



Pontificia Universidad
Católica del Ecuador

SEDE MANABÍ

CARRERA DE BIOLOGÍA MARINA

TRABAJO DE TITULACIÓN

INFLUENCIA DE LA DIETA MICROALGAL EN EL CRECIMIENTO DE LA
ESPONJA *Mycale sp* Y ASCIDIA *Botryllus sp* EN CONDICIONES DE
CAUTIVERIO

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

MANEJO SOSTENIBLE DE RECURSOS NATURALES

PREVIO AL TÍTULO DE

BIÓLOGO MARINO

AUTOR

RODRÍGUEZ SOLÓRZANO JHOAN CARLOS

DIRECTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN

FRANCISCO HERNÁN POZO MIRANDA. Máster

BAHÍA DE CARÁQUEZ, MARZO, 2021

CERTIFICACIÓN DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Francisco Pozo Miranda. Máster

TUTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

En mi calidad de tutor del trabajo de integración curricular, certifico haber revisado el presente manuscrito de investigación, el mismo que se ajusta a las normas vigentes de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Manabí, cumpliendo la Normativa del Trabajo de Integración Curricular; en consecuencia, es apto para su presentación y sustentación.

Francisco Hernán Pozo Miranda, Máster

C.C.: 0918330952

ACTA DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

El jurado examinador aprueba el presente trabajo de integración curricular en nombre de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Sede Manabí.

Evelyn Arias Cedeño M.Sc.

Primer lector

Ph.D. Eduardo Barahona

Segundo lector

Kruger Loor Santana M.Sc.

Tercer lector

Bahía de Caráquez, marzo del 2021

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Este manuscrito no contiene ningún tipo de material que ha sido aceptado para la obtención de un título universitario en otra institución, excepto en forma de información de soporte que ha sido debidamente citada en mi trabajo. Este trabajo es de total responsabilidad del autor, quien declara bajo juramento que ninguna sesión de este trabajo de integración curricular infringe los derechos de autor de nadie.

Jhoan Carlos Rodríguez Solórzano

C.C.: 1316282563

DECLARACIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a distribuir este manuscrito de investigación en medios físicos y electrónicos con el fin de promover la divulgación de mis resultados a la comunidad científica y a la sociedad en general. Adicionalmente autorizo el uso de los contenidos de esta investigación como bibliografía para fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, citando como fuente de información al autor de este trabajo.

Jhoan Carlos Rodríguez Solórzano

C.C.: 1316282563

Email: rjhoan1994@gmail.com

Teléfono: 0982082743 - 05 2 677924

AGRADECIMIENTOS

Procuro agradecer a Dios por darme la fuerza para terminar este proyecto. Agradezco a mis padres, Carlos Rodríguez y María Solórzano, por brindarme maravillosos consejos y palabras de aliento, tenerme paciencia y darme el amor que necesitaba sin pedir nada a cambio.

También agradezco a mis tías Luisa y Ana Rodríguez por su cariño y el apoyo incondicional que me ofrecieron y a mis hermanos, René, Susy, Angélica y Ana por ser los mejores hermanos que alguien pudo tener y por haber estado siempre para mí cuando los necesitaba.

Agradezco a todo el personal de CENAIM especialmente a Cristóbal Domínguez, Lic. Gabriela Argusto, y a PhD. Jenny Rodríguez por toda la ayuda proporcionada para terminar este proyecto.

Asimismo, agradezco a todos los profesores de la PUCE, al personal que la conforma y a los compañeros de clase que estuvieron conmigo a lo largo de la carrera. Por último, me gustaría agradecer a mi director de tesis, el Máster Francisco Pozo por la paciencia y guía que me brindo durante todo este proceso.

RESUMEN

Este estudio cuantitativo evaluó la influencia de dos consorcios de dietas microalgales en el crecimiento de la esponja *Mycale spp.* y las ascidias *Botryllus spp.*, en condiciones de cautiverio, porque pese a tener una gama de compuestos bioactivos farmacológicos, estos organismos necesitan una alta cantidad de biomasa debido a las bajas concentraciones de bioactivos que poseen. Consecuentemente, este estudio se realizó en las instalaciones del Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM), de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), durante enero y febrero de 2019. Para ello, se ejecutaron ensayos de dietas microalgales en esponjas *Mycale spp.* y ascidias *Botryllus spp.*, que influyen en el crecimiento del área de cobertura que ocupaban los organismos sobre el sustrato al cual estaban adheridos. Los resultados indican que en las pruebas de dietas microalgales hechas en esponjas *Mycale spp.*, éstas disminuyen el crecimiento con ambas dietas [*Isochrysis sp/Chaetoceros sp/Pavlova sp* (-0.2303 mm²/día) e *Isochrysis sp/Chaetoceros sp/Thalassiosira spp.* (-0.3141mm²/día)], siendo necesario evaluar la adición de materia orgánica como una dieta, y dando como resultado mejor fijación al sustrato y crecimiento (15 mm²/día). Los resultados de las pruebas realizadas en ascidias *Botryllus spp.*, indican que la dieta conformada por *Isochrysis spp/Chaetoceros spp.*, tiene mayor fijación y crecimiento en el sustrato. Esto permite concluir que, dietas a base de partículas coloidales de materia orgánica facilitan la colonización y crecimiento de *Mycale spp.*, mientras que en *Botryllus spp.*, la dieta más adecuada es *Isochrysis spp/Chaetoceros spp.*

Palabras clave: microalga, crecimiento, *Mycale spp.*, *Botryllus spp.*

ABSTRACT

This quantitative research study evaluated the influence of two microalga diet consortia on the growth of the marine sponge *Mycale spp.* and ascidians *Botryllus spp.*, under conditions of captivity, because despite having a range pharmacological bioactive compounds, these organisms need a much higher biomass due to their low concentrations of bioactive substances. Consequently, this study was carried out at *Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM)* of *Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL)*, from January through February 2019. There were performed some tests of microalga diets on the sponge *Mycale spp.* and ascidians *Botryllus spp.*, which influenced on the coverage area growth occupied by the organisms on the substrate to which they were attached. The findings of the tests of microalga diets performed with sponges *Mycale spp.*, show that they decrease their growth with both diets [*Isochrysis sp / Chaetoceros sp / Pavlova sp* (-0.2303 mm²/day) and *Isochrysis sp / Chaetoceros sp / Thalassiosira spp.* (-0.3141mm²/day)], being necessary to evaluate the addition of organic matter as a diet, resulting in better fixation to the substrate and growth (15 mm²/day). The findings of the tests performed with ascidians *Botryllus spp.*, reveal that the diet made up of *Isochrysis spp / Chaetoceros spp.*, has greater fixation and growth in the substrate. This helps to conclude that diets based on organic matter colloidal particles promote the colonization and growth of *Mycale spp.*, while the most suitable diet for *Botryllus spp.* is *Isochrysis spp/Chaetoceros spp.*

Keywords: microalga, growth, *Mycale spp.*, *Botryllus spp.*

INDICE GENERAL

CERTIFICACIÓN DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR	ii
ACTA DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL	iii
DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD	iv
DECLARACIÓN DE DERECHOS DE AUTOR.....	v
AGRADECIMIENTOS	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT.....	viii
INDICE DE TABLA.....	x
INDICE DE FIGURAS.....	xi
INDICE DE IMÁGENES.....	xii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
2.1. Área de estudio	3
2.2. Material biológico	3
2.3. Identificación de los organismos empleados en el estudio	4
2.4. Efecto de las dietas microalgales sobre el crecimiento de esponja <i>Mycale sp.</i>	4
2.5. Efecto de las dietas microalgales sobre el crecimiento de ascidias <i>Botryllus sp.</i>	5
2.6. Medición del crecimiento del área de cobertura.....	6
2.7. Análisis estadístico	6
3. RESULTADOS	8
3.1. Identificación de los organismos de estudios	8
3.2. Normalidad y homogeneidad de los datos	10
3.3. Efecto de las dietas microalgales sobre el crecimiento de esponja <i>Mycale sp.</i>	11
3.4. Efecto de la dieta microagal sobre el crecimiento de la <i>Botryllus sp.</i>	12
4. DISCUSIÓN.....	14
5. CONCLUSIONES	17
RECOMENDACIONES.....	18
LITERATURA CITADA.....	19
CERT-0085-2021.....	24

