

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE VALPARAISO  
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES  
ESCUELA DE CIENCIAS DEL MAR

“Evaluación de la vida útil de floculados de *Nannochloropsis  
oculata* a distintas temperaturas de conservación”

Proyecto para optar al título de Ingeniero Acuicultor  
por  
Constanza Del Pilar Low Guerra

Valparaíso  
2012

**Comité de Titulación:**

**Profesor Guía : Dra. M<sup>a</sup> Isabel Toledo Donoso**

**Profesor : Dr. Gabriel Yany González**

**Profesor : Ing. Pesq. Tatiana Zúñiga Vicencio**

## **AUTORIZACIÓN DE USO**

Al presentar este proyecto como último requisito para la obtención del título de Ingeniero Acuicultor, autorizo a la biblioteca de la Escuela de Ciencias del Mar de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, para que disponga libremente de ella. Autorizo además reproducciones parciales o totales de este proyecto sólo con fines académicos.

---

Constanza del Pilar Low Guerra

## **DEDICATORIA**

*A mi madre Florencia por  
su amor y apoyo incondicional,  
gracias por siempre creer en mí.*

*A Manuel Fernández por  
su amor y apoyo incondicional,  
por ser siempre mi mejor amigo.*

## AGRADECIMIENTOS

Mis agradecimientos van dirigidos en especial a mi madre Florencia por que siempre dio todo por mí, por su apoyo incondicional en esta trayectoria universitaria y en la vida, a mi familia por su confianza en mí y sus consejos, a todos les agradezco principalmente por su infinita paciencia y sus palabras de aliento cada vez que fue necesario.

A Manuel Fernández quien me entregó su sabiduría e incondicional cariño, gracias por tu apoyo y compañía siempre. Agradezco a mis amigos con los que caminamos juntos este sendero, a Mical por su cariño y confianza, a Rino por su paciencia y humildad, a Felipe por sus locuras y consejos, a Claudia por su autenticidad y confianza.

Al laboratorio 204 en especial a Germán por ser acogedor y su gran sentido del humor a Javier por sus consejos y nuestros constantes desacuerdos, a Lorena y Alejandra por las risas y las largas conversaciones.

A los miembros del Comité de Tesis, gracias por guiar este proyecto. A mis profesoras guías, Dra. María Isabel Toledo e Ing. Pesq. Tatiana Zúñiga, por todo su conocimiento brindado, sus consejos y el empuje para lograr este trabajo. Al Dr. Gabriel Yany por sus consejos para mejorar este proyecto.

También deseo expresar mis agradecimientos a todos los integrantes de la Escuela Ciencias del Mar, profesores, secretarias, auxiliares y personal de la biblioteca, por tener siempre la mejor disposición para enseñar en distintos ámbito de la vida y por su dedicación para hacernos más simple cada día.

Finalmente agradezco a la Empresa COTACO, por facilitarme el agente floculante FLOCOTAC PLUS, sin el cual no habría podido desarrollar la presente investigación.

## CONTENIDO

|                                                                                           | Pág. |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Comité de titulación.....                                                                 | i    |
| Autorización de uso .....                                                                 | ii   |
| Dedicatoria.....                                                                          | iii  |
| Agradecimientos .....                                                                     | iv   |
| Contenido.....                                                                            | v    |
| Índice de tablas .....                                                                    | vii  |
| Índice de figuras.....                                                                    | viii |
| Índice de anexos.....                                                                     | ix   |
| Resumen.....                                                                              | x    |
| Abstract.....                                                                             | xi   |
| 1. Introducción .....                                                                     | 1    |
| 2. Objetivos.....                                                                         | 2    |
| 2.1. Objetivo general.....                                                                | 2    |
| 2.2. Objetivos específicos .....                                                          | 2    |
| 3. Antecedentes.....                                                                      | 3    |
| 3.1. Generales .....                                                                      | 3    |
| 3.2. De la especie ( <i>Nannochloropsis oculata</i> ).....                                | 3    |
| 3.3. Densidades de cultivo y tasas de crecimiento de <i>Nannochloropsis oculata</i> ..... | 4    |
| 3.4. Métodos de concentración de microalgas.....                                          | 5    |
| 3.4.1. Floculación.....                                                                   | 5    |
| 3.4.2. Centrifugación .....                                                               | 6    |
| 3.5. Almacenamiento y conservación de los floculados .....                                | 7    |
| 3.5.1. Temperatura y tiempo.....                                                          | 7    |
| 3.6. Evaluación de la vida útil de los floculados .....                                   | 8    |
| 3.6.1. Viabilidad celular.....                                                            | 8    |
| 3.6.2. Viabilidad de cultivo.....                                                         | 9    |
| 4. Materiales y métodos .....                                                             | 10   |

