



Pontificia Universidad
Católica del Ecuador

SEDE
ESMERALDAS

CARRERA DE GESTIÓN AMBIENTAL

TESIS DE GRADO

Primera aproximación de un cultivo de *Ostreopsis cf. ovata* bajo condiciones de laboratorio

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA EN
GESTIÓN AMBIENTAL

AUTORA

Reyes Santos Andrea Carolina

ASESORA

Mgtr. Rebolledo Monsalve Eduardo

Esmeraldas – marzo 2022.

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

Trabajo de tesis aprobado luego de haber dado cumplimiento a los requisitos exigidos por el reglamento de Grado de la PUCE – SE, previo a la obtención del título de Ingeniero en Gestión Ambiental.

Presidente tribunal de Graduación.

Ph.D. Molinero Jon

Lector 1

Ph.D. Jiménez Pedro

Lector 2

Mgtr. Karla Solís Charcopa

Coordinadora de la Carrera de Gestión Ambiental

Mgtr. Rebolledo Monsalve Eduardo

Asesor de Tesis

Esmeraldas, viernes 25 de marzo de 2022.

AUTORÍA

Yo, Andrea Carolina Reyes Santos, declaro que la presente investigación enmarcada en el actual trabajo de tesis es absolutamente original, auténtica y personal.

En virtud del contenido con respecto a esta investigación se expone que es exclusiva responsabilidad legal y académica del autor y de la “PUCE - SE”.

Nombre: Andrea Carolina Reyes Santos

C.I.: 085012458 – 7

DEDICATORIA

El simple hecho de existir es un logro que me ha permitido *Dios*, por eso cada uno mis movimientos son aprobados por *Él*. Todo lo que he logrado y lograré será en su nombre.

Llegar hoy a culminar esta meta me ha costado mucho más tiempo que al resto. Sin embargo, quiero dejar por sentado que mis tiempos no son comparables y deben ser respetados.

A mis padres, todo se los debo y todo se los recompensaré. Mi vida, mis logros, mis sueños y mi razón de existir se los dedico a ustedes. *Con amor y desvelo.*

A mis sobrinos, *Jorge Elías, Renato Emilio, Noah Fabiana y Rafaella*. A mis hermanos, *Jorge Luis y María Fernanda*. A *Sugey y Juan Carlos*.

A mi familia, en su totalidad.

A mis verdaderos amigos, *Sammy, María Belén, Josselyn, Erika, Karen, Helen, Roxanna, Kevin, Freddy, Gustavo, José Luis V.*

A mi apoyo emocional más grande, la conexión más fuerte y real que he tenido. *Anita María*, mi gata.

A mi persona, porque me lo debo todo y soy merecedora.

A la naturaleza misma, en todo su esplendor.

AGRADECIMIENTOS

Mis gracias infinitas a Dios, Creador, Todopoderoso que nos permite vivir bajo su legado y en cada uno de sus tiempos. Todo lo que soy es por Él y todo en la vida se da en el momento que Él lo disponga.

“El legado que un padre deja a sus hijos es el estudio”.

A mis padres, que con tanto esfuerzo sacaron adelante mis sueños y nunca me dejaron caer aún en circunstancias difíciles. A mi papá, por hacer todo lo que está a su alcance para que mis sueños se realicen, por sus consejos, por su compañía incondicional, por incluso dejar su trabajo a un lado para cuando yo lo necesito, por amarme tanto. A mi mamá, por su interés de que siempre haga las cosas bien, como debe ser; por siempre demostrarme estar presente en cada paso que doy, por quedarse conmigo hasta la hora que sea por terminar mis trabajos, por tenerme al pendiente de mis actividades del diario, por darme la vida. Ustedes son mi razón de existir y los amo en cuerpo, alma, razón y corazón, sin límites.

A mi hermano, por apoyarme en mis estudios, por defenderme, por darme oportunidades para superarme a través de su conocimiento y experiencia; por estar ahí conmigo y querer mi superación. Por enseñarme a manejarme, tanto intrapersonal como interpersonalmente.

A mi hermana, por no querer que me equivoque en cualquier paso que doy y siempre consentirme, por guardarme secretos, pero no sin antes darme un buen consejo; por enseñarme a sobrevivir en el mundo real.

A mis hermanos, por darme a mis sobrinos: Jorge Elías, Renato Emilio, Noah Fabiana y Rafaella; a los cuales les tengo que demostrar que sí se puede llegar lejos, como lo hará su tía y seguir mi ejemplo. A ellos les quiero decir que siempre que necesiten de mi ayuda la tendrán, siempre estaré ahí.

A mi cuñada, Sugey. A mi cuñado, Juan Carlos. Por ser parte de mi cálida familia y apoyarme siempre.

A mi abuela, Argentina, mi mamatina, que sé que desde el cielo está muy orgullosa de mí y de lo que me he convertido, por darme los mejores momentos de mi niñez y por amarme tanto. A mi abuela, Alicia, que me ha mandado palabras de aliento siempre que puede y ha hecho esto posible al darme las herramientas para poder lograr mis metas.

A mi segunda familia, gracias por el apoyo a la distancia. Patricia Santos, Claudia Santos, Arianita Conde S., Gilberto Orozco y Diego Orozco.

A mi tío Julio Santos, y de manera especial a José y Fernando que me apoyaron siempre. Un saludo hasta el infinito.

A mis mejores amigas, hermanas de distinta sangre, unidas en corazón, por darme frases de aliento y sacar lo mejor de mis peores momentos. Por hacerme olvidar por horas de mis preocupaciones, gracias.

A mis mejores amigos, gracias, por hacerme fuerte con sus consejos llenos de verdad, por estar ahí cuando mis tristezas abundan por mi mente.

Un agradecimiento especial para quienes aportaron con un grano de arena en este trabajo que significó un lugar especial en mi corazón, Gustavo Pavón, Erika Mera, Salvador Zerna, Andrés Pineda, Camila Garzón y María José Lobo.

Por ellos y cada uno de ellos, se hace posible este logro.

A mi asesora Olga Carnicer, que me ha ayudado tanto para poder lograrlo, desde el momento en que ella me escogió para ser su pupila, gracias por enseñarme cada uno de los conocimientos que he obtenido. Además, de transmitirme su sencillez y humildad, que, a pesar de ser tan grande intelectualmente, nunca se debe dejar de ayudar a los demás ni de cambiar quién eres. Gracias por su inmensa paciencia. Gracias porque con usted lo hice posible.

A mis profesores: Karla Solís, Eduardo Rebolledo, Jorge Velazco, Felipe Carrera, Ignacio Carazo, Pedro Jiménez, Jon Molinero y demás profesores que pasaron por mi vida universitaria y brindaron un poco de su conocimiento conmigo, así como también, gracias por despejar mis dudas cuando lo necesité y sobre todo gracias por alentarme cuando me veían no poder seguir más, por supuesto también por cada uno de sus consejos.

Gracias a Emilia Jama por haberme tenido paciencia y guiarme siempre que lo necesité con cualquier trámite, gracias por existir.

Gracias totales, a todos los que han querido y velado por mis logros, por hacerme mejor persona cada día.

ÍNDICE DE CONTENIDO

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN	I
DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTOS	IV
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
ÍNDICE DE GRÁFICAS	X
ÍNDICE DE TABLAS	X
RESUMEN	XI
ABSTRACT	XII
INTRODUCCIÓN	13
Planteamiento del problema	15
Justificación.....	15
Delimitación de objetivos.....	17
Objetivo General	17
Objetivos específicos	17
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO	18
Bases teórico-científicas.....	18
Microalgas.....	18
Dinoflagelados	19
Floraciones Algales Nocivas (FAN)	20
<i>Ostreopsis sp.</i>	21
<i>Ostreopsis cf. ovata</i>	22
Parámetros requeridos para los cultivos de microalgas	23
Luz.....	23
Temperatura.....	23
Nutrientes	23
Crecimiento.....	24
Fases del crecimiento microbiano.....	24
Colección de microalgas	25
Antecedentes	26
Marco Legal	27

Capítulo II: MATERIALES Y MÉTODOS	29
Aislamiento de las cepas de <i>Ostreopsis cf. ovata</i>	29
Recolección de muestras.....	29
Análisis físico – químico del agua	31
Cultivo de microalgas.....	31
Preparación de medios de cultivo.....	31
Aislamiento e inoculación de la cepa y cultivos stock	32
Experimento	33
Conteos y mediciones obtenidas de las muestras fijadas.....	33
Cálculo de la Tasa de crecimiento.....	35
Mediciones	35
Análisis de datos.....	36
CAPÍTULO III: RESULTADOS.....	37
Crecimiento <i>Ostreopsis cf. Ovata</i>	37
Tasa de crecimiento.....	39
Tamaño	39
Morfología de las células	43
CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN	44
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	49
Conclusiones	49
Recomendaciones.....	49
BIBLIOGRAFÍA	50
ANEXOS 57	
Figuras.....	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	(53). [Five growth phases of micro – algae cultures] [Image]. [Belgium]: Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture, 1996. 1 image: b/w, 2.7"x4.374.	25
Figura 2.	Recolección de muestras: <i>Estación de muestreo</i>	30
Figura 3.	Toma de coordenadas geográficas.	57
Figura 4.	Agitación de muestras de macrófitas.	57
Figura 5.	Filtración de agua de mar mediante un tamiz con luz de malla de 200 μm	58
Figura 6.	Volumen de agua resultante.	58
Figura 7.	Medición pH, salinidad y temperatura.	59
Figura 8.	Purificación de agua de mar a través de filtros G/FC.	59
Figura 9.	Agua previamente filtrada vaciada en el Matraz Erlenmeyer con su respectiva cubierta de papel aluminio para evitar impurezas.	60
Figura 10.	Esterilización del agua filtrada junto con las puntas de micropipeta Plus-Sed en el autoclave. 60	
Figura 11.	Composición química del medio f/2 de Guillard.	61
Figura 12.	Caja Petri con una muestra del volumen de agua resultante obtenido.	61
Figura 13.	Derretimiento de las micropipetas de vidrio para obtener un orificio más pequeño. 62	
Figura 14.	Micropipetas de vidrio sometidas al mechero de Bunsen.	62
Figura 15.	Captura de células por capilaridad para su respectiva inoculación.	63
Figura 16.	Muestra aislada colocada en un portaobjetos dividido en 3 gotas.	63
Figura 17.	Microplaca con pocillos previamente abastecidos de medio esterilizado para la inoculación de células iniciales aisladas.	64
Figura 18.	Reescalado desde los pocillos a botellas estériles de 40 ml.	64
Figura 19.	Reescalado a botellas de 160 ml.	65
Figura 20.	Botellas con cultivos a exposición de luz natural – Laboratorio de Gestión Ambiental PUCE - SE. 65	
Figura 21.	Botellas con cultivos a exposición de luz artificial – Laboratorio de Microbiología PUCE - SE. 66	
Figura 22.	Termómetro digital para interiores ubicado en el Laboratorio de Microbiología PUCE - SE. 66	

Figura 23.	Termómetro digital para interiores ubicado en el Laboratorio de Gestión Ambiental PUCE - SE.	67
Figura 24.	Toma de alícuotas de 10 ml en tubos Falcon® fijadas con Lugol.....	67
Figura 25.	Agitación en forma de ocho de las muestras fijadas previo al recuento.	68
Figura 26.	Muestra fijada distribuida en cámara de sedimentación de Utermöhl (3 ml).	68
Figura 27.	Recuento de muestras fijadas en cámaras de sedimentación de Utermöhl por medio del microscopio invertido.	69
Figura 28.	Forma de medición con respecto a los recuentos - transecto lineal clásico....	69
Figura 29.	Mediciones del tamaño dorsoventral y ancho de células escogidas por medio del programa Optika Vision Lite.	70
Figura 30.	Portaobjetos micrométrico para calibrar el microscopio con la cámara integrada.	70
Figura 31.	Distribución frecuencial del largo de las células para ambas condiciones a lo largo del tiempo	71
Figura 32.	Distribución frecuencial del ancho de las células para ambas condiciones a lo largo del tiempo.	72

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1.	Curva de crecimiento <i>Ostreopsis cf. Ovata</i>	38
Gráfica 2.	Tamaño longitudinal (largo) de las células en el tiempo.	41
Gráfica 3.	Tamaño longitudinal (ancho) de las células en el tiempo.....	42
Gráfica 4.	Porcentaje de células deformes y normales para luz artificial y luz natural.	43
Gráfica 5.	Morfología de <i>Ostreopsis cf. ovata</i> . (A) Célula normal en fase de latencia/lag. (B) Célula deformada (con formaciones quísticas) en fase estacionaria.	44

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Parámetros físico – químicos del punto de muestreo.....	37
Tabla 2.	Medias de cada botella por fecha.....	39

RESUMEN

Ostreopsis cf. ovata es un dinoflagelado epibentónico tóxico que se distribuye ampliamente por el mundo y su presencia se ha hecho cada vez más frecuente. Varios estudios han comprobado su crecimiento bajo condiciones de laboratorio, para llevar a cabo un mejor entendimiento en cuanto a su comportamiento y características. Sin embargo, la mayoría de estas cepas estudiadas son del Mar Mediterráneo y algunos del Océano Atlántico y Japón. Actualmente, no se han realizado estudios de cultivos con cepas del Pacífico. Por tal motivo, en el presente estudio se realizó un cultivo de *O. cf. ovata* con cepas del Océano Pacífico expuestas a luz natural con el objetivo de evaluar su crecimiento. El experimento consistió en someter 4 botellas con cultivos expuestas a luz natural y 4 botellas con cultivos expuestas a luz artificial, a una temperatura ambiente (26 °C aprox.), se trabajó con agua de mar previamente filtrada en la autoclave. El aislamiento de la cepa se hizo por medio de pipetas de vidrio por capilaridad. Se añadió medio f/2 para el aporte nutrientes. Los resultados arrojaron una tasa de crecimiento ($0.31 \pm 0.02 \mu\text{m}$) significativamente mayor para la condición de luz natural, lo cual quiere decir que en el laboratorio de la PUCE - SE, se pueden llevar a cabo cultivos de microalgas con los instrumentos que se cuentan al momento y comprobando que la luz natural influye de manera positiva al crecimiento de estas, sin necesidad de mayores costos de inversión. Dando apertura a estudios sobre microalgas, que están revolucionando en el campo científico, enfatizando en el planteamiento del estudio de otras cepas que puedan aportar al sector acuícola y biotecnológico.

Palabras clave: Tóxico, *Ostreopsis cf. ovata*, luz natural, cepas, cultivos.

ABSTRACT

Ostreopsis cf. ovata is a toxic epibenthic dinoflagellate that is widely distributed throughout the world and its presence has become increasingly frequent. Several studies have verified its growth under laboratory conditions, to carry out a better understanding of its behavior and characteristics. However, most of these strains studied are from the Mediterranean Sea and some from the W. Atlantic and Japan. Currently, no culture studies have been conducted with Pacific strains. For this reason, in the present study a culture of *O. cf. ovata* with Pacific Sea strains exposed to natural light to evaluate their growth. The experiment consisted of subjecting 4 bottles with cultures exposed to natural light and 4 bottles with cultures exposed to artificial light, at room temperature (approx. 26 °C), working with seawater previously filtered in the autoclave. The isolation of the strain was done by means of glass pipettes by capillarity and f/2 medium was added for nutrient supply. The results showed a significantly higher growth rate ($0.31 \pm 0.02 \mu\text{m}$) for the natural light condition, which means that in the PUCE - SE laboratory, microalgae cultures can be carried out with the instruments that are counted, time and verifying that natural light positively influences their growth, without the need for higher investment costs. Opening studies on microalgae, which are revolutionizing the scientific field, emphasizing to approach to the study of other strains that can contribute to the aquaculture and biotechnological sector.

Keywords: Toxic, *Ostreopsis cf. ovata*, natural light, stains, culture

INTRODUCCIÓN

El término “plancton” fue acuñado por primera vez por el biólogo Víctor Hensen en 1887, el cual hace referencia a los organismos mayoritariamente microscópicos vivos o muertos que circulan a partir del movimiento del agua. De acuerdo con los elementos que lo componen, se clasifica en fitoplancton y zooplancton. Por su parte, el fitoplancton, comprende a los organismos autótrofos generalmente microscópicos, que forman parte del primer eslabón de la cadena trófica (1).

Por otro lado, el término “microalgas” se refiere a todos los microorganismos que contienen clorofila y realizan la fotosíntesis oxigénica, es decir, en la que el agua es el donante principal de electrones y posteriormente libera O_2 (1). Poseen una amplia diversidad de aproximadamente 100.000 especies, de las cuales solo han sido identificadas 4.000 de estas (2). Existen dos grandes grupos de microalgas: fitoplanctónicas y bentónicas, que se encuentran adheridas al sustrato (3).

Las microalgas son la base del ciclo del carbono y por tanto, determinan la cantidad de peces y crustáceos que se alimentan de este recurso (4). Por lo cual, una disminución de la diversidad y abundancia de microalgas se encuentra relacionada directamente con el declive de especies de peces y crustáceos, así como también, una proliferación de las mismas resulta en una disminución de los vertebrados e invertebrados que se alimentan de estas (3).

