



**UNIVERSIDAD LAICA “ELOY ALFARO”
DE MANABÍ**

FACULTAD CIENCIAS DEL MAR

BIOLOGÍA PESQUERA

**TESIS ORIENTADA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
BIÓLOGO PESQUERO**

TEMA:

“Criopreservación de las microalgas marinas; *Thalassiosira pseudonana* y *Navícula sp.*, utilizando glucosa y metanol como alternativa alimenticia de organismos cultivados.”

EGRESADOS:

**CABAL ARCENTALES EMILIO
RENDÓN DELGADO CINTHIA**

DIRECTOR DE TESIS:

BLGO. JAIME SANCHEZ MOREIRA MG. A.

MANTA – ECUADOR

2013

CERTIFICACIÓN

Biólogo Jaime Sánchez Moreira Mg. A., Docente de la Facultad Ciencias del Mar, certifico que los señores egresados en la carrera Biología pesquera Cabal Arcentales Emilio y Rendón Delgado Cinthia, realizaron la Tesis de Grado Titulada: “Criopreservación de las microalgas marinas; *Thalassiosira pseudonana* y *Navícula sp.*, utilizando glucosa y metanol como alternativa alimenticia de organismos cultivados.”.

Blgo. Jaime Sánchez Moreira Mg.A

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad por los hechos, ideas y doctrinas expuestas en este Trabajo de tesis, corresponde exclusivamente a los autores, y el patrimonio intelectual del mismo corresponderá a la Universidad Laica “Eloy Alfaro” de Manabí.”

Cabal Arcentales Emilio

Rendón Delgado Cinthia

MIEMBROS DEL TRIBUNAL

Dr. Luis Ayala. Castro, PhD.
Decano de Facultad

Blgo. Jaime Sánchez Moreira Mg.A.
Director de Tesis.

Ing. Miguel Zambrano Reyes
Miembro Principal.

Dr. David Villarreal de la Torre
Miembro Principal.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por darme La vida, a mis padres por ser parte fundamental para culminar mis estudios, a mis hermanos y en especial a mi Abuela que me guía desde el cielo, a la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí, al cuerpo docente de la Facultad.

GRACIAS

Emilio Cabal Arcentales

DEDICATORIA

Dedico a Dios por ser mi Ángel y mi guía, a mis padres a mis Hermanos y en especial a mi abuela y a mis maestros de la Universidad.

Emilio Cabal Arcentales

AGRADECIMIENTO

“EL VERBDADERO HUÉRFANO ES EL QUE NO HA RECIBIDO EDUCACIÓN”

Agradezco a Dios por permitirme ver el sol todos los días y la capacidad para lograr esta meta que me propuse, a mis padres que por su empuje para llegar al éxito, a mis hermanas por la ayuda constante, a mis adorados hijos que son el motor de mi vida y a mi esposo que sigue siendo mi apoyo y gracia a ustedes queridos maestros

Hoy en esta linda profesión es parte de mi vida y de mi futuro, emprenderé mi camino por el sendero del éxito y prosperidad contando siempre con la bendición de Dios.

Con sinceridad mil gracias

CINTHIA MARIA RENDON DELGADO

DEDICATORIA

Todo mi esfuerzo y constante superación es dedicada a mis padres forjadores de mi vida que con esfuerzo y sacrificio me han dado lo mejor de sí, incándome valores de sinceridad, responsabilidad, honradez y respeto, a mis hermanos por la ayuda recibida, a mi esposo que siempre me ha apoyado en todo, y junto con mis hijos han sido fieles testigos de este caminar diario para alcanzar esta meta

PADRES...ESPOSO...HIJOS ...

GRACIAS POR CUANTO HAN HECHO POR MÍ
DE CORAZONEN MI ALMA...ASÍ LO SIENTO
ESPERO QUE MI TRIUNFO.. LES SIGNIFIQUE
UNA DE SUS MAS GRANDES RECOMPENSAS

CINTHIA MARIA RENDON DELGADO

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Fitoplancton de la Facultad Ciencias del Mar de la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí, en la ciudad de Manta, provincia de Manabí, el cual consistió en criopreservar microalgas marinas de interés comercial de las especies *Thalassiosira pseudonana* y *Navícula sp.*, a nivel de laboratorio como alternativa alimenticia de larvas de camarón del género *Penaeus vannamei*.

En estos resultados de supervivencia de las larvas alimentadas con *Thalassiosira pseudonana* biopreservadas durante 15 días muestran que el tratamiento con Glucosa (2%) fue significativamente menor (14.47 %) al del tratamiento con Methanol 58.48%, sin embargo a los 30 días se pudo apreciar que la supervivencia con el control 1 (55.59%) fue significativamente mayor que los tratamientos con Methanol y Glucosa.

A los 90 días se pudo comprobar que la supervivencia de las larvas alimentadas con microalgas biopreservadas con Glucosa (1.76%) fue relativamente baja a las del Methanol (9.04%), mientras que el tratamiento control 1 (41.96%) demostró una supervivencia superior al de los tratamientos mencionados.

Así tenemos que Brown, 1972 utilizó diatomeas *Chaetoceros gracilis* y *Thalassiosira pseudonana* criopreservadas durante 6 semanas, reportó altos porcentajes de supervivencia para las larvas de *Penaeus vannamei*, los cuales fueron comparables con el tratamiento empleado en esta investigación, pero al emplear *Chaetoceros calcitrans* la supervivencia fue muy baja e igual se obtuvo un pobre desarrollo.

Los resultados obtenidos en la presente investigación concuerdan con este autor, ya que se obtuvo una supervivencia comparable con el control al emplear la microalga marina *Thalassiosira pseudonana* biopreservada

durante 15 días en la alimentación de larvas de camarón *Penaeus vannamei*. En conclusión, se obtuvo una alta supervivencia en las larvas de camarón *Penaeus vannamei* durante los primeros 15 días de tratamiento con Methanol al 10% y en el control. La alta mortalidad obtenida con microalgas biopreservadas durante 30 y 90 días se la puede atribuir probablemente en primera instancia a la toxicidad de los biopreservados, la cual depende del tipo, concentración y duración de exposición. De igual manera se pudo observar que las microalgas biopreservadas con Glucosa se adhieren a los apéndices de las larvas, lo cual les impide mudar y nadar correctamente siendo este factor una causa de mortalidad. La viabilidad de las microalgas biopreservadas se vió afectada probablemente al tiempo de biopreservación y temperatura de congelación. Las microalgas biopreservadas son aceptadas por las larvas de camarón *Penaeus vannamei* afectando la supervivencia a medida que se incrementa el tiempo de biopreservación, así como también su normal desarrollo por lo que no se las recomienda como un sustituto total sino parcial de las microalgas vivas y combinado con dietas artificiales.

SUMMARY

The present investigation work was carried out in the laboratory of Fitoplancton of the Ability Sciences of the Sea of the Lay University Eloy Alfaro of Manabí, in the city of Blanket, county of Manabí, which consisted on criopreservar marine microalgas of commercial interest of the species *Thalassiosira pseudonana* and *Navícula* sp., to laboratory level like nutritious alternative of larvas of shrimp of the gender *Penaeus vannamei*.

In these results of survival of the larvas fed with *Thalassiosira pseudonana* biopreservadas during 15 days they show that the treatment with Glucose (2%) it was significantly smaller (14.47%) to that of the treatment with Methanol 58.48%, however to the 30 days you could appreciate that the survival with the control 1 (55.59%) it was significantly bigger that the treatments with Methanol and Glucose.

To the 90 days it could be proven that the survival of the larvas fed with microalgas biopreservadas with Glucose (1.76%) he/she went relatively low to those of the Methanol (9.04%), while the treatment control 1 (41.96%) it demonstrated a superior survival to that of the mentioned treatments.

We have this way that Brown, 1972 used diatomeas *Chaetoceros gracilis* and *Thalassiosira pseudonana* criopreservadas during 6 weeks, it reported high percentages of survival for the larvas of *Penaeus vannamei*, which were comparable with the treatment used in this investigation, but when

using *Chaetoceros calcitrans* the survival it was very low and same a poor person development was obtained.

The results obtained in the present investigation agree with this author, since a survival comparable with the control was obtained when using the marine microalga *Thalassiosira pseudonana* biopreservada during 15 days in the feeding of shrimp larvas *Penaeus vannamei*. In conclusion, a high survival was obtained in the shrimp larvas *Penaeus vannamei* during the first 15 days of treatment with Methanol to 10% and in the control. The high mortality obtained with microalgas biopreservadas during 30 and 90 days can probably attribute it in first instance to the toxicity of the biopreservanes, which depends on the type, concentration and exhibition duration. In a same way one could observe that the microalgas biopreservadas with Glucose adheres to the appendixes of the larvas, that which prevents them to move and to swim being this factor a cause of mortality correctly. The viability of the microalgas biopreservadas you vió probably affected to the time of biopreservación and freezing temperature. The microalgas biopreservadas is accepted by the shrimp larvas *Penaeus vannamei* affecting the survival as the time of biopreservación is increased, as well as its normal development for what doesn't recommend them to him as a total substitute but partial of the alive microalgas and cocktail with artificial diets.

INDICE

1. ANTECEDENTES.....	1
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
1.2. OBJETIVOS.....	4
1.2.1. OBJETIVO GENERAL.....	4
1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
1.3. JUSTIFICACIÓN.....	5
1.4. HIPÓTESIS.....	6
2. MARCO TEÓRICO.....	7
2.1. Clases y especies algales cultivadas.....	7
2.2. FITOPLANCTON: CARACTERISTICAS GENERALES.....	9
2.2.1. Taxonomía.....	11
2.2.1.1. Diatomeas (clase: <i>Bacilliarophyceae</i>).....	12
2.3. PRODUCCIÓN ALGAL.....	15
2.3.1. Requerimientos y consideraciones generales.....	15
2.3.2. Luz.....	15
2.3.3. pH.....	16
2.3.4. Aireación.....	17
2.3.5. Temperatura.....	18
2.3.6. Salinidad.....	18
2.3.7. Medios de cultivo – nutrientes.....	20
2.4. Dinámica de crecimiento.....	21

2.5. Sistemas de cultivo de microalgas.....	24
2.5.1. Cultivos abiertos y cerrados.....	24
2.5.2. Cultivos axénicos.....	25
2.5.3. Cultivos en serie.....	25
2.5.4. Cultivos continuos.....	26
2.5.5. Cultivos semi-continuos.....	27
2.6. Valor nutricional de las microalgas.....	27
2.7. Concentración y conservación biológica de microalgas.....	30
2.8. Preservación biológica.....	33
2.8.1. Bioprotectores.....	34
2.8.2. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS BIOPROTECTORES..	36
2.8.1. METANOL (CH₃OH).....	36
2.8.2. GLUCOSA (C₆H₁₂O₆).....	37
2.9. ESTUDIOS SOBRE ALGAS BIOPRESERVADAS.....	38
2.10. IMPORTANCIA EN ACUACULTURA DE LA ESPECIE EMPLEADA.....	42
3. MATERIALES Y METODOS.....	44
3.1. LUGAR DE REALIZACION.....	44
3.2. MATERIALES.....	44
3.3. METODOS.....	46
3.3.1. CULTIVO DE MICROALGAS.....	46

