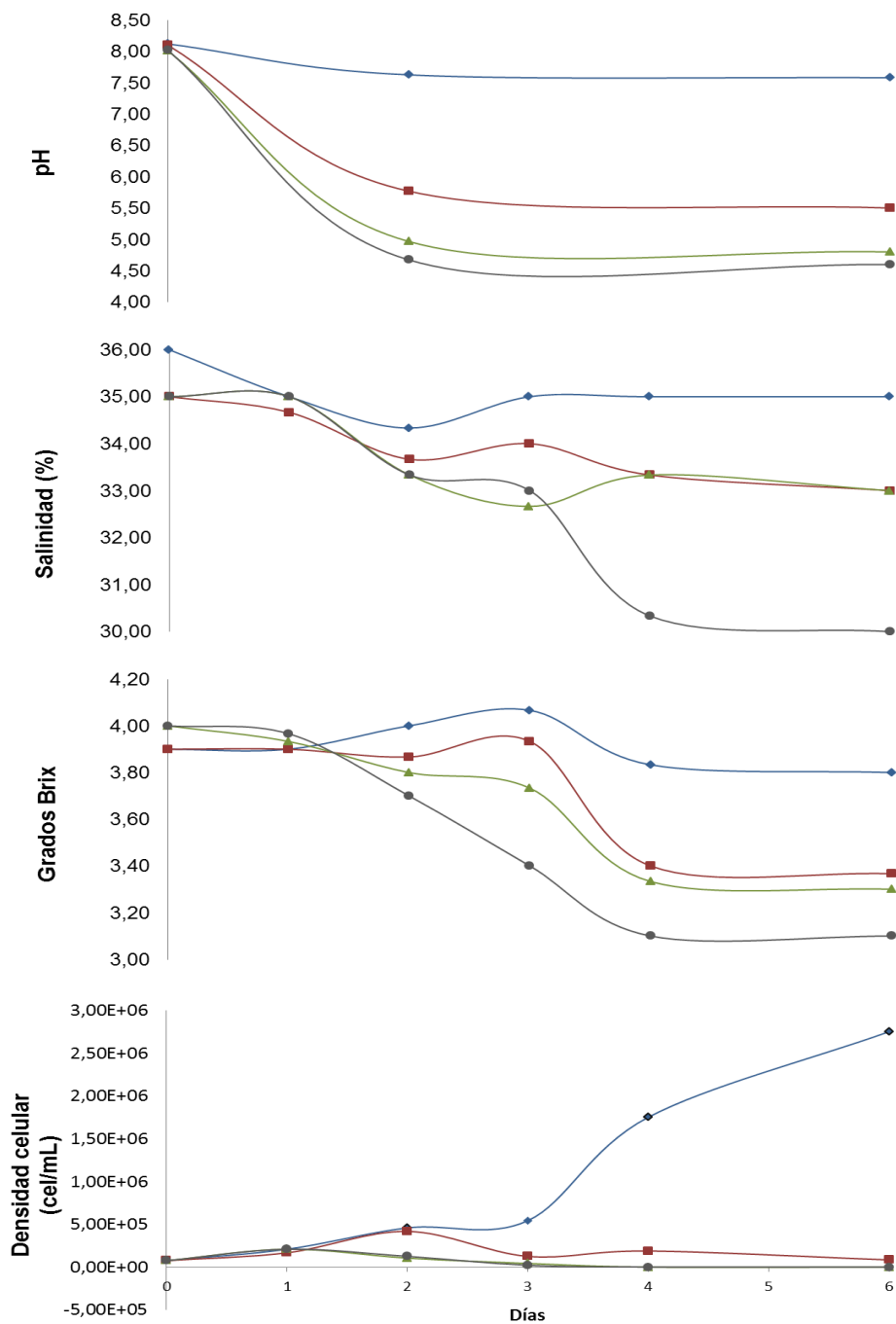


Figura N° 9. Cinéticas de los cultivos preliminares de la microalga *Chaetoceros gracilis* en MACM al 10%(◆) 20% (■), 30% (▲) y 40% (●) reformulados

En el MACM 10% se obtuvo un leve crecimiento microalgal desde el inicio del cultivo hasta el día 3, que podría considerarse como una fase lag aparente, después del día 3 se observa una fase de crecimiento exponencial de la microalga. Por otro lado, en este medio se observó que el pH y la salinidad se encontraron dentro del rango de tolerancia de las microalgas, durante todo el tiempo de cultivo, observándose un comportamiento bastante estable de los parámetros de salinidad, pH y grados Brix en los cultivos, lo observado en estos parámetros no indica que el consumo de azúcares y/o sales sea muy alto durante el crecimiento de la microalga.

Con estos resultados se procedió a la aplicación del Análisis de Varianza de Muestras Aleatorias Independientes (ANOVA), a un valor de significancia del 0.05 ($P < 0.05$), obteniéndose los resultados expresados en la Tabla N° 8.

Tabla N° 8 Análisis de Varianza de Muestras Aleatorias Independientes (ANOVA) de las densidades celulares obtenidas de los MACM.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Valor</i>
Efectos principales					
A:DIAS	1.0948E12	5	2.18961E11	0.71	0.6280
B:MACM	3.35301E12	3	1.11767E12	3.60	0.0386
RESIDUAL	4.65358E12	15	3.10239E11		
TOTAL (CORREGIDO)	9.1014E12	23			

Al realizar el Análisis de Varianzas de Muestras Aleatorias Independientes, (Tabla N° 8) se obtiene que para los días de cultivo se tiene un valor de $P=0.6280$ ($P \geq 0.05$) por lo tanto las medias de los valores de densidad celular, no presentan diferencias estadísticamente significativas considerando los días de cultivo. Para los MACM se obtiene un valor de $P=0.0386$ ($P < 0.05$) por lo tanto tenemos que al menos uno de los medios de cultivo ha producido resultados de densidad celular, la media de los cuales difiere de forma estadísticamente significativa del resto.

A partir de los resultados de ANOVA se aplicó la técnica estadística de Diferencia Mínima Significativa (LSD) para verificar cuál de los MACM presenta mayores valores, estadísticamente comprobados, de densidad celular, y así seleccionar el medio de cultivo con mejores resultados; la prueba LSD se expresa en la Tabla N° 9.

Tabla N° 9 Diferencia Mínima Significativa (LSD) de las densidades celulares obtenidas de los MACM.

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencias</i>	<i>+/- Limites</i>
MACM 10% - MACM 20%	*	787950.	685431.
MACM 10% - MACM 30%	*	892383.	685431.
MACM 10% - MACM 40%	*	892367.	685431.
MACM 20% - MACM 30%		104433.	685431.
MACM 20% - MACM 40%		104417.	685431.
MACM 30% - MACM 40%		-16.6667	685431.

Al analizar los resultados obtenidos por LSD se observa que un asterisco se ha colocado junto a 3 pares, lo que nos indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas en el nivel de confianza del 95,0%.

Con base a los resultados obtenidos se puede valorar que las diferencias existentes entre el MACM 10% y los demás MACM propuestos son positivas, cuya interpretación nos indica que se obtiene mayor densidad celular del MACM 10%, en comparación con los otros MACM respectivamente.

Considerando los resultados estadísticos obtenidos de ANOVA y LSD, y los resultados de los parámetros determinados en los medios de cultivo (pH y salinidad), se determinó que se seleccionaría el MACM 10% para ser comparado con el medio comercial F2 de Guillard.

- Comparación de las cinéticas de crecimiento de *Chaetoceros gracilis* en MACM 10% y F2 de Guillard.

El MACM 10% se preparó según reformulación del Tabla N° 7, el medio F2 de Guillard se preparó utilizando las soluciones de nutrientes de F2 de Guillard donada por CENDEPESCA (Ver Anexo N° 1). Se inoculó de la misma forma que en el experimento preliminar y se hicieron las mismas mediciones realizadas anteriormente (pH, salinidad y grados Brix y biomasa). Además se realizó la cuantificación de pigmentos fotosintéticos (Clorofilas a, b y Carotenoides totales) por método espectrofotométrico. Los resultados obtenidos (datos crudos en Anexo N° 2) se presentan en la Figura N° 10, donde se observó que es posible obtener crecimiento del microalga *Chaetoceros gracilis* en ambos medios de cultivo.

Al analizar los resultados de pH en MACM 10% se observó que esta variable permaneció dentro del rango de tolerancia de las microalgas a lo largo de todo el tiempo del cultivo, en cambio en el medio F2 de Guillard se aprecia una disminución del pH, observándose que el día 4 llega a valores por debajo del rango de tolerancia de pH de las microalgas, sin embargo a partir de ese día, se observa que el pH del medio comercial F2 de Guillard aumenta, llegando nuevamente a valores de tolerancia, para el día 6 cuando ya cesa el crecimiento. En el caso de la Salinidad los valores obtenidos en ambos medios, se encuentran dentro del rango de tolerancia de las microalgas. En el caso de los grados Brix, en el MACM 10% el día 6 se observa un ligero aumento, observándose un efecto contrario en el medio F2 de Guillard. Estos cambios observados en los valores de grados Brix, nos indican que las microalgas no consumen en grandes cantidades azúcares en solución, para su desarrollo y metabolismo; más bien el carbono es fijado en la biomasa producida.

