



UNIVERSIDAD ESTATAL PENINSULA SANTA ELENA

FACULTAD CIENCIAS DEL MAR

CARRERA DE BIOLOGÍA

TEMA:

**INFLUENCIA DE LOS MEDIOS DE CULTIVO EN LA
CONCENTRACION CELULAR DE *Navicula* sp EN LA PROVINCIA DE
SANTA ELENA**

UNIDAD DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Previo a la obtención del título de:

BIÓLOGA

AUTOR:

FIGUAVE CHANCAY NICOLE KATHERINE

TUTOR ACADÉMICO:

BLGA. MARÍA HERMINIA CORNEJO RODRÍGUEZ, PhD

2023

UNIVERSIDAD ESTATAL PENÍNSULA DE
SANTA ELENA

FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
CARRERA DE BIOLOGÍA

“INFLUENCIA DE LOS MEDIOS DE CULTIVO
EN LA CONCENTRACION CELULAR DE *Navicula*
sp EN LA PROVINCIA DE SANTA ELENA”

TRABAJO DE TITULACIÓN

Previa a la obtención del Título de:

BIÓLOGA

Nicole Katherine Piguave Chancay

LA LIBERTAD – ECUADOR

2023

DEDICATORIA

A mis padres por enseñarme que siempre se puede a mi madre por dedicarme su tiempo y apoyo y a mi padre que descansa en paz por enseñarme a nunca rendirme y ser un maravillo ejemplo de superación.

A mi tía que me ayudo incondicionalmente en todo momento para poder terminar mi carrera.

También a mi compañero de aventuras William Bedoya que gracias a su apoyo incondicional en los momentos difíciles estuvo dispuesto a ayudarme en toda ocasión

Nicole Piguave

AGRADECIMIENTO


A las autoridades y personal Académico de la Universidad Estatal
Península de Santa Elena por liderar el proceso de formación
profesional.

En particular a mi tutor de tesis la Blga. María Herminia Cornejo
Rodríguez, PhD porque con sus ideas científicas profesionales oriento
nuestro trabajo.

Agradezco mucho a mi tía Flor Piguave quien estuvo atenta a todas las
necesidades que presentaba en el transcurso de mi proceso estudiantil

Y también a mis amigas Sheylla y Anabel por acompañarme en mis
desvelos

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN




Blgo. Richard Duque Marín, Mgt

DECANO DE LA FACULTAD



Ing. Jimmy Villón Moreno, M.Sc.

DIRECTOR DE LA FACULTAD



**Blga. María Herminia Cornejo
Rodríguez, PhD.**

DOCENTE TUTOR



Blga. Ana Balseca Vaca M.Sc.

DOCENTE DE ÁREA



Ab. María Margarita Rivera González, Mgt.

SECRETARIO GENERAL-PROCURADOR

DECLARACIÓN EXPRESA

Yo Nicole Katherine Piguave Chancay declaro bajo juramento que la responsabilidad por los datos, ideas y resultados expuestos en este trabajo de titulación, me corresponden exclusivamente, y el patrimonio intelectual de la misma y a la Universidad Estatal Península de Santa Elena



Nicole Katherine Piguave Chancay

CI. 2450187139

INDICE GENERAL

INDICE GENERAL	7
INTRODUCCION.....	18
1. JUSTIFICACION	21
2. OBJETIVOS GENERALES.....	22
2.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS	22
3. HIPÓTESIS	23
4. MARCO TEÓRICO.....	24
4.1 Taxonomía	27
4.2 Morfología	28
4.3 Factores que influyen en el cultivo de microalgas	29
4.3.1 Luz.....	29
4.3.2 Temperatura	30
4.3.3 pH.....	31
4.3.4 Salinidad	31
4.4 Cultivo medio Guillard f/2.....	31
4.5 Nutrientes esenciales	32
4.5.1 El nitrógeno.....	32
4.5.2 El fósforo	33
4.5.3 Silicio.....	33
4.5.4 Hierro.....	34
4.6 Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento	35
4.6.1 Camara de recuento	36
4.6.2 Crecimiento de las microalgas	37
4.6.3 Fase de latencia o fase inicial.....	37
4.6.4 Fase exponencial o desarrollo logarítmico	37
4.6.5 Fase de declinación de la fase exponencial	38
4.6.6 Fase estacionaria.	38
4.6.7 Fase de declinación o muerte.....	38
5. METODOLOGIA	40
5.1 Ubicación geográfica.....	40
5.2 Generalidades del cultivo.....	41
5.2.1 Obtención de cepa	41
5.2.2 Parámetros	41
5.3 Método utilizado.....	41
5.4 Primera línea experimental	44
5.5 Segunda línea experimental	45

5.6	Crecimiento celular.....	46
5.7	Dimensión celular (Tamaño).....	46
5.8	Determinación de forma y color de la célula	46
5.9	Análisis de datos.....	46
6.	ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.....	47
6.1	Experimentaciones.....	47
6.2	Primera línea experimental, concentración celular en sus diferentes fases de cultivo en cada tratamiento	47
6.3	Comparación de los diferentes tratamiento.....	51
6.4	En función al tamaño	54
6.5	Segunda línea experimental	56
6.6	En función al crecimiento de la concentración celular	57
6.7	En función al tamaño	58
6.8	En comparación con todos los tratamientos.....	61
7.	DISCUSIÓN.....	63
8.	CONCLUSIÓN.....	65
9.	RECOMENDACIONES	67
10.	BIBLIOGRAFÍA	68
11.	Anexos	77
Tabla 2	86
Tabla 3	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:.....	27
Figura 2.....	27
Figura 3.....	29
Figura 4.....	39
Figura 5	40
Figura 6.....	43
Figura 7.....	44
Figura 8:.....	45
Figura 9.....	48
Figura 10.....	49
Figura 11.....	50
Figura 12.....	51
Figura 13.....	51
Figura 14.....	53
Figura 15.....	55
Figura 16.....	55
Figura 17.....	57
Figura 18.....	58
Figura 19.....	59
Figura 20.....	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Medios de cultivos para microalgas modificados	42
Tabla 2.	Tabla de registro de colorimetría de la microalga	86
Tabla 3.	Tabla de registro de la forma de <i>Navicula</i> sp	86

GLOSARIO Y SIMBOLOGÍA

Digestibilidad

Facilidad de descomposición del alimento en ser transformado en nutrientes por el sistema digestivo.

Unicelulares

Organismos que contiene una única célula como todas las bacterias y protozoos (paramecios, amebas, ciliados, etc.).

Diploide

Contiene los dos conjuntos de cromosomas en la célula, al progenitor y otorga un cromosoma de cada par.

Haploide

Presencia un solo conjunto de cromosomas en las células de un organismo.

División vegetativa

La reproducción suele ser por fisión binaria, y de hecho siempre se forman nuevas tecas dentro de la teca heredada, por lo que cada generación será un poco más pequeña.

Auxoesporulación

El proceso reproductivo, propio de las diatomeas, relacionado siempre con un aumento de las dimensiones de las células.

Pennadas

Forma alargada del vértice de las valvas en las diatomeas. La válvula puede ser de forma lineal o elíptica y normalmente tiene un patrón decorativo bilateralmente simétrico.

Lanceolada

Se refiere a la hoja, pétalo u otro órgano laminar que tienen forma de punta de lanza.

Biopelículas

Capa de bacterias u otros microbios que crecen y se adhieren a la superficie de una estructura.

Fotobiorreactor

Sistema que no está expuesto a la atmósfera y está especialmente diseñado para la producción de microalgas, soporta las condiciones físicas y químicas del medio ambiente.

Polimérica

Material caracterizado por la dispersión homogénea de partículas de relleno de dimensiones nanométricas en el interior de una matriz.

Antioxidante

Sustancias naturales que pueden prevenir distintos daños a las células.

Poliinsaturados

Es un tipo de grasa dietaria es una de las grasas saludables, junto con la grasa monoinsaturada.

Bipartición

La fisión binaria es una forma de reproducción asexual que ocurre en arqueas, bacterias (células procariotas) y protozoos (células eucariotas). Consiste en la replicación del ADN y la división citoplasmática simultánea, lo que da como resultado dos células hijas idénticas.

Frústula

Es la pared celular dura y porosa de la capa externa, o teca, de las diatomeas. La frústula está compuesta casi en su totalidad por sílice (óxido de silicio hidratado).

hipovalva

Esta pared denominada frústulo está constituida por dos mitades desiguales que reciben el nombre de valvas. Estas valvas desiguales de tamaño se superponen a modo de tapa (epivalva) y caja (hipovalva); unidas por bandas pleurales a modo de “cintura”.

Inocuo

Sustancia pura que se va a trasladar a otro medio.

Oligoelemento

Sustancia química que es necesaria para el desarrollo metabólico normal y se encuentra en las células biológicas en pequeñas cantidades.

Fotoinhibición

La inhibición de la fotosíntesis causada por el exceso de radiación.

Ralentiza

Es la acción que permite lograr que algo se vuelva más lento o se desarrolle con menor rapidez.

Hidroxilo

Radical compuesto de un átomo de oxígeno y uno de hidrógeno, que se encuentra presente en los hidróxidos y en las disoluciones acuosas básicas.

Fotooxidación

es un proceso que a través de la interacción con la luz visible se pretende la formación de radicales hidroxilos (OH°) que dan pie a una fase de oxidación en los componentes inorgánicos hasta simplificarlos a CO_2 o iones.

Ineficiente

Que no es capaz de realizar o cumplir adecuadamente una función.

Inquistamiento

El enquistamiento en amebas, ciliados y hongos es un proceso dependiente de transcripción como lo demuestra el hecho de que inhibidores metabólicos.

Fototaxis

Reacción de orientación de los organismos celulares libres como respuesta a un estímulo luminoso.

pH: potencial de hidrogeno

CO₂: Dioxido de carbono

SI: Sílicio

%o: Salinidad

g: gramos

NO₃: nitrato

NH₄: amonio

uL: microlitros

mm: Milímetro

HPO₄²⁻: Ácido fosfórico

HPO₄⁻: Fosfato de Hidrógeno

ABREVIATURAS

PUFA: ácidos grasos poli-insaturados

CENAIM: Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas

RESUMEN

El cultivo de microalgas con medios no convencionales es una actividad que se ha desarrollado desde hace más de medio siglo. Por esta razón existen muchos tipos de medios de cultivos para las microalgas (diatomeas), en este estudio tiene como objetivo analizar la influencia de diferentes niveles de nutrientes en medios de cultivo sobre la concentración celular de *Navicula* sp mediante sus características de tamaño, color y forma en modificación del medio F/2 por un medio más económico pero con distintas cantidades nutricionales, por lo cual se establecieron 4 tratamientos donde no se empleó sus nutrientes requeridos para determinar el comportamiento de esta especie bajo niveles de estrés causados por la ausencia o bajas concentraciones de estos componentes. Unos de los análisis más significativos fueron el TSNR1 el cual consistió en la baja cantidad de nitrógeno donde se decretó que si existe concentraciones muy bajas como es la cantidad de 3.40 mg/l de este nutriente es perjudicial para el crecimiento de la célula y el TSSR2.1 se observa que se puede trabajar con cantidades mínimas como es 0.85 mg/l , pero al momento de transportar al cultivo con un medio rico en nutrientes se efectúa un incremento de la célula, comparando la importancia de cada uno de estos nutrientes con los cuales se experimentaron.

Palabras claves: *Navicula* sp, microalgas, nutrientes, diatomeas

ABSTRACT

The cultivation of microalgae with non-conventional media is an activity that has been developed for more than half a century. For this reason there are many types of culture media for microalgae (diatoms), the objective of this study is to analyze the influence of different levels of nutrients in culture media on the cellular concentration of *Navicula* sp through its characteristics of size, color and shape in modification of the F/2 medium by a more economical medium but with the same nutritional amounts, 4 treatments were established where the required nutrients were not used to determine the behavior of this species under stress levels caused by the absence or low concentrations of these components. Some of the most significant analyses were the TSNR1 which consisted of the low amount of nitrogen where it was decreed that if there are very low concentrations such as the amount of 3.40 mg/l of this nutrient it is detrimental to the growth of the cell and the TSSR2.1 it is observed that it is possible to work with small amounts such as 0.85 mg/l, but at the moment of transporting the culture with a medium rich in nutrients an increase of the cell takes place, comparing the importance of each one of these nutrients with which they were experimented.

Key words: *Navicula* sp, microalgae, nutrients, diatoms

INTRODUCCION

Las microalgas son esenciales como alimento para las primeras fases de desarrollo de la mayoría de las especies de moluscos, crustáceos y peces en cultivo, debido a su tamaño, fácil cultivo y buena calidad nutricional (Brown & Jeffrey, 1992). Sin embargo, aunque varias especies de microalgas han sido utilizadas como alimento en acuicultura, no todas producen un crecimiento acorde a las necesidades del cultivo. Algunos de los factores que intervienen con el mayor o menor éxito en su uso son la talla, la digestibilidad y la composición bioquímica.

Las diatomeas están entre el grupo de microalgas que presentan el mayor número de especies. Son organismos eucariontes, unicelulares, fotosintéticos, cuya pared celular está compuesta por dos valvas de sílice. Por medio de la fotosíntesis fijan probablemente, el 20% el carbono de la atmósfera (excediendo a la selva tropical), teniendo un papel importante en el funcionamiento de la biosfera. La reproducción sexual genera diversidad genética, además de permitir al genoma purgar las mutaciones letales: la mayoría de las diatomeas son organismos sexuales obligados (Mann A. , 2006).

Estas microalgas constituyen el grupo más numeroso de algas, y son notablemente constantes en el plan general de su ciclo vital, siendo todas las especies sexuales diplontes. Presentando una gran variedad en los métodos de emparejamiento, como son los gametos y fertilización, así como en el desarrollo del cigoto. Dentro de cualquier especie, la reproducción sexual suele seguir un curso bien definido como se indicó anteriormente, aparentemente poco alterado por la influencia ambiental (Geitler, 1932). La variación de los caracteres reproductivos puede utilizarse en la sistemática, como cualquier otra variación basada en el genotipo. Cuando parece haber desajustes entre los patrones de variación de otros caracteres (por ejemplo,

entre las distribuciones de los caracteres de la pared celular y los caracteres de los plastos), el tipo de reproducción sexual puede ser especialmente útil para revelar las verdaderas relaciones entre los taxones.

Su ciclo de vida de las diatomeas comprende dos fases principales: una fase vegetativa prolongada que puede durar de meses a años en la cual las células se dividen mitóticamente, y una fase relativamente corta que incluye a la reproducción sexual con gametogénesis y fertilización (dura pocas horas); y por último un proceso complejo de desarrollo que lleva a la formación de nuevas células vegetativas (duración de pocas horas a semanas) (Chepurnov, 2004).

Es decir que el proceso reproductivo de las diatomeas, está relacionado siempre con un aumento de las dimensiones de las células. Estableciendo el proceso de la auxosporulación que realizan las diatomeas en el cual regresan a sus dimensiones originales, compensando su gradual disminución a través de divisiones vegetativas. Es así importante establecer que, en la gran mayoría de las especies nunca se ha observado durante este proceso, aunque la variación de tamaño y forma en las células vegetativas muestra que este proceso debe ocurrir.

Diversas especies de diatomeas se han utilizado para la acuicultura, siendo uno de los géneros más importantes como es la *Navicula*, que contiene especies planctónicas y bentónicas (López, 2012). Muchos estudios han demostrado que las diatomeas bentónicas son los principales componentes de las biopelículas marinas cuando hay suficiente luz y nutrientes (Pati & Anil, 2005). Esto se debe a su adecuada composición bioquímica, ya que son ricos en macronutrientes como proteínas (25 - 50 %), carbohidratos (hasta 40 %) y lípidos (aproximadamente 20 %); adicionalmente, contienen fibra, almidón, celulosa, vitaminas (principalmente del complejo B y C), pigmentos (carotenoides) y metabolitos secundarios con un

papel importante como compuestos activos. La biomasa de la materia orgánica y la composición bioquímica de las diversas especies de microalgas puede variar mucho en función de los ambientales, como la intensidad luminosa, la salinidad, la temperatura, la disponibilidad de nutrientes y demás variables.