3.3.2. PREPARACION DE FERTILIZANTES FORMULA GUILLARD F/2.....	48
3.3.3. PROCEDIMIENTO PARA EL CULTIVO DE MICROALGAS.....	57
3.3.3.1. Desarrollo de cepas en medio líquido.....	57
3.3.3.2. Preparación de materiales.....	58
3.3.3.3. Preparación de agar.....	59
3.3.4. CONTEO DE CELULAS DE MICROALGAS EN LA CAMARA DE NEUBAUER O HEMATOCITOMETRO.....	61
3.3.5. METODOLOGIA PARA ALIMENTAR CON MICROALGAS.....	63
3.3.6 Concentración de las microalgas.....	64
3.3.7. PRESERVACIÓN BIOLÓGICA DE MICROALGAS.....	64
3.3.8. VIABILIDAD DE LAS MICROALGAS.....	65
4. RESULTADOS.....	66
5. CONCLUSIONES.....	68
6. RECOMENDACIONES.....	70
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
8. ANEXOS.....	69

I. ANTECEDENTES.-

Los métodos de cultivo de organismos bioacuáticos en nuestro país han ido en constante crecimiento, existiendo actualmente una variedad de especies sometidas a cultivos en granjas o camaroneras (peces e invertebrados), las cuales representan un rubro importante en nuestra economía. Dichos organismos requieren durante su ciclo de desarrollo de una fuente de alimento, que la constituyen principalmente las microalgas.

Para la alimentación de cada especie cultivada se utilizan diferentes especies de microalgas, por lo general en cultivos monoespecíficos, en el desarrollo larval de camarones peneidos la sobrevivencia depende del tipo, calidad y cantidad del alimento vivo ingerido. Numerosos estudios han determinado el efecto de diferentes especies de microalgas, siendo las más utilizadas: *Chaetoceros gracilis*, *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira spp.*, *Tetraselmis chuii*, *Navicula*, *Isochrysis galbana*, *Amphora sp.*, entre otras.

En los momentos actuales, los cultivos intensivos de microalgas se han convertido en una rutina de laboratorios, donde las diferentes cepas (cultivos iniciales puros) son seleccionadas de acuerdo a dos criterios; su valor nutricional y la facilidad con que estas pueden ser cultivadas, tratando con esto de satisfacer los requerimientos nutricionales de los organismos cultivados.

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.-

Hoy en día muchas especies de microalgas aisladas de diferentes partes del mundo, son cultivadas en sistemas intensivos aplicando para ellos técnicas de esterilización, aislamiento, manipulación y siembra. Tenemos especies de diatomeas, flagelados, algas verdes y azul verdosas filamentosas, con tamaños que van desde algunas micras hasta más de 100.

Todas estas especies algales son cultivadas en laboratorios diseñados específicamente para este fin, aplicando técnicas laboriosas para obtener un cultivo puro y libre de contaminación tanto en cilindros como en grandes volúmenes, satisfaciendo la demanda de organismos cultivados. Siendo requeridos entre 18 a 21 días a partir de tubos de ensayo, para obtener cultivos masivos que cumplan con este fin y poder establecer una producción continua. Esta disponibilidad puede verse limitada por muchas causas: 1) la contaminación de los cultivos, 2) el descenso abrupto de la densidad celular por causas no controlables, 3) la pérdida de cepas puras desde las cuales se inicia el cultivo; así como también se presentan problemas debido a la manipulación de grandes volúmenes o la incapacidad de suplir demandas del alimento.

Estas limitantes podrían superarse con técnicas adecuadas de concentración y preservación de microalgas, las cuales disminuirían la dependencia de los cultivos frescos. La preservación biológica podría ser considerada una

alternativa inmediata a las necesidades en un laboratorio en caso de presentarse problemas. Además se lograría almacenar más células por mililitro, de lo que se obtiene en los cultivos masivos, concentrándose en volúmenes inferiores hasta su posterior utilización. De igual forma se evitarían todas las limitantes que se presentan en los cultivos frescos, y no sería necesaria una gran infraestructura para la producción de tales volúmenes pequeños lo que las hace apetecibles en la comercialización y transportación, reduciendo los costos de operación en laboratorios de cultivos. Un adelanto importante para la investigación acuícola y los laboratorios comerciales, podría ser la preservación biológica de microalgas, puesto que el desarrollo de esta técnica contribuiría a mejorar la eficiencia de los laboratorios, asegurando una permanente e inmediata disponibilidad de los cultivos estables de alta calidad.

1.2. OBJETIVOS.-

1.2.1. OBJETIVO GENERAL.-

Criopreservar microalgas marinas de interés comercial de las especies *Thalassiosira pseudonana* y *Navícula sp.*, a nivel de laboratorio como alternativa alimenticia de larvas de camarón del género *Penaeus vannamei*.

1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.-

- Cultivar microalgas marinas a nivel de laboratorio, para proceder a criopreservarlas con crioprotectores.
- Realizar el conteo de células microalgales, para determinar el crecimiento del cultivo
- Fertilizar el cultivo de las microalgas utilizando el método Guillard F/2.
- Evaluar la viabilidad de las microalgas criopreservadas, después de varios periodos de tiempo.
- Utilizar las microalgas criopreservadas como alimento en larvas de camarón del género *Penaeus*.

1.3. JUSTIFICACIÓN.-

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de plancton de la Facultad Ciencias del mar de la Univesidad “Eloy Alfaro” de Manabí, con la finalidad de poder criopreservar microalgas marinas de interés comercial y evaluar su viabilidad, determinando su eficacia como alimento después de atravesar un procedimiento de criopreservación y congelación de estas microalgas, ya que en el sector productor de larvas de camarón, se alimenta con microalgas marinas frescas, sin contar con métodos para preservar las cepas puras, y poder re utilizarlas en cultivos futuros de larvas de camarón.

1.4. HIPÓTESIS.-

- La viabilidad de las microalgas marinas utilizadas en el presente trabajo *Thalassiosira pseudonana* y *Navícula sp.*, es eficaz después de ser criopreservadas y congeladas, y se pueden utilizar como alternativa alimenticia en larvas de camarón del género *Penaeus*.
- La viabilidad de las microalgas marinas utilizadas en el presente trabajo *Thalassiosira pseudonana* y *Navícula sp.*, no es eficaz después de ser criopreservadas y congeladas, y tampoco se pueden utilizar como alternativa alimenticia en larvas de camarón del género *Penaeus*.

2. MARCO TEÓRICO.-

2.1. Clases y especies algales cultivadas.-

Desde 1940 se ha puesto interés en la producción intensiva de fitoplancton. Algunos de los criterios que influyen en la selección de las especies a ser cultivadas son: el tamaño de las células, naturaleza de la pared celular, potencial de cultivo, digestibilidad, composición química y sobre todo el valor nutricional para los animales que las ingieren. (Le Borgne, 1990).

Las microalgas son indispensables en la producción comercial de varias especies de animales marinos como una fuente de alimento para moluscos bivalvos, estadios larvales para algunas especies de crustáceos y para los primeros estadios de algunos peces. Sin embargo son más utilizadas para alimentar grandes cantidades de organismos zooplanctónicos (rotíferos, copépodos, artemia, etc) los cuales sirven a la vez para alimentar primeros estadios de peces y crustáceos. (Lavens, and Sorgeloos, 1996).

Varias técnicas han sido desarrolladas para la producción de estas especies a gran escala, variando desde cultivos extensivos menos controlados a cultivos específicos controlados; sin embargo la producción controlada de microalgas es un procedimiento complejo y caro. (Coutteau, 1996).

Se ha observado que la probabilidad del colapso de los cultivos se incrementa cuando disminuye el control de los parámetros tales como la iluminación, temperatura y cantidad de nutrientes.

La fase de crecimiento del cultivo, la intensidad de luz, temperatura, limitación y fuente de nutrientes, y la densidad celular pueden afectar la composición química de las algas (Persoone, 1988).

Los problemas más importantes encontrados en la producción a gran escala de microalgas como alimento para bivalvos, crustáceos y zooplancton pueden ser clasificados como: de naturaleza económica y relacionado a la dependiente y consistente calidad de grandes volúmenes de microalgas (Ukeles, 1980). El problema de la confiabilidad tiene dos componentes, mantener un suplemento regular y producir continuamente algas de alta calidad.

Las especies más frecuentemente cultivadas y utilizadas en maricultura incluyen:

Diatomeas: Clase Bacilliarophyceae (café)

Skeletonema costatum, *Thalassiosira pseudonana*, *Phaedactylum tricoratum*, *Chaetoceros calcitrans*, *C. gracilis*.

Flagelados: Clase Haptophyceae (café-amarillo)

Pavlova lutheri, *Isochrysis galbana*, *Isochrysis sp.*

Clase Prasinophyceae (verde)

Tetraselmis suecica, *Tetraselmis chuii*. (Le Borgne, 1990)

2.2. FITOPLANCTON: CARACTERISTICAS GENERALES.-

El plancton del océano se lo define como organismos flotantes, sin rumbo con limitados poderes de locomoción, que son transportados principalmente por los movimientos del agua.

Las subdivisiones del plancton incluyen bacterioplancton (bacterias), fitoplancton (vegetales) y zooplancton (animales). (Kennish, 1989)

El fitoplancton lo constituyen plantas microscópicas (unicelulares, filamentosas y en forma de cadena) que habitan la superficie de las aguas marinas (zona fótica) y de los medio ambientes costeros. Aunque las formas unicelulares comprenden la base del fitoplancton, algunas algas verdes y azul – verdosas son filamentosas. (Kennish, 1989)

Abarca una amplia diversidad de grupos algales a pesar de estar compuesto de simples células o pequeñas colonias relativamente organizadas. Estos autótrofos diminutos, los cuales son ampliamente holoplanctónicos, poseen la principal función en los océanos siendo responsables de al menos el 90%

de la fotosíntesis, con el 10% restante atribuido principalmente a las macroalgas bentónicas y las plantas vasculares.

Debido a que los océanos cubren el 72% de la superficie de la tierra, el fitoplancton como grupo es el productor primario más importante del planeta y comprenden la base de la cadena trófica alimenticia. (Kennish, 1989)

Las algas tanto bentónicas como planctónicas varían considerablemente en cantidad y forma. Este amplio grupo de organismos incluye las algas macroscópicas marinas así como también las formas unicelulares microscópicas y pequeñas colonias de forma variada.

Las características morfológicas detalladas no son fáciles de describir exactamente en organismos como el fitoplancton, pero estudios más recientes con el microscopio electrónico, demuestran finas estructuras de los constituyentes de las células tales como las membranas, flagelos, etc, en la pared celular que contribuyen a las características específicas de cada grupo (Dodge, 1973).