Se consideran blooms algales a grandes almacenamientos de microalgas, macroalgas y en algunos casos protistas (dinoflagelados) que eventualmente forran de biomasa o espuma las áreas costeras, tiñéndolas de distintos colores, tales como rojo, marrón, verde, entre otros. A su vez, reducen la cantidad de oxígeno disuelto del agua, a través de su excesiva demanda respiratoria, causando serios problemas de mortandad en especies de fauna marina, incluyendo aves marinas que se alimentan de peces contaminados por la ingesta de estas (5).

Por su parte, los dinoflagelados se refieren a un grupo de aproximadamente 2400 especies de organismos pertenecientes al reino protista y forman parte del plancton, la mayoría de las veces marino. Estos pueden ser autótrofos o también pueden considerarse como parásitos, mixotróficos e incluso simbioses. Dentro de sus generalidades, son conocidos particularmente como organismos potencialmente tóxicos. Y, la presencia de estas biotoxinas es generada principalmente por microalgas (6). Se clasifican en dos grupos taxonómicos, tales como organismos tecados con una existente cubierta dura y los organismos atecados o sin presencia de una cubierta dura (7).

Algunas microalgas segregan toxinas a ciertos predadores, las cuales se bioacumulan en los tejidos y en las vísceras de estos y posteriormente pueden llegar a ser consumidos por el ser humano, a través de su captura para alimento. Algunos de estos microorganismos tóxicos son la razón de la intoxicación por ciguatera e intoxicación diarreaica por ingesta de mariscos. Este tipo de microalgas son de relevancia en la realización de estudios, puesto que, representan una importante función ecológica y un riesgo potencial al ser humano por su producción de toxinas y su alta probabilidad de ser consumidas (8).

Debido a su amplia distribución geográfica, *Ostreopsis spp.*, es uno de los géneros de microalgas más conocidos con potencial de generar biotoxinas marinas (9). En otro aspecto, es considerada como parte del grupo de los dinoflagelados epibentónicos, en vista de que viven adheridas a diversos sustratos, entre estos macroalgas, rocas, sedimentos, lecho marino y comunidades de corales (10). Este género posee 9 especies registradas, son organismos tecados con una morfología muy similar en todos los casos y poseen la particularidad de presentar quistes como parte de una estrategia de adaptación ante el surgimiento de adversidades en el medio en el cual se desarrollan (11).

Por su parte, *Ostreopsis cf. ovata* es una de las especies con la capacidad de producir compuestos análogos con cierta similitud a las palitoxinas y ovatoxinas (12), generando efectos perjudiciales a su alrededor y en algunos casos al ser humano, no solamente por ingesta de mariscos contaminados sino también por aerosoles marinos tóxicos, es decir, por aspiración de pequeñas gotas con presencia de células de *Ostreopsis cf. ovata*, hasta ahora esto se ha registrado en el Mar Mediterráneo. Su presencia fue referida por primera vez por Fukuyo en 1981 (13) y se caracterizan por ser muy invasivos (14).

Además, estas microalgas son consideradas como bioindicadores de la calidad del ambiente en el que se encuentran (8). Puesto que, varios estudios han revelado que las condiciones ambientales del medio son determinantes clave para dar lugar a eventos de floraciones algales nocivas del género *Ostreopsis spp* (15,16).

Planteamiento del problema

La concurrencia de *Ostreopsis* cf. *ovata* ha sido cada vez más frecuente, siendo registrada mayormente en el Mar Mediterráneo (9,11,15,17,18) y Océano Atlántico (13,17), aunque también en Japón (19,20), Mar Adriático (21,22) y a lo largo de las costas de Latinoamérica (13,23). La presencia de este dinoflagelado potencialmente tóxico representa un riesgo inminente a las especies de su alrededor, llegando a convertirse también en un riesgo para la salud humana (8).

Esto es debido a su capacidad para producir toxinas marinas (9) (palitoxinas y ovatoxinas) por ciertas cepas. Estas se acumulan en los tejidos de los organismos que las consumen. Los humanos pueden llegar a consumir estos organismos contaminados por la ingesta de estas microalgas, lo cual supone un riesgo para la salud (16).

A lo largo del Océano Pacífico solo se han llevado a cabo estudios de caracterización e identificación de *O. cf. ovata* (8,24,25), donde evidencian su presencia. No obstante, existen estudios realizados por otros autores como Carnicer et al. (11), Pezzolesi et al. (16), Penna et al. (9) y Nascimento et al. (13) que comprueban el crecimiento de esta cepa bajo condiciones de laboratorio y la producción de toxinas. No obstante, algunas cepas, aun perteneciendo a la misma especie, no son tóxicas. Se desconoce hoy en día la causa de esta diferencia intraespecífica.

Para poder caracterizar una cepa, en cuanto a su crecimiento y producción de toxinas, se necesita cultivar las microalgas en laboratorio. En el presente estudio se ha planteado comprobar si se puede llevar a cabo un cultivo de *O. cf. ovata* bajo exposición de luz natural, con los instrumentos que se cuentan al momento en el laboratorio de la PUCE-SE, sin necesidad de incubadores ni altos costos de inversión.

Justificación

Existe una variedad de estudios acerca de curvas de crecimiento de géneros de microalgas potencialmente tóxicas, entre ellas *O. cf. ovata*, sobre todo en el Mar Mediterráneo y algunos en el Océano Atlántico. Sin embargo, a lo largo de la costa del Océano Pacífico los estudios realizados son escasos, particularmente, en Ecuador. Se cuenta con un registro de un estudio de cultivo de

microalgas dulceacuícolas en la Universidad de Cuenca (18), puesto que existe un espacio de trabajo especializado dentro de la Facultad de Ciencias Químicas. No obstante, aún no se han realizado cultivos especies de microalgas marinas.

Uno de los objetivos de los cultivos de microalgas es contar con información suficiente acerca de los organismos aislados, como por ejemplo realizar estudios del contenido de toxinas. En este caso, gracias a los estudios realizados por Ramírez, Yépez y Garzón, incorporadas con el título de Ingenieras en Gestión Ambiental de la PUCE - SE recientemente, se demuestra la presencia de esta especie, *Prorocentrum* y *Gambierdiscus* en la Reserva Marina Galera San Francisco, donde se expone debido a la falta de estudios toxicológicos no se pueden realizar conclusiones respecto a su toxicidad (8). Concretamente en la Reserva Marina Galápagos, también se registra la presencia 5 posibles especies del género *Ostreopsis*, gracias a análisis morfológicos, incluyendo *Ostreopsis* cf. *ovata* (19). En adición, un reciente estudio corrobora la presencia de *O. cf. ovata* en múltiples lugares de Latinoamérica (20), pero ninguna zona nueva en la costa del Atlántico.

En los últimos decenios, la concurrencia de *Ostreopsis* cf. *ovata* ha sido muy frecuente, sobre todo en el Mar Mediterráneo. Varios autores han dado por sentado su dependencia a la alta temperatura, nutrientes y la dinámica del agua (21,22) y su rápido crecimiento, considerándola una de las microalgas tóxicas más invasivas, causando efectos perjudiciales a su alrededor. Por lo general, esta especie provoca blooms cuando la temperatura aumenta en verano.

A pesar de ello, no se han realizado estudios fisiológicos que evalúen el crecimiento vinculado al comportamiento propio de cada cepa en cuestión en el Océano Pacífico, lo cual traería consigo beneficios para determinar cómo reaccionan bajo condiciones de laboratorio similares a las del medio de su lugar de origen, puesto que, las colecciones de cultivos tienen gran relevancia para la evaluación de riesgos con respecto a las ficotoxinas, proporcionando información confiable, así como también, para poder establecer un reglamento que proteja y aborde a los consumidores de mariscos (23).

Si bien es cierto, las estimaciones futuras en cuanto al cambio climático suponen un riesgo inminente con respecto a los productos de consumo humano, por lo que, es de gran relevancia reforzar los sistemas de seguridad alimentaria, a través de planes de prevención, contingencia y monitoreos continuos (24). Cabe recalcar que, cada cepa de los géneros de microalgas posee un comportamiento y características totalmente diferentes, dependiendo de su lugar de origen. Con lo

cual se deben realizar una serie de estudios completos que van desde caracterización, comportamientos, hasta extracción de toxinas, estudios filogenéticos, entre otros (13).

Los cultivos de microalgas son fundamentales para los estudios taxonómicos, principalmente para estudios toxicológicos. Es necesario obtener información adicional de cada cepa, que permitirá conocer las dinámicas de crecimiento y en un futuro, gracias a modelos matemáticos que añadirán la información correspondiente a cada zona, poder prevenir eventos de floraciones algales nocivas que reflejan un riesgo sanitario y ecológico, sin dejar de mencionar sus afectaciones en el ámbito socioeconómico, generado por las actividades ligadas a la pesca y el turismo (25).

Por lo cual, el presente estudio se plantea con el propósito de comprobar si se pueden ejecutar cultivos de microalgas para evaluar sus características de comportamiento en cuanto al crecimiento, dentro de un tiempo estimado bajo condiciones de laboratorio expuesto a luminosidad natural, lo cual implica trabajar con los instrumentos con los que se cuentan actualmente; dejando por sentado un primer estudio con una cepa del Océano Pacífico.

Delimitación de objetivos

Objetivo General

Evaluar el crecimiento de *Ostreopsis cf. ovata*, bajo condiciones de luz natural y luz artificial.

Objetivos específicos

- Analizar la curva de crecimiento.
- Calcular y comparar la tasa de crecimiento de las células bajo condiciones de luz artificial y luz natural.
- Comparar las medias del tamaño (largo y ancho) de las células bajo condiciones de luz artificial y luz natural.
- Examinar morfología celular.

CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

Bases teórico-científicas

Microalgas

Las microalgas son microorganismos que se han mantenido en un proceso evolutivo desde el origen de la tierra, forman parte de la cadena alimenticia como el primer eslabón de esta. Éstas realizan el proceso de la fotosíntesis, capaz de sintetizar compuestos orgánicos a partir de la energía solar, por lo cual tienen gran importancia para los heterótrofos y su desarrollo vital, puesto que, a partir de todo este proceso en función de satisfacer sus necesidades metabólicas, proporcionan oxígeno como resultado del mismo (26). Su eficiencia en cuanto a la transformación de CO₂ en O₂ es el cuádruple más eficiente que la de las plantas (19).

Tienen una gran importancia para los ecosistemas acuáticos, puesto que contribuyen al equilibrio del oxígeno y mantienen el flujo de energía entre los mismos. Su desarrollo de la vida se lleva a cabo netamente en ambientes con parámetros tolerables, tales como: radiación luminosa, temperatura, disponibilidad de oxígeno y concentración de nutrientes principalmente (1).

Por tanto, sus medios de vida pueden ser tanto en ecosistemas acuícolas como marinos (27), y se dividen en dos grandes grupos, tales como: fitoplancton y fitobentos. El primero se refiere al grupo de microorganismo que realiza el proceso fotosintético que se encuentra suspendido en los diferentes estratos de la columna de agua. Estos se subdividen en: picoplancton (0,2 a 2 µm); nanoplancton (>20 µm); microplancton (>200 µm) y el mesoplancton (200 a 2000 µm) (28). Además, juegan un rol importante como indicadores biológicos de los cuerpos hídricos (29).

El segundo, se refiere a los organismos que se encuentran en el fondo marino, en la zona que se extiende desde la costa hasta la región oceánica alcanzando profundidades de hasta 100 metros por debajo del nivel mar (30). Muchos de estos grupos presentan parámetros asociados a la adaptación de vida de las macroalgas, conviviendo en relación simbiótica (31).

Las microalgas epibentónicas se distribuyen a lo largo de la costa, denominadas también como perifiton, puesto que, viven en simbiosis sobre distintos sustratos naturales de los ecosistemas

acuáticos, bien sean macroalgas u otros organismos macrófitos, como pastos marinos, arrecifes de coral, invertebrados, vivos o muertos (32). Debido a que estos macroorganismos proporcionan altas fuentes de alimento y refugio (33).

Dinoflagelados

Es el grupo más abundante de las algas en el fitoplancton después de las diatomeas, cuentan con 2000 especies vivientes, de las cuales la mitad son heterótrofas, aunque algunas pueden combinar su carácter autótrofo y heterótrofo; y en algunas ocasiones son considerados como protozoos (1).

Son animales microscópicos unicelulares, que corresponden a un grupo de fitoplancton, que están compuestos por flagelos lo cual les permite la locomoción y alimentación. Estos a su vez, proliferan exageradamente, dan lugar a la “Marea Roja” donde el mar se tiñe de diferentes colores lo cual ocasiona un gran problema ambiental desequilibrando a los ecosistemas (34).

Este grupo es tan amplio que no cuenta con un patrón específico de nutrición. Algunas de estas especies son autótrofas por lo que son capaces de sintetizar sus propios alimentos por medio de la fotosíntesis. Esto se debe a la existencia de cloroplastos entre sus organelos citoplasmáticos donde hay moléculas de clorofila (35).

Los dinoflagelados presentan dos tipos de flagelos distintos:

- **Longitudinal:** Sirve para la locomoción.
- **Transversal:** Situado en la parte central de la célula.

Los dinoflagelados se dividen en dos grupos:

- **Desnudos o atecados:** Se caracterizan por tener una pared celular muy fina. La identificación de este grupo a nivel familia, género y especie considera como base la talla forma y proporción de las células vivas o preservadas.
- **Tecados o armados:** Se caracteriza por tener una teca formada por una pared celular de placas de celulosa. La sistemática de este grupo se basa en la estructura externa de la célula (34).

Floraciones Algales Nocivas (FAN)

Ocasionalmente, el mar se torna de colores diferentes a su tono azul comúnmente adoptado, tales como: verde, marrón, rojizo o incluso blanco. A esto se le conoce como el fenómeno de la marea roja, a pesar de que su nombre no hace inferencia al nivel del mar ni al color rojo específicamente. Los causantes de este fenómeno son las microalgas fitoplanctónicas, que estando bajo ciertas condiciones favorables, incrementan descontroladamente su población, pasando normalmente de ser miles de microalgas a millones de estas presentes en el mar. Así pues, es como se consigue cambiar el tono del mar, dependientemente de las características propias del alga dominante (25).

Este fenómeno es de origen natural y recibe el nombre de proliferación o bloom algal. Por lo general, estas floraciones algales presentan géneros de algas nocivas, y se producen en aguas calmadas con una tasa de renovación del agua muy baja. Por tanto, estas irregularidades se encuentran en zonas cercanas a la costa, tales como playas, lagunas litorales o puertos. Y, para que este fenómeno se presente, se necesita el engranaje de múltiples factores biológicos y físico-químicos respectivamente, entre los cuales, está la luz, la temperatura, los nutrientes y la estabilidad horizontal y vertical suficiente de la columna de agua (25).

Las floraciones algales nocivas (FAN), provocan la reducción de oxígeno a partir de su descomposición (36), como resultado de este proceso, produce la mortalidad de poblaciones de organismos acuáticos y bioacumulación de toxinas en los tejidos de ciertos organismos que pueden terminar siendo consumidos por el ser humano y causar enfermedades y en el peor de los escenarios la muerte (25).

Dentro de los procesos que aportan a la conformación de una FAN, se encuentran la eutrofización, la cual es la contribución intensa de nutrimentos en ambientes acuáticos. También, se puede citar al Fenómeno del Niño, el cual es un evento de origen natural al igual que las FAN, el mismo que provoca la alteración en la hidrodinámica del agua y en los patrones de precipitación, produciendo un aumento de temperatura que fomenta la proliferación de estos microorganismos (37).

Las FAN son provocadas por varias especies de microalgas, siendo así los actores principales el grupo biológico de dinoflagelados (36). Alrededor de 40 especies de dinoflagelados tienen la capacidad de generar toxinas con gran potencial presentes en el ambiente. Éstas representan un

alto riesgo ambiental al tener como consecuencia de su presencia, el desequilibrio del ecosistema acuático en función perjudicial a los organismos que existentes en él. Además, de presentar riesgos a la salud humana e impactos económicos y sociales que recaen sobre las comunidades costeras (38). La dinámica del agua, la temperatura y la salinidad son factores determinantes para su existencia (39).

A pesar de ello, la presencia de microorganismos tóxicos, no solo se la atribuye a los dinoflagelados, sino también al grupo biológico de diatomeas y cianobacterias (40).

Estos tres grupos biológicos producen biotoxinas marinas, las cuales destinan como hospedador final al ser humano, debido a que es el último predador de este ciclo de bioacumulación por ingesta de microalgas tóxicas que se involucran en la cadena alimenticia, acumulando ficotoxinas en los tejidos y vísceras de quienes las consuman (41). A pesar de que las microalgas no son los únicos microorganismos con la capacidad de sintetizar ficotoxinas, componen el grupo principal para la producción de estas (42).

Ostreopsis sp.

Es un género de dinoflagelados epibentónicos con potencial tóxico, cuya existencia está asociada a diversos sustratos (macroalgas, rocas, comunidades de corales, sedimentos y lecho marino) (21). Generalmente, viven en sociedad con otros géneros de dinoflagelados como *Gambierdiscus*, *Prorocentrum*, *Coolia* y *Anfidinio*. Cabe recalcar que *Ostreopsis* y *Gambierdiscus* son los géneros más tóxicos (14). Por su parte, el género *Ostreopsis sp.*, fue descrito por primera vez en Tailandia por Schmidt en 1901. De ahí, hasta la actualidad su presencia se ha distribuido ampliamente por todo el mundo, abarcando ecosistemas marinos templados y tropicales (43).