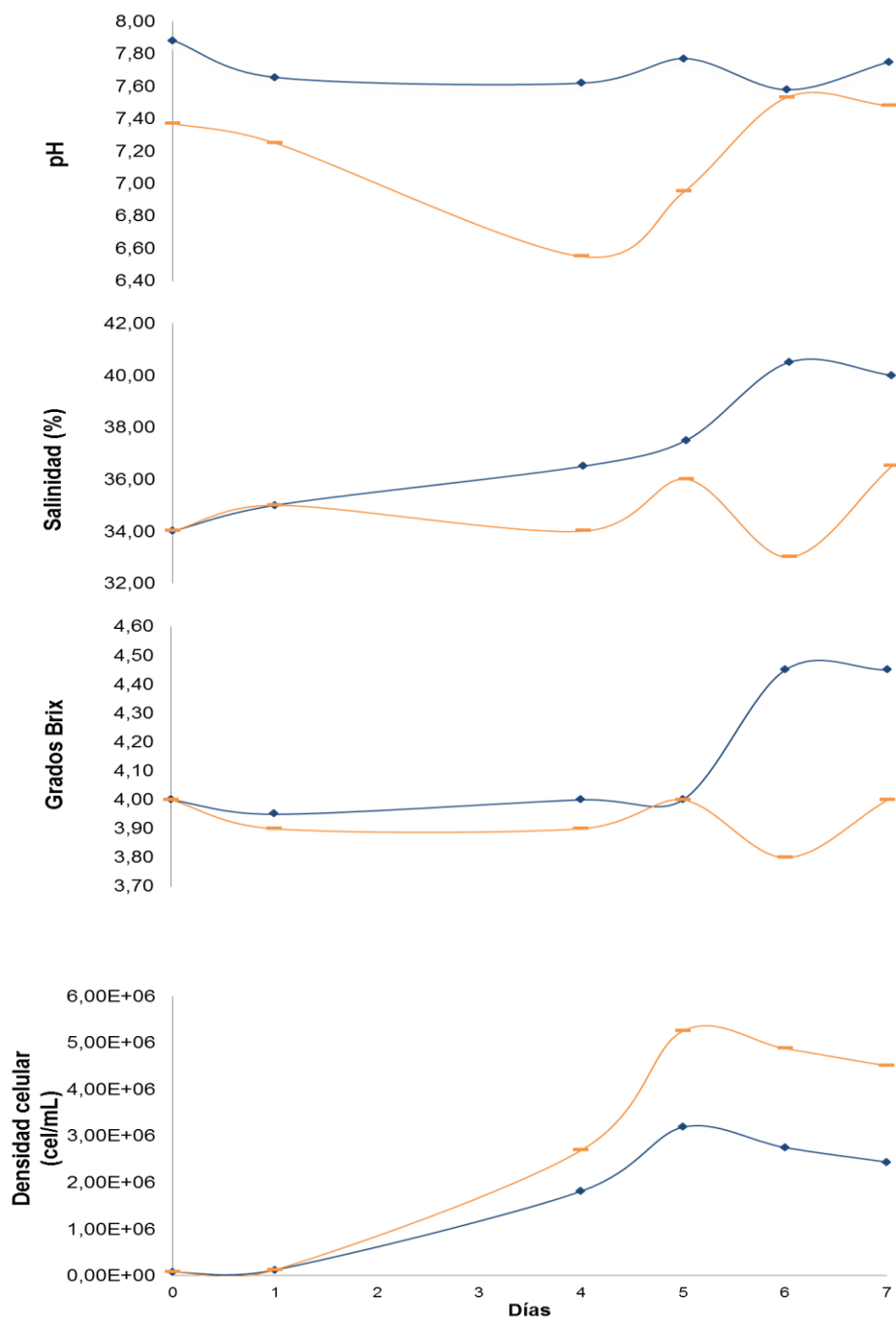


Figura N° 10 Cinéticas de los cultivos de microalga *Chaetoceros gracilis* en MACM 10% (♦) y medio F2 de Guillard (—).

Al analizar los resultados se observó que las cinéticas de crecimiento microalgal de ambos medios de cultivo presentan cierta similitud, ya que ambos medios presentaron una aparente fase lag, que se desarrolla probablemente desde el día 0 hasta el día 3 de los cultivos, observándose un desarrollo de fase exponencial a partir de día 3, los valores máximos de densidad celular obtenidos fueron de 5.25×10^6 cel/mL en el caso del medio comercial F2 de Guillard y de 3.19×10^6 cel/mL para el caso del MACM 10%.

Con estos resultados se procedió a la aplicación del Análisis de Varianza de Muestras Aleatorias Independientes (ANOVA), a un valor de significancia del 0.05 ($P < 0.05$), obteniéndose los resultados expresados en la Tabla N° 10.

Tabla N° 10 Análisis de Varianza de Muestras Aleatorias Independientes (ANOVA) de las densidades celulares obtenidas de los medios de cultivo MACM 10% y medio comercial F2 de Guillard.

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Valor
Efectos principales					
A:DIAS	3.40605E13	5	6.81211E12	12.79	0.0071
B:MEDIOS DE CULTIVO	4.23641E12	1	4.23641E12	7.95	0.0371
RESIDUAL	2.66284E12	5	5.32568E11		
TOTAL (CORREGIDO)	4.09598E13	11			

Al realizar el Análisis de Varianzas de Muestras Aleatorias Independientes, (Tabla N° 10) se observa que para los días de cultivo se tiene un valor de $P=0.0071$ ($P < 0.05$) por lo tanto se valora que al menos uno de los días de cultivo ha producido resultados promedio de densidad celular, significativamente diferentes del resto. Para los medios de cultivo se obtiene un valor de $P=0.0371$ ($P < 0.05$) por lo tanto se valora que al menos uno de los medios de cultivo, en uno de los tiempos, ha producido resultados de densidad celular promedio significativamente diferentes del resto.

A partir de los resultados de ANOVA se aplicó la técnica estadística de Diferencia Mínima Significativa (LSD) para verificar cuál de los días de cultivo presenta mayores valores, estadísticamente comprobados, de densidad celular, la prueba LSD se expresa en la Tabla N° 11.

Tabla N° 11 Diferencia Mínima Significativa (LSD) de las densidades celulares obtenidas de los medios de cultivo MACM 10% y medio comercial F2 de Guillard, según los días de cultivo.

<i>Contraste (Días)</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencias</i>	<i>+/- Limites</i>
0 – 1		-50000.0	1.87595E6
0 – 4	*	-2.175E6	1.87595E6
0 – 5	*	-4.145E6	1.87595E6
0 – 6	*	-3.74E6	1.87595E6
0 – 7	*	-3.395E6	1.87595E6
1 – 4	*	-2.125E6	1.87595E6
1 – 5	*	-4.095E6	1.87595E6
1 – 6	*	-3.69E6	1.87595E6
1 – 7	*	-3.345E6	1.87595E6
4 – 5	*	-1.97E6	1.87595E6
4 – 6		-1.565E6	1.87595E6
4 – 7		-1.22E6	1.87595E6
5 – 6		405000.	1.87595E6
5 – 7		750000.	1.87595E6
6 – 7		345000.	1.87595E6

Al analizar los resultados obtenidos por LSD (Tabla N° 11) observamos que un asterisco se ha colocado junto a 9 pares, lo que nos indica que estos pares presentan diferencias estadísticamente significativas en el nivel de confianza del 95,0%.

Con base a los resultados obtenidos podemos apreciar que las diferencias existentes entre el día 0 y el día 1 con los días 4, 5, 6, y 7 son negativas, cuya interpretación nos indica que con el transcurso de los días aumentaba la densidad celular. Obteniéndose que la mayor diferencia se alcance el día 5, siendo este día, en el que se obtiene mayor densidad celular.

También a partir de los resultados de ANOVA se aplicó la técnica estadística de Diferencia Mínima Significativa (LSD) para verificar cuál de los medios de cultivo presenta mejores resultados estadísticamente comprobados de densidad celular, y así seleccionar el medio de cultivo con mejores resultados; los resultados obtenidos de LSD se expresan en la Tabla N° 12.

Tabla N° 12 Diferencia Mínima Significativa (LSD) de las densidades celulares obtenidas de los medios de cultivo MACM 10% y medio comercial F2 de Guillard.

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Limites</i>
MACM 10% - Medio F2 de Guillard	*	-1.18833E6	1.08308E6

Al analizar los resultados obtenidos por LSD (Tabla N° 12) observamos que un asterisco se ha colocado junto a un par, lo que nos indica que ambos medios muestran diferencias estadísticamente significativas en el nivel de confianza del 95,0%.

Con base a los resultados obtenidos podemos apreciar que las diferencias existentes entre el MACM 10% y el medio comercial F2 de Guillard son negativas, cuya interpretación nos indica que se obtiene menor densidad celular en el MACM 10% que en el medio comercial F2 de Guillard.