También se demuestra una remarcada diversidad de las especies algales en las características bioquímicas incluyendo los pigmentos fotosintéticos, especialmente la variedad de xantofilas y el almacenamiento de productos.

El fitoplancton es comúnmente categorizado en base a su talla, en 4 clases:

Ultraplancton (< 5 um de diámetro; nanoplancton (5 a 70 um), microfitoplancton (70 a 100 um) y macrofitoplancton (> 100 um), más de la mitad de todo el fitoplancton pertenecen al Ultraplancton y nanoplancton. (Kennish, 1989).

2.2.1. Taxonomía.-

Diatomeas (clase Bacillariophyceae), dinoflagelados (clase Dinophyceae), coccolitofóridos (clase Prymnesiophyceae), silicoflagelados (clase Chrysophyceae) y algas azul verdosas (clase Cyanophyceae) constituyen la principal taxa de productores planctónicos en el océano. En estuarios o cuerpos de agua cerrados, es importante mencionar que se encuentran otros grupos como las algas verdes (clase Chlorophyceae), café (clase Haptophyceae) y los euglénidos flagelados (clase Euglenophyceae) (Kennish, 1989).

2.2.1.1. Diatomeas (clase: Bacilliarophyceae)

Los miembros de esta clase, son esencialmente unicelulares y uninucleadas, aunque pueden ocurrir agregaciones pseudofilamentosas o coloniales.

El núcleo se encuentra suspendido en el centro por filamentos citoplasmáticos o desplazado hacia un lado de la célula. (Kennish, 1989).

La mayoría de las diatomeas son planctónicas y de las 10000 especies que han sido identificadas, al menos la mitad vive en ambientes marinos.

Varían en su tamaño desde menores a 10 micras hasta aproximadamente 200 micras. No presentan flagelos, cilios u otros órganos de locomoción, las especies planctónicas no poseen motilidad y flotan en aguas tranquilas.

La característica quizás más importante de las diatomeas, es que la célula tiene la habilidad para formar un esqueleto externo rígido de silicio (pectina impregnada con sílice), llamado frústula.

La frústula está formada por dos valvas, la epiteca y la hipoteca, las cuales están unidas por puentes pectináceos o dientes diminutos. Cada valva consiste de discos aplanados o convexos que pueden variar de forma entre las especies siendo circulares, elípticos, triangulares, cuadrados, poligonales o aún irregulares. (Kennish, 1989).

La cantidad de sílice en la pared celular de las diatomeas varían ampliamente con las especies así como también con las condiciones de cultivo, con un rango estimado del 4 al 50% en peso seco.

La clasificación de las diatomeas, está casi siempre basada sobre esta estructura. Su forma y simetría ayudan a los taxonomistas en la clasificación, basados en estas características se han reconocido dos órdenes: las diatomeas céntricas (*centricae*), que poseen valvas circulares o en forma de domo y predominantemente de existencia planctónica.

Y las diatomeas pennatales (*Pennatae*), que poseen valvas oblongadas y principalmente de hábitat bentónico; las células son más o menos alargadas en una dirección y la estructura valvar está dispuesta con referencia a su eje apical. (Kennish, 1989)

Aunque los taxonomistas como Hendey no creen que las diatomeas *pennatae* y *centricae* formen una división natural es conveniente distinguir los dos grupos. Los cloroplastos pueden ser pequeños y numerosos. El color es típicamente café dorado y los pigmentos fotosintéticos incluyen clorofila a y c Beta caroteno (el principal pigmento amarillo), fucoxantina (café) y las pequeñas cantidades de diatoxantina y diadinoxantina así como también otros carotenoides. (Kennish, 1989)

El método de reproducción de las diatomeas es la división celular vegetativa, obteniendo dos células hijas de menor tamaño que la célula madre.

Debido a que este tipo de reproducción asexual es ejecutada en varias generaciones de células, la talla promedio de la población gradualmente disminuye; cuando esto ocurre la restauración de la talla máxima ocurre a través de la reproducción sexual y la formación de una auxospora. (Kennish, 1989)

La escala taxonómica de la diatomea evaluada en la presente investigación, es la siguiente:

DIVISIÓN: CRHYSOPHYTA

CLASE: Bacilliarophyceaea

SUB-ORDEN: Centricae

ORDEN: Biddulphiales

FAMILIA: *Thalassiosira*

GENERO: *Thalassiosira*

ESPECIE: *Thalassiosira pseudonana* y *Navícula sp.*

2.3. PRODUCCIÓN ALGAL.-

2.3.1. Requerimientos y consideraciones generales.-

Los parámetros bajo control más importantes del crecimiento algal son la cantidad y calidad de nutrientes, luz, pH, turbulencia, salinidad y temperatura.

La diversidad de factores pueden ser independientes y un parámetro que es óptimo para una especie, en unas condiciones, no es necesariamente óptimo para otra. (Kennish, 1989)

2.3.2. Luz.-

Como todos los vegetales, las microalgas fotosintetizan. La luz es la fuente de energía la cual conduce la reacción y con respecto al régimen de iluminación a ser usado, las consideraciones más importantes, son: la intensidad, calidad espectral y fotoperiodo. La intensidad de la luz juega un papel importante, pero los requerimientos varían de acuerdo con la densidad y volumen del cultivo algal. Grandes volúmenes y concentraciones de células requieren que la intensidad de la luz sea incrementada para penetrar a través del cultivo, siendo estas variables las claves que regulan la eficiencia de la utilización de la luz. (Kennish, 1989).

Una intensidad alta de luz puede resultar en una inhibición de la fotosíntesis. La luz puede ser natural o suplementada por tubos de fluorescentes, en el cual las lámparas dan el mejor efecto de radiación. La duración de la iluminación también puede ser variada, de 12 a 18 horas por día, pero el fitoplancton cultivado se desarrolla normalmente bajo iluminación constante.

Se ha demostrado que 1000 lux de iluminación es adecuada para fiolas, pero de 5000 a 10000 lux es requerido para grandes volúmenes.

2.3.3. pH.-

Durante el crecimiento de un cultivo algal el pH puede fluctuar de 7.5 – 9, el cual limita su crecimiento, con un rango óptimo de 8.2 – 8.7 (Ukeles, 1971).

El cultivo completo colapsa debido a la destrucción de muchas células, lo cual conlleva a la inestabilidad del pH. En el caso de un cultivo de alta densidad algal, la adición del dióxido de carbono, naturalmente presente en el aire, permite el correcto incremento del pH, el cual puede mantener los valores menores a 9 durante el crecimiento algal.

Esta adición sirve para incrementar la capacidad buffer del medio de cultivo y prevenir los cambios bruscos de pH. (Kennish, 1989)

2.3.4. Aireación.-

La aireación es necesaria para prevenir la sedimentación de las microalgas, asegurando que todas las células de la población estén igualmente expuestas a la luz y nutrientes, evitando una estratificación térmica y proveyendo un intercambio de gas entre el medio de cultivo y el aire. La aireación es benéfica por las siguientes razones:

Primero el aire es una fuente de carbono en forma de CO_2 , el cual es consumido durante la fotosíntesis. Segundo la adición del CO_2 provee una estabilización esencial del pH. La adición de CO_2 debería ir de mano con la asimilación, o de lo contrario el pH del medio se elevaría. Esto es debido al balance mantenido entre el bicarbonato, dióxido de carbono e iones de Hidrógeno, que sirven como buffer en el agua contra los cambios de pH.

El aire que contiene aproximadamente 0.003% de CO_2 por volumen, puede o no ser enriquecido con CO_2 adicional antes de que sea adicionado al cultivo. El tercer beneficio deriva en sí a que el factor aireación para muchos cultivos es la base para la mezcla de estos. Para cultivos exteriores un nivel adecuado de mezcla puede prevenir la estratificación térmica.

Debe ser anotado que no todas las especies algales pueden tolerar agitaciones vigorosas, sin embargo, la intensidad de agitación debe ser

adecuada pero no intensa como para detener o evitar el crecimiento.
(Kennish, 1989)

2.3.5. Temperatura.-

La temperatura óptima para el cultivo de fitoplancton está generalmente entre 18 y 24° C aunque esta puede variar con la composición del medio de cultivo, las especies y las cepas cultivadas. La mayoría de las especies comúnmente cultivadas toleran temperaturas entre 16 y 27° C. temperaturas más bajas que 16° C disminuirán el crecimiento del cultivo, mientras que temperaturas más altas a 35° C son letales para ciertas especies. (Kennish, 1989)

Cuando los nutrientes están presentes en óptimas concentraciones, la temperatura y la iluminación son los únicos factores limitantes en los cultivos algales.

Debido a que la luz fluorescente causa aumento de la temperatura en los cultivos, es necesario mantenerlos refrigerados, especialmente cuando los volúmenes son pequeños, o simplemente se deben mantener en cuartos con aire acondicionado.

La temperatura sin embargo, puede ser importante determinando cuales especies predominarán en cultivos abiertos exteriores. (Kennish, 1989)

2.3.6. Salinidad.-

La tolerancia del fitoplancton marino a cambios en la salinidad se considera extremadamente alta, la cual varía de acuerdo con las especies cultivadas.

El fitoplancton marino es extremadamente tolerante a cambios en salinidad, la mayoría de las especies crecen mejor a salinidades ligeramente más bajas que las de su hábitat nativo, la cual es obtenida diluyendo el agua de mar con agua dulce. Salinidades de 20 – 24 ups se han encontrado óptimas. (Kennish, 1989)

2.3.7. Medios de cultivo – nutrientes.-

Las especies sometidas a cultivo alcanzan concentraciones que son generalmente más altas que aquellas encontradas en la naturaleza, requiriendo de medios de cultivo con una composición química similar a la del mar.

Además del carbono los principales nutrientes requeridos por el fitoplancton son Nitrógeno (Nitrato) y Fósforo (Fosfato), en una relación aproximada de 6:1. Adicionalmente las diatomeas requieren Silicato, las cuales utilizan este compuesto para la producción de su esqueleto externo.

También son adicionados los metales traza (Hierro, Cobre, Cobalto, Zinc, Manganeso y Molibdeno) y las vitaminas, especialmente Cianocobalamina (B₁₂), Tiamina (B₁) y algunas veces Biotina que son necesarias en la mayoría de los cultivos axénicos.

Dos medios enriquecidos que han sido usados extensivamente y están disponibles para el crecimiento de las algas son el medio Walne y el medio Guillard F/2 (1975) entre otros.

