



UNIVERSIDAD LAICA “ELOY ALFARO” DE MANABÍ
FACULTAD CIENCIAS DEL MAR
ESPECIALIDAD BIOLOGIA PESQUERA

Tesis previa a la obtención del título de:
Biólogo Pesquero

TEMA:

“Rendimiento en la sobrevivencia de larvas de camarón
alimentadas con alga microscópicas conservadas con
Glucosa”

AUTORES:

Álvarez Carrillo Juan Carlos

Castro Granoble Johnny Manuel

DIRETOR DE TESIS:

Blgo. JUAN NAPA ESPAÑA

MANTA - MANABÍ - ECUADOR

2013

DERECHOS DE AUTORÍA

Nosotros, Álvarez Carrillo Juan y Castro Granoble Johnny declaramos bajo Juramento que el trabajo aquí descrito es de nuestra autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que hemos consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración cedemos nuestros derechos de propiedad intelectual correspondientes a este trabajo, a la Facultad de

“Ciencias del Mar” de la Universidad Laica” Eloy Alfaro” de Manabí

Según lo establecido por la ley de Propiedad Intelectual y su Reglamento.

ÁLVAREZ CARRILLO JUAN

CASTRO GRANOBLE JOHNNY

CERTIFICACION DEL TUTOR

Yo, Blgo., pesq. Juan Napa España, certificó haber tutelado la tesis titulada “ **Rendimiento en la sobrevivencia de larvas de camarón alimentadas con algas microscópicas conservadas con glucosa**” que ha sido desarrollada por Álvarez Carrillo Juan Carlos y Castro Granoble Johnny Manuel, previa a la obtención del título de:

Biólogo Pesquero, de acuerdo al Reglamento para la elaboración

De tesis de grado de tercer nivel de la Universidad Laica

“Eloy Alfaro” de Manabi U.L.E.A.M.

Blgo., pesq. Juan Napa España

TUTOR

APROBACION DEL TRIBUNAL

Los suscritos miembros del tribunal correspondiente, declaramos que hemos

APROBADO la tesis titulada **“Rendimiento en la sobrevivencia de larvas de camarón alimentadas con algas microscópicas conservadas con glucosa.”** que ha sido propuesta, desarrollada y sustentada por Álvarez Carrillo Juan Carlos y Castro Granoble Johnny Manuel, previa a la obtención del título de: Biólogo Pesquero, de acuerdo al REGLAMENTO PARA LA ELABORACION DE TESIS DE GRADO DE TERCER NIVEL de la facultad “CIENCIAS DEL MAR”.

Blga. Tania Maldonado Sabando, Mg. GE. Blgo., pesq Juan Napa España

DECANA FACULTAD CCMM

MIEMBRO TRIBUNAL

Blgo. Javier Cañarte Pin

MIEMBRO TRIBUNAL

Blgo. Luis Bravo Delgado

MIEMBRO TRIBUNAL

AGRADECIMIENTO

Primeramente agradezco, a el Gran yo soy , Dios porque a pesar de todo

El mal hagamos siempre nos da nuevas oportunidades para hacer las cosas correctas siempre has guiado mis pasos le agradezco infinitamente por tenerme mucha paciencia .

A mis padres, por su apoyo incondicional por inculcarme buenos valores y que gracias a ellos estoy culminando mis estudios

Agradezco a Ocean Farm S.A. por permitirnos realizar nuestro proyecto de Tesis en sus instalaciones.

A nuestro tutor de tesis Blgo., Juan Napa España por su asesoría en nuestro presente trabajo.

A el Dr. Luis Ayala Castro, por su apoyo en los años de estudiante

A la Universidad , y a la Facultad por permitirnos ingresar a sus aulas

A los profesores, que nos aportan con sus conocimientos para que sean comprendidos por los estudiantes

A las secretarias de Ciencias de Mar en especial:

A la Licenciada Margarita Franco muchas gracias

Y por ultimo a las personas que siempre me han apoyado en las buenas y en las malas.

Johnny Castro Granoble

Dedicatoria

A Dios

A mis Padres

Le dedico esta sustentación a Dios y le doy las gracias por ser tan grande en misericordia

A mis Padres: German Castro y Digna Granoble por haberme dado los estudios y hoy poderme Graduar

Johnny Castro

AGRADECIMIENTO

Le doy gracias a Dios por estar siempre en mi vida, por guiarme en mi etapa de estudiante y así mismo gracias por permitirme terminar mis estudios

A mis padres por estar siempre apoyándome en todo lo que emprenda

Y gracias a ellos estoy culminando mis estudios ,

Agradezco a Ocean Farm S.A. por prestarnos sus instalaciones para realizar nuestro proyecto de tesis

A nuestro tutor de tesis Blgo,. Juan Napa España por su asesoría en la presente tesis.

Le agradezco a la Universidad el templo del saber y a la Facultad por abrirnos las puertas

A los profesores por su dedicación y constancia

Y por últimos a mis compañeros de aula en el cual hice grandes amistades

Juan Álvarez Carrillo

DEDICATORIA

A Dios

A mis Padres

A mis hermanos

A mis profesores

Dios, gracias por darme fuerzas y permitir haber terminado

Esta etapa de mi vida.

Le dedico el presente trabajo a mis Padres por creer en mi

Y por siempre apoyarme

A mis hermanos por siempre estar a mi lado y por apoyarme en todo

A mis maestros, gracias por su tiempo, por su apoyo así como por la sabiduría
que me transmitieron en el desarrollo de mi formación

Juan Álvarez Carrillo

RESUMEN

El presente trabajo sobre criopreservación de microalgas marinas de la especie *Chaetoceros gracilis*, fue desarrollado en el laboratorio de fitoplancton de la Facultad Ciencias del Mar de la Universidad Eloy Alfaro ubicada en la ciudad de Manta Provincia de Manabi, Ecuador, y en el laboratorio de biocultivos Ocean Farm S.A ubicado en Punta blanca del Cantón Jaramijó también en la provincia de Manabi. La cepa pura de microalgas marinas fue obtenida del laboratorio de biocultivos Ocean Farm S.A. y fueron repicadas en el laboratorio de la Universidad, el método de cultivo de microalgas marinas utilizado fue Guillard F/2 y luego estas microalgas fueron criopreservadas con Glucosa al 2% utilizando el método de centrifuga y congelación.

Las microalgas marinas luego del proceso de criopreservación fueron descongeladas para evaluar su viabilidad y ser suministradas a larvas de Camarón blanco *Panaeus vannamei* como suplemento alimenticio en los primeros estadios de las larvas, es decir desde Zoea 1 hasta Mysis 3 en donde las microalgas marinas son indispensables. Se congelaron muestras de microalgas en tres diferentes periodos de tiempo 15,30 y 45 utilizando Glucosa al 2% de concentración los resultados demostraron que la Sobrevivencia de larvas de camaron que fueron alimentadas desde el estadio Zoea 1 hasta Mysis 3 con microalgas criopreservadas con Glucosa al 2% durante un periodo de quince días fueron significativamente similares (86%) al de la muestra control con algas frescas (86%) al finalizar el estadio Mysis 3. A los 30 días de criopreservación se pudo apreciar Que la sobrevivencia de las larvas fue ligeramente bajas (78%) en comparación con la Muestra control (84%) al finalizar el estadio Mysis 3

La sobrevivencia de las larvas de Alimentadas con microalgas criopreservadas durante 45 días fue significativamente baja (58%) que la muestra control (87%). Fue notoria la mortalidad de larvas de camarón al ser alimentadas con microalgas criopreservadas con Glucosa al 2% durante los 30 y 45 días esto podría haber sido ocasionado por la pequeña toxicidad que puede demostrar en cierto punto el criopreservante utilizado en la investigación posiblemente por la concentración de adición del mismo y también el tiempo a que fueron expuestas las microalgas.

Además, durante el cultivo de las larvas de camarón se realizaron observaciones bajo el microscopio de muestras de las mismas, en donde pudimos apreciar que algunas células estaban adheridas a los apéndices abdominales y posiblemente este efecto impedía que muden muchas larvas produciendo mortalidad.

ABSTRACT

The present work on cryopreservation of marine microalgae species *Chaetoceros gracilis*, was developed in the laboratory of phytoplankton of The Faculty of Marine Science of the University Eloy Alfaro located in the City of Manta, in the province of Manabi, Ecuador, and in the laboratory of biocultivos Ocean Farm S.A. located in Punta Blanca of the canton Jaramijo also in the province of Manabi. The pure strain of marine microalgae was obtained from the laboratory of biocultivos Ocean Farm S.A. pistachio transplants were ready and were in a laboratory at University, the method of cultivation marine microalgae Guillard used F/2 and then these microalgae were cryopreserved with 2% glucose using the method of centrifuge and freezing. The marine microalgae after the process of cryopreservation were thawed to evaluate its feasibility and be supplied t3. The larvae of white shrimp of the species *Penaeus vannamei* as a dietary supplement in the early stages of larvae, i.e. from Zoeal until Mysis 3 where the marine microalgae are indispensable. Samples were frozen microalgae in three different periods of time; at 15,30 y 45 days using 2% glucose concentration. The results showed that the survival of the Larvae of shrimp which were fed from the Zoea stage 1 until Mysis 3 with microalgae cryopreserved with 2% glucose over a period of fifteen days were significantly similar (86 %) than the control sample with fresh seaweed within 30 days of cryopreservation is able to appreciate that the survival of the larvae was slightly low (78 %) compared with the control sample (84 %) at the end the Mysis stage 3. The survival of the larvae of shrimp fed with microalgae cryopreserved during 45 days was significantly lower (58 %) than the control sample (87 %). There was considerable mortality of larvae of shrimp to be fed with microalgae cryopreserved with

glucose 2% for the 30 y 45 days, this could have been caused by the small toxicity than can demonstrate at a certain point criopreservante used in the research, Possibly by concentration of adding the same and also the time to which they were exposed the microalgae. In addition during the cultivation of shrimp larvae of observation were conducted under the microscope of samples of the same, in where we could appreciate that some cells were attached to the abdominal appendages and possibly prevented this effect to moult in many larvae producing mortality.