Últimamente, se han ejecutado estudios filogenéticos acerca de *Ostreopsis cf.*, sumando nuevos clados y subclados al género (9). Se describieron 9 nuevas especies como *Ostreopsis siamensis*, *Ostreopsis ovata*, *O. lenticularis*, *O. heptagona*, *O. mascarenensis*, *O. labens*, *O. marina*, *O. belizeana* y *O. caribbeana* (21).

Su presencia ha sido muy marcada en el Mar Mediterráneo y se ha convertido en un problema, sobre todo por su reiterada aparición cada año (16). Se han registrado diversas morfologías

similares entre las 9 especies descritas hasta la actualidad (9). A pesar de haber sido consideradas como causantes de la enfermedad de la ciguatera, se desmintió este hecho, puesto que, al realizarse varios estudios se pudo comprobar que las toxinas que estas producen (análogos componentes de las palitoxinas) no provocan la ciguatera.

Sin embargo, se afirma haber demostrado toxicidad en *O. siamensis*, *O. mascarenensis*, *O. lenticularis* y *O. cf. ovata*, sus efectos se han catalogado como nocivos para la salud humana y su ecosistema de alrededor (14,15,21).

Incluso existen reportes de intoxicación respiratoria en humanos debido a la inhalación de *O. cf. ovata* por medio de su presencia en pequeñas gotas de agua en el aire, esto ha sido reportado en Italia, España, Francia y Argelia (44).

Ostreopsis cf. ovata

La especie *O. cf. ovata*, fue registrada por primera vez por Fukuyo en 1981 (15), y es considerada como uno de los dinoflagelados epibentónicos potencialmente tóxicos más invasivos y muy frecuente (9).

Su crecimiento se encuentra ampliamente distribuido a nivel mundial, aún faltan muchas características propias por estudiar. De hecho, también se ha comprobado su crecimiento bajo condiciones de laboratorio (11,16,45). Su presencia está ligada a las condiciones del medio (hidrodinámica, salinidad y temperatura), por lo que en condiciones de laboratorio se trata de replicar sus condiciones óptimas de vida para mantener un estudio eficaz (21).

O. cf. ovata, normalmente posee forma de lágrima en vista apical (21) y tiene la característica propia de los dinoflagelados de formar enquistamientos como estrategia de supervivencia a adversidades del medio en el que se encuentra, esto consiste en eliminar su teca principal y sus flagelos tomando forma redondeada. Sin embargo, una vez de vuelta a sus condiciones óptimas de crecimiento retorna a su estado vegetativo (46).

Parámetros requeridos para los cultivos de microalgas

Dentro de los requisitos más importantes para llevar a cabo un cultivo de microalgas están: esterilización, salinidad, temperatura, nutrientes, luminosidad, agitación (47).

En el crecimiento de las microalgas es de vital importancia tener suficiente información acerca de las condiciones óptimas y sus rangos de tolerancia (2).

Luz

Es uno de los parámetros más importantes y debe ser constante por estar ligada directamente al proceso de fotosíntesis de las células (2). Por otra parte, este parámetro puede ser natural o artificial. En cuanto a la aplicación de luz natural, por lo general es utilizada en cultivos a gran escala al aire libre. Por otro lado, la luz artificial es mayormente usada en condiciones de laboratorio para mantener un control total (48).

Temperatura

En un cultivo de microalgas este parámetro determina su producción, puesto que a temperaturas más altas y controladas sus tasas de crecimiento son más elevadas (2). Para *O. cf. ovata*, las tasas más altas se alcanzaron con 26 °C, con cepas originarias de Brasil (45).

Nutrientes

Por otro lado, en varios estudios se ha aplicado el medio f/2 de Guillard para alimentar a las cepas de *O. cf. ovata*., el cual contiene diferentes componentes que favorecen el crecimiento de las células por los nutrientes que le aporta (fósforo, silicio, nitratos, trazas de metales y vitaminas) (49).

Crecimiento

Es el incremento del número de células o biomasa que está influido notablemente por la naturaleza química y física del ambiente en el que se encuentra. También se lo define como el incremento de microorganismos procariotas mediante fisión binaria en el que a partir de una célula se dividen en dos, dentro del cual los componentes estructurales de la célula se duplican de manera exacta, sin que exista al menos una célula admisible no se dará un crecimiento microbiano. De igual manera la presencia de nutrientes en mayor o menor proporción influirá en el aumento o disminución de su tasa de crecimiento, puesto que si las condiciones del ambiente también son óptimas los microorganismos se multiplican en tiempos muy breves (1,2).

Fases del crecimiento microbiano

Fase de latencia o lag: Es una fase de adaptación al medio y reposo en el que las células sintetizan las enzimas que necesitan para la actividad metabólica que deben llevar a cabo, es decir, las bacterias se preparan para hacer uso de los nutrientes que le aporta el medio. En esta fase el número de microorganismos puede disminuir o permanecer constante para que una vez adaptados procedan a multiplicarse de manera lenta.

Fase exponencial: En esta fase la velocidad de crecimiento aumenta o es máxima, sin embargo, la velocidad de crecimiento varía de acuerdo con el tipo de microorganismo a tratarse y a otros factores ambientales como la temperatura, oxigenación, pH y demás. A su vez, los microorganismos al multiplicarse de manera activa aumentan su número a manera de progresión geométrica.

Fase estacionaria: En esta fase la velocidad comienza a disminuir hasta ser prácticamente nula y alcanzar un equilibrio entre la reproducción o la cantidad de células nuevas y el número de células o microorganismos que mueren, puesto que los nutrientes esenciales de los microorganismos se agotan y también se acumulan metabolitos inhibidores o productos metabólicos tóxicos. Además, se presenta por el cambio en alguno de los factores ambientales como la acidificación o alcalinización del medio de cultivo (pH) o la disminución de la oxigenación.

Fase de muerte o de declive: En esta fase las condiciones que prevalecen no pueden soportar más crecimiento, por lo que el número de células que muere alcanza un mayor número que las que se van formando (52).

A continuación, dichas fases pueden observarse en la (Figura 1).

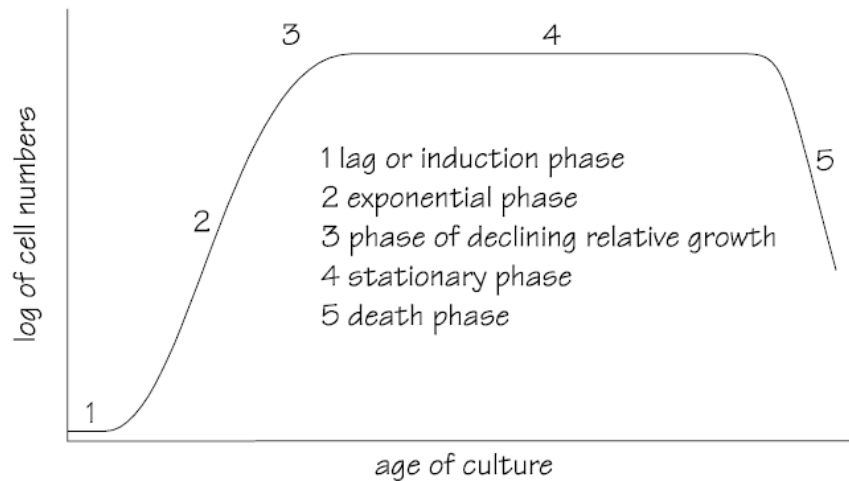


Figura 1. (53). [Five growth phases of micro – algae cultures] [Image]. [Belgium]: Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture, 1996. 1 image: b/w, 2.7"x4.374.

Colección de microalgas

Se entiende por una colección de microalgas al reservorio de microorganismos que poseen cualidades nuevas o que representan un papel fundamental para distintos campos como la medicina y el sector de la biotecnología (54). Esto representa la conservación, protección y accesibilidad para llevar a cabo estudios y aplicaciones estratégicas (55).

Actualmente, el interés del sector empresarial recae en las colecciones de microalgas, por sus diversas aplicaciones para distintos fines, tales como productos alimenticios, cosméticos, médicos y energéticos. Es importante mencionar que hay tratados que respaldan la patente del lugar de origen y la utilización de los recursos genéticos (10).

Antecedentes

En el Mar Mediterráneo, son varios los estudios realizados sobre cultivos de *O. cf. ovata*, como el de Pezolesi et. Al, en el año 2012 (23), sus muestreos fueron llevados a cabo a lo largo de la Costa Adriática de Italia. Se evaluó el comportamiento de la cepa adriática de *Ostreopsis cf. ovata*, por medio del método capilar en condiciones estériles. Se llevaron a cabo cultivos a diferentes temperaturas (20, 25 y 30 °C) y salinidades (26, 32, 36 y 40). Se registraron tasas de crecimiento de 0.34 – 0.49 μm . Se explica que la tasa máxima de crecimiento (0.49 μm) fue registrada a 20 °C. No se encontraron diferencias significativas en los cultivos a diferentes salinidades (32 y 36), excepto para el de salinidad a 26, en el cual su crecimiento se redujo. Cabe mencionar que los cultivos estuvieron expuestos a luz artificial.

En el estudio realizado por Carnicer et al. (11) en el 2016, se describe un aislamiento de cepas de *O. cf. Ovata*, a partir de recolecciones de macroalgas en dos yacimientos de la Costa Sur de Cataluña. Este proceso se realizó por medio del método capilar en condiciones de máxima esterilidad, se utilizó agua de mar en conjunto con el medio f/2 para los medios de cultivo. Se controlaron rangos de salinidad (concentración 36 agua MilliQ), su temperatura se ajustó a 24°C bajo exposición de luz artificial. Se llevaron a cabo tres experimentos en una cámara de ambiente con condiciones controladas. Los resultados arrojaron mayores tasas de crecimiento para el experimento a 24 °C, salinidad 32 (0,48 \pm 0,05 μm) marcando diferencias significativas sobre el experimento a 28 °C. La tasa de crecimiento más baja se registró para el experimento sometido a 19 °C. Sin embargo, se registró el crecimiento de las cepas en todos los experimentos.

Por otro lado, Scalco et al. (2012) (17) llevó a cabo un estudio de cepas del Mediterráneo de *O. cf. ovata*, el cual consistió en someterlas a diferentes temperaturas y fotoperíodos e irradiancia. Sus resultados arrojaron las tasas de crecimiento más bajas (0.18 – 0.23 μm), en los cultivos sometidos a 50 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y un fotoperiodo de 9 horas. Tasas de crecimiento un poco más altas (0.24 – 0.41 μm) se registraron a 100 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Por último, cabe recalcar que a pocos días de iniciar el experimento las células presentaron anomalías en su morfología.

En el estudio por Nascimento et al. (2010) (13), se hicieron crecer cepas brasileñas de *O. cf. ovata*. Una vez aisladas las cepas, se sometieron a 60 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y 12:12 horas luz: oscuridad. Los cultivos se sometieron a distintas temperaturas (16, 20 y 24 °C). Las tasas de crecimiento para

todos los experimentos fueron significativamente más bajas a 16 °C al igual que su reproducción. Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas con las tasas de crecimiento de los cultivos sometidos a 20 y 26 °C y a 20 y 24 °C.

En otro estudio realizado por Tanimoto et al. (2013) (56), se cultivaron cepas de Japón de *O. cf. ovata*. Los cultivos se ejecutaron en matraces de 60 ml de medio f/2 previamente autoclavado. Se sometieron a varias temperaturas (15 – 30 °C), expuestos a luz artificial (90 – 100 μmol fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y un fotoperiodo de 6:18 horas. La tasa de crecimiento más alta (0.55 μm) registrada en este estudio fue del cultivo sometido a 25 °C y salinidad 35.

Marco Legal

Las toxinas contenidas en microalgas representan un riesgo para la salud humana y ambiental, debido a que a través de su ingesta tienden a bioacumularse en los tejidos, lo cual resulta en distintas complicaciones para la salud humana dependiendo del género de estas. Y, a su vez arrasan con todo el ecosistema marino de su alrededor.

Por tal, el Consejo de las Comunidades Europeas, estableció normativas para el control temprano de productos destinados a la alimentación humana que no cumplan con los estándares de calidad impuestos. Por otra parte, el Reglamento (CE) N°178/2002 (57), realza la importancia de la calidad de los productos alimenticios, con lo cual surge la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), donde se fijan estipulaciones, principios y reglamentos que garantizan un producto de calidad totalmente apto para el consumo humano. A su vez, el Parlamento Europeo y el Consejo de la Unión Europea, en el Reglamento (CE) N°853/2004 (58), Art. 11, se indican resoluciones específicas con respecto a los métodos de detección de toxinas marinas bioacumulables y sus límites permisibles que de ser el caso deben ser aplicados y que tiene por objeto el cumplimiento de las normas sanitarias establecidas.

Del mismo modo, en el Reglamento (CE) N°854/2004 (59), se establecen controles fijos que involucran procesos formales para llevar a cabo registros evaluativos en cuanto a la producción y comercialización de especies marinas. Por su parte, en el Reglamento (CE) N° 2074/2005 (60), se

estipulan medidas aplicativas a productos específicos, como lo indica en el Art. 3, con respecto a procedimientos analíticos reconocidos para detectar a tiempo la presencia de biotoxinas marinas.

Con respecto a Centroamérica, ciertos países, tales como El Salvador, Nicaragua, Guatemala, Costa Rica y Honduras, se encuentran regidos por el Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50.08 (61), dentro del cual se establecen parámetros sobre microbiología de los alimentos para el consumo humano, límites permisibles y monitoreos a largo plazo sobre la comercialización de determinados alimentos (pescados y sus derivados, productos marinos y moluscos bivalvos vivos) con la finalidad de prevenir riesgos sanitarios.

En América Latina, estas normativas europeas antes mencionadas están vigentes en países, tales como Argentina, Uruguay y Perú, para el control de biotoxinas marinas en moluscos bivalvos vivos (62). Por el contrario, Chile, se acoge al reglamento aplicado por países de Centroamérica (63).

No obstante, Ecuador carece de una normativa legal rigurosa que específicamente se dirija hacia la detección y/o prevención de organismos marinos potencialmente tóxicos, a pesar del riesgo que representan a la salud humana, al ecosistema y por ende a la economía basada en actividades pesqueras y turísticas.

Por otra parte, el ente regulador de control y vigilancia de las FAN en Ecuador es el Instituto Oceanográfico de la Armada en conjunto con la Autoridad Ambiental Competente, es decir, Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica. Sin embargo, su periodicidad en el asunto es discontinua, con lo cual no advierten adecuadamente de los riesgos ocasionados por la presencia de estos organismos con potencial toxicidad.

Por último, el Ecuador cuenta con el TULSMA, como herramienta de normativa ambiental y control, constituido en el Libro VI, Anexo 1, Acuerdo Ministerial N° 061 (64), el cual se basa en la protección de los ecosistemas acuáticos para mantener la integridad del engranaje de seres vivos involucrados. Además, se establecen límites permisibles de descargas al medio marino que con la finalidad de preservar las especies de flora y fauna.

Cabe recalcar, que dentro de la nueva Ley Orgánica para el desarrollo de la Acuicultura y Pesca no se estipulan planes de prevención, monitoreos o rangos de límites permisibles en cuanto a las biotoxinas marinas. Mas bien, se refieren a una serie de reglamentos y obligaciones que deben

cumplirse con respecto a cultivos acuícolas para consumo humano y aplicaciones de artes de pesca, ligado a promover la sostenibilidad de los recursos pesqueros. Sin embargo, se menciona que en un futuro se financiarán proyectos con respecto a actividades pesqueras y acuícolas para fines investigativos, ciencia, tecnología e innovación (65).

Capítulo II: MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de las cepas de *Ostreopsis cf. ovata*

Recolección de muestras

La recolección de muestras se llevó a cabo en la Playa Estero del Plátano, Esmeraldas, Ecuador. Las coordenadas geográficas del punto de muestreo establecido son: 80°05'18.1''W; 0°46'43.3''N (Figura 2) y se midieron a través de un GPS marca GARMÍN ETREX (Figura 3, Anexo). La “**Playa Estero del Plátano**”, pertenece a la “Reserva Marina Galera – San Francisco”, es un biocorredor costero con una megadiversidad de especies de hábitats marino – costeros que incluso aún no han sido identificadas en su totalidad. Se caracteriza por tener un clima tropical, por su temperatura que fluctúa desde los 24 °C hasta los 27 °C y por su promedio de precipitaciones anuales de 3500 mm (66).

