# EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO POBLACIONAL DE LA DIATOMEA *Thalassiosira weissflogii* A DIFERENTES SALINIDADES EN CONDICIONES DE LABORATORIO

**YURY SUSANA IBARRA CAJIAO**
**JHON ANDRÉS MUÑOZ BURBANO**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO**
**FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS**
**PROGRAMA DE INGENIERÍA EN PRODUCCIÓN ACUÍCOLA**
**PASTO, COLOMBIA**
**2011**

# EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO POBLACIONAL DE LA DIATOMEA *Thalassiosira weissflogii* A DIFERENTES SALINIDADES EN CONDICIONES DE LABORATORIO

**YURY SUSANA IBARRA CAJIAO**
**JHON ANDRÉS MUÑOZ BURBANO**

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniero en Producción Acuícola**

**Presidente:**
**JULBRINNER SALAS BENAVIDES**
**Biólogo *Enf* Ecología**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO**
**FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS**
**PROGRAMA DE INGENIERÍA EN PRODUCCIÓN ACUÍCOLA**
**PASTO, COLOMBIA**
**2011**

**“Las ideas y conclusiones aportadas en la Tesis de Grado, son Responsabilidad exclusiva de su autor”.**

**Artículo 1ero del acuerdo N°. 324 de octubre 11 de 1996, emanado del Honorable Consejo Superior de la Universidad de Nariño.**

**NOTA DE ACEPTACIÓN:**

_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____

_____
**JULBRINNER SALAS BENAVIDES.**
**Presidente**

_____
**VILMA YOLANDA GÓMEZ NIEVES.**
**Jurado delegado**

_____
**ARIEL EMIRO GÓMEZ CERÓN.**
**Jurado**

San Juan de Pasto, Marzo de 2011

**DEDICO A:**

“Un trabajo de investigación es también fruto del reconocimiento y del apoyo vital que ofrecen las personas que estiman, sin el cual no tendríamos la fuerza y energía que nos anima a crecer como personas y como profesionales”.

En primer lugar, dedico a Dios quien es mi guía en mi camino y me ha brindado la fuerza y sus bendiciones en todas las fases de mi vida.

A mi querido Director de Tesis: Biólogo. Julbrinner Salas Delgado, por su generosidad al brindarme la oportunidad de recurrir a sus conocimientos y experiencia científica en un marco de confianza, afecto y amistad, con cuyo trabajo estaré siempre en deuda.

A mis padres quienes me infundieron la ética y el rigor que guían mi transitar por la vida.

Este trabajo, dedico a mis hermanos, porque con ellos compartí una infancia feliz, que guardo en el recuerdo y es un aliento para seguir creciendo como persona y como profesional; además me enseñaron que la perseverancia y el esfuerzo son el camino para lograr objetivos.

Dedico a mis tías, por su paciencia, comprensión y solidaridad con este proyecto, por el tiempo que me han concedido, un tiempo robado a la historia familiar. Sin su apoyo este trabajo nunca se habría escrito y, por eso, este trabajo es también el suyo.

Gracias a mis amigos, que siempre me han prestado un gran apoyo moral y humano, necesarios en los momentos difíciles de este trabajo y esta profesión.

Son muchas las personas q me gustaría dedicar esta trabajo de investigación, por su amistad, apoyo, ánimo y compañía en las diferentes etapas de mi vida, unas están aquí y otras en mis recuerdos; sin importar donde estén quiero darles las gracias por formar parte de mí, por todo lo q me han brindado y todas sus bendiciones.

“Este documento es resultado de un trabajo interdisciplinario e interinstitucional, que fue posible gracias a la voluntad decidida de muchas personas y organizaciones Ecuatorianas, que compartieron interrogantes y se comprometieron en la búsqueda de conocimientos acuícolas. A todos ellos, instituciones y personas, un agradecimiento especial porque con sus aportes están haciendo posible que la acuacultura crezca”.

***YURY SUSANA IBARRA***

**DEDICO A:**

A Dios por ser guía, a mis padres Marleny Burbano y Bolívar Muñoz por darme la vida y resistir todo las adversidades y por ser el motor para lograr mis sueños; a mis hermanos Luis, Edgar y Jimmy por ser mi espejo y mi inspiración para salir adelante; a mi gran amigo Orlando Collazos por brindarme su apoyo y sus concejos incondicionales para lograr salir siempre adelante; a mi hija Cristal Juliana Muñoz quien es la luz de mis ojos y por la que cada día me esfuerzo más y más.

A mis sobrinos Luisito, David, pipe y Danielita; a toda mi familia que unida me regala apoyo y alegrías.

A mi gran amiga y compañera en este lindo trabajo de tesis Yuri que es una gran trabajadora, quien hizo que esto fuera una realidad.

“Todo lo que UNO se proyecte en la vida será realizado con sacrificio y apoyo pero se realizara”.

**Jhon Andrés muñoz Burbano**.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a:

| | |
|---|---|
| JULBRINNER SALAS BENAVIDES | Biólogo. Docente del Programa de Ingeniería en Producción Acuícola |
| VILMA YOLANDA GOMEZ NIEVES | Bióloga. Docente del Programa de Ingeniería en Producción Acuícola |
| ARIEL EMIRO GOMEZ CERÓN | Biólogo. Marino, Esp; Docente del Programa de Ingeniería en Producción Acuícola. |
| ALVARO BURBANO | Ingeniero en Producción Acuícola, Magister en Estadística. |
| LUIS ALFONSO SOLARTE PORTILLA | Zootecnista, Esp; Secretario Académico la Facultad de Ciencias Pecuarias de la Universidad de Nariño. |
| CAMILO L. GUERRERO ROMERO | Ingeniero en Producción Acuícola |
| PIEDAD MEJÍA SANTACRUZ | Secretaria del Departamento de Recursos Hidrobiológicos de la Universidad de Nariño. |
| OSCAR MEJÍA SANTACRUZ | Auxiliar del Centro de Documentación Especializada del Departamento de Recursos Hidrobiológicos de la Universidad De Nariño. |
| EDUARDO DIAZ | Gerente. Empresa EXPALSA S.A, |

Al personal del Laboratorio Macrobio, perteneciente a la Empresa EXPALSA S.A.

A todas las personas que de una u otra manera contribuyeron al desarrollo de esta investigación

**CONTENIDO**


| | | Pág. |
|---|---|---|
| | GLOSARIO<br>RESUMEN<br>ABSTRACT<br>INTRODUCCIÓN | 18 |
| 1. | DEFINICION Y DELIMITACION DEL PROBLEMA | 19 |
| 2. | FORMULACION DEL PROBLEMA | 21 |
| 3. | OBJETIVOS | 22 |
| 3.1 | OBJETIVO GENERAL | 22 |
| 3.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 22 |
| 4. | MARCO TEÓRICO. | 23 |
| 4.1 | GENERALIDADES DE LAS ALGAS | 23 |
| 4.2 | GENERALIDADES DE LAS DIATOMEAS O ALGAS SILÍCEAS (Diatomae) | 23 |
| 4.3 | CITOLOGÍA DE LAS DIATOMEAS | 24 |
| 4.4 | REPRODUCCIÓN | 25 |
| 4.4.1 | Reproducción asexual | 25 |
| 4.4.2 | Reproducción sexual | 25 |
| 4.5 | FASES DE CRECIMIENTO | 26 |
| 4.5.1 | Latencia o fase inicial | 26 |
| 4.5.2 | Exponencial o desarrollo logarítmico | 26 |
| 4.5.3 | Declinación de la fase exponencial | 26 |
| 4.5.4 | Estacionaria | 26 |
| 4.5.5 | Declinación o muerte | 26 |
| 4.6 | CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA | 27 |
| 4.7 | CONDICIONES DE LABORATORIO PARA EL CULTIVO DE ALGAS | 30 |
| 4.7.1 | Requerimientos fisicoquímicos | 30 |
| 4.7.2 | Requerimientos nutritivos | 31 |
| 4.8 | MEDIOS DE CULTIVO | 34 |
| 4.8.1 | Formas de cultivo | 36 |
| 4.8.1.1 | Por su naturaleza | 36 |
| 4.8.1.2 | Por la forma de cosechar | 36 |
| 4.8.1.3 | Por la pureza de cultivo | 37 |
| 4.8.2 | Técnicas de aislamiento y purificación | 37 |
| 4.8.2.1 | Métodos de aislamiento | 37 |
| 4.8.2.2 | Métodos de purificación | 38 |
| 4.8.3 | Procedimiento general en el cultivo de las microalgas | 38 |
| 4.8.3.1 | Mantenimiento de cepas | 38 |

| | | |
|---|---|---|
| 4.8.3.2 | Cultivo inicial | 38 |
| 4.8.3.3 | Cultivo intermedio | 38 |
| 4.8.3.4 | Cultivo en bolsas plásticas de 10 a 20 litros (Carboys) | 39 |
| 4.8.3.5 | Cultivo masivo | 39 |
| 4.9 | DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD DE POBLACIÓN DE LA MICROALGA | 39 |
| 5 | DISEÑO METODOLÓGICO | 41 |
| 5.1 | LOCALIZACIÓN | 41 |
| 5.2 | PERÍODO DE ESTUDIO | 42 |
| 5.3 | INSTALACIONES, MATERIALES, EQUIPOS E INSUMOS | 42 |
| 5.3.1 | Instalaciones | 42 |
| 5.3.2 | Materiales | 43 |
| 5.3.3 | Equipos | 44 |
| 5.3.4 | Insumos | 45 |
| 5.4 | MATERIAL BIOLÓGICO | 46 |
| 5.5 | PLAN DE MANEJO | 46 |
| 5.5.1 | Adecuación de instalaciones | 46 |
| 5.5.1.1 | Limpieza y desinfección de materiales y equipos | 46 |
| 5.5.1.2 | Adecuación de los recipientes | 48 |
| 5.5.1.3 | Preparación del agua | 48 |
| 5.5.1.4 | Preparación de los medios de cultivo | 49 |
| 5.5.2 | Cultivo de la microalga | 51 |
| 5.5.3 | Protocolo de cultivo de microalgas | 51 |
| 5.5.3.1 | Cultivo en tubos | 51 |
| 5.5.3.2 | Cultivo  erlenmeyers | 52 |
| 5.5.3.3 | Cultivo en Botellones de 3 litros | 53 |
| 5.5.3.4 | Cultivo en Bolsas Plásticas de 20 litros (Carboys) | 54 |
| 5.5.4 | Seguimiento del cultivo de microalgas | 54 |
| 5.5.5 | Determinación de la densidad de población de la microalga | 55 |
| 5.6 | TRATAMIENTOS | 55 |
| 5.7 | DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANALISIS ESTADÍSTICO | 55 |
| 5.7.1 | Diseño del experimento | 55 |
| 5.7.2 | Hipótesis | 56 |
| 5.8 | VARIABLES DE EVALUACIÓN | 56 |
| 5.8.1 | Densidad algal | 56 |
| 5.8.2 | Tiempos de crecimiento microalgal | 56 |
| 5.8.3 | Análisis de relación beneficio-costo | 56 |
| 6. | PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS | 57 |

| | | |
|---|---|---|
| 6.1 | VARIABLES EVALUADAS | 57 |
| 6.1.1 | Análisis para crecimiento poblacional | 57 |
| 6.1.1.1 | Evaluación de los parámetros físico-químicos | 61 |
| 6.1.2 | Análisis de la fase de crecimiento | 64 |
| 6.1.3 | Relación beneficio/ costo | 65 |
| 7 | CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | 67 |
| 7.1 | CONCLUSIONES | 67 |
| 7.2 | RECOMENDACIONES | 67 |
| | BIBLIOGRAFÍA | 68 |
| | ANEXOS | 71 |

## LISTA DE TABLAS


| | | Pág. |
|---|---|---|
| Tabla 1. | Medio de GUILLAR “F/2” (J. Stein, 1979) | 33 |
| Tabla 2. | Medio de cultivo F/2 GUILLARD modificado. | 48 |
| Tabla 3. | Condiciones para las dos salas de cultivo | 49 |
| Tabla 4. | Distribución de los tratamientos y replicas | 53 |
| Tabla 5. | Costos por tratamiento | 63 |
| Tabla 6. | Costos e ingresos de producción en el periodo experimental | 63 |

## LISTA DE FIGURAS


| | | Pág. |
|---|---|---|
| Figura 1. | Partes de la diatomea | 24 |
| Figura 2. | Fase de crecimiento | 25 |
| Figura 3. | *Thalassiosira weissflogii* | 26 |
| Figura 4. | Conteo celular en Hematocímetro | 38 |
| Figura 5. | Laboratorio de Macrobio | 39 |
| Figura 6. | Localización del laboratorio | 39 |
| Figura 7. | Sala de inoculo | 40 |
| Figura 8. | Materiales de uso en cultivos Microalgales | 41 |
| Figura 9. | Equipos | 42 |
| Figura 10 | Insumos | 43 |
| Figura 11 | Cepa de Thalassiosira weissflogii | 44 |
| Figura 12 | Blowers | 45 |
| Figura 13 | Prueba de cloro con orthotolidine | 45 |
| Figura 14 | Desinfección de vidriería | 46 |
| Figura 15 | Materiales para la preparación de salinidades | 47 |
| Figura 16 | Medio de cultivo F/2 Guillard | 48 |
| Figura 17 | Adición de nutrientes | 49 |
| Figura 18 | Cultivo en tubos | 50 |
| Figura 19 | Cultivo en erlenmeyers | 51 |
| Figura 20 | Cultivo en botellones | 51 |
| Figura 21 | Cultivo en bolsas plásticas o carboys | 52 |
| Figura 22 | crecimiento para la microalga *Thalassiosira weissflogii* | 55 |
| Figura 23 | Crecimiento poblacional para tubos | 56 |
| Figura 24 | Crecimiento poblacional para erlenmeyers | 57 |
| Figura 25 | crecimiento poblacional para botellones | 58 |
| Figura 26 | crecimiento poblacional para carboys | 58 |
| Figura 27 | Promedio del pH en los cultivos | 59 |
| Figura 28 | Temperatura para cultivos puros y carboys | 60 |
| Figura 29 | Salinidad de los cultivos | 61 |
| Figura 30 | Fase de crecimiento de los tres tratamientos y el control | 62 |
| Figura 31 | Relación beneficio costo | 63 |

## LISTA DE ANEXOS


| | | Pág. |
|---|---|---|
| Anexo A | Tés de normalidad según prueba de shapiro wilk. | 70 |
| Anexo B | Tabla De Anova | 70 |
| Anexo C | Prueba de Tukey para tubos | 71 |
| Anexo D | Prueba de Tukey para Erlenmeyer | 72 |
| Anexo E | Prueba de Tukey para botellones | 72 |
| Anexo F | Prueba de Tukey para carboys | 72 |
| Anexo G | Tabla de relación de costos | 73 |

## GLOSARIO

**ALGA:** cada una de las plantas talofitas, unicelulares o pluricelulares, que viven de preferencia en el agua, tanto dulce como marina, y que, en general, están provistas de clorofila acompañada a veces de otros pigmentos de colores variados que la enmascaran.

**CULTIVO AXÉNICO:** (puro), cultivos libres de bacterias y estériles, para mantener la productividad por un periodo prolongado de tiempo. Estos cultivos son delicados y de cuidado, requieren material estéril y asepsia.

**CLOROFILA:** pigmento verde que presenta la mayoría de vegetales y que les permite realizar la fotosíntesis.

**CLOROPLASTOS:** órgano responsable de la función de la clorofila.

**CROMATÓFORO:** cuerpo que contiene pigmentos.

**DIATOMEA:** vegetal microscópico con su célula cubierta por una pared dividida en dos tapas o valvas formadas por sílice.

**EDTA:** (etilendiaminotetraacetico), es un químico que sirve para la precipitación de residuos de metales pesados, al actuar como agente quelador.

**FERTILIZANTES:** sustancias orgánicas e inorgánicas empleadas para mejorar la calidad de un medio de cultivo.

**FLAGELO:** filamento largo y fino que sirve para dar movimiento.

**FRÚSTULOS:** cada una de las valvas o caparazones que rodea y protege al cuerpo de las diatomeas.

**LUX:** unidad de luminiscencia.

**METABOLISMO:** conjunto de reacciones químicas que efectúan constantemente las células de los seres vivos con el fin de sintetizar sustancias complejas a partir de otras más simples, o degradar aquellas para obtener estas.

**MICRA:** unidad de longitud, una milésima parte de un milímetro.

**MONOESPECÍFICO:** referido a una única especie.

**PIGMENTO:** sustancia colorante. En los seres vivos se puede encontrar disuelto o formado organoides en sus células.

**PLANCTON:** organismos pequeños que se encuentran flotando en la región superficial de las aguas dulces y marinas. Pueden presentar movimientos de desplazamientos.

**PROTOZOARIO:** organismo, casi siempre microscópico, cuyo cuerpo está formado por una sola célula o por una colonia de células iguales entre sí.

**SALINIDAD:** es la cantidad de sólidos disueltos que contiene un kilogramo de agua de mar, expresada en miligramos por litro o partes por millón (ppm).

**THIOSULFATO:** químico empleado como neutralizante de partículas de cloro.

## RESUMEN

La presente investigación, se realizó en el laboratorio Macrobio perteneciente a la empresa Expalsa S.A., productora de postlarvas de camarón blanco *(Litopenaeus vannamei)*, ubicada en la Península de Santa Elena, Cantón Ayangue, Ecuador durante un periodo de un mes.

En el estudio, se evaluó el crecimiento de la especie fitoplanctónica *Thalassiosira weissflogii,* cultivada a diferentes salinidades; 20 ppmT1, 25 ppm T2, 30 ppmT3 y 35 ppm T4 partes por millón (este último actúo como testigo), con iluminación continúa bajo condiciones de laboratorio.

Los bioensayos se realizaron a partir de una cepa pura, cultivada en medio F/2 Guillard (1979). En la verificación del crecimiento de la especie, la cepa se transfirió a tubos de ensayo de 20 ml, pasando a erlenmeyers (fiolas) de 350 ml, luego a recipientes de plástico de capacidad 3 litros, hasta llegar a bolsas plásticas (Carboys) de 20 litros a diferentes salinidades de siembra, bajo un diseño de 4 tratamientos y 4 réplicas, a constante asepsia desde la fase inicial hasta el final de la producción evitando así la contaminación. La evaluación de los tratamientos coincide con el monitoreo diario de los parámetros físicos y químicos de salinidad, temperatura y pH.

Se pudo observar que los tratamientos T1, T2, y T3 desarrollaron mejor crecimiento que el Tratamiento cuatro o control. El Tratamiento uno fue el que mantuvo las más altas densidades celulares; en todas las fases, esto demuestra que este tipo de microalga *T. weissflogii,* tiene un mejor comportamiento a salinidades bajas, alcanzando densidades poblacionales en promedio 434,687 cel/ml; valor correspondiente al tratamiento uno a diferencia del tratamiento cuatro con 221,250 cel/ml.