Contenido

I. MARCO METODOLÓGICO.....	1
1.1. Planteamiento del problema.....	1
1.2. OBJETIVOS.....	3
1.2.1. OBJETIVO GENERAL.....	3
1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
1.3. JUSTIFICACIÓN.....	4
1.4. HIPÓTESIS.....	4
II. MARCO CONCEPTUAL.....	5
2.1. Diferentes cepas de microalgas que pueden ser utilizadas en cultivos.....	5
2.2. Características principales de las microalgas en general (Fitoplancton).....	7
2.2.1. Breve taxonomía de las microalgas utilizadas en el estudio.....	9
2.2.2. Diatomeas (clase: <i>Bacilliarophyceae</i>).....	9
2.3. Metodología para cultivar microalgas marinas.....	14
2.3.1. Principales consideraciones para el cultivo.....	14
2.3.2. Luminosidad.....	14
2.3.3. El potencial de Hidrógeno (pH).....	15
2.3.4. Suministro de aire.....	15
2.3.5. Temperatura del cultivo de fitoplancton.....	16
2.3.6. Salinidad.....	17
2.3.7. Medios de cultivo y nutrientes.....	17
2.4. Crecimiento de las microalgas marinas (Dinámica).....	18
2.5. Tipos de cultivo de microalgas marinas.....	21
2.5.1. Cultivos abiertos y cerrados.....	22
2.5.2. Cultivos axénicos.....	22
2.5.3. Cultivos en serie.....	22
2.5.4. Cultivos continuos.....	23
2.5.5. Cultivos semi-continuos.....	24
2.6. Calidad nutrimental de las microalgas marinas.....	25
2.7. Concentración y conservación biológica de microalgas.....	26
2.8. Criopreservación biológica.....	29

2.8.1. Crioprotectores.....	30
2.8.2. Breve síntesis química del crioprotector utilizado en la investigación.	31
2.8.2.1 Glucosa. (C ₆ H ₁₂ O ₆).....	31
2.9. Revisión de estudios sobre microalgas criopreservadas.....	32
2.10. Crustáceo utilizado en el presente estudio.	36
2.10.1 Camarón blanco <i>Penaeus vannamei</i>	36
3. METODOLOGÍA Y MATERIALES EMPLEADOS.	39
3.1. Sitos o zonas del estudio.	39
3.2. Materiales y equipos empleados.	40
3.3. Métodos empleados.....	41
3.3.1. Metodología para el cultivo de microalgas marinas.....	41
3.3.2. Preparación de fertilizantes fórmula Guillard F/2.....	42
3.3.3. Procedimiento para el cultivo de microalgas.....	48
3.3.3.1. Desarrollo de cepas en medio líquido.	48
3.3.3.2. Preparación de materiales.....	50
3.3.3.3. Preparación de agar.	50
3.3.4. Conteo de células de microalgas en la cámara de Neubauer o Hematocitómetro.....	52
3.3.5. Metodología para alimentar con microalgas.	54
3.3.6 Método de centrifugado para concentrar las células microalgales.	56
3.3.7. Criopreservación de las microalgas.....	56
3.3.8. Evaluación de la viabilidad de las microalgas criopreservadas.....	56
IV. RESULTADOS OBTENIDOS.	57
V. CONCLUSIONES.	63
VI. RECOMENDACIONES.....	64
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	65
VIII. ANEXOS.....	67

INTRODUCCIÓN

En nuestro país Ecuador, se han venido desarrollando diferentes tipos de cultivos tradicionales tales como; cultivo de peces marinos y de agua dulce, además de cultivo de crustáceos y moluscos.

Estos en sus etapas larvarias se alimentan principalmente de fitoplancton y entonces se han implementado laboratorios de cultivos semi extensivos de algas marinas especialmente microscópicas, en la zona costera de nuestro país. Las zonas donde se desarrolla la actividad camaronera, especialmente en la provincia de Manabí, son en los cantones Cojimíes, Pedernales, Jama, San Vicente, entre otros cantones, se ven en la necesidad de implementar laboratorios de larvas de camarón en donde se incluye un laboratorio de fitoplancton. En la ciudad de Manta donde fue desarrollado el presente trabajo, existen empresas que se dedican al cultivo de larvas de camarón, estas podemos encontrarlas en Punta Blanca, zona ubicada en el Cantón Jaramijó cercana a la ciudad de Manta, y muchas veces se han visto en la necesidad de adquirir cepas de microalgas marinas en otros laboratorios alejados de las zonas de cultivo, es por esta razón que las técnicas de criopreservación de microalgas marinas podrían ayudar a mantener cepas que podrían ser almacenadas en congelación para su posterior utilización en la alimentación de organismos marinos, principalmente larvas de camarón

I. MARCO METODOLÓGICO.

1.1. Planteamiento del problema.

En el Ecuador desde hace varias décadas, se ha venido practicando el cultivo de organismos acuáticos principalmente de origen marino, existiendo gran interés por parte de muchas industrias y empresarios dedicados a estas actividades. Existen especies variadas que son utilizadas para el cultivo en cautiverio mencionando grandes grupos de peces e invertebrados de los que podemos destacar el camarón blanco *Penaeus vannamei* que han venido representando un gran rubro en la economía del país. Las microalgas marinas, especialmente de interés comercial, son requeridas por la mayoría de estos organismos cultivables, convirtiéndose en una gran fuente de alimento y de aporte de nutrientes.

En los actuales momentos, son muchas las especies microalgales que son utilizadas para alimentar organismos acuáticos, y se cultivan en nuestro país en laboratorios sumamente especializados, adecuados para tales fines, y que se utilizan en gran parte para alimentar larvas de camarón blanco desarrollado en cultivo mono específico.

Las especies microalgales que más se utilizan para cultivo en cautiverio son; *Thalassiosira pseudonana.*, *Skeletonema costatum*, *Chaetoceros gracilis*, *Navicula* y *Tetraselmis maculata*.

De acuerdo a su valor nutricional y facilidad de cultivo, son seleccionadas las cepas puras de las microalgas marinas. Estas son cultivadas de forma intensiva y masiva, utilizando técnicas de aislamiento y manipulación.

La disponibilidad de las microalgas puede verse limitada por varios factores tales como cultivos libres de contaminación, hasta la pérdida de cepas puras, etc., es por esta razón que la técnica de criopreservación de microalgas marinas podría ser una alternativa rápida en caso de que ocurran este tipo de problemas dentro de un laboratorio especializado. También se podrían almacenar cepas bajo congelación y ser reutilizadas en lo posterior.

1.2. OBJETIVOS.

1.2.1. OBJETIVO GENERAL.

Cultivar microalgas de la especie *Chaetóceros gracilis* utilizando el método Guillard/F2 y aplicar Glucosa 2% para criopreservarlas.

1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Aplicar el método Guillard/F2 para el cultivo de las microalgas marinas utilizadas en el trabajo de investigación.
- Utilizar Glucosa al 2% de concentración (criopreservante) para realizar la respectiva criopreservación de las microalgas del estudio.
- Monitorear la viabilidad de las microalgas criopreservadas en 15, 30 y 45 días, en larvas de camarón blanco *Penaeus vannamei* para evaluar su eficacia como alimento en los crustáceos mencionados.
- Analizar los resultados obtenidos y elaborar las respectivas conclusiones y recomendaciones.

1.3. JUSTIFICACIÓN.

Este trabajo de investigación fue realizado en dos fases; la primera en el laboratorio de plancton de la Facultad Ciencias del Mar de la Universidad Laica “Eloy Alfaro” de Manta y posteriormente en el laboratorio de larvas de camarón Ocean Farm S.A. ubicado en la zona de Punta Blanca del cantón Jaramijó, con la finalidad de experimentar con microalgas marinas de interés comercial y probar su eficacia una vez que se le apliquen crioprotectores, como una alternativa alimenticia para organismos tales como larvas de camarón.

1.4. HIPÓTESIS.

Hipótesis afirmativa: Las microalgas marinas de interés comercial del género *Chaetoceros* pueden ser criopreservadas y reutilizadas para alimentar larvas de camarón del género *Penaeus*, las mismas que pueden presentar una buena viabilidad durante su inoculación y posterior crecimiento poblacional.

Hipótesis nula: Las microalgas marinas de interés comercial del género *Chaetoceros* no soportan la criopreservación y por lo tanto no pueden ser

reutilizadas para alimentar larvas de camarón del género *Penaeus*, las mismas no pueden presentar una buena viabilidad durante su inoculación y crecimiento poblacional.

II. MARCO CONCEPTUAL.

2.1. Diferentes cepas de microalgas que pueden ser utilizadas en cultivos.

Desde más de cinco décadas (1940) el interés en producir de forma intensiva microalgas ha aumentado, y siempre se ha venido tomando en cuenta ciertos parámetros para poder seleccionar especies de estas microalgas para ser cultivadas, entre las cuales podemos mencionar; el tamaño celular, su membrana externa (pared en las células vegetales), el potencial de los cultivos, capacidad digestiva, el contenido nutricional que va a beneficiar a los organismos que las van a consumir y su composición bioquímica (Le Borgne, 1990).

El fitoplancton cultivable (microalgas marinas) es considerado una fuente indispensable de alimento para organismos marinos, tales como especies de moluscos filtradores, crustáceos en estado larval e inclusive para estadios larvarios de muchos peces cultivados en cautiverio. También son utilizadas como alimentación de otros tipos de organismos pertenecientes al zooplancton tales como crustáceos copépodos, especies de artemia y

metazoarios como los rotíferos, estos a su vez pueden ser utilizados para alimentar otras especies de crustáceos y peces en estado larvario. (Lavens, and Sorgeloos, 1996).

Han sido creadas muchas técnicas que conllevan a producir especies de microalgas de forma masiva, teniendo cultivos específicos hasta cultivos extensivos controlados, pero hay que tomar en cuenta que aplicando una producción muy controlada puede resultar muy costoso (Coutteau, 1996).

La cantidad de nutrientes en el medio de cultivo al disminuir, y parámetros físicos como la iluminación, la temperatura y el pH son descontrolados, podrían provocar un colapso en el cultivo. La estructura bioquímica de las microalgas podría verse afectada también por problemas en sus fases de crecimiento y la cantidad excesiva de células dentro del medio de cultivo, la luminosidad y variaciones de temperatura (Persoone, 1988).

Se han encontrado muchos problemas cuando se han producido microalgas marinas en grandes escalas para ser usadas en la dieta de crustáceos, moluscos bivalvos, etc., estos problemas son de origen económico y eficiencia en volúmenes altos de estas microalgas marinas (Ukeles, 1980).

2.2. Características principales de las microalgas en general

(Fitoplancton).

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 reciente 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:

Ultraplankton ($< 5 \mu\text{m}$ de diámetro; nanoplankton (5 a $70 \mu\text{m}$), microfitoplankton (70 a $100 \mu\text{m}$) y macrofitoplankton ($> 100 \mu\text{m}$), más de la mitad de todo el fitoplancton pertenecen al Ultraplankton y nanoplankton. (Kennish, 1989).

2.2.1. Breve taxonomía de las microalgas utilizadas en el estudio.

Las microalgas utilizadas en este estudio fueron las microalgas cafés o Diatomeas de la clase *Bacilliarophyceae* pertenecientes a los principales grupos encontrados en el plancton de los océanos.