INDICE DE TABLA

Tabla 1. Resumen estadístico de la normalidad y homocedasticidad de las varianzas de datos *Mycale sp* y *Botryllus sp*. Dietas: AM= Isochrysis/Chaetoceros/Thalassiosira, BM= Isochrysis/Chaetoceros/Pavlova, Dietas: AB=Pavlova sp, BB=so/Cha, CB=Thalassiosira.9

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de dietas microalgales para <i>Mycale sp.</i>	5
Figura 2. Representación gráfica de los explantes de ascidias coloniales <i>Botryllus sp</i> para prueba de dietas microalgales.	6
Figura 3. Análisis de normalidad de los datos evaluados en Dietas para a) <i>Mycale sp</i> y b) <i>Botryllus sp</i> : Dietas: Dietas: AM= Isochrysis/Chaetoceros/Thalassiosira, BM= Isochrysis/Chaetoceros/Pavlova, Dietas: AB=Pavlova sp, BB=so/Cha, CB=Thalassiosira.	9
Figura 4. Crecimiento de las esponjas <i>Mycale sp</i> alimentadas con dietas en base a microalgas.	10
Figura 5. Crecimiento de las esponjas <i>Mycale sp</i> alimentadas con materia orgánica.	11
Figura 6. Medias marginales del crecimiento de <i>Botryllus sp</i> alimentado con 3 dietas. Se observa el efecto negativo de retirar el hilo fijador al día 5.	12

INDICE DE IMÁGENES

Imagen 1. Ubicación geográfica del Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM).	3
Imagen 2. Esponja (A) y espículas (B) de espécimen analizado (<i>Mycale sp.</i>).	7
Imagen 3. Ascidia y zooides del espécimen analizado (<i>Botryllus sp.</i>).	8

1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura de los organismos marinos, especialmente los sedentarios como esponjas y ascidias, se ha desarrollado para la obtención de una alta gama de compuestos bioactivos para pruebas farmacológicas como péptidos, alcaloides, terpenoides y esteroides derivada de sus adaptaciones metabólicas que le permiten disuadir a los depredadores, mantener competidores a raya o paralizar a su presa (Datta, Talapatra y Swarnakar, 2015).

En ambientes naturales es factible encontrar poblaciones grandes que nos permita explorar y explotar esta riqueza de compuesto, debido a su rápido crecimiento en el mar donde existe gran disponibilidad de alimento como bacterias, algas, eucariotas heterótrofos y material orgánico muerto (Osinga, Tramper y Wijffels, 1999). Sin embargo, las bajas concentraciones de compuestos bioactivos que presentan las poblaciones naturales, (Carballlo, Yañez y Zubía, 2010), y la limitada información relacionada al suministro de alimento en condiciones de cautiverio generan la necesidad evaluar el crecimiento en sistemas cerrados.

Bajo este contexto el objetivo de la presente investigación es comparar la influencia de distintas dietas microalgales sobre el crecimiento de esponjas *Mycale sp* y ascidias *Botryllus sp* en condiciones de cautiverio, que serán las bases para realizar futuros cultivos a mayor escala, con la finalidad de obtener bioactivos potenciales en esponjas del género *Mycale spp* y ascidias del género *Botryllus spp*. Además, sería el primer estudio registrado para estos géneros que se encuentran distribuidos en el Pacífico ecuatoriano.

Potencial Bioactivo del género *Mycale spp*.

Las esponjas del género *Mycale*, tienen una gran diversidad química, convirtiéndole en fuentes de compuestos bioactivos con mayor potencial biotecnológico como son la mycalolides, pateamine, peloruside A y tetrapéptidos cíclicos azumamidas A-E con propiedades inhibitoras (Coello, Martín y Reyes, 2009). Por lo cual, a nivel mundial, se ha realizado cultivo de distintas especies del género *Mycale*, la mayoría en sistemas abiertos en el mar, como los de Page *et al.*, 2005 que utilizaron la especie *Mycale*

hentscheli en Nueva Zelanda. Mientras que, Carballo, Yañez, & Zubía, 2010, en México, llevaron a cabo el cultivo de *Mycale cecilia*, en condiciones controladas, para obtener compuestos bioactivos tipo mycalazal alimentadas con una mezcla de dos microalgas (*Tetraselmis sp* y *Isochrysis sp*), con supervivencias de 65%.

Potencial bioactivo del género *Botryllus spp.*

En cuanto a las ascidias del género *Botryllus spp.*, ha sido considerado modelo experimental en una variedad de campos biológicos tales como inmunología, fisiología, ecología, genética, biología del desarrollo, biología evolutiva y envejecimiento, por la capacidad de estas especies para extenderse rápidamente en diversos ambientes (Epelbaum *et al.*, 2009).

A nivel mundial, se ha experimentado diversas dietas microalgales. en la especie *Botryllus schlosseri* como Milkman 1967 donde usó *Cyclotella nana* reportando buen crecimiento; Brunetti *et al.*, 1980 empleó una mezcla de *Phaeodactylum tricornutum*, *Dunaliella sp.* y *Chlorella sp.* registrando excelente crecimiento en juveniles; Rinkevich y Shapira 1998 aplicó una mezcla de *Nannochloropsis sp*, *Dunaliella salina*, y *Isochrysis galbana* logrando buenos resultados en el desarrollo de los juveniles; y Epelbaum *et al.*, 2009 utilizó una mezcla de *Chaetoceros muelleri* y *Isochrysis sp* logrando rango de crecimiento altos.

Bajo este contexto nos planteamos la hipótesis de que el crecimiento de esponja del género *Mycale* y ascidia del género *Botryllus* están influenciadas directamente por el tipo de alimento administrado, por lo cual el objetivo de la presente investigación fue comparar la influencia de distintas las dietas sobre el crecimiento de *Mycale spp.* y *Botryllus spp.* en condiciones de cautiverio.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Área de estudio

El estudio se realizó entre enero y febrero del 2019 dentro de las instalaciones del CENAIM, perteneciente a la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL). El CENAIM está ubicado en San Pedro de Manglaralto de la provincia de Santa Elena-Ecuador, dentro de los límites de la Reserva Marina el Pelado (REMAPE, 131 Km²) y es parte del Sistema Nacional de Áreas Protegidas (Ministerio de Ambiente y Aguas de Ecuador, 2012) (Imagen 1).