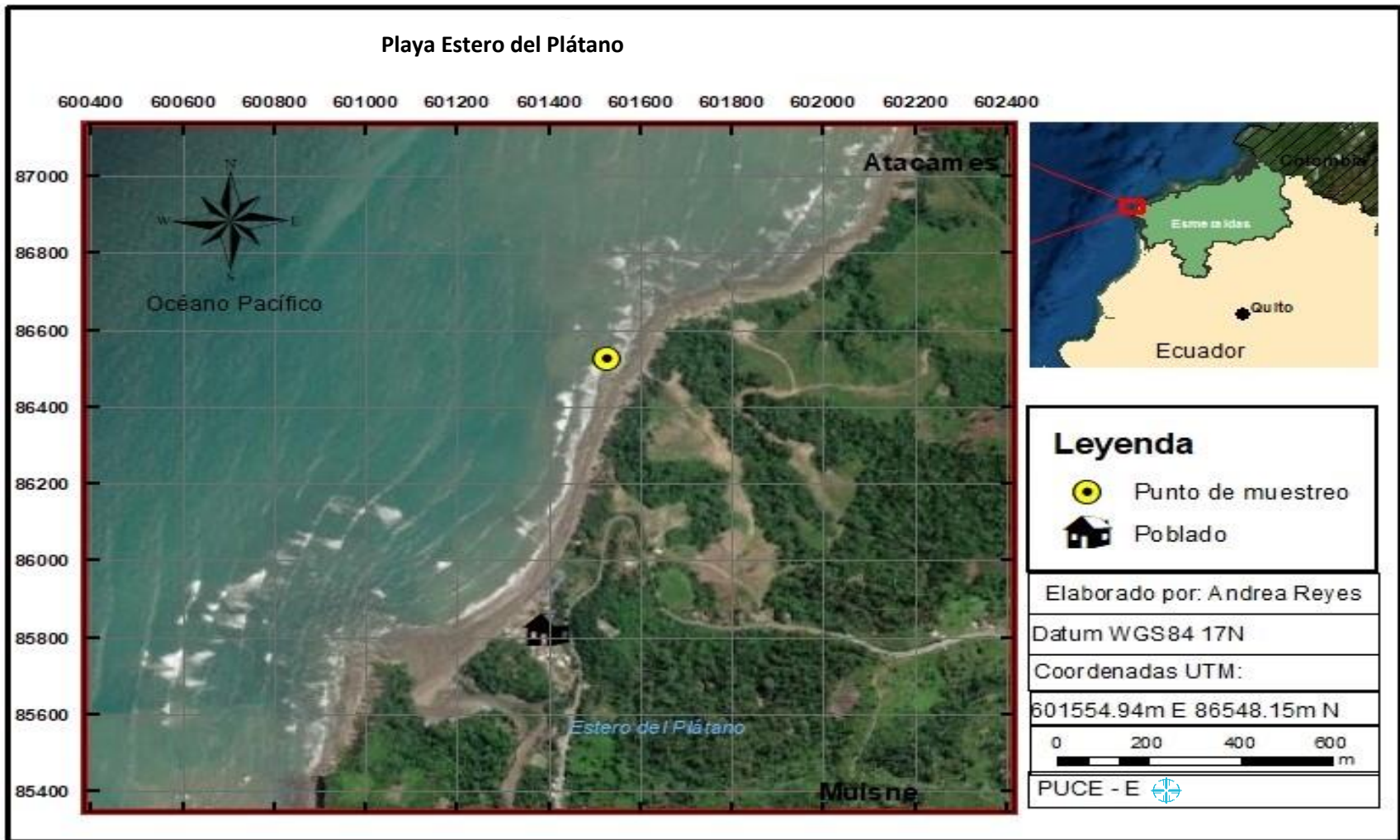


Figura 2. Recolección de muestras: *Estación de muestreo.*

Se recolectaron muestras de macrófitas del género *Padina* con agua de mar en botellas de plástico de 1000 ml de volumen, para luego proceder a agitarlas fuertemente varias veces con la finalidad de desprender las microalgas adheridas a las macroalgas (Figura 4, Anexo). Una vez realizado este proceso, estas fueron filtradas por medio de un tamiz con ojo de malla (luz de malla) de 200 μm para descartar el paso de organismos indeseables, sedimentos y sólidos en suspensión innecesarios en el presente estudio (Figura 5, Anexo). El volumen de agua resultante (Figura 6, Anexo) fue transferido a las botellas de plástico mediante un embudo y se almacenaron a temperatura ambiente con entrada de luz constante para evitar la muerte de los microorganismos (11).

Además, se recogieron las muestras de la columna de agua de mar que se almacenaron bajo refrigeración para su adecuada preservación, con el fin de proporcionar un medio propicio a las cepas que se van a aislar.

Análisis físico – químico del agua

En el presente estudio se analizaron la salinidad (ppm), la temperatura ($^{\circ}\text{C}$) y el pH del lugar de donde fueron recolectadas las muestras como parte de los factores físico – químicos necesarios para la simulación de las condiciones naturales aplicadas a las de laboratorio.

Estas mediciones se llevaron a cabo mediante un medidor multiparamétrico portátil marca HANNA, modelo “HI98130”, el cual fue previamente calibrado. El proceso se ejecutó de manera superficial y consistió en sumergir el sensor de la sonda multiparamétrica a una profundidad de 10 cm para obtener las mediciones deseadas (Figura 7, Anexo).

Cultivo de microalgas

Preparación de medios de cultivo

Las muestras de agua de mar tomadas de la columna de agua fueron purificadas, a través de filtros G/FC marca Whatman de 0,8 de poro (Figura 8, Anexo) para luego ser colocadas en el Matraz Erlenmeyer y cubiertas con papel aluminio para evitar la entrada de

organismos externos que puedan interferir con la pureza de estas (Figura 9, Anexo). Posteriormente, se llevó a cabo el proceso de esterilización del agua por medio de la autoclave (marca Trident, modelo EA – 640) en conjunto con las puntas de micropipeta Plus – Sed, durante 30 minutos (Figura 10, Anexo).

Antes de agregar el suplemento de nutrientes f/2 diluido (1 ml x 150 ml de agua), se deben esperar 30 minutos hasta que el agua se adapte a la temperatura ambiente adecuada. Por último, el agua de mar esterilizada se distribuyó tanto en los pocillos para el aislamiento de las cepas. Cabe resaltar que, gracias a la colaboración de la Universidad de Cuenca, facultad de Ciencias Químicas, la cual cuenta con un laboratorio especializado destinado al cultivo de microalgas e investigaciones afines, se pudo conseguir el medio f/2 de Guillard (Figura 11, Anexo).

Aislamiento e inoculación de la cepa y cultivos stock

Se dejó sedimentar el volumen de agua de mar resultante de la filtración realizada en el muestreo por aproximadamente 6 horas. Posteriormente, mediante una pipeta Pasteur se obtuvo una muestra del fondo que se dejó sedimentar y se colocó en una caja Petri (Figura 12, Anexo) para proceder a aislar las células en microscopio invertido marca Optika®.

Se utilizó la capilaridad del agua para aislar las células de *Ostreopsis sp.* Con lo cual, para ello, se sometieron las micropipetas de vidrio al mechero de Bunsen con la finalidad de derretirlas y obtener un orificio mucho más pequeño (Figura 13 y 14, Anexo), de modo que a través de estas se puedan capturar con mayor facilidad las células (aproximadamente 70 micras).

A través, de micropipetas capilares marca BLAUBRAND®, se fueron capturando las células una a una por acción capilar (Figura 15, Anexo). Por cada célula aislada, en un portaobjetos, se pasaban por 3 gotas de medio como indica el (Figura 16, Anexo). Este paso se realizó para disminuir la posibilidad de arrastrar otros microorganismos que se encontraban también en la muestra. Luego, se procedió a su respectiva inoculación en una microplaca con 24 pocillos previamente abastecidos con el medio esterilizado (Figura 17, Anexo) y listo para propiciar condiciones óptimas de cultivo a las células. Dicho de otra

manera, en cada pocillo se introdujo una célula inicial que se reproducirá y, una vez que alcance su densidad adecuada, se podrá inocular en botellas de 40 ml.

Para ello, el agua contenida en los pocillos se reescaló a botellas de plástico esterilizadas de 40 ml (Figura 18, Anexo). Se esperó el tiempo adecuado para dejar crecer el cultivo (a partir de la célula inicial). Y, por último, se reescaló a botellas de 160 ml de volumen (Figura 19, Anexo).

Con respecto a la identificación de las cepas, es imprescindible acotar que se utilizó como una guía literaria el artículo de “*Ostreopsis cf. ovata* from Western Mediterranean Sea: Physiological Responses under Different Temperature and Salinity Conditions”, elaborado por Carnicer et al. (11).

Experimento

Las botellas con los respectivos cultivos se mantuvieron a temperatura ambiente, de las cuales se escogieron 4 botellas que fueron ubicadas en un punto estratégico expuestas a luminosidad natural en el laboratorio de Gestión Ambiental y 4 botellas con cultivos expuestas a luz artificial en el laboratorio de Microbiología de la PUCE - SE (Figura 20 y 21, Anexo). Cabe recalcar que la luz artificial, fue proporcionada por tubos fluorescentes con una radiancia de fotones $100 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, bajo un fotoperiodo 12:12 horas luz: oscuridad.

La variable de temperatura se trató de ajustar según a la del medio de donde fueron recolectadas las muestras. En ambos laboratorios se mantuvo una temperatura de entre 25 – 26°C por medio de un aire acondicionado y fue tomada a través de un termómetro digital para interiores (Figura 22 y 23, Anexo).

Conteos y mediciones obtenidas de las muestras fijadas

Para evaluar el crecimiento de cada cultivo, se tomaron alícuotas de 10 ml de cada botella (8 botellas en total), por medio de una pipeta Pasteur cada dos días, durante dos semanas y se colocaron en tubos Falcon® (tubos de centrífuga de 10 ml) (Figura 24, Anexo),

teniendo un total de 8 fechas registradas, un total de 64 tubos. Por último, las muestras se fijaron con una solución de yoduro potásico mejor conocido como Lugol al 3% (de 3 a 4 gotas por tubo) para mantenerlas y preservarlas en consecuencia a sus conteos.

Es importante resaltar que previo a la fijación de muestras, las botellas con cultivos tuvieron que ser agitadas fuertemente en forma de ocho para homogeneizar la muestra y evitar que las células estén agrupadas en las esquinas de estas, de modo que causen interferencia en los resultados al tomar la alícuota correspondiente. Cabe recalcar que se debe tener cuidado en el proceso de agitación de las botellas para evitar su ruptura, puesto que, lo que se busca es desarmar el moco que forman las microalgas y distribuir de manera adecuada las células (50).

Antes de iniciar los recuentos se dio paso a homogeneizar las muestras fijadas contenidas en los tubos Falcon®, de manera que la agitación sea constante haciendo movimientos en forma de ocho, durante 1 minuto (Figura 25, Anexo), con el objetivo de remover las agrupaciones de sedimentos formadas especialmente en el fondo de estos.

Los recuentos se realizaron a través de cámaras de sedimentación de Utermöhl (67), cubiertas por un cubreobjetos de cristal grueso (Figura 26, Anexo). Para evitar el surgimiento de burbujas que interfieran en el volumen de la muestra, la sedimentación se realizó una vez alcanzada la temperatura ambiente. Cada muestra total fijada (10 ml) se distribuyó en 3 cámaras de sedimentación de 3 ml, es decir, se obtuvieron 3 réplicas por cada tubo. El recuento es la media de las 3 réplicas. Se realizaron un total de 192 mediciones. Por último, bajo el lente del microscopio invertido con un aumento de 10x0.25 (Figura 28, Anexo) se trazó un transecto lineal clásico a lo ancho del objetivo para tener un valor estimado confiable de la población total, clasificando a las células en dos grupos: normales y deformes (con formaciones quísticas).

Para hallar la abundancia celular en la muestra se aplicó la siguiente fórmula, tomada de Environmental Protection Agency (EPA) (68)

$$cell/ml = \frac{C \times TA}{L \times W \times V \times S}$$

Donde:

C= número total de células contadas

TA= área total del fondo de la cámara Utermöhl

L= longitud del transecto (mm)

W= ancho del transecto (mm)

V= volumen de la cámara Utermöhl (ml)

S= número de transectos

Cálculo de la Tasa de crecimiento

Mediante esta operación se puede dar seguimiento a la variación del número de células existentes en el transcurso del tiempo que dura el experimento (69).

Se calcula por medio de la siguiente ecuación:

$$y = \frac{\ln N_1 - \ln N_0}{t_1 - t_0}$$

Donde, ln es logaritmo natural; N0 y N1 son abundancias celulares en el tiempo t0 (día x) y t1 (día x), coincidiendo con la fase exponencial de cada tratamiento (los días son elegidos según la distribución lineal de la fase logarítmica aplicada) (11). Teniendo en cuenta que, en el presente estudio t0 sería el día 1 cuando empieza la fase exponencial y t1 sería el día 7 en el cual se encuentran al final de su fase exponencial.

Mediciones

A su vez, a través de la cámara integrada del microscopio invertido con conexión a una computadora mediante el programa “Optika Vision Lite” se realizaron las mediciones de las células escogidas con base en el tamaño dorsoventral y ancho de estas (Figura 29, Anexo). El software fue previamente calibrado con la finalidad de regular los píxeles que representan una unidad de micra, lo cual se hace mediante el portaobjetos micrométrico “Optika M – 005” (Figura 30, Anexo). Este proceso consiste en capturar una fotografía e ingresarla al programa que se va a utilizar para calcular la escala deseada y poder obtener los datos del tamaño celular y la superficie exacta (50). De cada condición se escogió una botella, botella 4 para luz artificial y botella 8 para luz natural. Cada día de muestreo se

midieron 15 células por alícuota, tanto de la condición de luz artificial como de la condición de luz natural.

Por otro lado, la toma de fotografías se realizó mediante la computadora conectada al microscopio invertido y se escogieron las células más representativas.

Análisis de datos

Todos los análisis de los datos obtenidos se ejecutaron por medio del programa estadístico “IBM SPSS Statistics 26”.

La comparación de las curvas de crecimiento a diferentes exposiciones de luz y tamaños de las células presentes en el estudio se la realizó mediante el análisis de varianza multiparamétrico (ANOVA), a través del programa estadístico SPSS, en el cual se comparan resultados y se determina si existen diferencias significativas con aquellos valores que tengan un valor $p < 0,05$ (70).

En el presente estudio se aplicaron histogramas para la determinación del tamaño celular (máximo/mínimo) y el ancho de estas a lo largo de todo el crecimiento. Además, de la aplicación de histogramas para determinar la media del tamaño y ancho celular.

Cabe acotar que, para la ejecución de algunos gráficos y cálculos se utilizó el programa de hoja de cálculo ‘Excel’.

CAPÍTULO III: RESULTADOS

Parámetros físico – químicos

Los parámetros físico – químicos del agua de mar de Estero del Plátano fueron: temperatura 27,6 ° C; pH 8.39 y salinidad 31,4 ppm (Tabla 1).

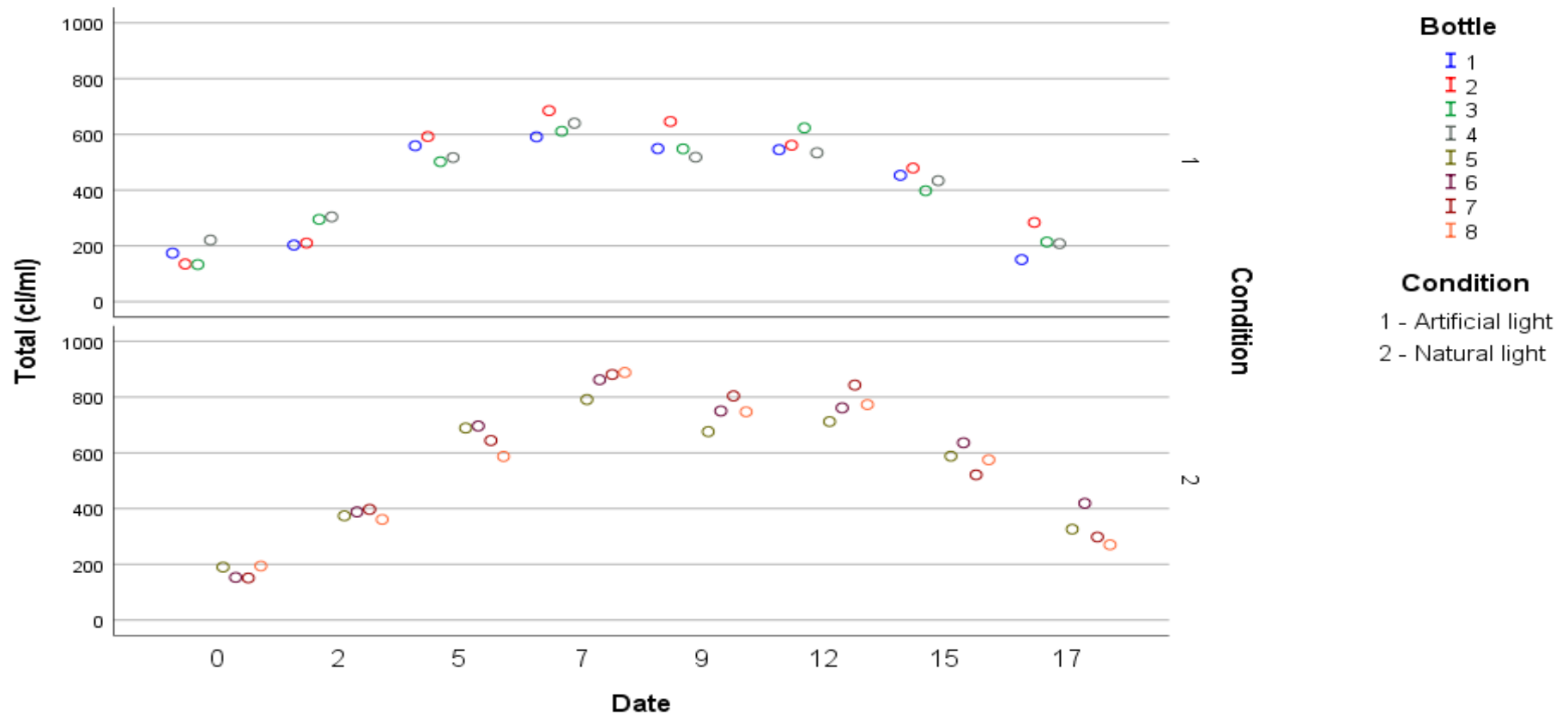
Tabla 1. Parámetros físico – químicos del punto de muestreo.