2.4. Dinámica de crecimiento.-

Generalmente se han reconocido de tres a cinco fases de crecimiento de las poblaciones algales, para las microalgas estas se consideran que responden al estado nutricional de las células y son:

Fase de Inducción

En esta fase, en la cual las células han empezado a absorber los nutrientes, ocurre poco incremento de la densidad algal, siendo relativamente larga cuando un cultivo pasa de un medio sólido a un medio líquido. Esta fase es atribuida a la adaptación fisiológica del metabolismo celular para crecer y reproducirse, tal como el incremento de los niveles de enzimas y

metabolitos involucrados en la división celular y fijación del carbono.
(Kennish, 1989)

Fase exponencial

Después de la absorción de los nutrientes la población entra a la fase larga (fase exponencial) en la cual la reproducción es extremadamente rápida, durante la segunda fase, la densidad celular se incrementa en una función de tiempo t de acuerdo a una función logarítmica: $C_t = C_0 \cdot e^{mt}$

La cosecha debería ser hecha antes del final de esta fase la cual tarda de 3 a 6 días.

Fase de declinación de la tasa de crecimiento

Esta fase es transitoria, donde el crecimiento y la división celular bajan lentamente cuando los nutrientes, luz, pH, dióxido de carbono u otros factores físicos y químicos llegan a limitar el crecimiento. (Kennish, 1989)

Fase estacionaria

En el cuarto estadio los factores limitantes y la tasa de crecimiento son balanceadas, lo cual resulta en una densidad celular relativamente constante, en esta fase el número de las células no cambia y puede durar varias semanas si no hay contaminación. (Kennish, 1989)

Muerte o fase de declinación

Durante el estadio final, la calidad de agua se deteriora y los nutrientes están agotados a un nivel incapaz de sostener el crecimiento. La densidad celular decrece rápidamente y el cultivo celular eventualmente colapsa debido a que las células muertas no son reemplazadas.

En la práctica el colapso de los cultivos puede ser causado por muchas razones, incluyendo el agotamiento de los nutrientes, la deficiencia de oxígeno, exceso de manipuleo, desorden de pH o contaminación.



Figura 2.1.- Fases de crecimiento de los cultivos de microalgas.

La clave para asegurar un cultivo algal es mantener todos los cultivos en la fase exponencial de crecimiento. También el valor nutricional y la

composición bioquímica de las algas producidas es inferior una vez que hayan pasado de la fase tres debido a la reducción de la digestibilidad, deficiente composición, y una posible producción de metabolitos tóxicos.

Siempre es mejor cosechar las células durante la fase exponencial y usar estas células como inóculo para otros cultivos. Un inóculo con células de esta fase se dividirá más rápidamente que las células tomadas de otra fase, así producirán cultivos que son en general más viables. (Kennish, 1989)

2.5. Sistemas de cultivo de microalgas.-

Las algas pueden ser producidas de acuerdo a una gran variedad de métodos, desde los métodos controlados de laboratorio, hasta métodos menos predecibles en tanques exteriores. Así los cultivos de microalgas pueden ser divididos a grosso modo en sistemas interiores y exteriores. Los cultivos interiores típicamente producen pequeños volúmenes de algas bajo condiciones controladas. Además la temperatura, luz y niveles de nutrientes pueden ser controlados dentro de niveles estrictos, permitiendo un crecimiento muy predecible. (Fulks and Main, 1991)

La terminología usada para describir el tipo de cultivo algal incluye:

2.5.1. Cultivos abiertos y cerrados.- los cuales son mantenidos en tubos de ensayo, fiolas, botellas o carboys, en contraste a los cultivos abiertos que son más propensos a la contaminación. Sin embargo para producir grandes cantidades de algas, los cultivos abiertos son los sistemas prácticos hasta la fecha.

2.5.2. Cultivos axénicos.- Son estériles, libres de cualquier organismo foráneo como bacterias o protozoarios, los cuales requieren de medios de cultivo, vidriería, pipetas, agua, etc escrupulosamente esterilizados para evitar la contaminación.

2.5.3. Cultivos en serie.- el cultivo en serie consiste en una simple inoculación de células dentro de un recipiente de agua de mar fertilizada seguido por un período de crecimiento de siete días y finalmente cosechado cuando la población algal alcanza su máxima densidad. Se podría utilizar la siguiente secuencia de estadíos consecutivos: tubos de ensayo, fiolas de un litro, fiolas de dos litros, botellones de 10 litros, carboys de 50 y 100 litros y tanques exteriores de una tonelada. De acuerdo a la concentración algal en el inóculo los volúmenes de 1/50 y de 1/10 del volumen final son utilizados para la siembra.

Los cultivos en serie son ampliamente aplicados debido a su simplicidad y flexibilidad, permitiendo cambiar las especies y remediar defectos en el sistema rápidamente, el disturbio dura solo un día. (Coutteau, 1996)

Esta técnica es considerada por muchos como el método más confiable de producción algal, sin embargo la calidad de las células producidas no es tan predecible como aquellas provenientes de cultivos continuos. Una importante variable puede ser el tiempo de cosecha.

2.5.4. Cultivos continuos.-

Estos cultivos son sistemas delicados balanceados, a menudo axénico en los cuales el cultivo es cosechado continuamente y el mismo envase es usado por varias semanas o meses, recibiendo un constante reemplazo de nutrientes. Una fracción del cultivo es removida regularmente y reemplazado por agua de mar enriquecida. Es muy importante ajustar la tasa de lavado de manera que la tasa de cosecha sea un poco más baja que la tasa máxima específica de crecimiento.

Hay muchas ventajas en los cultivos continuos incluyendo un constante suplemento de células de alta calidad en fase estacionaria, una gran tasa de producción y automatización; estos cultivos solo son realizables para la producción de cantidades relativamente pequeñas de microalgas.

Este método es riesgoso y toma de 4 a 5 días restaurar el sistema si se pierde el cultivo accidentalmente.

2.5.5. Cultivos semi-continuos.-

En los cultivos semi-continuos una población dada se permite crecer hasta que alcanza la densidad celular deseada, utilizando grandes tanques de cultivo para una cosecha parcial periódica, seguido inmediatamente por el llenado al volumen original y suplementando con nutrientes para lograr el nivel original de enriquecimiento. Su duración es impredecible; los predadores, competidores y/o contaminantes y metabolitos hacen el cultivo indisponible para usos futuros. Se produce una variabilidad en la calidad nutricional de las células. (Fulks and Main, 1991)

2.6. Valor nutricional de las microalgas.-

El valor nutricional de cualquier especie algal, depende del tamaño de la célula, condiciones de cultivo, digestibilidad, producción de compuestos tóxicos y la composición bioquímica, la cual puede variar considerablemente aún cuando crecen bajo condiciones estándar.

Las especies utilizadas con mayor frecuencia en operaciones de maricultura generalmente pertenecen al nanoplancton (2 a 20 μm) y entre ellas podemos mencionar: *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira pseudonana*,

Chaetoceros gracilis, *C. calcitrans*, *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica*, etc.

Aunque hay marcadas diferencias en la composición de las clases y especies microalgales, la proteína es siempre el mayor constituyente orgánico, seguido usualmente por los lípidos y carbohidratos. Expresado como porcentaje de peso seco, el rango para los niveles de proteína, lípidos y carbohidratos son 12 – 35%; 2.3 – 7.2% y 2.3 – 4.6% respectivamente.

El contenido de los ácidos grasos altamente insaturados (HUFA) en particular el ácido eicosapentaenoico (20:5n – 3 EPA), ácido araquínódico (20:4n – 6 ARA), y ácido decosahexaenoico (22:6n – 3 DHA) son los de mayor importancia en la evaluación de la composición nutricional de una especie algal a ser utilizada como alimento para organismos marinos.

La composición total difiere entre las especies, pero para muchas este no es el mayor factor relacionado al valor del alimento. La composición de azúcar es variable, y en algunas instancias puede afectar el valor nutricional. Las microalgas son fuente rica de dos vitaminas claves, ácido ascórbico y la riovoflavina, pero algunas especies no las poseen. Las diatomeas se pueden considerar como una fuente rica en ácido ascórbico (0.11 – 1.26% de peso seco).

Debido a que las microalgas pueden estar limitadas en una ó más de los nutrientes claves, la mezcla algal provee un mejor balance nutricional en operaciones de maricultura.

La composición bioquímica de las microalgas puede ser manipulada cambiando las condiciones de crecimiento, pero el efecto varía de una especie a otra, y por lo tanto no siempre puede relacionarse con el valor nutricional. El tamaño, tasa de crecimiento y valor nutricional de las microalgas son características importantes cuando son evaluadas como fuente potencial de alimento para acuicultura. Todas las especies planctónicas son disponibles como alimentos para bivalvos.

Los requerimientos óptimos de proteína, lípidos y carbohidratos en la dieta de animales en cultivo, están influenciados por muchos factores, incluyendo factores genéticos, medioambientales y la calidad nutricional de cada componente dietético.

Para un crecimiento óptimo muchas larvas de bivalvos requieren alimentarse con especies microalgales conteniendo 30 – 60% (peso seco) de proteína y 5 – 30% de carbohidratos.

El valor nutricional idóneo de las microalgas como alimento para especies de acuicultura está muy influenciado por la composición de ácidos grasos de los lípidos, y en menos extensión por la composición de aminoácidos de

las proteínas y la composición de azúcar de los carbohidratos. Es bien establecida la presencia de los ácidos grasos altamente insaturados (HUFAS) en el perfil lipídico, especialmente EPA y DHA en la dieta microalgal, los cuales están asociados con altas tasas de crecimiento de larvas de bivalvos, y muchos otros organismos juveniles en acuicultura. El ácido araquínódico es también considerado importante en maricultura debido a que puede tener un rol en el desarrollo de los estadios embrionicos y larvales de peces. (Kennish, 1989)

2.7. Concentración y conservación biológica de microalgas.-

El problema en la concentración de las microalgas ha sido usualmente enfocado desde el punto de vista de la eliminación del medio el cual ellas se encuentran colonizando, y en la mayoría de los casos cuando es necesario separar las microalgas del medio líquido.

Sin embargo los excesos de producción pueden ser concentrados y conservados. Los cultivos algales de alta densidad pueden ser concentrados ya sea por centrifugación o floculación.

Centrifugación.- este procedimiento está basado en el factor que hay una ligera diferencia de densidad entre las algas y el medio líquido, el cual permite la extracción del 80 al 90% de las algas. La centrifugación permite

un nivel de concentración el cual varía de acuerdo a los autores desde 100 – 150, con un nivel de sólidos entre 12 y 15%.

La concentración de grandes volúmenes de algas es logrado usando un separador de crema (centrífuga) y la tasa de flujo es ajustada de acuerdo a las especies algales y la tasa de centrifugación del separador.

Las células son depositadas en las paredes del cono del separador de la centrífuga como una delgada pasta algal, la cual es re suspendida en un volumen limitado de agua. La pasta resultante puede ser almacenada por una o dos semanas en el refrigerador o congelada. para el último caso los agentes bio conservadores (metanol, glucosa) son adicionados para mantener la integridad celular durante la congelación. Sin embargo la destrucción de las células y el tiempo limitado de vida son las mayores desventajas de la biomasa algal conservada durante largos periodos. Cultivos concentrados de *Tetraselmis suecica* mantenidos en oscuridad a 4° C mantienen su viabilidad, la cual es completamente perdida en la congelación. Además los cultivos almacenados en envases sellados herméticamente, pierden más rápido su viabilidad que aquellos mantenidos en envases no herméticos.