Coordenadas:

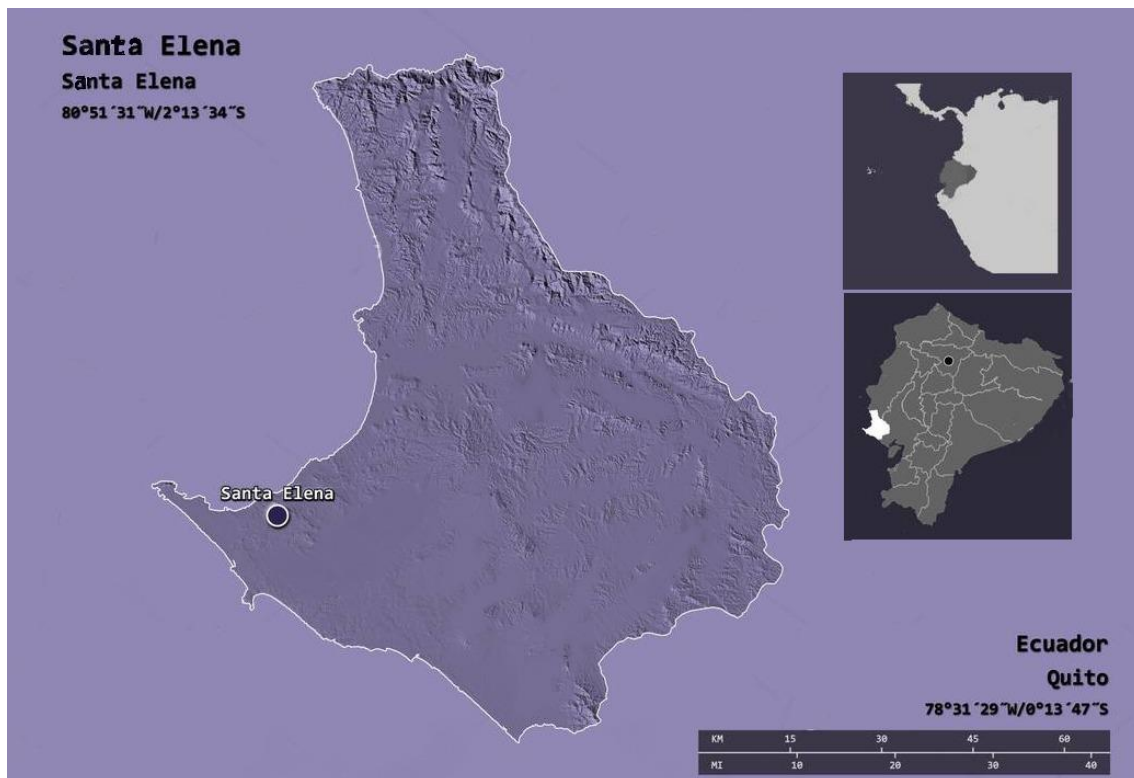


Imagen 1. Ubicación geográfica del Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM), en la provincia de Santa Elena – Ecuador.

2.2. Material biológico

Las esponjas *Mycale sp* fueron recolectadas desde la línea de producción de moluscos del CENAIM (Anexo1), adheridas sobre las valvas de ejemplares vivos de bivalvos a una

profundidad menor a 8 metros. Luego fueron trasladadas al lugar de trabajo en un recipiente con una temperatura ambiental de 22°C.

Las ascidias coloniales *Botryllus sp* fueron extraídas con la ayuda de pinza y bisturí de las valvas de *Spondylus crassisquama* de los tanques de maduración de moluscos del CENAIM, donde las condiciones son óptimas para favorecer la proliferación de estas colonias.

2.3. Identificación de los organismos empleados en el estudio

Para ser identificadas como esponja de género *Mycale*, se siguió las indicaciones de Mothes, Da Silva, & Lerner, 2016 quienes especifican la forma de las espículas (Anexo 2). Mientras que, la identificación de las ascidias coloniales se hizo mediante el procedimiento de Jaffar & Tamiselvi, 2016, quienes especifican la coloración, morfología larvaria y el número de ámpulas (24-32) que se incuban en la túnica para ser consideradas del género *Botryllus*.

2.4. Efecto de las dietas microalgales sobre el crecimiento de esponja *Mycale sp*.

Para evaluar el efecto de las dietas microalgales en el crecimiento, se cortaron 24 trozos pequeños de esponjas (Anexo 3), colocándolas en microtubos de 1.5 ml, con agua de mar filtrada y esterilizada con luz ultravioleta. Mientras que, las microalgas empleadas fueron obtenidas del laboratorio de Microalgas del CENAIM.

Inmediatamente, se puso una muestra en cada uno de los pocillos de las 2 microplacas agregando 1 ml de agua de mar esterilizada manteniendo una temperatura de 23 °C. Luego de 24 horas, 12 de las muestras de esponjas fueron alimentadas con 1 ml de la dieta conformada por *Isochrysis sp*, *Chaetoceros sp* y *Pavlova sp* (Pavl/Iso/Chae) con una concentración de 500 cel/ml.

Mientras que, las restantes 12 muestras de esponjas fueron alimentadas con 1 ml de la dieta conformada por *Isochrysis sp*, *Chaetoceros sp* y *Thalassiosira sp* (Thala/Iso/Chae) con

una concentración de 500 cel/ml como se muestra en la Figura 1. El ensayo tuvo una duración de 15 días y se realizó un registro fotográfico diario.

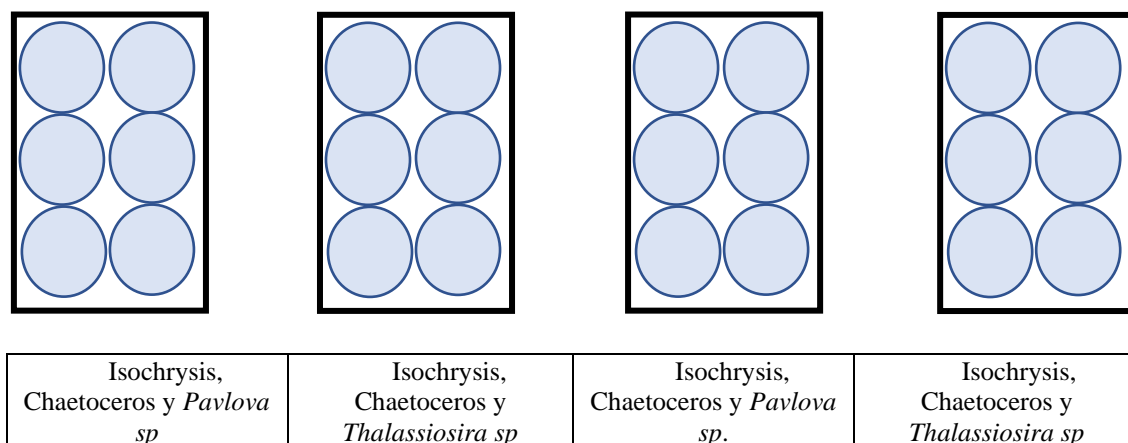


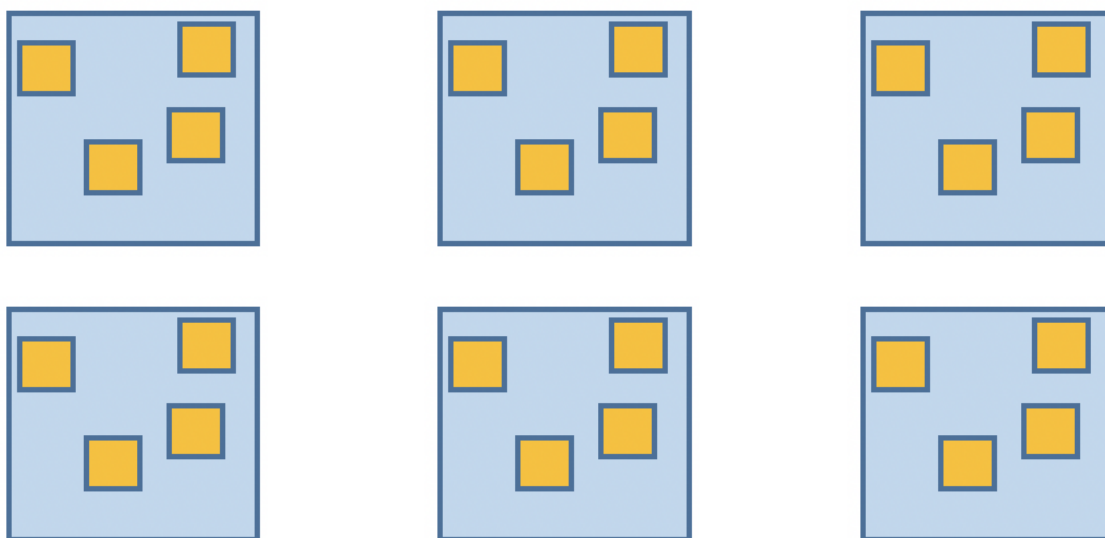
Figura 1. Esquema de dietas microalgales para *Mycale sp.*

2.5. Efecto de las dietas microalgales sobre el crecimiento de ascidias *Botryllus sp.*

Para evaluar el efecto de las dietas microalgales sobre el crecimiento de *Botryllus sp* se extrajeron las mejores colonias cuyos zooides estaban completos y esparcidos para ser trasplantadas en placas de PVC de 6 x 6 cm fijándolas mediante un hilo de nylon (Anexo 4).