Las microalgas son organismos fotosintéticos que requieren una serie de nutrientes para llevar a cabo sus procesos metabólicos y mantener un óptimo funcionamiento. Los nutrientes esenciales para las microalgas incluyen elementos como carbono, nitrógeno, fósforo, hierro y varios micronutrientes. Estos elementos son necesarios para la síntesis de biomasa, la producción de energía y la realización de procesos metabólicos clave en las microalgas. Además, los nutrientes también pueden influir en la productividad y composición química de estas especies. Esta investigación pretendió identificar un medio de cultivo más efectivo o más factible para un mejor enriquecimiento de las microalgas, analizando en función de la concentración y calidad de la microalga *Navicula* sp.

1. JUSTIFICACION

La optimización de cultivos microalgales se ha enfocado en la importancia de controlar y mejorar la producción de biomasa y la composición bioquímica (Moreno M. , 2008). Entre los principales estímulos que afectan el crecimiento de estos microorganismos son la temperatura, la intensidad luminosa, la deficiencia de nutrientes (nitrógeno, fósforo, azufre y silicio), la salinidad, la concentración de CO₂ y el pH del medio de cultivo, de estos la deficiencia de nitrógeno es el principal factor que incide en el metabolismo del lípido (Olguín, 2010).

Estudios relacionados a larvicultura donde se proporciona información sobre el valor nutricional que tienen microorganismos fotosintéticos, como son las diatomeas. Por esta razón se analizó un cultivo con un mejor crecimiento de microalgas a través de la modificación de los niveles de nutrientes como es el silicio que se determinó cantidades mínimas o bajos un estrés en la cuales se observó un incremento de tamaño esta especie, por lo cual se asume que contiene mejores resultados en su valor nutricional que proporciona la *Navicula* sp por lo cual se espera una mayor implementación en la alimentación de organismos.

Es necesario conocer las diferentes alternativas de producción de alimento vivo para peces, moluscos y crustáceos, cultivados en condiciones controladas, considerando tanto la producción, con una alta supervivencia de los individuos cultivados a través de un sistema de cultivo semi-intensivo e intensivo.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS GENERALES

Analizar la influencia de diferentes niveles de nutrientes en medios de cultivo sobre la concentración celular de *Navicula* sp mediante sus características de tamaño, color y forma determinado el nutriente que favorece a una mejor calidad de microalga.

2.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Implementar el proceso de cultivo de *Navicula* sp bajo diferentes concentraciones de nutrientes.
- Determinar la concentración celular de la *Navicula* sp en las diferentes fases de cultivo.
- Comparar la calidad celular de la microalga *Navicula* sp, en función al tamaño, color y forma bajo las diferentes concentraciones de nutrientes.

3. HIPÓTESIS

H1

La calidad y concentración de la microalga *Navicula* sp en el medio modificado es mejor en función a las características morfológicas que a la obtenida en el medio Guillar F/2 comúnmente utilizado.

4. MARCO TEÓRICO

Las microalgas son organismos fotosintéticos unicelulares, debido a su alta tasa de crecimiento y capacidad para acumular lípidos y proteínas, se consideran una fuente de biomasa renovable (Huangc & Xijie, 2021). Son responsables de la mayor parte de la fijación del carbono en la tierra y representan al menos el 32% de la fotosíntesis global. Mejorar la productividad de la biomasa de algas es el foco de amplios esfuerzos para lograr aplicaciones comerciales de estos bioproductos basados en microalgas.

Estas especies tienen la ventaja de utilizar la luz solar para regular el carbono atmosférico, existen muchas especies que pueden generar grandes cantidades de biomasa de forma rápida y económica en comparación con las plantas y llegan a tener un metabolismo flexible y pueden acumular biomasa en una variedad de condiciones de crecimiento (Minhas & Meena, 2020).

Las microalgas convierten el agua, los nutrientes y el dióxido de carbono (CO_2) en una variedad de productos biológicos. Además, el tratamiento de aguas residuales y la producción de biohidrógeno se pueden lograr mediante el cultivo de microalgas. El uso de estanques abiertos o fotobiorreactores ha ampliado la gama de cultivo. Los fotobiorreactores de membrana introducen aún más el cultivo de microalgas y permiten el diseño de diferentes fotobiorreactores para promover el crecimiento de microalgas (Jia, Leo, & Juinn, 2022). Las membranas de polímero de fibra hueca se usan comúnmente porque proporcionan una gran área de superficie para una permeación eficiente de dióxido de carbono (CO_2) o retención

de biomasa. Además, también se introducen líquidos iónicos para mejorar el procesamiento posterior de las microalgas.

Bajo condiciones naturales las microalgas existen en ambientes muy diferentes, habitan en ecosistemas donde la salinidad y los rangos de temperatura varían ampliamente. La adaptación a estos ambientes implica la aparición de procesos que de alguna manera los protegen, ya sea proporcionando ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga en las membranas, pasando por la síntesis de compuestos antioxidantes en ambientes de alta salinidad y temperatura para evitar que las membranas se congelen. Los ambientes fríos o el desarrollo de mecanismos de fototaxis permiten a las microalgas evitar el máximo tiempo de exposición (Guerrero, 2018).

La posibilidad de cultivar microalgas con fines económicos se ha estudiado durante varias décadas (como se mencionó anteriormente). Los estudios sobre la producción industrial de lípidos comenzaron en la década de 1940 y desde la década de 1950 para una variedad de propósitos que van desde la producción de proteínas hasta el tratamiento de aguas residuales. Se han investigado las condiciones óptimas de cultivo para la obtención de sustancias antioxidantes (Karawita & Affan, 2007). Sin duda alguna, uno de los campos donde ha cobrado mayor auge es el de la acuicultura.

El grupo distintivo de microalgas, las diatomeas (Reino Chromista; Phylum Bacillariophyta) son fácilmente reconocibles por su color amarillento la formación de filamentos hechos de células o agregados de células suspendidas al final de un filamento, ya sea ramificado o no, es común en muchos casos cuando se usa un microscopio óptico.

En el caso de las diatomeas bentónicas, se considera que no existen estudios relevantes de este grupo, este tipo de especie son muy rico por su alto potencial en su uso como fuente de alimento vivo para organismos que se cultivan con fines comerciales y que muestran hábitos bentónicos al menos ocasionalmente a lo largo de sus ciclos de vida (Siqueiros, 1994).

Los primeros estudios sobre la nutrición a base de diatomeas se centraron en su uso en el cultivo de abulones, donde descubrieron que las primeras etapas de desarrollo del abulón *Haliotis* sp, dependen totalmente de la nutrición a base de diatomeas. Estas microalgas están consideradas un elemento crítico para la primera alimentación de las postlarvas de los abulones y su ausencia puede causar hasta un 90% de mortalidad en las mismas (Searcy-Bernal, 1992). Estas especies no sólo constituyen un alimento importante en los estadios juveniles tempranos del abulón, sino que también inducen el asentamiento larval en condiciones de cultivo.

La pared celular de las microalgas diatomeas es extremadamente rígida, arenosa y está hecha de sílice (óxido de silicio hidratado). Formado por dos mitades desiguales que, nombradas comúnmente como válvulas, las cuales tienen forma de tapa y caja (epivalva y hipovalva) que están conectados por bandas pleurales a la manera de "cintura".

Se reproducen tanto de forma sexual como asexual por el mecanismo de bipartición (fisión binaria), proceso por el que pueden proliferar rápidamente en ambientes propicios, pero su tamaño se reduce paulatinamente por su reproducción vegetativa, el frústulo (pared celular) produce una célula hija de menor tamaño que las parentales, ya que se desarrolla a partir de la valva más pequeña. En su fase de división mitótica las células se dividen y se regeneran en la hipovalva. Llegado a un punto de reducción, las células fértiles se dividen por mecanismos sexuales

(meiosis), con producción de gametos que se fusionan para producir una espora sexual que germina en una célula vegetativa del tamaño inicial (**figura 1**) (AELS, 2018).

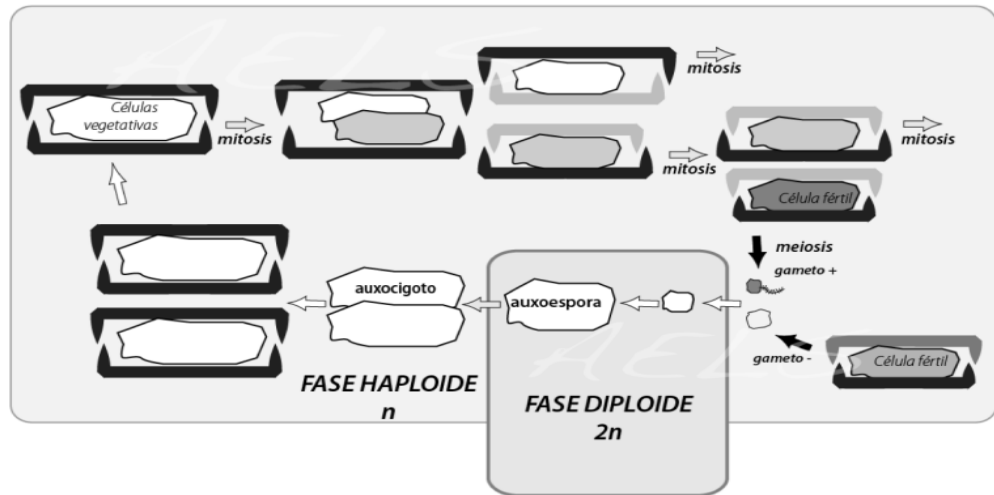


Figura 1: Fases reproductivas de las microalgas tomado de AELS (2018).

4.1 Taxonomía



Figura 2: *Navicula* sp a nivel microscópico

Reino: Bacillariophyta,

Subphylum: Bacillariophytina,

Clase: Bacillariophyceae,

Subclase: Bacillariophycidae,

Orden: Naviculales,

Suborden: Naviculineae,

Familia: Naviculaceae,

Género: Navicula

Fuente: Guirly, 2021.

4.2 Morfología

Su tamaño promedio oscila entre 16 – 29 μm de largo y 5.8 – 6.8 μm de ancho, tiene forma elíptica cuyos extremos son redondeados, presenta de 28 a 33 estrías cada 10 μm , las cuales irradian débilmente del centro y se vuelven paralelas en los extremos, presenta de 30 a 35 areolas circulares cada 10 μm , no tiene área central ni barras polares (Heudre, 2018).

Las valvas son anchamente lanceoladas con ápices subcapitados abruptamente prolongados y estrechos. La zona axial es estrecha, ensanchándose gradualmente hacia una zona central grande y redondeada. El rafe es filiforme a débilmente lateral. Los extremos proximales del rafe están expandidos y débilmente desviados hacia un lado. Las fisuras terminales del rafe son curvas (Bahls, 2012).

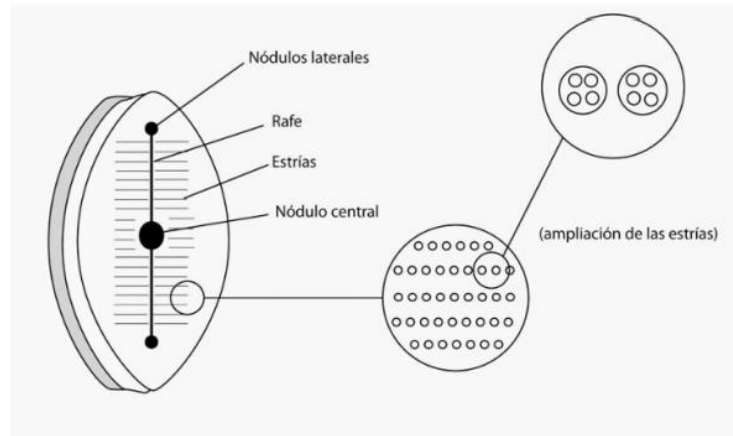


Figura 3: Morfología de la *Navicula* sp, extraída de Carmen Zepeda (2019)

4.3 Factores que influyen en el cultivo de microalgas

En cultivos a gran escala, el rendimiento obtenido depende de la concentración de células en el medio y de la medida en que las células alcanzan su potencial de crecimiento. Por lo tanto, para lograr un cultivo de microalgas en crecimiento activo se requiere: un inóculo viable de tamaño mínimo, aporte de nutrientes y oligoelementos, condiciones físicas y químicas (temperatura, pH, salinidad, etc.) adecuadas y energía.

4.3.1 Luz

La fotosíntesis aumenta con el aumento de la intensidad de la luz, alcanzando la tasa máxima de crecimiento específica de cada especie en el punto de saturación de luz, se alcanza el punto de fotoinhibición, que tiene efectos perjudiciales en la célula original e incluso puede resultar en su fase de muerte. Esto da como resultado una pérdida en la eficiencia fotoquímica y la productividad del cultivo (Hernández, 2014).

La luz es absorbida por los pigmentos presentes en las microalgas, como la clorofila y otros pigmentos fotosintéticos, los cuales captan la energía lumínica necesaria para llevar a cabo la fotosíntesis. Estos pigmentos también cumplen una función fotoprotectora al proteger a las microalgas de la radiación ultravioleta y otros factores estresantes (López Portillo & Martínez, 2021).

4.3.2 Temperatura

En el aumento de la temperatura, la producción de microalgas aumenta proporcionalmente hasta alcanzar la temperatura ideal para cada especie. Además de esto, el aumento de la respiración y la fotorrespiración reducen la productividad general la temperatura ideal varía según la especie, pero suele oscilar entre los 28 y los 35 grados centígrados (Park, 2011).

La temperatura no solo afecta la respuesta celular, sino también la naturaleza del metabolismo, los requisitos nutricionales y la composición de la biomasa, pero en el rango óptimo, no solo la producción y la composición bioquímica de las microalgas, sino también el final casi no tiene efecto en la concentración típica de biomasa. Existe una relación entre la temperatura y la actividad biológica y, hasta cierto punto, la tasa de crecimiento aumenta con el aumento de la temperatura. Más allá de eso, a medida que la temperatura sigue aumentando, se ralentiza y, en algunos casos, de repente llega a cero.

4.3.3 pH

El pH es uno de los factores más importantes en el cultivo de microalgas. Dado que la membrana plasmática original no permea los iones de hidrógeno y los iones de hidroxilo, la concentración de iones de hidrógeno dentro y fuera de la célula no siempre está en un estado de equilibrio, y hay un gradiente de concentración de iones de hidrógeno en toda la membrana. Las microalgas eran claramente dependientes del pH del medio, y diferentes especies respondieron de manera significativamente diferente. Independientemente, cada microalga tiene un pH óptimo para su crecimiento. (7-8), las caídas de pH suelen ser fatales, pero tienden a tolerar mejor las subidas de pH hasta ciertos límites.

4.3.4 Salinidad

La concentración de sales inorgánicas disueltas tanto en agua dulce como en agua de mar puede afectar el crecimiento de las microalgas, dependiendo de la actividad osmótica. La tolerancia a la sal varía de una especie a otra, algunas aceptan solo milimoles de sal, mientras que otras persisten en soluciones saturadas. El estrés salino, que es fatal para un grupo, es fácilmente tolerado por otro grupo. Sin embargo, los efectos de la sal son más influyentes cuando se relacionan con otras variables como temperatura, luz, fuente de nitrógeno, concentración de nutrientes.