2.2.2. Diatomeas (clase: *Bacilliarophyceae*).

Las diatomeas son una clase de algas unicelulares microscópicas. Conocidas también como *Bacillariophyceae*, son uno de los más comunes tipos de fitoplancton. Muchas diatomeas son unicelulares, aunque algunas de ellas pueden existir como colonias en forma de filamentos o cintas (e.g. *Fragillaria*), abanicos (e.g. *Meridion*), zigzags (e.g. *Tabellaria*) o colonias estrelladas (e.g. *Asterionella*). Las diatomeas son productores dentro de la cadena alimenticia. Una característica especial de este tipo de algas es que se hallan rodeadas por una pared celular única hecha de sílice opalino (dióxido de silicio hidratado) llamada frústula. Estas frústulas muestran una amplia variedad en su forma, pero generalmente consisten en dos partes asimétricas con una división entre ellas, se debe a esta característica el nombre del grupo. La evidencia fósil sugiere que las diatomeas se originaron durante o después del periodo jurásico temprano, aunque los

primeros restos corpóreos son del paleogeno. Las comunidades de diatomeas son una herramienta recurrentemente usada para la vigilancia de las condiciones medioambientales, pasadas y presentes, son también usadas para el estudio de la calidad del agua. Tomado de <http://es.wikipedia.org/wiki/Diatomea>

Actualmente se conocen más de 200 géneros de diatomeas, y se estima que hay alrededor de 100.000 especies extintas. Como colonizadores, las diatomeas se distinguen por encontrarse en cualquier tipo de ambiente ya sea marino, dulceacuícola, terrestre o también sobre superficies húmedas. Otras se encuentran en ambientes donde existen condiciones extremas de temperatura o salinidad y de igual forma las encontramos interactuando con otros organismos como es el caso con las cianofíceas filamentosas donde existe un epifitismo por parte de las diatomeas. La mayoría son pelágicas (viven en aguas libres), algunas son bentónicas (sobre el fondo marino), e incluso otras viven bajo condiciones de humedad atmosférica. Son especialmente importantes en los océanos, donde se calcula que proporcionan hasta un 45 % del total de la producción primaria oceánica.¹ La distribución espacial del fitoplancton marino es restringida tanto horizontal como verticalmente. Las diatomeas viven en todos los océanos desde los polos hasta los trópicos; las regiones polar y subpolar contienen relativamente pocas especies en contraste con la biota templada. Aunque

las regiones tropicales exhiben la mayor cantidad de especies, las mayores poblaciones de diatomeas se hallan entre las regiones polar y templada. A pesar de ser generalmente microscópicas, algunas especies de diatomeas pueden alcanzar los 2 milímetros de longitud. Las diatomeas son clasificadas según la distribución de sus poros y ornamentación. Si las frústulas poseen una simetría radial se las denomina diatomeas centradas, mientras que si poseen una simetría bilateral (fusiformes) se las denomina pennadas. Tomado de <http://es.wikipedia.org/wiki/Diatomea>

Las diatomeas pertenecen a un gran grupo llamado *Heterokontophyta*, incluyendo especies tanto autótrofas (e.g. *Golden algae*, un alga marina) como heterótrofas (e.g. *Oomycetes*). Los cloroplastos amarillo-marrones son típicos de los heterokontophytas, con cuatro membranas y poseyendo pigmentos tales como el carotenoide Fucoxantina. Sus individuos usualmente carecen de flagelo, pero están presentes en gametos y usualmente presentan una estructura heterokontophyta, excepto en que carecen de vellosidades (Mastigonema) característico de otros grupos. Muchas diatomeas no poseen movimiento, aunque algunas otras poseen movimiento flagelado. Debido a su relativamente pesada pared celular ellas se hunden con facilidad, las formas planctónicas en aguas abiertas por lo general dependen de la turbulencia oceánica producida por el viento en las

capas superiores para mantenerse suspendidas en las aguas superficiales iluminadas por el Sol. Algunas especies regulan activamente su flotabilidad con los lípidos intracelulares para hacer frente al hundimiento.

Las diatomeas están contenidas dentro de una única pared celular de silicato (frústula) compuesta de dos válvulas separadas. La sílice biogénica de la que la pared celular se compone es sintetizada intracelularmente por polimerización de monómeros de ácido silícico. Este material es luego secretado hacia el exterior de la célula en donde participa en la conformación de la pared celular. Las válvulas de las diatomeas se superponen una a otra como las dos mitades de una placa de Petri. Tomado de <http://es.wikipedia.org/wiki/Diatomea>

Dentro del grupo de las Diatomeas se han reconocido los órdenes *Centricae* que corresponde a las céntricas y se caracterizan principalmente por poseer valvas semi- circulares y son planctónicos predominantes, y luego tenemos las *Pennatae* o pennales que tienen las valvas de manera oblongada y por lo general son bentónicas y estas células se muestran menos alargadas (Kennish, 1989).

Poseen cloroplastos de forma muy numerosa y son pequeños, el color característico de esta microalgas es el café – dorado y además poseen pigmentos que son fotosintéticos y son; Clorofila, Beta – Caroteno

(pigmento de coloración amarilla), Fucoxantina (pigmento de coloración café) y en pequeñas cantidades los pigmentos diadinoxantina y diadoxantina (Kennish, 1989). Como toda célula mitótica, su reproducción es por bipartición vegetativa en donde se obtienen dos células pequeñas o células hijas.

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

Reino: *Protista*
Filo: *Heterokontophyta*
División: *Chrysophyta*
Clase: *Bacilliarophyceae*
Sub-orden: *Centricae*
Orden: *Biddulphiales*
Familia: *Chaetoceraceae*
Género: *Chaetoceros*
Especie: *Chaetoceros gracilis*

2.3. Metodología para cultivar microalgas marinas.

2.3.1. Principales consideraciones para el cultivo.

Los principales parámetros que se deben tomar en cuenta en un cultivo de microalgas marinas son los físicos tales como Luminosidad, pH, salinidad, turbulencia, temperatura, además la calidad y cantidad de sustancias nutritivas.

2.3.2. Luminosidad.

Todos los organismos vegetales del planeta fotosintetizan, las microalgas también lo hacen, tanto la luz solar como la artificial representan una fuente de energía la cual produce la reacción y se deben considerar el espectro, fotoperiodo e intensidad de la luz.

Sobre todo la intensidad lumínica es importante, debido que en cultivos de alta densidad de células algales, la luminosidad debe ser alta para que pueda penetrar en el cultivo y así esta luz sea repartida de manera uniforme (Kennish, 1989). La luminosidad es ideal cuando es natural, es decir la luz solar, pero también es posible suministrar luz de forma artificial utilizando lámparas fluorescentes que otorgan un efecto de irradiación efectiva.

Esta iluminación cuando es natural solo se la puede aprovechar unas doce horas en el día, pero cuando es artificial se puede suministrar de forma

constante y así el cultivo se desarrollará de mejor manera, dependiendo del cultivo se suministrará luz, es decir, por ejemplo si tenemos cultivos en tubos de ensayo o fioles de hasta 500 ml serán necesarios unos mil luxes, pero en el caso de cultivos masivos pueden ser suministrados desde 5000 hasta 8000 luxes. (Kennish, 1989)

2.3.3. El potencial de Hidrógeno (pH).

Las fluctuaciones dentro de un cultivo microalgal podrían darse entre 7.7 a 9.5 limitando la división normal de las células (Ukeles, 1971). Cuando se produce una inestabilidad del pH, esta es producida por la muerte de muchas células durante el cultivo, pero si es posible a adición de CO₂ esto puede ayudar al equilibrio del pH, pudiendo mantener el mismo por debajo de 8.8 durante el desarrollo microalgal. Esta adición de CO₂ incrementa la capacidad buffer y se puede prevenir un cambio de pH (Kennish, 1989).

2.3.4. Suministro de aire.

Se debe suministrar aire limpio y filtrado, para evitar que las células se sedimenten, ya que a diferencia de otras microalgas marinas, estas no

poseen movimientos propios. También con la aireación se expone a la luz y a los nutrientes a todas las células microalgales evitando la estratificación térmica proveyendo así intercambios gaseosos entre el aire y el cultivo. El suministro de aire beneficia al cultivo, ya que en el aire existe CO_2 y este es aprovechado en la fotosíntesis para la producción de O_2 , esta adición del CO_2 debe ir de la mano en la asimilación de nutrientes por lo contrario se podría elevar el pH en el cultivo, esto ocurre porque los iones de H se balancean con los del CO_2 . El aire suministrado podría ser enriquecido con dióxido de Carbono adicional.

2.3.5. Temperatura del cultivo de fitoplancton.

Las especies microalgales pueden tolerar temperatura entre 17 y 28° C, pero la temperatura óptima oscila entre 18.5 y 25° C pudiendo variar con la composición del cultivo y la especie utilizada. Una temperatura por debajo de los 16.5° podrían causar una disminución del crecimiento en el cultivo, y temperaturas altas como 34.5° C podrían hacer colapsar ciertas especies microalgales (Kennish, 1989). Cuando se ha suministrado correctamente la cantidad de nutrientes en el medio de cultivo, solamente la luminosidad y la temperatura podrían ser factores limitantes del mismo.

La luz que emiten las lámparas fluorescentes, podrían provocar un aumento de la temperatura en el cultivo, principalmente en volúmenes pequeños, por

eso es necesario mantenerlos en refrigeración o en un cuarto frío o con aire acondicionado (Kennish, 1989).

2.3.6. Salinidad.

Las microalgas marinas pueden tolerar cambios de salinidad en el medio de cultivo, dependiendo de las especies. Estas pueden desarrollarse a salinidades ligeramente bajas es decir, a salinidades que fluctúan entre 22 a 25 ppm, para bajar la salinidad de un medio de cultivo, el agua salada puede diluirse con agua dulce (Kennish, 1989).

2.3.7. Medios de cultivo y nutrientes.

Las microalgas cultivadas en cautiverio en muchas ocasiones pueden desarrollarse en medios de cultivo de alta densidad o altas concentraciones muy diferentes a las que son encontradas en la naturaleza, es por esta razón que es necesario obtener medios de cultivos que posean una composición parecida a la existente en el agua oceánica.

Generalmente las principales sustancias nutritivas que son requeridas por el fitoplancton son; Nitratos (Nitrógeno) y Fosfatos (Fósforo) en una relación aproximada de 5:1, pero además de estas sustancias también son requeridos

Silicatos (Silicio) que es utilizado principalmente en la formación del esqueleto externo (Tecas).

Son necesarios también metales tales como; el Hierro, Zinc, Manganeso, Cobre, Cobalto, Molibdeno (metales traza), son requeridas ciertas vitaminas como; Cianocovalamina, Tiamina y Biotina.

Para el cultivo de microalgas han sido usados dos métodos que son el Guillard/F2 y el Walne, pero por lo general en los laboratorios se ha utilizado el primero.

2.4. Crecimiento de las microalgas marinas (Dinámica).

Son reconocidas de dos a cinco fases en el crecimiento de fitoplancton respondiendo a un estado nutricional de las mismas, a continuación podemos mencionar las siguientes:

- **Inducción.**

Esta es la fase en donde las microalgas empiezan con la absorción intracelular de los nutrientes, luego empieza de forma lenta el incremento de la densidad celular, pero se puede mostrar mucho más lento de un cultivo sólido a uno líquido. Aquí ocurre una adaptación fisiológica en el metabolismo celular en donde empiezan a crecer y también ocurre la mitosis (bipartición celular) (Kennish, 1989).

- **Exponencial.**

Una vez que ha finalizado la absorción de los nutrientes en el medio de cultivo la población algal entra en una fase alargada llamada exponencial, ya que aquí la reproducción es rápida, y la densidad poblacional empieza a incrementarse en función del tiempo. Es ideal realizar el inóculo antes de que finalice esta fase que tiene una duración aproximada de 3 a 7 días.

- **Declinación del crecimiento poblacional.**

En esta fase el crecimiento y la división celular empiezan a reducirse, en donde la cantidad de nutrientes y factores físicos existentes en el medio de cultivo empieza a reducirse de forma lenta (Kennish, 1989).