|        |                                                                       |    |
|--------|-----------------------------------------------------------------------|----|
| 4.1.   | Cultivo inicial de <i>Nannochloropsis oculata</i> .....               | 10 |
| 4.2.   | Floculación.....                                                      | 12 |
| 4.3.   | Métodos de conservación.....                                          | 13 |
| 4.4.   | Evaluación de la vida útil de los concentrados floculados .....       | 14 |
| 4.4.1. | Viabilidad celular.....                                               | 14 |
| 4.4.2. | Viabilidad de cultivo.....                                            | 15 |
| 4.4.3. | Cultivo control .....                                                 | 17 |
| 4.5.   | Métodos estadísticos empleados .....                                  | 17 |
| 4.5.1. | Análisis de varianza de un factor para la viabilidad de cultivo ..... | 17 |
| 4.5.2. | Análisis de varianza de un factor para tec entre grupos .....         | 18 |
| 4.5.3. | Análisis de varianza de un factor para tec y cultivo control.....     | 19 |
| 5.     | Resultados.....                                                       | 20 |
| 5.1.   | Floculación.....                                                      | 20 |
| 5.2.   | Vida útil de los concentrados.....                                    | 20 |
| 5.2.1. | Viabilidad de celular.....                                            | 20 |
| 5.2.2. | Viabilidad de cultivo.....                                            | 22 |
| 6.     | Discusión .....                                                       | 26 |
| 7.     | Conclusión .....                                                      | 28 |
| 8.     | Referencias.....                                                      | 29 |
| 9.     | Anexos .....                                                          | 33 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|                                                                                                                                                                                                                                                     | Pág. |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Tabla 1: Cultivo tradicional <i>versus</i> concentrados de microalgas. ....                                                                                                                                                                         | 3    |
| Tabla 2: Medio de cultivo F/2 de Guillard .....                                                                                                                                                                                                     | 10   |
| Tabla 3: Tasa media de crecimiento específico del cultivo inicial .....                                                                                                                                                                             | 17   |
| Tabla 4: Anova para determinar la influencia de las temperaturas de almacenamiento (-18, 0 y 5°C) en la viabilidad celular. ....                                                                                                                    | 21   |
| Tabla 5: Anova entre los grupos -18 y 0°C.....                                                                                                                                                                                                      | 21   |
| Tabla 6: Anova entre los grupos -18 y 5°C.....                                                                                                                                                                                                      | 21   |
| Tabla 7: Anova entre los grupos 0 y 5°C.....                                                                                                                                                                                                        | 21   |
| Tabla 8: Tasa media de crecimiento específico (promedio de 16 semanas) de los cultivos de los concentrados almacenados a 0 y 5°C.....                                                                                                               | 23   |
| Tabla 9: Anova para determinar la influencia de las temperaturas de almacenamiento en las tasas medias de crecimiento para un volumen de cultivo de 2 litros.....                                                                                   | 23   |
| Tabla 10: Anova para determinar la influencia de las temperaturas de almacenamiento en las tasas medias de crecimiento para un volumen de cultivo de 5 litros.....                                                                                  | 24   |
| Tabla 11: Anova para determinar la influencia de las temperaturas de almacenamiento en las tasas medias de crecimiento un volumen de cultivo de 20 litros.....                                                                                      | 24   |
| Tabla 12: Anova para determinar la influencia de las temperaturas de almacenamiento en la tasa media de crecimiento en los cultivos a partir de floculados refrigerados (0 y 5°C) de <i>N. oculata</i> para un volumen de cultivo de 2 litros ..... | 24   |
| Tabla 13: Anova para determinar la influencia de la floculación y almacenamiento en la tasa media de crecimiento en los cultivos a partir de floculados refrigerados de <i>N. oculata</i> para un volumen de cultivo de 5 litros. ....              | 25   |



## ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                    | Pág. |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Figura 1: Microalga <i>Nannochloropsis oculata</i> , vista desde un microscopio (Fuente: Center of Freshwater Biology, UNH, 2012).....                             | 4    |
| Figura 2: Etapas de la producción de microalgas .....                                                                                                              | 11   |
| Figura 3: Hemacitometro de Neubauer.....                                                                                                                           | 12   |
| Figura 4: Recipiente cónico, construido para realizar la floculación .....                                                                                         | 12   |
| Figura 5: Agregación y sedimentación de las células de microalgas por medio de la adición del floculante, lo que permite sedimentar en la base del recipiente..... | 13   |
| Figura 6: Diseño experimental de la evaluación de la viabilidad celular. ....                                                                                      | 15   |
| Figura 7: Diseño experimental de la evaluación de la viabilidad de cultivo .....                                                                                   | 16   |
| Figura 8: Porcentaje en el que las células concentradas mantienen su vida útil.....                                                                                | 22   |

## ÍNDICE DE ANEXOS

|                                                                                                     | Pág. |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Anexo I: Perfil de ácidos grasos de <i>Nannochloropsis oculata</i> .....                            | 33   |
| Anexo II: Conteo para determinar viabilidad celular para las muestras almacenadas a -18°C .....     | 34   |
| Anexo III: Conteo para determinar viabilidad celular para las muestras almacenadas a 0°C.....       | 35   |
| Anexo IV: Conteo para determinar viabilidad celular para las muestras almacenadas a 5°C.....        | 36   |
| Anexo V: Tasa específica de crecimiento de las células que poseen viabilidad de cultivo -18°C ..... | 37   |
| Anexo VI: Tasa específica de crecimiento de las células que poseen viabilidad de cultivo 0°C .....  | 38   |
| Anexo VII: Tasa específica de crecimiento de las células que poseen viabilidad de cultivo 5°C ..... | 39   |

## RESUMEN

Se evaluó la viabilidad celular y de cultivo de concentrados de microalga *Nannochloropsis oculata*, almacenada durante 16 semanas a -18, 0 y 5°C. El concentrado se obtuvo un cultivo de *N. oculata*, el cual se cosechó al inicio de la fase estacionaria de crecimiento mediante un proceso de floculación.

Como agente floculante se empleó FLOCOTAC PLUS, con el cual se logró una floculación del 90% de las microalgas suspendidas y el proceso químico no afectó el número de células vivas. El concentrado almacenado a -18° C experimentó un proceso de congelación lenta el cual deterioró las células y por ello redujo su viabilidad celular a 5 semanas (75%). Los concentrados almacenados a 0 y 5°C mostraron viabilidad celular superior al 97% al cabo de las 16 semanas. Se observó viabilidad de cultivo sólo en los concentrados almacenados a 0 y 5°C, los cuales mostraron tasas de crecimiento específico similares a las tasas del cultivo control.

Se concluye que es posible utilizar después de 16 semanas, floculados almacenados a 0 y 5° C como inóculo de cultivos masivos de *N. oculata* para alimento, aguas verdes y otros usos.

**Palabras clave:** *Nannochloropsis oculata*, vida útil, tasa de crecimiento, floculación, viabilidad celular, temperatura de almacenamiento.

## ABSTRACT

Cell viability was assessed and culture microalgae concentrates *Nannochloropsis oculata*, stored for 16 weeks at -18, 0 and 5 ° C. The concentrate was obtained a culture of *N. oculata*, which was harvested at the beginning of the stationary phase of growth by a flocculation process.

Was used as flocculating agent FLOCOTAC PLUS, which was achieved with 90% flocculation of suspended microalgae and chemical process did not affect the number of living cells. The concentrate stored at -18 ° C experienced a slow freezing process which cells deteriorated and thus reduced cell viability at 5 weeks (75%). The concentrates stored at 0 to 5 ° C showed cell viability above 97% after 16 weeks. Culture viability was observed only in the concentrates stored at 0 to 5 ° C, which showed higher specific growth rates similar to control culture.