Las placas se mantuvieron cerca de la superficie mediante pedazos de boyas. Luego, se colocaron cuatro placas por gaveta, utilizando un total de seis gavetas con suministro constante de oxígeno (Anexo 5).

Las muestras se alimentaron después de 24 horas y se probaron tres dietas microalgales con una densidad de 150.00 células/mL/día, las cuales fueron: *Pavlova sp*, *Thalassiosira sp* y la mezcla 1:1 de *Isochrysis sp* y *Chaetoceros sp*. Una vez observada la fijación de las colonias en las placas se procedió a retirar el hilo. El ensayo tuvo una duración de 15 días y se realizó un registro fotográfico diario. La Figura 2 muestra el diseño utilizado:



Colonia de *Botryllus sp* con
Paulova sp

Colonia de *Botryllus sp* con
Thalassiosira sp

Colonia de *Botryllus sp*
con *Isochrysis sp* /
Chaetoceros sp


 Colonia de *Botryllus sp* en placa de PVC.

Figura 2. Representación gráfica de los explantes de ascidias coloniales *Botryllus sp* para prueba de dietas microalgales.

2.6. Medición del crecimiento del área de cobertura

Los datos del crecimiento de la esponja *Mycale sp* y ascidia *Botryllus sp* fueron registrado mediante fotografía diaria a través de una cámara Cannon Power Shot D20, lo cual, se tomará en cuenta el área que ocupa el organismo sobre el sustrato que esta adherido en mm² mediante el programa de Análisis Iwork.

2.7. Análisis estadístico

Se evaluaron la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro Wilk y la homocedasticidad de las varianzas con la prueba Levene. Cumplido el supuesto de normalidad de los datos se estableció diferencias significativas mediante análisis de varianza ANOVA una vía ($p < 0.05$). Al existir diferencias se procedió a la evaluación de

cada tratamiento mediante prueba de contraste de Tukey ($p < 0.05$). El programa estadístico utilizado fue el software libre R estudio para Windows.

3. RESULTADOS

3.1. Identificación de los organismos de estudios

Mycale sp

El espécimen de esponja *Mycale sp* analizado fue de color naranja fuerte, flabelado sin presencia de mucus, pinacodermo liso y frágil al tacto. Presentó espículas megascleras monoactinas y diactinas con un tamaño promedio de 364.99 μm unidas por muchas fibras de espongina y microscleras muy variadas. Según la descripción detallada de Da Silva (2016) estas características corresponden a esponjas pertenecientes al género de *Mycale* (imagen 2).

Reino *Animalia*

Filo *Porifera*

Clase *Demospongia*

Orden *Poecilosclerida*

Familia *Mycalidae*

Género *Mycale*

A



B



Imagen 2. Esponja (A) y espículas (B) de espécimen analizado (*Mycale sp*).

Botryllus

El espécimen de ascidia colonial analizado presentó una coloración café clara, una túnica blanda y entre 10 – 11 hileras de estigmas; tiene zooides ovalados de hasta 3 mm de

longitud, cuerpo no dividido en tórax y abdomen. Además, posee un sifón oral sin pegar y su auricular largo y ancho, estrechándose en un tubo (imagen 3).

Reino *Animalia*

Filo *Chordata*

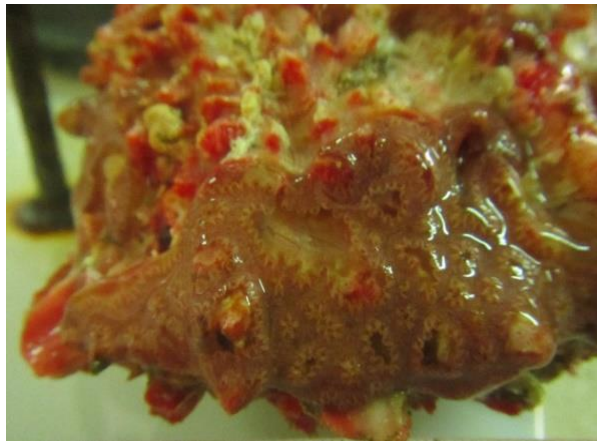
Clase *Ascidiacea*

Orden *Pleurogona*

Familia *Styelidae*

Genero *Botryllus*

A



B



Imagen 3. Ascidia (A) y zooides (B) del espécimen analizado (*Botryllus sp.*).

3.2. Normalidad y homogeneidad de los datos

Se efectuó el análisis de los datos de las dietas en *Mycale sp.* y *Botryllus sp.* los cuales mostraron valores de normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk ($p < 0.05$). Todos los datos obtenidos muestran normalidad. (Tabla 1; figura 3).

Tabla 2. Resumen estadístico de la normalidad y homocedasticidad de las varianzas de datos *Mycale sp* y *Botryllus sp.* Dietas: AM= Isochrysis/Chaetoceros/Thalassiosira, BM= Isochrysis/Chaetoceros/Pavlova, Dietas: AB=Pavlova sp, BB=Iso/Cha, CB=Thalassiosira sp.

<i>Dieta Mycale sp</i>			
Concentración mg/ml		A M	B M
Shapiro-Wilk W		0.96	0.93
p(normal)		0.8291	0.3909
Levene prueba para Homocedasticidad de varianza (medias) (valor p)			0.2371

<i>Dieta Botryllus sp</i>			
Concentración mg/ml	A B	BB	BC
Shapiro-Wilk W	0.89	0.90	0.98
p(normal)	0.1300	0.1700	0.9760
Levene prueba para Homocedasticidad de varianza (medias) (valor p)			0.0006268

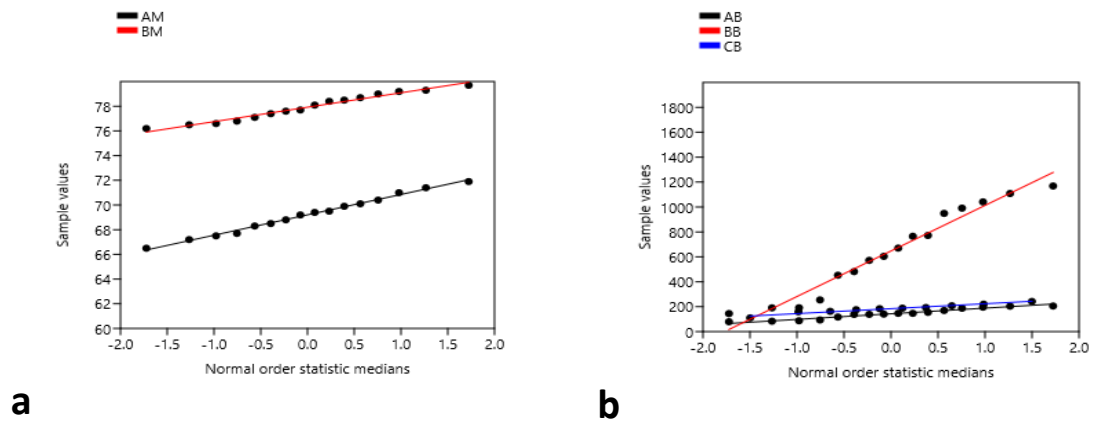


Figura 3. Análisis de normalidad de los datos evaluados en Dietas para a) *Mycale sp* y b) *Botryllus sp*: Dietas: Dietas: AM= Isochrysis/Chaetoceros/Thalassiosira, BM= Isochrysis/Chaetoceros/Pavlova, Dietas: AB=Pavlova sp, BB=Iso/Cha, CB=Thalassiosira sp.