Considerando los valores máximos de densidad celular obtenidos y relacionándolos porcentualmente se tiene que:

$$\begin{array}{l} 5,25 \times 10^6 \text{ cel/mL} \text{ ----- } 100 \% \text{ del microalga obtenible en medio comercial} \\ 3,19 \times 10^6 \text{ cel/mL} \text{ ----- } x \end{array}$$

$$x = 61\% \text{ del microalga en MACM 10\%}$$

Teniéndose que es posible obtener, en el MACM 10%, el equivalente a un 61% de densidad celular máxima de *Chaetoceros gracilis* al ser cultivada en el medio comercial F2 de Guillard, en condiciones de laboratorio.

Además también se pueden discutir los resultados al analizar los aumentos obtenidos de la densidad celular en términos de magnitudes logarítmicas (Tabla N° 13), pudiendo verificarse que los valores máximos de densidad celular obtenidos en esta investigación, son de 6.72 logaritmos para el medio comercial F2 de Guillard y de 6.50 logaritmos para el MACM 10%. Considerando que al inicio del cultivo se tenía una densidad celular de 7.5×10^4 cel/mL de *Chaetoceros gracilis* en ambos medios de cultivo equivalentes a 4.88 logaritmos, se puede calcular el aumento y compararlo con los aumentos de densidad celular reportados por otras investigaciones, como los resultados obtenidos en la investigación realizada por Ortega, A. y Reyes, H. (2013) ⁽³⁷⁾, quienes cultivaron la microalga *Chaetoceros gracilis* en medio F de Guillard, donde se observó un aumento de la densidad celular de 0,78 logaritmos en 5 días; también los resultados obtenidos por González, B. (1999) ⁽⁶⁾, quien cultivó 3 tipos de microalgas, entre ellas la microalga *Chaetoceros gracilis*, en 4 medios de cultivo nutritivos, F2 de Guillard, medio algal, fertilizante agrícola y Walne, partiendo de un inóculo inicial de 6,34 logaritmos de *Chaetoceros gracilis*; obteniendo valores máximos de 7.16, 7.2, 6.99 y 7.22 logaritmos respectivamente.

Al considerar los aumentos en la densidad celular en los diferentes cultivos de *Chaetoceros gracilis*, se verificó que en ésta investigación, se obtuvo un mayor crecimiento de la microalga que el obtenido por otras investigaciones.

Tabla N° 13 Comparación de los aumentos de la densidad celular en unidades logarítmicas, de resultados de diferentes investigaciones, utilizando *Chaetoceros gracilis*. ^(6, 37)

Medios de cultivo /Autores	Parra, E.; Cuadra, T. y Sorto, M. (2015).			Ortega, A. y Reyes, H. (2013). ⁽³⁷⁾ .			González, B. (1999). ⁽⁶⁾ .		
	Log [Inicial]	Log [Final]	Δ	Log [Inicial]	Log [Final]	Δ	Log [Inicial]	Log [Final]	Δ
MACM 10%	4,88	6,50	1,63						
Medio F2 de Guillard	4,88	6,72	1,85				6,34	7,16	0,82
Medio F de Guillard				5,40	6,18	0,78			
Medio Algal							6,34	7,20	0,86
Fertilizante Agrícola							6,34	6,99	0,65
Walne							6,34	7,22	0,87

Al analizar los resultados obtenidos de los pigmentos fotosintéticos (clorofilas a, b y carotenoides totales) se puede observar la producción de pigmentos fotosintéticos elaborados por la microalga *Chaetoceros gracilis* en cada uno de los medios de cultivo probados. Observando que en ambos casos hay una aparente relación entre la concentración de clorofila a y b. En ambos medios de cultivo la microalga se observa una disminución en la concentración de clorofila a cuando aumenta la concentración de clorofila b (Figura N° 12).

Esta relación observada entre las concentraciones de clorofila a y b confirman el fenómeno reportado del ciclo de las clorofilas ^(31; 32), el cual consiste en la conversión de clorofila a (debido a oxidación), a clorofila b (Figura N° 11), lo cual pareciera estar sucediendo desde el inicio del cultivo al día cuatro en el MACM al 10%, y en el caso del medio F2 se observa en puntos más focalizados (del día cero al uno y del cuatro al cinco). Por otro lado se observa que el cese del crecimiento en ambos medios está acompañado de la disminución de la clorofila b y aumento de la clorofila a, es decir un fenómeno de reducción, que se realiza entre el cuarto y quinto día en el MACM al 10%, y entre el quinto y

sexto día en el medio F2 de Guillard, lo cual concuerda con las variaciones observadas en los valores de pH en los medios de cultivo (Figura N° 12), considerándose que estas variaciones responden también a las transformaciones debidas al ciclo de las clorofilas ^(31; 32).

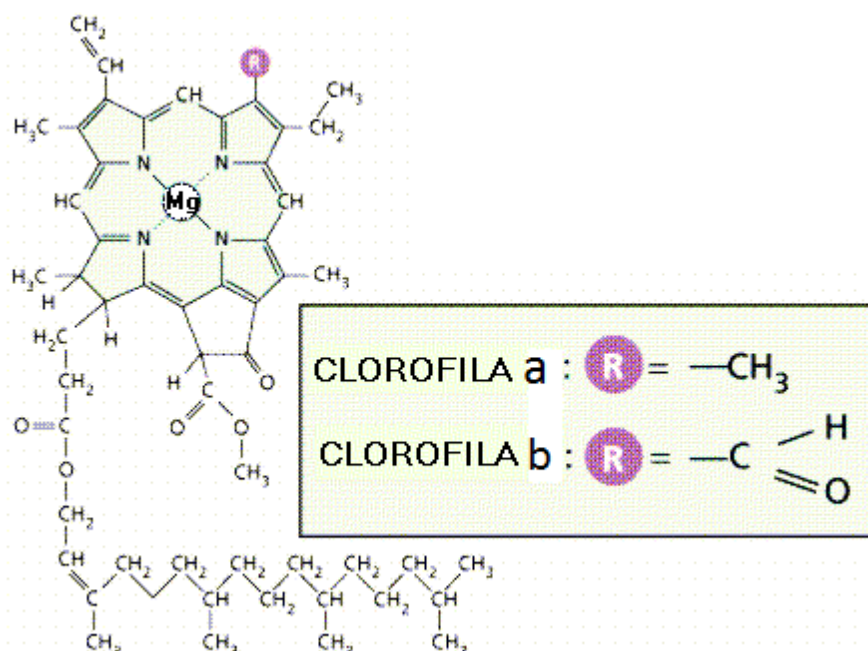


Figura N° 11 Estructura molecular de la clorofila a y b

En el caso de los carotenoides totales, estos siguen una ruta metabólica diferente a la de las clorofilas ^(31; 32), presentando un comportamiento diferente. En las cinéticas de los carotenoides totales podemos observar que a medida que pasa el tiempo existe una mayor producción de carotenoides totales. Teniéndose valores máximos de producción de carotenoides totales el día 5, de 0.1434 µg/mL de carotenoides totales en el MACM 10% y de 0.3401 µg/mL de carotenoides totales en el medio F2 de Guillard, lo cual nos indica que podría existir una relación directamente proporcional entre la cantidad de biomasa y la cantidad de carotenoides totales, en la cinética de crecimiento microalgal.