La presente investigación, obtuvo nuevas alternativas de producción estimando la salinidad como un factor determinante en el crecimiento y densidad poblacional de esta especie, con el ánimo de satisfacer la necesidad alimenticia de calidad, cantidad y bajo costo para las larvas de camarón *Litopenaeus vannamei*.



Palabras claves: *Thalassiosira weissflogii*, y salinidad.

## ABSTRACT

The present investigation, was realized in the Macrobio laboratory belonging the Expalsa S.A company, producer of postlarvas of white shrimp (Litopenaeus vannamei), located in Santa Elena Peninsula, Canton Ayangue, Ecuador.

In the study, the growth of the phytoplankton species *Thalassiosira weissflogii* was evaluated, cultivated to different salinities; 20, 25, 30 and 35 parts for million (this last one acted as witness), with continue illumination under the laboratory conditions for a month

The bio-tests were realized from a pure; it was cultivated between F/2 Guillard (1979). In the verification of the growth of the species, the stump was transferred to test tubes of 20 ml, passing to erlenmeyers (fiolas) of 350 ml, then to plastic recipients of capacity 3 liters, until arriving at plastic bags (Carboys) of 20 liters at different salinities from sowing, under a design of 4 treatments and 4 replicas, to constant asepsis from the first phase until the end of the production avoiding avoiding this way the contamination.The evaluation of the treatments agrees with the daily monitoring of the physical and chemical parameters of salinity, temperature and pH.

It was observed that the treatments T1, T2 and T3 developed better growth than four or control treatment. Treatment one was the one who held the highest cell densities, as in all phases, this shows that this type of microalga T. weissflogii or better performance to low salinity, reaching an average population density 434,687 cells/ml, a value for the treatment unlike the four treatment 221,250 cells/ml.

The present investigation to tried to offer new production alternatives, considering the salinity like a decisive factor in the growth and populational density of this species, with the intention of to satisfy the nutritional necessity of quality, quantity and low cost for the larvae of shrimp *Litopenaeus vannamei*



Key words*: Thalassiosira weissflogii*, and salinity.

# INTRODUCCIÓN

El cultivo de larvas en el Ecuador, se realiza aproximadamente desde el año de 1980, a raíz de la demanda de post-larvas existentes en el medio productivo, por tanto el fitoplancton y zooplancton en la alimentación de estos organismos acuáticos son considerados como el alimento que contiene la mayoría de las sustancias nutritivas, su valor se basa en el contenido de ácidos grasos esenciales, entre otros elementos que favorecen el crecimiento, la sobrevivencia de las larvas y postlarvas, presentan altos niveles de proteína de excelente calidad, siendo fuente importante de vitaminas y minerales.

Según Leger:

> Las microalgas son de gran interés para la acuicultura debido a que juegan un papel primordial en la nutrición de larvas o adultos de organismos acuáticos en cultivos comerciales. Por ejemplo algunos como los peneidos, requieren microalgas como fuente de alimento durante sus primeros estadíos larvarios y los bivalvos necesitan de una gran cantidad de algas unicelulares durante todo su ciclo de vida. Por tal motivo se han realizado estudios sobre la morfología, la genética, la sistemática y la composición química de las diversas especies y sus variaciones en dependencia de los medios de cultivo.
>
> Estas a su vez por ser el primer eslabón de la cadena alimenticia, tienen importancia primordial dentro del cultivo larval, esto es a partir de la etapa de Zoea el suministro algal en dosis adecuadas es imprescindible. En la alimentación larval se utiliza diversas especies, tales como: *Chaetoceros sp; Skeletonema sp; Isochysis sp; Dunaliella sp; Tetraselmis* etc; siendo la *Thalassiosira sp,* la más común.
>
> Estas especies de microalgas utilizadas en laboratorios de cultivos de larvas de camarones no solamente deben presentar una buena calidad nutricional sino una gran adaptabilidad a sistemas de cultivo; además estos últimos se buscan que sean económicos tanto en cultivos primarios como en masivos. [1]

La finalidad de esta investigación fue “evaluar el crecimiento poblacional de la diatomea *Thalassiosira weissflogii* a diferentes salinidades en condiciones de laboratorio”, utilizando métodos que no requieren de un control exagerado.

[1] LEGER, P.A., D.A. Bengston, P. Sorgeloos, K.L. Simpson y A. Deck. . The nutritional value of *Artemia*: a review. En: P. Sorgeloos, D.A. Bengtson, W. Decleir y E. Jasper (eds.). *Artemia* research and its applications. 3. 1987. 357-372 p

# 1. DEFINICIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA.

En la Acuicultura, uno de los factores limitantes es la obtención y producción de alimentos que cubran todos los requerimientos para las especies de cultivo que resulten costeables; el alimento vivo (fitoplancton y zooplancton) es esencial durante el desarrollo larvario del camarón. En la actualidad la investigación orientada hacia los microorganismos como fuente de alimentación está en pleno desarrollo. En países como Japón, donde se practica con éxito la maricultura, los cultivos masivos de microalgas, rotíferos, copépodos y cladóceros son la base de la producción comercial.

Dado el interés que existe por la acuacultura en Latinoamérica y el Caribe, dirigido a especies de importancia comercial como el camarón en condiciones controladas de producción para la alta supervivencia de semillas en sistemas de cultivo semi-intensivo e intensivo, se hace necesario el conocer las diferentes alternativas de obtención de alimento vivo a gran escala, con el fin de reducir las altas mortalidades ocasionadas por deficiencias nutricionales en dietas artificiales no balanceadas.

Actualmente se han desarrollado diferentes medios para el cultivo de microalgas para enriquecer el agua de mar natural, debido a que estas requieren de factores de crecimiento, dentro de los cuales se encuentran físicos, químicos y nutritivos, destacando la luz, temperatura, salinidad, pH, $CO_2$, fotoperiodo y los macronutrientes utilizados para sintetizar compuestos orgánicos y los micros nutrientes usados como catalizadores.

Según Moronta, Mora y Morales[2] La salinidad es un factor abiótico importante, porque afecta el crecimiento y cantidad celular de las microalgas en cultivo como en el ambiente, determinando así su distribución; igualmente influye en los gases disueltos, lo cual ocasiona una respuesta de las microalgas regulado con cambios rápidos en el volumen celular y ajuste osmótico; ésta variación provoca en la célula liberación de iones, síntesis de compuestos orgánicos, disminución en la fijación de $CO_2$ y afecta el metabolismo del nitrógeno.

En acuicultura marina, la diatomea *Thalassiosira weissflogii,* ha sido utilizada como alimento vivo dado su valor nutritivo y su pequeño tamaño, principalmente para moluscos y crustáceos, además, tiene la capacidad de crecer en cultivos masivos generando buenas densidades poblacionales, que la hace una especie ideal para continuar su investigación sobre todo en la búsqueda de como optimizar su producción.

[2] R. MORONTA, R. MORA Y E. MORALES. Respuesta de la microalga Chlorella sorokiniana al pH, salinidad y temperatura en condiciones axénicas y no axénicas Rev. Fac No.1 caracas 2006 agronomía. Vol. 23

## 2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Debido a las escasas investigaciones y teniendo en cuenta que para los técnicos e ingenieros dedicados a esta actividad la producción de microalgas de excelente calidad y mayor densidad poblacional es un aspecto fundamental para el éxito de la producción de larvas de camarón comercial, considerando que la larvicultura es una de las etapas más críticas en cualquier actividad acuícola debido al escaso desarrollo del tamaño del tracto digestivo de las larvas por esto se hace necesario alimentarlas con organismos con capacidad inferior a su boca, por esto las algas cumplen con los requerimientos para alimentación larval lo que hace que hallan mayores investigaciones y una de estas es la salinidad ya que está directamente relacionada con su crecimiento por esto se ha formulado el siguiente problema ¿Cuál es el efecto de la salinidad sobre el crecimiento poblacional en las diferentes fases de desarrollo del alga *Thalassiosira weissflogii* en condiciones de laboratorio?

# 3. OBJETIVOS

## 3.1. OBJETIVO GENERAL.

Evaluar el crecimiento de la diatomea *Thalassiosira weissflogii* a diferentes salinidades en condiciones de laboratorio.

## 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Cuantificar la densidad poblacional cada 6 horas, para las diferentes salinidades a evaluar (20, 25, 30 y 35 partes por millón ppm).

- Determinar los tiempos en las fases de crecimiento poblacional de *Thalassiosira weissflogii* a diferentes salinidades.

- Realizar un análisis parcial de costos en cada tratamiento.

# 4 .MARCO TEÓRICO

## 4.1 GENERALIDADES DE LAS ALGAS.

Según Krueger:

> Las algas incluyen una gran variedad de organismos que ocupan los más diversos hábitats marinos (algas marinas) o terrestre (algas de agua dulce). Pueden ser unicelulares (microalgas) o pluricelulares (macroalgas) de las formas más variadas, desde coloniales hasta la formación de un talo como modelo de organización más compleja, morfológicamente son plantas unicelulares que crecen como células individuales o agregaciones, aunque estas son relativamente indiferenciables en órganos y solamente en los géneros más complejos se encuentran tejidos conductores, sin embargo, la gama de formas y colores es variada, desde células diminutas, de unos cuantos micrómetros en diámetro, hasta las grandes algas marinas del Antártico.
>
> Normalmente, las algas habitan los ambientes húmedos, en la tierra, el aire, el mar, lagunas, hielo y nieve. En el mar ocupan las capas más superficiales, hasta los niveles donde hay penetración de la luz solar. Su función dentro de la naturaleza destaca por su rol de formar parte del primer eslabón dentro de la cadena trófica acuática.
>
> Las algas que contienen clorofila como pigmento fotosintético, producen oxigeno como un derivado de la fotosíntesis. Las divisiones están definidas en base a dos tipos de propiedades bioquímicas: a) el tipo de pigmento y b) la reserva alimenticia. Sobre la base de estas características parece que las algas procariotas dan origen a las formas eucarioticas. Cada división se caracteriza por su propia distribución de pigmento, además de la presencia de la clorofila a.[3]

## 4.2 GENERALIDADES DE LAS DIATOMEAS O ALGAS SILÍCEAS (DIATOMEAE)

El mismo autor menciona que las diatomeas son organismos que pertenecen al Phylum de las algas pardo doradas; *Chrysophyta*, el mayor en número de especies 21.500, y poseen 190 géneros con más de 5000 especies de diatomeas. Estas son de color verde pálido, además de la clorofila tienen un pigmento amarillo, la diatomina; las células de estas algas poseen una membrana silicificada, a modo de caparazón llamado frustula, formado por dos valvas adornadas de estrías y relieves muy finos, las células constan de protoplasmas, núcleo, una vacuola central, y los cromoplastos ofrecen el aspecto de granos o grandes plaquitas, pueden ser unicelulares y vivir en colonias, están muy

[3] KRUEGER, R. & Gillman, J. & Coggin. Introducción a la microbiología; 1973. 102-175 p.

extendidas en el mar en los pantanos y demás depósitos de agua dulce, algunas de ellas viven en el fondo; otras, en cambio, se mantienen en suspensión formando parte del plancton.

La Revista Chilena de Historia Natural menciona:

> En los sedimentos lacustres es posible encontrar tanto formas bentónicas como formas provenientes de la columna de agua por esta razón, los sedimentos entregan un registro temporal y espacial de lo que habita en el sistema la custre. Estos organismos habitan en los sitios más impensados del planeta: desde hielos polares hasta aguas termales, tanto en mares como en ambientes dulciacuícolas, pasando por terrenos secos e inclusive en interior de animales (como en las vías respiratorias de monos), pueden seguir adelante en condiciones mínimas de vida.
>
> Las diatomeas poseen un protoplasma interno de densidad similar a la del agua, pero su pared celular contiene grandes cantidades de siliconas, que tienen una densidad dos o tres veces mayor. Como resultado de esto, las diatomeas tienden a hundirse en un rango de 1m por día. Dichas células, se ubican en la columna de agua y toman los nutrientes inorgánicos, tendiendo a formar zonas con una drástica reducción de nutrientes alrededor de ellas; así entonces, hundiéndose es la forma en que las diatomeas alivian este problema.
>
> Sin embargo, la desventaja de esto es que cada vez se hunden a zonas de menor intensidad lumínica, se necesitará una mezcla a gran escala en la columna de agua que llevara a las diatomeas a la superficie nuevamente; así, entonces las diatomeas son características de aguas en que la mezcla por vientos ocurre con frecuencia.[4]

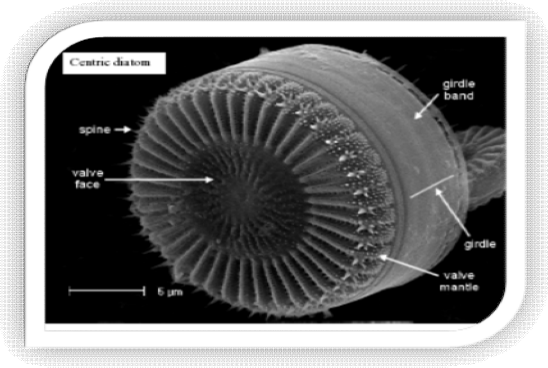
## 4.3 CITOLOGÍA DE LAS DIATOMEAS

Las paredes celulares consisten en dos mitades casi idénticas que encajan, estas mitades son llamadas frústulos y contienen algo de celulosa, pero generalmente tienen grandes cantidades de sílice, puede constituir hasta el 95% del total de su peso, esta sustancia les confiere rigidez y origina patrones de estrías de trama complicada, que suelen servir como rasgos para su identificación. El frustulo externo que recubre en parte al otro se denomina Epiteca y el frustulo interno se denomina Hipoteca; cada frustulo está formada por una valva que puede ser aplanada o convexa, provista de una banda de unión, unida a lo largo de su borde. La parte plana superior o inferior de la célula se denomina valva, pero podemos encontrar desigualdades en la superficie de las valvas y de las pleuras, en todo caso pueden presentarse dos aspectos: uno valvar y otro pleural. Figura 1.

[4]REVISTA CHILENA DE HISTORIA NATURAL. Estructura comunitaria de diatomeas presentes en los sedimentos superficiales de ocho lagos andinos de Chile central. versión impresa ISSN 0716-078XRev. Santiago mar chil. hist.nat. 2008, vol.81 no.1.

El citoplasma se presenta como una caja que rodea a una gran vacuola por lo general en las céntricas el núcleo tiene posición parietal. Posee una vacuola Central y además uno, dos o muchos cloroplastos parientales que pueden ser lobulados, perforados, discoidales o acintados, tienen en general muchos cloroplastos.

**Figura1. Partes de una Diatomea.**




## 4.4 REPRODUCCIÓN

**4.4.1 Reproducción asexual.** Salvador expresa "la reproducción de las diatomeas, es por lo general asexual o vegetativa mediante bipartición celular, los frustulos de las células que se dividen actúan como epiteca de las dos células hijas resultantes, lo que permite una rápida producción de muchas células que heredan un patrimonio genético idéntico al de las células progenitora"[5].

**4.4.2 Reproducción sexual.** El mismo autor menciona que otra modalidad de reproducción es la sexual, esta puede ser isógama, anisógama u oogamia. El cigoto resultante de la singamia se denomina auxospora, la auxosporulación, asegura la variabilidad genética de las poblaciones de diatomeas, este proceso tiene lugar en el seno de una población y puede originarse por autogamia donde se produce la unión de células distintas, producidas por la misma célula madre, la auxospora crece hasta alcanzar de dos a tres veces el tamaño original de la célula productora del gameto. La producción de auxosporos, se debe cuando la disminución de la célula se vuelve crítica y constituye una reintegración del volumen normal de la célula.

[5] SALVADOR, William A. Producción de microalgas Thalassiosira weisflogii como alimento de larvas de Litopenaeus vannamei. Libertad, Ecuador. UPSE, 2007. 7 p.

## 4.5 FASES DE CRECIMIENTO

Según Álvarez “son cinco las fases de crecimiento en un cultivo típico de microalgas. Estas fases se definen por el número de células presentes a un tiempo determinado (edad) y también por las condiciones generales del cultivo”[6]. Figura 2.

**4.5.1 Latencia o fase inicial.** Es una fase de adaptación de las células a las nuevas condiciones de medio, con poco incremento de la población celular. Muchas enzimas metabólicas llegan inactivas y las concentraciones de materiales celulares caen a niveles que afectan la división de la célula; Antes de reanudar su crecimiento les toma un corto periodo aclimatarse a su medio acuático. Otro factor que contribuye a su fase inicial, es el requerimiento de alcanzar los niveles máximos de compuestos específicos antes que la fase exponencial comience. Altas concentraciones de calcio, magnesio o fosforo pueden extender la fase de latencia. Esta fase se puede dilatar de uno a tres días, dependiendo del tamaño y del estado del inoculo.

**4.5.2 Exponencial o desarrollo logarítmico.** En esta fase, la división celular se incrementa en función del tiempo, el incremento de la población existente, es debido a que las células están asimilando los nutrientes del medio y su proceso de reproducción es activo. La fase exponencial puede presentarse del segundo al tercer día después de inoculado el medio y prolongarse hasta cuatro días, si se controla la dilución del cultivo; sin embargo, esta etapa puede prolongarse por semanas.

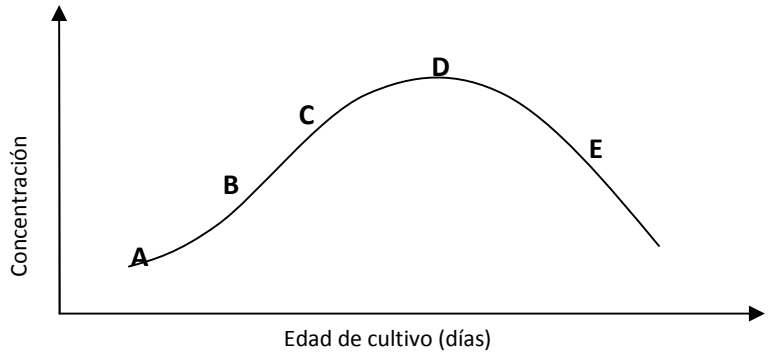
**4.5.3 Declinación de la fase exponencial.** La división celular es lenta cuando los nutrientes han sido consumidos y su carencia limita el crecimiento, esta fase puede durar de uno a dos días en que la edad del cultivo alcanza su valor máximo.

**4.5.4 Estacionaria.** En este período el factor limitante es la carencia de nutrientes y la tasa de crecimiento es balanceada, es decir que las densidades celulares se mantienen relativamente constantes por un periodo prolongado, esta fase es muy corta en grupos de cultivo donde los nutrientes son consumidos y no remplazados.