3.3. Efecto de las dietas microalgales sobre el crecimiento de esponja *Mycale sp.*

Los ejemplares de esponjas *Mycale sp* colocados en los pocillos de las microplacas durante los días de ensayo tuvieron un porcentaje de supervivencia de 95%, pero la tendencia a disminuir el área de fijación se observó cada día de forma significativa respecto al día de 0 en cada tratamiento.

Para evaluar el crecimiento a través del tiempo de ensayo, se procedió a realizar el análisis de la pendiente en la dieta Pavl/Iso/Chae notamos que la pérdida de área de cobertura fue menor (-0,2303) a la pendiente de la dieta Thala/Iso/Chae (-0,3141). Esto nos indica que la presencia de *Pavlova sp* en la dieta retrasa el proceso de pérdida de cobertura comparada a la presencia de *Thalassiosira sp* (figura 4). Aunque estas no favorecen la fijación y crecimiento del organismo.

A partir de estos resultados se consideró evaluar el impacto de la materia orgánica como fuente alimenticia, el resultado fue un alto nivel de fijación y cobertura hasta el día 8, alcanzando un crecimiento de 93.12 mm² (figura 5). A partir de allí, se mostró un declive del área de 75.05 mm² y con una decoloración de las muestras. Desde el día 12 se muestra una expansión del área de 100.56 mm² debido a una fragmentación de los individuos. El mayor descenso fue el día 18 con un valor de 63.56 mm².

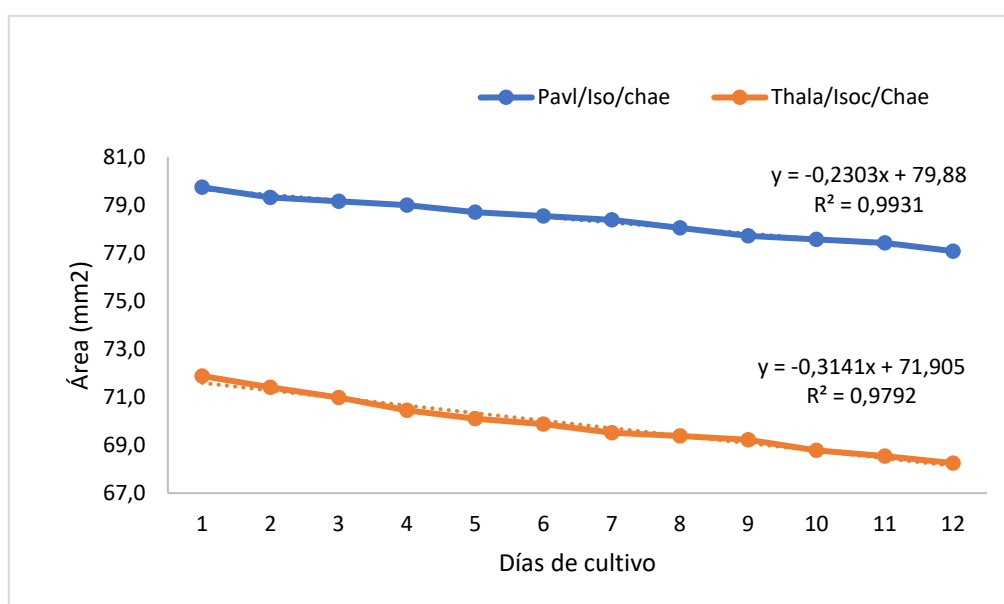


Figura 4. Crecimiento de las esponjas *Mycale sp* alimentadas con dietas en base a microalgas.

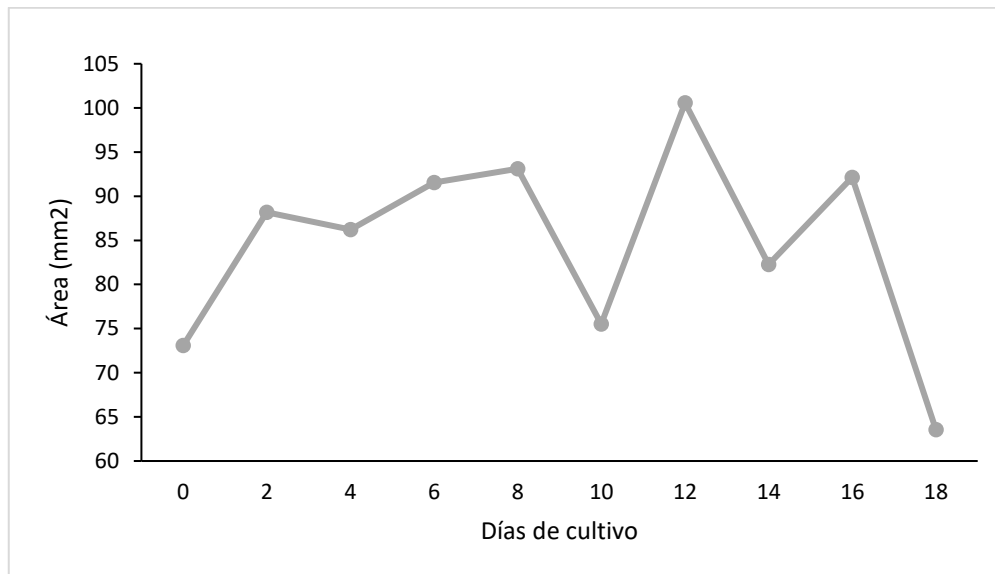


Figura 5. Crecimiento de las esponjas *Mycale sp* alimentadas con materia orgánica.

3.4. Efecto de la dieta microalgal sobre el crecimiento de la *Botryllus sp*

En la evaluación de la dieta, se observó diferencias significativas (ANOVA: $p < 0.05$) en el crecimiento, notamos mayor crecimiento en *Botryllus sp* alimentado con la mezcla de *Isochrysis sp* y *Chaetoceros sp* (Tukey: $p < 0.05$), alcanzando la media marginal más alta de 423 mm^2 en el día 4. Sin embargo, en el día 5 se dio una reducción llegando a menos de 128 mm^2 . Luego, las colonias se recuperaron alcanzando medias de 365 mm^2 que se mantuvieron hasta el día 9 (figura 6).

Por otra parte, con la dieta de *Thalassiosira sp*, el crecimiento de *Botryllus sp* no fue tan notable ya que se alcanzaron medias marginales de 70.1 mm^2 , las cuales tuvieron un declive a partir del día 4 cuando disminuyó la media a 17.8 mm^2 .

Se observó recuperándose en el día 8 con 54 mm^2 . Mientras que con la dieta *Pavlova sp* se observaron mejores resultados que con *Thalassiosira sp* con una media de 95 mm^2 hasta el día 8, que luego disminuyó a 0 en el día 9. Se observó en recuperación al día 10 con 58.2 mm^2 (figura 6).