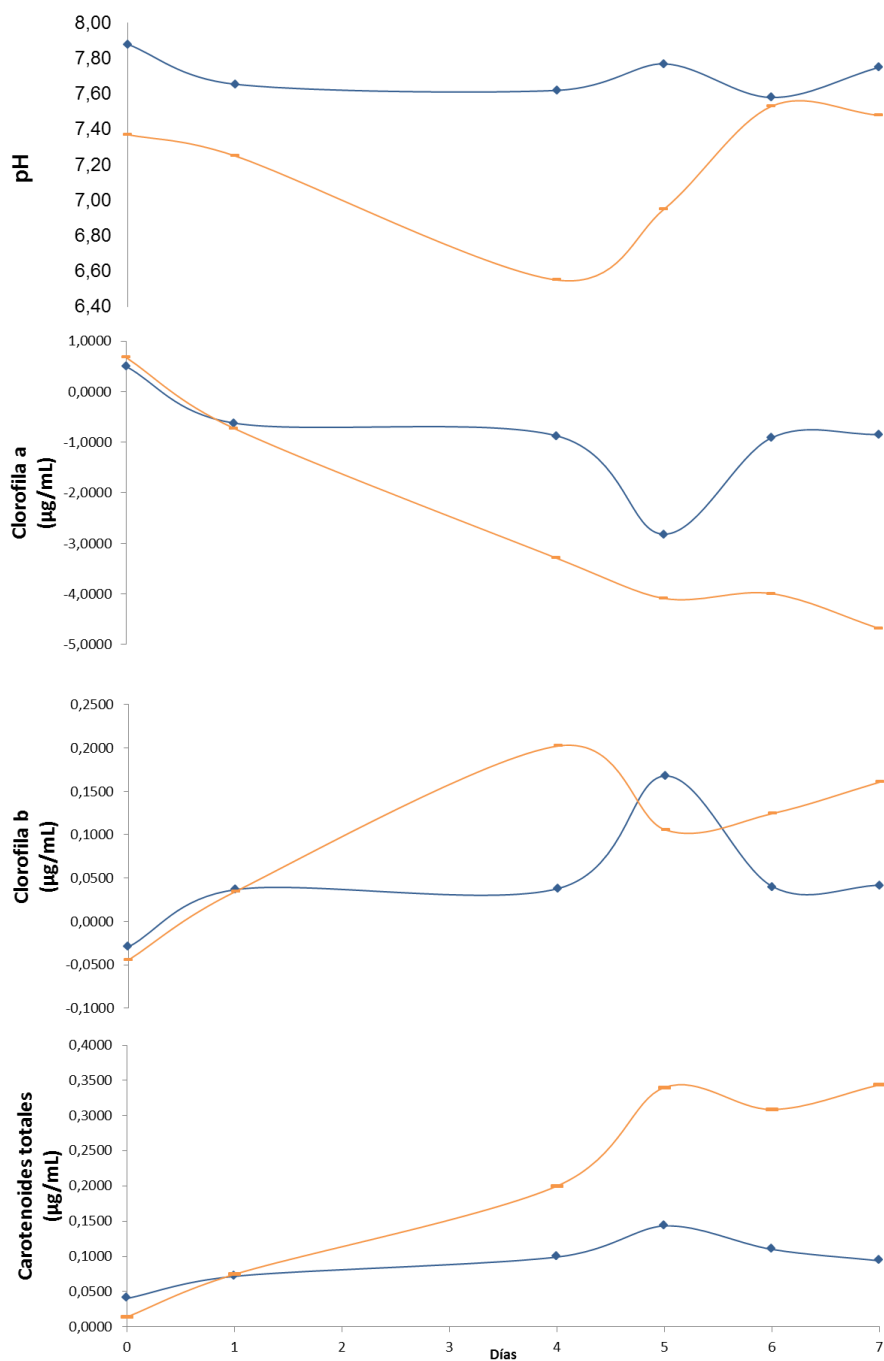


Figura N° 12 Cinéticas de producción de pigmentos fotosintéticos en el cultivo microalga *Chaetoceros gracilis* en MACM 10% (◆) y medio F2 de Guillard (—).

Con estos resultados se procedió a la aplicación del Análisis de Varianza de Muestras Aleatorias Independientes (ANOVA), a un valor de significancia del 0.05, dichos resultados se encuentran en las Tablas, desde la Tabla N° 14 a la Tabla N° 18.

Tabla N° 14 Análisis de Varianza de Muestras Aleatorias Independientes (ANOVA) para clorofilas a, obtenida de *Chaetoceros gracilis* cultivada en los medios de cultivo MACM 10% y medio comercial F2 de Guillard.

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Valor
Efectos principales					
A:DIAS	22.2765	5	4.4553	3.36	0.1046
B:MEDIO DE CULTIVO	9.24815	1	9.24815	6.98	0.0459
RESIDUAL	6.62338	5	1.32468		
TOTAL (CORREGIDO)	38.148	11			

A pesar de que se obtuvieron valores negativos de clorofila a, estos se observan consistentes en lo relativo a su relación con la clorofila b en lo referente al ciclo de las clorofilas ⁽³¹⁾, y se decidió realizar el Análisis de Varianzas de Muestras Aleatorias Independientes (Tabla N° 14). Este análisis indica que para los días de cultivo se tiene un valor de $P=0.1046$ ($P \geq 0.05$) por lo tanto las medias de los valores de clorofila a, no presenta diferencias estadísticamente significativas considerando los días de cultivo. Para los medios de cultivo se obtiene un valor de $P=0.0459$ ($P < 0.05$) por lo tanto tenemos que al menos uno de los medios de cultivo ha producido resultados promedio de clorofila a que difieren de forma estadísticamente significativa del resto.

A partir de los resultados de ANOVA se aplicó la técnica estadística de Diferencia Mínima Significativa (LSD) para verificar cuál de los medios de cultivo presenta mayores valores, estadísticamente comprobados, de clorofila a, la prueba LSD se expresa en la Tabla N° 15.

Tabla N° 15 Diferencia Mínima Significativa (LSD) de clorofila a, obtenida de *Chaetoceros gracilis* cultivada en los medios de cultivo MACM 10% y medio comercial F2 de Guillard.

Contraste	Sig.	Diferencias	+/- Limites
MACM 10% - Medio F2 de Guillard	*	1.75577	1.70815

Al analizar los resultados obtenidos por LSD (Tabla N° 15), observamos que la prueba indica que ambos medios de cultivo muestran diferencias estadísticamente significativas en el nivel de confianza del 95,0%.

Se puede apreciar que las diferencias existentes entre el MACM 10% y el medio comercial F2 de Guillard son positivas, cuya interpretación nos indica que se obtiene mayor cantidad de clorofila a en el MACM 10% que el en medio comercial F2 de Guillard.

Tabla N° 16 Análisis de Varianza de Muestras Aleatorias Independientes (ANOVA) para clorofila b, obtenida de *Chaetoceros gracilis* cultivada en los medios de cultivo MACM 10% y medio comercial F2 de Guillard.

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Valor
MAIN EFFECTS					
A:DIAS	0.0411682	5	0.00823365	2.13	0.2129
B:MEDIO DE CULTIVO	0.0069649	1	0.0069649	1.80	0.2371
RESIDUAL	0.0193124	5	0.00386249		
TOTAL (CORREGIDO)	0.0674456	11			

Al realizar el Análisis de Varianzas de Muestras Aleatorias Independientes con los valores de clorofila b obtenidos (Tabla N° 16) resulta que para los días de cultivo se tiene un valor de $P=0.2129$ ($P \geq 0.05$) por lo tanto la media de los valores de clorofila b, no presentan diferencias estadísticamente significativas considerando los días de cultivo. Para los medios de cultivo se obtiene un valor de $P=0.2371$ ($P \geq 0.05$) por lo tanto la media de los valores de clorofila b, no

presenta diferencias estadísticamente significativas considerando los medios de cultivo.

Considerando estos resultados podemos establecer que la cantidad de clorofila b obtenible de la microalga *Chaetoceros gracilis*, cultivada en el MACM 10%, es estadísticamente equivalente a la cantidad de clorofila b obtenible de *Chaetoceros gracilis* cultivada en medio comercial F2 de Guillard.

Tabla N° 17 Análisis de Varianza de Muestras Aleatorias Independientes (ANOVA) para carotenoides totales, obtenidos de *Chaetoceros gracilis* cultivada en los medios de cultivo MACM 10% y medio comercial F2 de Guillard.

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Valor
Efectos principales					
A:DIAS	0.0751154	5	0.0150231	2.33	0.1869
B:MEDIO DE CULTIVO	0.0435608	1	0.0435608	6.77	0.0482
RESIDUAL	0.0321858	5	0.00643715		
TOTAL (CORREGIDO)	0.150862	11			

Al realizar el Análisis de Varianzas de Muestras Aleatorias Independientes con los valores de carotenoides totales obtenidos, (Tabla N° 17) resulta que para los días de cultivo se tiene un valor de $P=0.1869$ ($P \geq 0.05$) por lo tanto la media de los valores de carotenoides totales, no presenta diferencias estadísticamente significativas considerando los días de cultivo. Para los medios de cultivo se obtiene un valor de $P=0.0482$ ($P < 0.05$) por lo tanto tenemos que al menos uno de los medios de cultivo ha producido resultados de carotenoides totales, la media de los cuales difiere de forma estadísticamente significativa del resto.

A partir de los resultados de ANOVA se aplicó la técnica estadística de Diferencia Mínima Significativa (LSD) para verificar cuál de los medios de cultivo presenta mayores valores, estadísticamente comprobados, de carotenoides totales, la prueba LSD se expresa en la Tabla N° 18.

Tabla N° 18 Diferencia Mínima Significativa (LSD) para carotenoides totales, obtenidos de *Chaetoceros gracilis* cultivada en los medios de cultivo MACM 10% y medio comercial F2 de Guillard.

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencias</i>	<i>+/- Limites</i>
MACM 10% - Medio F2 de Guillard	*	-0.1205	0.119075

Al analizar los resultados obtenidos por LSD (Tabla N° 18) observamos que un asterisco se ha colocado junto a un par, lo que nos indica que ambos medios muestran diferencias estadísticamente significativas en el nivel de confianza del 95,0%.

Con base a los resultados obtenidos podemos apreciar que las diferencias existentes entre el MACM 10% y el medio comercial F2 de Guillard son negativas, cuya interpretación nos indica que se obtiene menor cantidad de carotenoides totales en el MACM 10% que el en medio comercial F2 de Guillard.