**4.5.5 Declinación o muerte.** Durante esta etapa las células sufren completa limitación por escasez de nutrientes, la densidad celular comienza a decaer rápidamente, liberando azucares, proteínas y lípidos que son aprovechados, en algunos casos, por bacterias oportunistas que se alimentan de ella, desplazando a la población que aún se mantienen viva, pero rápidamente colapsa.

[6]ALVAREZ, Henry A. Cultivo de microalgas, manual de uso para la acuacultura tropical. Guayaquil: FIMCM-ESPOL, 2003. 16 p.

**Figura 2. Fases de crecimiento en cultivo de microalgas**



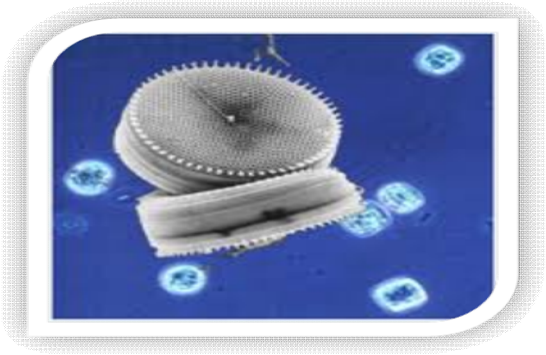

**A.** Adaptación o retraso del crecimiento, **B.** exponencial. **C.** declinación relativa del crecimiento. **D**. estacionaria. **E**. muerte.

## 4.6 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.

Según Gruunow citado por Giménez, "la clasificación e identificación taxonómica de la *Thalassiosira weissflogii* es la siguiente" Giménez[7], figura 3.

**División:** Chrysophyta
**Clase:** Bacillariophyceae
**Orden:** Centrales
**Suborden:** Discoideae
**Familia:** Coscinodiscaceae
**Subfamilia:** Skeletoneminae
**Género:** Thalassiosira - Micropudiscus
**Especie:** Weissflogii o F*luviatilis*
**Nombre especifico:** ***Thalassiosira weissflogii***

***Figura 3.*** *Thalassiosira weissflogii.*



[7] GIMENEZ, Roberto. Diatomeas sillico flagelados del fitoplancton del Golfo de Guayaquil. Instituto Océano grafico del armada. 2da edición. Vol 2. Guayaquil Ecuador, 1983. p198.

Según Fryxell, G. y Hasle, G. R:

> L*a Thallassiosira weissflogii,* es una diatomea grande (6-20µm x 8-15µm), que se utiliza en la industria de cultivo de larvas de camarón y mariscos, esta alga se la suministra en todas las fases larvarias y es considerada por varios criaderos como el único alimento algal que cumple con las condiciones nutritivas mejorando la supervivencia y el crecimiento larval.
>
> Durante el invierno esta alga es de aproximadamente 15 micras, pero se reduce a cerca de 5 micrones durante el verano, su color varia de marrón a verde amarillo dependiendo de la cantidad de clorofila, pero su cambio de color no afecta en modo alguno la calidad de las algas; las células de este tipo de microalgas son cortas y cilíndricas, tienen la valva ya sea cóncava o convexa, además posee areolas que están dispuestas en hilera sinuosa de diferentes largos, una corona de espinas submarginales y una sola espina más grande (rara vez 2 ó 3), justo dentro de la corona [8].

Son pocos estudios acerca de la influencia que ejerce la salinidad sobre el crecimiento celular de la micro alga *Thalassiosira weissflogii o Thalassiosira fluviatilis.* Así Guerra, Romero, Valdivia y Pérez, "la sometieron a distintas salinidades planteando que la microalgas alcanzo la mayor densidad en cultivos realizados a 35 ppm, presentando diferencias estadísticamente significativas (P=0.05), al resto de las salinidades evaluadas con una concentración celular, velocidad de crecimiento y productividad superior"[9].

Otras investigaciones realizadas con este tipo de alga según Barbieri, Villafañe y Helbling:

> Dicen acerca de La producción de oxígeno / dinámica del consumo, en tres especies de fitoplancton (20-25 micras de diámetro efectivo), *Dunaliella salina* (Chlorophyceae), *Thalassiosira weissfiogii* (Bacillariophyceae) y *Heterocapsa triquetra* (Dinophyceae), fue cuando las células circularon dentro de una simulación de la capa de mezcla (UML). Las muestras fueron expuestas a tres tratamientos de radiación que reciben: a) la radiación solar total (PAB, 280-700 nm), b) PAR + UV-A (PA, 320-700 nm), y c) sólo PAR (P, 400-700 nm). Dos vías fueron simulados (como si las células comenzaron a circular desde la superficie o del fondo de la CSM): 1) la circulación hacia abajo *(es decir,* del 100% al 9% de la irradiación y nuevamente al 100%), y 2) circulación

---

[8]FRYXELL, G. y Hasle, G. R. The genus *Thalassiosira*: Some species with a modified ring of central strutted processes. Beih. zur Nova Hedwigia, 1977. (citado el 11 de mayo del 2010). Disponible en internet: http://www.thalassiosira weissfligii.com. 1977.

[9]GUERRA, Aznay Misael, ROMERO López Teresita, VALDIVIA Lázaro, y PÉREZ Nodar Rosa. Centro de Investigaciones Pesqueras. REDVET Rev. electrón. vet. http://www.veterinaria.org/revistas/redvet - http://revista.veterinaria.org Ciudad de La Habana. Cuba. Vol. 10, Nº 4, Abril/2009.

hacia arriba (es *decir,* del 9% al 100% de la irradiación y nuevamente al 9%). No hubo diferencias significativas entre tratamientos de radiación ($p < 0,05$) y la inhibición fotosintética se debió sólo a PAR. Se encontraron importantes diferencias inter-específicas en las tasas de $O_2$ cuando las células circularon dentro de la CSM simulada, *D. salina* fue afectada tanto por altas y bajas irradiancias, mientras que *T. weissfiogii* solo fue inhibida por altas irradiancias.

Por otra parte, H. triquetra mostró la menor variabilidad y se benefició por la fluctuación de los regímenes de radiación. También se determinaron diferencias en la profundidad de producción integrada de $O_2$ cuando las especies realizaron una rotación completa dentro de la CSM simulada, con los mayores valores en H. triquetra y la más baja en D. salina. Los hallazgos sugieren que los diferentes recorridos de las células que circulan en la columna de agua se debe considerar a la hora de evaluar la productividad primaria en áreas expuestas a condiciones meteorológicas cambiantes durante todo el año, y por lo tanto, con CSMs variable[10].

Según Guerra, Romero y Valdivia, "menciona que el Nutrilake por sus excelentes resultados en cuanto a concentración de microalgas obtenidas se ha convertido en últimos años en un fertilizante de probada eficacia en el cultivo de las mismas. En este trabajo se procedió a la evaluación de *Thalassiosira fluviatilis* frente a tres concentraciones diferentes de Nutrilake"[11].

Vega y Lorenzo y Ruiz "cultivaron la diatomea marina, *Thalassiosira weissflogii,* en un sistema discontinuo con el medio f/2 adicionado de 10 mg l-1 de los zeólicos Zeben 56, Zestec 56 y AZ. Después de 10 días se de cultivo se comprobó la composición proximal celular. El efecto más importante se observó con Zestec 56 el cual produjo un incremento del ácido octadecatetraenoico (C 18: 4) y del ácido docosahexaenoico (C22:6 – DHA). Los resultados sugieren que la adición de productos zeólicos pueden ser utilizados como parte del medio f/2 para mejorar la calidad nutricia de la diatomea"[12].

[10] BARBIERI, Elena S, VILLAFAÑE Virginia E. y HELBLING Walter. Dinámica de la producción de oxígeno / consumo en *Dunaliella salina, Thalassiosira weissfiogii* y *Heterocapsa triquetra* circulan en una capa superficial de mezcla simulada. Disponible en internet: http://translate.google.com.co/translate?hl=es&sl=en&u=http://www.scielo.cl/scielo.php%3Fpid%3Ds0717 (citado el 20 de septiembre del 2010)

[11] GUERRA Aznay, ROMERO Teresita, Y VALDIVIA Alba. Evaluación del crecimiento de *Thalassiosira fluviatilis* frente a diferentes concentraciones de Nutrilake (Evaluation of the growth of *Thalassiosira fluviatilis* as opposed to different concentrations from Nutrilake). (citado el 20 de septiembre del 2010). Disponible en internet: http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n111106/110618.pdf.

[12] VEGA Bertha, LORENZO Silvia y RUIZ José. Efecto de productos zeolicos en la calidad nutritiva de la diatomea*Thalassiosira weissflogii*. (Citado el 15 de noviembre del2010).Disponible en internet: http://www. Rehb@xanum.uam.mx./revista hidrobiológica. Pdf.

## 4.7 CONDICIONES DE LABORATORIO PARA CULTIVO DE ALGAS.

### 4.7.1 Requerimientos fisicoquímicos. Según Carmona:

Las principales variables físicas que influyen en los cultivos de microalgas son: luz, temperatura, y salinidad.

- **Luz.** La iluminación puede ser natural (del sol) o artificial; y las fuentes de luz artificial tienes espectros de emisión que no son necesariamente idénticos a la del sol. La cantidad de energía radiante (lux o W/ $cm^2$) debe ser óptima para el crecimiento, esta cantidad óptima para una determinada especie varia con la cantidad de nutrientes, de densidad celular, profundidad y forma del cultivo. Las microalgas que crecen lentamente prefieren luz débil (200 lux), mientras que las de crecimiento rápido necesitan más de (4000 lux); además que el periodo de exposición puede ser continuo (luz artificial), o bien periódico (luz artificial o ciclo natural día – noche).

- **Temperatura.** Generalmente, las temperaturas óptimas de cultivo de microalgas marinas van desde 15 a 22°C lo que hace que los cultivos se ubiquen en cámaras especiales de temperatura controlada, las temperaturas óptimas de cultivo de las microalgas de agua dulce pueden ser entre 5 - 8°C más altas. Muchas cianofíceas crecen a temperaturas de 40 °C en adelante. Se ha comprobado que se obtiene una mayor tolerancia a altas temperaturas (30 – 35°C), si el medio de cultivo se enriquece con vitaminas y factores de crecimiento. En cultivos seminaturales, en los que se utilizan aguas con su contenido de microalgas natural, la temperatura de cultivo selecciona las especies que provocaran el bloom en esas condiciones, por lo que debe ser un factor a estudiar en estos casos. El mismo autor menciona que la temperatura óptima para las diatomeas es de 18°C a 35°C. Para las algas verdes y para las algas verde azules de 35 a 40 °C[13].

- **Aireación.** De acuerdo a Sipaúba y Rocha[14]:

Se debe utilizar aireación directa con aire comprimido para volúmenes mayores que un litro, siendo que para volúmenes menores los intercambios gaseosos entre el tamaño de la tapa y la superficie del cultivo son suficientes. En erlenmeyers de 1,0 L el volumen ideal del cultivo es de aproximadamente 400 ml, con un máximo de 500 ml.

Los cultivos en stock no deben ser aireados o agitados, sin embargo deben ser mantenidos vivos obteniéndose así, un crecimiento moderado, evitándose

[13] CARMONA, V. MUÑOZ j. Establecer los efectos que produce la alimentación con microalgas en la fase exponencial y estacionaria en la larvicultura del camarón blanco (*Penaeus vannamei*), tesis de grado de la Universidad Técnica de Machala. El Oro. Ecuador. p. 15.

[14] SIPAÚPA, L. H. y ROCHA, O. cultivo a larga escala de organismos planctónicos para alimentacâo de larvas e alevinos de peixes: I-algas clorofíceas. : Biotemas. Jaboticabal, SP, Brasil. Vol. 6, No 1 (fevereiro, 1993). p.18

la replicación constante para cultivos de gran escala, la aireación directa del medio es indispensable, puesto que la corriente de aire enriquece el medio con $CO_2$, sin embargo el aire contiene solo 0,03% de carbono, así las células son mantenidas en suspensión, el suministro de carbono inorgánico es asegurado y el pH, estabilizado, la agitación producida por un flujo gaseoso permite la manutención de las células en suspensión, asegurando condiciones idénticas de crecimiento para todas.

- **Salinidad.** La respuesta a las variaciones en salinidad depende de la concentración total de iones (osmolalidad) y de las concentraciones relativas de algunos iones, según la especie, en la misma especie es posible encontrar variedades naturales adaptadas a bajas salinidades (variedades de mar abierto). La salinidad, al igual que las otras variables físicas, puede afectar la composición y por lo tanto, su valor nutritivo.

- **pH.** Para Carmona[15], el pH óptimo del medio de cultivo para el crecimiento de microalgas, depende de la especie, pero suele estar comprendido entre 7 y 9, los métodos que se utilizan para controlar el pH del medio de cultivo incluyen: aireación con aire/$CO_2$, adición de productos químicos y uso de tampones. Generalmente, se usa el sistema carbonato – bicarbonato como tampón, además, permite un control amplio del pH mediante variaciones en la proporción del $CO_2$ con que se airea el cultivo. La fotosíntesis provoca un aumento de pH que se ha de contrarrestar aumentando el $CO_2$, ahora bien, en la oscuridad, el metabolismo de las células reduce el pH, por lo que se ha disminuir la cantidad de $CO_2$ adicionando a los cultivos.

El mismo autor menciona, que la presencia de las microalgas durante las fases larvarias tiene la ventaja de ayudar a mantener la calidad del agua, debido al consumo del amonio y la producción de oxígeno. La producción de oxigeno que lleva aparejada una activa fotosíntesis hace que el medio de cultivo de microalgas cuando está iluminado sea oxidante. Este medio no es siempre favorable al crecimiento y en algunas especies, o cuando las concentraciones celulares son altas, se hacen burbujear nitrógeno en el medio de cultivo, o bien añadir compuestos reductores (sulfito sódico, B-mercaptoetanol, ditioeritrol, etc.), para equilibrar el potencial Redox.

Todos estos factores no son independientes sino que se influyen mutuamente; así el crecimiento a una determinada temperatura depende de la iluminación, de la salinidad, del pH y del potencial Redox, entre otras variables de cultivo de una determinada especie sea un estudio complejo

**4.7.2 Requerimientos nutritivos.** Según Krauss citado por Guerrero y Villegas “el medio químico es definido como una solución diluida, de la cual es extraído por las algas todo el material bruto necesario para la estructura y la síntesis protoplasmática.

[15] CARMONA, Op. Cit; p. 16

Varios son los nutrientes requeridos por las algas, unos son denominados macro nutrientes o nutrientes esenciales para el desarrollo de las plantas, generalmente encontrados en cantidades significativas (carbono, nitrógeno, fosforo, potasio, silicio, calcio, magnesio, hidrogeno, oxígeno y azufre), otros son denominados micronutrientes o nutrientes requeridos en pequeñas cantidades por los organismos" [16].

- **Carbono.** Según Fiala, "la mayoría de las especies fototrópicas utilizan algunas fuentes de carbono o de gas carbónico, en la forma de gas libre o de bicarbonato, dependiendo del pH del medio. Estas algas constituyen la mayoría de las especies de fitoplancton"[17].

Álvarez, indica "que Las algas son seres capaces de formar compuestos orgánicos a partir del $CO_2$ y sales minerales con la ayuda de la luz (fotosíntesis). La cantidad de $CO_2$ en el cultivo es, por lo tanto, factor limitante de primera importancia para el crecimiento de las microalgas, el $CO_2$ se añade al cultivo mediante el uso de tanques de alta presión que contiene la mezcla apropiada de aire/$CO_2$ (5% parece ser el óptimo). También puede considerarse la adición de carbonatos o bicarbonatos, tales como los que ya llevan en disolución el agua del mar"[18].

- **Nitrógeno.** Para Boyd, citado por Álvarez "la fijación de nitrógeno molecular ($N_2$) atmosférico por procesos biológicos, meteorológicos o industriales es el principal recurso de nitrógeno inorgánico para los sistemas acuáticos. El nitrógeno esta combinado en el agua en la forma de nitrato ($NO_3^-$), nitrito ($NO_2^-$), amonio ($NH_4^+$) y trazas de compuestos orgánicos que contienen nitrógeno. La mayoría del nitrógeno de los compuestos orgánicos existen como grupos aminos en las proteínas que provienen de los alimentos no ingeridos, excretas, organismos en descomposición, y a través de los constantes procesos microbiológicos" [19].

- **Fosforo**. El mismo autor argumenta que el fósforo se encuentra en el agua casi completamente como iones ortofosfato ($PO_4H_2^-$ y $PO_4H_2^-$) con pequeñísimas concentraciones de fósforo orgánico. Este elemento al igual que el nitrógeno es

[16] GUERRERO, R. D. y VILLEGAS, C.T. Report of the training course on growing food organism for fish hatcheries. Philippines, South China: Sea Fisheries Development/Coordinating Programam, 1982. p 45.

[17] FIALA, M. Phytoplankton: biomasse, production, numeration et culture. Jacques, Antillas Francesas: UNESCO, 1979. p 54.

[18] ÁLVAREZ, Op. Cit., p. 31.

[19] Ibid; p. 31

importante para el crecimiento de las algas, los que junto a otros constituyentes esenciales son comúnmente conocidos como “nutrientes”.

La concentración de estos nutrientes es mayor en la profundidad que en las aguas superficiales donde se da un rango de 1 a 120 µg/l de $NO_3$ - N y de 0 a 20 µg/l de $PO_4$-P. En las aguas profundas estas concentraciones pueden llegar a 200 µg/l de $NO_3$-N y 40 µg/l de $PO_4$ – P debido a la producción de nutrientes por descomposición bacteriana de la materia orgánica depositada en el fondo.
Las concentraciones relativas de nitrato y fosfato permanecen constantes. El radio N: P normalmente es de 7:1 en peso y de 15:1 en iones. Esta estrecha relación indica que los iones son absorbidos por los organismos vegetales (algas) y animales (zooplancton). En el caso del fósforo las aguas naturales responden a la adición de este elemento con una mayor producción de plantas. Experiencias con fertilización de estanques también sugieren surgieren que la aplicación de fosfatos incrementa la productividad primaria de los mismos. Aunque el fósforo es un constituyente menor del agua, sin embargo tiene gran importancia biológica, sobre todo si lo analizamos dentro de la acuacultura donde lo consideramos como elemento que más frecuente limita la productividad en un ecosistema acuático natural o en un estanque[20].

- **Potasio.** Este es un nutriente esencial para todas las algas, las cuales no requieren en altas cantidades para su crecimiento y desarrollo. Por eso el potasio es un macronutriente o nutriente al igual que el nitrógeno y el fósforo. Fomenta la fotosíntesis activando las enzimas que promueven la transferencia de energía, la generación ATP y estimula la síntesis de los azucares, almidón, proteínas y otros compuestos orgánicos[21].