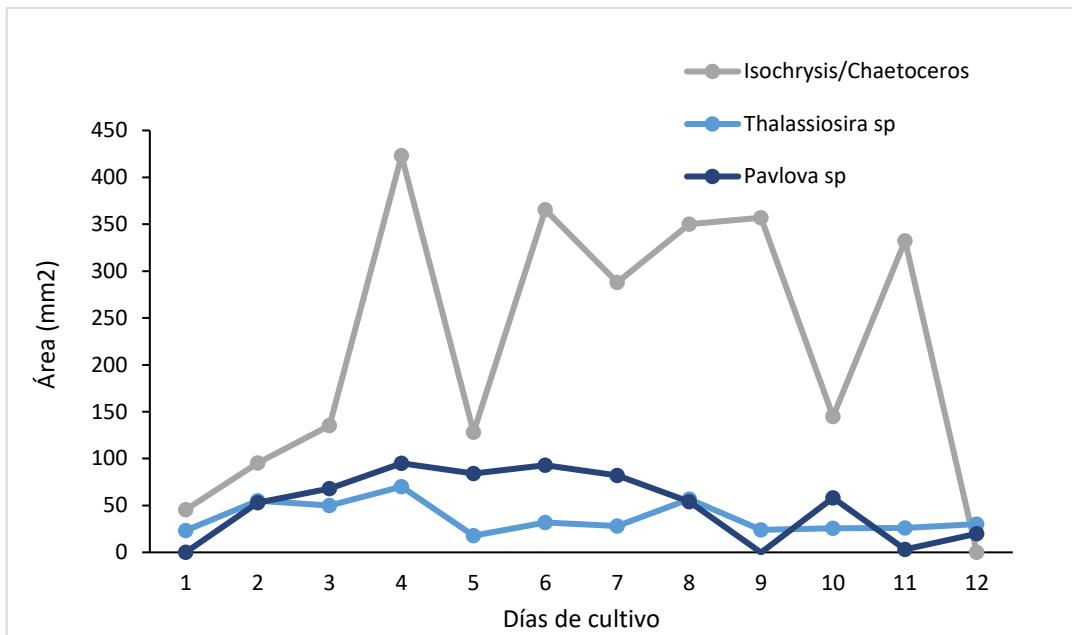


Figura 6. Medias marginales del crecimiento de *Botryllus sp* alimentado con 3 dietas. Se observa el efecto negativo de retirar el hilo fijador al día 5.

4. DISCUSIÓN

Explorar las condiciones de cultivo en sistemas cerrados para las esponjas y tunicados es un paso vital para la obtención de bioactivos potenciales sin recurrir a actividades extractivas. En este estudio se evaluó el potencial de cultivo de esponjas y tunicados ricos en compuestos con actividad biológica.

Identificación

Para la identificación de los organismos prometedores en compuestos bioactivos, es necesario literatura detallada que permita apreciar características taxonómicas claves para lograr llegar hasta el nivel más bajo, en este caso hasta Género. Los géneros identificados en el presente estudio fueron *Mycale sp* y *Botryllus sp.*, estos forman parte del conjunto de epibiontes presentes en la mayoría de las valvas de moluscos.

Mycale sp es un género identificado por características distintivas tales como ramas incrustantes, arborescentes, bastante densa, colonias de forma irregular y un color azul. En de cada colonia se observa su superficie opaca e hispida mucosa con textura suave (Phuwapraisirisan *et al.* 2003). Nosotros identificamos este género a partir de muestras obtenidas en líneas de cultivos de moluscos, aun cuando existen reporte del género a lo largo del Pacífico en zonas rocosas, como por ejemplo *Mycale laevis*, cuyas características son muy semejantes al organismo en el presente estudios, ambas poseen cojines gruesos (5 cm), estructura de color amarillo anaranjado por fuera, más claro por dentro (Collin, 2005). Aun cuando comparten estas características muy notorias, crece la necesidad de estudios moleculares para su definición correcta.

En el caso de *Botryllus sp.*, Acorde a Integrated Taxonomic Information System (ITIS), los Botrylloides poseen una variedad de formas, a veces van acorde a la superficie del sustrato. Carver, 2006 reporta la presencia de dos características morfológicas básicas (irregular o estrellada) dentro del género *Botryllus*. Otra característica reportada es el color de la colonia, pero reportes atribuyen la variedad de colores a factores ambientales como afloramiento algal y presencia de microflora bacteriana en la superficie del organismo. Debido estas características morfológicas tanto *Botryllus sp.* y *Mycale sp.* son difíciles de identificar a nivel de especie.

Dietas

En lo referente a las dietas, a fin de establecer el requerimiento alimenticio se evaluaron varias dietas a base de microalgas en *Mycale spp.* y *Botryllus spp.* Estos organismos filtradores requieren un movimiento continuo del flujo de agua, provocado por la inyección de aire comprimido mediante uso de dispersores para la formación de microburbujas que generan tal flujo de agua y estimulan la filtración de los organismos. El presente ensayo de cultivo de *Mycale spp.* en microplacas bajo ausencia de flujo de agua, presentó mortalidad de los organismos en el ensayo, pero fue capaz de sobrevivir varios días alimentada únicamente de materia orgánica. Esto podría deberse a la capacidad coloidal de que tiene la materia orgánica. Contrario a nuestros resultados, ensayos estudios en sistemas cerrados con flujo continuo discontinuo y en flujo continuo donde se usó dietas a base de microalgas y se obtuvieron resultados favorables, se pueden destacar la de Belarbi *et al.* 2003 en esponjas *Crambe crambe*, que utilizaron una dieta a partir de la microalga *Phaeodactylum tricornutum*; Caralt, Agell y Uriz (2003), utilizaron una mezcla de bacterias marinas con microalgas *Chlorella sp* para la alimentación de sus esponjas *Corticium candelabrum* y Carballo *et al.* 2010 usó una mezcla de *Tetraselmis sp*, *Isochrysis sp* y levadura en polvo *Saccharomyces cerevisiae* en su cultivo de esponja *Mycale Cecilia*. Basado en estos ensayos podríamos hipotetizar que nuestros resultados fueron afectados por la falta de flujo de agua y la precipitación de las microalgas (*Pavlova sp.* talla 5 μm y *Thalassiosira sp.* talla 20-25 μm), por lo cual para favorecer la sobrevivencia y fijación del organismo en condiciones in vitro es mejor al usar material orgánico coloidal ($< 0.1 \mu\text{m}$)

Las ascidias coloniales *Botryllus spp.* al igual que *Mycale sp.* son organismos filtradores y comúnmente se asientan en diferentes tipos de sustratos naturales como valvas, o elaborados como cerámica, concreto y vidrio, y crecen como esteras delgadas, planas e incrustantes dependiendo del tipo de sustrato y la madurez de la colonia (Epelbaum *et al.* 2009), consecutivamente la supervivencia y extensión de la colonia dependerá de su dieta. Según Rinkevich y Shapira 1998 indica que la alimentación con *Isochrysis sp* es beneficiosa para la fijación y crecimiento de juvenil de las larvas de *Botryllus sp.* Por su parte, Epelbaum *et al.* 2009 indican que con una mezcla de *Chaetoceros muelleri* y *Isochrysis sp* se puede tener un crecimiento favorable de las colonias juveniles de *Botryllus sp.*

Estos reportes coinciden con los resultados de este estudio donde las colonias de *Botryllus sp* alimentadas con *Chaetoceros sp* y *Isochrysis sp* mostraron mejores resultados que las que fueron alimentadas con *Pavlova sp* y *Thalassiosira sp*. Según Gómez *et al.* 2011 el valor nutricional de las microalgas es dependiente del tamaño de la célula, digestibilidad y alto nivel bioquímico, característica que provee las dietas con *Chaetoceros sp* y *Isochrysis sp*.

En este sentido, la evaluación del crecimiento de esponjas *Mycale sp* y *Botryllus sp*. Indican que la etapa de fijación es clave para posterior formar cobertura del área por parte de los organismos, siendo importante ahondar más investigación en procesos de reproducción para asegurar la expansión de la colonia o cobertura del sustrato.