4.4 Cultivo medio Guillard f/2

La práctica más generalizada en el caso de las microalgas diatomeas es cultivar en medio Guillard f/2 (Guillard, 1975). Sin embargo, se han ensayado diferentes

variantes de este medio y otros alternativos cuando ya se trata de cultivos masivos, con vista a abaratar los costos de producción. Se conoce que la composición bioquímica depende de muchos factores entre los que destacan los nutrientes, la iluminación, la salinidad y la temperatura, entre otros. Por tal motivo el estudio de estos factores permite manipular la calidad nutricional de las microalgas a suministrar como alimento.

4.5 Nutrientes esenciales

Los suplementos nutricionales que se pueden obtener de las microalgas son diversos y contienen compuestos volátiles además de multivitaminas, carotenoides, clorofila, ficobiliproteínas, ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), polisacáridos, esteroides y diversos compuestos fenólicos. (Basantes Chango, Quinapanta Pérez, & Vásquez Quishpe, 2021).

4.5.1 El nitrógeno

Es el nutriente más importante (después del carbono) para las microalgas y está presente como nitrato (NO_3^-) o amonio (NH_4) (Grobbelaar, 2004). También es un factor clave en la regulación del contenido de lípidos en las microalgas (Parker & Frampton, 2001).

El nitrógeno es un componente clave para el crecimiento y desarrollo de las microalgas, ya que forma parte de proteínas, aminoácidos y clorofila en estas células (Abalde, 1995). El nitrógeno se utiliza principalmente en la síntesis de clorofila y la formación de estructuras de proteínas. Las microalgas son capaces de

obtener nitrógeno de la forma más simple, como el nitrato, el amonio y la urea, y también pueden fijar el nitrógeno diatómicamente. La tasa de crecimiento y la cantidad de biomasa producida están directamente relacionadas con la disponibilidad de nitrógeno, y la limitación de nitrógeno puede ser un factor clave en la reducción del crecimiento en las microalgas.

4.5.2 El fósforo

Es esencial para muchas funciones celulares, incluida la transferencia de energía y la síntesis de ácidos nucleicos. Aunque las microalgas tienen menos del 1 % de fósforo, su capacidad de crecimiento se ve limitada en gran medida por la ausencia de fósforo. En los medios de cultivo suele incorporarse en forma de HPO_4^{2-} o HPO_4^- (Grobbelaar, 2004).

4.5.3 Silicio

Es un componente importante de la pared celular de las diatomeas, que les proporciona una estructura rígida y resistente. La frústula de las diatomeas está compuesta por sílice hidratado amorfo, que se deposita en capas sucesivas para formar una estructura compleja y altamente ordenada (Gordon & Losic, 2014).

El silicio juega un papel importante en la síntesis de la pared celular de las diatomeas, un grupo de microalgas unicelulares con pared celular de sílice. Las diatomeas requieren grandes cantidades de silicio, y la deficiencia de silicio puede inhibir su crecimiento y reducir la producción de estructuras de sílice en su pared celular. Además, se ha demostrado que el silicio tiene un efecto mejorado en la fotosíntesis y la producción de biomasa en algunas otras especies

de microalgas. La adición de silicio en el medio de cultivo puede aumentar la tasa de crecimiento, la eficiencia fotosintética y la producción de biomasa en algunas especies de microalgas, posiblemente debido a su capacidad para mejorar la capacidad de las células para absorber la luz y el CO₂. En resumen, el silicio es esencial para la síntesis de la pared celular de las diatomeas y puede mejorar la fotosíntesis y la producción de biomasa en otras especies de microalgas cuando se agrega al medio (Brzezinski, 2000).

Los patrones de las frústulas son específicos y se encuentran determinados genéticamente. Las frústulas están formadas por nanopartículas de sílice, recubiertas por matrices que contienen carbohidratos y proteínas.

4.5.4 Hierro

El hierro desempeña una función importante en el crecimiento de las microalgas, ya que se utiliza como cofactor en muchas enzimas necesarias para el crecimiento y la producción de biomasa. Además, el hierro es un elemento esencial para la síntesis de clorofila, que es la molécula que permite a las microalgas realizar la fotosíntesis. La deficiencia de hierro en las microalgas puede inhibir el crecimiento y la producción de biomasa, mientras que la adición de hierro puede aumentar la producción de biomasa y la tasa de crecimiento de las microalgas. En estudios realizados con la microalga *Chlorella vulgaris*, se ha demostrado que la mejora de hierro en el medio de cultivo puede aumentar la acumulación de lípidos y carotenoides en las microalgas, lo que tiene aplicaciones en la producción de biocombustibles y productos nutracéuticos. El hierro es un elemento esencial para el crecimiento y la producción de biomasa en las microalgas, y su añadido al medio de cultivo puede mejorar la acumulación de

lípidos y carotenoides en algunas especies de microalga (Serrano Bermúde & Sierra Sáenz, 2011).

4.6 Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento

El crecimiento de un cultivo de microalgas se mide como un aumento de la biomasa, expresado en número de células por mililitro (cel/ml), peso seco (total u orgánico), una cantidad de proteína o pigmento medida directa o arbitrariamente en unidades de fluorescencia, o un volumen celular total calculado para un período de tiempo específico en fase de crecimiento celular (Vega & Arredondo, 2010).

Este incremento se puede evaluar por varios métodos, siendo los más habituales el recuento de células en laboratorio mediante microscopio o contador de partículas, la detección espectroscópica fotométrica óptica de cambios. densidad de cultivo o cuantificación de biomasa en peso seco, bruto u orgánico o sus componentes bioquímicos de interés para un cultivo en particular (proteínas, pigmentos o ácidos grasos, etc.).

De estos métodos, el recuento de células es el más utilizado porque es un método simple y económico y permite un mejor seguimiento de los cultivos mediante inspección visual. Es importante señalar que la concordancia entre la concentración celular y la información proporcionada por otros métodos (como la cantidad de pigmentos u otros componentes celulares (Alfonso, 2001).

4.6.1 Cámara de recuento

Lograr una buena reproducibilidad en el conteo microscópico es uno de sus desafíos, por lo que es fundamental saber cómo seleccionar el volumen de la muestra, la dilución, el tipo de cámara de conteo, el objetivo del microscopio y la técnica para llenar la cámara de conteo. En algunos casos, puede ser necesario corroborar el volumen de la cámara que se está utilizando (Leal, 1998).

La más factible a utilizar es el hematocitómetro de 0,1 mm de profundidad con una regla de Neubauer para el conteo celular de las microalgas más grandes y también para muchos dinoflagelados, los tipos de cámara más utilizados son los hemocitómetros Sedgwick-Rafter o de 0,2 mm de profundidad con escalas Fuchs-Rosenthal.

La cámara de recuento utilizada en la mayoría de los laboratorios es un hemocitómetro de 0,1 mm de profundidad con una regla de Neubauer que consta de 9 cuadrados de 1 mm de lado (área total de recuento = 0,9 mm²), cada uno correspondiente a un volumen de 0,1 µL. Los cuatro extremos se dividen en 16 cuadrados pequeños. El cuadrado central tiene 25 cuadrados, cada uno con un área de 0,04 mm² (0,2 mm x 0,2 mm), divididos a su vez en 16 cuadrados más pequeños. Para células de más de 6 µm y con una concentración de cultivo relativamente baja, se recomienda contar en los cuatro cuadrados etiquetados como A, B, C y D, aunque muchos laboratorios prefieren contar al menos un cuadrado adicional (Jimenez, 2022).

4.6.2 Crecimiento de las microalgas

El crecimiento algal de un cultivo típico se describe en 5 fases de Crecimiento y estas se definen por el número de células presentes a un tiempo (edad) determinado y por las condiciones generales del cultivo

4.6.3 Fase de latencia o fase inicial

En esta fase inicial es poco la densidad celular o el incremento, esta es una fase de adaptación a las nuevas condiciones de medio de las células. Muchas enzimas metabólicas llegan a ser inactivas y las concentraciones de materiales celulares caen a niveles que perturban la división de la célula, antes de reanudar el crecimiento a las algas les toma un corto período de tiempo aclimatarse a su medio acuático.

Otro factor que ayuda a la fase de latencia, es el requerimiento de alcanzar los máximos niveles de compuestos específicos antes de que comience la fase exponencial. Altas concentraciones de magnesio, calcio o fósforo pueden extender la fase inicial. Esta fase se puede dilatar entre 1-3 días, dependiendo del tamaño y del estado del inóculo.

4.6.4 Fase exponencial o desarrollo logarítmico

En esta fase la división celular se aumenta en función del tiempo. El incremento de la población existente es debido a que las células están asimilando los nutrientes en el medio y su proceso de reproducción asexual es activo. La fase exponencial puede establecer en el segundo o en el tercer día después de la realización del inóculo en

el medio y prolongarse hasta cuatro días. Si se controla la dilución del cultivo esta etapa puede extenderse por semanas.

4.6.5 Fase de declinación de la fase exponencial

La división celular es lenta cuando los nutrientes han sido consumidos y su carencia limita el crecimiento. Puede durar de uno a dos días en que la edad del cultivo alcanza su valor máximo.

4.6.6 Fase estacionaria.

En esta fase el factor limitante (carencia de nutrientes) y tasa de crecimiento está balanceados, es decir que las densidades celulares se mantienen relativamente constantes por un período relativamente prolongados. Esta fase es muy corta en grupos de cultivos donde los nutrientes son consumidos y no reemplazados.

4.6.7 Fase de declinación o muerte

Durante esta fase las células sufren la completa limitación por escasez de nutrientes, la densidad celular comienza a fenecer rápidamente liberando azúcares, proteínas, lípidos los cuales son aprovechados en algunos casos por bacteria oportunistas que se alimentan de ella desplazando a la población que aún se mantiene viva, pero que rápidamente colapsa.

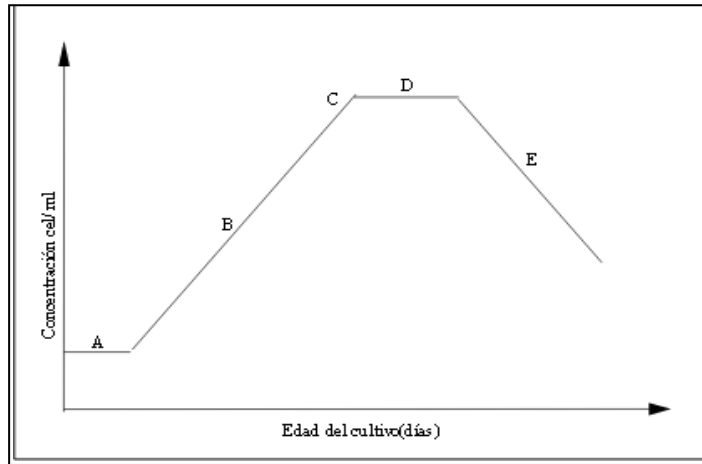


Figura 4: Fases de crecimiento del cultivo de microalgas. A: fase de inducción o retraso del crecimiento; B: fase exponencial; C: fase de declinación relativo del crecimiento; D: fase estacionaria; E: fase de muerte (tomado de Fernández 2020).

5. METODOLOGIA

5.1 Ubicación geográfica

El presente trabajo se realizó en un laboratorio, ubicado en el sector de La Libertad Provincia de Santa Elena con coordenadas $2^{\circ}14'36''S$ $80^{\circ}53'54''W$ (**figura 5**)



Figura 5: *Fotografía satelital del Laboratorio*

Fuente: Google maps (2023)

5.2 Generalidades del cultivo

5.2.1 Obtención de cepa

Para esta investigación las cepas seleccionadas fueron de la especie de microalga *Navicula* sp esta fue adquirida del CENAIM-ESPOL.

5.2.2 Parámetros

La temperatura promedio fue de 26 °C, el agua de mar 34 ‰ fue filtrada con papel Whatman GF/C de 1.2µm en tamaño de poro y auto clavada a 120°C/15psi de presión por 15min, la intensidad lumínica es de 3200 lm.

Para la preservación de la cepa se la mantuvo en congelación a -4 °C, la segunda línea experimental paso en congelación por 10 días.

Cuando los cultivos alcancen la fase de crecimiento exponencial, se procedió a realizar conteos con mayor revisión para observar los respectivos cambios de la célula de la microalga.

5.3 Método utilizado

Tabla 1. Medios de cultivos para microalgas modificados

SOLUCIONES	Nombres de los componentes	Formula química	Cantidad en 200ml
1	Nitrato de sodio	NaNO ₃	15g
	Tripolifosfato de sodio	Na ₅ P ₃ O ₁₀	0.89g
2	Metasilicato de sodio pentahidratado	SiO ₃ Na ₂ ·5H ₂ O	4.47g
3	Cloruro férrico anhídrido	FeCl ₃	0.36g
	Ácido etilendiamino tetracético (EDTA)	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈	0.87
			Cantidad en 10ml
	METALES TRAZA		
	Sulfato de cobre	CuSO ₄	0.09g
	Sulfato de zinc	ZnSO ₄	0.22g
	Cloruro de cobalto	CoCl ₂	0.10g
	Cloruro de manganeso	MnCl ₂	1.80g
	Molibdato de sodio	Na ₂ MoO ₄	0.06g
4			Cantidad en 10ml
	Biotina	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	0.01g/ml
	Cianocobalamina	C ₆₃ H ₈₈ CoN ₁₄ O ₁₄ P	0.01g/ml
	Tiamina	C ₁₂ H ₁₇ N ₄ OS+	0.2g/L

Fuente: Medio de cultivo Guillar F/2 modificado

En la **Figura 6** se esquematiza el proceso de cultivo general, a partir del cual se estableció dos protocolos de cultivo el cual consiste en la eliminación de soluciones 1,2 y 3 expresada en la **Tablas 1**.



Figura 6: Esquema del proceso de cultivo de la Microalga

Para la primera parte del estudio se inició con la realización de los nutrientes expresados en la **Tabla 1**, los cuales se aplicaron en cada fase de cultivo. Se seleccionó del cepario las colonias de microalgas con mayor pigmentación para la realización del inóculo a tubos de ensayos, se sembraron 6 con un volumen de 10ml, en un transcurso de 3-4 días se trasladaron a otro tubo con la misma cantidad de volumen que los anteriores, donde se aplicó el tratamiento experimental y se estableció 3 diferentes tipos de alteración de nutrientes expresados en la **Figura 7**, se mantuvo hasta el transcurso de 3 días, se procedió a tomar los parámetros diariamente (salinidad, pH y temperatura) y también la respectivas características de densidad, coloración, forma y tamaño.

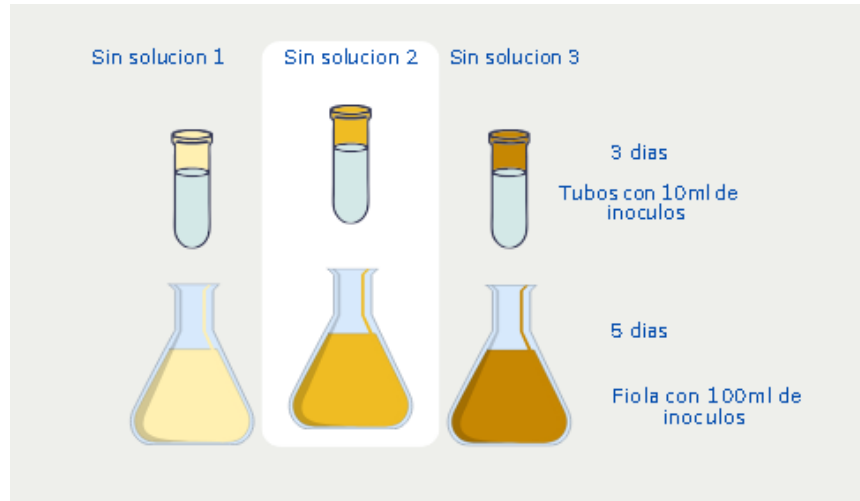


Figura 7. Esquema de la primera experimentación

5.4 Primera línea experimental

Se estableció primero tres medios alterados de cultivo los cuales contenían bajas concentraciones de las soluciones 1, 2 y 3 para la primera línea experimental.