- **Micronutrientes.** Marshall[22], menciona que aunque no se consideran factores limitantes tan importantes como el N, P, K, en ocasiones aparecen otros elementos inorgánicos en concentraciones limitantes, ya sea como deficiencia o a niveles tóxicos. Los elementos que se requieren en cantidades muy pequeñas aparecen por lo general a niveles muy suficientes en las aguas eutróficas, pero pueden ser deficientes en las oligotróficas. Los experimentos de enriquecimiento han demostrado que la productividad se intensifica al añadir magnesio, cobre, zinc, cobalto, molibdeno, entre otros. Además de estos compuestos también pueden ser requeridas algunas vitaminas como $B_{12}$, $B_1$ (Tiamina) y Biotina.

[20] Ibid; p. 19.

[21] Ibid; p. 20.

[22] MARSHALL, Darley. Biología de las algas: Enfoque fisiológico. México: Limusa, 1987. p. 68.

## 4.8 MEDIOS DE CULTIVO

Según Tacon “varias formulaciones de medios de cultivo han sido utilizadas para el cultivo de algas, dependiendo de la necesidad de nutrientes de las especies algales cultivadas. Generalmente la composición química de los medios definidos es derivada y modificada a partir de formulaciones básicas de medios pioneros en la ficología. Los cambios han sido a adoptados a partir de resultados obtenidos en experimentos realizados con requerimientos o limitaciones de nutrientes. Estas investigaciones son básicas en la ficología, no solo para propuestas académicas, sino que también para producción de masa, la cual es necesaria en prácticas de acuacultura” [23].

Para Álvarez, “los medios son generalmente preparados a partir de soluciones stock previamente mezcladas. Las alícuotas de estas soluciones son medidas y agregadas a un volumen dado de agua. En algunos casos los componentes indicados son pesados y agregados directamente al volumen de agua, quedando así preparado el medio, los procedimientos incorrectos pueden causar precipitaciones, especialmente nitratos y fosfatos; Las soluciones stock pueden prepararse y almacenarse en frio por largo tiempo, para lo cual se recomienda el uso de recipientes con tapa de vidrio, todas estas soluciones deben prepararse con agua destilada” [24].

Según la FAO, “las principales fórmulas utilizadas van desde el agua de Miguel, que data en 1910, desarrollada por Allen-Nelson; el medio de End-Schereiber de 1934, hasta formulas específicas para familias como la fórmula del laboratorio Haskins de Nueva York para diatomeas, Provasoli *et al;* 1975; Matthiesen & Thorner, 1966, Mclachlan, 1973; Guillard F; 1973*; Droop, 1975, 1979; Schoene, 1982, etc. Las principales formulaciones de los medios de cultivo, tanto de mantenimiento de cepas como de producción masiva (minerales, enriquecidos y orgánicos)” [25]. Tabla 1.

[23] TACON, A. G. J. The nutrition and feeding of farmed fish and shrimp. A training manual II: Nutrient sources and composition. Brasilia: FAO, 1987. p 20.
[24] ALVAREZ, Op; cit; p 22.
[25] ORGANIZACIÓN D DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACION (FAO). Producción de alimento vivo y su importancia en acuacultura [online]. Roma: FAO; 2005 (citado el 20 de junio de 2010). Disponible en internet: http://www.fao.org/docrep/003/AB4735/AB3s01.htm.

**Tabla 1. Medio de Guillar "F/2" (J. Stein, 1979)***

| Nutrientes Mayores | Solución Primaria |
|---|---|
| $NaNo_3$ | 7.5 % w/v |
| $NaH_2PO_4.H_2O$ | 0.5 % w/v |
| $NH_4Cl$ | 2.65 % w/v |
| $Na_2SIO_3.9N_2O$ | 3 % w/v (calentar para disolver) |

Usar un mililitro de estas soluciones por litro de agua de mar, para preparar el medio "F/2". Sugerencia: Preparar el NaNO3 junto con $NaH_2PO$. $H_2O$ en 100 mililitros.

| Metales Traza | Solución Primaria |
|---|---|
| $CuSO_4.5H_2O$ | 0.98 % w/v |
| $ZnSO_4.7H_2O$ | 2.2 % w/v |
| $ZnCl_2$ | 1.05 % w/v |
| $CoCl_2.6H_2O$ | 1.0 % w/v |
| $MnCl_2.4H_2O$ | 18 % w/v |
| $Na_2MnO_4.2H_2O$ | 0.63 % w/v |

Es conveniente hacer las soluciones primarias en forma individual.

- **Solución Primaria de Metales Traza**

A. Con "Secuestrante Férrico" (Cloruro Férrico):

Disolver 5 gr del Secuestrante Férrico en 900 ml de agua destilada y añadir 1 ml de cada una de las soluciones primarias de metales traza preparados anteriormente; aforar a un litro y asegurar que el pH quede cerca de 4.5. Use 1 ml de esta solución por cada litro de agua de mar para hacer el medio de cultivo. Agua de mar filtrada (5µ, 10µ, etc.) y de ser posible irradiada con UV.

B. Con EDTA y Cloruro Férrico ($FeCl.6H_2O$)

Disuelva 3.15 g de FeCl.6H2O ó 4.36 de EDTA ($Na_2$) en 900 ml de agua destilada, agregue 1 ml de cada una de las soluciones stock primario de metales traza y afore a 1 litro, asegure un pH de 2.0.

Use 1 ml de esta solución por litro de agua de mar para preparar el medio "F/2".
Solución Primaria de Vitaminas

Solución Primaria de Biotina: Se prepara a partir de cristales de Bl, disolver 10 mg de Biotina en 96 ml de agua destilada. Haga esta solución ligeramente ácida para ser autoclavada y manténgase en un congelador.

Solución de vitamina B12: A partir de Cyanocobalamina U.S. de 1000 mg/ ml solución inyectable. Tomar 1 ml y aforarlo en 100 ml de agua destilada. La solución se acidifica para ser autoclavada y se congela.

- **Solución Primaria de Vitaminas**

Tomar 1 ml de la solución primaria de Biotina y 0.1 ml de la solución stock primaria de B12, aforar a 100 ml con agua destilada y añadir 20 mg de Tiamina HCl.

Se pueden preparar ampolletas de 2, 5 ó 10 ml y almacenarlas estériles (acidificas) en el congelador.

Utilizar 0.5 ml de esta solución por cada litro de agua de mar para preparar el medio "F/2".

- **Preparación del Buffer "Tris"**

Tome 50 g de "Tris" y disuélvase en 200 ml de agua destilada y ajuste el pH a 7.2 en HCL. Use de 1 a 5 ml por litro de medio antes de la autoclave, ajustando el pH a 7.4 (recomendado usar 1 ml por litro cuando el pH del medio es 7.9–8.2).

**4.8.1 Formas de cultivo.** Según Álvarez, "las formas de cultivo se pueden clasificar de la siguiente manera" [26].

**4.8.1.1 Por su naturaleza.** Los cultivos por su naturaleza pueden ser:

- **Cultivo Intensivo.** Aquí los factores de crecimiento se mantienen bajo un sistema controlado, de tal manera que se pueda obtener una máxima respuesta en la producción.

- **Cultivo Extensivo.** En esta clase de cultivo solo se controla las variables más accesibles en su manejo, tales como las características del medio y la densidad el cultivo.

**4.8.1.2 Por la forma de Cosechar.** Se clasifican en:

- **Cultivos Continuos.** La población algal, las características químicas del medio, la temperatura y finalmente la luz son mantenidas en un valor constante por

[26] ALVAREZ, Op. Cit; p.35

periodos prolongados, procurando un flujo sostenido de requerimientos del producto.

➢ **Cultivo Batch.** Estos cultivos son intermitentes, se implementan de una sola vez y son cosechados completamente después que la producción algal alcance un nivel apropiado, medido en número de células por ml. En el momento de la cosecha el cultivo debe estar en la fase exponencial.

➢ **Cultivos Semicontinuos.** Aquí se cosecha una parte del medio según la producción y se renueva el volumen cosechado por medio de un cultivo fresco.

**4.8.1.3 Por la pureza del cultivo.** Entre estas formas de cultivos estarían:

➢ **Cultivos Axénicos.** Son cultivos libres de bacterias y estériles, para mantener la productividad por un periodo prolongado de tiempo.

➢ **Cultivos monoespecificos (clónales).** Aquí la población de microalgas está parcialmente contaminada por otros microorganismos como bacterias y protozoarios. Son empleados en cultivo de tipo Batch y extensivos.

**4.8.2 Técnicas de aislamiento y purificación** Según la FAO, "Muchos métodos se han desarrollado para obtener cultivos monoespecíficos (de una sola especie) y axènicos (libres de contaminantes). A continuación se brinda una breve descripción de algunos de los principales métodos que se utilizan para aislar y purificar microalgas"[27].

**4.8.2.1 Método de aislamiento.**

➢ **Pipeteo Capilar.** Se utiliza para separar microalgas mayores de 10µ, mediante una pipeta construida con un tubo capilar, a través del microscopio óptico se "pesca" las células y se separan en pequeñas gotas de nutrientes colocados alrededor de una caja de petri o en portaobjetos escavados.

➢ **Rayado de Placas de Agar.** Se transfieren pequeñas gotas de plancton con un asa de siembra, extendiendo por estrías (rompiendo un poco el agar).

Este agar se preparará con una solución nutritiva para microalgas y con una relación de 1–1.5% w/v de agar disuelto en el medio nutritivo, se incuba la placa bajo iluminación a 18 a 20°. De este primer crecimiento se transfiere a tubos con agar inclinado sembrando por estrías o bien, se transfiere a medios líquidos en

[27] ORGANIZACIÓN D DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACION (FAO). Producción de alimento vivo y su importancia en acuacultura [online]. Producido por el departamento de pesca (citado el 14 de junio de 2010). Disponible en internet: http://www.fao.org/docrep/003/AB4735/AB3s01.htm.

subcultivos sucesivos para su purificación, de tal manera que en cada dilución se reduzca el número de organismos en un mililitro, es recomendable combinar la técnica de diluciones con la de transferencia en placa de agar o tubo inclinado para obtener cultivos clónales (de una sola colonia o célula) y poder establecer el cultivo monoespecífico. Después de 10 días, pequeñas colonias aparecen sobre la superficie del agar, que se pueden transferir mediante el Método de Hocking o de la micropipeta a medios líquidos.

**4.8.2.2 Métodos de purificación.** Como ya se mencionó al describir las técnicas de aislamiento, estas mismas permiten purificar el cultivo a través de las resiembras clónales sucesivas, pero además es recomendable entre otros métodos el uso de antibióticos para eliminar otros microorganismos, generalmente de tipo bacteriano que estén contaminando el cultivo de microalgas de nuestro interés.

**4.8.3 Procedimiento general en el cultivo de las microalgas** Janet, menciona "algunos procedimientos para el cultivo de las microalgas" [28].

**4.8.3.1 Mantenimiento de Cepas.** En esta etapa las cepas (stocks) de algas se mantienen en fiolas o matraces de 250L con 100 ml de medio de cultivo y/o placas con agar. El medio de cultivo se prepara según el procedimiento descrito para cada caso y según la especie, sea esta de mar o de agua dulce. Esta etapa tiene carácter de cultivo axénico por lo que un máximo de cuidado se debe tener para no contaminar las cepas. La intensidad de luz debe estar entre 500 y 1000 lux y la temperatura de 15$^{o}$C constante. La cepa se mantiene en una incubadora que brinda todas estas facilidades. Las cepas también se mantienen en tubos de ensayo con tapa rosca o de algodón de 20 centímetros cúbicos.

**4.8.3.2 Cultivo Inicial.** El cultivo inicial se desarrollara erlenmeyers de 350 ml, con 250 ml de medio nutritivo. La inoculación de las algas se realiza cuando las fiolas esterilizadas han alcanzado la temperatura ambiente, transfiriendo asépticamente bajo una campana de luz UV, un volumen de 1 a 5 ml de cepa al medio fresco. La boca de estos recipientes se debe flamear para "quemar" microorganismos que puedan ingresar al interior. Luego de la inoculación las fiolas son puestas en la estantería iluminada junto a uno de los matraces viejos para observar luego de uno a dos días el crecimiento rápido del nuevo cultivo. Estos cultivos deben agitarse manualmente en forma periódica y suavemente, a fin de variar la posición de las células. La intensidad de la luz debe estar entre 1500 y 2000 lux.

**4.8 .3.3 Cultivo Intermedio.** Esta etapa se desarrolla en fiolas de 1000 a 2000 ml, con medios del 60 al 65% de la capacidad total. Se transfieren los antiguos cultivos que hacen de stock (cultivo inicial) de 4 a 7 días. Esta inoculación se hace

[28] JANET, R. Handbook of phycological methods: culture methods and growth measurements. Inc: J. Ecol. Brazil. Vol. 30, No. 6 (ene-feb. 1993). p. 20.

bajo el mismo esquema del caso anterior evitando que las algas sedimentadas pasen al nuevo medio. Se transfieren aproximadamente de 80 al 90% del volumen total. Los nuevos recipientes son agitados con aire *filtrado a máximo 1,0 µm*, la temperatura se puede mantener a 18 $^{o}$C, igual para la etapa anterior. La intensidad de la luz puede ajustarse entre 2000 y 2500 lux.

**4.8.3.4 Cultivo en bolsas plásticas de 10 a 20 litros (Carboys).** Los cultivos intermedios son empleados como inoculo para los recipientes de 10 a 20 litros. El agua antes de ser enriquecida con los nutrientes es filtrada a 1µm y esterilizada con UV. El agua debe permanecer en reposo por una hora para reducir los peróxidos generados, a continuación fertilizar e inocular. Estos peróxidos afectan los pigmentos fotosintéticos de las algas. Flamear la boca de cada recipiente para evitar la contaminación; la intensidad luminosa se ajusta entre 2000 y 5000 lux. La temperatura se mantiene entre 18 y 20 $^{o}$C en cultivos Batch, las poblaciones algales alcanzan densidades mayores a los cuatro millones de células por mililitro. Igualmente en esta etapa el aire se debe filtrar como en el caso anterior.

**4.8.3.5 Cultivo Masivo.** El grado de contaminación bacteriana es mayor en esta etapa. La iluminación por lo general se coloca en la parte superior de los recipientes y la intensidad puede estar entre 4000 y 5000 lux. Los recipientes para estos cultivos son blancos en su parte inferior (base) o son transparentes en su totalidad. Los inóculos son obtenidos de la etapa anterior que presentan un crecimiento rápido y carecen de sedimento. En los cultivos masivos la aireación no es filtrada y generalmente se desarrolla externamente, aprovechando la iluminación del sol.

## 4.9 DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD DE POBLACIÓN DE LA MICROALGA.

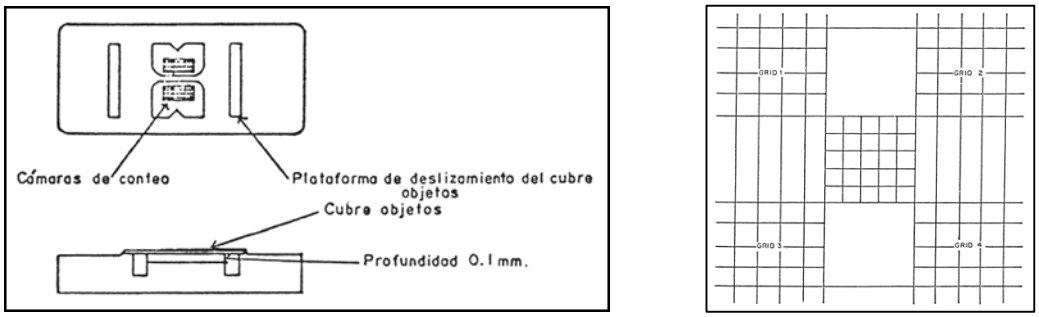
Según la FAO:

> Cuando el plancton es utilizado para alimentar larvas u organismos filtradores como los moluscos y algunos crustáceos, el suministro constante y la concentración de estos alimentos son factores que determinan la supervivencia y desarrollo de los organismos en cultivo. El método a utilizar para determinar el número de células presentes en una muestra de plancton, se hará mediante una pipeta Pasteur, a través de la cual se toma una muestra de plancton y se desliza en la cámara que previamente tiene adherido el cubreobjetos, se deja pasar 5 a 10 minutos para que la muestra se estabilice; se procede a contar mediante un contador de mano; en algunos casos es necesario diluir la muestra cuando la densidad es alta y también fijada cuando el plancton es móvil, siguiendo los siguientes pasos:
>
> 1. Se toma un milímetro de la muestra.
> 2. Se añade un mililitro de agua de mar filtrada preparada con formaldehido 4%.

3. Se deja reposar por tres minutos.
4. La muestra se homogeniza con una Pipeta Pasteur.
5. Se cuentan las células de cada una de las cámaras.

Una vez que se tiene el promedio de células de las cámaras, el cálculo total de células por mililitro se lleva a cabo de la siguiente manera[29]. Figura4.

**Figura 4. Conteo celular en Hematocímetro**




1. Cálculo del factor de dilución

$$F.D = \frac{m + f}{\mathbf{m}}$$

m = Muestra problema (ml)
f = Agua de mar con formaldehido (4%)

2. Se requiere también la profundidad del Hematocímetro, (incluida en el mismo en la parte inferior derecha).

$$P.H = Profundidad\ del\ Hematocímetro$$

3. Todo el cálculo se multiplica por 1000 para convertir a mililitros.
4. Se requiere el número promedio de células de la muestra problema.

$$N.P = Numero\ promedio\ de\ células\ por\ mililitro$$

Con todos los incisos anteriores se realiza el cálculo de número de células de la muestra problema por ml y la fórmula queda así:

$$Numero\ de\ Células = D.F\ x\ P.H\ x\ 1000\ x\ N.P$$

[29] ORGANIZACIÓN D DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACION (FAO). Producción de alimento vivo y su importancia en acuacultura [online]. Producido por el departamento de pesca (citado el 14 de junio de 2010). Disponible en internet: http://www.fao.org/docrep/003/AB4735/AB3s02.htm.

## 5. DISEÑO METODOLÓGICO.

### 5.1 LOCALIZACIÓN.

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio Macrobio, productor de postlarvas de camarón blanco *(Penaeus vannamei),*ubicado en la línea norte de la costa del Golfo de Guayaquil, en lo que corresponde a la Provincia de Santa Elena (01° 59‘3,6 S Y 80° 44.56,8‘ W), y Cantón Ayangue, república del Ecuador; este sector brinda 2 estaciones claramente definidas con una temperatura en verano de 25 ° C y de 28 ° C en invierno, siendo su temperatura media anual de 25 °C [30] (Instituto Oceanográfico de la Armada del Ecuador - INOCAR). Figura. 5 y 6.