- **Estacionaria.**

En esta cuarta fase, la tasa de crecimiento es balanceada con los factores limitantes, y la densidad celular se muestra constante de forma relativa, es decir, la densidad celular durante esta fase se mantiene sin cambios y podría tener una duración de varias semanas hasta que se agoten por completo los nutrientes y tampoco exista contaminación en el cultivo (Kennish, 1989).

- **Fase de muerte o declinación.**

En esta fase la calidad del agua empieza a reducirse y se han agotado los nutrientes casi en su totalidad, a tal punto que el medio de cultivo no puede mantener el crecimiento celular de las microalgas, decrece velozmente la densidad celular, y podría presentarse un colapso en el cultivo por muerte celular. Este colapso celular puede ser causado por otras razones tales como posible contaminación microbiana, la manipulación del cultivo, deficiencia en el suministro de aire, un pH desordenado, etc.



Figura 2.1.- Fases o edades del cultivo de microalgas marinas. Tomado de: Tesis de grado de Espinales Villegas. Repositorio ULEAM

El principal aseguramiento de un cultivo de microalgas es sostener estos cultivos en la fase exponencial de crecimiento. También el valor nutricional y la composición bioquímica de las algas en el cultivo, será baja cuando hayan pasado de la fase de crecimiento debido a la reducción de la digestibilidad, deficiente cantidad de nutrientes, y posiblemente una generación de metabolitos tóxicos que podrían colapsar el cultivo.

Es recomendable cosechar las microalgas cuando su edad se encuentre en la fase exponencial y utilizar las mismas como inóculo para otros cultivos. Un inóculo con microalgas de esta fase crecerá con mayor velocidad que con microalgas tomadas de otra fase (Kennish, 1989).

2.5. Tipos de cultivo de microalgas marinas.

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

2.5.1. Cultivos abiertos y cerrados.

Estos 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. Tomado de:

<http://repositorio.uleam.edu.ec/bistream/26000/1012/1/T-ULEAM-06-0009.pdf>

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 minuciosamente esterilizados para evitar la contaminación.

Tomado de: <http://repositorio.uleam.edu.ec/bistream/26000/1012/1/T-ULEAM-06-0009.pdf>

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

estadios consecutivos: tubos de ensayo, fioles de un litro, fioles de dos litros, botellones de 10 litros, carboys de 50 y 100 litros y tanques exteriores de una tonelada. Los cultivos en serie son ampliamente aplicados debido a su simplicidad y flexibilidad, permitiendo cambiar las especies y remediar defectos en el sistema rápidamente.

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 (Coutteau, 1996).

Tomado de: <http://repositorio.uileam.edu.ec/bistream/26000/1012/1/T-ULEAM-06-0009.pdf>

2.5.4. Cultivos continuos.

Estos cultivos son sistemas delicados balanceados, a menudo axénicos 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 automación; 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. Tomado de:

<http://repositorio.uleam.edu.ec/bistream/26000/1012/1/T-ULEAM-06-0009.pdf>

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). Tomado de:

<http://repositorio.uleam.edu.ec/bistream/26000/1012/1/T-ULEAM-06-0009.pdf>

2.6. Calidad nutrimental de las microalgas marinas.

El valor nutrimental de las microalgas va a depender primero; del tamaño celular, luego las condiciones del cultivo, las propiedades de digestibilidad y la producción de sustancias tóxicas, estos parámetros pueden variar aun cuando son cultivadas en condiciones estándares. Hay que considerar las proteínas como un mayor constituyente celular, también los lípidos e hidratos de carbono, la relación de porcentajes en peso seco entre las mencionadas son: 11-34 % para proteínas, 2.5-7 % para lípidos y 2-4.5 % para hidratos de carbono.

Las microalgas presentan contenidos de ácidos grasos insaturados tales como; los ácidos araquinódico, eicosapentaenoico y el decosaheptaenoico. Estos ácidos grasos son considerados dentro de una evaluación alimenticia para organismos acuáticos.

Entre las especies algales difieren sus composiciones totales, varía la composición del azúcar y puede verse afectado el valor nutricional, cabe mencionar que son fuente de riboflavina y ácido ascórbico, pero no todas las especies las poseen.

Podemos considerar a las diatomeas o algas cafés como células con alto contenido de ácido ascórbico (0.10-1.29 % de su peso seco), se puede manipular la composición bioquímica de las algas cambiando las condiciones del cultivo, pero esta condición puede variar entre especies, en

consecuencia no puede estar relacionada con el valor nutrimental. Cuando las microalgas son consideradas como una fuente de alimentación para organismos acuáticos se deben tomar en cuenta la tasa de crecimiento, valor nutricional y el tamaño de las células. Por lo general la mayoría de las especies planctónicas son disponibles para la alimentación de moluscos bivalvos. La composición nutricional de las células algales considerada para la alimentación de especies acuáticas, se ve influenciada en la presencia de ácidos grasos, lípidos y ciertos aminoácidos. También se consideran mucho la aparición de ácidos grasos HUFAS, DHA y EPA presentes en la dieta de las microalgas marinas, estos están íntimamente relacionados con la tasa de crecimiento de bivalvos en estadios larvarios y otros organismos utilizados en la acuicultura (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 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 crioprotectores como la 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). Tomado de: <http://repositorio.uleam.edu.ec/bistream/26000/1012/1/T-ULEAM-06-0009.pdf>

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.

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 o está en investigación por otros autores. Tomado de: <http://repositorio.uleam.edu.ec/bistream/26000/1012/1/T-ULEAM-06-0009.pdf>

2.8. Criopreservación biológica.

La criopreservación biológica es el proceso en el cual células o tejidos son congelados a muy bajas temperaturas, generalmente entre -80°C y -196°C (el punto de ebullición del nitrógeno líquido) para disminuir las funciones vitales de una célula o un organismo y poderlo mantener en condiciones de *vida suspendida* por mucho tiempo. A esas temperaturas, cualquier actividad biológica, incluidas las reacciones bioquímicas que producirían la muerte de una célula, quedan efectivamente detenidas. Tomado de: <http://es.wikipedia.org/wiki/Criopreservaci%C3%B3n>

Normalmente para preservar una muestra biológica durante en mayor tiempo posible sin que pierda su calidad se utiliza nitrógeno líquido. De esta manera sumergiendo la muestra en nitrógeno líquido se alcanzan temperaturas entre -80 y $-195,79^{\circ}\text{C}$ (la temperatura de ebullición del nitrógeno líquido). La utilización de helio líquido permite alcanzar temperaturas incluso menores de hasta $-268,93^{\circ}\text{C}$ (temperatura de ebullición del helio), aunque este es mucho más caro. A estas temperaturas cualquier actividad biológica, incluidas las reacciones bioquímicas que producen la muerte de los organismos, quedan totalmente detenidos por congelación. Las muestras criopreservadas en nitrógeno líquido sólo estarán afectadas por las radiaciones que puedan incidir sobre ellas puesto

que la congelación impide todo movimiento molecular en la muestra.

Tomado de: <http://es.wikipedia.org/wiki/Criopreservaci%C3%B3n>

2.8.1. Crioprotectores.

Son sustancias que pueden permitir la sobrevivencia de microalgas marinas al ser sometidas al proceso de criopreservación, en donde se evita la formación de cristales de hielo en la membrana celular (pared celular para vegetales). Esa función posible debido a que los crioprotectores presentan estos mecanismos: básicamente van disminuyendo la fusión del agua de forma total a temperatura de congelación, solamente una pequeña fracción de agua contenida en la célula podría congelarse, además se inhibe la formación de cristales de hielo, también podría incrementarse la viscosidad del medio en que se encuentre la célula algal.

Actualmente se han utilizado metanol, sacarosa, y glucosa como crioprotectores.

La acción coligativa de un agente crioprotector se redacta en la prevención de la difusión de las moléculas del agua, formación de hielo que podrían desnaturalizar las fracciones bioquímicas dentro de las células algales. También estas sustancias previenen grandes concentraciones de electrolitos mientras ocurre la congelación (Kennish, 1989).

2.8.2. Breve síntesis química del crioprotector utilizado en la investigación.

2.8.2.1 Glucosa. (C₆H₁₂O₆)

La glucosa es un monosacárido con fórmula molecular C₆H₁₂O₆. Es una hexosa, es decir, contiene 6 átomos de carbono, y es una aldosa, esto es, el grupo carbonilo está en el extremo de la molécula (es un grupo aldehído). Es una forma de azúcar que se encuentra libre en las frutas y en la miel. Su rendimiento energético es de 3,75 kilocalorías por cada gramo en condiciones estándar. Es un isómero de la fructosa, con diferente posición relativa de los grupos -OH y =O.

La aldohexosa glucosa posee dos enantiómeros, si bien la D-glucosa es predominante en la naturaleza. En terminología de la industria alimentaria suele denominarse dextrosa (término procedente de «glucosa dextrorrotatoria») a este compuesto. **Tomado de:**

<http://es.wikipedia.org/wiki/Glucosa>

La glucosa, libre o combinada, es el compuesto orgánico más abundante de la naturaleza. Es la fuente primaria de síntesis de energía de las células, mediante su oxidación catabólica, y es el componente principal de polímeros de importancia estructural como la celulosa y de polímeros de almacenamiento energético como el almidón y el glucógeno.

A partir de su estructura lineal, la D-glucosa sufre una ciclación hacia su forma hemiacetálica para dar sus formas furano y pirano (D-glucofuranosa y F-glucopiranososa) que a su vez presentan anómeros alfa y beta. Estos anómeros no presentan diferencias de composición estructural, pero si diferentes características físicas y químicas.

La glucosa es uno de los tres monosacáridos dietéticos, junto con fructosa y galactosa, que se absorben directamente al torrente sanguíneo durante la digestión. Las células lo utilizan como fuente primaria de energía y es un intermediario metabólico. La glucosa es uno de los principales productos de la fotosíntesis y combustible para la respiración celular.

Todas las frutas naturales tienen cierta cantidad de glucosa (a menudo con fructosa), que puede extraerse y concentrarse para preparar un azúcar alternativo. Sin embargo, a escala industrial tanto el jarabe de glucosa (disolución de glucosa) como la dextrosa (glucosa en polvo) se obtienen a partir de la hidrólisis enzimática de almidón de cereales (generalmente trigo o maíz). Tomado de: <http://es.wikipedia.org/wiki/Glucosa>

2.9. Revisión de estudios sobre microalgas criopreservadas.

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 lograr una buena criopreservación. 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.