Se sembró en tubo de 20 ml con un inocuo de 10 ml los cuales fueron 3 experimentales que contiene todos los nutrientes menos los ya establecidos, se mantuvieron entre 2 -3 días máximo y después se pasó a un medio con un volumen más elevado como son las fioles de 250ml con un inocuo de 100ml donde se mantuvo la misma secuencia y estos se mantuvieron de 4-5 días, después de este proceso empieza su curva de decaída. Las muestras se revisarán todos los días a través del programa Microcapture 8.7 y se observará en la cámara de Neubauer.

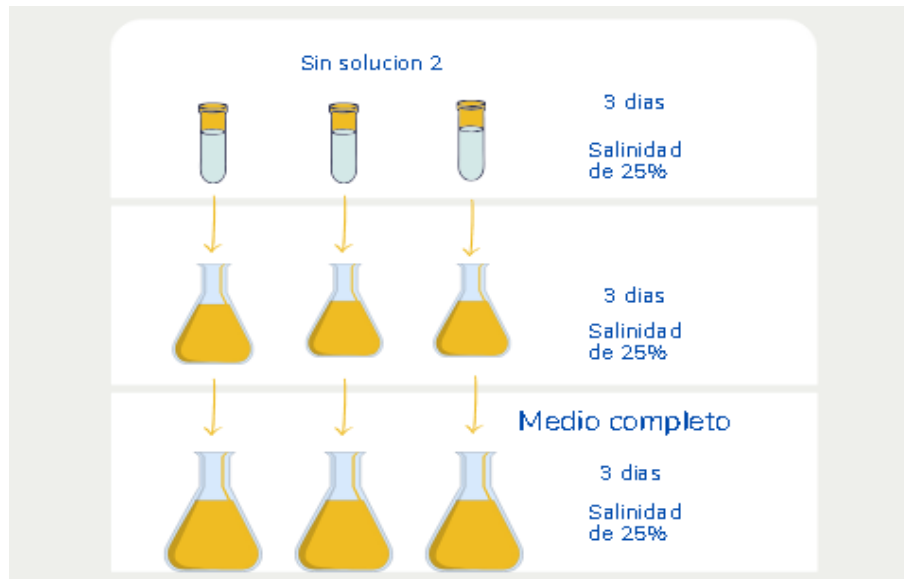


Figura 8: Esquema de la segunda experimentación

5.5 Segunda línea experimental

La segunda línea se estableció con la solución 2 que contiene el metasilicato, en esta línea de siembra se redujo la salinidad a 25 %, se inició en tubos con 10ml donde no se le colocó la solución 2, en los tubos se dejó transcurrir 3 días y se pasó a un volumen más elevado de 100ml en una fiola en los cuales también se dejó transcurrir 3 días más, luego de este proceso se colocó en un medio completo se inoculó un 10% de la fiola ya establecida, se dejó por 4 días para observar su incremento de densidad celular.

5.6 Crecimiento celular

Desde el inicio cada 24 horas, se tomarán muestras (1mL), por triplicado de cada tratamiento, y se fijarán con 50 μ L de una pequeña muestra para realizar el recuento celular por microscopia de luz, utilizando la cámara de Neubauer de 0.01mm de profundidad. Con los datos obtenidos se elaborará las curvas de crecimiento y a partir de éstas se determinarán las tasas instantáneas de crecimiento (Madigan , 1999).

5.7 Dimensión celular (Tamaño).

La fotomicrografía se llevará a cabo utilizando un microscopio equipado con una cámara digital Polaroid DMC2 con una resolución de 1600 - 1200 píxeles, las imágenes se capturarán mediante análisis de imágenes Micro Capture Ver8.7.

5.8 Determinación de forma y color de la célula

Se realizará tomando una pequeña muestra con Lugol al 1%, a través de esto se observará en un microscopio con una cámara adecuada, donde se tomarán muestras diarias para observar su forma y coloración.

5.9 Análisis de datos

Se utilizó el programa Past 4.13 para realizar el análisis de variancia (ANOVA) (Análisis de Varianza) es una técnica estadística utilizada para comparar las medias

de tres o más grupos independientes. Su función principal es determinar si existen diferencias significativas entre las medias de estos grupos y, en caso afirmativo, identificar qué grupos difieren entre sí. Se utiliza comúnmente en estudios experimentales y observacionales para analizar la varianza de una variable dependiente a través de diferentes categorías o niveles de una variable independiente.

La hipótesis nula en ANOVA establece que no hay diferencias significativas entre las medias de los grupos, mientras que la hipótesis alternativa sugiere que al menos una de las medias difiere de las demás. Para realizar el análisis, se requiere una variable dependiente continua y al menos una variable independiente categórica con dos o más niveles.

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

5.10 Experimentaciones

Como resultado de los diferentes tipos de cultivos establecidos, se determinaron las diferencias encontradas en la concentración celular y el tamaño de las microalgas debido al estrés nutricional a través de las cuatro experimentaciones establecidas a continuación.

5.11 Primera línea experimental, concentración celular en sus diferentes fases de cultivo en cada tratamiento

Tratamiento control TCR se determinó un crecimiento normal debido a que estos contenían todos los nutrientes necesarios para poder tener un óptimo desarrollo de las microalgas en un ambiente controlado (figura 9).

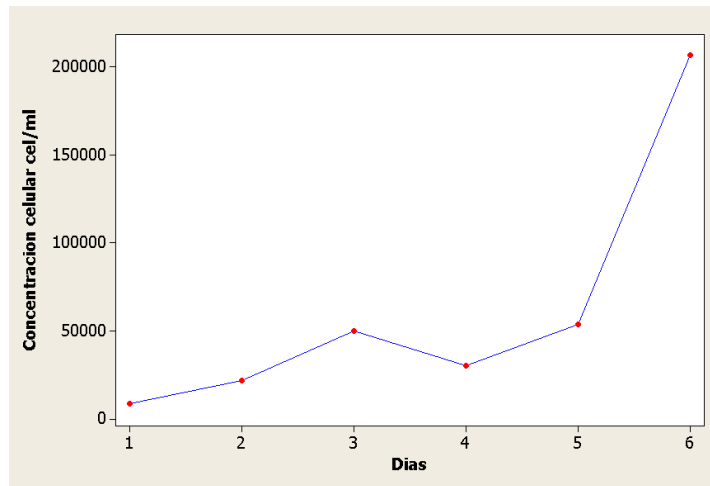


Figura 9. Tendencia de concentración celular de *Navicula* sp del TCR

La densidad de las células en su contenido de nutrientes normales se mantuvo con una curva de crecimiento normal, debido que los primeros tres días se encontraban en un medio de cultivo de tubos de 10 ml de muestra y los tres días restantes estuvieron en un nivel más elevado de 100 ml manteniendo así la curva de crecimiento en la fase exponencial.

Primera experimentación sin solución 1 (TSNR1)

Se estableció una curva de crecimiento negativa debido a que los primeros días existió un leve crecimiento de la microalga aproximadamente de 25000 cel/ml y después se observó su fase de muerte, asumiendo que la causa fue la ausencia del nitrógeno (este tratamiento no lo incluía), ya que este es fundamental en su metabolismo porque es el encargado de la formación de las proteínas y nucleótidos y sin este factor las diatomeas no podrían seguir su ciclo reproductivo normal (figura 10).

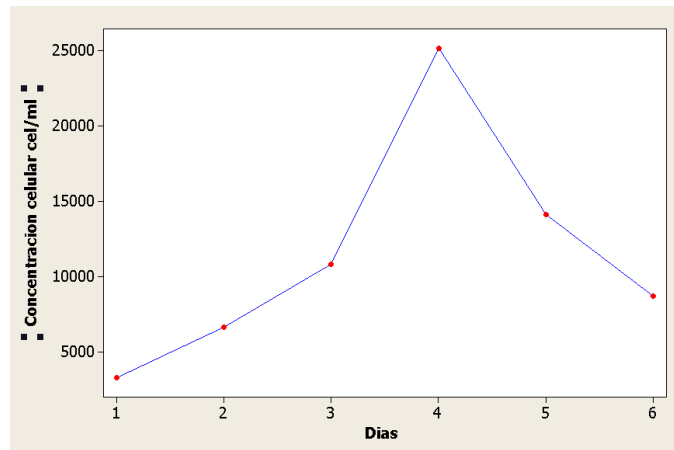


Figura 10. Tendencia de concentración celular de *Navicula* sp del TSNR1

En esta figura 10 se observa que en las primeras fases de crecimiento como es desde el segundo hasta el cuarto día este se encuentra en su fase exponencial, pero con un crecimiento muy leve de células a partir del día cuarto se establece en su fase de muerte.

Segunda experimentación sin solución 2 (TSSR2)

Se registró curva de crecimiento normal, pero con una densidad mínima de 5000 cel/ml, a pesar de que en este estudio no se le aplicó el nutriente correspondiente, que fue el metasilicato. Este se encarga del fortalecimiento de la pared de silicio, que contiene este tipo de microalga (*Navicula* sp). Además, la muestra tuvo una tasa pequeña de declive, pero después de este proceso su curva de crecimiento fue normal (Figura 11).

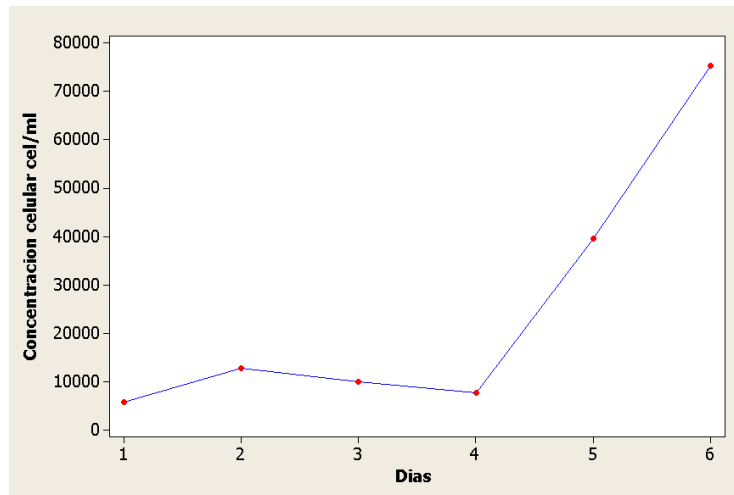


Figura 11. Tendencia de concentración celular de *Navicula* sp del TSSR2

En la figura se puede observar que se mantiene un crecimiento normal con una curva de crecimiento ascendente, dado que el crecimiento de las microalgas no se ve afectado en su totalidad por el silicio, encargado de fortalecer las paredes celulares que forman la frústula.

Tercera experimentación sin solución 3 (TSHR3)

Existió un rango de inestabilidad en la curva de crecimiento y se observó un pequeño cambio en su pigmentación, debido a la función que realiza el hierro con la clorofila, la cual se encarga de mantener la forma de los cloroplastos y la activación de las enzimas con sus funciones.

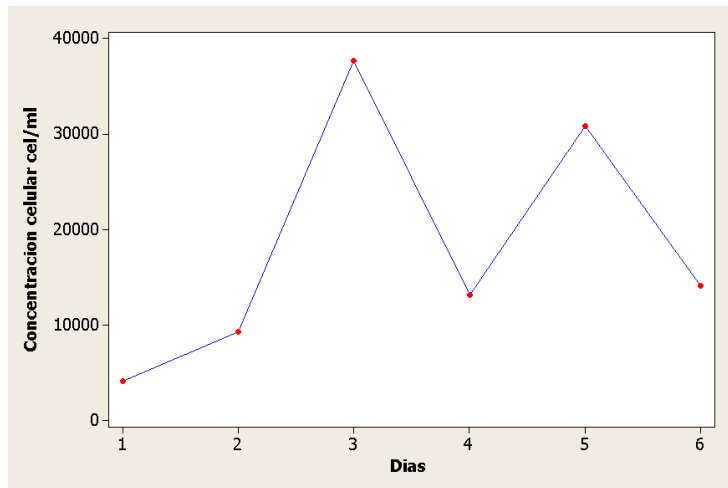


Figura 12. Tendencia de concentración celular de *Navicula* sp del TSHR3

5.12 Comparación de los diferentes tratamiento

Función a la concentración celular

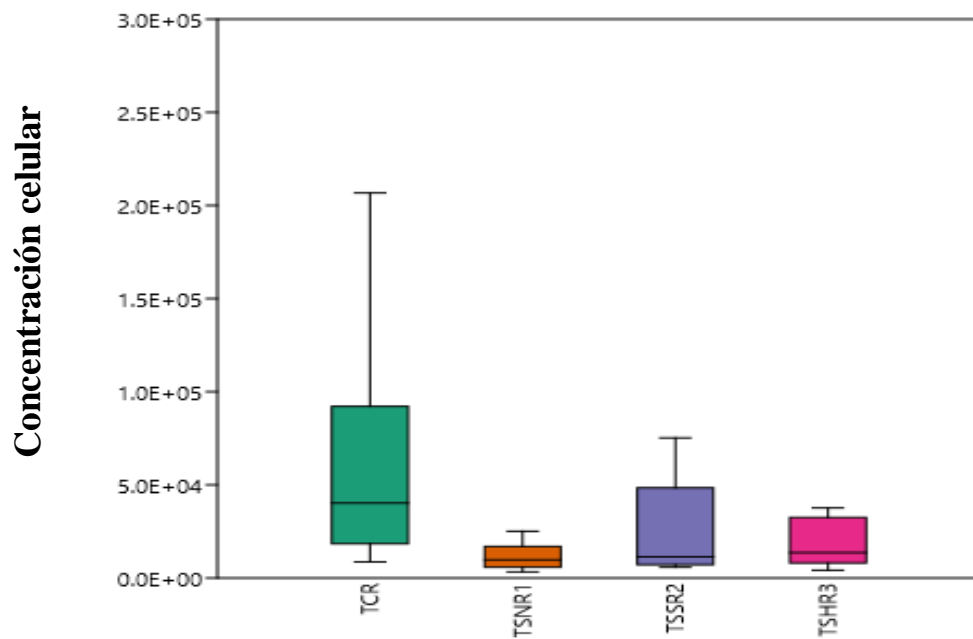


Figura 13. Boxplot extraídos de past con los 4 tratamientos experimentales

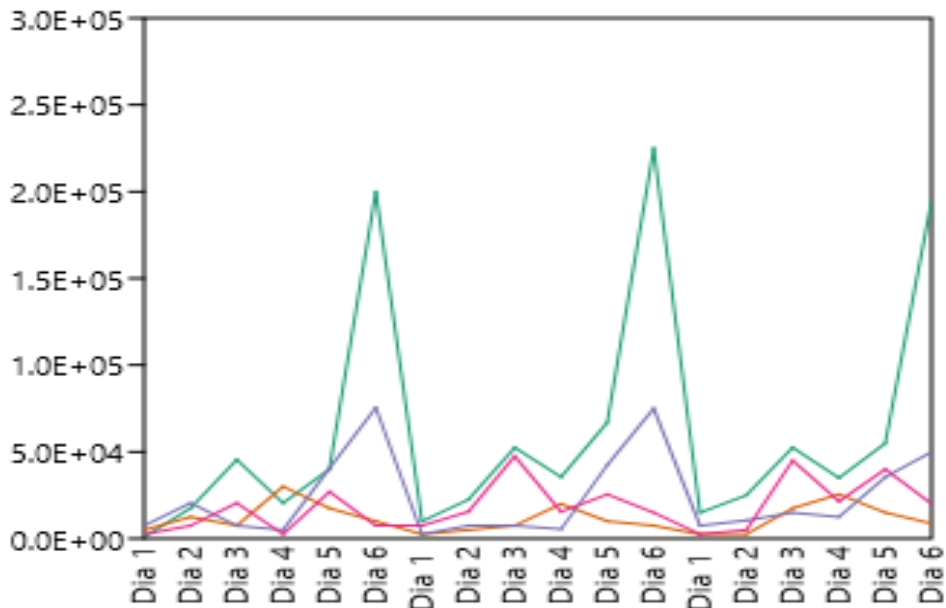


Figura 14: diferencias significativas en los tratamientos

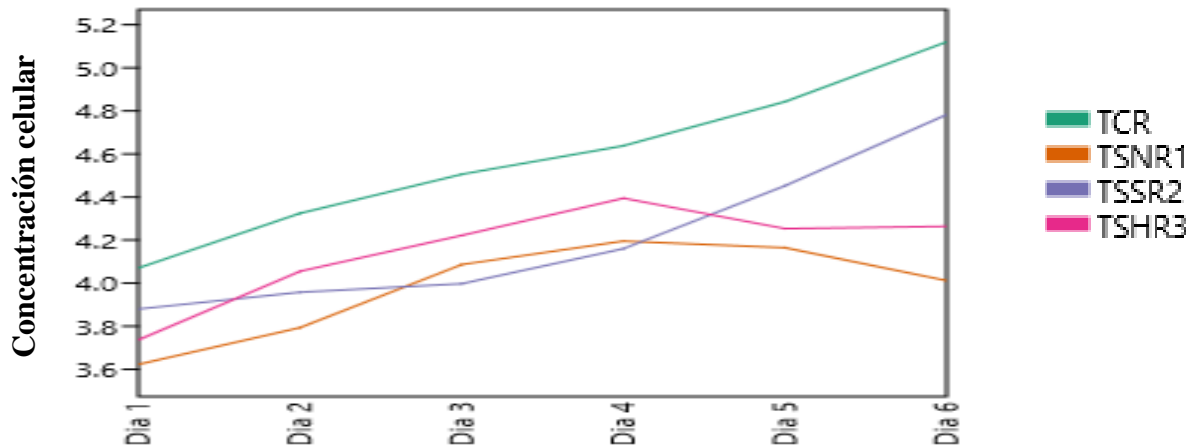
Las densidades celulares fueron diferentes significativamente en comparación a todos los tratamientos debido a que el ($p < 0.05$) y con una media de 9.20 nos determina esto los datos estadísticos se pueden observar en el anexo 30.