**Figura 5. Laboratorio Macrobio**

**Figura 6. Localización del laboratorio Macrobio**

[30] (Instituto Oceanográfico de la Armada del Ecuador - INOCAR). http://www.inocar.mil.ec/meteorologico.php

## 5.2 PERÍODO DE ESTUDIO.

La investigación duro un mes el cual estuvo dividido en tres etapas; la primera de ellas abarcó la respectiva adecuación de instalaciones; la segunda comprendió la etapa de pre-ensayo; y finalmente, la tercera fue la etapa de ensayo, donde se desarrollaron las actividades de siembra, muestreo, en los respectivos recipientes de los cuatro tratamientos propuestos junto con la toma de parámetros fisicoquímicos.

## 5.3 INSTALACIONES, MATERIALES, EQUIPOS E INSUMOS

**5.3.1 Instalaciones.** El laboratorio Macrobio cuenta con la siguiente infraestructura física del laboratorio de algas utilizado en la producción e investigación:

Área total de 200 $m^2$, de las cuales:

Laboratorio de algas 100 $m^2$ dividida en

- Sala de Inoculo 15 $m^2$.
- Sala de Cultivos Puros 15 $m^2$.
- Sala de Carboys 45 $m^2$.
- Sala de Desinfección 25 $m^2$.

Tanques rectangulares 85 $m^2$.
Tanques de masivos 15 $m^2$.

**Figura.7 Sala de inoculo.**

**5.3.2 Materiales:** Los materiales empleados fueron. Figura 8.

- Tubos de ensayo de 20 ml
- Fiolas – erlenmeyers de 350 ml
- Botellones o frascos de 3 L
- Bolsas plásticas (Carboys) 20 L
- Mangueras de 3/16 para aireación.
- Manguera de una pulgada
- Baldes de 20 L
- Vidriería del laboratorio.
- Lámparas fluorescentes de 1000 - 4000 lux.
- Papelería
- Papel absorbente
- Guantes
- Mascarilla
- Cubreobjetos
- Portaobjetos
- Mechero de gas
- Peras de succión
- Gradilla
- Calculadora
- Libreta de apuntes
- Jarras plásticas de 1 L

**Figura 8. Materiales de uso en Cultivos Microalgales.**

**5.3.3 Equipos:** los equipos utilizados son: figura 9.

- Blowers de 1 y 2.5 Hp o aireador marca Jaccuzy
- Bomba de 1 Hp y 7.5 Hp marca Jaccuzy
- Cámara de Neubauer o Hemocitometro
- Microscopio Nikon VS2-H triocular Olimpus
- Filtros de piola 1 µ
- Filtros de piola 5 µ
- Termómetro de mercurio
- Cámara fotográfica digital marca Sonny
- Computador marca Toshiba
- Salinómetro o refractómetro marca Vegge
- Cinta de pH
- Phmetro digital.
- Autoclave
- Cámara de flujo laminar.
- Andamios para producción
- Balanza digital marca Ohaus
- Refrigerador
- Aire acondicionado
- Agitador magnético

**Figura 9. Equipos**

**5.3.4 Insumos:** los siguientes son los insumos que se utilizaron durante la investigación. Figura 10.

➢ **Insumo biológico.**

- Microalgas cepa de *Thalassiosira weissflogii.*

➢ **Insumos químicos.**

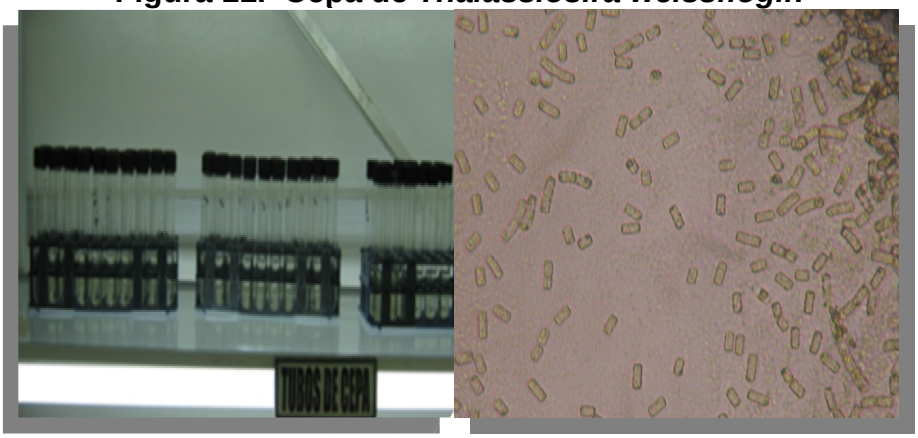
- Agua dulce
- Agua salada
- Agua destilada
- Medios de cultivo (F/2 Guillard)
- Hipoclorito puro y al 10 %
- Orthotolidine
- Thiosulfato de sodio
- Acido nítrico puro
- Alcohol 70 %
- Formol
- Gas Propano (Domiciliario)

**Figura 10. Insumos químicos.**

## 5.4 MATERIAL BIOLÓGICO

En el ensayo se utilizó la microalga *Thalassiosira weissflogii;* cultivo puro proveniente del cepario del Laboratorio de Larvicultura Macrobio. Figura 11

**Figura 11. Cepa de *Thalassiosira weissflogii*.**




## 5.5 PLAN DE MANEJO

Se realizó el cultivo a partir de tubos de ensayo de 20 ml, previa cosecha del medio de agar nutritivo, con posterior transferencia a erlenmeyers de 350 ml, pasando luego a botellones de 3 litros, y finalizando el cultivo en bolsas plásticas (Carboys) de 20 L de capacidad.

**5.5.1 Adecuación de Instalaciones.** La adecuación de las instalaciones del Departamento de Microalgas en el Laboratorio de Larvicultura Macrobio, se implementó de la siguiente manera:

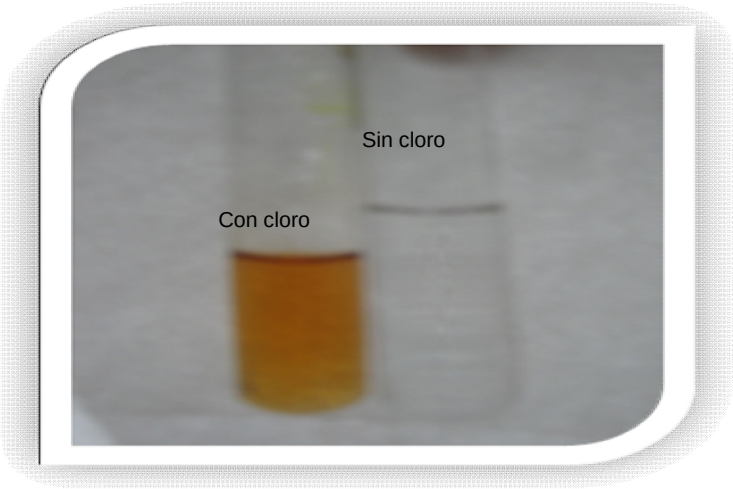
**5.5.1.1 Limpieza y Desinfección de Materiales y Equipos.** Esta actividad se realizó de acuerdo al protocolo de manejo establecido en el laboratorio de la empresa, durante las siguientes etapas.

**Desinfección de la Línea de Aire.** Se inicio con la humectación de una esponja con 100 ml de formol, que se coloca en el sistema de filtración del blower, este se disperso por la línea del aire, encendiendo el equipo por treinta minutos y luego de 24 horas se realizó el mantenimiento del aireador. Posteriormente se adicionó 300 ml de alcohol con el fin de permitir su circulación por toda la línea al encender el blower, y de esta manera ya está apto para su uso. Figura 12.

**Figura 12. Blowers**

➢ **Desinfección de Línea de Agua Salada.** Se preparó 3 toneladas de agua salada más 300 ml de hipoclorito y esta mezcla recirculó por la tubería, al tercer día se lavo con agua salada para eliminar todos los residuos de hipoclorito con verificación a través de la prueba con Orthotolidine. Figura 13.

**Figura 13. Prueba de cloro con Orthotolidine.**




➢ **Limpieza de Mangueras de Aire de 3/16.** En un recipiente con de 20 litros de agua más un litro de Acido Nítrico, se colocaron todas las mangueras para desinfectarlas durante un periodo de 24 horas.

➢ **Limpieza del material de vidriería.** Se procedió a lavar los materiales de vidrio con detergente para luego ser enjuagados con suficiente agua dulce; a continuación el material se sumergió en una solución que contenía 1 litro de Acido Nítrico mas 20 litros de agua dulce, por un periodo 48 horas, finalizando la limpieza con enjuague y esterilización por media hora. Figura 14.

**Figura 14. Desinfección de vidriería**

➢ **Limpieza de los Botellones de Plástico.** Se lavo con detergente y se enjuago con agua dulce, posteriormente aplicar aproximadamente 200 ml de una solución preparada con 100 ml de acido nítrico mas 1 litro de agua dulce, y procedió a lavar bien, luego enjuago con abundante agua hasta retirar todo el acido y dejar secar, para luego ser utilizados.

➢ **Desinfección del Laboratorio.** El piso se clorinó con 300 ml de hipoclorito al 10 %, mezclado con 60 litros de agua dulce y se esparció esta solución por todo el piso.

**5.5.1.2 Adecuación de los recipientes.** Una vez limpios y estériles los recipientes, a cada uno de ellos se les suministro a las líneas de aireación de acuerdo a los sistemas de producción donde se cultivó la especie de microalga.

**5.5.1.3 Preparación del agua.** El agua de mar que ingresa al laboratorio es conducida por una línea principal mediante una bomba con una capacidad de 7.5 HP, de la cual se derivan 3 líneas secundarias; una de estas líneas es la que conduce agua al departamento de algas mediante una bomba de menos capacidad de 3 HP. En cambio el agua dulce es adquirida de una cisterna o reservorio con un volumen de 100 toneladas.

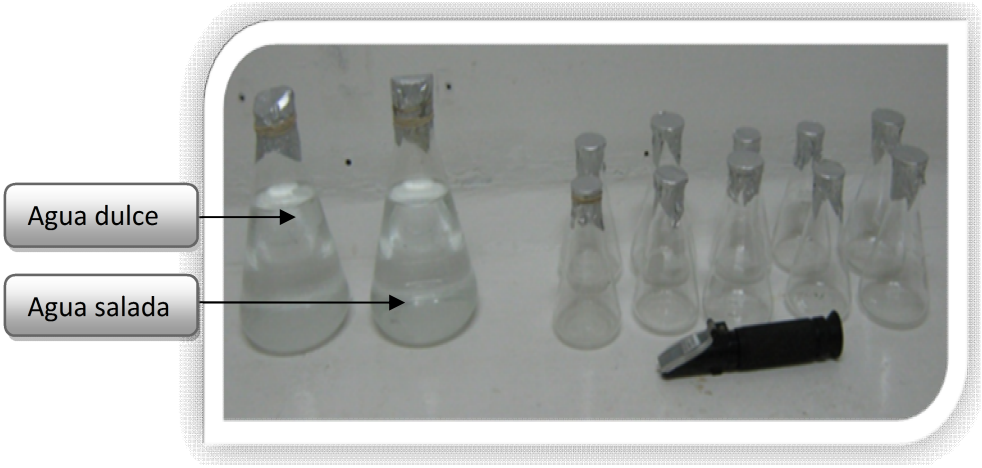
Tanto el agua salada como dulce, tuvo que pasar por medio de de unos filtros de 1 y 5 micras, para luego ser desinfectadas con hipoclorito de sodio puro; en este

proceso se llenaron 2 recipientes de 20 litros con agua de mar y otro con agua dulce, a los cuales se adiciono 10 ml de este químico, con el fin de acabar con bacterias que estén presentes en el medio; al siguiente día se agregó 5 ml de thiosulfato de sodio para neutralizar el hipoclorito, y de esta manera realizar la prueba para verificar la presencia de este químico; para tal efecto, se tomó muestra de agua en un tubo de ensayo y se agregó de 2 a 3 gotas de Orthotolidine, el agua permaneció cristalina indicando la ausencia de esta sustancia. Posteriormente el agua ya tratada pasó por previo tamizage con papel filtro y autoclavado a 15 PSI (libras de presion) por 20 minutos para volúmenes menores y para volúmenes de 10 litros fue de 30 minutos.

➢ **Preparación del agua a diferentes salinidades.** Luego de ser desinfectada el agua se preparó las salinidades correspondientes de acuerdo a los tratamientos a evaluar y la verificación de las salinidades con un Salinómetro marca Vegge, para luego ser utilizada para su debida nutrición. Figura 15. La fórmula utilizada fue la siguiente:

$$\text{Cantidad de agua salada} = \frac{\text{Volumen a preprar} * \text{salinidad deseada}}{\text{Salinidad del mar}}$$

**Figura 15. Materiales para la preparación de salinidades.**



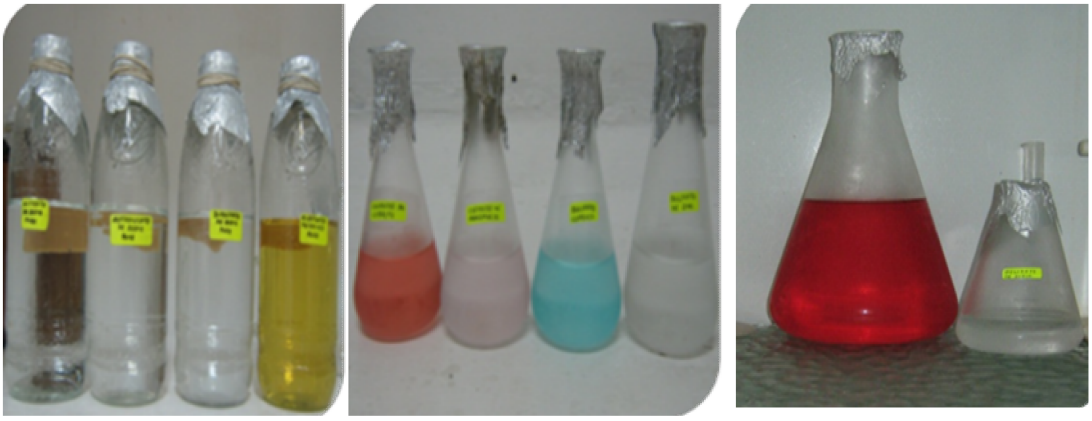

**5.5.1.4 Preparación de los medios de cultivo.** En esta etapa, se empleó el stock de nutrientes (macronutrientes, micronutrientes, metales traza y vitaminas), definidos en el método F/2 Guillard modificado, divididos en 5 soluciones descritos en la Tabla 2, estas mezclas fueron realizadas con compuestos químicos puros.

**Tabla 2. Medio de Cultivo F/2 GUILLARD Modificado.**

| GUILLARD F/2 (CULTIVOS PUROS) | |
|---|---|
| SOLUCION 1 | |
| Nitrato de sodio ( Na2NO3) | 150 gr/L |
| Fosfato de sodio (Na2HPO4) | 10 gr/L |
| SOLUCION 2 | |
| Metasilicato de sodio (Na2SiO3) | 30 gr/L |
| SOLUCION 3 | |
| Cloruro ferrico (FeCL3) | 3.2 gr/L |
| EDTA | 4.4gr/L |
| SOLUCION 4 | |
| Molibdato de sodio | 1 gr/L |
| Cloruro de manganeso | 36 gr/L |
| Cloruro de cobalto | 2 gr/L |
| Sulfato de zinc | 4.4gr/L |
| Sulfato cúprico | 2 gr/L |
| SOLUCION 5 | |
| B1 (tiamina) | 20 gr/L |
| B12 (cianocobalamina) | 0.1 gr/L |
| H (biotina) | 0.1 gr/L |

Cada solución se disolvió en 1 litro de agua destilada para ser llevada a la autoclave que luego fueron mantenidas en recipientes forrados con papel aluminio para evitar su degradación y fueron mantenidas en refrigeración para su conservación. La cantidad de estos nutrientes utilizada fue por cada litro de agua a nutrir se aplico 1ml para macromutrientes como para los micronutrientes y de 0,1 ml de vitaminas. Figura 16.

**Figura 16. Medio de Cultivo F/2 GUILLARD.**



**5.5.2 Cultivo de la microalga.** El cultivo fue restricto al protocolo del Laboratorio Macrobio, el cual maneja una temperatura de 20 °C ± 2 °C dentro de una cámara con iluminación de 1000 y 4000 lux; aire acondicionado permanente a través de un blower de 1 y 2.5 HP. Tabla 3.

**Tabla 3. Condiciones para las dos salas de Cultivo.**

| SALA DE CEPARIO | | SALA DE CARBOYS | |
|---|---|---|---|
| Temperatura | 17 $^{o}$C | Temperatura | 21 $^{o}$C |
| Iluminación | 1000 lux | Iluminación | 4000 lux |
| Blower | 1 HP | Blower | 2.5 HP |

**5.5.3 Protocolo de Cultivo de Microalgas.**

**5.5.3.1 Cultivo en tubos.** Para este cultivo se realizó los siguientes pasos.

➢ Se preparó 4 erlenmeyers rotulados, descritos con su correspondiente tratamiento. Cada recipiente, contenía 100 ml de agua previamente esterilizada, enriquecidos con 0,1 ml de nutrientes y 0,01 ml de vitaminas, en mezcla homogénea; esta procedimiento se realizó dentro de la cámara de flujo laminar y cerca de la flama del mechero. Figura 17.

**Figura 17. Adición de nutrientes.**

➢ Se seleccionaron 5 tubos que contenían 10 ml de la cepa de la microalga *Thalassiosira weisflogii*, los cuales presentaran las mejores condiciones, entre ellas, células jóvenes, en división, buen color, libres de contaminantes como

bacterias, hongos u otra especie de alga; la muestra se tomo dentro de una cámara estéril y cerca de la llama del mechero, estos tubos seleccionados se mezclaron en un erlenmeyer para homogenizar la muestra y de esta manera poder sembrar los tubos de producción en una densidad estándar para todos los tubos a evaluar.

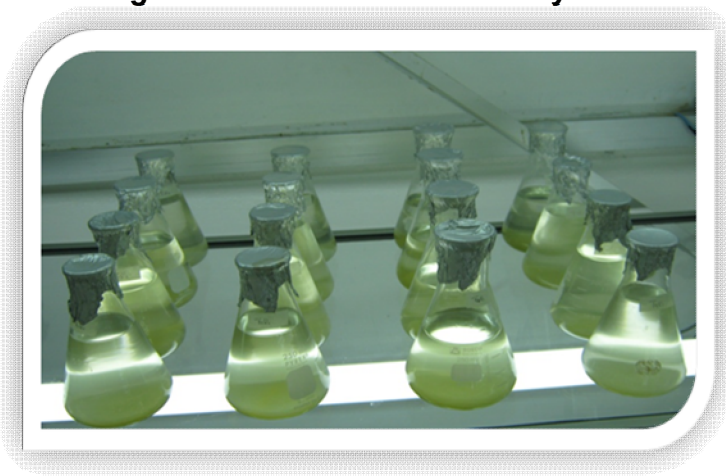
➢ Posteriormente se inicio con la preparación de 16 tubos de ensayo identificados respectivamente con su número de tratamiento y replica, los tubo tienen una capacidad de 20 ml a los cuales se adiciono 7 ml de medio nutritivo y 3 ml de inoculo por medio de una pipeta flameada, este procedimiento fue realizado dentro de la cámara laminar. La verificación de la densidad poblacional en cultivo fue estimada por medio de la cámara Neubauer (100,000 cel/ml), para cada uno de los tratamientos, luego se procedió a tapar los tubos e incubar, con agitación manual continua y homogénea 3 veces al día para facilitar el intercambio gaseoso y para ayudar por medio de movimiento a la reproducción vegetativa de las células. Los cultivos permanecieron en la sala de cultivos puros, en una gradilla cerca de la luz fluorescente y a una temperatura de 17$^{o}$C con las condiciones estándar de cultivo. El monitoreo fue ejecutado cada 6 horas, incluyendo aquí los parámetros físico-químicos como el crecimiento poblacional de la microalga evaluada. Figura 18.