Lugar	Temperatura (°C)	pH	Salinidad (ppm)
Esteros del Plátano	27,6	8.39	31,4

Crecimiento *Ostreopsis cf. Ovata*

Según la gráfica 1 de la dinámica de crecimiento en función al tiempo para *Ostreopsis cf. ovata*, se comporta de una manera muy similar en ambos tratamientos. Empieza desde el día 0 que corresponde a la fase de latencia o lag, continúa con la fase exponencial que inicia a partir del día 2 hasta su día tope que corresponde al día 7. Seguido de la fase estacionaria, del día 7 al 12. Por último, el crecimiento disminuye a partir del día 12, lo cual corresponde a la fase final o muerte celular.

Por otra parte, la fase de latencia o día 0 empieza con una media 180 cel/ml para la condición de luz artificial y una media de 183 cel/ml para la condición de luz natural. En la fase exponencial o día 7 se alcanza una media de 625.88 cel/ml para la condición de luz artificial y 842.13 cel/ml para la condición de luz natural. Por último, la abundancia va disminuyendo en el día 12 hacia el día 17 o fase final (muerte celular) con una media de 240 cel/ml para condición de luz artificial y 311 cel/ml para la condición de luz natural.



Gráfica 1. Curva de crecimiento *Ostreopsis cf. Ovata*.

Tasa de crecimiento

La fórmula logarítmica para evaluar el crecimiento de las células en función al tiempo que duró el experimento arroja una tasa de crecimiento de 0.25 ± 0.03 para la condición de luz artificial y una tasa de crecimiento de 0.31 ± 0.02 para la condición de luz natural (Tabla 1). Los resultados se analizaron mediante un ANOVA para comparar medias y se obtuvo un valor de p 0.02, lo cual indica que sí existen diferencias significativas entre la tasa de crecimiento de ambas condiciones.

Tabla 2. Medias de cada botella por fecha.

FECHA	DÍA	Variable	Botella	Tasa de crecimiento	Tasa de crecimiento media
9/19/2018	0	Artificial	1	0.27	0.25 ± 0.03
9/21/2018	2	Artificial	2	0.25	
9/24/2018	5	Artificial	3	0.28	
9/26/2018	7	Artificial	4	0.21	
9/28/2018	9	Natural	5	0.29	0.30 ± 0.02
10/1/2018	12	Natural	6	0.33	
10/4/2018	15	Natural	7	0.32	
10/9/2018	17	Natural	8	0.29	

Tamaño

Largo (Dorsoventral)

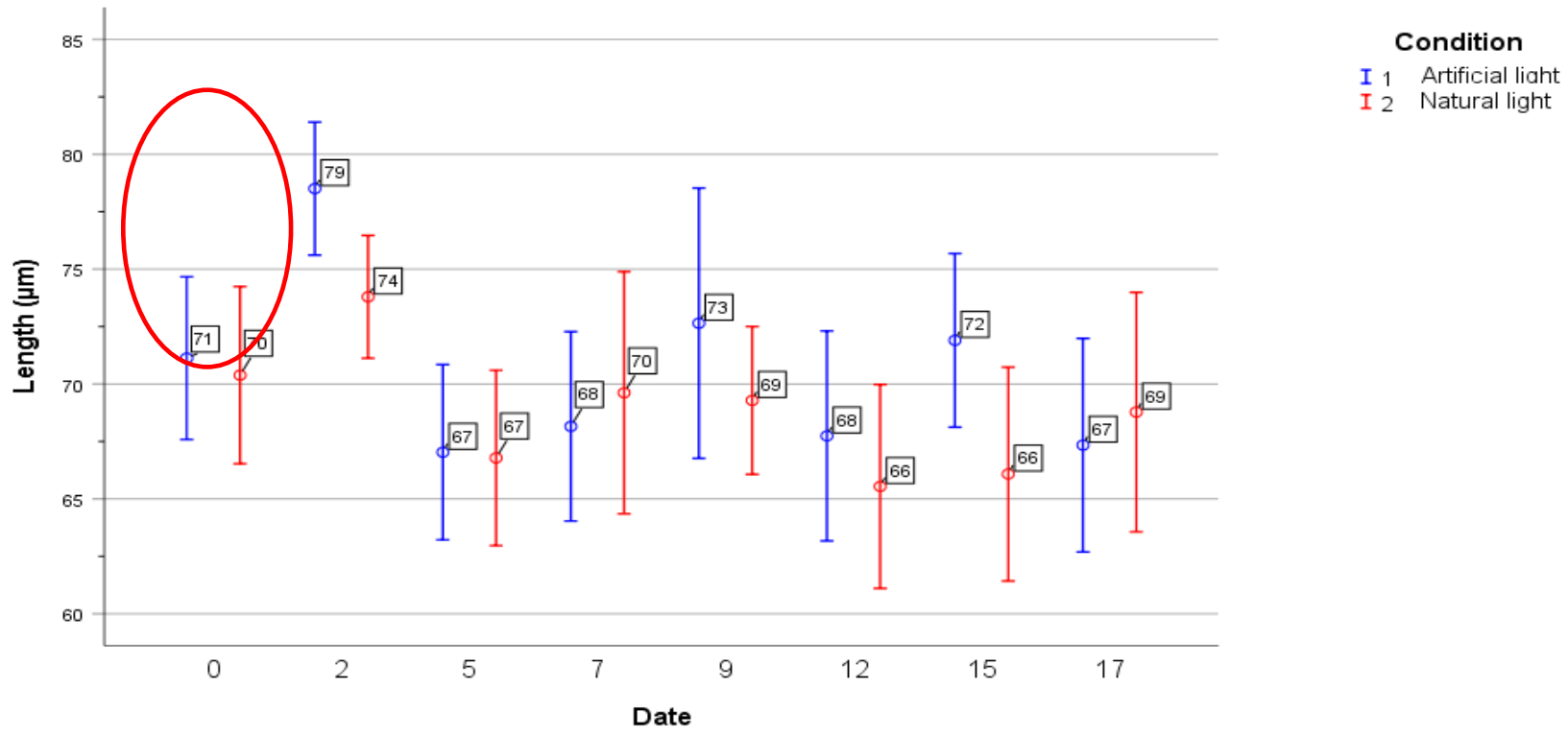
De acuerdo con la gráfica 2, en el día 0 la media de las células fue de $71 \pm 6.39 \mu\text{m}$ para la condición de luz artificial y de $70 \pm 6.97 \mu\text{m}$ para la condición de luz natural; en el día 2 la media asciende a $79 \pm 5.22 \mu\text{m}$ para la condición de luz artificial y $74 \pm 5.74 \mu\text{m}$ para la condición de luz natural, lo cual quiere decir que aquí sí hay diferencias significativas. Sin embargo, se observa que en el día 5 la media de las células desciende a $67 \pm 6.89 \mu\text{m}$ para ambas condiciones. Manteniendo este comportamiento en el tiempo restante del experimento.

Ancho (Transdiámetro)

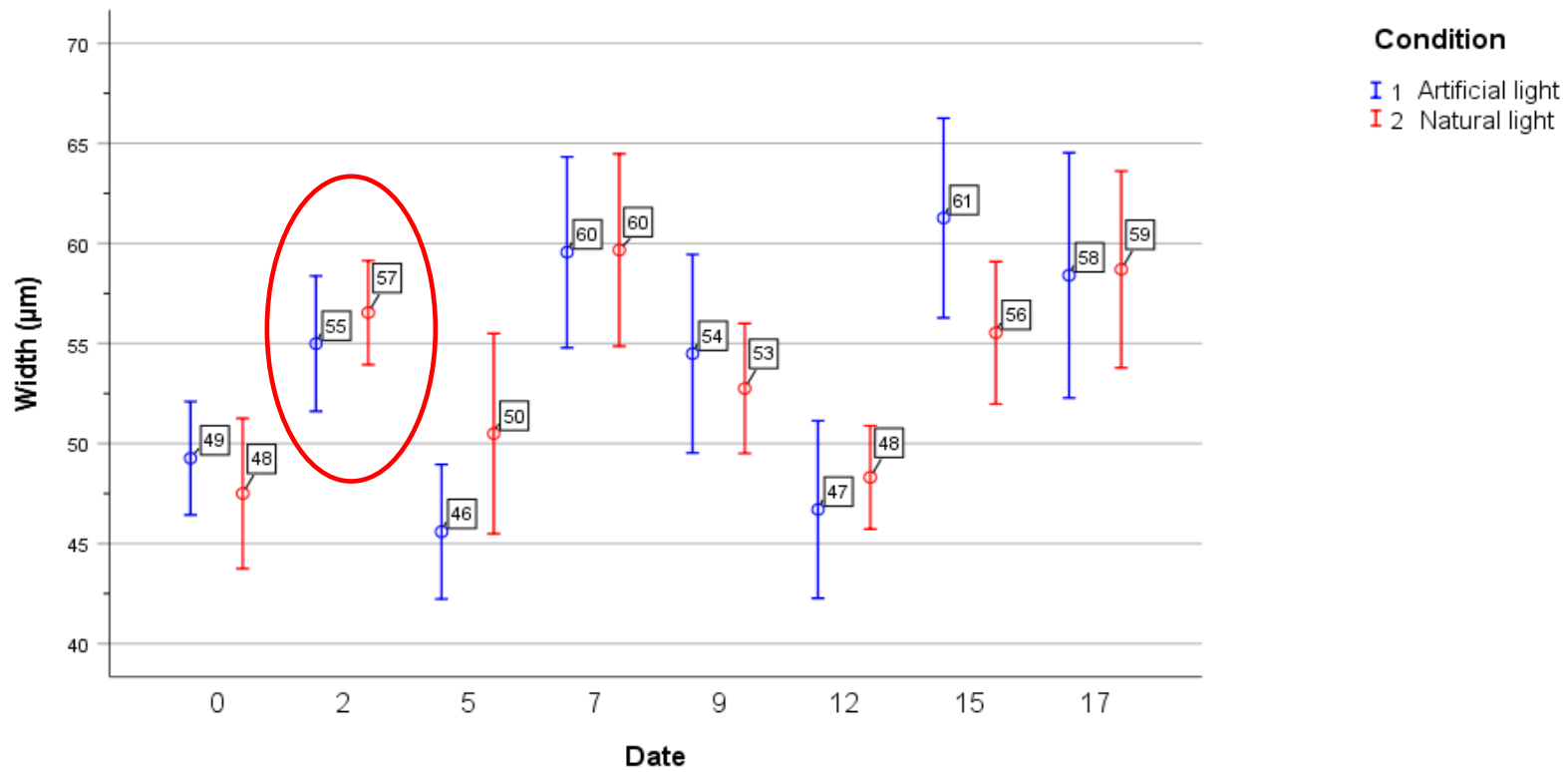
Con respecto al ancho de las células, según la gráfica 3 señala que inicia con un ancho celular de $49 \pm 5.11 \mu\text{m}$ para la condición de luz artificial y $48 \pm 6.78 \mu\text{m}$ para la condición de luz natural para el día 0. Seguido de un ascenso a $55 \pm 6.56 \mu\text{m}$ – condición de luz artificial y $57 \pm 4.69 \mu\text{m}$ – condición de luz natural para el día 2. A pesar de ello, para el día 5 se observa un notable descenso a $46 \pm 6.07 \mu\text{m}$ – condición luz de artificial y $50 \pm 7.03 \mu\text{m}$ – condición de luz natural. Este comportamiento se mantiene a lo largo del tiempo restante del experimento, excepto para la fase final (día 15 y 17) donde los valores son los más elevados. No hay diferencias significativas entre ambas condiciones a lo largo de la curva de crecimiento para el ancho de las células.

Por otro lado, en cuanto a la comparación de las medias del tamaño longitudinal de las células (largo y ancho) a lo largo del tiempo empleado en el experimento, tanto para la condición de luz artificial como para la condición de luz natural, se aplicó un ANOVA de una vía donde no se encontraron diferencias significativas entre ambas condiciones, excepto en los días 2 y 9 con respecto al largo de las células.

Por otra parte, el número de células distribuidas por frecuencias a lo largo del tiempo de duración del experimento, con sus respectivos máximos y mínimos y con respecto a la longitud tanto para el largo y el ancho celular, se puede apreciar en la figura 31 y 32, del apartado de Anexo.



Gráfica 2. Tamaño longitudinal (largo) de las células en el tiempo.

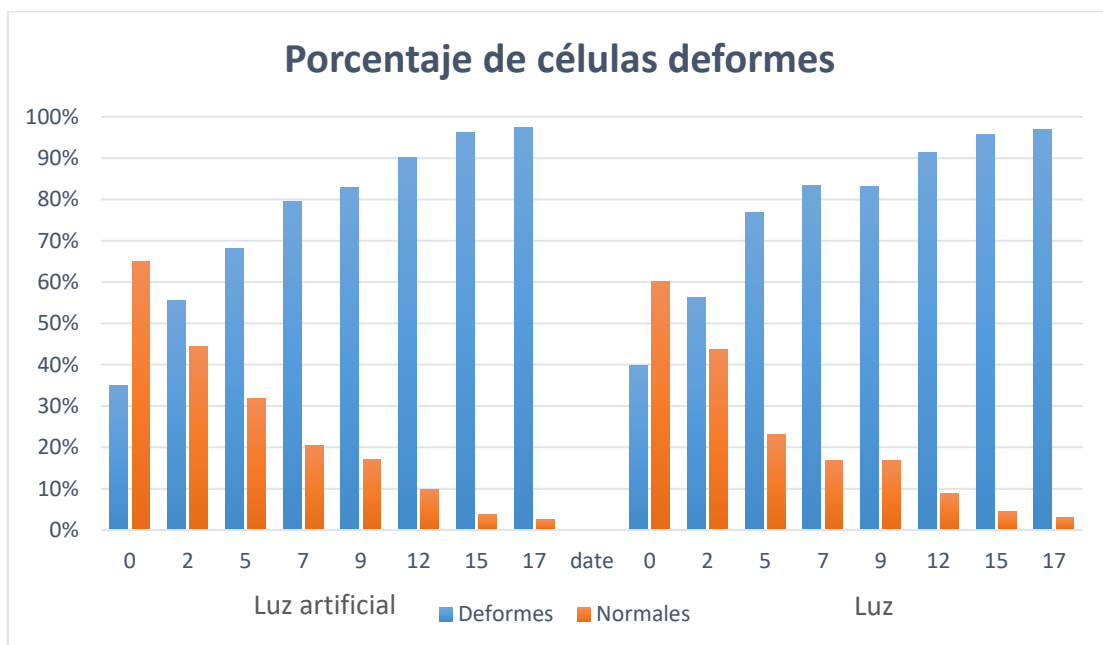


Gráfica 3. Tamaño longitudinal (ancho) de las células en el tiempo.

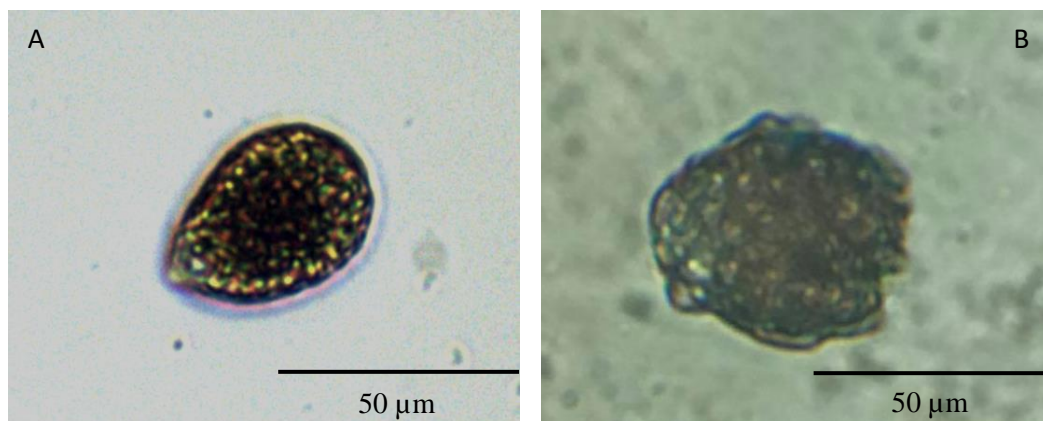
Morfología de las células

Las células analizadas de la cepa de *Ostreopsis cf. ovata*, tenían forma de lágrima en vista apical como suele ser normalmente. Sin embargo, presentaron anomalías en su estructura celular desde el inicio del experimento. Por lo cual, se las clasificó en dos grupos: normales y deformes (formaciones quísticas).