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

1. Es posible cultivar la microalga *Chaetoceros gracilis* en medios de cultivo empleando agua de coco como sustrato. Sin embargo, solo el Medio de Agua de Coco Modificado al 10% se produjo crecimiento significativo, presentando diferencias estadísticamente significativas de densidad celular promedio, con respecto a los Medios de Agua de Coco Modificado al 20%, 30% y 40%.
2. Se seleccionó el Medio de Agua de Coco Modificado al 10%, ya que en este se obtuvieron mejores resultados de crecimiento de la microalga, pH y salinidad.
3. El Medio de Agua de Coco Modificado al 10% dio lugar a un incremento máximo de biomasa de *Chaetoceros gracilis* de 1.63 logaritmos, el cual constituye un mejor resultado que el obtenido por otras investigaciones.
4. Se determinó estadísticamente que el día cinco fue el día de máxima producción de biomasa en los cultivos de *Chaetoceros gracilis* en los diferentes medios de cultivo comparados.
5. De acuerdo a los resultados obtenidos es posible obtener valores promedio máximos de densidad celular de 3.19×10^6 cel/mL de *Chaetoceros gracilis* en el Medio de Agua de Coco Modificado al 10% y de 5.25×10^6 cel/mL de *Chaetoceros gracilis* en el medio comercial F2 de Guillard.
6. Al comparar porcentualmente los valores promedio máximos de densidad celular de *Chaetoceros gracilis* se tiene que, en el MACM 10%, es posible obtener el equivalente a un 61% de densidad celular máxima de *Chaetoceros gracilis* al ser cultivada en el medio comercial F2 de Guillard, en condiciones de laboratorio.

7. Al evaluar las cinéticas de los pigmentos fotosintéticos, elaborados por *Chaetoceros gracilis*, al ser cultivada en el Medio de Agua de Coco Modificado al 10% y el medio comercial F2 de Guillard, se puede observar que existe una tendencia a la disminución de la concentración de clorofila a, conforme aumenta la clorofila b, fenómeno acorde a lo explicado por el ciclo de las clorofilas, donde se desarrollan reacciones Oxido Reducción, que podrían ser las causantes de las variaciones en los cambios de pH en los medios.
8. De acuerdo a los resultados obtenidos, es posible obtener cantidades significativamente mayores de clorofila a, al cultivar la microalga *Chaetoceros gracilis* en el Medio de Agua de Coco Modificado al 10%, cantidades estadísticamente equivalentes de clorofila b en ambos medios de cultivo y mayor cantidad de carotenoides totales en el medio F2 de Guillard.
9. Al igual que la biomasa, la máxima producción de carotenoides totales se observó el día cinco, obteniéndose 0,1434 µg/mL de carotenoides totales en el Medio de Agua de Coco Modificado al 10% y 0,3401 µg/mL de carotenoides totales en el medio comercial F2 de Guillard.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

1. Realizar un análisis químico proximal para determinar la calidad de la biomasa obtenida con el Medio de Agua de Coco Modificado al 10% y el medio comercial F2 de Guillard, para verificar cuál de los dos medios de cultivo produce biomasa con mejores características.
2. Realizar un estudio de disponibilidad y costos, para determinar la conveniencia económica de utilizar el agua de coco como nutriente para la elaboración del Medio de Agua de Coco Modificado al 10% para el cultivo de microalgas, respecto a otros medios de cultivo.
3. Cultivar otras especies de microalgas en el Medio de Agua de Coco Modificado al 10%, para comprobar su efectividad como medio de cultivo para microalgas.
4. Experimentar con el Medio de Agua de Coco Modificado al 10%, el cultivo de microalgas a escala de volúmenes masivos.
5. Cultivar las microalgas en el Medio de Agua de Coco Modificado al 10% en el laboratorio de microalgas de la Estación Acuícola Puerto El Triunfo Jiquilisco, Usulután, del Centro de Desarrollo de la Pesca y la Acuicultura, para verificar el desarrollo de las microalgas en las condiciones de su laboratorio.

BIBLIOGRAFIA

1. Albuquerque, R.; de Macedo, S. y Koenig, M. (1999). *Use of Secondary Sewage Water as a Culture Medium for Chaetoceros gracilis and Thalassiosira sp (Chrysophyceae) in Laboratory Conditions*. ScieloBrazil, Brazilian Archives of Biology and Technology, 42 (2).
2. MD Guiry en Guiry, MD y Guiry, GM 2014. (2014). AlgaeBase. [Base de datos de Internet]. Publicación en todo el mundo de la electrónica, de la Universidad Nacional de Irlanda, Galway; 23 de mayo de 2005, [verificado 15 de marzo de 2011; buscado el 22 de mayo de 2014]. [On line] Disponible en: <http://www.algaebase.org>
3. Almaguer, Y.; Alfonso, E. y Leal, S. (2004). *Aislamiento y cultivo de dos especies de diatomeas bentónicas*. Revista de Invest. 25 (1), 57-64.
4. Avelar, A. y Ayala, G. (2006). *Diseño de un sistema de gestión de calidad basado en la seguridad alimentaria para la industria de los jugos naturales* [Tesis de ingeniería.] San Salvador: Universidad de El Salvador. Facultad de Ingeniería y Arquitectura. 283 p.
5. Brand, C. (1997). *Generación Biotecnológica para la producción de microalgas*. Ciencia y Mar. UMAR.
6. González, Breezy. (1999). *Evaluación de medios nutritivos para el crecimiento de tres microalgas marinas de uso común en acuicultura*. Fundación La Salle de Ciencias Naturales, tomo LIX, número 151.

7. Booth, B. (1995). *Estimación de la biomasa del plancton autótrofo usando microscopía*. En Alveal, K.; Ferrario, M.E.; Oliveira, E.C. y Sar, E. Manual de Métodos Ficológicos. Primera Edición. (pp. 187-198) Chile: ANÍVAL PINTO SA.
8. Cambefort, S. y Arcos, F. (2009). *Efecto de las Microalgas Chaetoceros gracilis, Tetraselmis sp. e Isochrysis galbana sobre la reproducción y desarrollo naupliar en Copépodos Calanoideos marinos tropicales, Acartia spp* [Tesis de ingeniería.] Guayaquil: Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL). Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar (FIMCM); 81 p.
9. Castelló Orvay, F. (1993). *Acuicultura Marina: Fundamentos biológicos y tecnología de la producción*. 2ª ed. Barcelona: HUROPE, SL.
10. Centro de Desarrollo de la Pesca y la Acuicultura. (2009). *Informe técnico Producción artificial de semilla y cultivo de engorde de moluscos bivalvos*. San Salvador, El Salvador: CENDEPESCA, MAG y JICA. A través del proyecto para el desarrollo de la Acuicultura de Moluscos en la República de El Salvador.
11. Centro de Desarrollo de la Pesca y la Acuicultura. (2004). *Manual de cultivo de microalgas en CENDEPESCA, Puerto El Triunfo*. San Salvador, El Salvador: CENDEPESCA, MAG y JICA. En apoyo al proyecto de Desarrollo de la Acuicultura en los Estuarios de El Salvador.
12. Centro de Desarrollo de la Pesca y la Acuicultura. (2008). *Manual sobre reproducción y cultivo del camarón blanco (Litopenaeus vannamei)*. San Salvador, El Salvador: CENDEPESCA, MAG y MARN. En apoyo al

proyecto Manejo integral para el desarrollo sostenible en el Golfo de Fonseca y su área de influencia, Araucaria XXI.

13. Centro de Desarrollo de la Pesca y la Acuicultura. (2007). *Manual técnico de producción de semillas de ostra del Pacífico (Crassostrea gigas) y manual técnico sobre el cultivo de engorde de ostra del Pacífico (C. gigas) en las comunidades modelo*. San Salvador, El Salvador: CENDEPESCA, MAG y JICA. A través del proyecto para el desarrollo de la Acuicultura de Moluscos en la República de El Salvador.
14. Centro de Desarrollo de la Pesca y la Acuicultura. (2008). *Manual sobre reproducción y cultivo del camarón blanco (Litopenaeus vannamei)*. San Salvador, El Salvador: CENDEPESCA, MAG y MARN. En apoyo al proyecto Manejo integral para el desarrollo sostenible en el Golfo de Fonseca y su área de influencia, Araucaria XXI.
15. Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA). (2000). *Boletín Técnico Hibridación del coco*. San Salvador. El Salvador: CENTA, MAG.
16. Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA). (2003). *Guía técnica Cultivo del cocotero*. San Salvador. El Salvador: CENTA, MAG.
17. Chávez, F.; Alas, J.; Rovira, M. y Ramos, E. (2013). *Proyecto: Potencial de la biomasa como fuente de energía en la zona de Bahía de Jiquilisco*. San Salvador, El Salvador. UCA, AEA, SICA, CCAD. 70 p
18. FAO. (2014). *La Producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura*. Depósito de Documentos de la FAO, Departamento de Pesca.