**Figura 18. Cultivo en Tubos.**

**5.5.3.2 Cultivo en Erlenmeyers.** Pasado los 3 días de cultivo en los tubos de ensayo, se procedió a sembrar en 16 erlenmeyers, con agua previamente tratada igual con la que se hizo para la producción en tubos y nutrida de acuerdo a su contenido, así por ejemplo, 243 ml de medio nutritivo y 7 ml de inoculo proveniente de los tubos de ensayo evaluados; la siembra de las algas fue realizada asépticamente bajo una campana, con el ánimo de flamear la boca de estos recipientes y así matar microorganismos que puedan ingresar al interior; una vez,

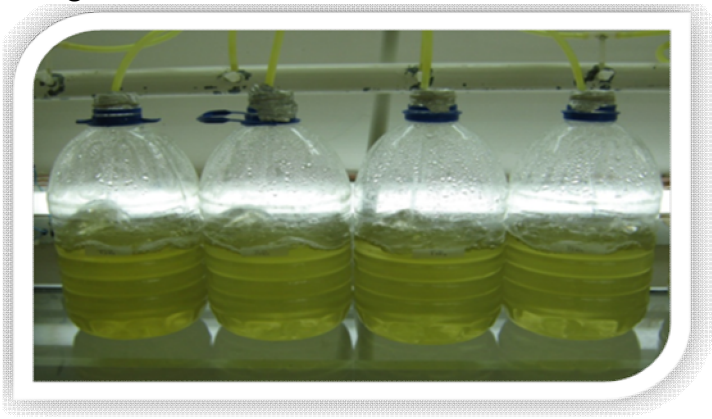
inoculados los erlenmeyers, estos fueron ubicados en la estantería iluminada de la sala de cultivos puros bajo las mismas condiciones que estuvieron los tubos evaluados; y se agitaron manualmente en forma periódica y suave, a fin de variar la posición de las células. Figura 19.

**Figura 19. Cultivo en Erlenmeyers.**



**5.5.3.3 Cultivo en Botellones de 3 litros.** Fue preparada el agua un día antes a su utilización para el cultivo de la diatomea en botellones o frascos de 3 litros de capacidad; el día de la siembra, se preparo los 16 frascos previamente rotulados con las 4 diferentes salinidades correspondientes a los tratamientos, y fue adicionado 2,325 ml de medio nutrido a razón de 1ml por litro y 175 ml de inoculo que contenía los erlenmeyers. La boca de los embases fueron cubiertas con papel aluminio para evitar la contaminación, y luego se dispuso las debidas mangueras de 3/16 con su respectiva varilla de vidrio para la aireación y así mantener las microalgas en suspensión, además de evitar la proliferación de bacterias, protozoarios y otros microorganismos, finalmente estos cultivos fueron llevados hasta la sala de cultivos puros los cuales se mantuvieron en condiciones iguales a los procedimientos anteriores de cultivo. Figura 20.

**Figura 20. Cultivo en Botellones de 3 litros**



**5.5.3.4 Cultivo en Bolsas Plásticas de 20 litros (Carboys).** Del cultivo anterior, se tomó el inoculo para los 16 recipientes con capacidad de 20 litros, los cuales fueron llenados con 10,250 ml de agua previamente nutrida y 1,750 ml de inoculo. Esta siembra fue realizada, bajo condiciones de esterilidad con el mechero a gas, y los investigadores con un eficiente lavado de manos con jabón líquido y desinfectando la mesa con alcohol; las bolsas plásticas fueron mantenidas bajo las mismas condiciones anteriores. La disposición final de los Carboys, se efectuó en la parte baja de la estantería con el fin de soportar el peso. Figura 21.

**Figura 21. Cultivo en Bolsas plásticas.**

**5.5.4 Seguimiento del cultivo de microalgas.** El crecimiento poblacional se analizo a través del conteo de células por mililitro de muestra, con un recuento de cada 6 horas, tomando una alícuota por recipiente, para posteriormente ser observadas y contadas en la cámara Neubauer en un montaje microscópico. Paralelamente a este procedimiento se monitoreo parámetros físicos y químicos como temperatura, salinidad y pH. Para el análisis de estas variables de estudio se utilizo el software SAS versión 9.0 y Microsoft Excel 2007.

Estas variables físicas y químicas fueron evaluadas a través de medios electrométricos y colorimétricos. La variable tiempo de crecimiento, se evaluó diariamente mediante conteos celulares en muestras de 1 ml por recipiente, hasta establecer las fases propias de su desarrollo entre las cuales fue definidas las etapas de Adaptación, Exponencial, Declinación Relativa, Estacionaria y Muerte.

**5.5.5 Determinación de la Densidad de Población de la microalga**. El método utilizado para determinar el número de células presentes en la muestra de fitoplancton, fue empleando una pipeta Pasteur, a través de la cual se tomo una muestra de fitoplancteres para ser adicionada en la cámara Neubauer que previamente tiene adherido el cubreobjetos; se dejo reposar para estabilizar la muestra por espacio de 3 minutos.

## 5.6 TRATAMIENTOS

La presente investigación, utilizó 3 tratamientos y un testigo en el siguiente modelo: Tratamiento 1, se evaluó el crecimiento a una salinidad de 20 ppm; Tratamiento 2, salinidad de 25 ppm; Tratamiento 3, salinidad de 30 ppm y finalmente, el Tratamiento testigo a 35 partes por millón de salinidad (ppm); cada tratamiento se cualifico con 4 replicas. Tabla 4.

**Tabla 4. Distribución de los Tratamientos y Replicas**

| **TRATAMIENTOS** | **T1** *20 ppm* | **T2** *25 ppm* | **T3** *30 ppm* | **T0** *35 ppm* |
|---|---|---|---|---|
| **REPLICAS** | **R1** | **R1** | **R1** | **R1** |
| | **R2** | **R2** | **R2** | **R2** |
| | **R3** | **R3** | **R3** | **R3** |
| | **R4** | **R4** | **R4** | **R4** |

## 5.7 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

**5.7.1 Diseño del experimento**. Se utilizo un diseño completamente al azar (DCA) con submuestreo , conformado por cuatro tratamientos y cuatro réplicas para cada uno de ellos, aplicando submuestreos, permitiendo con estos que las pruebas estadísticas tuvieran mayor veracidad.

El modelo matemático que representa el diseño es el siguiente:

$$y_{ijk} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij} + \eta_{ijk}; \quad i = 1,2,3,4; \quad j = 1,2,3,4; \quad k = 1,...,m$$

Dónde:

$y_{ijk}$ = Variable respuesta

$\mu$ = Media poblacional

$\tau_i$ = Efecto del *i-ésimo* tratamiento

$\varepsilon_{ij}$ = Error experimental asociado a la *j-ésima* unidad experimental que recibe el *i-ésimo* tratamiento

$\eta_{ijk}$ = Error de muestreo asociado a la *k-ésima* muestra

### 5.7.2 Hipótesis

**Hipótesis nula (Ho).** No existen diferencias significativas entre los tratamientos.

Ho: μ1 = μ2 = μ3 = μ4

**Hipótesis alterna (H1).** Al menos uno de los tratamientos tiene un efecto medio diferente sobre las variables estudiadas.

H1: μ1 ≠ μ2 ≠ μ3 ≠ μ4

## 5.8 VARIABLES DE EVALUACIÓN

**5.8.1 Densidad algal.** Determina la concentración de algas por unidad de volumen, conseguido en un momento dado, en los diferentes tratamientos y métodos de producción.

**5.8.2 Tiempos de crecimiento microalgal.** A través de esta variable se pretende establecer la característica de interés que estime el tiempo aproximado para alcanzar cada una de las fases del crecimiento microalgal.

**5.8.3 Análisis de relación Beneficio - Costo.** Es el índice que resulta de dividir los beneficios (flujos de efectivo) entre los costos variables, a precios actuales de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$RCB = \frac{B}{C}$$

*RBC: Relación beneficio costo*
*B: Beneficio*
*C: Costo*

# 6. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

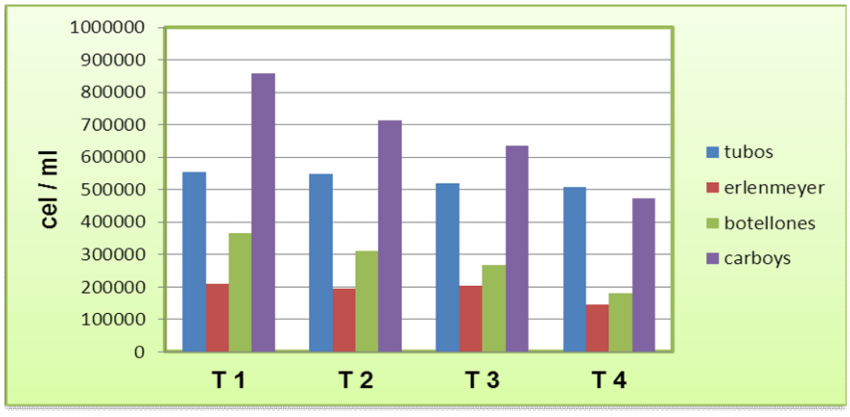
## 6.1 VARIABLES EVALUADAS

Se verifico los supuestos para la variable crecimiento poblacional, detectando desviaciones de la normalidad según la prueba de Shapiro-Wilk, exceptuando los carboys. Anexo A. De acuerdo con Montgomery (2003)[31] los diseños completamente a azar son robustos para esta situación y los resultados obtenidos se pueden validar si se obtienen los mismos resultados que con la prueba no para métrica de Kruskal Wallis, hecho que fue corroborado.
En términos generales se obtuvo diferencias significativas para tubos, erlenmeyers, botellones, mientras para carboys no hubo diferencias significativas. Ver anexo B.

**6.1.1 Análisis para Crecimiento Poblacional.** Cuando se probaron las diferentes salinidades, en tubos, erlenmeyers, botellones y carboys se demostró que en todos los tratamientos hubo crecimiento, esto se debe a lo planteado por Guillard (1972), "donde se refirió a que todas las células fitoplanctónicas se adaptan fisiológicamente a la salinidad ajustando su concentración interna de sales a un nivel un poco superior al de su medio de crecimiento. Esto establece una presión osmótica que favorece el flujo del agua hacia el interior de la célula manteniendo la turgencia de la misma"[32].

De los tratamientos evaluados el que presento mejor comportamiento respecto al resto de las salinidades evaluadas fue el T1 (20ppm) como se muestra en la figura 22.

**Figura. 22. Crecimiento poblacional de la Microalga *T. weissflogii.***



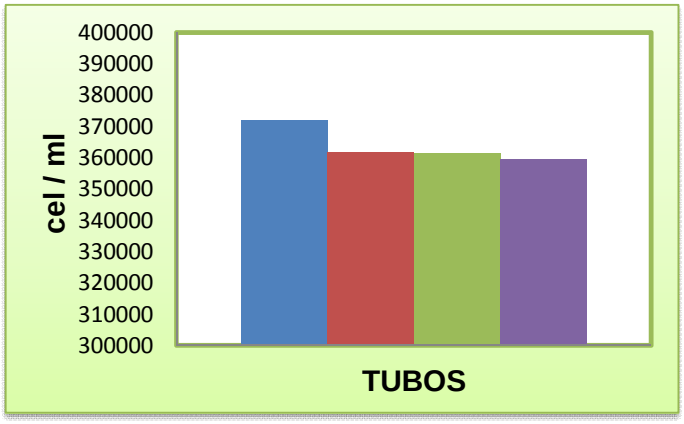

[31] MONTGOMERY, DOUGLAS, diseño y análisis de experimentos editorial limusa. 2003 p.118-119
[32] GUILLARD, R. R. L Handbook of phycological methods. J. R. Stein Cambridge University press, London. Division rates. 1972; p.289-311

Otros autores como Guerra, Romero, Valdivia, y Pérez "demostraron que este tipo de microalgas tuvo un mejor crecimiento poblacional con salinidad de 35 ppm, resultados que solo se obtuvieron con una sola replica lo cual hace que estos resultados no sean totalmente confiables a diferencia de esta investigación que se realizó con 4 réplicas, y se trabajó una siembra uniforme para todos los tratamientos" [33].

Otros estudios relacionados con los efectos de la salinidad sobre distintas especies de microalgas marinas indican que el rango óptimo para el crecimiento es variado. Por ejemplo, algunas especies sólo crecen entre 10 y 35 ppm como *D. tertiolecta*. Mientras que otras no presentan diferencias en su crecimiento al hacerlas crecer en 0 y 35 ppm de salinidad [34](Fábregas *et al.*, 1986).

➢ **Análisis del crecimiento poblacional para Tubos.** Los resultados obtenidos en el análisis de varianza señalaron que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, obteniendo mayor densidad celular el T1 (20 ppm de salinidad) con 372,031cel/ml y el tratamiento control con una densidad mínima de 359,765 cel/ml mostrando un crecimiento normal en este medio logrado en tres días que el crecimiento es bajo en cantidad celular por ser en un recipiente con solo 10 ml de volumen celular no alcanza mayor crecimiento ver anexo B. Figura 23.

**Figura 23. Crecimiento poblacional para Tubos.**

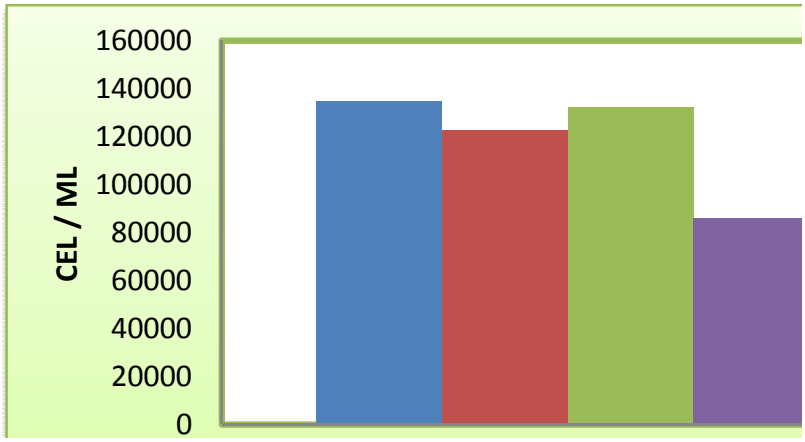



[33]GUERRA, ROMERO, VALDIVIA, Y PÉREZ, Op. Cit; vol 10.

[34] FÁBREGAS, J; HERRERO, C; CABEZAS, B; LIAÑO, R. Y ABALDE, J. Response of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* to nutrient concentration and salinity variations in batch culture. *J. Plant Physiol.* 1986 pg 475-484.

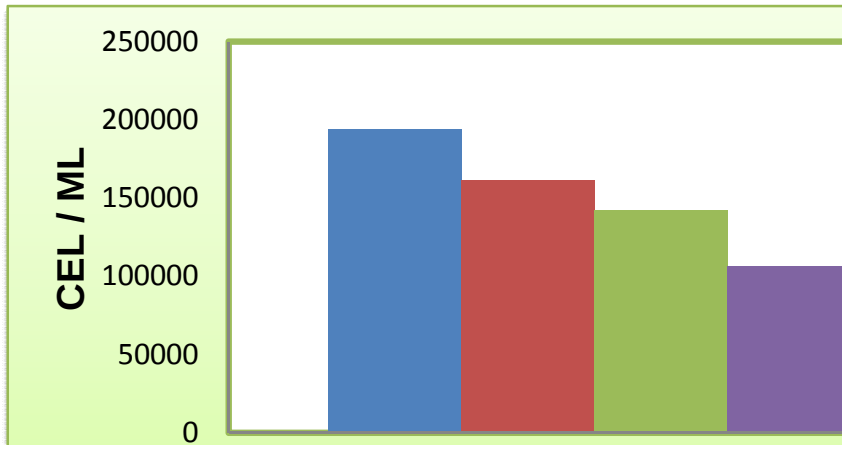
➢ **Análisis del crecimiento poblacional para Erlenmeyers.** Los resultados de los análisis estadísticos muestran que los tratamientos 1, 2 y 3 no tuvieron diferencias significativas y si la tuvieron frente al tratamiento 4 empezando a diferenciarse el crecimiento que existe entre el tratamiento 1 y el tratamiento 4 ya que el crecimiento celular aumentaba para salinidades bajas y se mantenía para el tratamiento con la salinidad más alta que en este caso era el control manifestándose así para todos los medios de cultivo. Ver figura 24. Ver Anexo C (Tukey).

**Figura 24. Crecimiento poblacional para Erlenmeyers.**



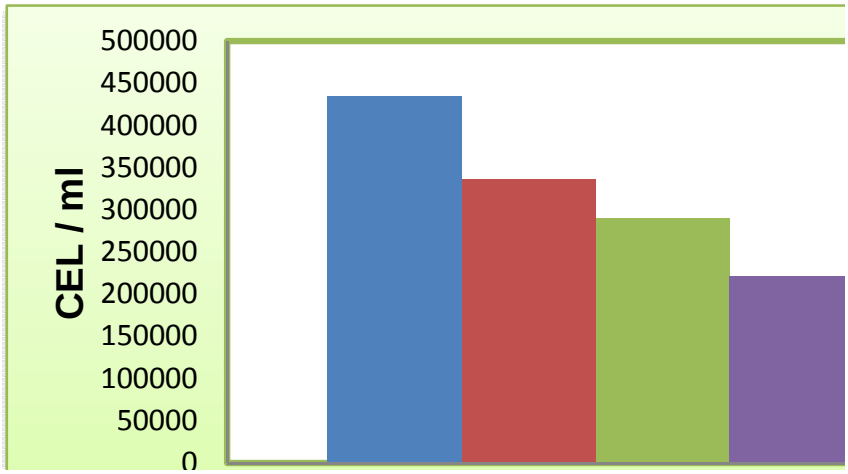

➢ **Análisis del crecimiento poblacional para Botellones de 3 litros.** Según la prueba de Tukey, se conforman tres grupos homogéneos entre sí, el primero está conformado por el T1, el segundo por el tratamiento 2 y 3 los cuales son estadísticamente iguales, el tercer grupo lo conforma el T4, en este medio se empieza a diferenciar el mayor crecimiento celular que tiene el tratamiento uno sobre los demás con un total de 193750 cel./ ml alejándose de los otros tres tratamientos acotando también que el tratamiento cuatro es el más bajo y el de menos concentración celular con 106.562 cel. / ml como lo muestra la figura 25. Ver Anexo D (Tukey).