En cuanto al porcentaje de las células deformes que se hallaron en el estudio, la gráfica 6 y 7 indican que para el día 0 había más células normales que deformes. Sin embargo, a partir del día 5 el porcentaje de células deformes va en ascenso sobre todo para los días 15 y 17 donde casi se alcanza un 100% de células deformes para ambas condiciones (luz artificial y luz natural) (Gráfica 4 y 5).



Gráfica 4. Porcentaje de células deformes y normales para luz artificial y luz natural.



Gráfica 5. Morfología de *Ostreopsis cf. ovata*. (A) Célula normal en fase de latencia/lag. (B) Célula deformada (con formaciones quísticas) en fase estacionaria.

CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN

Varios autores como Carnicer et al. (11), Pezolesi et al. (16), Vanucci et al. (23), Penna et al. (9) y Bravo et al. (14), han corroborado el crecimiento exitoso de *O. cf. ovata* bajo condiciones de laboratorio. Sin embargo, todas las cepas utilizadas en estos estudios provenían del Mediterráneo. Así mismo, cepas de Brasil como en el estudio de Nascimento et al. (13), y de Japón por Zhang et al. (71) y Tanimoto et al. (56). Es por esto, que el presente estudio representa el primer cultivo de *O. cf. ovata* de una cepa aislada en el Océano Pacífico. Otra particularidad del estudio es la exposición de los cultivos a luz natural, cuya tasa de crecimiento resultó ser significativamente superior a la tasa de los cultivos expuestos a luz artificial.

Por su parte, en los estudios realizados por Abalde et al. (47) y Helm, Bourne y Lovatelli (48), se respalda la ejecución de un cultivo de microalgas con exposición a luz natural, disminuyendo costos de inversión. Pese a ello, también se explica que puede existir variabilidad en los resultados, debido a que no se puede tener un control total de la

luminosidad e intensidad como en los cultivos expuestos a luz artificial. No obstante, Abalde et al. (47) indica que los cultivos de microalgas expuestos a luz natural también dependen mucho de la ubicación geográfica.

En este caso, en Ecuador el día dura lo mismo que la noche durante todo el año (72), es decir, las microalgas estuvieron sometidas a un fotoperiodo 12:12 horas luz:oscuridad bajo luz natural. Sin embargo, la intensidad de la luz natural no pudo ser medida, puesto que no se contaba con un luxómetro. Cabe recalcar que los estudios previos mencionados han sido dirigidos a cultivos de microalgas para fines acuícolas (47,48).

Por otra parte, la curva de crecimiento de *O. cf. ovata*, se comporta de una manera muy similar en ambas condiciones, tanto en la luz artificial como en la luz natural. Se encontraron en ambas condiciones una fase de latencia de dos días, una fase exponencial de cinco días y una fase estacionaria de cinco días, seguida de la decadencia y muerte celular en los últimos días del experimento. En ambos tratamientos se observó el mismo patrón. Sin embargo, con respecto a la abundancia de las células existe una ligera diferencia con ventaja que recae sobre la condición de luz natural, lo cual puede deberse a que las células se adaptan mejor a este tratamiento, teniendo en cuenta que la luz natural es la misma a la que se encontraban expuestas en su medio de origen. Por tal razón, se ha demostrado que en el laboratorio de la PUCE - SE, se pueden llevar a cabo cultivos de microalgas con los instrumentos que se tienen al alcance.

Por otro lado, la tasa de crecimiento perteneciente a la condición de luz natural es significativamente mayor ($0.31 \pm 0.02 \mu\text{m}$) que en la condición de luz artificial ($0.25 \pm 0.03 \mu\text{m}$), esto quiere decir que un cultivo de microalgas puede llevarse a cabo sin necesidad de incubadores y tantos costos de producción involucrados. Por su parte, eso también se refiere a que la condición de luz natural influyó positivamente para que las células tengan un nivel más alto de reproducción. No obstante, en el presente estudio se registra una tasa de crecimiento mucho más baja en comparación con otros estudios como el de Carnicer et al. (11) ($0,61 \pm 0,05\mu\text{m}$ y $0,51 \pm 0,01 \mu\text{m}$), teniendo en cuenta que las células fueron sometidas a diferentes concentraciones de salinidad bajo la exposición de luz artificial.

Por otro lado, el estudio ejecutado por Pezzolesi et al. (16) tiene una tasa de crecimiento ($0.34 \mu\text{m}$ mín. – $0.49 \mu\text{m}$ máx.) similar a la del presente estudio. Pese a ello, en dicho estudio las células también fueron sometidas a distintas temperaturas y concentraciones

de salinidad. Con lo cual, todas estas variaciones pueden atribuirse a las diferencias en las metodologías aplicadas y por supuesto, a la falta de un espacio de trabajo especializado en este tipo de investigación, en el Laboratorio de la PUCE - SE, puesto que es necesario mantener condiciones estériles todo el tiempo, con la finalidad de evitar la introducción de microorganismos que afecten al crecimiento de las cepas en cuestión. En este caso, cuando se utilizó la autoclave para esterilizar el agua y las pipetas no se contaron con las condiciones de óptima esterilización, puesto que lo ideal sería realizar este proceso por medio de una campana de esterilización para prevenir el paso de bacterias que interfieran en el crecimiento de las células. A su vez, también podría ser posible que las cepas del Pacífico tuvieran un crecimiento menor en comparación con las cepas del Mediterráneo, como ocurre con la cepa brasileña (mayores tasas de crecimiento a temperatura de 26°C, tasas más bajas a temperatura de 16 °C) (45). De modo que podría considerarse que la temperatura no controlada por llevarse a cabo este experimento sin incubadores pudo haber influido en las diferencias de las tasas de crecimiento de *O. cf. ovata* obtenidas en el presente estudio en comparación con otros estudios realizados en el Mediterráneo (11,16,45).

Si bien es cierto, los dinoflagelados se han distribuido ampliamente a nivel mundial (55). Sin embargo, se sabe que estos organismos prefieren las altas temperaturas, sobre todo los géneros más tóxicos como *Gambierdiscus* y *Ostreopsis* (24). Partiendo de esto, con la innegable existencia del cambio climático la temperatura del mar se ha ido incrementando, dando lugar a eventos de mareas rojas con mayor frecuencia (24). En el presente estudio las cepas de *Ostreopsis* se recolectaron a una temperatura de 27.5 °C, mientras que, en el experimento se aplicó una temperatura aproximadamente de 25 – 26 °C, debido a que los laboratorios en los que se llevó a cabo el estudio se manejan con esta temperatura. Pese a ello, esto no afecta al proceso de proliferación de estas microalgas, puesto que, en los últimos años su presencia en temperaturas templadas (las más altas, entre 21 – 25° C) no se ha visto limitada (75,76).

En cuanto al tamaño de las células durante la fase exponencial, estas resultaron ser significativamente menores en la condición de luz natural con respecto a la luz artificial, lo cual probablemente sea debido a su rápida división celular, tal como se menciona en el estudio realizado por Silva y Fausto (73) donde se explica que las células de menor tamaño indican un proceso acelerado de reproducción sexual o asexual. No obstante, otros autores como Accoroni et al. (15) y Bravo et al. (14) exponen que esto podría atribuirse

a la rapidez de las fases, además de recomendar un muestreo minucioso, tener un tamaño de muestra sólido y la estimación de duración de cada fase para evitar sesgo en los resultados. Por otro lado, no se hallaron diferencias significativas en cuanto al tamaño celular entre ambas condiciones, excepto en el segundo y noveno día, dado que probablemente se encontraban en su proceso de división celular (73).

Las células desarrollaron diversos tipos de morfología (50), dentro de los cuales se determinaron dos grupos: normales y deformes. A lo largo de la curva de crecimiento el porcentaje de células deformadas fue aumentando hasta representar el 100% en los últimos días para ambas condiciones. Este hecho se ha observado en otros estudios por Carnicer et al. (11,33), Guerrini et al. (23), Accoroni et al. (15) y Aligizaki (74), donde los quistes aparecen en la fase final del cultivo. Cabe destacar que en el presente estudio su aparición es notoria desde los primeros días aunque en menor medida, posiblemente se deba a que el desarrollo de las células no estuvo en óptimas condiciones, según lo reporta Bravo et al. (14). Como se ha dicho anteriormente el experimento no se llevó a cabo en un laboratorio especializado para el desarrollo de microalgas con condiciones de esterilidad, lo que puede favorecer la aparición de este tipo de células aberrantes.

Cabe recalcar que las formaciones quísticas son una característica de los dinoflagelados y se hacen presente como parte de un mecanismo de defensa frente a las adversidades del medio donde se desarrollan, esto ha sido revelado por varios autores, tales como López – Moreira et al. (50) y Bravo y Figueroa (46), los mismos que argumentan que esto se entiende como una fase de adaptabilidad y que una vez que las condiciones vuelvan a mantenerse dentro de un rango óptimo para su desarrollo, estas adoptarán su forma normal. Este proceso de formación de quistes consiste en eliminar la teca de las células y sus flagelos tomando una forma redondeada con presencia de protuberancias. Otra característica interesante es que la célula con presencia de quistes se mantiene en el sedimento, mientras atraviesa las condiciones adversas del medio. Sin embargo, cuando las condiciones vuelven a ser normales, la célula vuelve a ser vegetativa en la columna de agua (14,46). A lo largo del tiempo, se han estudiado las diversas morfologías y especies de *O. cf.*, sin embargo, aún no se cuenta con estudios totalmente elaborados que permitan detallar a profundidad sus distintos comportamientos, dado que existen múltiples variables que influyen en su crecimiento, tanto en el medio natural como en condiciones de laboratorio que aún faltan por identificarse (15). De hecho, existen laboratorios especializados en microalgas que compran cepas de diferentes partes del

mundo para realizar nuevos estudios toxicológicos, genéticos, comparativos, etc. Entre estos laboratorios de reconocimiento mundial en colecciones de cultivos de microalgas se encuentran La Station Biologique de Roscoff (SBR) de la Universidad Pierre-et-Marie-Curie del Institut National des Sciences de L'univers, en Francia; y The Culture Collection of Algae at The University of Texas at Austin (UTEX), en E.E.U.U., los cuales se dedican a publicar artículos científicos liderando estudios de renombre, conferencias específicas, nacionales e internacionales.

Bajo este contexto, mantener una colección de microalgas es de gran relevancia dentro del entorno científico, puesto que trae consigo aspectos positivos como la disponibilidad para llevar a cabo una serie de estudios que aporten a otras ramas tal como la biotecnología y farmacéutica (77). Además, son piezas clave para la conservación de especies según su lugar de origen, siendo esto apoyado por el Protocolo de Nagoya (2014) que sustenta la equitativa distribución y utilidad de los recursos genéticos (54,55). Cada vez más, las empresas se plantean el auspicio y reconocimiento a los laboratorios con colecciones de microalgas, debido a su gran aporte al sector biotecnológico (27). Cabe recalcar, que el campo de la biotecnología ligada al uso de las microalgas coleccionadas en laboratorios va en aumento, siendo más común la elaboración de productos a base de microalgas en distintos aplicativos como el consumo humano, sector agrícola, cosmético y médico (55,78).

Se han llevado a cabo investigaciones donde hacen uso de microalgas y sus componentes químicos y tóxicos para tratamientos contra el cáncer. En la actualidad se siguen estudiando sus aplicaciones y aportes en distintos campos (79). En el 2014 se llevó a cabo una investigación por Lorenzo et al. (80), en donde se explica que estos compuestos químicos producidos por los dinoflagelados son de fundamental interés en el campo farmacéutico, puesto que en dosis pequeñas se han visto beneficios para la elaboración de analgésicos y anticancerígenos. No obstante, también expone que lo ideal sería aumentar las colecciones de microalgas disponibles para poder analizar sus propiedades y los aplicativos que beneficiarían a la humanidad.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

Conclusiones

La curva de crecimiento de *Ostreopsis* cf. *ovata* tuvo un comportamiento similar, tanto en la condición de luz artificial como en la condición de luz natural. Por tanto, se puede decir que en el laboratorio de la PUCE – SE, se pueden llevar a cabo cultivos de microalgas con los instrumentos que se cuentan al momento y comprobando que la luz natural influye de manera positiva al crecimiento de estas, sin necesidad de mayores costos para su producción.

La tasa de crecimiento *O.* cf. *ovata* bajo condición de luz natural (0.31 ± 0.02) fue significativamente mayor que la de la condición de luz artificial (0.25 ± 0.03). Lo cual, puede deberse a que las células se adaptan favorablemente a la condición de luz natural, debido a que era la misma a la que se encontraban sometidas en su medio de origen.

En cuanto al tamaño de las células se puede concluir que, durante la fase exponencial, estas resultaron ser significativamente menores en la condición de luz natural en comparación a las de la condición de luz artificial, lo cual seguramente se debe a su rápida división celular.

Se determinaron dos grupos de células con diferentes características morfológicas: normales y deformes. Dentro de las cuales las células deformes son aquellas que poseen anomalías en su estructura celular, dando lugar a formaciones quísticas que se evidenció en un 100% con respecto a los últimos días del experimento. Lo cual probablemente se deba a que las células no se desarrollaron en óptimas condiciones de cultivo.

Recomendaciones

Es así como, debería considerarse destinar un espacio de trabajo especializado en microalgas donde se podrían controlar de manera más adecuada múltiples variables y generar una mayor amplitud de enfoques, aún más con la propuesta de la carrera de Ciencias del Mar. De hecho, la presente investigación se planteó con bases en una proyección a futuro, donde se puedan seguir realizando estudios acerca de microalgas

para lograr un laboratorio de residencia de microalgas a nivel nacional, con el objetivo de dar realce nacional e incluso internacional a la PUCE – SE. Dando apertura a estudios sobre microalgas, que están revolucionando el campo científico, enfatizando en el planteamiento del estudio de otras cepas que puedan aportar al sector acuícola y como ya se mencionó al sector de la biotecnología.

Con respecto a la ejecución de cultivos de microalgas se sugiere mantener condiciones máximas de esterilidad para no interferir en la variabilidad de los datos. Además, se recomienda llevar a cabo muestreos minuciosos y destinar un tiempo prolongado para tomar un número de muestras adecuado pudiendo así evitar el margen de error en los datos.

Finalmente, se aconseja también mantener los cultivos en un espacio específico y alejado de otros experimentos que puedan causar interferencia, así como también se sugiere mantenerlos en un lugar donde puedan estar expuestos a la luz natural sin que nada les cause sombra, de preferencia a través de un ventanal.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gómez Luna LM. Microalgas: Aspectos Ecológicos Y Biotecnológicos. 2007;3(2).
2. Hernández-Pérez A, Labbé J. Microalgas, cultivo y beneficios. Rev Biol Mar Oceanogr. 2014;49:157–73.
3. Montaña SA. Clasificación taxonómica de microalgas presentes en un consorcio microbiológico que biorremedia el efluente de una planta de sacrificio de bovinos y porcinos. Trab Grado - Univ LOS ANDES. 2016;(May):39.
4. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Las Algas : Recordemos su Importancia evolutiva , ecológica y biotecnológica Importancia evolutiva , ecológica y biotecnológica. Dep Biodivers y Biol Exp Univ Buenos Aires. 2015;1:1–34.
5. Sellner KG, Doucette GJ, Kirkpatrick GJ. Harmful algal blooms: Causes, impacts and detection. J Ind Microbiol Biotechnol. 2003;30(7):383–406.
6. Gómez F, Moreira D, López-García P. Avances en el estudio de los dinoflagelados (Dinophyceae) con la filogenia molecular Advances on the study of dinoflagellates (Dinophyceae) with the molecular phylogeny. 2011;21(3):343–64.
7. Parra-Toriz D, Ramírez-Rodríguez M, Hernández-Becerril D. Dinoflagelados