The conclusion that can be used after 16 weeks, flocculated stored at 0 to 5 ° C as inoculum massive crop *N. oculata* for food, green water and other uses.

**Keywords:** *Nannochloropsis oculata*, lifespan, growth rate, flocculation, cell viability, storage temperature.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las microalgas son necesarias para la nutrición de larvas y adultos de bivalvos, larvas de otros moluscos, crustáceos, peces o presas vivas utilizadas en el cultivo como rotíferos y artemia (Beacker, 2006, Ponis *et al.*, 2006, Holme *et al.*, 2009). En la actualidad, la industria acuícola considera como un aspecto importante el componente nutricional del alimento vivo (microalgas y zooplankton), ya que representa parte importante de la cadena alimenticia para la producción de peces, moluscos y crustáceos. La producción de zooplankton y microalgas a gran escala resulta dificultosa, ya que el medio para su cultivo debe cubrir todos los requerimientos nutricionales que permitan la composición química óptima del alimento vivo (Torres *et al.*, 2008).

El cultivo de microalgas frescas es una limitante en la industria de la acuicultura cuando se refiere a la disponibilidad del alimento. Es por esto que se recomienda evaluar suplementos de microalgas frescas que sean rentables y que simplifiquen los procedimientos de cultivo de larvas, como los concentrados de microalgas (D'souza *et al.*, 2002).

Suplementos a partir de concentrados de microalgas por floculación o centrifugación pueden ser una buena alternativa y parecen tener un alto potencial como reemplazo del alimento fresco (Mc Causland *et al.*, 1999, Heasman *et al.*, 2000, Brown *et al.*, 2001, Heasman *et al.*, 2001, Knuckey *et al.*, 2006). Las microalgas frescas podrían ser sustituidas en un 80% con concentrados elaborados por floculación y almacenados durante un máximo de 20 días (Brown *et al.*, 2001).

El uso inminente de concentrados de microalgas como un componente dietético principal de la alimentación de organismos acuáticos ha sido demostrado por varios autores en juveniles de *Pecten fumatus*, larvas y juveniles de ostras *Crassostrea gigas* (Brown y Robert, 2002 y Knuckey *et al.*, 2006).

Heasman *et al.*, (2001) y Brown *et al.*, (2003) sugieren que almacenar los concentrados de microalgas a bajas temperaturas, en refrigeradores domésticos que se encuentren disponibles en los centros de cultivos, podrían extender su vida útil. Por lo anterior este trabajo propone evaluar las temperaturas de almacenamiento para concentrados de la microalga *Nannochloropsis oculata*, con el fin de prolongar la vida útil, para que estos se utilicen tanto como alimento para la producción de organismos acuáticos, como inóculos de cultivo.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1.Objetivo general**

Evaluar la vida útil de concentrados floculados de la microalga *Nannochloropsis oculata*, a distintas temperaturas.

### **2.2.Objetivos específicos**

- Producir un concentrado de *Nannochloropsis oculata*, mediante un proceso de floculación
- Evaluar la viabilidad celular y la viabilidad de cultivo de concentrados floculados de *Nannochloropsis oculata*, almacenados por 16 semanas a -18, 0 y 5 °C .

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1. Generales

Se debe tener especial cuidado si el cultivo de microalgas se infecta con organismos patógenos o si los sistemas empleados fallan, si esto ocurre puede generar la escasez de alimentos para diversas especies acuícolas mantenidas en *hatcheries*. Por esto, se requieren instalaciones y equipos especializados para escalar los cultivos y así evitar la contaminación y pérdida de microalgas. Estos equipos incluyen estanterías que se instalan en una sala especial con una alta iluminación para la inoculación, la esterilización se realiza utilizando métodos físicos (filtración, esterilización en autoclave, pasteurización, la radiación UV) o químicos (cloro, la acidificación, la ozonización) (Jones *et al.*, 1993, Cysewski y Lorenz, 2006). Además, el cultivo de microalgas tradicional requiere de personal especializado, una gran disponibilidad de espacio y otros requerimientos que lo hacen más dificultoso (Tabla 1).