19. FAO. (2007). *Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura, factores que afectan su sustentabilidad en América Latina*. Depósito de Documentos de la FAO, Actas de pesca y acuicultura.
20. Fundación La Salle de Ciencias Naturales. (1999). *Evaluación de medios nutritivos para el crecimiento de tres microalgas marinas de uso común en acuicultura*: Tomo LIX (151).
21. Gonzales, A. (2000). *Alternativas en el cultivo de microalgas* [Tesis de Acuicultor.] Guayaquil: Escuela Superior Politécnica Del Litoral. Facultad de Ingeniería marítima y Ciencias del Mar. 81 p.
22. Gonzales, M.; Parra, O. y Cifuentes, A. (1995). *Técnicas de cultivo de microalgas en laboratorio*. En Alveal, K.; Ferrario; M.E.; Oliveira, E.C. y Sar, E. Manual de Métodos Ficológicos. Primera Edición. (pp 219-250). Chile: ANÍVAL PINTO SA.
23. Gómez-Guillen E. y Tejada, Olga Lidia. (2010). *Algas marinas: un recurso potencial para el futuro alimenticio en El Salvador*. El Salvador Ciencia & Tecnología. 15(20): 20-24.
24. Gómez, O.; Rodríguez R. y Subero, S. (2011). *Cultivo polialgal (Chaetoceros gracilis, Chlorella sp. Y Tetraselmis chuii) en medios de cultivo no convencionales*. Saber, Universidad de Oriente, Venezuela. 23(1): 84-90.
25. Guerra, M. (2011). *Humus de Lombriz Eiseniafoetida para cultivar dos microalgas marinas como alimento de larvas de camarón*. [Tesis de maestría en biología marina.] La Habana: Universidad de la Habana. Centro de Investigación Marina. 75 p.

26. Instituto Interamericano de cooperación para la agricultura (IICA). (1997). *Diagnóstico del Sector Agropecuario*. El Salvador: Agencia de Cooperación Técnica.
27. Instituto Interamericano de cooperación para la agricultura (IICA). (2001). *Guía técnica sobre el cultivo del coco*. El Salvador: Agencia de Cooperación Técnica.
28. Universidad de la República de Uruguay. *Determinación de clorofilas A, B, C y carotenoides totales por espectrofotometría*. [On line] Disponible en Limno.fcien.edu.uy. 20/01/2015.
29. Lovatelli, A.; Farías, A. y Uriarte, I. (2007). *Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura, factores que afectan su susceptibilidad en América Latina*. En Taller Técnico de la FAO, (pp 17-377). Puerto Montt, Chile. Roma, Italia: FAO. 377p.
30. Martínez, M. (2002). *Los moluscos Pectínidos de Iberoamérica: ciencia y acuicultura*. Mexico: LIMUSA, S.A. de C.V.
31. Masuda, Tatsuru. y Fujita, Yuichi. (2008). *Regulation and evolution of chlorophyll metabolis*. Journal Homepage. DOI: 10.1039/b807210h.
32. Markwell, J.; Namuth, D. y Rios, I. (2015). *Los Pigmentos Vegetales y la Fotosíntesis*. Plant and Soil Sciences eLibrary:: Print Lesson.
33. Moura, A.; Bezzera, E.; Koenig, M. y Eskinazi, E. (2007). *Chemical composition of three microalgae species for possible use in mariculture*. ScieloBrazil, Brazilian Archives of Biology and Technology. 50(3).

34. Moura, A.; Bezzer, E.; Koenig, M. y Eskinazi, E. (2006). *Composição química de microalgas em cultivo semi-intensivo: Chaetoceros gracilis Schutt, Isochrysis galbana Parke e Thalassiosira weissflogii (Grunow) G. Fryxell & Hasle*. Revista Ciência Agronômica (Brasil). 37(2): 142-148.
35. Navarro, P.; Tapia, M.; Pérez, E. y Fernández., Welti-Chanes J. (2007). *Leche de coco, composición tecnología y Funcionabilidad: Nuevas oportunidades para su conservación y Uso*. Revista Agrollandia. 4:37-52.
36. Nieves, M.; Voltolina, D.; Ruiz, J.; Cisneros, M. y Piña, P. (2000). *Cultivo de algas marinas con medios enriquecidos con productos de naturaleza zeolítica*. Hidrobiológica. 10(1): 1-6.
37. Ortega, A. y Reyes, H. (2013). *Cultivation of the microalgae Chaetoceros gracilis to feed the rotifer Brachionus plicatilis*. Cuaderno de Investigación UNED. 5(2): 189-193.
38. Ovalles, J.; León, L.; Vielma, R. y Medina, A. (2002). *Determinación del contenido de aminoácidos libres del agua de coco tierno por HPLC y Revisión electrónica sobre la nueva tecnología para el envasado del agua de coco*. Fe de erratas en Revista de la facultad de Farmacia. 44. 70-78.
39. Oviedo, N. (2004). *Caracterización de ecotipos de cocoteros en la planicie costera de los departamentos de La Paz, Sonsonate, La Libertad y Usulután*. [Tesis de ingeniería.] San Salvador: Universidad de El Salvador. Facultad de Ciencias Agronómicas. 114p.

40. Perez, D. (1995). *Cultivo experimental de las diatomeas Thalassiosira subtilis, Skeletonema costatum y Chaetoceros affinis en condiciones de Laboratorio para fines de Acuicultura*. [Tesis de maestría.] Manzanillo: Universidad de Colima. Facultad de Ciencias Marinas. 69 p.
41. Pérez, J. (2011). *Evaluación del efecto de diferentes diluciones de agua de coco suplementada con Biotina para la producción de levadura (Saccharomyces cerevisiae) a nivel matraz y en bioreactor de tanque agitado*. [Tesis de maestría.] Córdoba, Veracruz: Institución de enseñanza de investigación de ciencias agrícolas. Postgrado de Agroindustria. 50 p.
42. Picado, C. (1942). *El agua de coco como medio de cultivo*. Oficina Sanitaria Panamericana: Laboratorio del Hospital de San José, Costa Rica.
43. Prieto, M.; Mogollon, M.; Castro, A. y Sierra, L. (2005). *Efecto del medio y condiciones de cultivo en la productividad de tres diatomeas marinas con potencial acuícola*. MVZ-Cordoba. 10(1): 544-554.
44. Ramírez, O. y Molina, M. (2005). *Evaluación de parámetros cinéticos para la Sacharomyces cerevisiae utilizando agua de coco como sustrato*. Ingeniería. 15 (1,2): 91-102.
45. Romo, A. (2002). *Manual para el Cultivo de Microalgas* [Memoria técnica de trabajo profesional.] La Paz: Universidad Autónoma de Baja California. Área Interdisciplinaria de Ciencias del Mar. Departamento de Biología Marina. 65p.

46. Sánchez, A. (1993). *Cultivos: Producción de microalgas*. Castelló Orvay F. Acuicultura Marina: Fundamentos biológicos y tecnología de la producción. 2ª ed. Barcelona: HUROPE, SL. p. 313
47. Sanchez-Saavedra, M. y Voltolina, D. (2006). *The Growth rate, biomass production and composition of Chaetoceros sp grown with different light sources*. ELSEVIER Aguacultura engineering. 35(2): 161-165.
48. Serrano Gallego, Roque. (2003). *Introducción al análisis de datos experimentales: Tratamiento de datos de Bioensayos*. Castello de la Plata: Publicacions de la Universitat Jaume I, D.L.
49. Soto, A. (2012). *Transferencia de tecnología a comunidades pesqueras. Cultivo de moluscos de manglar en El Salvador*. El Salvador Ciencia & Tecnología. 17(23):23-28.
50. Sumanta, N.; Haquel, C.; Nishika, J. y Suprakash, R. (2014). *Spectrophometric analysis of Chlorophylls and Carotenoids from commonly grown fern species by using various extracting solvents*. Research Journal of Chemical Sciences. Vol. 4(9), 63-69. ISSN 2231-606X.
51. United States Department of Agriculture (USDA) NRCS equipo Nacional de datos de plantas – PlantsDatabase. [Base de datos de Internet]. Publicación en todo el mundo de la electrónica, de United States, USDA NRCS; 22 de mayo de 2014, [verificado 22 de mayo de 2014; buscado el 22 de mayo de 2014]. [On line]. Disponible en <http://www.plants.usda.gov>

52. Yong, J.; Ge, L.; Fei, Y. y Tan, S. (2009). *The Chemical Composition and Biological Properties of Coconut (Cocos nucifera L.) Water*. *Molecules*. 14. 5144-5164.

ANEXOS

ANEXO N° 1
MATERIALES, EQUIPO, MEDIOS Y REACTIVOS.

MATERIALES Y EQUIPO (9, 10; 20; 21; 22; 24; 41; 43; 44; 45).

Tabla N° 19 Materiales y equipo utilizados en el presente trabajo de investigación.