Continuando con las pruebas estadísticas de ANOVA con cada tratamiento individual como fue TCR y TSNR1 donde se obtuvo obtuvieron un $p=0,004$ estableciendo que si existe diferencia significativa.

Ahora bien, en la Figura 15 se determina el índice de varianza en los diferentes tratamientos en función de la densidad. Con esto, se puede establecer que existe una

relación más estable con el TSSR2, debido a que se mantiene el mismo rango de crecimiento y se observa una curva de crecimiento en aumento

Figura 15. Curvas de concentración celular de los tratamientos TCR, TSNR1, TSSR2 Y TSSHR3



La curva de crecimiento del TCR como en el TSSR2 tienen una tendencia a un crecimiento ascendente a diferencia de los tratamientos TSNR1 y el TSHR3 que tienen una tendencia a decaer que se representan en la **figura 14**.

Se compararon los tratamientos establecidos en los cuales el TCR y el TSSR2 tienden a una curva de crecimiento que va en aumento estableciendo una concentración celular en un rango adecuado para un cultivo de *Navicula* sp, con el TSSR2 se obtienen concentraciones celulares en un rango un poco bajas de 5000cel/ml, pero en una curva creciente ascendente, debido a que el componente limitante fue la solución de silicio el cual cumple una función mas no perjudicial el cual es darle firmeza y más dureza a la frústura por lo que está formada de silicio.

A diferencia de los tratamientos TSNR1 Y TSHR3 no se observa un resultado favorable debido a que su curvo de crecimiento fue negativa para un crecimiento

adecuado, ya que no contienen nutrientes esenciales como es el nitrato en el primer tratamiento el cual es fundamental para la vida de las diatomeas y en el TSHR3 sus resultados fueron negativos, pero mantuvo una curva de crecimiento pequeña, pero se obtuvo en función a la concentración celular, pero era inestable.

5.13 En función al tamaño

Se realizó la fase estadística ANOVA para determinar si es significativamente diferente o no. Este procedimiento ejecuto un análisis de varianza de un factor para los tratamientos. El análisis de varianza de ANOVA en función al tamaño en la primera experimentación de la célula estableció una media de 6.45 se detectó una razón F de 2.97 y una $(p>0.05)$ lo cual significa que existe una diferencia significativa entre las medias. Para poder determinar con mas certeza cual fue la media de los tratamientos con diferencia se realiza el análisis de Tukey que comparas las medias y poder definir que tratamiento son diferentes.

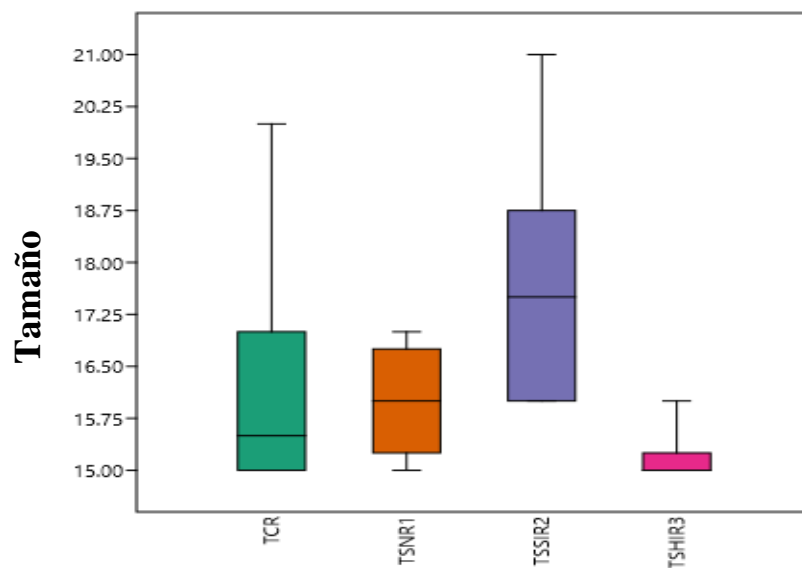


Figura 15. Box plot de los tratamientos en función al tamaño

También se utilizó el análisis de Kruskal-Wallis el cual presento un ($p < 0.05$) determinando que, si existe una diferencia significativa en el tratamiento TSNR1 y TSHR3, debido a que estos fueron los tratamientos que no se mantuvo con una curva de crecimiento ascendente, por su déficit de nitrógeno y hierro.

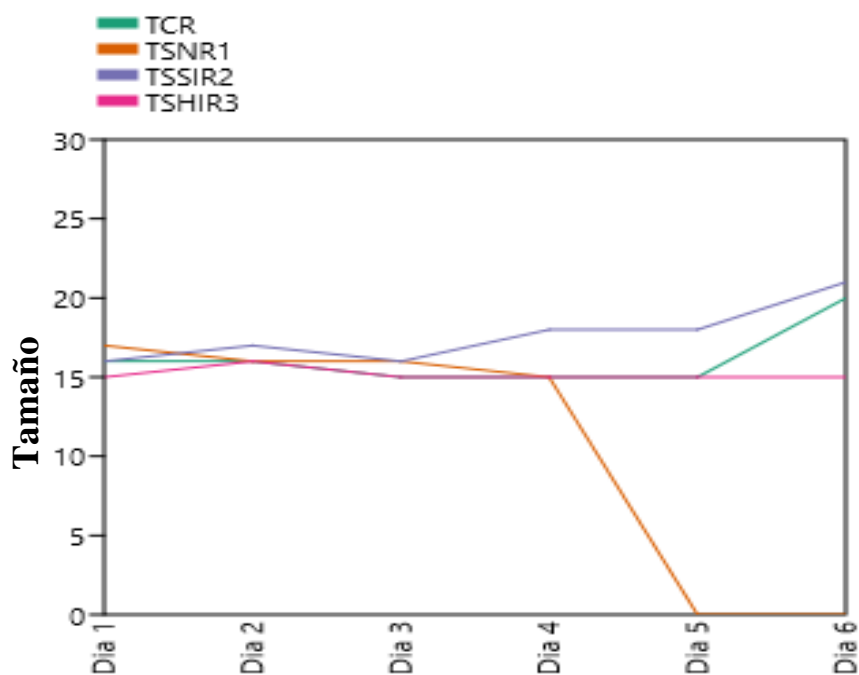


Figura 16. Comparación de tamaños en los diferentes tratamiento

En la **figura 16** se representa una estandarización en función al tamaño estableciendo en los tratamientos TCR, TSNR1 Y TSSR2, estos tratamientos

mantiene el mismo índice de tamaño el cual fue 15 μm hasta 20 μm el cual es un rango que se estableció a través de esta experimentación, identificando que es el tamaño en los que varía este tipo de especie como es la *Navicula* sp. Definiendo que estos tamaños van apareciendo debido a su reproducción vegetativa, porque como ya se sabe las microalgas tienen sus fases de reproducción mitótica en las que se presenta la disminución del tamaño a través de sus valvas como se encuentra expresado en la **figura 1**.

5.14 Segunda línea experimental

Cuarta experimentación sin solución 2 y baja salinidad TSSR2.1

Este tratamiento consistió en la reducción de la salinidad al 25 ‰ y sin la aplicación del metasilicato (solución 2) por un transcurso de seis días y luego se le aplicó todos los nutrientes necesarios.

En este estudio se pudo observar un incremento de tamaño el cual fue de 13 μm a 30 μm de la microalga debido a los factores limitantes el cual es un factor de estrés y supervivencia de las microalgas.

La experimentación con todos los nutrientes establecidos demostró que existe una gran importancia en su implementación en los medios de cultivos debido a que cada uno cumple una función importante y sustentable para la vida de las microalgas.

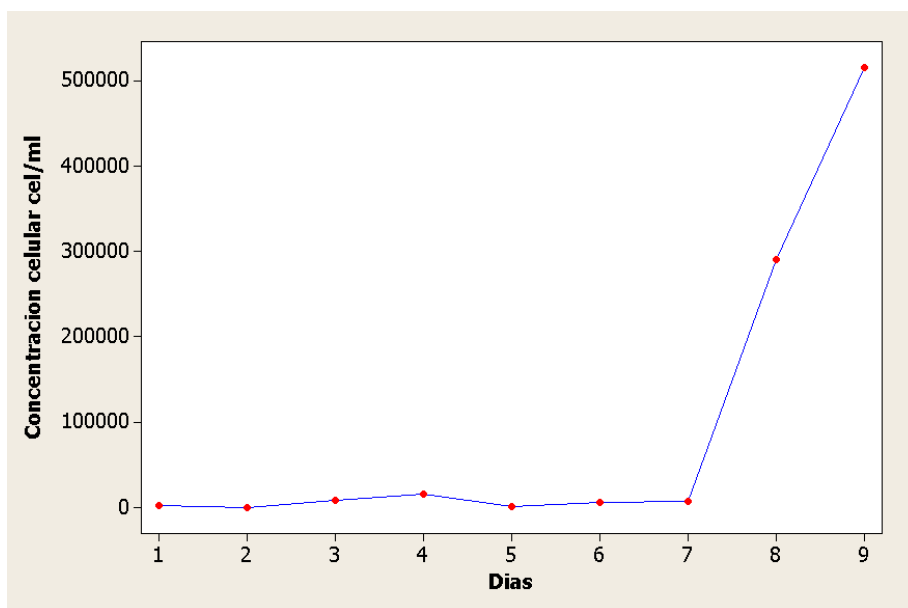


Figura 17. Tendencia de concentración celular de *Navicula* sp del TSSR2.1

En la figura 17 se observan como en los primeros 6 días mantiene una concentración de células baja debido a la ausencia del silicio después que se colocó a un medio con todos los nutrientes establecidos en la **Tabla 1**, se obtuvo un incremento espontaneo de las células donde alcanzaron concentraciones celulares mucho más elevadas que los días anteriores, también se observó el incremento del tamaño de las microalgas de 13 μm a 30 μm .

5.15 En función al crecimiento de la concentración celular

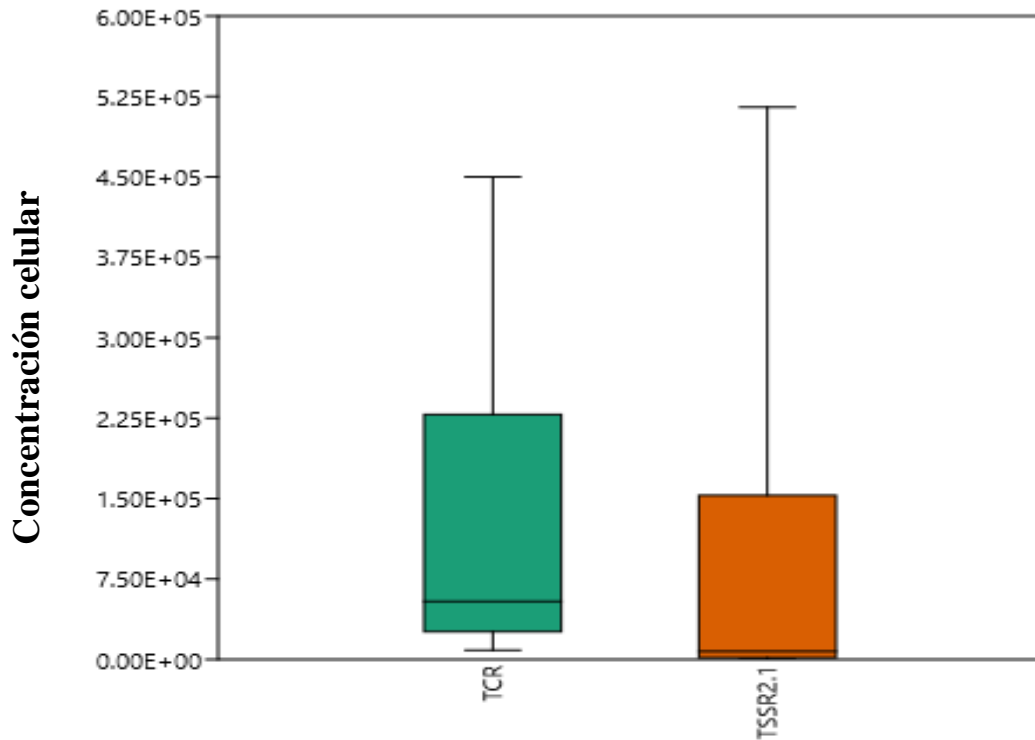


Figura 18. Box plot de los dos tratamientos en función a la concentración celular

La densidad celular de los cultivos TCR no mostró diferencia significativa con la densidad celular del TSSR2.1 porque ($p > 0.05$), también se pudo determinar la media de este tratamiento que fue de 5.94 estableciendo que no existe diferencia significativa este análisis de datos en función a la concentración celular de la segunda línea experimental. Se empleó la prueba de Tukey **anexo 31** para evaluar diferencias en la densidad celular al final del experimento también se determinó que no existe una diferencia en comparación con los dos tratamientos (figura 16).