Tabla 1: Cultivo tradicional *versus* concentrados de microalgas.

| Ítems                                | Concentrados floculados | Cultivo tradicional | Referencia                                              |
|--------------------------------------|-------------------------|---------------------|---------------------------------------------------------|
| Disponibilidad de espacio            | <                       | >                   | Southgate, (2012), Heasman <i>et al.</i> , (2001)       |
| Mano de obra                         | <                       | >                   | Southgate, (2012), Heasman <i>et al.</i> , (2001)       |
| Materiales y equipos necesarios      | <                       | >                   | Cysewski y Lorenz, (2006), Jones <i>et al.</i> , (1993) |
| Riesgos de contaminación             | <                       | >                   | Cysewski y Lorenz, (2006), Jones <i>et al.</i> , (1993) |
| Crecimiento de organismos (Bivalvos) | <                       | >                   | Brown <i>et al.</i> , (1999)                            |

#### 3.2. De la especie (*Nannochloropsis oculata*)

La microalga *Nannochloropsis oculata* (Fig.1), es muy importante en acuicultura debido a su valor nutricional. Esta microalga pertenece a la clase Eustigmatophyceae, que agrupa a las especies que contienen la mayor cantidad de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), especialmente ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido araquidónico (ARA), docosahexaenoico (DHA) (Anexo I) de gran importancia en la nutrición de animales

marinos, especialmente en el crecimiento y desarrollo de larvas de peces, moluscos y crustáceos (Otero *et al.*, 1997, Brown *et al.*, 1999). Su cultivo es de origen Japonés y su tamaño varía de 2 a 3  $\mu\text{m}$  (Brown *et al.*, 1999). La microalga *N. oculata* ha sido sugerida como un alimento preferible para el rotífero *Brachionus plicatilis*, el cual transfiere eficientemente los ácidos grasos poliinsaturados de las microalgas a las larvas de peces marinos (Sukenik, *et al.*, 1993, Hoshida *et al.*, 2005).