Estantería	Cristalería y Estériles	Equipo y más
<ul style="list-style-type: none">- Estante metálico de 6 niveles (Dexium).- Lámparas de Luz Blanca artificial con armazón.<ul style="list-style-type: none">- UPS (Batería).- Motores de pecera (sistema de aireación).- Varillas de vidrio huecas.- Mangueras de pecera.<ul style="list-style-type: none">- Papel Aluminio.- Cajas de cartón.- Sistema eléctrico.	<ul style="list-style-type: none">- Erlenmeyers de 250 mL.- Probetas de 100 mL.- Micropipetas con puntas.<ul style="list-style-type: none">- Pipetas pasteur.- Cámara de neubauer.- Laminillas de vidrio.- Pipetas volumétricas.<ul style="list-style-type: none">- Tubos con rosca.- Embudos de vidrio.- Cajas petri.- Vasos de precipitado.- Agitadores de vidrio.- Pinzas (estériles).- Perlas de ebullición (estériles).- Asas bacteriológicas.	<ul style="list-style-type: none">TrípodesPapel filtro Whatman.Vortex.Refrigeradora.Espectrofotómetro UV/VIS.Autoclave.Sistema de esterilización. (Filtración por Membrana).Caja incubadora.Desecadores.Brixometro.pHmetro y equipo.Balanzas analítica digital.Luxómetro.Salinometro.

MEDIOS Y REACTIVOS (9, 10; 20; 21; 23; 24; 41; 43; 44; 45).

Medio F2 de Guillard:

Kit comercial F2 de Guillard, preparación según CENDEPESCA (9).

El kit comercial de nutrientes F2 de Guillard consta de 3 porciones, macronutrientes, micronutrientes y solución vitamínica para preparar la solución A y metasilicato de sodio para preparar la solución B. Ambos vienen en

presentación para preparar 1 galón de nutrientes. (La composición de cada solución se describe en la Figura N° 13).

Solución	Reactivo	Cantidad (g)
I (N/P)	NaNO_3	75g
	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	5g
	Agua destilada	total 1000ml
II (Si)	$\text{NaSiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	15g
	Agua destilada	total 1000ml
III (metal)	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.0098g
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.022g
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.01g
	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.18g
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.063g
	Na_2EDTA	4.36g
	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	3.15g
	Agua destilada	total 1000ml
IV (Vitamina)	Biotina	0.005g
	B_{12}	0.005g
	Tiamina (B_1)	0.1g
	Agua destilada	Total 1000ml



Kit de Solución 1 parte A más parte B



Meta: Silicato de Sodio

Figura N° 13 Presentación comercial del medio F2 de Guillard, utilizado en CENDEPESCA. Donde la Solución I (N/P), III (metal) y IV (vitaminas) conforma la Solución A, y la Solución II (Si) conforma la Solución B.

Solución A: Solución de macronutrientes, micronutrientes y vitaminas.

1. Colocar en un vaso de precipitado de 1 L estéril, agua destilada estéril.
2. Disolver la porción de macronutrientes y micronutrientes, utilizando un agitador magnético.
3. Trasegar esta solución a un recipiente de 1 galón y adicionar la solución vitamínica.

4. Homogenizar solución y completar volumen con agua destilada estéril.
5. Homogenizar nuevamente.
6. Etiquetar y guardar bajo refrigeración.

Solución B: Solución de metasilicato de sodio.

1. Colocar en un vaso de precipitado de 1 L estéril, agua destilada estéril.
2. Disolver la porción de metasilicato de sodio.
3. Trasegar esta solución a un recipiente de 1 galón.
4. Aforar a volumen con agua destilada estéril.
5. Homogenizar.
6. Etiquetar y guardar bajo refrigeración.

Medio F2 de Guillard (para preparar 0.8 L).

1. Colocar en el Erlenmeyer de 1 L, 800 mL de agua de mar estéril con salinidad 27-39%.
2. Adicionar 0.5 mL de solución de macronutrientes, micronutrientes y vitaminas y 0.5 mL de solución de metasilicato de sodio.
3. Homogenizar
4. Etiquetar y guardar bajo refrigeración.

Nota: Cuando se quiera utilizar en forma sólida agregar agar-agar al 2%, al medio F2 de Guillard, y esterilizar al autoclave (21).

- *Medio F2 de Guillard para purificación con antibiótico* (21).

Preparara el medio F2 de Guillard, como indica arriba y se le adiciona 1 mL de la mezcla de antibióticos como se describe a continuación:

Solución Stock de antibióticos, Mezcla I (21).

0.6 g de Penicilina G (1.625 unidades por mg)

1.0 g de estreptomicina – SO₄

Agua csp 200 mL.

Esterilice por filtración y guarde en freezer. (-20°C).

Para Utilizarla agregue 1 mL de solución Stock a 100 mL de medio de cultivo.

ANEXO No 2
PROMEDIOS DE LOS DATOS EXPERIMENTALES

Tabla N° 20 Tabla de datos promedio de grados Brix de los MACM en primer experimento preliminar.

Medio de Cultivo / días	°Brix							
	0	1	2	3	6	7	8	9
MACM 10%	4.10	4.00	4.00	4.00	3.93	4.00	4.00	4.00
MACM 20%	4.10	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.03	4.00
MACM 30%	4.30	4.00	4.00	4.03	4.07	4.10	4.00	4.03
MACM 40%	4.30	4.00	4.03	4.00	4.10	4.07	4.00	4.13

Tabla N° 21 Tabla de datos promedio de salinidad de los MACM en primer experimento preliminar.

Medio de Cultivo / días	Salinidad							
	0	1	2	3	6	7	8	9
MACM 10%	35.00	35.00	35.00	35.00	35.00	35,00	35.00	35.00
MACM 20%	35.00	35.33	36.00	36.00	36.67	35,00	36.00	36.67
MACM 30%	35.00	37.67	37.67	37.00	38.00	38,00	37.00	38.00
MACM 40%	37.00	38.00	38.00	38.00	38.00	38,00	38.00	38.33

Tabla N° 22 Tabla de datos promedio de pH de los MACM en primer experimento preliminar.

Medio de Cultivo / días	pH			
	antes de autoc	0	6	9
MACM 10%	8.07	7.63	6.66	6.43
MACM 20%	8.00	6.75	6.04	5.93
MACM 30%	8.03	6.59	5.87	5.60
MACM 40%	8.03	6.23	5.81	5.69

Tabla N° 23 Tabla de datos promedio de densidad celular de los MACM en primer experimento preliminar.

Medio de Cultivo / días	Densidad Celular Promedio							
	0	1	2	3	6	7	8	9
MACM 10%	7.5E+04	1.9E+05	1.9E+05	1.9E+05	5.0E+05	5.0E+05	5.0E+05	5.0E+05
MACM 20%	7.5E+04	2.5E+05	2.5E+05	1.0E+05	1.0E+05	0.0E+00	6.3E+04	0.0E+00
MACM 30%	7.5E+04	2.7E+05	2.5E+05	8.3E+04	8.3E+04	4.2E+04	0.0E+00	0.0E+00
MACM 40%	7.5E+04	1.7E+05	1.3E+05	1.3E+05	1.3E+05	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00

Tabla N° 24 Tabla de datos promedio de grados Brix de los MACM en segundo experimento preliminar.

Medio de Cultivo / días	°Brix					
	0	1	2	3	4	6
MACM 10%	3.90	3.90	4.00	4.07	3.83	3.80
MACM 20%	3.90	3.90	3.87	3.93	3.40	3.37
MACM 30%	4.00	3.93	3.80	3.73	3.33	3.30
MACM 40%	4.00	3.97	3.70	3.40	3.10	3.10

Tabla N° 25 Tabla de datos promedio de salinidad de los MACM en segundo experimento preliminar.

Medio de Cultivo / días	Salinidad					
	0	1	2	3	4	6
MACM 10%	36.00	35.00	34.33	35.00	35.00	35.00
MACM 20%	35.00	34.67	33.67	34.00	33.33	33.00
MACM 30%	35.00	35.00	33.33	32.67	33.33	33.00
MACM 40%	35.00	35.00	33.33	33.00	30.33	30.00

Tabla N° 26 Tabla de datos promedio de pH de los MACM en segundo experimento preliminar.

Medio de Cultivo / días	pH			
	antes de autoc	0	2	6
MACM 10%	8.12	8.12	7.63	7.58
MACM 20%	8.10	8.10	5.77	5.50
MACM 30%	8.01	8.01	4.97	4.80
MACM 40%	8.02	8.02	4.67	4.60

Tabla N° 27 Tabla de datos promedio de densidad celular (cel/mL) de los MACM en segundo experimento preliminar.

Medio de Cultivo / días	Densidad Celular Promedio					
	0	1	2	3	4	6
MACM 10%	7.50E+04	2.08E+05	4.58E+05	5.42E+05	1.75E+06	2.75E+06
MACM 20%	7.50E+04	1.67E+05	4.17E+05	1.25E+05	1.88E+05	8.33E+04
MACM 30%	7.50E+04	2.08E+05	1.04E+05	4.17E+04	0.00E+00	0.00E+00
MACM 40%	7.50E+04	2.08E+05	1.25E+05	2.08E+04	0.00E+00	0.00E+00

Tabla N° 28 Tabla de datos promedio de grados Brix de los MACM en experimento final.

Medio de Cultivo / días	°Brix					
	0	1	4	5	6	7
MACM 10%	4.00	3.95	4.00	4.00	4.45	4.45
F2 de Guillard	4.00	3.90	3.90	4.00	3.80	4.00

Tabla N° 29 Tabla de datos promedio de salinidad de los MACM en experimento final.