**Figura 25. Crecimiento para Botellones.**




➢ **Análisis del crecimiento poblacional en Carboys.** En esta prueba los cuatro tratamientos tiene diferencias significativas, obteniendo una densidad poblacional máxima de 434,687 cel. / ml el T1 y una mínima de 221,250 cel/ ml para el T4 confirmando así las diferencias de crecimiento a medida que los volúmenes celulares aumentan ya que las condiciones del medio también cambian presentando variaciones en sus condiciones de crecimiento como se muestra en la figura 26.Ver Anexo E (Tukey).

**Figura 26. Crecimiento poblacional para Carboys.**



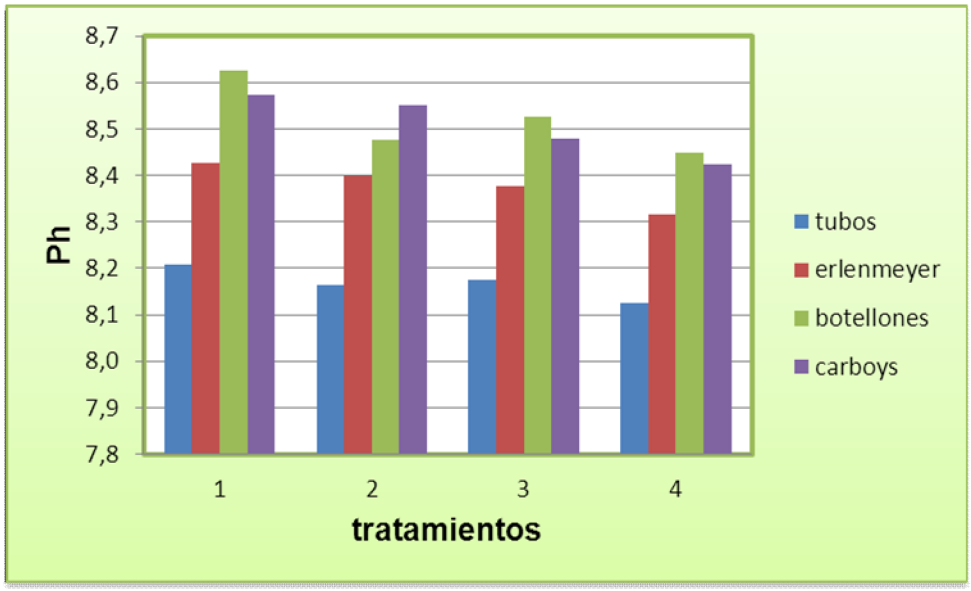

En forma general se pudo observar que los tratamientos (T1, T2, y T3) desarrollaron mejor crecimiento que el T4 o control. El T1 fue el que mantuvo las más altas densidades celulares; al igual que en todas las fases, esto demuestra que este tipo de microalga *T. weissflogii* tiene un mejor comportamiento a

salinidades bajas, alcanzando densidades poblacionales en promedio 434,687 cel/ml; valor correspondiente al tratamiento 1, a diferencia del tratamiento control (T4) como lo muestra en la figura 26, valores muy favorables por su alto número y poco tiempo de desarrollo, siendo esto muy beneficioso para la etapa larval, la cual requiere gran cantidad de microalga para un buen desarrollo.

### 6.1.1.1 Evaluación de los Parámetros Físico-químicos.

➢ **Evaluación del pH.** En la figura 27, se observa un aumento continuo del parámetro pH; en promedio, éste osciló entre 8.1 y 8.6 para los tres tratamientos y el control, evaluados en los 4 diferentes recipientes, según la figura 31 se diferencia el T1 se diferencia del resto de los tratamientos, coincidiendo igualmente con el tratamiento de mayor crecimiento celular. Debido a que el comportamiento del pH está directamente relacionado con el incremento celular el aumento de este último, eleva el consumo de $CO_2$; en consecuencia, existe alcalinización del medio.

**Figura 27. Promedio del pH en los Cultivos.**




Según Carmona[35]. El pH óptimo del medio de cultivo para el crecimiento de microalgas depende de la especie, sin embargo, éste, suele estar comprendido entre 7 y 9. La fotosíntesis provoca un aumento de pH que se ha de contrarrestar aumentando el $CO_2$, ahora bien, en la oscuridad el metabolismo de

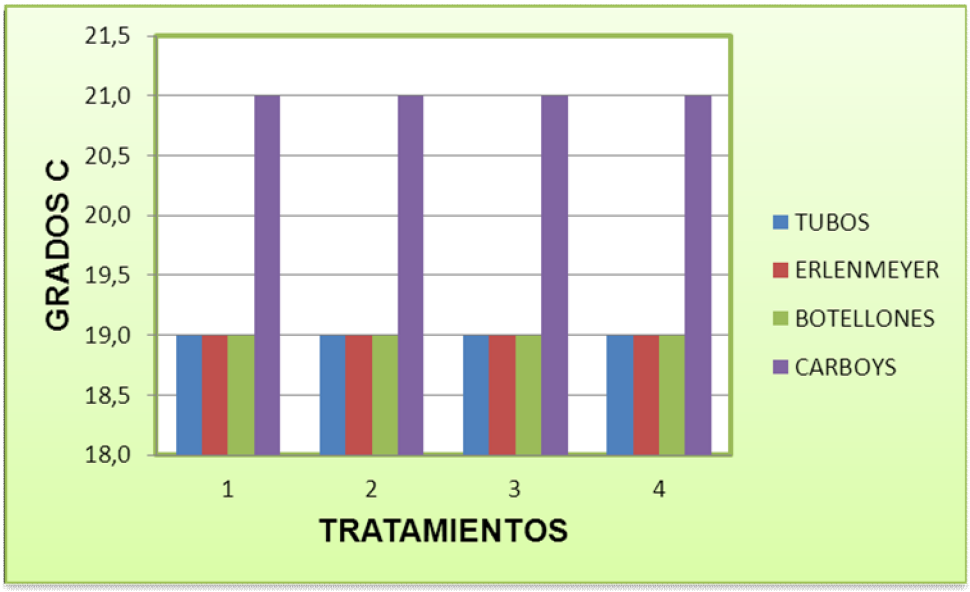
[35]CARMONA, cit. pp 15.

las células reduce el pH, por lo que se ha de disminuir la cantidad de $CO_2$ adicionado a los cultivos. Por tal razón, los datos obtenidos en esta investigación están acordes a lo reportado por el autor, ya que el aumento progresivo del pH fue debido a que el cultivo en todas sus fases desde tubos hasta bolsas plásticas estuvo con iluminación continúa

➢ **Evaluación de la temperatura.** La temperatura en tubos hasta frascos (botellones de 3 litros), se mantuvo constante en 17°C; en bolsas plásticas (Carboys), se estableció en 21°C, merced a un sistema controlado mediante aire acondicionado, logrando así, una estabilidad en el cultivo. Figura 28.

También Carmona[36], menciona que generalmente, las temperaturas óptimas de cultivo de microalgas marinas van desde 15 a 22°C, para tal fin los cultivos se ubican en cámaras especiales bajo condición controlada; por otra parte la temperatura óptima de cultivo para microalgas de agua dulce pueden ser 5 a 8°C más altas.

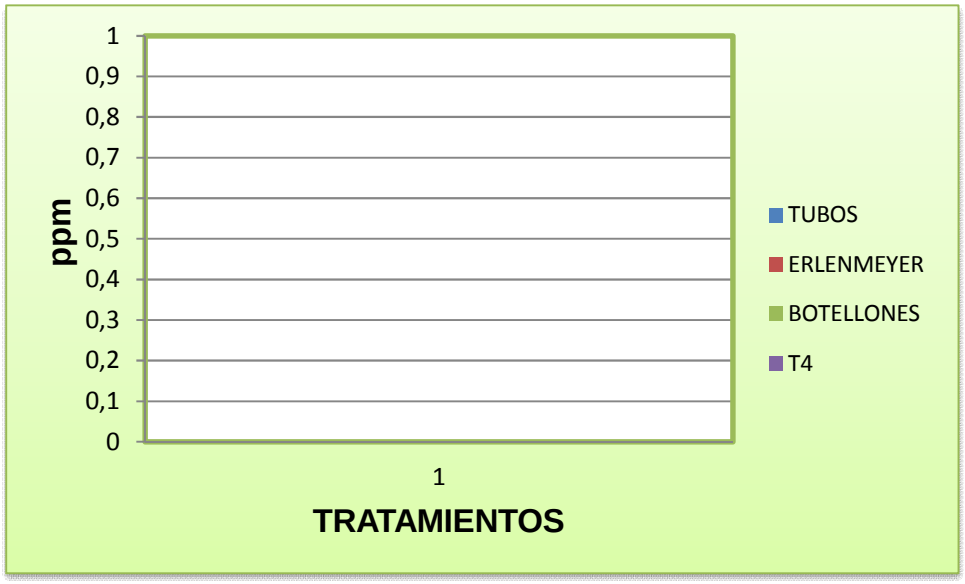
**Figura 28. Temperatura para Cultivos Puros y Carboys.**




➢ **Evaluación de la Salinidad.** Este parámetro se mantuvo constante para los 3 tratamientos y el control de acuerdo a la metodología propuesta en la presente investigación, ver figura 29.

[36] Ibid; pp.15

**Figura 29. Salinidad de los cultivos**.




**6.1.2 Análisis de las Fases de Crecimiento de la microalga.** Una vez realizada la primera fase de la evaluación, se observó un mejor comportamiento *de la* cepa *T. weissflogii* como lo muestra la figura 34. Los cuatro tratamientos no obtuvieron diferencias significativas debido a que para todos la curva de crecimiento se comportó de igual forma, alcanzando en el mismo tiempo para las correspondientes fases de cultivo de la microalga a continuación definidas así:

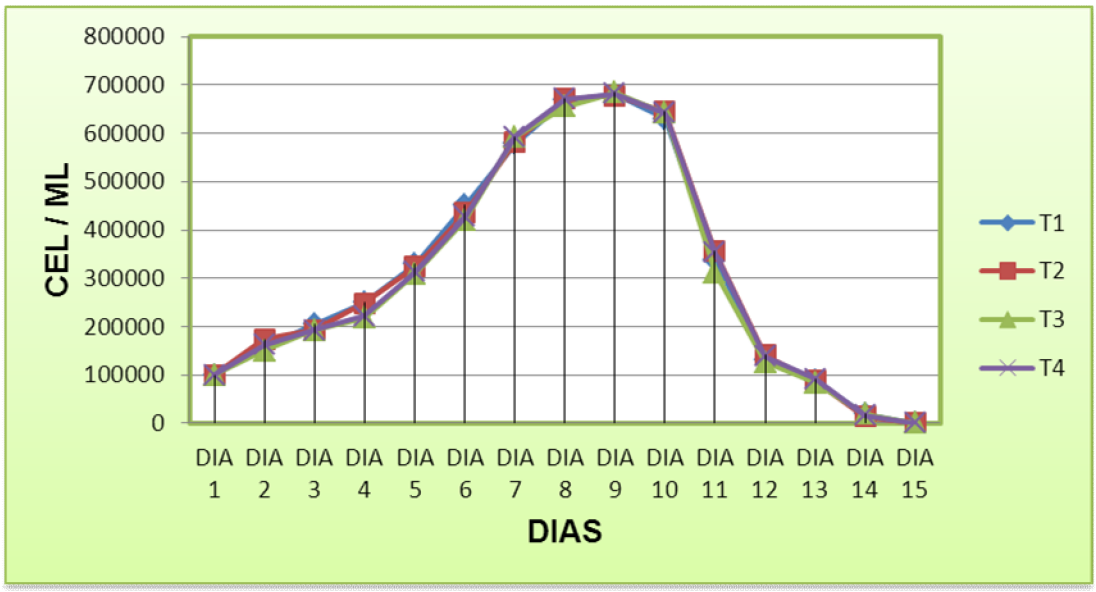
El crecimiento en cultivo inició por la fase de adaptación hasta el cuarto día en donde la mayoría de las células inoculadas fueron viables pero no están en condiciones de dividirse inmediatamente, luego continuó el crecimiento exponencial donde las células comenzaron a dividirse regularmente a una tasa constante, para registrar la tasa de crecimiento máximo en esta fase

Posteriormente el tiempo requerido para la duplicación celular aumentó, reduciendo la tasa de crecimiento.. En estas condiciones, la población no aumentó en virtud a que la tasa de crecimiento está compensada con la tasa de mortalidad, entrando así el cultivo en la fase estacionaria en el día séptimo. Figura 30.

Posteriormente, los cultivos entraron en fase de declinación a partir del décimo día, en donde la tasa de mortalidad fue mayor a la tasa de reproducción y formación de nuevas células. La disponibilidad de células viables disminuyó geométricamente para todas las especies en los diferentes volúmenes. Esto

coincide con lo planteado por Prieto 2005[37] evaluando tres especies de microalgas encontrando los mismos cambios comunes para las diferentes microalgas.

**Figura 30. Fase de crecimiento para los tres tratamientos y el control.**




**6.1.3 Relación Beneficio/Costo.** Para determinar la relación beneficio - costo, se tuvo en cuenta el precio de venta de las bolsas de carboys (tabla 5). En esta relación, no se encontraron diferencias entre los cuatro tratamientos; debido a que los insumos utilizados tienen casi los mismos valores comerciales, se estableció que el mayor indicador lo presenta el T1 con 137.444 pesos como ingreso neto y el menor indicador, el Tratamiento 4 con 137.328,7 pesos es posible señalar entonces que en todos los tratamientos existe un rendimiento en ingresos netos del 60 %. Figura 31.

El ítem que más contribuye con los costos es el de la mano de obra. Para reducir este costo Lemos[38] manifiesta que es un factor difícil de bajar, puesto que implica usar alternativas como implementar sistemas extensivos de producción lo que encarece la producción así entonces está demostrado lo rentable que es esta producción de alimento vivo (*T. weissflogii*) por su bajo costo de producción en laboratorio. Tabla 5 y 6. Ver anexo G.

[37]MARTHA J. PRIETO.efecto del medio y condiciones de cultivo en la productividad de tres diatomeas marinas con potencial acuícola. Rev. MVZ Córdoba vol.10 no.1 Córdoba Junio 2005

[38] Lemos, alitiene. Cultura em larga escala da microalga ankistrodesmus gracilis (CHLOROPHYCEAE), e do microcrustaceo diaphanosoma birgei (KORINECK, 1981) (CLADÓCERA) em laboratorio. Tese doutor em aquicultura. Jaboticabal, Brasil: CAUNESP-UNESP, 2001. P 55.

## Tabla 5. Costos por cada Tratamiento.

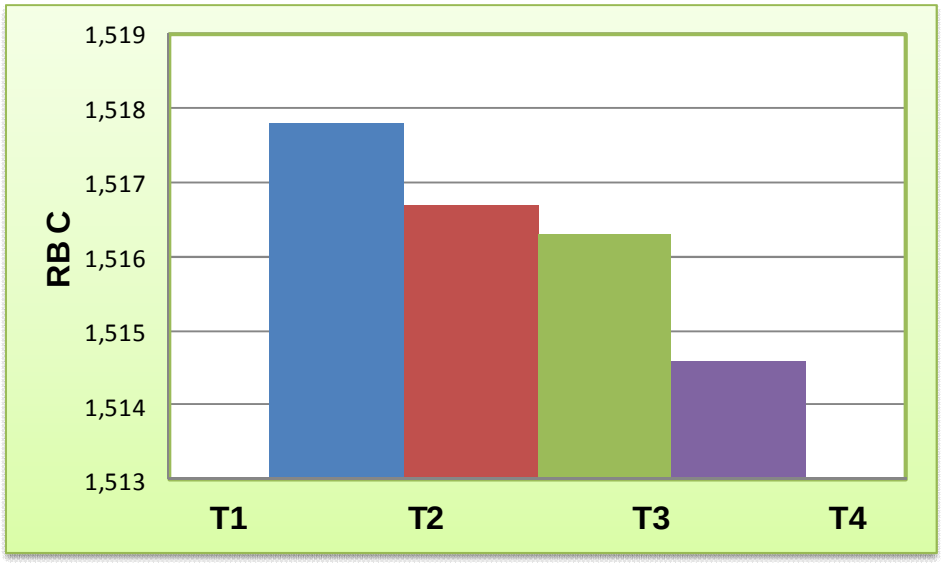
| DETALLE<br>COSTOS VARIABLES | Utilizado | Pesos | T1 | T2 | T3 | T4 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| REACTIVOS PUROS | 263,11 | 117.519,71 | 29.379,93 | 29.379,93 | 29.379,93 | 29.379,93 |
| Varios | 123,33 | 239.884,09 | 59.971,02 | 59.971,02 | 59.971,02 | 59.971,02 |
| Agua | 211,57 | 5.027,02 | 1.205,00 | 1.242,71 | 1.258,93 | 1.320,38 |
| TOTAL | 598,01 | 362.430,82 | 90.555,95 | 90.593,67 | 90609,88 | 90.671,33 |

Varios: combustible, papel, bolsas, cepa, agar desinfectantes etc.
Agua: bombeo del agua salada y agua dulce.

## Tabla 6. Costos e ingresos de producción durante el período experimental

| Tratamientos | Costo parcial | Numero bolsas | Precio bolsa | Ingreso bruto | Ingreso neto | Beneficio costo |
|---|---|---|---|---|---|---|
| T1 | 90.555,95 | 4 | 57.000 | 228.000 | 137.444 | 1,5178 |
| T2 | 90.593,67 | 4 | 57.000 | 228.000 | 137.406,3 | 1,5167 |
| T3 | 90.609,88 | 4 | 57.000 | 228.000 | 137.390,1 | 1,5163 |
| T4 | 90.671,33 | 4 | 57.000 | 228.000 | 137.328,7 | 1,5146 |

## Figura 31. Relación beneficio costo.



# 7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

## 7.1 CONCLUSIONES

- El crecimiento poblacional de *Thalassiosira weissflogii*, es estadísticamente diferencial a 20 ups (unidades practicas de salinidad).

- De acuerdo a la edad poblacional de la especie, el crecimiento en células por unidad de volumen, no es diferencial para ninguno de los tratamientos evaluados

- El análisis de costo beneficio, derivado de las formas de cultivo de *Thalassiosira weissflogii*, determina mayores ventajas económicas en el tratamiento 4; sin embargo, en términos de producción y la necesidad de la cantidad de alimento vivo requerido por las empresas dedicadas a la larvicultura y levante de camarones, el mayor beneficio, saldrá de la implementación del cultivo de la especie a razón de 20 ups.