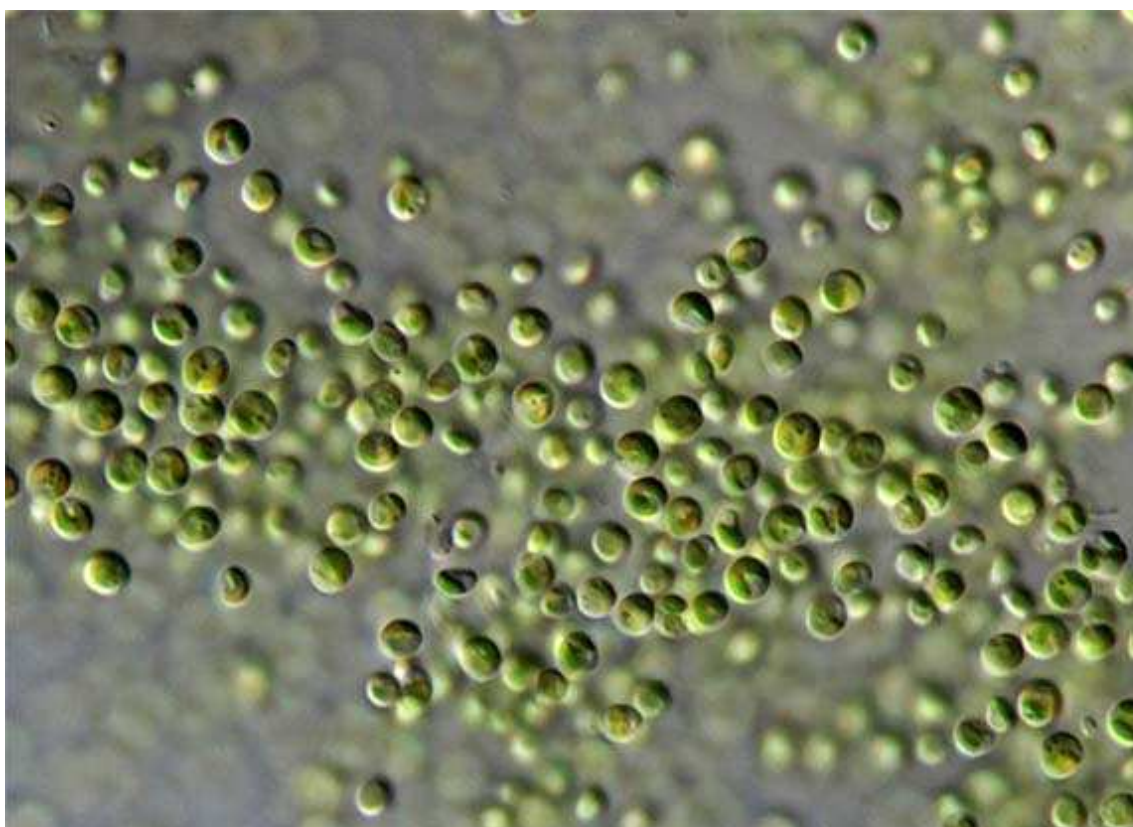


Figura 1: Microalga *Nannochloropsis oculata*, vista desde un microscopio (Fuente: Center of Freshwater Biology, UNH, 2012).

### **3.3. Densidades de cultivo y tasas de crecimiento de *Nannochloropsis oculata***

La microalga *N. oculata* es requerida principalmente para cultivo por su elevado contenido de aceites y su adaptación al cultivo masivo, por estas características su cultivo se realiza tanto para alimento como para la producción de biodiesel (Pérsico *et al.*, 2011). En estudios realizados por Brown *et al.*, (1999), los cultivos pueden alcanzar densidades de



cultivo de  $8 \times 10^6$  a  $20 \times 10^6$  cel/ml y tasas de crecimiento de 0,7 a  $1,13 \text{ día}^{-1}$  (López *et al*, 2007 y Sánchez *et al*, 2008).

### **3.4.Métodos de concentración de microalgas**

Si bien es cierto que, las microalgas son, difíciles de concentrar o separar por su pequeño tamaño, algunas cianobacterias por su tamaño, decantan espontáneamente o flotan y otras, en cambio, forman agregados, lo que facilita su decantación (Ruiz, 2011). En la búsqueda de cosechar y conservar microalgas en el tiempo, se han utilizado varios métodos de concentración de microalgas; uno de los más antiguos ha sido preservar las microalgas secas, sin embargo se ha considerado que nutricionalmente son inadecuadas para algunas especies (Heasman *et al*, 2001).

La elección del proceso más adecuado de concentración, dependerá del uso que se destine a la biomasa, costo o eficiencia del proceso (Castello, 1993). Actualmente las técnicas de cosecha se pueden dividir en cuatro categorías:

- Cosecha basada en la gravedad específica (centrifugación, sedimentación)
- Filtración
- Floculación química
- Electro-floculación

Sin embargo las técnicas más utilizadas y las que han mostrado más eficiencia en la recolección de microalgas son la floculación y la centrifugación (Heasman *et al*, 2001)

#### **3.4.1. Floculación**

La floculación es un procedimiento que elimina los sólidos en suspensión por medio de una reacción química y puede ser aplicado con éxito a las microalgas en suspensión. La floculación es la etapa de recolección masiva donde se agrega un floculante a las células con el fin de incrementar el tamaño de las partículas (Palomino *et al.*, 2010). Varios métodos de floculación han sido probados. Knuckey *et al.*, (2006) desarrollaron un proceso que implica el ajuste del pH entre 10 y 10,6 utilizando NaOH, seguido por la adición de un polímero no iónico, obteniendo una eficiencia de floculación mayor a un 80%, para una amplia gama de especies de microalgas. Por otra parte, después de la floculación, la mayoría de las células pierde su movilidad, Knuckey *et al.*, (2006) expone que después de

este proceso, es difícil volver a desglosar una sola célula, requisito indispensable para la alimentación de bivalvos.

Se usan como agentes floculantes, policationes en concentraciones entre 100-200 mg/l, ejemplo de ellos son: Al, Fe (OH)<sub>3</sub>, FeCl<sub>3</sub>, Al<sub>2</sub> (SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>, KAl (SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, Ca (OH)<sub>2</sub>. El problema que poseen muchos de estos policationes es la contaminación por aluminio, razón por la cual son más efectivos los polielectrolitos orgánicos: purifloc, magnifloc, primafloc en concentraciones de 2 a 5 mg/l que dan una mejor producción y calidad pero aumentan el costo del proceso (Castello, 1993). Una alternativa utilizada como floculante por Heasman *et al.*, (2001), es el quitosano el cual no es tóxico y ha sido utilizado para concentrar varias especies de microalgas.