Tomado de: <http://repositorio.uleam.edu.ec/bistream/26000/1012/1/T-ULEAM-06-0009.pdf>

2.10. Crustáceo utilizado en el presente estudio.

2.10.1 Camarón blanco *Penaeus vannamei*.

El camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) es una especie de crustáceo decápodo de la familia Penaeidae, nativo del oriente del Océano Pacífico, desde el estado de Sonora, México, hasta el noroeste del Perú. Es una especie característica de las aguas con fondos lodosos (o arenas con lodo) entre 5 y 72 m de profundidad. Los adultos se encuentran en ambientes netamente marinos, mientras que la cría y levante se desarrollan en los estuarios y lagunas salobres. Es una especie propia de aguas con temperaturas medias anuales de unos 20 °C. Alcanza una longitud máxima de 230 mm, con caparazón de 90 mm. Presenta un color blanquecino a amarillento con la parte dorsal del caparazón un poco más oscura. Rostro

con ocho o nueve dientes superiores y uno o dos inferiores, anteriores al diente epigástrico. En 1973, fue introducida en Florida para la acuicultura, con ejemplares capturados en Panamá. Los cultivos de *L. vannamei* se extendieron luego en el sudeste de Asia y en Latinoamérica , donde los picos de producción se han registrados durante los años cálidos de El Niño y las caídas de producción durante los años fríos de La Niña o como resultado de la presencia de enfermedades. En los cultivos se ha detectado la presencia de agentes patógenos tales como los virus *Baculovirus penaei*, de la baculovirosis tetraédrica; el virus de la mancha blanca (*Nimaviridae*); el virus de la necrosis infecciosa hipodermal y hematopoyética (*Novirhabdovirus*); el virus de la vacuolización del órgano linfoide y el *Aparavirus* del síndrome de Taura. Tomado de: http://es.wikipedia.org/wiki/Litopenaeus_vannamei

Varios estadios son incluidos dentro del ciclo de vida de este crustáceo, y han sido encontrados en una variedad de hábitats, cuando llegan a la etapa juvenil son preferidas por estos organismos aguas costeras principalmente en estuarios o sistemas eurihalinos (variación de salinidades), pero en etapa adulta se dirigen hacia aguas más profundas y abiertas en el océano en donde la salinidad se mantiene constante. En estadios larvales el camarón blanco habita en la zona planctónica del océano, formando parte de él

(Rodriguez, *et al.*, 1995).

El ciclo larvario del camarón blanco está comprendido básicamente en tres estadios que ocurren por metamorfosis estos son; Nauplii que comprende cinco sub estadios, Zoea que comprende tres subestadios, y Mysis con tres subestadios también. El camarón durante sus estadios naupliares se alimenta de las reservas vitelinas contenidas en el saco vitelino, una vez que se han acabado estas reservas empieza la metamorfosis para pasar al siguiente estadio de Zoea (Z1) en donde debe existir alimento en el tanque de cultivo, compuesto principalmente por microalgas marinas que deben ser suministradas antes del último estadio naupliar (N5), la importancia de esta fase es que no haya falta de alimento, y que su tamaño y valores nutricionales sean adecuados para no causar mortalidades en las larvas de camarón, después de la última fase de Zoea (Z3) vienen las tres siguientes fases de Mysis en donde el alimento puede mezclarse entre microalgas y balanceado. Estos cambios implican la muda del exoesqueleto que se genera al iniciar un subestadio y tienen una duración aproximada de diez a once días.

3. METODOLOGÍA Y MATERIALES EMPLEADOS.

3.1. Sitos o zonas del estudio.

Esta investigación tuvo lugar en dos sitios; el primero fue en el laboratorio de Fitoplancton de la Facultad Ciencias del Mar de la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí, en la ciudad de Manta, en donde se realizó el inóculo de cepas puras de las microalgas utilizadas y en donde se aplicó la criopreservación; el segundo sitio fue en el laboratorio Oceanfarm S.A. ubicado en el la zona de Punta Blanca del cantón Jaramijó, en la provincia de Manabí, en donde se realizaron los ensayos en larvas de camarón blanco del género *Penaeus*, así pudimos completar los objetivos propuestos en nuestra investigación.



Figura # 3.1.- Mapa del sitio de estudio, Laboratorio bioacuático Oceanfarm S.A. ubicado en Punta Blanca del cantón Jaramijó, provincia de Manabí. Fuente: Consejo provincial de Manabí.

3.2. Materiales y equipos empleados.

- Lámparas de fluorescentes (40 watts)
- Aire acondicionado
- Distribuidor de aire filtrado (Blower)
- Dos microscopios binoculares
- Un agitador magnético
- Un esterilizador o autoclave
- Una balanza gramera electrónica
- Tubos de polivinil y mangueras de aireación
- Hematocitómetro
- Picetas para desinfección de manos
- Fiolas de 500 ml
- Pipetas de 1 y 5 ml
- Probeta de 200 ml
- Pipetas Pasteur
- Porta y cubre objeto
- Tubos de ensayo de 30 ml
- Gradilla para tubos de ensayo
- Cajas Petri de 20 ml

- Papel aluminio
- Fundas plásticas de alta densidad y grado alimenticio
- Fertilizantes utilizando el método Guillard F/2
- Material de limpieza y protección (cepillos, jabón neutro, guantes, mascarilla, mandil, etc)
- Mechero de alcohol

Reactivos.-

- Bactor agar
- Ácido clorhídrico 8 %
- Hipoclorito de sodio 8 %

3.3. Métodos empleados.

3.3.1. Metodología para el cultivo de microalgas marinas.

Las cepas utilizadas en la presente investigación procedieron del laboratorio de cultivos bioacuáticos Oceanfarm S.A. las células microalgales utilizadas fueron de la especie *Chaetoceros gracilis*, o microalgas marinas de color café (Diatomeas). Como método de cultivo se utilizó el medio Guillard F/2 (1975), utilizando agua marina con una salinidad de 34 ppm totalmente tratada.

Preparación 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.

Clorinación y declorinación del agua de mar.

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

Tomado de: <http://repositorio.uleam.edu.ec/bistream/26000/1012/1/T-ULEAM-06-0009.pdf>

3.3.2. Preparación de fertilizantes fórmula Guillard F/2

- Para tubo de ensayo, fiolas de 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	6.15 g	3.7 g
	(1 ml de cada metal)		
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. Tomado de:

<http://repositorio.uleam.edu.ec/bistream/26000/1012/1/T-ULEAM-06-0009.pdf>

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
	COLORURO FERRICO	10
	(2 ml de cada metal)	
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. Tomado de:

<http://repositorio.uleam.edu.ec/bistream/26000/1012/1/T-ULEAM-06-0009.pdf>

CILINDROS DE 300 Y EXTERIORES (tm)		
		g/l
	NITRATO DE SODIO	225
SOLUCION 1	FOSFATO DE SODIO	30
SOLUCION 2	METASILICATO	90
	EDTA	10
SOLUCION 3	CLORURO FERRICO	15
	(2 ml de cada metal)	
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	$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0.98
SULFATO DE ZINC HEPTAHIDRATADO	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	2.3
CLORURO DE COBALTO HEXAHIDRATADO	$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	2.2
CLORURO DE MANGANESO TETRAHIDRATADO	$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	1
MOLIBDATO DE SODIO DIHIDRATADO	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	18
CLORURO DE ZINC HEXAHIDRATADO*	$\text{ZnCl}_2 \cdot \text{O}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0.63

*Este metal se lo puede usar en el lugar del $\text{Na}_2 \text{MoO}_4$

PREPARACION DE VITAMINAS

	<u>g/lts</u>
TIAMINA (<u>Vit B₁</u>)	20
CIANOCOVALAMINA (<u>Vit B₁₂</u>)	0.1
BIOTINA (<u>Vit H</u>)	0.1

- Se disuelven bien las vitaminas en 1 lt de agua destilada esterilizada y se refrigera.

Preparación de soluciones.

- Se toma un Beacker de volumen apropiado y se coloca sobre un agitador magnético.
- Se agrega el Metasilicato de sodio y se disuelve bien caliente la solución.
- **Nitratos y Fosfatos.**
- Se toma un Becker de volumen apropiado y se coloca sobre un agitador magnético.
- Se adiciona luego el Nitrato de sodio

- 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.**
- Similar al paso anterior, pero calentándolo a 45° C.
- Se adiciona el Cloruro de hierro.
- Se disuelve el EDTA en otro recipiente y se lo agrega, luego el recipiente conteniendo la solución de Hierro.
- 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.
- 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.**
- Se toma un recipiente apropiado sobre el agitador magnético y se adicionan las vitaminas, luego se refrigera.

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. Tomado de: <http://repositorio.uleam.edu.ec/bistream/26000/1012/1/T-ULEAM-06-0009.pdf>

Los factores de riesgo deberán ser considerados tales como; la contaminación, además es indispensable conocer el número de divisiones por día de las microalgas, curvas de crecimiento para cada fase en los medios de cultivo tales como tubos de ensayo hasta tanques masivos.

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 fiolas 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. 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. Tomado de: <http://repositorio.uleam.edu.ec/bistream/26000/1012/1/T-ULEAM-06-0009.pdf>

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 30 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. Tomado de:
<http://repositorio.uleam.edu.ec/bistream/26000/1012/1/T-ULEAM-06-0009.pdf>

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 8 % 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 8% 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 8 % en concentraciones de 10 ppm, de debe enjuagar con agua de mar luego de la aplicación de cada producto. Tomado de: <http://repositorio.uleam.edu.ec/bistream/26000/1012/1/T-ULEAM-06-0009.pdf>

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. Tomado de: <http://repositorio.uileam.edu.ec/bistream/26000/1012/1/T-ULEAM-06-0009.pdf>

3.3.4. Conteo de células de microalgas en la cámara de Neubauer o Hematocitómetro.

Se debe llevar un estricto control de forma diaria en el conteo de células microalgales, para así conocer el tipo de concentración existente en el medio de cultivo. Con esto, se puede estimar el volumen de microalgas a suministrarse en un cultivo de larvas de camarón. Este conteo de células se lo realiza utilizando una cámara de Neubauer o Hematocitómetro, en donde es colocada una muestra de cultivo algal, por lo general una gota, y se lleva a observación microscópica para realizar el respectivo cálculo. Como la especie algal utilizada en el presente estudio era inmóvil, no era necesario añadir lugol para inmovilizarla como en el caso de especies motiles como *Tetraselmis chuii*.

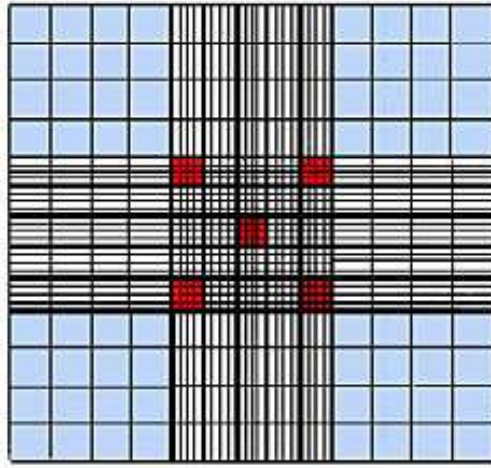


Figura # 3.2.- Cámara de Neubauer o Hematocitómetro para conteo celular de microalgas marinas.

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 y que los 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: $A1 + B1 + C1 + D1 + E1 = 43$

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

Tomado de: <http://repositorio.uleam.edu.ec/bistream/26000/1012/1/T-ULEAM-06-0009.pdf>

3.3.5. Metodología para alimentar con microalgas.

La cantidad de algas debe conocerse primero bajo numerosas observaciones al microscopio para poder conocer la densidad en el cultivo

y poder alimentar larvas de camarón, esto sirve también para determinar el estado de las algas y la existencia de contaminación.