La centrifugación ha sido seleccionada como el método más apropiado para la cosecha y concentración de microalgas en base a la eficiencia y evaluación del aparente daño celular. (Heasman, 1999)

Coagulación – floculación.- la floculación algal causa que las células se coagulen y precipiten hacia el fondo o floten en la superficie. Debido a que se incrementa el tamaño de las partículas en las algas coaguladas, estas no son aconsejables para suministrarse como alimento a organismos filtradores.

Productos tales como el Sulfato de aluminio, cloruro férrico, arcilla y ciertos pielectrolitos han sido utilizados exitosamente por varios investigadores. Los rangos de concentración de 100 – 200 mg.l⁻¹ o desde 2 -5 mg.l⁻¹ han sido usados dependiendo de las sales minerales.

Hasta el presente la centrifugación y floculación son los únicos procedimientos en operación que permiten la concentración celular, pero su viabilidad a una escala comercial no ha sido determinada, la cual ha sido sugerida ó está en investigación por otros autores.

2.8. Preservación biológica.-

La preservación biológica es el mantenimiento de células viables a bajas temperaturas y bajo cero. Esto se aplica a aquellos cultivos de microalgas que se someten a congelación utilizando agentes bioprotectores, con la finalidad de mantener la integridad celular.

Para que el método sea exitoso la estabilización de la temperatura no debería exceder los -130°C para la recristalización del hielo. Generalmente el Nitrógeno líquido es usado como un refrigerante conveniente a través de una inmersión total de las muestras congeladas (-196°C) o suspendidas en fase gaseosa (-135°C).

Una ventaja irresistible de esta técnica como método de mantenimiento es que una vez que los organismos han sido preservados por un método comprobado, se obtiene una alta recuperación celular, viabilidad que es independiente del tiempo de almacenamiento. Un procedimiento específico necesario para una óptima preservación de algunos microorganismos es la disminución de la formación de hielo, cuando las muestras alcanzan su punto de congelación. (Fuku, *et al*, 1992). El conocimiento en sí de este factor mejorará la preservación del fitoplancton y es una interrogante elemental en el éxito de un método ideal de preservación biológica.

2.8.1. Bioprotectores.-

Los bioprotectores por definición permiten la supervivencia de las células biopreservadas evitando la formación de hielo en la pared celular. Ellos permiten esta función por diferentes mecanismos: disminuyen el punto de congelación del agua de manera que a cualquier temperatura solo una pequeña fracción del medio suspendido solo estará compuesto de hielo.

Los bioprotectores que contienen grupos OH, actúan con el agua por medio de puentes de Hidrógeno y pueden ayudar a estabilizar el líquido e inhibir la formación de cristales de hielo; adicionalmente pueden incrementar muy considerablemente la viscosidad del medio en suspensión. En la actualidad han sido utilizados bioprotectores tales como: Metanol, glucosa, sacarosa, leche en polvo, y suero de caballo.

Aunque el mecanismo por el cual los agentes bioprotectores permiten la congelación no es completamente entendido, es cierto sin embargo, que se encuentran involucradas las propiedades coligativas tales como: 1.- disminución del punto eutéctico de congelación, 2.- facilidad de supercongelación y 3.- sales protectoras.

Las propiedades coligativas de los agentes bioprotectores previenen la difusión de las moléculas de agua y la formación del hielo, los cuales son

responsables de la desnaturalización de las fracciones bioquímicas intracelulares. (Kennish, 1989)

La protección a bajas temperaturas es también dada a las células por la habilidad de estos solventes neutrales para prevenir concentraciones excesivas de electrolitos durante la congelación. Ellos reportan sin embargo que el DMSO tiene ciertas ventajas sobre el glicerol debido a que este penetra más rápido en las células.

La probabilidad de vitrificación (proceso por el cual se induce a la solidificación del agua en un estado amorfo, como vidrio a manera de cristales) de una muestra depende de la tasa de congelación usada y de la viscosidad del medio suspendido y los contenidos intracelulares. La adición de un bioprotector altamente viscoso como el glicerol puede estimular la vitrificación de las muestras congeladas aún a tasas de congelación relativamente bajas.

Probablemente la presencia de un buen sustrato bacteriano como el glicerol favorece el incremento de la concentración bacteriano aún a aquellas temperaturas y permite estos cambios, los cuales afectan la permeabilidad de la membrana celular, usando un desbalance celular osmótico en el tiempo de la descongelación.

Previo a la adición de los aditivos, estos pueden ser esterilizados en el medio de cultivo autoclavandolos, sin embargo el metanol debe ser filtrado – esterilizado debido a que es desnaturalizado por una exposición al calor.

2.8.2. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS BIOPROTECTORES.-

2.8.1. METANOL (CH₃OH)

Llamado también alcohol metílico o alcohol de madera, es un miembro simple de la familia de los compuestos orgánicos conocidos como alcoholes. El grupo funcional característico de esta familia es el grupo hidroxilo (OH) ligado a un átomo de carbono tetravalente, cuyos puntos de fusión y ebullición son -978 y 64.6° C respectivamente. (Noller, 1968)

El metanol es un líquido incoloro muy tóxico que provoca la ceguera e incluso la muerte si se ingiere o si se aplica externamente. A pesar de su toxicidad se emplea para desnaturalizar alcohol etílico, o utiliza como disolvente en la fabricación de barnices, pinturas y en la obtención de formaldehido y otros productos intermedios necesarios en la producción de colorantes. Se utiliza también como anticongelante, el cual es muy aplicado en la criobiología para la preservación de embriones de camarón, esperma de peces e inclusive microalgas.

2.8.2. GLUCOSA.- (C₆H₁₂O₆)

Llamado también hexrosa, es el monosacárido más abundante perteneciente al grupo de los carbohidratos a las aldohexosas, denominado también 2 – 3 – 4 – 5 – 6 pentahidroxihaxanal.

Es el azúcar más sencilla e importante que se encuentra libre en las frutas, en la miel y en la sangre, en forma de polímeros en el almidón, celulosa y otros polisacáridos.

El método más fácil de obtener glucosa es la hidrólisis de almidón y celulosa. Se forma en la hidrólisis de muchos di y polisacáridos constituidos totalmente (maltosa, celobiosa, almidón, glucógeno, celulosa) o parcialmente (sacarosa, lactosa, rafinosa) por glucosa. (Noller, 1968)

Su aplicación en la industria es muy amplia a través de compuestos formados con ácidos y sales metálicas. La aplicación de interés en la biología es su empleo junto con otras sustancias bioprotectoras para la preservación de microalgas.

2.9. ESTUDIOS SOBRE ALGAS BIOPRESERVADAS.-

Para la mayoría de las cepas algales la tasa óptima de congelación solo está entre +20 y -30° C, seguido por una inmersión a -196° C. en esta instancia

una congelación a -30°C en un baño de inmersión y Nitrógeno líquido rociado son suficientes para logra una biopreservación efectiva. Lo único que se requiere para descongelar las muestras es un baño con agua a una temperatura de 40°C .

La resistencia a la preservación por parte de algunas algas de agua dulce y marinas, se incrementa con una disminución en la temperatura de crecimiento del cultivo. Las técnicas utilizadas exitosamente con algas de agua dulce no son efectivas con las algas marinas, debido a que las interacciones de la formación de cristales de hielo y saturación de sal intervienen en la desnaturalización de la proteína y solubilización de la lipoproteína.

Algunas cepas algales, pueden ser preservadas en ausencia de aditivos bioprotectores, proveyendo una tasa de congelación optimizada. Sin embargo para la preservación de la mayoría de las cepas algales es esencial la adición del bioprotector.

Para muchas especies algales y la mayoría de los protozoarios las estrategias exitosas de preservación biológica con altas tasas de recuperación de la población necesitan ser desarrolladas. Los métodos desarrollados recientemente para la preservación de protozoarios no

parásitos, particularmente *Nalgleria* resultan en tasas insignificantes de recuperación después de la congelación.

Uno de los problemas que se presentan en la comparación de los métodos de almacenamiento, que asegure su eficiencia relativa, es la variación de estos para asegurar la viabilidad celular. (Morris *et al.* 1986)

Un ensayo fundamental de viabilidad (donde ocurre o no el recrecimiento del cultivo) debe ser considerado como una medida cruda de la supervivencia de la población. Los ensayos cuantitativos basados en la exclusión de un colorante por la exclusión de la membrana celular, o motilidad, pueden proveer estimaciones útiles de sobrevivencia pero generalmente sobreestiman el potencial de recuperación. También se han utilizado otros métodos como son: observación al microscopio de la vitalidad, enumeración de células por mililitro, producción fotosintética de oxígeno, incremento de la absorbancia y formación de colonias de agar. De todos estos métodos el de siembra en placas de agar, el cual está basado en la división celular, es el único válido para determinar la viabilidad reproductiva de la mayoría de las algas planctónicas.

Por ejemplo, algunas cepas algales han sido recuperadas con una disminución no significativa de su viabilidad 13 años después del almacenamiento inicial. Algunas cepas algales requieren de una regulación precisa de la tasa de congelación durante este proceso en orden a

maximizar la viabilidad seguida a la descongelación. Allí son necesarias las tasas de congelación controladas probado tasas lineares.

Los cultivos en fase exponencial, son en general más sensitivos al stress de congelación que los cultivos en fase estacionaria. (Morris, 1978)

Los cultivos en el inicio o a la mitad de la fase estacionaria deben ser congelados más rápidos que los cultivos que se encuentran al final de esta fase, debido a que la viabilidad puede disminuir y el estrés fisiológico puede resultar de una disminución de nutrientes.

Las tasas de congelación muy rápidas reducen la viabilidad probablemente debido a la formación del hielo intracelular. Igualmente las tasas bajas de congelación resultan en un similar disminución debido al estrés hipertónico inducido por la congelación. Se han determinado algunas tasas óptimas de congelación para un amplio grupo de especies algales, especialmente *Chlorococcales* teniendo una tasa de congelación óptima de 10 – 15° C por minuto en presencia del bioprotector. Con tales cepas un método simple de congelación está disponible usando una congelación de -30° C más un baño roceado de nitrógeno líquido.

En general los trabajos publicados muestran bajas viabilidades para las diatomeas marinas, ya que parece ser que el hecho de poseer una pared rígida es un obstáculo para sobrevivir a la congelación. Otro hecho estudiado recientemente es que el Glicerol y el DMSO en lugar de tener un efecto protector sobre las diatomeas marinas, ejerce cierta toxicidad.

No obstante a lo anterior en Filipinas se vienen concentrando y congelando microalgas desde hace algunos años con gran éxito, encontrándose que son aceptadas por la larvas de camarón sin diferencia significativa.