- (Dinophyta) de los órdenes Prorocentrales y Dinophysiales del Sistema Arrecifal Veracruzano, México. 2011;59(March):501–14.
8. Ramírez Sarmiento Angélica. Caracterización de la comunidad de microalgas epibentónicas de la Reserva Marina Galera San Francisco. PUCESE. 2017;1–42.
 9. Penna A, Vila M, Mari P, Giacobbe MG. CHARACTERIZATION OF OSTREOPSIS AND COOLIA (DINOPHYCEAE) ISOLATES IN THE WESTERN MEDITERRANEAN SEA BASED ON MORPHOLOGY , TOXICITY AND Santiago Fraga Francesca Andreoni Pilar Riobo and Cristiano Vernesi. 2005;225(November 2004):212–25.
 10. Almazán-Becerrín A. Dinoflagelados bentónicos del Arrecife Mesoamericano: Caribe Mexicano [Internet]. CONABIO. 2011. Available from: <https://www.gbif.org/es/dataset/ad9da392-a0ae-492f-ad51-24bf0fe1264c#description>
 11. Andree KB, Tartaglione L, Carnicer O, Aversano CD, Ciminiello P, De P, et al. *Ostreopsis cf. ovata* from western Mediterranean Sea : Physiological responses under different temperature and salinity conditions. *Harmful Algae*. 2016;57:98–108.
 12. Ciminiello P, Aversano D, Fattorusso E, Forino M, Tartaglione L, Grillo C. Putative Palytoxin and Its New Analogue , Ovatoxin-a , in *Ostreopsis ovata* Collected Toxic Outbreak. 2008;
 13. Mattos Nascimento S, Vitor J, Gonçalves JEA, Ferreira CEL. *Ostreopsis cf. ovata* (Dinophyta) bloom in an equatorial island of the Atlantic Ocean. *Mar Pollut Bull* [Internet]. 2012;64(5):1074–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.03.015>
 14. Bravo I, Vila M, Casabianca S, Rodriguez F, Rial P, Penna A. Life cycle stages of the benthic palytoxin-producing dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata* (Dinophyceae). *Harmful Algae*. 2012;18:24–34.
 15. Mangialajo L, Accoroni S, Mangialajo L, Ganzin N, Accoroni S, Asnaghi V, et al. Trends in *Ostreopsis* proliferation along the Northern Mediterranean coasts Author ' s personal copy *Toxicon Trends in Ostreopsis proliferation along the Northern Mediterranean coasts*. 2011;(March).
 16. Pezzolesi L, Guerrini F, Ciminiello P, Dell C, Dello E, Fattorusso E, et al. Influence of temperature and salinity on *Ostreopsis cf. ovata* growth and evaluation of toxin content through HR LC-MS and biological assays. *Water Res* [Internet]. 2011;46(1):82–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2011.10.029>
 17. Scalco E, Brunet C, Marino F, Rossi R, Soprano V, Zingone A, et al. Growth and toxicity responses of Mediterranean *Ostreopsis cf. ovata* to seasonal irradiance and temperature conditions. *Harmful Algae* [Internet]. 2012;17:25–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.hal.2012.02.008>
 18. Solano J. “Evaluación del potencial antibacteriano en extractos lipofílicos en cianobacterias y microalgas cultivadas a partir de muestras de agua recolectadas

- en el sector El Cajas.” Univ Cuenca Carrera Bioquímica y Farm. 2017;
19. Yépez-Rendón Josselyn. Presencia de dinoflagelados potencialmente tóxicos en la Reserva Marina Galápagos. PUCESE. 2018;
 20. Durán-Riveroll LM, Cembella AD, Okolodkov YB. A review on the biodiversity and biogeography of toxigenic benthic marine dinoflagellates of the coasts of Latin America. *Front Mar Sci.* 2019;6(APR):1–25.
 21. Totti C, Accoroni S, Cerino F, Cucchiari E, Romagnoli T. *Ostreopsis ovata* bloom along the Conero Riviera (northern Adriatic Sea): Relationships with environmental conditions and substrata. 2010;9:233–9.
 22. Vila M, Garcés E, Masó M. Potentially toxic epiphytic dinoflagellate assemblages on macroalgae in the NW Mediterranean. 2001;26:51–60.
 23. Pezolesi L, Guerrini F, Ciminiello P, Dell’Aversano C, Iacovo E Dello, Fattorusso E, et al. Influence of temperature and salinity on *Ostreopsis cf. ovata* growth and evaluation of toxin content through HR LC-MS and biological assays. *Water Res.* 2012;46(1):82–92.
 24. Botana L, Vilariño N. A vision on marine toxins in 2050 from Climate Change, Biosecurity and food security. *Inst Español Estud Estratégicos.* 2018;1–24.
 25. Geohab. GEOHAB CORE RESEARCH PROJECT: HABs IN BENTHIC SYSTEMS. E Berdalet, I Bravo, J Evans, S Fraga, S Kibler, R M Kudela, J Larsen, W Litaker, A Penna, P Tester, M Vila, A Zingone. 2012;64.
 26. Guamán M, González N. Catálogo de Microalgas y Cianobacterias de Agua Dulce del Ecuador. Corporación para la Investigación Energética. 2016;143.
 27. Herrera-Sepúlveda Angélica, Sierra-Beltrán Arturo H-SN. Floraciones Algales Nocivas: Perspectivas y Estrategias Biotecnológicas Para Su Detección. *BioTecnología.* 2008;12(1):23–40.
 28. Oliva-Martínez MG, Godínez-Ortega JL, Zuñiga-Ramos CA. Biodiversidad del fitoplancton de aguas continentales en México. *Rev Mex Biodivers.* 2014;85(SUPPL.):54–61.
 29. Jasso AM, Valdez PP, Soto MN. La importancia de las Microalgas. *Biodiversitas.* 2012;1–5.
 30. Appeltans W, Ahyong ST, Anderson G, Angel M V., Artois T, Bailly N, et al. The magnitude of global marine species diversity. *Curr Biol.* 2012;22(23):2189–202.
 31. Tapia ME. Composición y distribución del fitoplancton durante la prospección sísmica en la costa ecuatoriana, Diciembre de 2008. *Acta Oceanogr del pacífico.* 2013;18(1):75–89.
 32. Peralta P, Fuentes V. Fitobentos, fitoplancton y zooplancton litoral del bañado de Carilauquen, Cuenca de Llanquanelo, Mendoza, Argentina. *Limnetica.* 2005;24(1–2):183–97.

33. Carnicer O, Tunin-Ley A, Andree KB, Turquet J, Diogène J, Fernández-Tejedor M. Contribution to the Genus *Ostreopsis* in Reunion Island (Indian Ocean): Molecular, Morphologic and Toxicity Characterization. Vol. v. 36, Cryptogamie, Algologie. Association des Amis des Cryptogames; 2015.
34. Delgado del Villar S, Alonso-Rodríguez R, Jimenez-gutierrez L. Las extraordinarias formas de vida de los dinoflagelados del Pacífico mexicano. 2021;22:1–10.
35. Roa-Fuentes C, Pérez-Mayorga M. MODIFICACIÓN DE AMBIENTES LÓTICOS PARA LA EXTRACCIÓN DE CARBÓN A CIELO ABIERTO : EFECTOS SOBRE LA BIOTA Y RECOMENDACIONES Modification of Lotic Environments for Open Pit Coal Extraction : Effects on Biota and Recommendations. 2017;23(1):17–29.
36. Mancera-Pineda JE, Montalvo-Talaigua M, Gavio B. Dinoflagelados Potencialmente Tóxicos Asociados a Material Orgánico Flotante (Drift) En San Andrés Isla, Reserva Internacional De La Biosfera - Seaflower. Caldasia. 2014;36(1):139–56.
37. HERNÁNDEZ ROA HUMBERTO. EFECTOS DEL FENÓMENO DE EL NIÑO COMO FACTOR CONDICIONANTE DE LAS FLORACIONES ALGALES EN EL EMBALSE EL HATO, MUNICIPIO DE CARMEN DE CARUPA (CUNDINAMARCA, COLOMBIA). Univ JORGE TADEO LOZANO Fac CIENCIAS Nat E Ing Maest EN CIENCIAS Ambient BOGOTÁ, Colomb. 2014;
38. Meave M. Informe Final del Proyecto DJ022 “ Dinoflagelados y Diatomeas del Pacífico Tropical Mexicano ” Responsable : Dra . Ma . Esther Angélica Meave del Castillo Colaboradores : Ma . Eugenia Zamudio Resendiz Griselda Chavarría Bustamante Adriana Hernandez Rosas. 2009;
39. Sar EA, Ferrario ME, Reguera B. Floraciones Algaes Nocivas en el Cono Sur Americano. 2002. 303 p.
40. Vargas-montero M, Freer E. (Bacillariophyceae) en el Golfo de Nicoya , Costa Rica. 2004;52:127–32.
41. Celis JS, Mancera Pineda JE. Ciguatera En Las Islas Del Caribe Durante 31. Bol Invest Mar Cost. 2015;44(1):7–32.
42. Udaka S. Screening for protein-producing bacteria. Agric Biol Chem. 1976;40(3):523–8.
43. Quintana H, Mercado-Gómez J. Composición de dinoflagelados epífitos y forófitos en la Costa norte del golfo de Morrosquillo , Sucre , Colombia. 2017;9(2):129–40.
44. Tichadou L, Glaizal M, Armengaud A, Grosseil H, Lemée R, Lasalle J, et al. Health impact of unicellular algae of the *Ostreopsis* genus blooms in the Mediterranean Sea : experience of the French Mediterranean coast surveillance network from 2006 to 2009. 2010;839–44.
45. Nascimento SM, Corrêa E V. Influence of temperature on growth parameters of

- Ostreopsis ovata, Prorocentrum cf. maculosum, Coolia monotis and Amphidinium sp. Strains from Rio de Janeiro, Brazil. GEOHAB. 2010;(June):29–30.
46. Bravo I, Figueroa RI. Towards an Ecological Understanding of Dinoflagellate Cyst Functions. Microorganisms. 2014;2:11–32.
 47. Abalde Alonso JE, Cid Blanco A, Fidalgo Paredes JP, Torres Vaamonde JE, Herrero López C. Microalgas: Cultivo y aplicaciones. Microalgas: Cultivo y aplicaciones. 1995.
 48. Helm, M.M.; Bourne, N.; Lovatelli A. Cultivo de bivalvos en criadero. FAO Doc Técnico Pesca No 471 Roma, FAO. 2006;182.
 49. Guillard. f/2 Medium. 1975;5–7.
 50. Lopez L. Curva de crecimiento bacteriano en la producción de proteínas recombinantes. 2016;
 51. Gutiérrez K. Influencia de factores ambientales de crecimiento microbiano en la degradación de polietileno de baja densidad por la bacteria pseudomona aeruginosa enHuancayo. 2018;
 52. Benintende S, Sanchez C. Crecimiento Bacteriano. UN. 2002;1–7.
 53. Lavens P, Sorgeloos P. Manual on the production and use of live food for aquaculture. Vol. 361, Fao Fisheries Technical Paper. 1996. 1–295 p.
 54. IPacuicultura. Colección Vasca de Cultivos de Microalgas (BMCC) [Internet]. 2021. Available from: <https://www.ehu.es/es/web/bmcc/coleccion>
 55. Gómez-Luna L. Aspectos ecológicos y biotecnológicos. Rev Cuba Química [Internet]. 2007;XIX:3(19). Available from: <https://www.redalyc.org/pdf/4435/443543707001.pdf>
 56. Tanimoto Y, Yamaguchi H, Yoshimatsu T, Sato S, Adachi M. Effects of temperature, salinity and their interaction on growth of toxic *Ostreopsis* sp. 1 and *Ostreopsis* sp. 6 (Dinophyceae) isolated from Japanese coastal waters. Fish Sci. 2013;79(2):285–91.
 57. REGLAMENTO (CE) No 178/2002 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 28 de enero de 2002. D Of las Comunidades Eur [Internet]. 2002;1–24. Available from: chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/viewer.html?pdfurl=https%3A%2F%2Fwww.boe.es%2Fdoue%2F2002%2F031%2FL00001-00024.pdf&cIen=255301&chunk=true
 58. Reglamento (CE) N°853/2004. Parlam Eur y Cons las Comunidades Eur. 2004;(8):22–82.
 59. Reglamento (CE) N°854/2004. D Of las Comunidades Eur. 2004;2003.
 60. MINECO, CONACYT, MIFIC, SIC, MEIC. Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50.08. 2005;

61. Fomento M De. Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:08. 2009;(243):1–36.
62. Suárez B, Guzmán L. FLORACIONES DE ALGAS NOCIVAS Mareas Rojas y Toxinas Marinas . Dr . Benjamín Suárez Isla Instituto de Ciencias Biomédicas Facultad de Medicina Universidad de Chile Dr . Leonardo Guzmán Méndez. :1–56.
63. Salud MDE, Jurídica D. Reglamento sanitario de los alimentos. 13.
64. Ministerio del Ambiente. Acuerdo Ministerial N° 061. 2015;1–80.
65. Asamblea Nacional República del Ecuador. Suplemento del Registro Oficial 187, 21-IV-2020. 2020;(187).
66. Bossano M. Propuesta de Ordenamiento Territorial Ecológico en el recinto Estero de Plátano utilizando técnicas de geo-información. 2015; Available from: chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/viewer.html?pdfurl=https%3A%2F%2F repositorio.pucese.edu.ec%2Fbitstream%2F123456789%2F378%2F1%2FBOSSANO%2520%2520CLAVIJO%2520MARTHA%2520CRISTINA.pdf&clen=6053308
67. Utermöhl H. Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte. Sil Commun. 1958;9:1–38.
68. Environmental Protection Agency (EPA). Standard Operating Procedure for Phytoplankton Analysis. 2010;(February).
69. Inés A, Maite O, Isabel B. COMO ABORDAR Y RESOLVER ASPECTOS PRÁCTICOS DE. 2012; Available from: chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/viewer.html?pdfurl=https%3A%2F%2Focw.ehu.es%2Ffile.php%2F48%2FTema_4._calculo_de_los_parametros_que_definen_el_crecimiento_bacteriano.pdf&clen=258849&chunk=true
70. Marín J. Análisis de varianza factorial El procedimiento Modelo lineal general : Univariante. 2015; Available from: <http://halweb.uc3m.es/esp/Personal/personas/jmmarin/esp/GuiaSPSS/15anova2.pdf>
71. Zhang H, Lu S, Li Y, Cen J, Wang H, Li Q, et al. Morphology and molecular phylogeny of *Ostreopsis* cf. *ovata* and *O. lenticularis* (Dinophyceae) from Hainan Island, South China Sea. *Phycol Res.* 2018;66(1):3–14.
72. Hora de amanecer y atardecer en Ecuador [Internet]. Datos mundial. 2021. Available from: <https://www.datosmundial.com/america/ecuador/puesta-del-sol.php>
73. Silva ES, Faust MA. Small cells in the life history of dinoflagellates (Dinophyceae): a review. 1995;34:396–408.
74. Aligizaki K, Katikou P, Milandri A, Diogène J. Toxicon Occurrence of palytoxin-group toxins in seafood and future strategies to complement the present state of the art. *Toxicon* [Internet]. 2011;57(3):390–9. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.11.014>

75. Granéli E, Vidyarathna NK, Funari E, Cumaranatunga PRT, Scenati R. Can increases in temperature stimulate blooms of the toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis ovata*? *Harmful Algae*. 2011;10(2):165–72.
76. Pavaux A, Berdalet E, Lemée R. Chemical Ecology of the Benthic Dinoflagellate Genus *Ostreopsis* : Review of Progress and Future Directions. *Front Mar Sci*. 2020;7(July):1–28.
77. González Gil D, Jiménez Quiceno J. Colecciones microbianas : importancia, establecimiento y regulación. 2019;4(1):23–33.
78. CONABIO. Colección de microalgas CMCIBNOR [Internet]. 2000. Available from: <http://www.biodiversidad.gob.mx/fichas-conabio-war/resources/coleccion/427>
79. Lloret J. Ecosistemas Marinos y Salud Humana. *Mediterráneo económico* [Internet]. 2015;(27):179–97. Available from: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5207074>
80. López-Rosales L, Gallardo-Rodríguez JJ, Sánchez-Mirón A, Cerón-García M del C, Belarbi EH, García-Camacho F, et al. Simultaneous effect of temperature and irradiance on growth and okadaic acid production from the marine dinoflagellate *Prorocentrum belizeanum*. *Toxins (Basel)*. 2013;6(1):229–53.

ANEXOS

Figuras



Figura 3. Toma de coordenadas geográficas.



Figura 4. Agitación de muestras de macrófitas.



Figura 5. Filtración de agua de mar mediante un tamiz con luz de malla de 200 μm .



Figura 6. Volumen de agua resultante.



Figura 7. Medición pH, salinidad y temperatura.



Figura 8. Purificación de agua de mar a través de filtros G/FC.



Figura 9. Agua previamente filtrada vaciada en el Matraz Erlenmeyer con su respectiva cubierta de papel aluminio para evitar impurezas.



Figura 10. Esterilización del agua filtrada junto con las puntas de micropipeta Plus-Sed en el autoclave.

Nutrient ¹⁾	Amount (g)
Solution A: Nitrate and phosphate stock solution (1 L)	
NaNO ₃	84.15
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	6.0
FeCl ₃ · 6H ₂ O	2.90
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	10.0
Solution B: Silicate stock solution (1 L)	
Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O	33.0
Solution C: Trace metal stock solution (1 L)	
CuSO ₄ · 5H ₂ O	1.96
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	4.40
Ma ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	1.26
MnCl ₂ · 4H ₂ O	36.0
CoCl ₂ · 6H ₂ O	2.0
Solution D: Vitamins stock solution (1 L)	
Vitamine B ₁	0.4
Vitamine B ₁₂	0.002 mg
Biotin	0.1.mg

Figura 11. Composición química del medio f/2 de Guillard.



Figura 12. Caja Petri con una muestra del volumen de agua resultante obtenido.



Figura 13. Derretimiento de las micropipetas de vidrio para obtener un orificio más pequeño.



Figura 14. Micropipetas de vidrio sometidas al mechero de Bunsen.



Figura 15. Captura de células por capilaridad para su respectiva inoculación.



Figura 16. Muestra aislada colocada en un portaobjetos dividido en 3 gotas.



Figura 17. Microplaca con pocillos previamente abastecidos de medio esterilizado para la inoculación de células iniciales aisladas.



Figura 18. Reescalado desde los pocillos a botellas estériles de 40 ml.



Figura 19. Reescalado a botellas de 160 ml.