Una vez que las algas se encuentren en el tanque de cultivo de larvas se pueden tomar muestras de agua para poder realizar los conteos en la cámara de Neubauer y así conocer el número de células algales por mililitro. El mismo procedimiento se debe aplicar para el conteo en tanques masivos de algas. Para poder suministrar las microalgas necesarias para alimentar las larvas de camarón u otro organismo acuático debemos conocer el volumen final que se desea y el volumen final luego de hacer recambios de agua en el tanque de larvas.

La fórmula a seguir sería la siguiente:

V_d = Volumen de algas deseado.

V_t = Volumen de agua en el tanque de cría.

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

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

$$V_d = \frac{V_t \times D_a}{D_t}$$

Tomado de: <http://repositorio.uleam.edu.ec/bistream/26000/1012/1/T-ULEAM-06-0009.pdf>

3.3.6 Método de centrifugado para concentrar las células microalgales.

La técnica de la centrifugación fue utilizada para concentrar las células algales cuando el cultivo se encontraba en su fase exponencial es decir de tres a cinco días, se utilizó una centrífuga en donde se utilizó una velocidad de 7000 rpm por dos horas. Luego fueron separados el líquido sobrenadante y el concentrado de microalgas marinas depositado en el fondo del tubo de ensayo.

3.3.7. Criopreservación de las microalgas.

Luego del centrifugado las concentraciones de las microalgas (pastas de algas) se obtuvieron volúmenes entre 900 a 1200 ml, estos volúmenes fueron divididos en tres partes y fueron empacadas en fundas sellables de plástico a las cuales se les añadió Glucosa al 2 % y se procedió a la respectiva congelación para iniciar su criopreservación bajo cero grados de temperatura durante 15, 30 y 45 días respectivamente.

3.3.8. Evaluación de la viabilidad de las microalgas criopreservadas.

La viabilidad de las microalgas fue evaluada a los 15, 30 y 45 días de congelación a través del cultivo en tubos de ensayo en donde fue medida la división celular en el medio líquido con nutrientes respectivos. Para poder realizar la pruebas fue necesario descongelar una pequeña muestra de 60 gr

en cada funda hasta que desaparecieran los cristales de hielo, y utilizando un pipeta de 1 ml fueron inoculadas en tubos de ensayo con medio de cultivo Guillard/F2 donde se desarrollaron sin problemas las células microalgales. El crecimiento de las microalgas fue medido a través de conteos diarios en la cámara de Neubauer.

IV. RESULTADOS OBTENIDOS.

Las microalgas criopreservadas, fueron utilizadas como alimento en larvas de camarón *Penaeus vannamei* para evaluar su sobrevivencia en el cultivo, obtenidos durante diferentes períodos de tiempo utilizando el tratamiento con Glucosa al 2% y un tratamiento control a la vez en donde se realizó una combinación de 50% de microalgas criopreservadas con Glucosa al 2% y 50% de microalgas sin crioprotector, los cuales se pueden apreciar en la siguiente tabla y gráficos estadísticos:

% de sobrevivencia de larvas de camarón <i>Penaeus vannamei</i>		
ALGAS CRIOPRESERVADAS	TRATAMIENTOS	
Días	Glucosa 2%	Control
15	86.45	86.12
30	78.24	84.45
45	59.37	87.28

Tabla # 4.1.- Resumen general de porcentajes de sobrevivencia en larvas de camarón *Penaeus vannamei* alimentadas con microalgas criopreservadas con Glucosa al 2% después de seis días de cultivo.

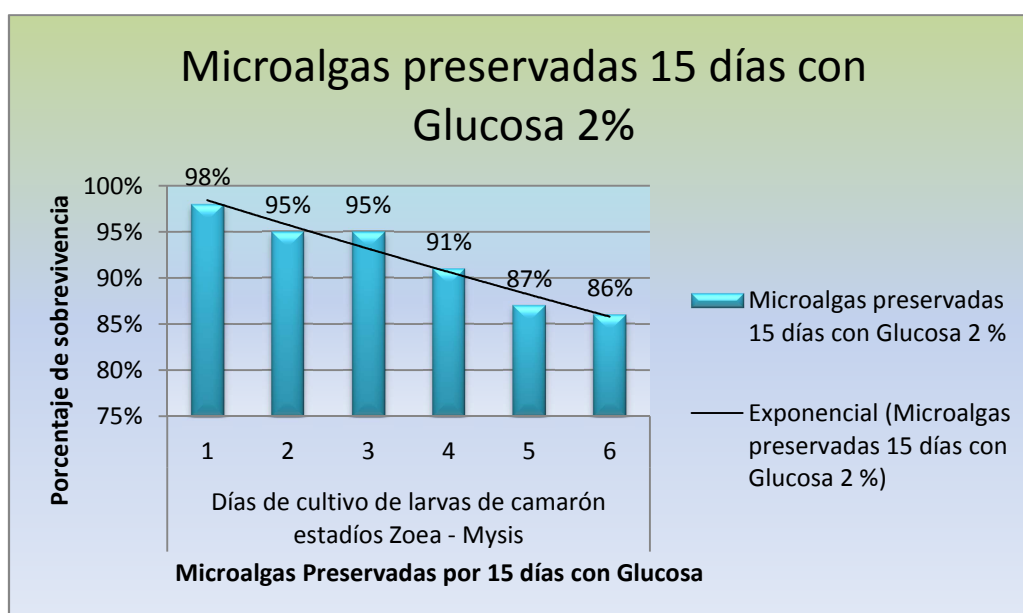


Figura # 4.3.- Gráfico que muestra los porcentajes de sobrevivencia de larvas de camarón *Penaeus vannamei* alimentadas con microalgas criopreservadas por 15 días con Glucosa al 2% de concentración. Los estadios evaluados fueron desde Zoea 1, 2, 3 hasta Mysis 1, 2, 3. Fuente: Autores de tesis.

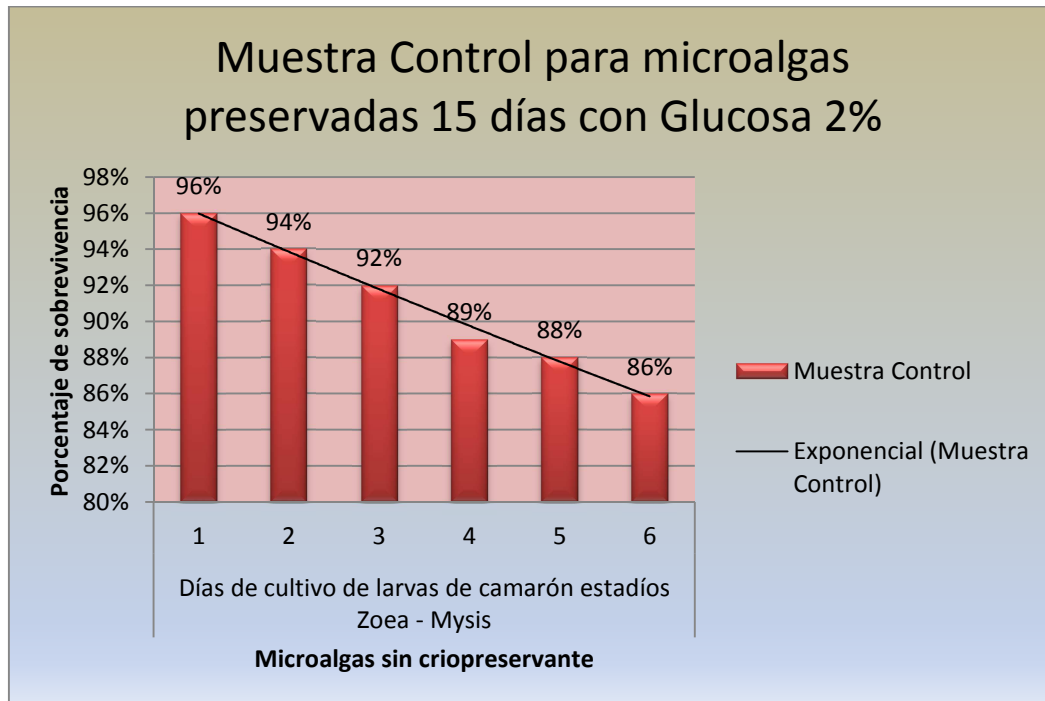


Figura # 4.4.- Gráfico que muestra los porcentajes de sobrevivencia de larvas de camarón *Penaeus vannamei* alimentadas con microalgas de la muestra control para microalgas criopreservadas por 15 días con Glucosa al 2% de concentración. Los estadíos evaluados fueron desde Zoea 1, 2, 3 hasta Mysis 1, 2, 3. Fuente: Autores de tesis.

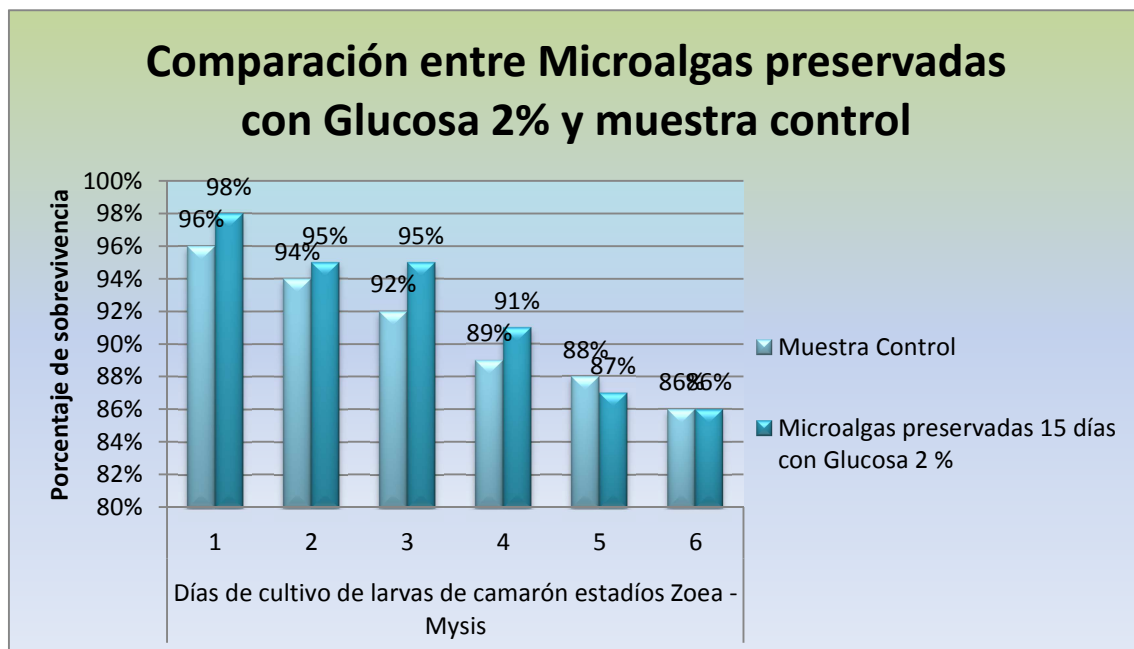


Figura # 4.5.- Gráfico que muestra la comparación entre los porcentajes de sobrevivencia de larvas de camarón *Penaeus vannamei* alimentadas con microalgas criopreservadas por 15 días con Glucosa al 2% de concentración microalgas y su respectiva muestra control. Los estadíos evaluados fueron desde Zoea 1, 2, 3 hasta Mysis 1, 2, 3. Fuente: Autores de tesis.