5.16 En función al tamaño

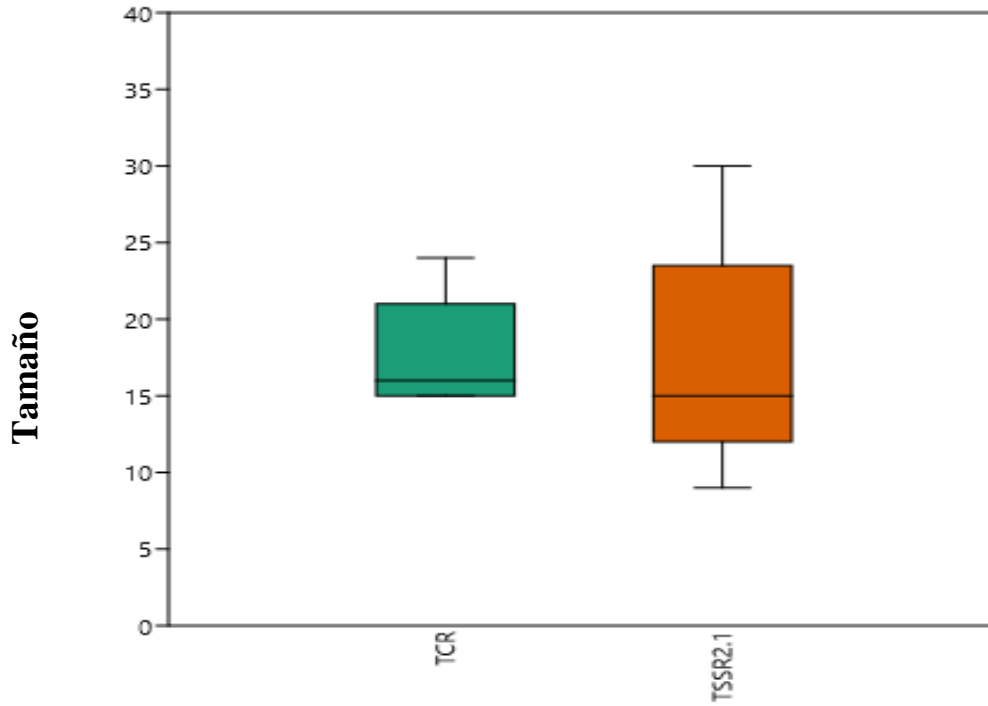


Figura 19. Box plot en función al tamaño de las células

Los análisis de datos ANOVA en función al tamaño de las células nos determinaron que existe una media de 0.05 se detectó una razón F de 0.001 y un valor $p > 0.05$ no existiendo una diferencia significativa entre las medianas y en el análisis estadístico de Kruskal-Wallis tampoco determina que existe una diferencia significativa.

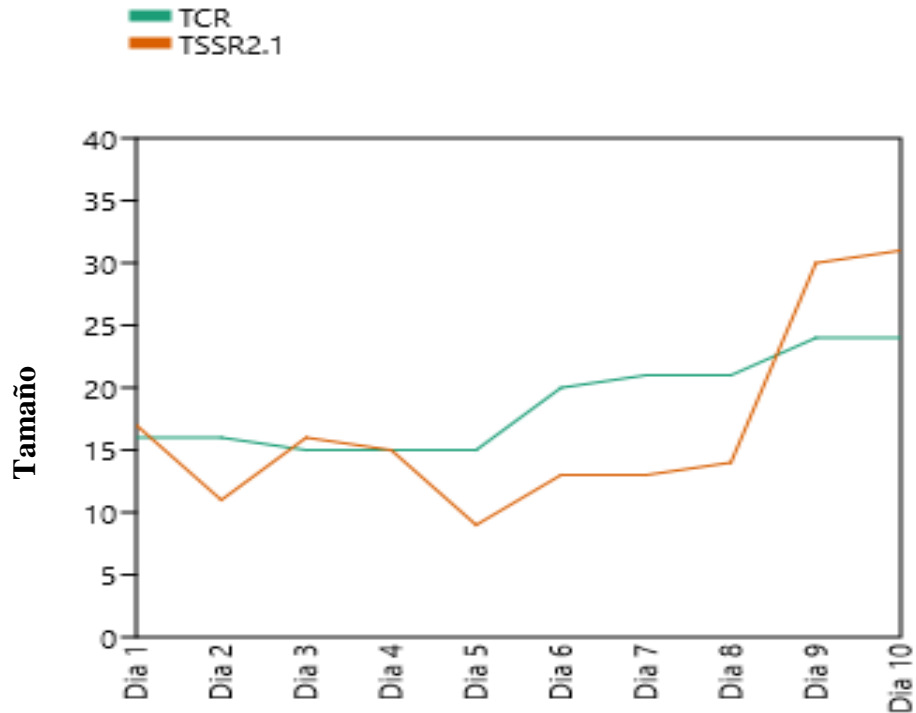


Figura 20. Comparación de los dos tratamientos en función al tamaño

En la ilustración se observa las curvas de crecimientos que se desarrollaron en los dos medios de cultivo como podemos ver en el TCR mantiene un tamaño normal en los últimos días incremento un 10% en su tamaño a comparación del TSSR2.1 el cual presenta una curva inestables pero después del transcurso de 6 días cuando pasa a un tratamiento con todos los nutrientes necesarios existe un incremento elevado en el tamaño de la célula estableciendo que en la última etapa del cultivo existe un aumento de un 70 % donde las células han incrementado su tamaño. que por medio de un factor de estrés o un tamaño mínimo de la célula esta comienza a regenerarse y establecer un tamaño más grande para así continuar su ciclo continuo, el silicio es absorción durante su división celular principalmente.

En función a las características de color y forma

Los datos estadísticos y los datos experimentales determinaron que no existió una diferencia significativa en las experimentaciones realizadas en función a la forma y el tamaño de esta especie tanto en los datos experimentales no existió diferencia alguna, estas características se las puede observar en las tablas de **anexos 34 y 35**.

5.17 En comparación con todos los tratamientos

A través de los análisis estadísticos como fue ANOVA no se demostró diferencias significativas comparando todos los tratamiento con nutrientes alterados a el tratamiento control con los nutrientes modificados determinado que con el medio modificado que se trabajo es igual a medio normal que es el f/2, pero aplicación de ANOVA con cada tratamiento individual si se encuentran diferencias significativas como se pudo observar en la experimentaciones realizada a través de factores que promovieron el estrés celular donde se le limitaron ciertas cantidades de nutrientes como es en el tratamiento TSNR1 que existe un índice negativo para un óptimo cultivo de microalgas debido a que en cantidades mínimas como es 3.40 mg/l de nitrógeno no genera la biomasa necesaria, estableciendo que no se realicen experimentaciones con esta cantidad de nitrógeno porque el cultivo tiende a decaer en los dos primeros días.

Se aceptó la hipótesis alterna que nos determina que los medios de cultivos experimentales no son iguales al medio de cultivo f/2, estableciendo así la importancia de todos los nutrientes necesarios para mantener un buen cultivo de microalgas.

Cabe recalcar que se establecieron los tamaños en los que fluctúa la diatomea *Navicula* sp que son entre los rangos de 13 μm a 30 μm , en esta fase experimental se observa que a través de la ausencia del nutriente como es el silicio se observa un comportamiento inusual, el cual presenta un aumento del tamaño de la célula, debido a un comportamiento bajo el estrés o supervivencia de esta especie son comportamientos que no se puede determinar con una veracidad debido a que indica este suceso se necesitan estudios específicos sobre este tema. Se decretó que bajas concentraciones de silicio como es 0.85 mg/l de este componente, aún genera un crecimiento celular de esta especie.

En función a la tercera experimentación donde el nutriente que más destaca fue el hierro, donde se observa un crecimiento inestable en sus primeros días y después una curva descendente debido a que su concentración de hierro fue de 0.14 mg/l obteniendo un resultado no favorable para un cultivo.

Para poder tener resultados más específicos se necesita hacer análisis estadísticos sobre la composición química que se les otorga en cada medio de cultivo establecidos para poder determinar si existen diferencias significativas químicas que contengan la microalga con respecto a la concentración del nitrato y el silicio.

DISCUSIÓN, CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES

6. DISCUSIÓN

Hay diferentes estudios con respecto a los nutrientes adecuados para las necesidades de las microalgas, y uno de los más conocidos es el guillar f/2. Los fertilizantes de origen de los medios de cultivo pueden presentar variaciones en su composición química (como metales traza y quelantes). Al respecto, autores como González Rodríguez, Maestrini y López (2011) atribuyen una función positiva para el crecimiento de las microalgas. La variación de la composición de los fertilizantes puede deberse al origen y a su proceso de producción (Valdepeña, 2004). Por tanto, lo anterior pudo influir positivamente en el crecimiento y la concentración celular observada en las microalgas cultivadas con medio modificado con respecto al medio f/2.

Por su parte, Rodolfi (2008) estableció diferentes medios de cultivo en los que se limitaron las concentraciones de nitrógeno, lo que resultó en el aumento de la productividad de lípidos en medios privados de nitrógeno. Este mismo autor estableció que, con la limitación de los nutrientes como el nitrógeno, se pueden obtener mayores concentraciones de lípidos. Igualmente, en el estudio se confirmó que con una concentración muy limitada de nitrógeno se observa un declive en la curva de crecimiento de las microalgas. De esa manera, se entiende que, entre concentraciones mínimas (3,40 mg/l) de nitrógeno en un medio, no existe un crecimiento del microorganismo como tal, sino que este tiende a decaer.

En el contexto de este trabajo, se establece una diferencia entre la deficiencia y la limitación de nutrientes. La primera se logra cuando el suministro exógeno se agota y la célula se ve obligada a utilizar sus reservas endógenas; mientras que, con la

segunda, el cultivo generalmente crece y se adapta a un ambiente constante, pero insuficiente, del nutriente limitante.

Cabe resaltar que, desde finales de la década de 1940, Milner (1949) demostró que un cultivo de *Chlorella pyrenoidosa* era capaz de acumular hasta un 85 % de lípidos en su biomasa, mientras que el contenido típico de los cultivos exponenciales de nutrientes, en particular el nitrógeno y el silicato, podía aumentar el contenido de lípidos en las algas. Así, se ha observado un aumento del contenido de lípidos de hasta el 70 % en la biomasa seca de las algas, y en este estudio también se determinó la importancia del nitrógeno, el silicio y el hierro.

Por otro lado, se observó un crecimiento negativo, debido a la ausencia del nitrógeno. Varios estudios han determinado que, dadas las concentraciones de nitrógeno en un cultivo de microalgas, es posible que se formen proteínas y ácidos grasos en estas. Finalmente, la investigación de Camacho (2013) estableció que la acumulación del pigmento astaxantina, extraído de la microalga *H. pluvialis*, ocurre a través de un estrés causado en este tipo de microalgas durante la transformación de su estado vegetativo (fase verde) hasta su estado de aplanospora (fase roja), cuando cesa su crecimiento en la fase estacionaria. Los factores de estrés que inducen a una acumulación de astaxantina son la temperatura y la concentración de nutrientes, entre otros. En conclusión, a través de este estudio se puede establecer que, por medio del estrés de una especie, se pueden obtener resultados favorables o de interés comercial, parecidos a los resultados de este análisis, donde se incluye la reducción del silicio para incitar el estrés en las células de la especie y estimular el incremento del tamaño celular.

7. CONCLUSIÓN

Aunque hay muchos estudios que se pueden realizar aún con respecto al medio de cultivo adecuado y las fuentes nutricionales adecuada a través de modificaciones para los fines de esta tesis se pudo establecer un medio de cultivo adecuado en donde la microalgas puede ejercer un crecimiento positivo, a través de eso también se determinó la influencia del medio de cultivo óptimos para el crecimiento adecuado de *Navicula* sp.

En el TCR la tasa de crecimiento específico más altas se registra durante la fase de crecimiento exponencial, cuando se observa que las células se replican gradualmente como resultado de las condiciones de cultivo ideales y los nutrientes disueltos en el medio.

Se desempeñó las curvas de crecimiento de la microalgas a través de los factores de estrés como fue la limitación de nutrientes dando nos como resultados que con una baja cantidad de nitrógeno y hierro existe una concentración celular no favorables a comparación de silicio el cual con bajas cantidades puede continuar con su reproducción vegetativa, aunque es mínima, pero se mantiene.

Es este estudio realizado se puede concluir con la importancia de todos los nutrientes que se otorga en un medio de cultivo estableciendo para este tipo de especies y aplicar las cantidades adecuadas en las cuales un medio de cultivo de microalga pueda tener lo que es un óptimo crecimiento y calidad nutricional de esta especie para ser aprovechadas en su totalidad.

Uno de los nutrientes más esenciales fue el nitrógeno que se determinó que si no existe una cantidad adecuada del nitrógeno las diatomeas no pueden mantener un crecimiento adecuado y llegan a morir rápidamente. Y también se estableció la

función esencial que cumple el silicio, debido a que por este medio las diatomeas pueden mantenerse fuertes y estables, este nutriente puede ejecutarse en mínimas cantidades por las cuales las diatomeas absorben todo el silicio del medio posible hasta llegar a un punto donde ya no exista el silicio suficiente y estas se establecen como esporas para poder mantener su sobrevivencia, después de este proceso cuando ellas vuelvan a tener un medio con suficiente silicio y regeneran a través de su reproducción meiótica estableciendo tamaños más grandes, es lo que se pretende que sucede en este proceso de aumento de dimensión celular, debido a que no se han realizado estudios pertinentes a este fenómeno como tal no se puede establecer una respuesta concreta y verídica.

Existen varios factores los cuales pueden afectar un medio de cultivo óptimo para el crecimiento de estos individuos como son los contaminantes que son las bacterias estas afectan negativa mente un cultivo y por tal motivo se tiene que mantener un manejo adecuado de toda la parte de esterilización.

8. RECOMENDACIONES

- Permanecer en un medio adecuado y esterilizado para los varios tipos de cultivos controlados con cada especie distinta que servir para medios de cultivo y determinar en cual es más factible trabajar debido a que cada especie contiene comportamiento y adaptaciones diferentes a través de esto se debe realizar estudios más detallados con relación al comportamiento en un medio controlado
- Mantener un medio de cultivo específico para cada especie debido a que cada tipo de especie tiene adaptaciones y componente distintos por eso se recomienda mantener un protocolo adecuado
- Realizar más estudios acerca del silicio en las diatomeas en función a sus factores como intervienen que procesos realiza, como se efectúa en las diatomeas
- Realizar estudios más relacionados al tema de la reproducción sexual de las diatomeas ya que son muy escasos este tipo de estudios
- Mantener una concentración adecuada de los nutrientes no excederse ni colocar menos, para mantener un óptimo crecimiento
- Utilizar un sistema híbrido, donde se cultiven las células en un medio suficiente de nutrientes para generar altas concentraciones de biomasa y posteriormente someterlas a un estrés nutricional bajo limitación de nutrientes como es el silicio para inducir a un aumento en las dimensiones celulares(tamaño), de esta manera no se ve mermada la productividad en función al tamaño.
- Se recomienda realizar estudio más detallados en función al tamaño de la célula a través de la ausencia del silicio en la formación del frústulo.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Abalde, J. (1995). Microalgas: cultivo y aplicaciones. Obtenido de https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/25013/Abalde_Julio_1995_Microalgas_cultivo_aplicaciones.pdf
- Acosta, C. M. (2021). Crecimiento de *Tetraselmis* sp. Empleando fertilizante como medio de cultivo. Obtenido de <https://revistas.uis.edu.co/index.php/revistaion/article/view/11474>
- AELS. (09 de 08 de 2018). Aula de Estudio del Lago de Sanabria. Obtenido de <https://aulaestudiolagosanabria.info/que-son-las-diatomeas/>
- Aleikar Vásquez, M. G. (9 de 2013). Crecimiento y composición bioquímica de *Thalassiosira pseudonana* (Thalassiosirales: Thalassiosiraceae) bajo cultivo semi-continuo en diferentes medios y niveles de irradiancias. Obtenido de https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442013000400002
- Alfonso. (2001). Metodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. Obtenido de Centro Interdisciplinario de Ciencias del Mar: https://www.academia.edu/73490620/Sustainable_Approaches_Towards_Aquaculture_Microalgal_Circular_Economy_Perspectives
- Bahls. (2012). *Navicula* . Obtenido de Identification: https://diatoms.org/species/navicula_whitefishensis
- Barros, J. (3 de 9 de 2021). Práctica de identificación y conteo de microalgas. Obtenido de <https://bloque10.unimagdalena.edu.co/identificacion-y-conteo-de-microalgas/#:~:text=Para%20llegar%20a%20esto%2C%20se,que%20estar>

%C3%A1%20disponible%20como%20alimento.