5. CONCLUSIONES

Al evaluar el efecto de dos mezclas de dietas microalgales en el crecimiento de la esponja *Mycale*, se presentó complicaciones para fijarse al sustrato para el ensayo experimental. La dieta evaluada no favoreció su crecimiento para colonizar el sustrato. Contrario a esto, cuando las esponjas fueron alimentadas con materia orgánica se observó crecimiento de la colonia, sugiriendo que la carga en materia orgánica es vital para el desarrollo de las esponjas *Mycale sp.*

Mientras que en ascidia colonial *Botryllus sp.*, la mezcla de microalgas *Isochrysis sp/Chaetoceros sp* mostró los mejores resultados para el desarrollo de la colonia de ascidia *Botryllus sp.* Incluso presentó una gran capacidad adaptativa para fijarse a cualquier sustrato. En cuanto a las dietas *Thalassiosira sp* y *Pavlova sp.* su crecimiento no fue favorable (no significativo).

La fijación de los organismos al sustrato fue reducida, aunque la menor reducción en ambos géneros estudiados fue en presencia de la dieta *Pavlova sp.* esto nos ayuda a afianzar conocimiento que permitan mejorar la tasa de fijación al sustrato y producir biomasa, así fortalecer la importancia de los géneros estudiados como futura fuente de metabolitos de importancia biotecnológica.

RECOMENDACIONES

Se requieren más estudios sobre el efecto de la mezcla de varias microalgas y su grado de concentración para un óptimo crecimiento de las esponjas *Mycale sp* y ascidias *Botryllus sp*, considerando sus capacidades reproductivas y competitivas con otros epibiontes.

Se sugiere trabajar en la evaluación de sustratos para la fijación de los organismos a fin de estimular la colonización.

Realizar estudios bioquímicos para conocer como la dieta aumenta o disminuye su nivel y composición de metabolitos útiles para el campo de la biomedicina.

LITERATURA CITADA

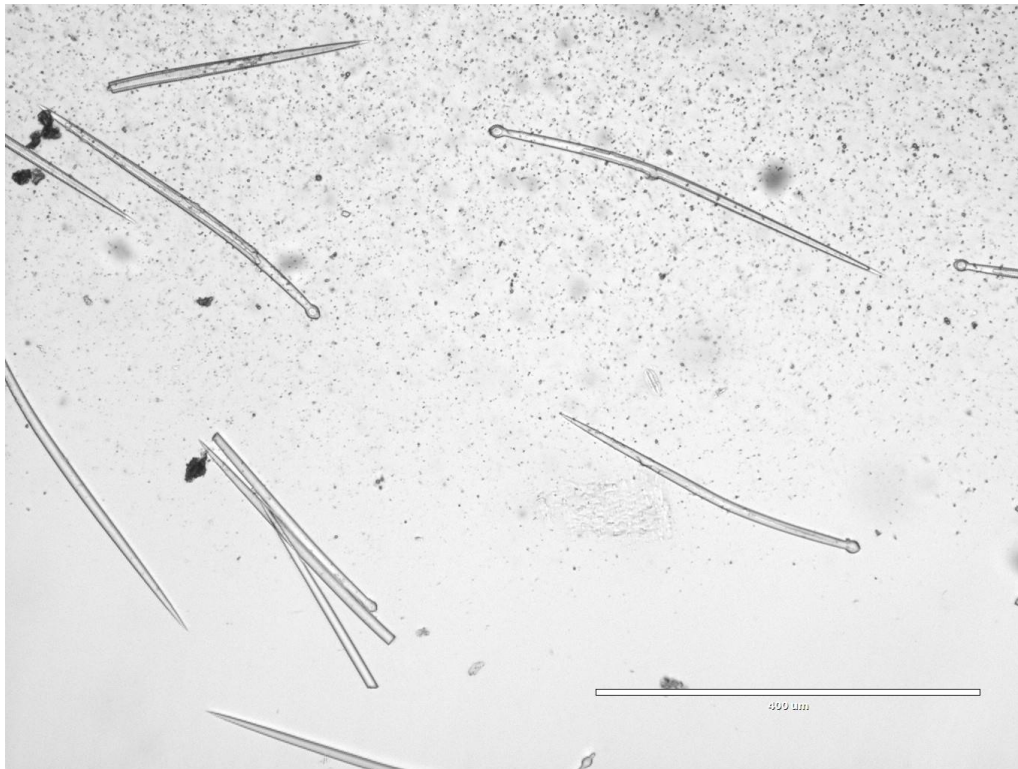
- Belarbi, H., Domínguez, R., Cerón, C., Gómez, A., García, F. y Molina, E. (2003). Cultivation of explants of the marine sponge *Crambe Crambe* in closed systems. *Biomolecular Engineering*, 20, 333-337.
- Brunetti, R. (1974) Observations on the life cycle of *Botryllus schlosseri* (Pallas) (Ascidacea) in the Venetian lagoon. *Bolletino de Zoologia*, 41, 225-251.
- Caralt, S., Agell, G. y Uriz, M. (2003). Long-term culture of sponge explants: conditions enhancing survival and growth, and assessment of bioactivity. *Biomolecular Engineering*, 20, 339-347.
- Carballo, J., Yañez, B. y Zubía, E. (2010). Culture of Explants from the Sponge *Mycale cecilia*. *Marine Biotechnology*, XII, 516-525.
- Carver, C., Mallet, A. y Vercaemer, B. (2006). Biological Synopsis of the colonial tunicates, *Botryllus schlosseri* and *Botrylloides violaceus*. *Fisheries and Oceans Canada Bedford Institute of Oceanography*. 51p.
- Collin, R., Díaz, M., Norenburg, J., Rocha, R., Sánchez, J., Schulze, A., Schwartz, M. y Valdés, A. (2005). Photographic Identification Guide to Some Common Marine Invertebrates of Bocas Del Toro, Panama. *Caribbean Journal of Science*. XLI, 638-707.
- Coello, L., Martín, M. y Reyes, F. (2009). Diazacyclohenicosane, a New Cytotoxic Metabolite from the Marine Sponge *Mycale sp.* *Marine drugs*, VII (3), 445-450.
- Corriero, G. y Pronzato, R. (1987). Epibiontic sponges on the bivalve *Pinna nobilis*. *Marine Ecology Progress Series*. 35, 75-82.
- Datta, D., Talapatra, N. y Swarnakar, S. (2015). Bioactive compounds from marine invertebrates for potential medicines – An overview, *International Letters of Natural Sciences*, 42-61.
- Epelbaum, A., Therriault, T., Paulson, A. y Pearce, C. (2009). Botryllid tunicates: Culture techniques and experimental procedures. *Aquatic Invasions*, IV, 111-120.
- Feifarek, B. (1987). Spines and Epibionts as antipredator defenses in the thorny oyster *Spondylus americanus* Hermann. *The Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 105, 39-56.
- Gómez, O., Rodríguez, R. y Subero, S. (2011). Cultivo polialgal (*Chaetoceros gracilis*, *Chlorella sp.* y *Tetraselmis chuii*) en medios nutritivos no convencionales. *Saber, Universidad de Oriente, Venezuela*. XXIII, 84-90.

- Jaffar, H. y Tamiselvi, M. (2016). Ascidians in coastal water: A comprehensive inventory of ascidian fauna from the Indian coastal. *Springer International Publishing*. 157p.
- Lacoste, E., Le Moullac, G., Levy, P., Gueguen, Y. y Gaertner, N. (2014). Biofouling development and its effect on growth and reproduction of the farmed pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *Aquaculture*. 434, 18-26.
- Mackensen, A., Brey, T., Bock, C. y Luna, S. (2012). *Spondylus crassisquama* Lamarck, 1819 as a microecosystem and the effects of associated macrofauna on its shell integrity: isles of biodiversity or sleeping with the enemy? *Marine Biodiversity*. 42, 443–451.
- Mazouni, N., Gaertner, J. y Deslous, J. (2001). Composition of biofouling communities on suspended oyster cultures: an in-situ study of their interactions with the water column. *Marine Ecology Progress Series*. 214, 93–102.
- Milkman, R. (1967) Genetic and developmental studies on *Botryllus schlosseri*. *Biological Bulletin*, 132, 229-243.
- Mothes, B., Da Silva, C., y Lerner, C. (2016). Guia ilustrada Esponjas Marinhas Costa sul- Brasileira. *Coleção Manuais de Campo USEB*.
- Osinga, R., Tramper, J. y Wijffels, R. 1999. Cultivation of marine sponges. *Marine Biotechnology*, 1, 509-532.
- Phuwapraisirisan, P., Matsunaga, S., Fusetani, N., Chaitanawisuti, N., Kritsanapuntu, S. y Menasveta, P. (2003). Mycaperoxide H, a New Cytotoxic Norsesiterpene Peroxide from a Thai Marine Sponge *Mycale* sp. *Journal of Natural Products*. LXVI, 289-291.
- Rinkevich, B. y Shapira, M. (1998). An improved diet for inland broodstock and the establishment of an inbred line from *Botryllus schlosseri*, a colonial sea squirt (Ascidiacea). *Aquatic Living Resources*, XI, 163-171.