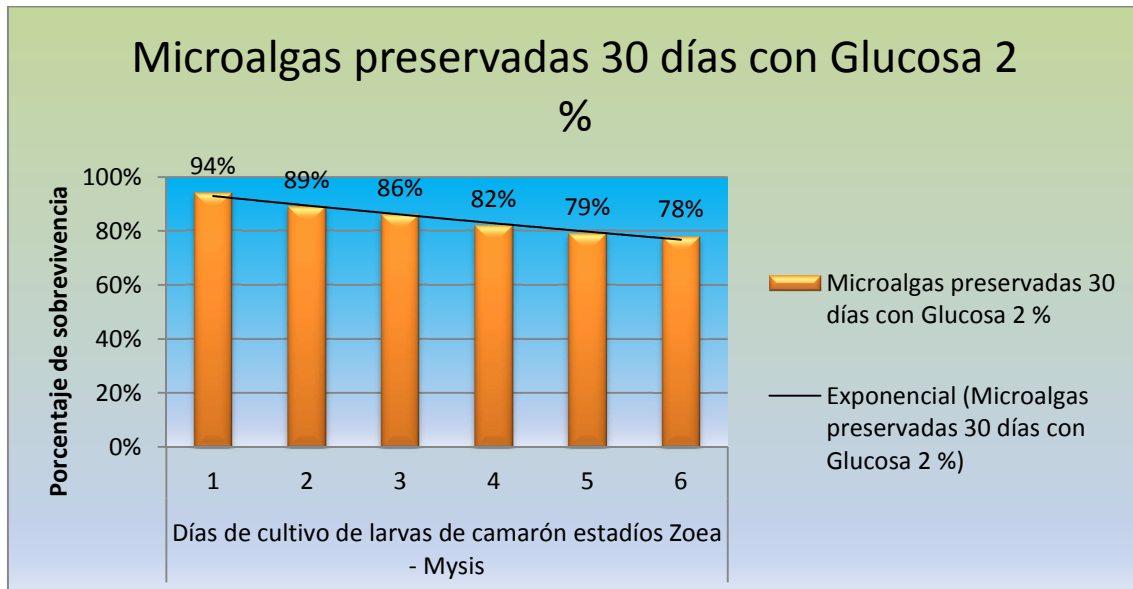


Figura # 4.6.- Gráfico que muestra los porcentajes de sobrevivencia de larvas de camarón *Penaeus vannamei* alimentadas con microalgas criopreservadas por 30 días con Glucosa al 2% de concentración. Los estadios evaluados fueron desde Zoea 1, 2, 3 hasta Mysis 1, 2, 3. Fuente: Autores de tesis.

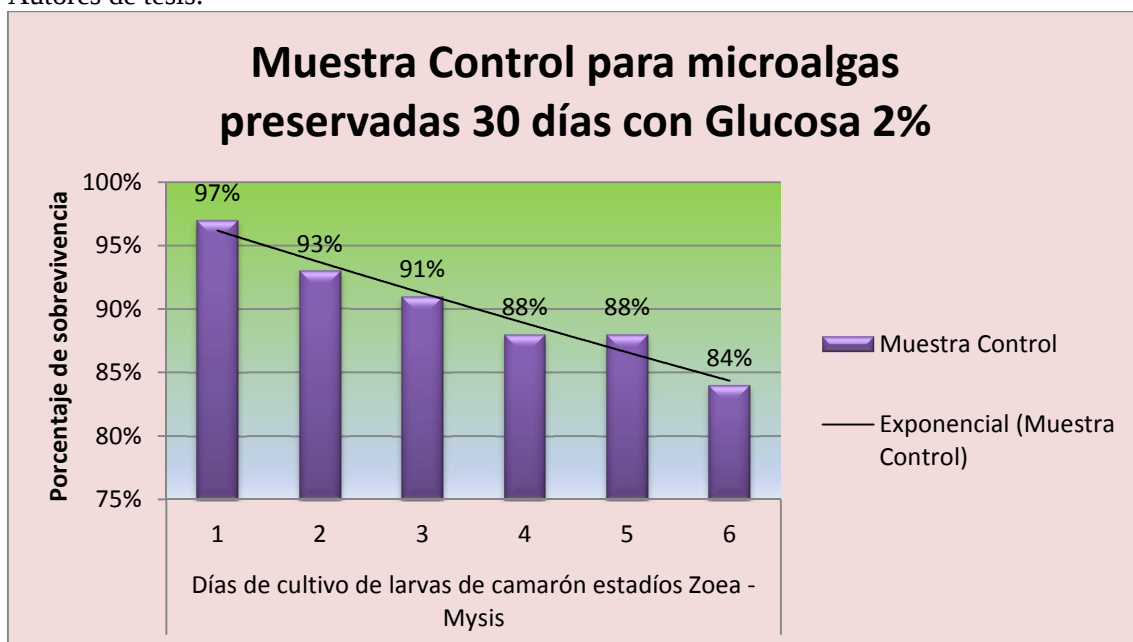


Figura # 4.7.- Gráfico que muestra los porcentajes de sobrevivencia de larvas de camarón *Penaeus vannamei* alimentadas con microalgas de la muestra control para microalgas criopreservadas por 30 días con Glucosa al 2% de concentración. Los estadios evaluados fueron desde Zoea 1, 2, 3 hasta Mysis 1, 2, 3. Fuente: Autores de tesis.

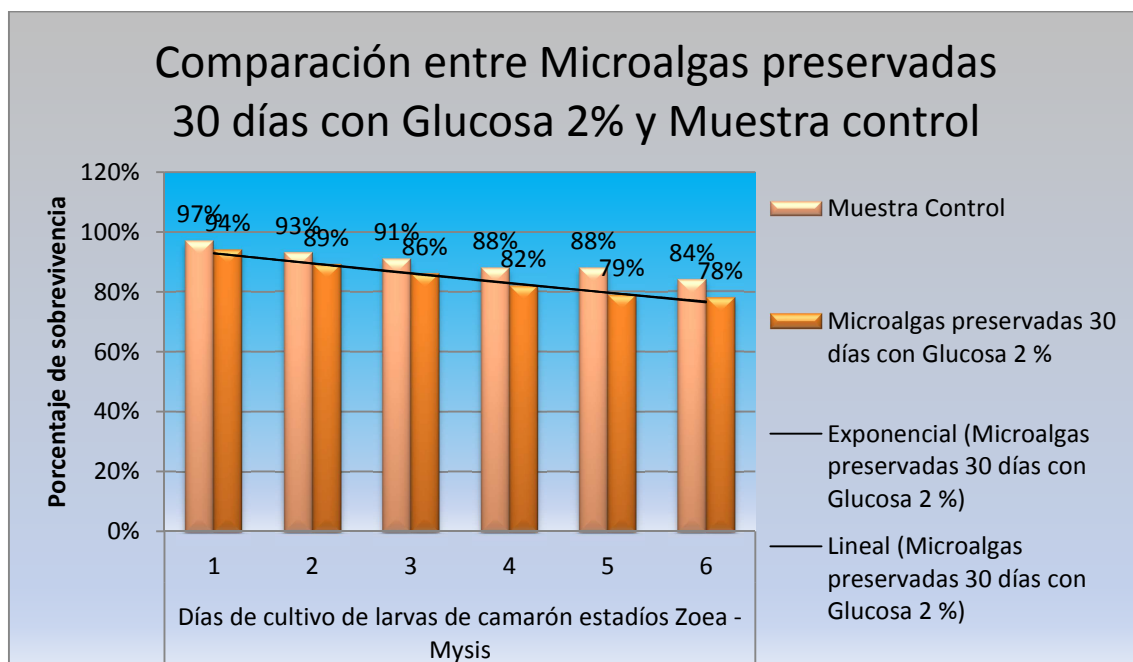


Figura # 4.8.- Gráfico que muestra la comparación entre los porcentajes de sobrevivencia de larvas de camarón *Penaeus vannamei* alimentadas con microalgas criopreservadas por 30 días con Glucosa al 2% de concentración microalgas y su respectiva muestra control. Los estadíos evaluados fueron desde Zoea 1, 2, 3 hasta Mysis 1, 2, 3. Fuente: Autores de tesis.

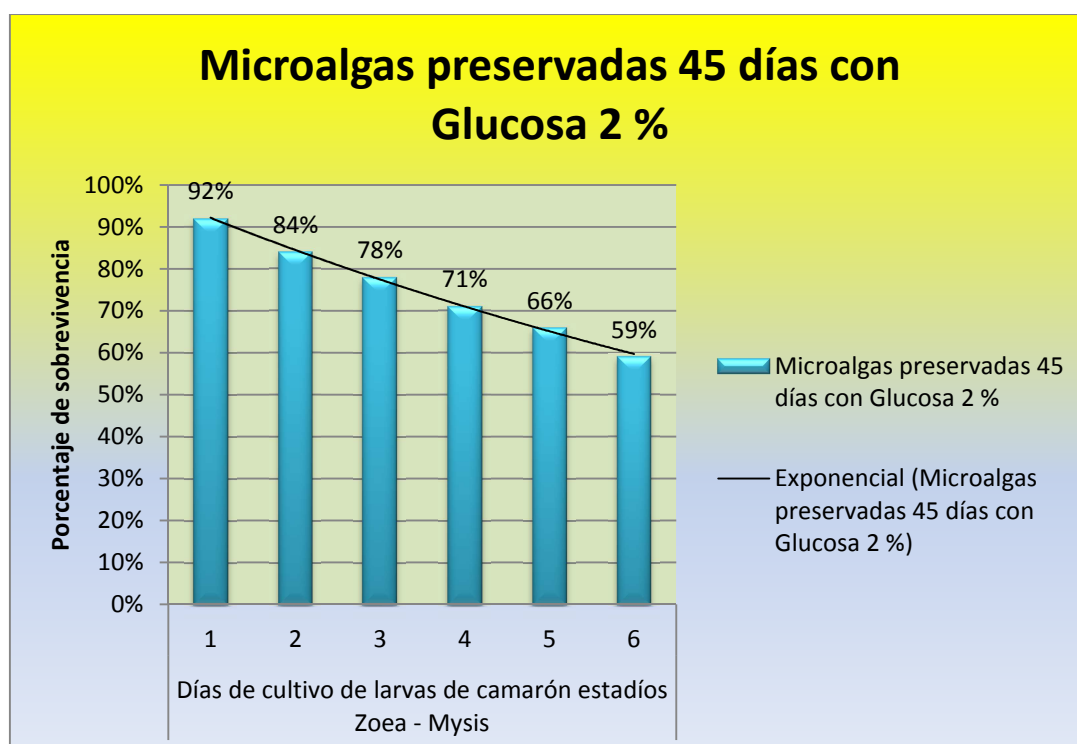


Figura # 4.9.- Gráfico que muestra los porcentajes de sobrevivencia de larvas de camarón *Penaeus vannamei* alimentadas con microalgas criopreservadas por 45 días con Glucosa al 2%

de concentración. Los estadios evaluados fueron desde Zoea 1, 2, 3 hasta Mysis 1, 2, 3. Fuente: Autores de tesis.