Medio de Cultivo / días	Salinidad					
	0	1	4	5	6	7
MACM 10%	34.00	35.00	36.50	37.50	40.50	40.00
F2 de Guillard	34.00	35.00	34.00	36.00	33.00	36.50

Tabla N° 30 Tabla de datos promedio de pH de los MACM en experimento final.

Medio de Cultivo / días	pH					
	0	1	4	5	6	7
MACM 10%	7.88	7.66	7.62	7.77	7.58	7.75
F2 de Guillard	7.37	7.25	6.55	6.95	7.53	7.48

Tabla N° 31 Tabla de datos promedio de densidad celular (cel/mL) de los MACM en experimento final.

Medio de Cultivo / días	Densidad Celular Promedio					
	0	1	4	5	6	7
MACM 10%	7.50E+04	1.25E+05	1.81E+06	3.19E+06	2.75E+06	2.44E+06
F2 de Guillard	7.50E+04	1.25E+05	2.69E+06	5.25E+06	4.88E+06	4.50E+06

Tabla N° 32 Tabla de datos promedio de concentración de clorofila a ($\mu\text{g/mL}$) de los MACM en experimento final

Medio de Cultivo / días	Clorofilas a ($\mu\text{g/mL}$)					
	0	1	4	5	6	7
MACM 10%	0.4963	-0.6214	-0.8729	-2.8189	-0.9127	-0.8466
F2 de Guillard	0.6745	-0.7234	-3.2927	-4.0899	-3.9940	-4.6853

Tabla N° 33 Tabla de datos promedio de concentración de clorofila b ($\mu\text{g/mL}$) de los MACM en experimento final.

Medio de Cultivo / días	Clorofilas b ($\mu\text{g/mL}$)					
	0	1	4	5	6	7
MACM 10%	-0.0292	0.0368	0.0380	0.1679	0.0398	0.0419
F2 de Guillard	-0.0442	0.0350	0.2024	0.1054	0.1247	0.1610

Tabla N° 34 Tabla de datos promedio de concentración de carotenoides totales ($\mu\text{g/mL}$) de los MACM en experimento final.

Medio de Cultivo / días	Carotenoides Totales ($\mu\text{g/mL}$)					
	0	1	4	5	6	7
MACM 10%	0.0404	0.0718	0.0992	0.1434	0.1101	0.0939
F2 de Guillard	0.0143	0.0747	0.2001	0.3401	0.3088	0.3438

Nota: Los días de muestreo de las determinaciones y cuantificaciones de los parámetros ($^{\circ}\text{Brix}$, salinidad, pH, de biomasa y pigmentos fotosintéticos), de todos los experimentos, se realizaron según la disponibilidad de acceso a las instalaciones y disponibilidad de equipo, del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.

ANEXO No 3
SOLICITUDES, PETICIONES Y CERTIFICADOS

Ciudad Universitaria, 10 de marzo de 2014.

Licenciada
Reyna Pacheco
Coordinadora CENDEPESCA
Presente.

Estimada Licenciada:

Sirva la presente para saludarle respetuosamente y desearle toda clase de éxito personal y profesional.


En esta oportunidad nos dirigimos a usted para solicitar su valiosa colaboración en el sentido de recibir al estudiante **EDUARDO ALEXANDER PARRA BARRIENTOS**, egresado de la Carrera Licenciatura en Química y Farmacia, y que le pueda brindar su apoyo técnico en la realización de su tesis cuyo anteproyecto ha sido denominado "**Cultivo del alga *Chaetoceros gracilis* utilizando como medio de cultivo Agua de Coco Modificada**"; por lo que solicitamos de la manera más atenta su colaboración en los siguientes aspectos:

- Donación de un inóculo de la microalga *Chaetoceros gracilis*,
- Donación de agua de mar filtrada,
- Autorización para que el Bachiller Parra, visite las instalaciones de los laboratorios de cultivo de microalgas, en la estación Acuícola de su Institución ubicada en Puerto El Triunfo, esto para poder conocer sus procesos y resultados relativos al cultivo de microalgas y que nos permitirá hacer una comparación y verificar diferencias con el medio de cultivo propuesto en nuestra investigación.
- Apoyo técnico-científico general para la realización del trabajo de investigación propuesto.

Seguros de contar con su amable atención y colaboración, nos suscribimos de usted con toda consideración y estima.

Cordialmente,

"HACIA LA LIBERTAD POR LA CULTURA"


Dra. Tania Ethel Cuadra Zelazny
Docente Asesor




Br. Eduardo Alexander Parra Barrientos
Tesisista


10/III/14



MINISTERIO DE AGRICULTURA Y GANADERÍA
DIRECCIÓN GENERAL DE DESARROLLO DE LA PESCA Y LA ACUICULTURA
(CENDEPESCA)



Santa Tecla, 12 de marzo de 2014

Doctora
Tania Ethel Cuadra Zelaya
Docente Asesor
Facultad Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador
Presente

Es grato para CENDEPESCA apoyar el interés expresado por el alumno **EDUARDO ALEXANDER PARRA BARRIENTOS**, con carnet PB08008, estudiante de la Licenciatura en QUÍMICA Y FARMACIA, para que realice la investigación pertinente a su anteproyecto de Tesis, denominado “Cultivo de Alga Chaetoceros gracilis, utilizando como medio de Cultivo agua de Coco Modificada”.

La anterior investigación, servirá para presentar su tesis, en cumplimiento de los requisitos necesarios para optar al grado de Licenciado en Química y Farmacia.

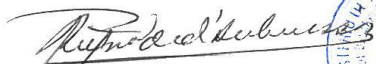
El lugar seleccionado para realizar la Tesis, es en la Estación Acuícola de Moluscos, ubicada en Puerto El Triunfo, Usulután.

Es importante que se presente ante la Licenciada Nadia Cornejo, Técnica del Proyecto Moluscos, en la Estación, para que se coordine con la responsable de la producción de microalgas en dicha Estación y que organicen el plan de trabajo correspondiente, en cumplimiento a su meta establecida.

Sin otro particular, me suscribo de Usted.

Atentamente

DIOS UNION LIBERTAD


Lic. Reyna Pacheco de d'Aubuisson
Coordinadora División de Acuicultura
CENDEPESCA-MAG



c.c: Ing. Kiyotaka Kani/Coordinador Proyecto Moluscos
Licda. Nadia Cornejo/Técnica Proyecto Moluscos
Alumno Eduardo Alexander Parra Barrientos

Recibido
13/03/14
EL
2014.03.13



FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA
UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

Ciudad Universitaria, 19 de mayo de 2014

Lic. Rodolfo Fernando Menjivar
Director de la Escuela de Biología
Presente.

Estimado Licenciado Menjivar:

Reciba un cordial saludo, esperando que todas sus actividades se estén desarrollando con éxito.

Por medio de la presente solicito a usted la confirmación de identidad de la cepa de microalga que de acuerdo a nuestro proveedor es *Chaetoceros gracilis*. Dicha confirmación será utilizada para el trabajo de investigación requisito para la graduación del grado de Licenciatura en Química y Farmacia del estudiante Eduardo Alexander Parra Barrientos, titulado:

“Cultivo del Alga *Chaetoceros gracilis*, utilizando como medio de cultivo agua de coco modificada”

Sin otro particular, agradeciendo de antemano su ayuda.

Atentamente,

“HACIA LA LIBERTAD POR LA CULTURA”

Dña. Tania Ethel Cuadra Zelaya
Docente ASESORA

Br. Eduardo Alexander Parra Barrientos
Tesisista

19.05.2014.



Universidad de El Salvador
Facultad de Ciencias Naturales y Matemática
Escuela de Biología



CERTIFICADO DE IDENTIFICACIÓN

Por medio de la presente se hace constar que en fecha 10 de Septiembre de 2014 se recibió en un tubo de ensayo una muestra de microalgas.

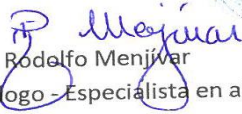
La observación microscópica del espécimen recibido mostró las siguientes características:

- Células solitarias de formas delicadas, geometría rectangular desde vista lateral y elíptica desde vista valvar.
- Cuatro setas delgadas, dos setas por valva, una en cada uno de los extremos del eje apical.
- Cloroplastos solo en el cuerpo de las células y no en las setas.
- Células solitarias rectangulares. Las setas se originan ligeramente dentro de las cuatro esquinas celulares en dirección perpendicular al eje perivalvar, ligeramente curvas y algunas veces onduladas. Eje apical en promedio mide de 5-12 μm .

Todas las características anteriores coinciden con lo reportado por la bibliografía para un espécimen del genero *Chaetoceros* y especie *gracilis* (Moreno, J.L., S. Licea & H. Santoyo. 1996. *Diatomeas del Golfo de California. Universidad Autónoma de Baja California.*).

Y para los interesados que estime conveniente, se extiende la presente en Ciudad Universitaria, a los 24 días del mes de octubre de 2014.




Lic. Rodolfo Menjivar
Biólogo - Especialista en algas
Director de la Escuela de Biología