Anexos.



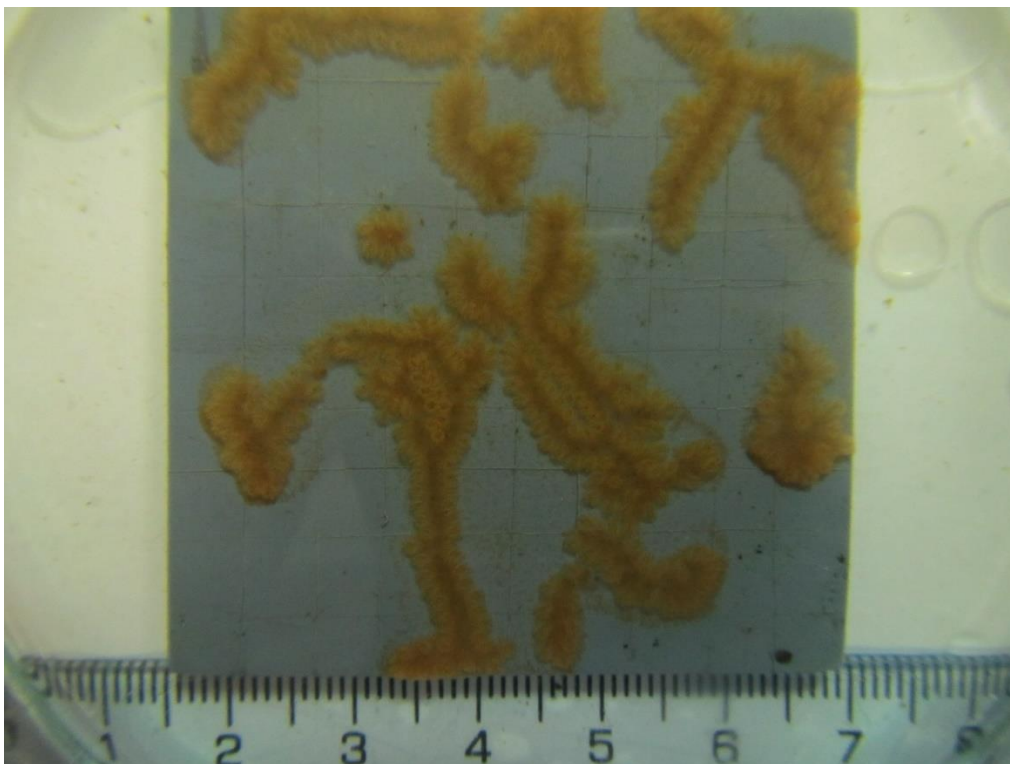
Anexo 1. Extracción de las canastas de moluscos en la línea de cultivo del CENAIM.



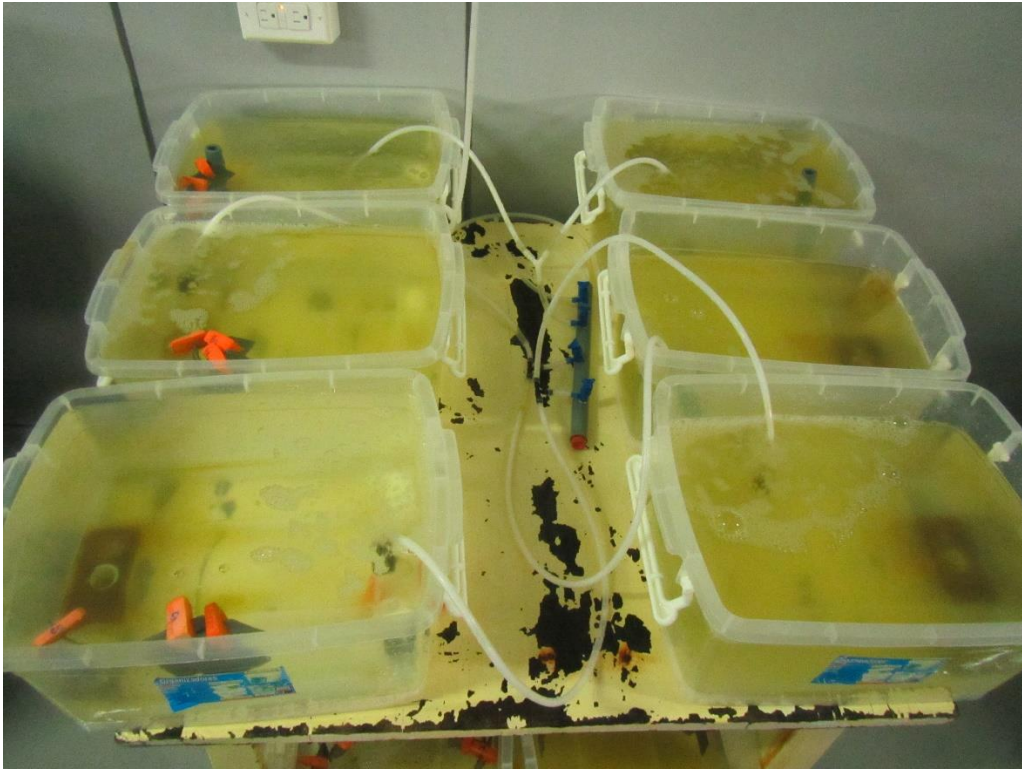
Anexo 2. Espículas de esponjas *Mycale sp*



Anexo 3. Extracción de las esponjas *Mycale* sp adheridas a valvas de *Spondylus*.



Anexo 4. Crecimiento de la colonia de *Botryllus* sp sobre la placa de PVC.



Anexo 5. Diseño experimental para análisis del crecimiento de *Botryllus sp* a base de tres tipos de dietas microalgales.

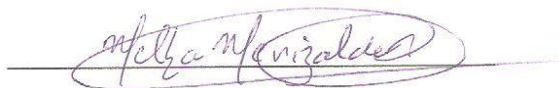
CERTIFICADO

CERT-0085-2021

Por medio de la presente certifico que el resumen en idioma inglés del trabajo de titulación del Señor Estudiante **RODRÍGUEZ SOLÓRZANO JHOAN CARLOS**, con código académico BM-196, reproduce con veracidad y precisión el significado de la versión final del resumen en idioma español por mí revisado y calificado, y cumple con las normas y estándares de contenido y formato establecidos por la *American Psychological Association –APA–* Séptima Edición, así como con las reglas gramaticales, semánticas, sintácticas, ortográficas y de vocabulario propias de dicho idioma extranjero.

Este certificado se expide en la ciudad de Portoviejo, el día 10 de marzo de 2021 para conocimiento de la Secretaría General de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Manabí - PUCE Sede Manabí.

Atentamente,

A handwritten signature in blue ink, reading "Melba Merizalde Alcívar", is written over a horizontal line. The signature is enclosed in a light blue oval.

Lic. Melba Merizalde Alcívar

Mgs. en Enseñanza de Inglés como Idioma Extranjero