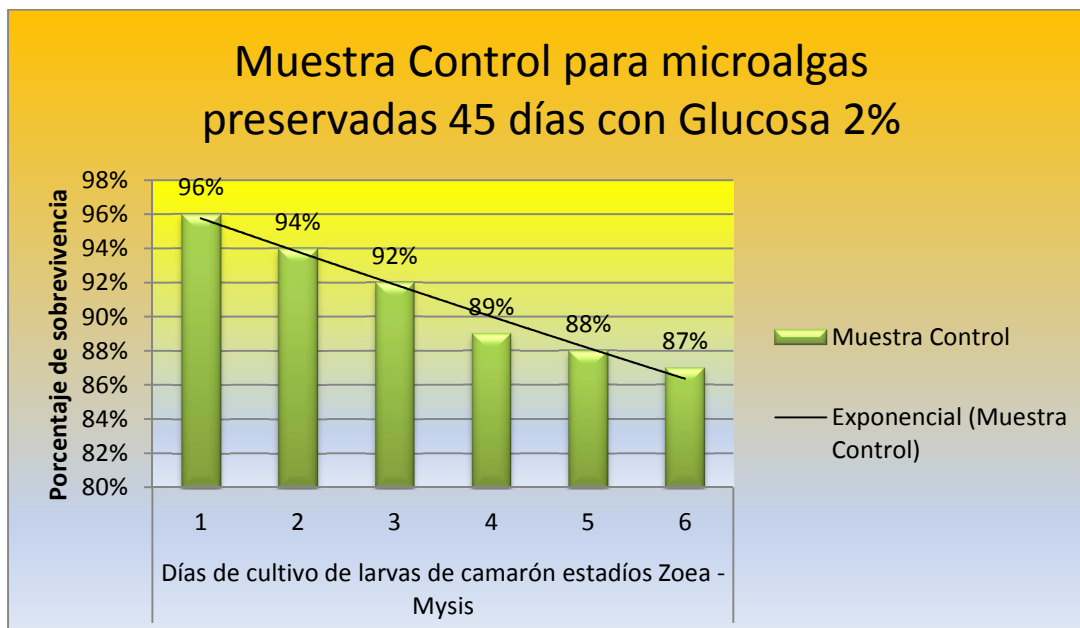


Figura # 4.10.- Gráfico que muestra los porcentajes de sobrevivencia de larvas de camarón *Penaeus vannamei* alimentadas con microalgas de la muestra control para microalgas criopreservadas por 45 días con Glucosa al 2% de concentración. Los estadios evaluados fueron desde Zoea 1, 2, 3 hasta Mysis 1, 2, 3. Fuente: Autores de tesis.

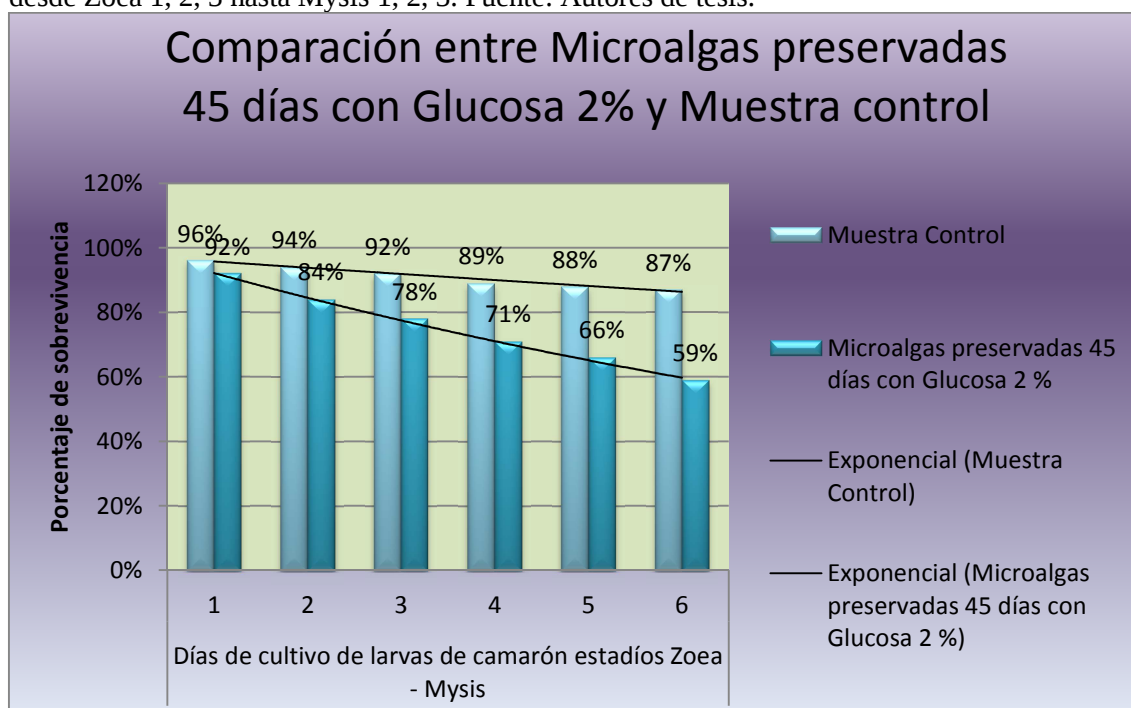


Figura # 4.11.- Gráfico que muestra la comparación entre los porcentajes de sobrevivencia de larvas de camarón *Penaeus vannamei* alimentadas con microalgas criopreservadas por 45 días

con Glucosa al 2% de concentración microalgas y su respectiva muestra control. Los estadios evaluados fueron desde Zoea 1, 2, 3 hasta Mysis 1, 2, 3. Fuente: Autores de tesis.

Los resultados demuestran que la sobrevivencia de las larvas de camarón que fueron alimentadas desde el estadio Zoea 1 hasta Mysis 3 con microalgas criopreservadas con Glucosa al 2% durante un periodo de quince días fueron significativamente similares (86%) al de la muestra control con algas frescas (86%) al finalizar el estadio Mysis 3. A los 30 días de criopreservación se puede apreciar que la sobrevivencia de la larvas fue ligeramente baja (78 %) en comparación con la muestra control (84 %) al finalizar el estadio Mysis 3. La sobrevivencia de las larvas de camarón alimentadas con microalgas criopreservadas durante 45 días fue significativamente baja (58 %) que la muestra control (87 %).

V. CONCLUSIONES.

- Se pudo apreciar una alta sobrevivencia en las larvas de camarón *Penaeus vannamei* alimentadas con microalgas criopreservadas durante 15 días de tratamiento con Glucosa al 2% y también se la pudo apreciar en la muestra control.
- Fue notoria la mortalidad de larvas de camarón al ser alimentadas con microalgas criopreservadas con Glucosa al 2 % durante los 30 y 45 días, esto podría haber sido ocasionado por la pequeña toxicidad que puede demostrar en cierto punto el criopreservante utilizado en la investigación, posiblemente por la concentración de adición del mismo y también el tiempo a que fueron expuestas las microalgas.

- Además durante el cultivo de las larvas de camarón se realizaron observaciones bajo el microscopio de muestras de las mismas, en donde pudimos apreciar que algunas células estaban adheridas a los apéndices abdominales y posiblemente este efecto impedía la muda en muchas larvas produciendo mortalidad.
- Lo principal de la investigación, es que las larvas de camarón aceptaron las microalgas criopreservadas como alimento, pero se pudo concluir que se afectó la sobrevivencia de las mismas cuando se suministró microalgas con mayor tiempo de criopreservación.

VI. RECOMENDACIONES.

- La viabilidad de las algas criopreservadas es menor que algas frescas, por esta razón no recomendamos que sean utilizadas como sustituto de estas.
- Deben utilizarse las algas criopreservadas en combinación con algas de cultivo fresco, así se podría evitar grandes mortalidades en las larvas de camarón *Penaeus vannamei*.
- Recomendamos que se investigue la criopreservación utilizando otras especies de microalgas de interés comercial, y así se generaría más información que podría servir de utilidad para la sociedad.

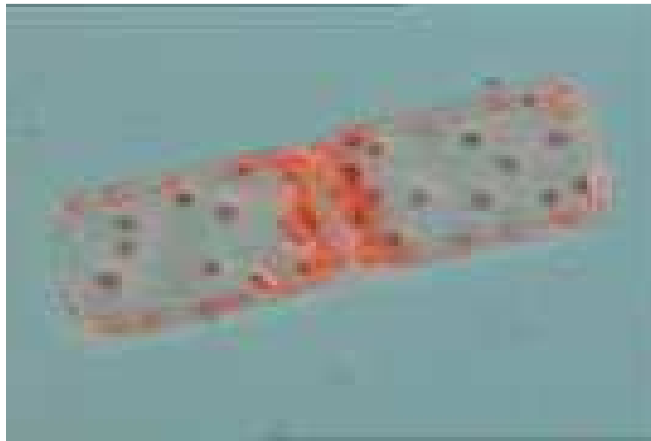
- Sería recomendable también que se realicen pruebas con otras especies de organismos cultivables, tales como moluscos bivalvos o larvas de peces.

VII. 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. A survey 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* (Bacillariophyceae) y *Tetraselmis chuii* (Prasynophyceae). Estación de maricultura del Pacífico.
6. **BITRIAGO 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 Bitriago 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

VIII. ANEXOS.



Anexo #1.- Fotografía microscópica de la microalga marina *Chaetoceros gracilis*.

Fuente: Autores de tesis



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

Fuente: Autores de tesis



Anexo #3.- Nutrientes preparados a base de químicos puros para alimentar las microalgas marinas. **Fuente:** Autores de tesis



Anexo #4.- Autoclave que se utilizó para esterilizar los materiales y fertilizantes. **Fuente:** Autores de tesis



Anexo #5.- Fotografía de cultivo inicial en tubos de ensayo de la microalga marina *Chaetoceros gracilis*.

Fuente: Autores de tesis



Anexo #6.- Fotografía de preparación de inóculos en tubos de ensayo de la microalga marina *Chaetoceros gracilis*.

Fuente: Autores de tesis



Anexo #8.- Microscopios utilizados para el chequeo y conteo de las microalgas marinas a traves de la cámara de Neubauer. **Fuente:** Autores de tesis



Anexo #9.- Conteo de microalgas marinas a traves de la cámara de Neubauer. **Fuente:** Autores de tesis



Anexo #10.- Medios de cultivo Guillard F/2 en recipientes de 500 ml de microalgas marinas *Chaetoceros gracilis* criopreservadas con Glucosa al 2% para suministro alimenticio. **Fuente:** Autores de tesis



Anexo #11.- Medios de cultivo Guillard F/2 en recipientes de 1 litro de microalgas marinas *Chaetoceros gracilis* criopreservadas con Glucosa al 2% para suministro alimenticio. **Fuente:** Autores de tesis



Anexo #12.- Tanque de cultivo masivo de microalgas marinas *Chaetoceros gracilis* criopreservadas con Glucosa al 2% para suministro alimenticio.
Fuente: Autores de tesis



Anexo #13.- Muestra del tanque de cultivo de larvas de camarón alimentadas con microalgas criopreservadas, en donde se aprecia su sistema digestivo lleno. **Fuente:** Autores de tesis