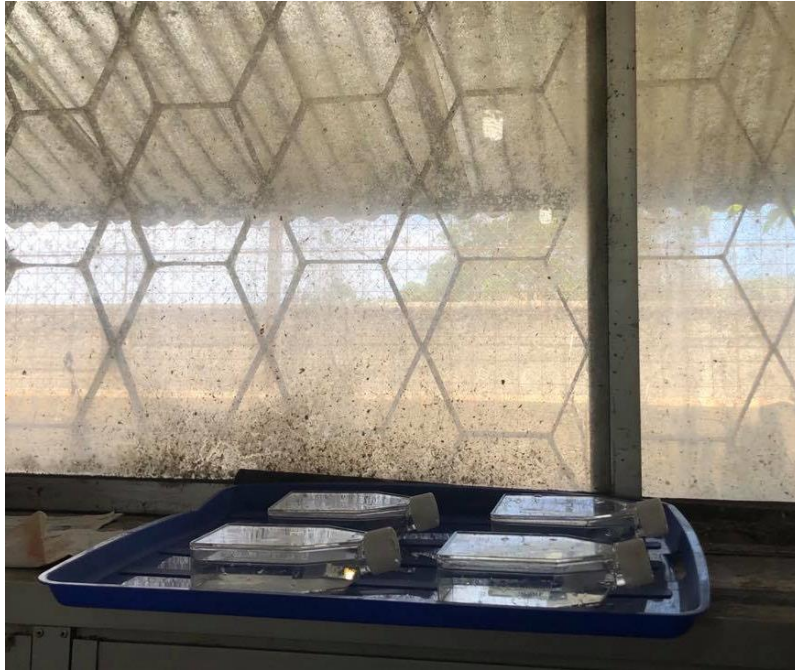


Figura 20. Botellas con cultivos a exposición de luz natural – Laboratorio de Gestión Ambiental PUCE - SE.



Figura 21. Botellas con cultivos a exposición de luz artificial – Laboratorio de Microbiología PUCE - SE.

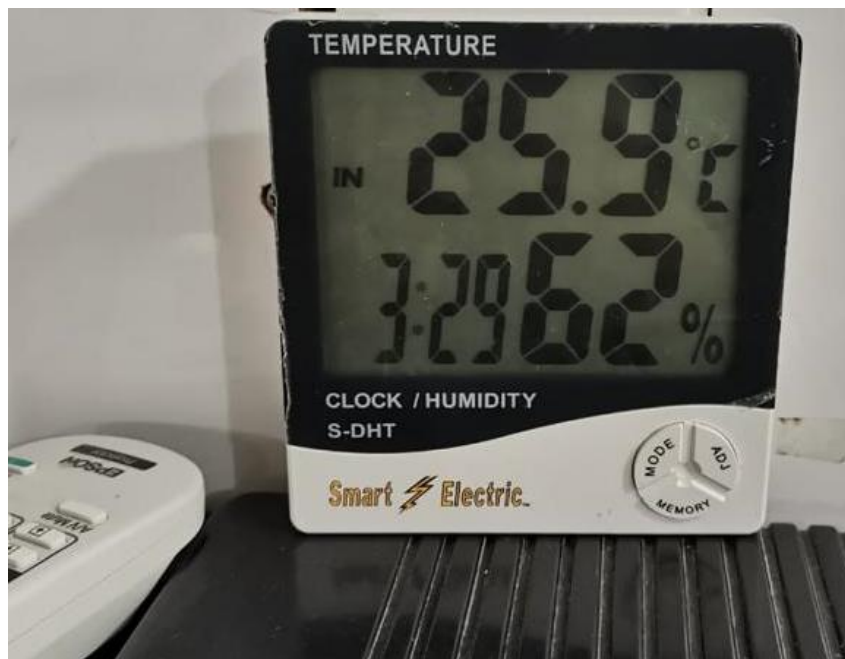


Figura 22. Termómetro digital para interiores ubicado en el Laboratorio de Microbiología PUCE - SE.



Figura 23. Termómetro digital para interiores ubicado en el Laboratorio de Gestión Ambiental PUCE - SE.



Figura 24. Toma de alícuotas de 10 ml en tubos Falcon® fijadas con Lugol.



Figura 25. Agitación en forma de ocho de las muestras fijadas previo al recuento.



Figura 26. Muestra fijada distribuida en cámara de sedimentación de Utermöhl (3 ml).



Figura 27. Recuento de muestras fijadas en cámaras de sedimentación de Utermöhl por medio del microscopio invertido.

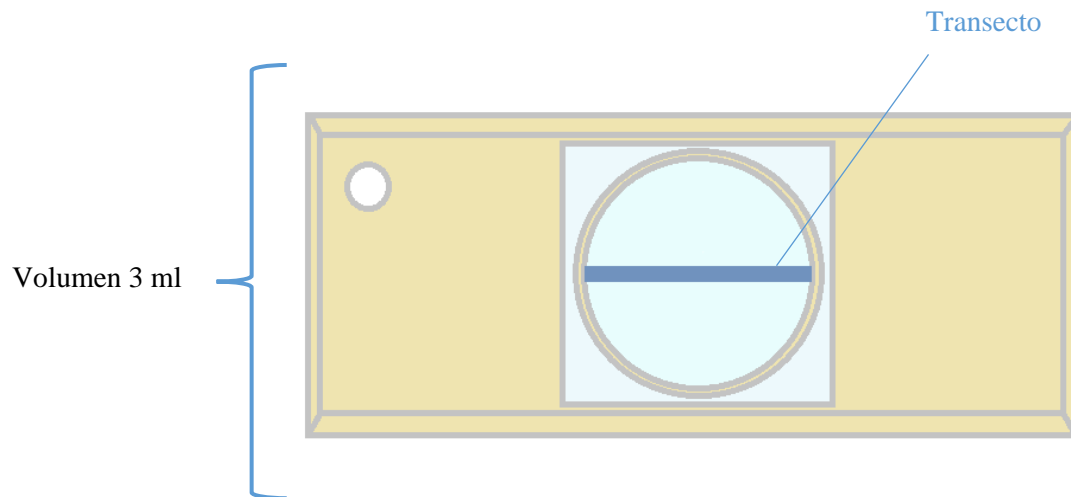


Figura 28. Forma de medición con respecto a los recuentos - transecto lineal clásico.

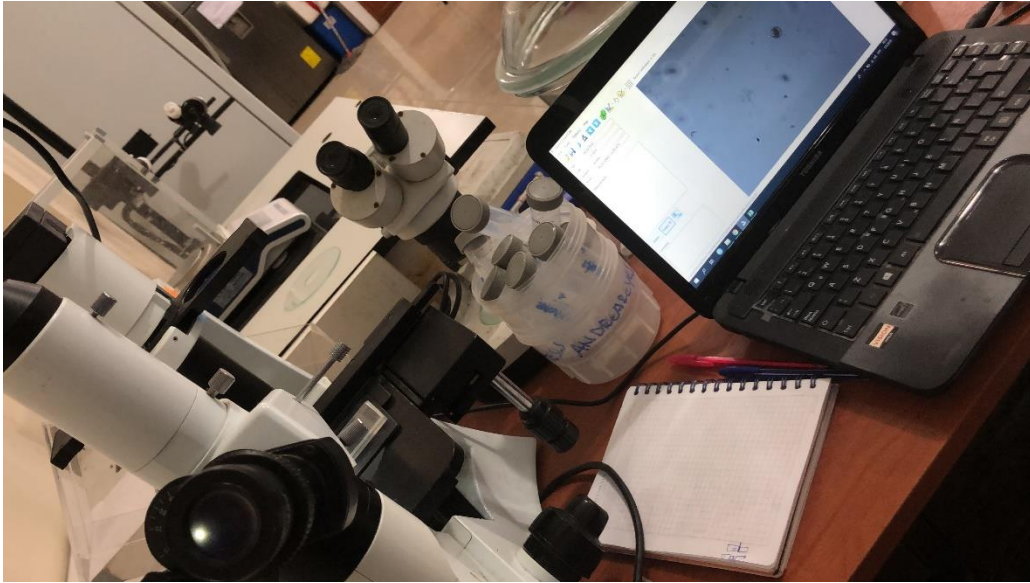


Figura 29. Mediciones del tamaño dorsoventral y ancho de células escogidas por medio del programa Optika Vision Lite.

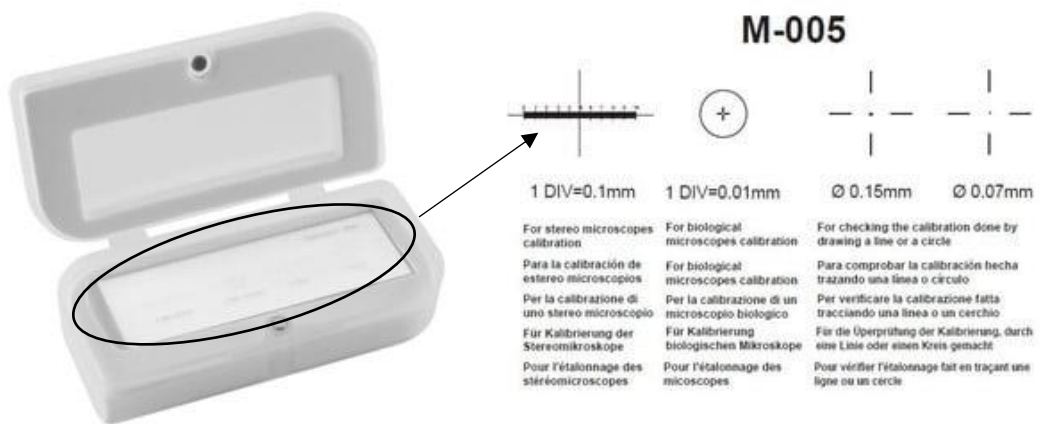


Figura 30. Portaobjetos micrométrico para calibrar el microscopio con la cámara integrada.

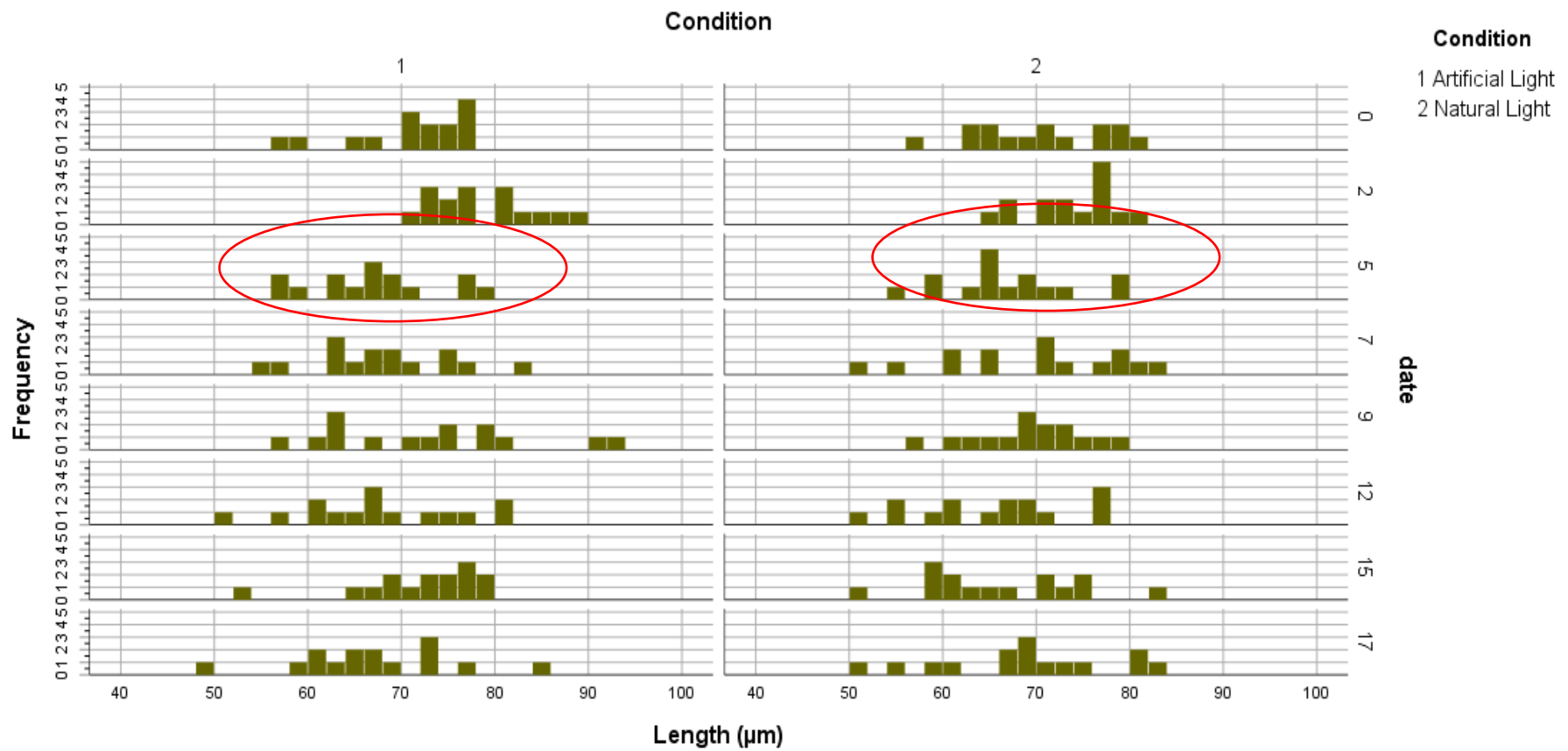


Figura 31. Distribución frecuencial del largo de las células para ambas condiciones a lo largo del tiempo

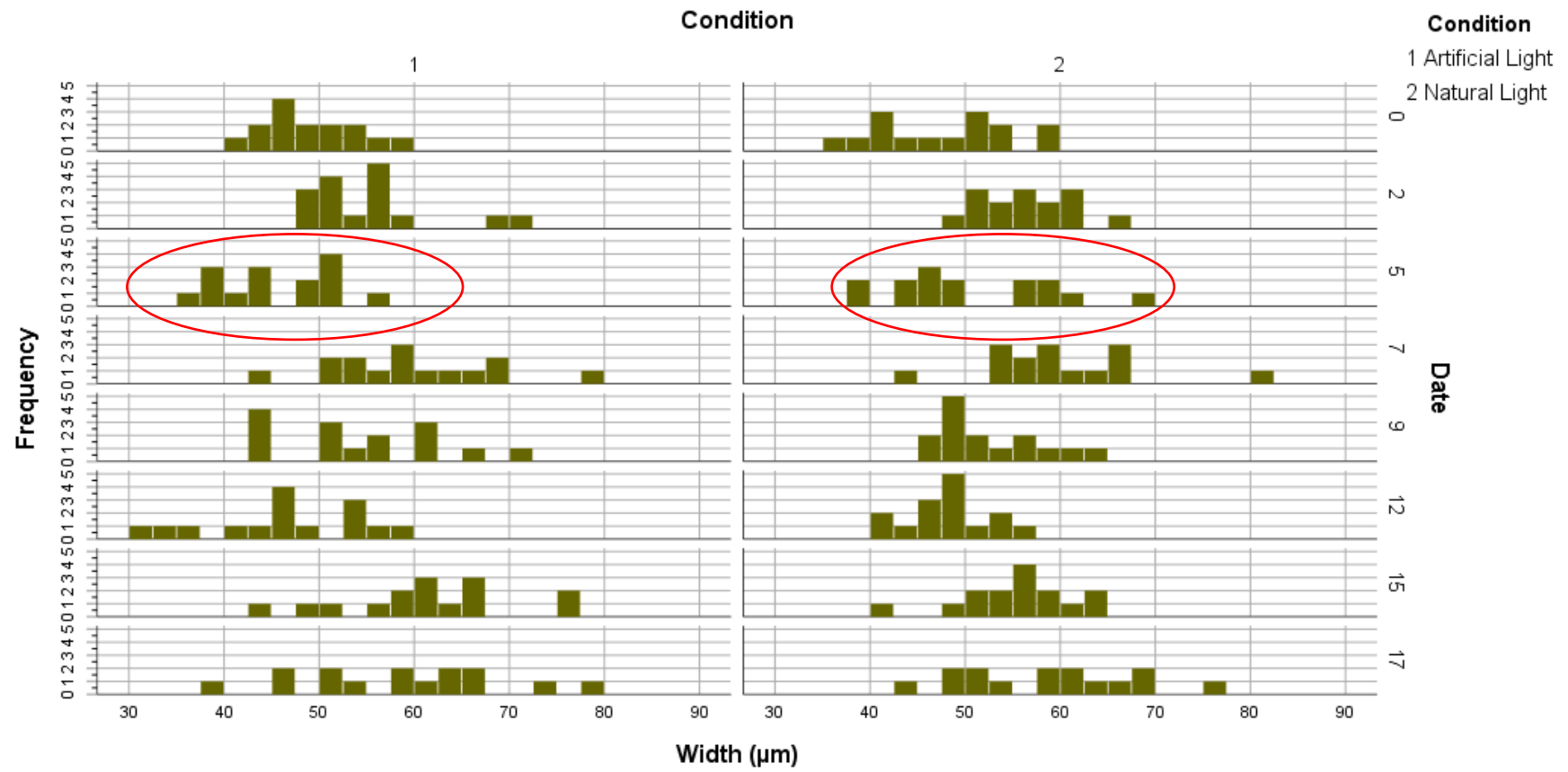


Figura 32. Distribución frecuencial del ancho de las células para ambas condiciones a lo largo del tiempo.