El agente floculante utilizado en este estudio fue FLOCOTAC PLUS, polielectrolito cuya base química corresponde a una poliacrilamida aniónica. Este producto está autorizado para ser usado en tratamientos de agua potable, según Resolución N° 5393 del 17.07.1986 del Ministerio de Salud, lo que indica su baja toxicidad. Enrique Encalada<sup>1</sup> (Com. Pers. 2011), indicó que es recomendable utilizar el agente floculante (FLOCOTAC PLUS) por que es efectivo en bajas cantidades, lo que favorece su escasa bioacumulación en los floculados de microalgas, que luego serán utilizados como alimento de organismos marinos para consumo humano. Este agente floculante se encuentra disponible en el mercado local.

El método de floculación tiene ventajas por su simplicidad ya que utiliza materiales de fácil acceso, es rápido y bajo costo. Por otra parte, hay evidencia de un mayor crecimiento cuando se utiliza la floculación en lugar de centrifugación. Knuckey *et al.*, (2006) informaron que juveniles de *Crassostrea gigas* mostraron un mejor crecimiento cuando se alimentan con *T. pseudonana* con concentrados por floculación modificando el pH que con los concentrados obtenidos por centrifugación.

### 3.4.2. Centrifugación

La centrifugación es un procedimiento físico que permite la separación de partículas, bien sean células, orgánulos, moléculas, etc. Se basa en la diferencia de densidad entre las microalgas y el medio líquido, donde se extrae el 80-90% de las células en 2-5 minutos con una aceleración de 500 a 1000 rpm o más (Castello, 1993).

---

<sup>1</sup> Enrique Encalada Ingeniero Químico. Docente de la división de medio ambiente de DUOC UC

La centrifugación se ha aplicado con éxito para la preparación de los concentrados de microalgas con una sólida estructura externa, también puede reducir el número de bacterias presentes en el cultivo de microalgas, por lo tanto, mejorar el tiempo de almacenamiento del concentrado. Heasman *et al.*, (2001), indican en sus ensayos se logro concentrar más el 95% de células.

Sin embargo, existen algunas limitaciones, en primer lugar, el proceso consiste en exponer las células a altas fuerzas gravitacionales y cortantes que dañan la estructura celular. En segundo lugar, el procesamiento de grandes cantidades de cultivos puede llevar mucho tiempo y requiere de equipos costosos como una centrífuga continua especializada (Knuckey *et al.*, 2006, Parwadani 2011)

### **3.5.Almacenamiento y conservación de los floculados**

Una vez que el concentrado de microalgas se obtiene, se han utilizado varios métodos para preservar su calidad durante el almacenamiento, tales como la adición de aditivos y conservantes (Tzovenis *et al.*, 2004), la congelación (Heasman *et al.*, 2000) y la refrigeración (Nunes *et al.*, 2009). El concentrado de microalgas se puede conservar durante varios días, semanas o meses (Mc Causland *et al.*, 1999).

Desde el punto de vista de la conservación de concentrados de microalgas, se siguen dos criterios: el primero es la conservación de la biomasa inerte mediante liofilización y envasada al vacío y el segundo es la conservación de la biomasa viva en condiciones de oscuridad y refrigerados a bajas temperaturas (Guerra *et al.*, 2003, Lubián, 2010). La liofilización consiste en congelar el concentrado de microalgas y evaporar el agua por medio de condiciones de vacío. El segundo método solo consiste en almacenar refrigerada la pasta hasta ser utilizada. Con los métodos anteriores las microalgas pueden ser conservadas vivas, aunque generalmente el proceso de liofilización mata un porcentaje de células dependiendo de la especie (Castello, 1993, Guerra *et al.*, 2003, Lubián, 2010).

#### **3.5.1. Temperatura y tiempo**

La temperatura de almacenamiento se debe encontrar dentro la capacidad normal de operación de congeladores (doméstico o industriales) y refrigeradores que se encuentren a disposición de los centros de cultivos o laboratorios (Heasman *et al.*, 2001). La temperatura de almacenamiento de los concentrados esta basada en el estudio realizado por Brown *et al.*, (2003), los cuales sugieren que para extender la vida útil de los concentrados de microalgas estos deberían mantenerse refrigerados a bajas temperaturas, como por ejemplo entre 0 y 5° C.