Basantes Chango, A., Quinapanta Pérez, G., & Vásquez Quishpe, E. (2021).

Microalgas como sustituto de proteínas de origen animal. Obtenido de

UniversidadTécnicadeAmbato:

<https://dx.doi.org/10.31243/mdc.uta.v5i4.1.1172.2021>

Brown, M., & Jeffrey. (1992). Composición bioquímica de microalgas de las

clases de algas verdes Chlorophyceae y Prasinophyceae. 1. Aminoácidos, azúcares y pigmentos. Obtenido de

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/002209819290192D>

Brzezinski, M. (2000). Metabolismo del silicio en diatomeas: implicaciones para el crecimiento. Obtenido de Revista de Ficología:

<https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2000.99135.x>

Camacho, E. (2013). Producción de Astaxantina en *Haematococcus pluvialis* bajo diferentes condiciones de estrés. Obtenido de SciELO:

http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702013000100009

Chavez, C. (2008). Efecto de distintas variables ambientales en la fisiología y composición bioquímica de *navicula incerta*. Obtenido de

<https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/1156/1/178311.pdf>

Chepurnov. (2004). El complejo de especies de *Sellaphora pupula*

(Bacillariophyceae): el análisis morfométrico, la ultraestructura y los datos de apareamiento proporcionan evidencia de cinco nuevas especies.

Obtenido de <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.2216/i0031-8884-43-4-459.1>

- Farías, A. (2018). Nutrición en Larvicultura de pectínidos: Relevancia de proteínas y lipidos. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/253513152_Nutricion_en_larvicultura_de_pectinidos_relevancia_de_proteinas_y_lipidos
- García, J. A. (2009). Crecimiento de la diatomea. Obtenido de http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2758/6_-_Efecto_de_las_sustancias_h%C3%BAmicas_en_el_crecimiento_de_algas_bent%C3%B3nicas.pdf?sequence=11
- Geitler. (1932). Obtenido de https://diatoms.org/citations/geitler_1-1932-der_formwechsel_der_pennaten_diatomeen_kieselalgen
- Geitler. (1968). Obtenido de <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=610608>
- González Rodríguez , Maestrini, & López , E. (2011). Humus de lombriz Eisenia foetida para cultivar dos microalgas marinas como alimento de larvas de camarón. Obtenido de Acuadocs: <https://aquadocs.org/handle/1834/4231?show=full>
- Gordon, R., & Losic, D. (2014). Obtenido de [https://www.cell.com/trends/biotechnology/fulltext/S0167-7799\(09\)00002-X?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS016777990900002X%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/trends/biotechnology/fulltext/S0167-7799(09)00002-X?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS016777990900002X%3Fshowall%3Dtrue)
- Grobbelaar, J. U. (2004). Algal Nutrition. Obtenido de Mineral Nutrition: <https://alगतex.org/ebook/Handbook%20of%20microalgal.pdf>
- Guerrero, R. (2018). Microalgas Bioindicadores, acuicultura y biotecnología. Obtenido de

https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/25013/Abalde_Julio_1995_Microalgas_cultivo_aplicaciones.pdf

Guillard, R. R. (1975). The relationship between cupric ion activity and the toxicity of copper to phytoplankton. Obtenido de <https://dspace.mit.edu/bitstream/handle/1721.1/58405/02286553-MIT.pdf?sequence=2&isAllowed=y>

Hernández, A. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. Obtenido de Scielo: https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-19572014000200001

Herrero, C. (2007). Nutritional properties of four marine microalgae for albino rats. Obtenido de <https://core.ac.uk/download/pdf/61913718.pdf>

Herrero, J. A. (1999). Obtenido de https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/13847/Herrero_Concepcion_1992_Crecimiento_bioquimica_Tetraselmis_suecica_microtroficos_azucares_aminoacidos.pdf?sequence=2&isAllowed=y

Heudre. (2018). Autecology. Obtenido de https://diatoms.org/species/adlafia_detenta

Huangc, J., & Xijie, Z. (2021). *Chlorella* sp. Mg muestra transiciones tróficas especiales y producción de biomasa. Obtenido de sciencedirect: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2589014X21002322>

Jia , X., Leo, C., & Juinn, D. (11 de 2022). Cultivo de interfaz aire-líquido de *Navicula* incerta usando membranas de fibra hueca. Obtenido de <https://s100.copyright.com/AppDispatchServlet?publisherName=ELS&contentID=S004565352202118X&orderBeanReset=true>

- Jimenez, M. (2022). Camara neubauer calculos. Obtenido de <https://proflash.es/blog/camara-neubauer-calculos/>
- Julio Abalde Angeles Cid, J. F. (s.f.). Obtenido de https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/25013/Abalde_Julio_1995_Microalgas_cultivo_aplicaciones.pdf?sequence=2
- Karawita, R., & Affan, A. (2007). Protective Effect of Enzymatic Extracts from Microalgae Against DNA Damage Induced by H₂O₂. Obtenido de Marine Biotechnology: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10126-007-9007-3#citeas>
- Leal, A. y. (1998). Protocolo de microalgas . Obtenido de Centro de investigaciones pesqueras : https://www.academia.edu/33014178/PROTOCOLO_DE_MICROALGAS
- López Portillo, F., & Martínez, A. (2021). Pigmentos en microalgas: funciones, aplicaciones. Obtenido de <https://smbb.mx/wp-content/uploads/2021/12/Vera-Lopez-Portillo-y-Martinez-Jimenez-2021.pdf>
- López, E. (2012). Manual de laboratorio de cultivos de apoyo acuícola. Hermosillo, Sonora: Editorial Universidad de Sonora. Obtenido de https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S0034-77442019000300599&script=sci_arttext#B32
- Madigan . (1999). Microbiologia. Obtenido de <http://147.96.70.122/Web/Programa/219.pdf>
- Mann. (1998). The species concept in diatoms. Obtenido de <https://hkvisa.net/10.2216/i0031-8884-38-6-437.1>

- Mann, A. (2006). Reproducción sexual en *navicula cryptocephala* (bacillariophyceae). Obtenido de <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1529-8817.2006.00235.x>
- Microalgas. (2018). Qué son las microalgas. Obtenido de cajamar.es/storage/documents/microalgas-1444391623-ca345.pdf
- Milner, S. y. (1949). La composición química de *Chlorella* efecto de las condiciones ambientales. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC437916/>
- Minhas, & Meena, K. (2020). Effect of plant growth regulators and deficit irrigation on canopy traits, yield, water productivity and fruit quality of eggplant (*Solanum melongena* L.) grown in the water scarce environment. Obtenido de ScienceDirect: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0301479720302553>
- Montoya, C. (2021). Obtenido de <https://revistas.uis.edu.co/index.php/revistaion/article/view/11474>
- Moreno, A. (octubre de 2008). Efecto de dietas monoespecíficas y mixtas en el crecimiento y supervivencia de larvas de camarón *Litopenaeus vannamei*. Obtenido de <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/1149/1/178481.pdf>
- Moreno, M. (2008). Obtenido de <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/1149/1/178481.pdf>
- Olguín, L. Q. (2010). Las microalgas oleaginosas como fuente de biodiésel: retos y

oportunidades. Obtenido de Instituto de Ecología:

https://www.academia.edu/8436830/Loera_olguin_2010_revlatinoambiote_cnolambalgal_v1n1

Park. (2011). Reciclaje de algas para mejorar el control de especies y la eficiencia de la cosecha de un estanque de algas de alta tasa. Obtenido de PubMed:
doi: 10.1016/j.watres.2011.09.042

Parker, N., & Frampton. (2001). Growth of the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* (Dinophyceae). Obtenido de Journal of Applied Phycology:
10.1023/A:1022170330857

Pati, J., & Anil, A. (2005). Cuantificación de diatomeas en biofilms:
Estandarización de métodos. Obtenido de
<https://www.tandfonline.com/doi/citedby/10.1080/08927010500241726?sroll=top&needAccess=true&role=tab>

Rodolfi, L. (2008). Microalgas para aceite: selección de cepas, inducción de síntesis de lípidos y cultivo masivo al aire libre en un fotobiorreactor de bajo costo. Obtenido de Biblioteca en línea Wiley:
<https://doi.org/10.1002/bit.22033>

Sati, p., & Malviya, K. (2023). Endófitos bacterianos como bioinoculantes: funciones microbianas y aplicaciones hacia la agricultura sostenible. Obtenido de Sciencedirect:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B978032390620300088>

Searcy-Bernal, R. (1992). Comparación simultánea de métodos de inducción de asentamiento y metamorfosis en el abulón rojo (*Haliotis rufescens*). Obtenido de Sciencedirect:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0044848692900908>

Serrano Bermúde, L., & Sierra Sáenz, É. (2011). Efecto del hierro en el crecimiento y acumulación de. Obtenido de dialnet:

<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4991541>

Silva, B. (2021). Astaxantina de *Haematococcus pluvialis* : procesos, aplicaciones y mercado. Obtenido de 10.1080/10826068.2021.1966802

Siqueiros, A. (1994). Composición y estructura de las asociaciones de diatomeas bentónicas del estero de punta banda en otoño de 1983 y 1986. Obtenido de

<https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/1946/1/75941.pdf>

Sylvia Leal, A. M. (2010). Las diatomeas bentónicas como fuente de alimento en el cultivo larvario de camarón y otros organismos acuáticos. Obtenido de https://www.uanl.mx/utilerias/nutricion_acuicola/X/archivos/24SylviaLeal.pdf

Sylvia Leal, A. M. (2010). Las diatomeas bentónicas como fuente de alimento en el cultivo larvario de camarón y otros organismos acuáticos. Obtenido de <https://nutricionacuicola.uanl.mx/index.php/acu/article/view/123>

Thalassiosira. (7 de 3 de 2015). Obtenido de

<http://www.acuinuga.com/es/producto/thalassiosira-18/#:~:text=Microalgas%20concentradas%20del%20grupo%20de,B%2C%20pigmentos%20carotenoides%20y%20clorofila.>

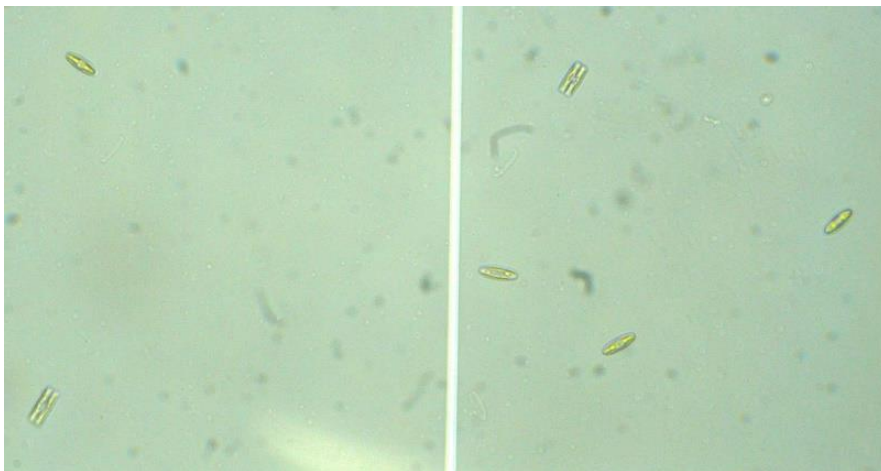
Thwaites, G. S. (2008). Morphology, cytology and sexual reproduction in the aerophytic cave. Obtenido de University Svobody :

<https://www.preslia.cz/article/pdf?id=277>

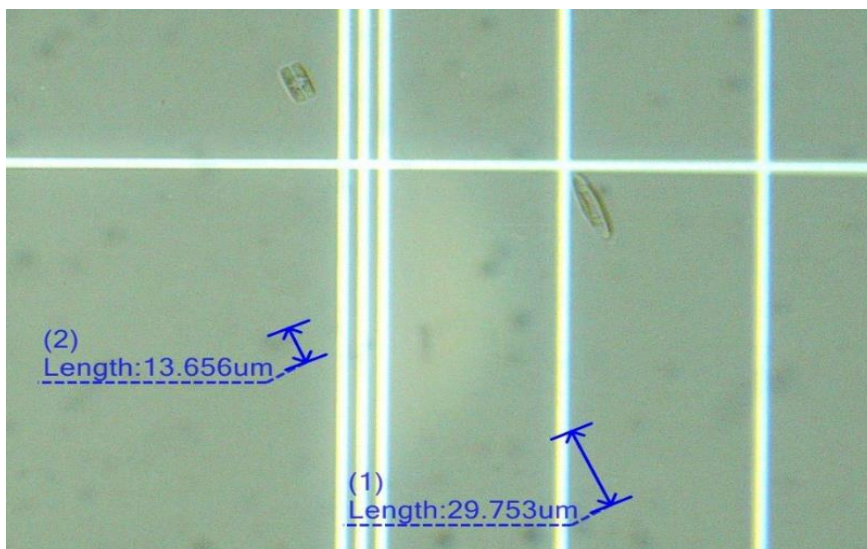
- Torres, A. O. (2007). crecimiento de microalgas. Obtenido de https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/33797783/Iridia_2007-libre.pdf?1401150278=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DProgresos_en_el_conocimiento_de_los_cicl.pdf&Expires=1653864913&Signature=NTm-2AllzZyqAS16I6gnWY0fdMnaO3WV5UYNk7WuY3T~AB6mV6
- Ulloa, G. (2011). Obtenido de <https://www.redalyc.org/journal/4576/457662072001/>
- Valdepeña, G. (2004). "Cultivo de Navícula incerta, Nitzschia commutata y Tetraselmis gracilis, utilizando un medio alterno al f/2". Obtenido de Universidad de Guadalajara : http://repositorio.cucba.udg.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/3117/Montes_Macias_Ruth_Adriana.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Vega, & Arredondo. (2010). Crecimiento y composición bioquímica de *skeletonema costatum* (greville, 1866) cleve, 1878 (heterokontophyta: bacillariophyceae) en función de la irradiancia. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/4277/427739444006.pdf>
- Villa, M. (26 de ENERO de 2011). Obtenido de <https://www.ainia.es/ainia-news/microalgas-sabias-que/#:~:text=La%20reproducci%C3%B3n%20es%20generalmente%20por,particular%20del%20ciclo%20d%C3%ADa%20noche.>
- Voltolina, B. A. (01 de 2007). Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/253237563_CONCENTRACION_RECUESTO_CELULAR_Y_TASA_DE_CRECIMIENTO