## 7.2 RECOMENDACIONES

- Esta investigación brinda la pauta de lo simple y eficiente que puede ser el desarrollo de un cultivo de microalgas con fines comerciales en larvicultura, sin necesidad de sistemas sofisticados y costosos.

- Emplear siempre las normas de desinfección y asepsia en la manipulación de las cepas y cepario, toda vez que a partir de este punto, depende el éxito del cultivo.

- La utilización del agua del mar y dulce, requiere el tratamiento previo que recomienda la Clorinación y el uso de filtros, especialmente el uso de carbón activado con el propósito de eliminar material orgánico y reducir los niveles de contaminación microbiológica en el agua que determinan competencia por los recursos, morbilidad y mortalidad de los cultivos microalgales.

- Implementación en nuestra región del cultivo de esta microalga como nueva alternativa de alimentación de organismos acuáticos.

## BIBLIOGRAFÍA


ALVAREZ, Henry A. Cultivo de microalgas, manual de uso para la acuacultura tropical. Guayaquil: FIMCM-ESPOL, 2003. 16 p.

BARBIERI, Elena S, VILLAFAÑE Virginia E. y HELBLING Walter. Dinámica de la producción de oxígeno / consumo en *Dunaliella salina, Thalassiosira weissfiogii* y *Heterocapsa triquetra* circulan en una capa superficial de mezcla simulada. (Citado el 20 de septiembre del 2010). Disponible en internet: http://translate.google.com.co/translate?hl=es&sl=en&u=http://www.scielo.cl/scielo.php%3Fpid%3Ds0717

CARMONA, V. Muñoz J; Establecer los efectos que produce la alimentación con microalgas en la fase exponencial y estacionaria en la larvicultura del camarón blanco (*Penaeus vannamei*), tesis de grado de la universidad técnica de Machala. El Oro. Ecuador. 15 p.

DIAZ-BAEZ; et al. Pruebas de Toxicidad Acuática, Fundamentos y Métodos. Colección Textos. Universidad Nacional de Colombia. 2004.

FÁBREGAS, J; HERRERO, C; CABEZAS, B; LIAÑO, R. Y ABALDE, J. Response of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* to nutrient concentration and salinity variations in batch culture. *J. Plant Physiol.* 1986 pg 475 - 484.

FIALA, M. Phytoplankton: biomasse, production, numeration et culture. Jacques, Antillas Francesas: UNESCO, 1979. 54 p.

FRYXELL, G. y HASLE, G. R. The genus *Thalassiosira*: Some species with a modified ring of central strutted processes. Beih. zur Nova Hedwigia, (Citado el 11 de mayo del 2010). Disponible en internet: http://www.thalassiosira weissfligii.com. 1977.

GIMENEZ, Roberto. Diatomeas sillico flagelados del fitoplancton del Golfo de Guayaquil. Instituto Océano grafico del armada. 2da edición.. Guayaquil Ecuador. Vol 2. 1983. 198 p.

GUERRA, Aznay Missael, ROMERO López Teresita, VALDIVIA Lázaro, y PÉREZ Nodar Rosa. Centro de Investigaciones Pesqueras. REDVET Rev. Electrón.vet.*http://www.veterinaria.org/revistas/redvet.http://revista.veterinaria.org* Ciudad de La Habana. Cuba. Vol. 10, Nº 4, Abril/2009.

GUERRA, Aznay, ROMERO Teresita, Y VALDIVIA Alba. Evaluación del crecimiento de *Thalassiosira fluviatilis* frente a diferentes concentraciones de Nutrilake (Evaluation of the growth of *Thalassiosira fluviatilis* as opposed to different concentrations from Nutrilake). (Citado el 20 de septiembre del 2010). Disponible en internet: http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n111106/110618.pdf

GUERRERO, R. D. y VILLEGAS, C.T. Report of the training course on growing food organism for fish hatcheries. Philippines, South China: Sea Fisheries Development/Coordinating Programam, 1982. 45 p.

JANET, R. Handbook of phycological methods: culture methods and growth measurements. Inc: J. Ecol. Brazil. Vol. 30, No. 6 (ene-feb. 1993). 20 p.

KRUEGER, R. & Gillman, J. & Coggin.. Introducción a la microbiología. 1973.102-175 p

LEGER, P.A., D.A. Bengston, P. Sorgeloos, K.L. Simpson y A. Deck. The nutritionalvalue of *Artemia*: a review. En: P. Sorgeloos, D.A. Bengtson, W. ecleir y E. Jasper (eds). *Artemia* research and its applications. 1987. 3: 357-372 p.

Lemos, alitiene. Cultura em larga escala da microalga ankistrodesmus gracilis (CHLOROPHYCEAE), e do microcrustaceo diaphanosoma birgei (KORINECK, 1981) (CLADÓCERA) em laboratorio. Tese doutor em aquicultura. Jaboticabal, Brasil: CAUNESP-UNESP, 2001. P 55.

MARSHALL, Darley. Biología de las algas: Enfoque fisiológico. Mexico: Limusa, 1987. 68 p.

MARTHA J. PRIETO.efecto del medio y condiciones de cultivo en la productividad de tres diatomeas marinas con potencial acuícola. Rev. MVZ Córdoba vol.10 no.1 Córdoba Junio 2005

MONTGOMERY DUGLAS, diseño y análisis de experimentos editorial limusa 2003. P 118 - 119

ORGANIZACIÓN D DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACION (FAO). Producción de alimento vivo y su importancia en acuacultura [online]. Roma: FAO; 2005 (citado el 20 de junio de 2010). Disponible en internet: http://www.fao.org/docrep/003/AB4735/AB3s01.htm.

ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACION (FAO). Producción de alimento vivo y su importancia en acuacultura [online]. Producido por el departamento de pesca (citado el 14 de junio de 2010). Disponible en internet:http://www.fao.org/docrep/003/AB4735/AB3s01.htm.

R. MORONTA, R. MORA Y E. MORALES. Respuesta de la microalga Chlorella sorokiniana al pH, salinidad y temperatura en condiciones axénicas y no axénicas Rev. Fac No.1 caracas 2006 agronomía. Vol. 23

REVISTA CHILENA DE HISTORIA NATURAL. Estructura comunitaria de diatomeas presentes en los sedimentos superficiales de ocho lagos andinos de Chile central. Versión impresa ISSN 0716-078X Rev. chil. hist. nat. v.81 n.1 Santiago Mar. 2008.

REYNOLDS, C. S. Vegetation Processes in the Pelagic: A Model for Ecosystem Theory. Ecology Institute, Oldendorf/Luhe Germany. 1997.

SALVADOR, William A. Producción de microalgas *Thalassiosira weisflogii* como alimento de larvas de *Litopenaeus vannamei*. Libertad, Ecuador. UPSE, 2007. 7 p.

SIPAÚPA, L. H. y ROCHA, O. cultivo em larga escala de organismos planctónicos para alimentacâo de larvas e alevinos de peixes: I-algas clorofíceas. : Biotemas. Jaboticabal, SP, Brasil. Vol. 6, No 1 (fevereiro, 1993). 18 p.

TACON, A. G. J. The nutrition and feeding of farmed fish and shrimp. A training manual II: Nutrient sources and composition. Brasilia: FAO, 1987. 20 p.

VEGA Bertha, LORENZO Silvia y RUIZ José. Efecto de productos zeólicos en la calidad nutritiva de la diatomea *Thalassiosira weissflogii*. (Citado el 15 de noviembre del2010).Disponible en internet: http://www. Rehb@xanum.uam.mx. /revista hidrobiológica. Pdf.

# ANEXOS

**Anexo A. Tés de normalidad según prueba de Shapiro Wilk.**

| Medio de cultivo | P valor |
|---|---|
| Tubos | 0.0012 |
| Erlenmeyer | 0.0019 |
| Botellones | 0.0039 |
| Carboys | 0.1691 |

## Anexo B. Tabla de Anova

**Tubos**

| Fuente | DF | Tipo III SS | Cuadrado medio | F-Valor | Pr > F |
|---|---|---|---|---|---|
| TRATAMIENTO | 3 | 1493823242 | 497941081 | 1.82 | 0.1969 |
| Error | 12 | 3280761719 | 273396810 | | |

Error: MS (TUBOS (TRATAMIENTO))

| Fuente | DF | Tipo III SS | Cuadro medio | F-Valor | Pr > F |
|---|---|---|---|---|---|
| TUBOS (TRATAMIENTO) | 12 | 3280761719 | 273396810 | 0.27 | 0.9918 |
| Error: MS (Error) | 48 | 49061328125 | 1022111003 | | |

**Erlenmeyers**

| Fuente | DF | Tipo III SS | Cuadro medio | F-Valor | Pr > F |
|---|---|---|---|---|---|
| TRATAMIENTO | 3 | 24463932617 | 8154644206 | 15.61 | 0.0002 |
| Error | 12 | 6267449219 | 522287435 | | |

Error: MS(ERLENMEYER(TRATAMIEN))

| Fuente | DF | Tipo III SS | Cuadro medio | F-Valor | Pr > F |
|---|---|---|---|---|---|
| ERLENMEYER (TRATAMIEN) | 12 | 6267449219 | 522287435 | 1.60 | 0.1241 |
| Error: MS(Error) | 48 | 15686671875 | 326805664 | | |

**Botellones**

| Fuente | DF | Tipo III SS | Cuadro medio | F-Valor | Pr > F |
|---|---|---|---|---|---|
| TRATAMIENTO | 3 | 63803417969 | 21267805990 | 71.27 | <.0001 |
| Error | 12 | 3580859375 | 298404948 | | |

Error: MS(BOTELLONE(TRATAMIEN))

| Fuente | DF | Tipo III SS | Cuadro medio | F-Valor | Pr > F |
|---|---|---|---|---|---|
| BOTELLONES (TRATAMIEN) | 12 | 3580859375 | 298404948 | 0.34 | 0.9779 |
| Error: MS(Error) | 48 | 42470312500 | 884798177 | | |

**Carboys**

| Fuente | DF | Tipo III SS | Cuadrado medio | F-Valor | Pr > F |
|---|---|---|---|---|---|
| TRATAMIENTO | 3 | 384546386719 | 128182128906 | 238.78 | <.0001 |
| Error | 12 | 6441796875 | 536816406 | | Error: MS(CARBOYS(TRATAMIENTO)) |

| Fuente | DF | Tipo III SS | Cuadro medio | F-Valor | Pr > F |
|---|---|---|---|---|---|
| CARBOYS (TRATAMIENTO) | 12 | 6441796875 | 536816406 | 1.03 | 0.4357 |
| Error: MS(Error) | 48 | 24951562500 | 519824219 | | |

**Anexo C. Prueba de Tukey para Tubos**

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

| Agrupamiento | Media | N | TRATAMIENTO |
|---|---|---|---|
| A | 372031 | 16 | 1 |
| A | 361719 | 16 | 2 |
| A | 361563 | 16 | 3 |
| A | 359766 | 16 | 4 |

**Anexo D. Prueba de Tukey para Erlenmeyer**

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

| Agrupamiento | Media | N | TRATAMIENTO |
|---|---|---|---|
| A | 135000 | 16 | 1 |
| A | 132297 | 16 | 3 |
| A | 122656 | 16 | 2 |
| B | 86094 | 16 | 4 |

**Anexo E. Prueba de Tukey para Botellones**.

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

| Agrupamiento | Media | N | TRATAMIENTO |
|---|---|---|---|
| A | 193750 | 16 | 1 |
| B | 161250 | 16 | 2 |
| B | 142031 | 16 | 3 |
| C | 106563 | 16 | 4 |

**Anexo F. Prueba de Tukey para Carboys**.

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

| Agrupamiento | Media | N | TRATAMIENTO |
|---|---|---|---|
| A | 434688 | 16 | 1 |
| B | 335781 | 16 | 2 |
| C | 290313 | 16 | 3 |
| D | 221250 | 16 | 4 |

**ANEXO G. Tabla de relación de costos**

| DETALLE COSTOS VARIABLES | UNIDAD | TOTAL UTILIZADO | PRECIO gr/ DOL | T./ DOLARES | T./ PESOS | T1 | T2 | T3 | T4 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| NITRATO DE SODIO PURO | 1 gr | 150 | 0,11561 | 17,3415 | 32948,9 | 8237,21 | 8237,21 | 8237,21 | 8237,21 |
| FOSFATO DE SODIO PURO | 1 gr | 10 | 0,7495 | 7,495 | 14240,5 | 3560,13 | 3560,13 | 3560,13 | 3560,13 |
| MOLIBDATO DE SODIO | 1 gr | 1 | 0,17 | 0,17 | 323 | 80,75 | 80,75 | 80,75 | 80,75 |
| METASILICATO SODIO PURO | 1 gr | 30 | 0,2 | 6 | 11400 | 2850,00 | 2850,00 | 2850,00 | 2850,00 |
| CLORURO FERRICO | 1 gr | 3,15 | 0,11567 | 0,3643605 | 692,285 | 173,07 | 173,07 | 173,07 | 173,07 |
| CLORURO DE MANGANESO | 1 gr | 36 | 0,288 | 10,368 | 19699,2 | 4924,80 | 4924,80 | 4924,80 | 4924,80 |
| CLORURO DE COBALTO | 1 gr | 2 | 0,58 | 1,16 | 2204 | 551,00 | 551,00 | 551,00 | 551,00 |
| E.D.T.A PURO | 1 gr | 4,36 | 0,18 | 0,7848 | 1491,12 | 372,78 | 372,78 | 372,78 | 372,78 |
| SULFATO DE ZINC | 1 gr | 4,4 | 0,017 | 0,0748 | 142,12 | 35,53 | 35,53 | 35,53 | 35,53 |
| SULFATO CUPRICO | 1 gr | 2 | 0,01751 | 0,03502 | 66,538 | 16,63 | 16,63 | 16,63 | 16,63 |
| BIOTINA | 1 gr | 0,1 | 56 | 5,6 | 10640 | 2660,00 | 2660,00 | 2660,00 | 2660,00 |
| CIANOCOBALAMINA | 1 gr | 0,1 | 33,33 | 3,333 | 6332,7 | 1583,18 | 1583,18 | 1583,18 | 1583,18 |
| THIAMINA | 1 gr | 20 | 0,4563 | 9,126 | 17339,4 | 4334,85 | 4334,85 | 4334,85 | 4334,85 |
| TOTAL REACTIVOS PUROS | 1 | 263,11 | 92,21959 | 61,852481 | 117520 | 29379,93 | 29379,9 | 29379,93 | 29379,9 |

## ANEXO G. Tabla de relación de costos

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| PAPEL FILTRO | 1 hoja | 6 | 0,36 | 2,16 | 4104 | 1026,00 | 1026,00 | 1026,00 | 1026,00 |
| PAPEL ALUMINIO | 70 m | 10 | 0,136 | 1,36 | 2584 | 646,00 | 646,00 | 646,00 | 646,00 |
| BOLSAS PALSTICAS | 1 | 16 | 0,1 | 1,6 | 3040 | 760,00 | 760,00 | 760,00 | 760,00 |
| LIGAS | 1 kg | 0,2 | 5 | 1 | 1900 | 475,00 | 475,00 | 475,00 | 475,00 |
| HIPOCLORITO | 1 lt | 0,128 | 24,005 | 3,07264 | 5838,02 | 1459,50 | 1459,50 | 1459,50 | 1459,50 |
| ACIDO NITRICO 38% | 1Lt | 1,1 | 0,89285 | 0,982135 | 1866,06 | 466,51 | 466,51 | 466,51 | 466,51 |
| OTHOTODOLINE | 1 ml | 1 | 0,025 | 0,025 | 47,5 | 11,88 | 11,88 | 11,88 | 11,88 |
| FORMOL | 1 lt | 1 | 1,52 | 1,52 | 2888 | 722,00 | 722,00 | 722,00 | 722,00 |
| THIOSULFATO DE SODIO | 2 gr | 62,5 | 0,00356 | 0,2225 | 422,75 | 105,69 | 105,69 | 105,69 | 105,69 |
| ALCOHOL | 1 gal | 0,2 | 2,25 | 0,45 | 855 | 213,75 | 213,75 | 213,75 | 213,75 |
| DETERGENTE | 1 kg | 0,2 | 1,8 | 0,36 | 684 | 171,00 | 171,00 | 171,00 | 171,00 |
| GAS | 1 cilindro | 1 | 2 | 2 | 3800 | 950,00 | 950,00 | 950,00 | 950,00 |
| PAPEL PARAFILM | 150m | 0 | 55 | 0 | 0 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| PAPEL ABSORVENTE | 50 m | 10 | 0,0308 | 0,308 | 585,2 | 146,30 | 146,30 | 146,30 | 146,30 |
| MANO DE OBRA | 30 dias | 12 | 8 | 96 | 182400 | 45600,00 | 45600,00 | 45600,00 | ####### |
| CEPA | 1 | 1 | 15 | 15 | 28500 | 7125,00 | 7125,00 | 7125,00 | 7125,00 |
| AGAR | 1 gr | 1 | 0,19451 | 0,19451 | 369,569 | 92,39 | 92,39 | 92,39 | 92,39 |
| total varios | | 123,33 | 116,31772 | 126,25479 | 239884 | 59971,02 | 59971 | 59971,02 | 59971 |

## ANEXO G. Tabla de relación de costos

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| BOMBEO DE AGUA SALADA | 1000 L | | 0,005 | 0 | 0 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| T1 | | 29,3 | 0,005 | 0,1465 | 278,35 | 278,35 | | | |
| T2 | | 36,6 | 0,005 | 0,183 | 347,7 | | 347,70 | | |
| T3 | | 43,9 | 0,005 | 0,2195 | 417,05 | | | 417,05 | |
| T4 | | 51,3 | 0,005 | 0,2565 | 487,35 | | | | 487,35 |
| AGUA DULCE | 1000 L | | 0,00225 | 0 | 0 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| T1 | | 21,9 | 0,00225 | 0,049275 | 93,6225 | 93,62 | | | |
| T2 | | 14,5 | 0,00225 | 0,032625 | 61,9875 | | 61,99 | | |
| T3 | | 2,07 | 0,00225 | 0,0046575 | 8,84925 | | | 8,85 | |
| T4 | | 0 | 0,00225 | 0 | 0 | | | | 0,00 |
| AGUA DE BOTELLON | 20 lt | 10 | 0,066 | 0,66 | 1254 | 313,50 | 313,50 | 313,50 | 313,50 |
| AGUA DESTILADA | 1 lt | 2 | 0,54687 | 1,09374 | 2078,11 | 519,53 | 519,53 | 519,53 | 519,53 |
| total agua | | 211,57 | 0,64912 | 2,6457975 | 5027,02 | 1204,999 | 1242,71 | 1258,926 | 1320,38 |