Cordero y Voltolina en 1997, determinaron la viabilidad de *Chaetoceros sp* al someterlas a liofilización y biopreservación con glicerol y DMSO a una temperatura de -20° C, obteniendo porcentajes muy bajos de viabilidad al cabo de un mes, y aún resultado peores a los tratados con la liofilización.

2.10. IMPORTANCIA EN ACUACULTURA DE LA ESPECIE EMPLEADA.-

. *Penaeus vannamei*.

Los camarones marinos constituyen uno de los recursos acuáticos más importantes, especialmente desde el punto de vista económico, dada la gran demanda existente en el mercado.

Cantidades significativas de camarones peneidos son comúnmente cultivadas solo en dos regiones: Asia y América latina, siendo *P. monodon* y *P. vannamei* las especies de mayor interés comercial producidas respectivamente.

El camarón blanco *P. vannamei* representa el 92 % de la producción de camarones cultivados en el hemisferio oeste. Ecuador es el líder en

producción en el hemisferio oeste (100000 tons), México ocupa el segundo lugar con 12000 tons.

El ciclo de vida de *P. vannamei* incluye varios estadios distintos encontrados en una variedad de hábitats. Los juveniles prefieren a menudo aguas salobres de estuarios y aguas costeras, mientras que los adultos se encuentran usualmente en mar abierto a salinidades y profundidades altas. Los estadios larvales habitan en aguas ricas en plancton, los cuales migran cuando se desarrollan (Rodríguez, *et al.*, 1995)

El ciclo larval en sí comprende 3 estadios morfológicamente diferenciados Nauplio (N1-N5), Protozoa (Z1-Z3) y Mysis (M1-M3). En todos sus estadios naupliares se alimentan de sus reservas vitelinas y no requieren alimentación hasta que ocurre su mayor metamorfosis, estadio de Protozoa, generalmente luego de 30 a 36 horas después de la eclosión. Con la transición de Z1 las larvas empiezan a alimentarse inmediatamente, por lo cual el alimento (fitoplancton) debe ser suministrado durante el último estadio naupliar de manera que esté disponible inmediatamente antes de la muda a estadio Z1. Durante esta fase la falta de alimento de tamaño y valor nutricional adecuado puede causar mortalidades en las larvas.

3. MATERIALES Y METODOS.-

3.1. LUGAR DE REALIZACION.-

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Fitoplancton de la Facultad Ciencias del Mar de la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí, en la ciudad de Manta, provincia de Manabí.

3.2. MATERIALES.-

- Microscopio binocular
- Autoclave
- Agitador magnético
- Balanza electrónica
- Aire acondicionado
- Lámparas de fluorescentes (40 watts)
- Blower o aireador
- Tubería de p.v.c. de 1”
- Válvulas de ¼”
- Mangueras de acuario
- Cámara de Neubauer
- Piceta (alcohol antiséptico)
- Fiolas de 250 y 500 ml
- Pipetas de 1.5 y 10 ml
- Probeta de 100 ml

- Micropipetas Pasteur
- Porta y cubre objeto
- Tubos de ensayo de 20 ml
- Gradilla
- Cajas Petri de 30 ml
- Mechero de alcohol (alcohol industrial)
- Papel aluminio
- Fundas plásticas rotuladas
- Fertilizantes formula Guillard F/2
- Material de limpieza y protección (cepillos, jabón neutro, guantes, mascarilla, mandil, etc)

REACTIVOS.-

- Bactor agar
- Acido clorhídrico 8%
- Hipoclorito de sodio 10%

3.3. METODOS.-

3.3.1. CULTIVO DE MICROALGAS.-

Las especies de microalgas utilizadas procedieron del Laboratorio de Fitoplancton del Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM), el cual posee cepas unicelulares en cultivos puros. Se utilizaron dos especies de microalgas marinas: *Navicula sp.* y *Thalassiosira pseudonona*.

Como medio de cultivo se empleó la formulación Guillard F/2 (1975), preparada con agua de mar a 35 ppm filtrada, clorinada y esterilizada.

CLORINACION DEL AGUA DE MAR.-

- Relación cloro: Thiosulfato = 1 : 1
- Para preparar la solución de Thiosulfato de sodio al 10%, se pesan 100g y se disuelven en un litro de agua destilada.

CLORINACION Y DECLORINACION DEL AGUA DE MAR.-

VOLUMEN	CLORO	THIOSULFATO
40 L	4.4 ml	4 ml
450 L	50 ml	45ml
1500 L	167 ml	150 ml

- Para clorinar, los cartuchos de los filtros de agua salada, colocarlos en 20 litros de agua dulce que contienen 2.2 ml de cloro liquido, dejarlo hasta el día siguiente en que se añade 2 ml de thiosulfato en el balde de los cartuchos del cloro, enjuagarlos bien con agua salada antes de volverlos a usar, los bolsos de aire se los cambiará cada semana y al sacarlos del agua declorinada se los deja secar antes de usar.

EDTA a los tanques masivos: Añadir solo 5 ppm

3.3.2. PREPARACION DE FERTILIZANTES FORMULA GUILLARD F/2.

- Para tubos de ensayo, fiolas de 250 y 500 ml, botellas de 3 litros

PREPARACION DE FERTILIZANTES FORMULA GUILLARD F/2			
		F/2	F/4
SOLUCION 1	NITRATO DE SODIO	75 g	37.5 g
	FOSFATO DE SODIO	5 g	2.5 g
SOLUCION 2	METASILICATO	30 g	15.0 g
SOLUCION 3	EDTA	4.36 g	2.15 g
	CLORURO FERRICO (1 ml de cada metal)	6.15 g	3.7 g
SOLUCION 4	VITAMINAS	10 ml	5 ml

- Utilización de fertilizantes químicamente puros.
- Cada solución se disuelve en 1 litro de agua destilada para ser llevada a autoclave.
- La adición de la solución 4 se realiza luego del autoclave.

CARBOYS DE 40 Y 100 LITROS		
		g/l
SOLUCION 1	NITRATO DE SODIO	150
	FOSFATO DE SODIO	10
SOLUCION 2	METASILICATO	60
SOLUCION 3	EDTA	10
	CLORURO FERRICO (2 ml de cada metal)	10
SOLUCION 4	VITAMINAS	20 ml/l

- Utilización de fertilizantes grado técnico
- Disolver cada solución en un litro de agua destilada para ser llevada al autoclave.
- Cada carboy se fertilizará con 25 ml de cada solución por ser doble la concentración. Relación 1 ml: 1 litro.
- La adición de la solución 4 se realiza luego del autoclave.

CILINDROS DE 300 Y EXTERIORES (tm)		
		g/l
SOLUCION 1	NITRATO DE SODIO	225
	FOSFATO DE SODIO	30
SOLUCION 2	METASILICATO	90
SOLUCION 3	EDTA	10
	CLORURO FERRICO (2 ml de cada metal)	15
SOLUCION 4	VITAMINAS	30 ml/l

- Utilización de fertilizantes grado técnico.
- Para fertilizar cilindros de 300 y exteriores (TM).

PREPARACION DE LOS METALES TRAZA		
	g/100 ml	
SULFATO DE COBRE PENTAHIDRATADO	$CuSO_4 \cdot 5 H_2O$	0.98
SULFATO DE ZINC HEPTAHIDRATADO	$ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$	2.3
COLORURO DE COBALTO HEXAHIDRATADO	$CoCl_2 \cdot 6 H_2O$	2.2
COLORURO DE MANGANESO TETRAHIDRATADO	$MnCl_2 \cdot 4 H_2O$	1
MOLIBDATO DE SODIO DIHIDRATADO	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	18
COLORURO DE ZINC HEXAHIDRATADO*	$ZnCl_2O_4 \cdot 6H_2O$	0.63

*ESTE METAL SE LO PUEDE USAR EN EL LUGAR DEL $Na_2 MoO_4$

PREPARACION DE VITAMINAS	
	g/L
TIAMINA (Vit B ₁)	20
CIANOCOVALAMINA (Vit B ₁₂)	0.1
BIOTINA (Vit H)	0.1

- SE DISUELVEN BIEN LAS VITAMINAS EN 1 L DE AGUA DESTILADA ESTERILIZADA Y SE REFRIGERA.

PREPARACION DE SOLUCIONES.-

A. Se toma un Beacker de volumen apropiado y se coloca sobre un agitador magnético.

B. Se agrega el Metasilicato de sodio y se disuelve bien caliente la solución.

• **Nitratos y Fosfatos.-**

A. Se toma un Becker de volumen apropiado y se coloca sobre un agitador magnético.

B. Se adiciona luego el Nitrato de sodio

C. Inmediatamente se agrega el Fosfato de sodio. Se recomienda una vez filtrar si se tiene precipitado. Se guarda la solución en refrigeración.

- **Hierro, EDTA y metales traza.-**
 - A. Similar al paso anterior, pero calentándolo a 45° C.
 - B. Se adiciona el Cloruro de hierro.
 - C. Se disuelve el EDTA en otro recipiente y se lo agrega, luego el recipiente conteniendo la solución de Hierro.
 - D. Se toma otro recipiente sobre un agitador magnético, se adiciona el EDTA, Sulfato de zinc, Cloruro de cobalto, Cloruro de manganeso y el Molibdato de sodio.
 - E. Se transfiere la solución (D) en el recipiente que contiene el Hierro y el EDTA (se recomienda autoclavar esta solución). Luego se mantiene esta solución en refrigeración.

- **Vitaminas.-**
 - A. Se toma un recipiente apropiado sobre el agitador magnético y se adicionan las vitaminas, luego se refrigera.
 - B. Una vez que se tienen esas soluciones se puede diluir para proceder a tener concentraciones de acuerdo a los requerimientos: cultivos puros, cultivos intermedios y masivos.

En el proceso de volumen de cultivo desde tubos hasta volúmenes en masivos, tendrá que estar de acuerdo con la definición de la entrega de algas para larvas y primeros estadios de organismos marinos.

El cálculo debe estar basado en máximo y mínimo de requerimiento, es decir con una densidad en los tanques de larvicultura de 50 a 100 mil células/ml.

Tener establecido el tiempo del ciclo de producción de producción inicial normalmente se estipula entre 9 y 12 días. (Paulos René, 1998).

Deben considerarse los factores de riesgos como, contaminación, así como de los tanques de bajo crecimiento. Es necesario conocer el número de divisiones por día, así como las curvas de crecimiento en cada etapa, tubos, fioles, botellones, cilindros y tanques masivos.

La planificación y la secuencia de producción de algas primarias y masivos, es esencial en los crecimientos larvarios de especies marinas, los pasos a seguir llevan una rutina controlada que en casos de emergencia ameritan modificaciones en el manejo para acortar los días de producción, la experiencia indica, que en grandes departamentos de algas, los cambios son inocuos con observación de color y calidad de cepas.