10. Anexos

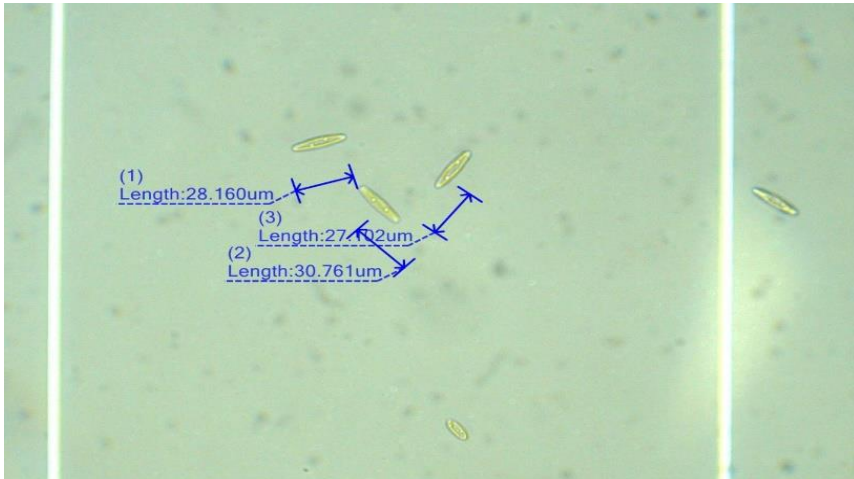
Imágenes



Anexo 21. *Navicula* sp



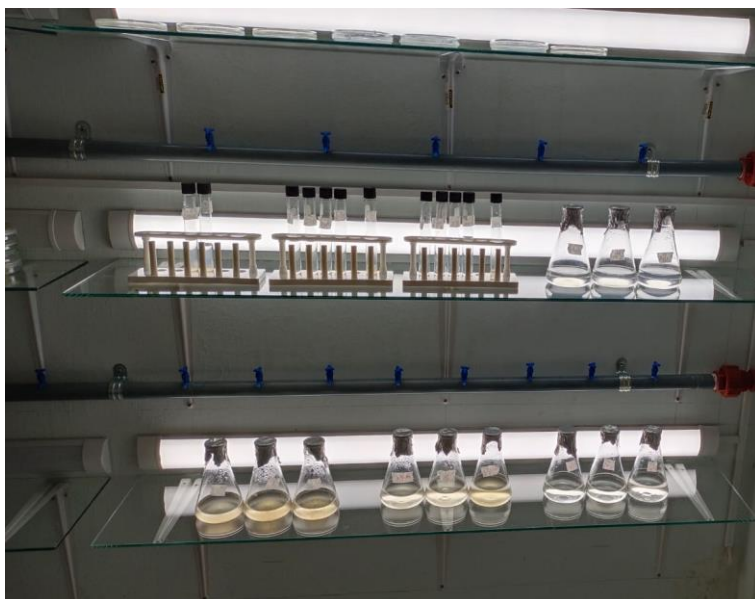
Anexo 22. Diferencia de tamaño de *Navicula* sp



Anexo 23. Presencia de celular de mayor tamaño



Anexo 24. Célula registrada con menor tamaño



Anexo 25. Experimentaciones de cultivo



Anexo 26. Réplicas de cada cultivo después de 3 días



Anexo 27. Revisión de las microalgas en el microscopio



Anexo 28. Visita de la docente tutor

Fase estadística

Several-sample tests

One-way ANOVA Effects Tukey's pairwise Residuals Kruskal-Wallis Mann-Whitney pairwise Dunn's post hoc

Test for equal means

	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p (same)
Between groups:	2,76046E10	3	9,20152E09	6,573	0,0005738
Within groups:	9,51867E10	68	1,3998E09		Permutation p (n=99999)
Total:	1,22791E11	71			0,00017

Components of variance (only for random effects):

Var(group):	4,33429E08	Var(error):	1,3998E09	ICC:	0,236429
ω^2 :	0,1885				

Levene's test for homogeneity of variance, from means p (same): 9,926E-06
 Levene's test, from medians p (same): 0,006715

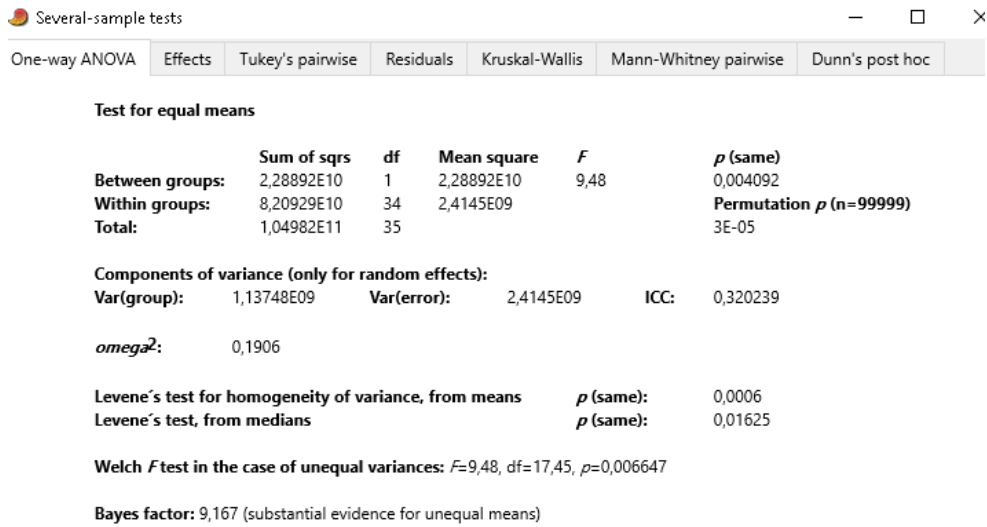
Welch F test in the case of unequal variances: $F=4,812$, $df=33,5$, $p=0,006807$

Bayes factor: 39,13 (very strong evidence for unequal means))

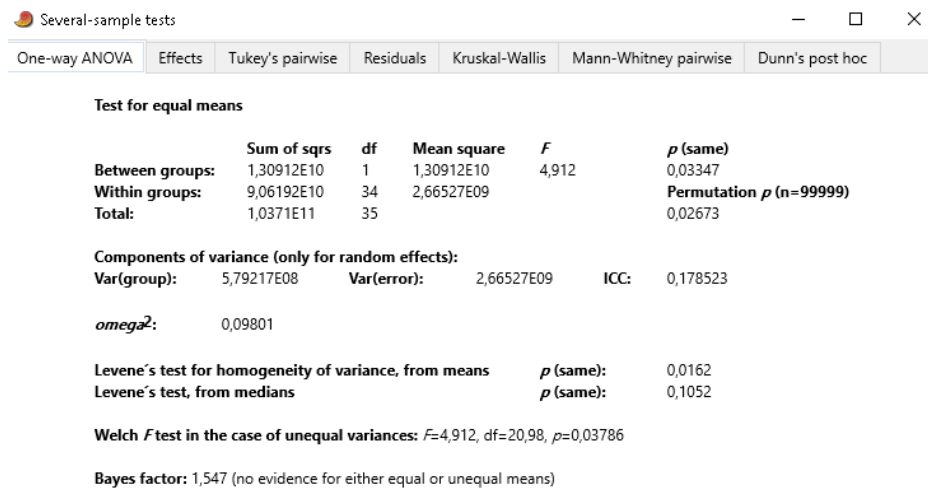
Anexo 29. datos de ANOVA realizados en el programa estadístico past de la primera línea experimental en función a la concentración celular

	TCR	TSNR1	TSSIR2	TSHIR3
TCR		0,1574	0,3997	0,2571
TSNR1	3,111		0,9317	0,9909
TSSIR2	2,266	0,8448		0,99
TSHIR3	2,696	0,4156	0,4293	

Anexo 30. Fase estadística de Tukey's



Anexo 30: ANOVA en comparación del TCR y TSNR1



Anexo 31: ANOVA comparación del TCR Y TSSR2

Several-sample tests

One-way ANOVA	Effects	Tukey's pairwise	Residuals	Kruskal-Wallis	Mann-Whitney pairwise	Dunn's post hoc
---------------	---------	------------------	-----------	----------------	-----------------------	-----------------

Test for equal means

	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p (same)
Between groups:	1,71828E10	1	1,71828E10	6,914	0,01275
Within groups:	8,44937E10	34	2,48511E09		Permutation p (n=99999)
Total:	1,01677E11	35			0,00202

Components of variance (only for random effects):

Var(group):	8,16541E08	Var(error):	2,48511E09	ICC:	0,247313
ω^2 :	0,1411				

Levene's test for homogeneity of variance, from means p (same): 0,002192
Levene's test, from medians p (same): 0,03744

Welch F test in the case of unequal variances: $F=6,914$, $df=18,46$, $p=0,01677$

Bayes factor: 3,456 (substantial evidence for unequal means)

Anexo 32: ANOVA de TCR Y TSHR3

One-way ANOVA	Effects	Tukey's pairwise	Residuals	Kruskal-Wallis	Mann-Whitney pairwise	Dunn's post hoc
---------------	---------	------------------	-----------	----------------	-----------------------	-----------------

Test for equal means

	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p (same)
Between groups:	19,3636	3	6,45455	2,979	0,05895
Within groups:	39	18	2,16667		Permutation p (n=99999)
Total:	58,3636	21			0,05139

Components of variance (only for random effects):

Var(group):	0,786111	Var(error):	2,16667	ICC:	0,266228
ω^2 :	0,2125				

Levene's test for homogeneity of variance, from means p (same): 0,1958
Levene's test, from medians p (same): 0,2647

Welch F test in the case of unequal variances: $F=3,979$, $df=7,929$, $p=0,05298$

Bayes factor: 1,26 (no evidence for either equal or unequal means)

Anexo 31. datos de ANOVA realizados en el programa estadístico past de la primera línea experimental en función al tamaño

	TCR	TSNR1	TSSIR2	TSHIR3
TCR		0,1617	0,9322	0,9782
TSNR1	3,089		0,05194	0,3082
TSSIR2	0,8426	3,932		0,755
TSHIR3	0,5617	2,528	1,404	

Anexo 32. Fase estadística de Tukey's

One-way ANOVA	Effects	Tukey's pairwise	Residuals	Kruskal-Wallis	Mann-Whitney pairwise	Dunn's post hoc
---------------	---------	------------------	-----------	----------------	-----------------------	-----------------

Test for equal means

	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p (same)
Between groups:	5,94363E09	1	5,94363E09	0,215	0,6491
Within groups:	4,42223E11	16	2,76389E10		Permutation p (n=99999)
Total:	4,48167E11	17			0,627

Components of variance (only for random effects):

Var(group):	-2,41059E09	Var(error):	2,76389E10	ICC:	-0,0955509
--------------------	-------------	--------------------	------------	-------------	------------

*omega*²: 0

Levene's test for homogeneity of variance, from means **p (same):** 0,6338

Levene's test, from medians **p (same):** 0,9089

Welch F test in the case of unequal variances: $F=0,215$, $df=15,25$, $p=0,6494$

Bayes factor: 0,2677 (substantial evidence for equal means)

Anexo 33. Datos estadísticos de ANOVA de la segunda línea experimental en función a la concentración celular

	TCR	TSSR2.1
TCR		0,6491
TSSR2.1	0,6558	

Anexo 34. Prueba de varianza Tukey's de la segunda línea experimental en función a la concentración celular

One-way ANOVA	Effects	Tukey's pairwise	Residuals	Kruskal-Wallis	Mann-Whitney pairwise	Dunn's post hoc
---------------	---------	------------------	-----------	----------------	-----------------------	-----------------

Test for equal means

	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p (same)
Between groups:	0,05	1	0,05	0,00118	0,973
Within groups:	762,9	18	42,3833		Permutation p (n=99999)
Total:	762,95	19			0,9896

Components of variance (only for random effects):

Var(group):	-4,23333	Var(error):	42,3833	ICC:	-0,110965
-------------	----------	-------------	---------	------	-----------

ω^2 : 0

Levene's test for homogeneity of variance, from means	p (same):	0,008411
Levene's test, from medians	p (same):	0,1371

Welch F test in the case of unequal variances: $F=0,00118$, $df=12,08$, $p=0,9732$

Bayes factor: 0,2325 (substantial evidence for equal means)

Anexo 35. Datos estadísticos de ANOVA de la segunda línea experimental en función al tamaño

	TCR	TSSR2.1
TCR		0,7264
TSSR2.1	0,5036	

Anexo 36. prueba de varianza Tukey's de la segunda línea experimental en función al tamaño

Tablas

EN DUNCION AL COLOR				
TCR	TSNR1	TSSIR2	TSHIR3	TSSR2.1
1	1	1	1	1
1	1	0	1	1
1	1	1	2	1
1	1	1	2	1
1	0	1	2	1
1	0	1	2	1

1 = Color normal (Parda)
2= Color medio (semi- pardo)
3= Sin pigmento
0= No presencia

Tabla 2. Tabla de registro de colorimetría de la microalga *Navicula* sp

EN FUNCION A LA FORMA				
TCR	TSNR1	TSSIR2	TSHIR3	TSSR2.1
1	1	1	1	1
1	1	1	1	1
1	1	1	1	1
1	1	1	1	1
1	0	1	1	1
1	0	1	1	1

0= No existe
1= Normal
2= Deforme

Tabla 3. Tabla de registro de la forma de *Navicula* sp

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cultivo de las microalgas en laboratorio es necesario para determinar su ciclo de vida, el cual suele presentar dificultades, ya que un porcentaje mínimo de especies crecen con un estándar alto en nutrición. Incluso en el caso de poder mantener las condiciones de cultivo, algunos factores afectan al normal desarrollo y comportamiento de la especie. Es imprescindible en la decisión de medios de cultivo conocimientos sobre la especie a cultivar destacándose, entre otros aspectos, la relevancia de la sexualidad y enquistamiento en los ciclos de vida, además de la ecología de los organismos (Torres, 2007).

En casi todas las especies de microalgas se presenta la reducción de tamaño obligada durante la fase vegetativa del ciclo de vida. En otros casos, el tamaño se restaura mediante la expansión de una célula especial, la auxospora, que se genera después de la reproducción sexual. Por este motivo la importancia de utilizar nuevas tecnologías de cultivo de microalgas que favorezcan este desarrollo y la expansión de volumen del cultivo se optan por nuevas técnicas de crecimiento favorecería obtener mayor concentración nutricional y un tamaño adecuado de estas especies para la alimentación inicial, por ejemplo, de camarones en cultivo.

Las microalgas como es la *Navicula* sp contiene una calidad nutricional adecuada de ahí la importancia el medio de cultivo. Es así entonces que el presente estudio se centró en determinar la influencia de diferentes medios de cultivos de fitoplancton con la finalidad de establecer una concentración celular de *Navicula* sp de su reproducción sexual bajo distintas condiciones experimentales.

Algunas empresas privadas llevan un proceso que es manejado en ocasiones empíricamente, es decir se basa en la experiencia, esto implica en el manejo del cultivo de microalgas existan falencias y no se registre de manera adecuada los costos que se generan ocasionando gastos innecesarios para la empresa. Debido a esto los medios de cultivo, que se utilizan químicos puros suelen tener un costo elevado por lo cual se tiende a reducir la cantidad de nutrientes desmejorando la producción de las microalgas. En base a lo anterior en este estudio se propuso buscar una solución para que este proceso se dé con una mejora en función a la calidad de las microalga.

Certificados

LABORATORIO DE MICROALGAS SALVADOR "LABMISAL"

LA LIBERTAD - ECUADOR

La libertad, 12 de julio de 2023

PARA: Nicole Katherine Piguave Chancay

ESTUDIANTE UNIVERSIDAD ESTATAL PENÍNSULA DE SANTA ELENA

DE: Blgo. William Aristides Salvador González

PROPIETARIO LABORATORIO LABMISAL

ASUNTO: CERTIFICACIÓN DE TRABAJO EXPERIMENTAL EN LAS INSTALACIONES DEL LABORATORIO LABMISAL.

Yo, Blgo. William Aristides Salvador González, con cédula de identidad 0916429483, con número de registro del SENESCYT 1023-10-985234; emito el siguiente certificado a la estudiante de la Universidad Estatal Península De Santa Elena, Nicole Katherine Piguave Chancay con cédula de identidad, 2450187139, para que haga uso pertinente en sus tramites de grado dando a conocer lo siguiente:

- 1) La estudiante solicita realizar las actividades experimentales en las instalaciones del Laboratorio de propiedad del Blgo William Salvador "LABOTRATORIO LABMISAL", el 26 de febrero DEL 2023.
- 2) La estudiante inicia sus actividades experimentales en el laboratorio, el 10 de marzo del 2023, desarrollando cultivos de microalgas de la especie *Navicula sp.*
- 3) La estudiante culmina sus actividades experimentales en el laboratorio "LABMISAL", 5 de julio del 2023.

Se sugiere reservar el nombre del laboratorio ya que los documentos para su funcionamiento se encuentran en trámites, pero se ha considerado oportuno dar apertura al conocimiento científico y experimental ya que de esta manera se logra incentivar la investigación, misión que llevamos para las futuras generaciones.

ATTE



Blgo. William Salvador

N° de Registro SENESCYT

1023-10-985234