El uso de alimentos microencapsulados ayuda en mucho, no solo en casos de requerimientos de algas por falta de ellas, sino por su contenido nutricional.

La producción de cultivos estériles de microalgas a altas concentraciones (desde un millón de cel/ml) requieren de una cepa pura previamente aislada del mar, mediante procesos de atomizado, medio selectivo, presión osmótica o micropipetas. El procedimiento consiste en inocular en forma

escalonada la especie de algas seleccionada, con el fin de mantener la pureza y vigor de la cepa, partiendo de tubos de ensayos (30 ml) que contienen el medio de Guillard F/2, seguidamente se utilizan fioles de 250 o 500 ml, luego los recipientes de tres litros y finalmente bolsas plásticas de 20 o 30 litros de capacidad, con el fin de aumentar el inóculo para cultivos exteriores de masivos de microalgas. Las condiciones de trabajo en esta sección del laboratorio deberán mantenerse en absoluta asepsia, la intensidad lumínica será de 2000 – 4000 lux (40 W), y una temperatura ambiental entre 22 a 24° C. la oxigenación en los recipientes mayores a 500 ml deberá ser continua y filtrada para garantizar el crecimiento de las algas. Obteniendo de esta manera el inóculo de microalgas de la especie seleccionada, se procede al cultivo masivo con el objeto de suministrarlo a los tanques de cultivos de especies marinas, utilizando para ello el agua de mar filtrada y fertilizada con el medio Guillard F/2. Se puede decir que el cultivo masivo está listo para suministrar a los tanques de cría cuando el *Bloom* presenta una coloración cerveza (800.000 a 2'500.000 cel./ml) para el caso de las diatomeas (*Chaetoceros gracilis*, *Thalassiosira pseudonana*, *Navicula sp*), y un color verdoso (400.000 a 600.000 cel./ml) para las clorofíceas (*Tetraselmis chuii*). Para determinar la concentración de células por ml de agua durante el proceso de cultivo de las microalgas se realizan conteos diarios bajo el microscopio, empleando para ello un hematocitómetro o cámara de Neubauer.

3.3.3. PROCEDIMIENTO PARA EL CULTIVO DE MICROALGAS.

3.3.3.1. Desarrollo de cepas en medio líquido.

Para realizar las siembras en medios líquidos se requiere del chequeo de las cepas para determinar la densidad, presencia de protozoarios, bacterias, etc. y agrupaciones de células muertas. No se debe olvidar la desinfección de nuestras manos con alcohol durante procedimiento.

- Una vez escogidas las colonias, son transferidas cerca de un mechero con un asa de platino estéril a un tubo de ensayo con 10 ml de agua filtrada, autoclavada y tratada.
- Estas cepas permanecen en los tubos de ensayos por el espacio de 7 días, tiempo en el cual cambia su coloración, indicando aumento de la concentración de células.
- De estas cepas tomamos 2 ml, y la inoculamos en un tubo de ensayo a 10 ml de agua filtrada y fertilizada, manteniéndolas ahí por un espacio de 3 días, proporcionándoles movimientos repentinos para su homogeneización.
- El agua de estos tubos es inoculada en fiolas de 500 ml de agua filtrada y fertilizada y permanecen ahí por el espacio de tres días.
- El contenido de estas fiolas es inoculada en recipientes de tres litros con agua de mar filtrada y fertilizada. A partir de aquí se utiliza aireación.

- A partir de estos recipientes de tres litros se debe clorinar el agua y luego debe ser desactivada con Thiosulfato de sodio, y se inocula el alga de las fiolas de 500 ml.
- Después estos recipientes son pasados a las fundas plásticas con capacidad de 30 litros y al cabo de tres días son pasados a tanques masivos de una tonelada y las fundas son desechadas.

3.3.3.2. Preparación de materiales.

Los materiales de vidrios son lavados con jabón neutro, enjuagados con agua dulce y desinfectados con una solución de ácido clorhídrico al 10% y enjuagados nuevamente con abundante agua dulce, envueltos en papel aluminio y son colocados al autoclave. Una vez terminado el autoclave, se dejan enfriar los materiales y se deben trasladar a un lugar con total asepsia.

Los botellones, carboys y tanques se 1 tonelada, también son lavados con jabón neutro y enjuagados con agua dulce y desinfectados con una solución de ácido clorhídrico al 10% y enjuagados con abundante agua salada.

Para la limpieza de los tanques, mangueras y pisos en la sección de cultivos masivos, usamos hipoclorito de sodio al 10% en concentraciones de 10 ppm, de debe enjuagar con agua de mar luego de la aplicación de cada producto.

3.3.3.3. Preparación de agar.-

Para la preparación de agar se siguen los siguientes pasos:

- Se esteriliza en el autoclave todo el material a utilizarse (fiolas, cajas petri, asa de platino, etc) a una temperatura de 120° C durante 10 minutos y se dejan enfriar.
- El agua que se va a utilizar debe ser debidamente filtrada, autoclavada a una temperatura de 120° C durante 10 minutos.
- Se pesa 8 gr. de Bacto-agar y se disuelven en 100 ml de agua de mar trazada con ½ ml de cada solución Q.P. (químico puro) de los nutrientes como son Nitrato, Fosfato, Metasilicato (este solo para diatomeas), metales y vitaminas.
- Se coloca esta disolución en el agitador magnético proporcionándole un ligero movimiento hasta llegar a su punto de ebullición, tomando una coloración característica.
- Dentro del cuarto estéril, en una vitrina desinfectada con alcohol, ponemos la dilución en las cajas petri previamente autoclavadas y teniendo en cuenta la higiene, asepsia, luminosidad (2000 lux) y temperatura del laboratorio.
- Se deja enfriar esta solución en las cajas petri que se gelatinizan.
- Luego se toma la muestra de la cepa de algas con el asa de platino estéril y cerca de un mechero para evitar cualquier contaminación se realiza el respectivo rayado. También podemos aplicar el método

de vertido de placas, el cual consiste en agregar pequeñas gotas de la cepa y esparcirlo por toda la superficie del agar.

- Cerramos las cajas petri y las colocamos en una cámara de cepas a temperatura de laboratorio, hasta que se observe crecimiento de colonias en la superficie del medio de cultivo después de unos días.

3.3.4. CONTEO DE CELULAS DE MICROALGAS EN LA CAMARA DE NEUBAUER O HEMATOCITÓMETRO.

Es necesario llevar el control diario para determinar la concentración de las algas en cultivo y estimar el volumen a suministrar para cada tanque de cultivo de larvas. Esto se logra utilizando un hematocitómetro o cámara de Neubauer. Para esto se toma una pequeña muestra del cultivo, y se coloca una gota en la cámara de conteo del hematocitómetro. Si la especie es mótil, como *Tetraselmis*, es necesario añadir una gota de lugol en la muestra para inmovilizar el alga.

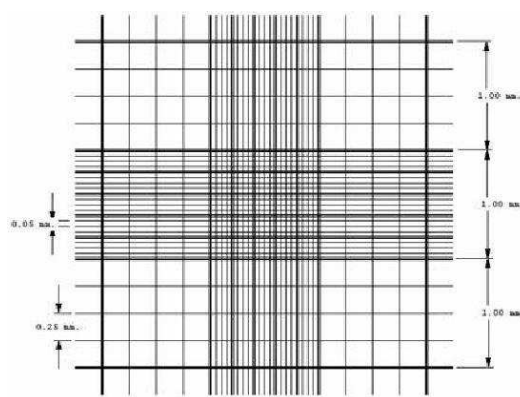


Figura 3.1.- Cámara de Neubauer o Hematocitómetro. Fuente: Google

La figura muestra el patrón de la cámara del hematocitómetro, existen varias formas de contar según sea la concentración:

Las células que se encuentran en los cuatro cuadrantes de los extremos que están enumerados y que llamaremos A, B, C y D son contadas.

El volumen del agua de cada cuadrante del hematocitómetro es de 1/10.000 en un mililitro. Asumiendo que los conteos hayan sido los siguientes:

Cuadrante A: 75

Cuadrante B: 60

Cuadrante C: 85

Cuadrante D: 69

Por lo tanto el número de células por mililitro es:

$$\frac{A+B+C+D \times 10^4}{4} = 7.2 \times 10^6 \text{ cel/ml}$$

Otra forma sería contar cuadros pequeños, en el caso de que la densidad de la célula sea mayor y las microalgas de menor tamaño. Los cuadros pequeños suman un total de 25; de los cuales se tomarán los extremos y el cuadro central que está resaltando y que llamaremos: A1, B1, C1, y E1.

Asumimos el siguiente conteo:

Cuadrado A1: 7

Cuadrado B1: 10

Cuadrado C1: 6

Cuadrado D1: 11

Cuadrado E1: 9

El número de células por mililitro sería: $A1 + B1 + C1 + D1 + E1 = 43$

$$\frac{43+25 \times 10^4}{5} = 215 \times 10^4 = 2.15 \times 10^6$$

3.3.5. METODOLOGÍA PARA ALIMENTAR CON MICROALGAS.-

Dependiendo de las observaciones al microscopio, se conocerá la cantidad de algas para alimentar las larvas. Así mismo servirá para determinar el estado de las células y si hubiera contaminación del cultivo.

Al tomar las muestras de los tanques de larvas y realizar los conteos en el hematocitómetro, sabremos la concentración de algas existentes. Lo mismo que al tomar muestras del cultivo masivo de algas. Para suministrar el alga necesaria para la alimentación, debemos saber nuestro volumen final deseado y el volumen que tomada la muestra al bajar el nivel; esto siempre y cuando se hagan recambios.

La formula a seguir sería la siguiente:

Vd = Volumen de algas deseado.

Vt = Volumen de agua en el tanque de cría.

Da = Densidad de algas en el tanque de cría. (Requerida)

Dt = Densidad de algas en el tanque de cultivo. (Masivo)

$$Vd = \frac{Vt \times Da}{Dt}$$

3.3.6 Concentración de las microalgas.-

Se utilizó la centrifugación como medio de concentración de las células.

Una vez que los cultivos habían alcanzado la fase exponencial, entre tres a cuatro días, eran pasados a través de un separador de centrífuga, a una velocidad de 8000 rpm durante 2 a 3 horas, dependiendo de la especie y concentración celular.

La concentración celular de los cultivos, previo a la centrifugación, era obtenida mediante conteos en una cámara de Neubauer. El producto final se presentaba en dos fases, una líquida y otra sólida en forma de pasta adherida a las paredes del cono de la centrífuga. Para obtener la concentración era necesario realizar diluciones sucesivas hasta obtener una dilución de 10^{-3} .

3.3.7. PRESERVACIÓN BIOLÓGICA DE MICROALGAS.-

Los volúmenes finales del concentrado fueron medidos, alcanzando generalmente 1100 y 1200 ml. Este volumen fue dividido en dos partes iguales y empacadas en bolsas plásticas autosellables para ser congeladas a una temperatura de -20° C durante los períodos de tiempo, 15 y 30 días.

A cada parte del concentrado se le agregó un bioprotector diferente: Metanol al 10 % y glucosa 2 %. Para obtener una mezcla más homogénea y poder diluir totalmente la pasta algal se utilizó un agitador magnético.

3.3.8. VIABILIDAD DE LAS MICROALGAS.-

La viabilidad de las microalgas fue evaluada inmediatamente después de la centrifugación, a los 15 y 30 días de congelación, por medio de métodos diferentes: el primero midió el crecimiento en tubos de ensayo con medio líquido y el segundo determinó el crecimiento de colonias en medio sólido: agar.

Para realizar la primera prueba se descongeló una muestra de cada bolsa plástica a temperatura ambiente hasta que desaparecieron los cristales de hielo. Se tomó una muestra del producto descongelado y se inoculó por triplicado en un tubo de ensayo con 9 ml de medio Guilard, realizando diluciones seriadas hasta llegar a obtener una dilución de 10^{-4}

El crecimiento celular fue determinado mediante conteos diarios de la hora del inóculo a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas.

El crecimiento de colonias en agar fue determinado inoculando una muestra de cada tubo en cajas petri. Las placas fueron incubadas a 28° C con luz continua durante 15 a 20 días, para observar la división celular producto de una célula viva.

4. RESULTADOS.-

Las microalgas biopreservadas, fueron utilizadas como alimento en las larvas de camarón *Penaeus vannamei* para la supervivencia en seis cultivos con una densidad de siembra de 10.000 larvas cada uno, obtenidos durante diferentes períodos de tiempo, utilizando tratamientos con metanol al 10%, glucosa al 2% y dos tratamientos controles; en el primero se realizó una combinación de 50% de microalgas biopreservadas con Methanol y 50% de microalgas frescas, en el segundo se utilizó una mezcla del 50% de microalgas biopreservadas con glucosa y el 50% de microalgas frescas, los cuales se muestran en la tabla siguiente:

% de supervivencia				
ALGAS BIOPRESERVADAS	TRATAMIENTOS			
Días	Methanol 10%	Glucosa 2%	Control 1	Control 2
15	58.48	14.47	52.37	46.23
30	17.27	1.84	55.59	42.34
90	9.04	1.76	41.96	38.45

En estos resultados de supervivencia de las larvas alimentadas con *Thalassiosira pseudonana* biopreservadas durante 15 días muestran que el tratamiento con Glucosa (2%) fue significativamente menor (14.47 %) al

del tratamiento con Methanol 58.48%, sin embargo a los 30 días se pudo apreciar que la supervivencia con el control 1 (55.59%) fue significativamente mayor que los tratamientos con Methanol y Glucosa.

A los 90 días se pudo comprobar que la supervivencia de las larvas alimentadas con microalgas biopreservadas con Glucosa (1.76%) fue relativamente baja a las del Methanol (9.04%), mientras que el tratamiento control 1 (41.96%) demostró una supervivencia superior al de los tratamientos mencionados.

Así tenemos que Brown, 1972 utilizó diatomeas *Chaetoceros gracilis* y *Thalassiosira pseudonana* criopreservadas durante 6 semanas, reportó altos porcentajes de supervivencia para las larvas de *Penaeus vannamei*, los cuales fueron comparables con el tratamiento empleado en esta investigación, pero al emplear *Chaetoceros calcitrans* la supervivencia fue muy baja e igual se obtuvo un pobre desarrollo.

Los resultados obtenidos en la presente investigación concuerdan con este autor, ya que se obtuvo una supervivencia comparable con el control al emplear la microalga marina *Thalassiosira pseudonana* biopreservada durante 15 días en la alimentación de larvas de camarón *Penaeus vannamei*.

5. CONCLUSIONES.-

- Se obtuvo una alta supervivencia en las larvas de camarón *Penaeus vannamei* durante los primeros 15 días de tratamiento con Methanol al 10% y en el control.
- La alta mortalidad obtenida con microalgas biopreservadas durante 30 y 90 días se la puede atribuir probablemente en primera instancia a la toxicidad de los biopreservantes, la cual depende del tipo, concentración y duración de exposición. De igual manera se pudo observar que las microalgas biopreservadas con Glucosa se adhieren a los apéndices de las larvas, lo cual les impide mudar y nadar correctamente siendo este factor una causa de mortalidad.
- La viabilidad de las microalgas biopreservadas se vió afectada probablemente al tiempo de biopreservación y temperatura de congelación.
- Las microalgas biopreservadas son aceptadas por las larvas de camarón *Penaeus vannamei* afectando la supervivencia a medida que se incrementa el tiempo de biopreservación, así como también su normal desarrollo por lo que no se las recomienda como un sustituto total sino parcial de las microalgas vivas y combinado con dietas artificiales.

6. RECOMENDACIONES.-

- Se recomienda que al utilizar microalgas biopreservadas, se las combine con microalgas frescas y una dieta balanceada.
- No se recomienda empezar un cultivo a partir de estas algas debido a la poca viabilidad de estas y no sería factible.
- Debido a que no existen suficientes investigaciones sobre la utilización de microalgas biopreservadas en la alimentación de organismos marinos, es necesario continuar con los estudios, así como también evaluar la técnica de biopreservación para obtener datos que sirvan para comprobar o destacar los resultados obtenidos.
- Deberían realizarse otras investigaciones empleando otras especies de microalgas utilizadas en organismos marinos, poniendo énfasis en larvas de camarón, ya que en nuestra región es una de la que más se cultiva.
- Sería necesario realizar una evaluación de la composición bioquímica de las microalgas biopreservadas a diferentes períodos de tiempo para evaluar su valor nutricional y variación de este durante la congelación.

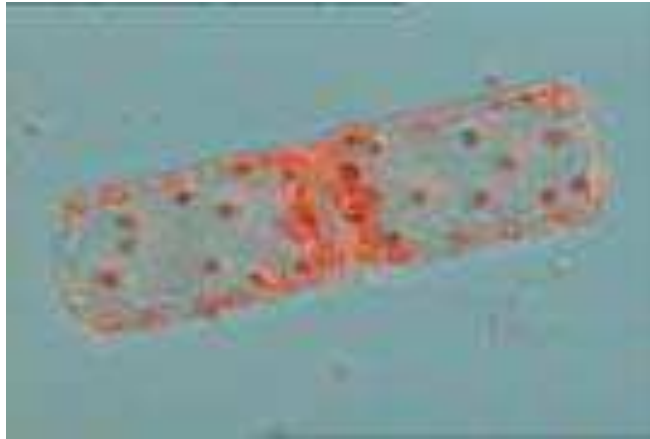
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.-

1. **BABOR, A.J, J. IBARZ, 1965.** Química general moderna. 7ma edición. Editorial Marín S.A. pp. 900-999.
2. **BRAY, W.A. AND A., LAWRENCE. 1992.** Reproduction of *Penaeus* species in captivity. Marine shrimp culture. Principles and practices. Arws fast and L. James Lester, editors. Elsevier Science.
3. **BENHRA, A., CLAUDEMIR M., RADESTKI AND FERARD J.F. 1996.** Crialgotox: Use for criopreserved algae in a simistatic microplate test. Environmental Toxicology Chemistry 5 (16): 505-508.
4. **BENT-AMOZT, A. AND A., GILBIOA, 1980.** Cryopreservation of marine unicellular algae. Asurvey of algae with regard to size, culture age, photosynthetic activity, and chlorophyll to cell ratio. Mar.ecol.prog.ser. 2: 221-278.
5. **BONADIES A., SAINZ Y QUIROS, V., 1992.** Floculación química y criopreservación de la microalga *Chaetoceros gracilis* (Bacilliarophyceae) y *Tetraselmis chuii* (Prasynophyceae). Estación de maricultura del Pacífico.
6. **BUITRIAGO E.B., 1992.** Concentración y preservación de microalgas como reserva de alimento de organismos marinos cultivables. Larvicultura de camarones peneidos. Volumen I.

producción de postlarvas, cultivo y evaluación de microorganismos como alimento.

7. **FRYXELL, G.A. 1980.** Cryopreservation of marine phytoplankton Sean Grant Final Report, Texas A&M University, College Station: 4. In Buitriago E.B., 1992. Concentración y preservación de microalgas como reserva de alimento de organismos marinos cultivables. CYTED-D.
8. **KIRSHOP, B.E. AND DOYLE, A., 1991.** Maintenance of microorganism and cultured cells. A manual of laboratory methods. Second edition. Academic press limited pp. 201-225

9. ANEXOS.-



Anexo #1.- Fotografía microscópica de la microalga marina *Thalassiosira pseudonana*.

Fuente: Autores de tesis



Anexo #2.- Fotografía microscópica de la microalga marina *Thalassiosira pseudonana*. formando colonias en tanque de cultivo.

Fuente: Autores de tesis



Anexo #3.- Fotografía de preparación de soluciones químicamente puras para el cultivo de microalgas marinas.

Fuente: Autores de tesis



Anexo #4.- Fotografía de autoclave utilizada para esterilizar los materiales y fertilizantes utilizados durante la investigación.

Fuente: Autores de tesis



Anexo #5.- Fotografía de cultivo inicial en tubos de ensayo de las microalgas marinas *Thalassiosira pseudonana* y *Navícula sp.*
Fuente: Autores de tesis



Anexo #6.- Fotografía de cultivo inicial en cajas petri de las microalgas marinas *Thalassiosira pseudonana* y *Navícula sp.*
Fuente: Autores de tesis



Anexo #7.- Fotografía de preparación de inóculos en tubos de ensayo de las microalgas marinas *Thalassiosira pseudonana* y *Navícula sp.*
Fuente: Autores de tesis



Anexo #8.- Fotografía de las microalgas marinas *Thalassiosira pseudonana* y *Navícula sp.* con los bioprotectores glucosa y metanol.
Fuente: Autores de tesis



Anexo #9.- Fotografía de microscopio utilizado para el conteo y observación de las microalgas marinas utilizadas en la investigación.

Fuente: Autores de tesis

Manta, 30 de agosto de 2013

Sr.
Luis Ayala Castro Ph.D.
DECANO DE FACULTAD CIENCIAS DEL MAR
Presente.-

De mis consideraciones:

Por medio de la presente, le informo sobre el trabajo de tesis terminado de los egresados en la carrera Biología Pesquera: Cabal Arcentales Emilio y Rendón Delgado Cinthia cuyo tema es: **"Criopreservación de las microalgas marinas; *Thalassiosira pseudonana* y *Navícula sp.*, utilizando glucosa y metanol como alternativa alimenticia de organismos cultivados."**, para que sea analizado por el H. Consejo de Facultad previo a su defensa, para que los mencionados egresados obtengan su título de Biólogos pesqueros. Adjunto dos copias de la tesis.

Sin más que informarle por el momento, me suscribo de usted.

Atentamente,



Blgo. Jaime Sánchez Moreira Mg. A.
TUTOR DE TESIS.
Archivo