Comercialmente existen empresas como ACUINUGA, la cual produce concentrados de microalgas al 18%, sugiriendo una temperatura de -20°C para mantenerlas congeladas durante un año y refrigeradas entre -2 y 4°C, durante 12 semanas. ALGAENERGY produce microalgas liofilizadas las que tienen una durabilidad mínima de dos años en un ambiente fresco y seco, la misma empresa produce una pasta de microalgas al 15% la cual solo posee 30 días de durabilidad al ser mantenidas a una temperatura de 4°C. Por otro lado MONZÓN BIOTECH S.L, genera concentrados secos de microalgas los cuales pueden ser guardados durante 3 meses entre -1 y +3 °C, si se congela pueden permanecer así 2 años.

### **3.6.Evaluación de la vida útil de los floculados**

En el área alimenticia, se define vida útil como un período en el cual, (bajo circunstancias definidas), se produce una tolerable disminución de la calidad del producto. La calidad engloba muchos aspectos del alimento, como sus características físicas, químicas, microbiológicas, sensoriales, nutricionales y referentes a inocuidad. En el instante en que alguno de estos parámetros se considera como inaceptable el producto ha llegado al fin de su vida útil (CENABAST, 2011). Económicamente se define como el periodo durante el cual un bien se puede utilizar, hasta que por desgaste, no puede seguir siendo utilizado, para los fines que ha sido fabricado o adquirido (Bravo, 2004).

Al momento de determinar la vida útil en microalgas la tinción azul de Evans se ha utilizado para ayudar a determinar el número de células muertas de diversas especies de microalgas marinas. Su acción se diagnóstica a través de manchas de un azul profundo en la materia orgánica dentro de las células muertas. Por el contrario, la tinción es rechazada por las células vivas por acción de la membrana celular (Heasman *et al.*, 2001)

#### **3.6.1. Viabilidad celular**

La viabilidad celular se refiere a la proporción de células que sobreviven a alguna situación particular (Castillos, 2005). Se asume viabilidad celular en aquellas microalgas que muestran integridad de su pared celular, y cuentan con todas sus cualidades nutritivas.

La viabilidad celular esta compuesta por el potencial y la impermeabilidad de la membrana a ciertas sustancias fluorescentes, estos han sido utilizados como los principales indicadores del estado fisiológico de la membrana citoplasmática y de la viabilidad del microorganismo, respectivamente. Aunque las células de diferentes especies, pueden exhibir diferencias en la permeabilidad de la membrana, se cree que ciertas clases de compuestos, incluyendo compuestos orgánicos que tienen al menos dos cargas positivas y compuestos orgánicos cargados negativamente, son excluidos por membranas celulares

intactas. Al demostrarse la afinidad de estos compuestos por células, esto es considerado un indicador de muerte celular (Castillo, 2005).

La viabilidad celular ha sido demostrada por Heasman *et al*, (2001), donde adicionando aditivos (Vitamina C y glicerol frío) y manteniendo refrigeradas las microalgas obtuvieron una viabilidad celular de 85% y un almacenamiento máximo de 15 semana de *Skeletonema costatum*, mientras que para otras especies como *Isochrysis sp.* que mostro un 40% de viabilidad celular durante 6 semanas y 14% *Chaetoceros muelleri*, durante 2 semanas.

### **3.6.2. Viabilidad de cultivo**

La viabilidad de cultivo engloba la viabilidad celular, y se asume viabilidad de cultivo cuando las células además de mantener la integridad de su pared celular, éstas mantienen todas sus cualidades nutritivas, están vivas y son capaces de reproducirse. La reproducción celular en cultivo proporciona una evidencia inequívoca de viabilidad (Castillo, 2005).

#### 4. MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se realizó en el Laboratorio Experimental de Acuicultura (LEDA) de la Escuela de Ciencias del Mar de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, durante el periodo de Enero-Junio de 2012.

##### 4.1. Cultivo inicial de *Nannochloropsis oculata*

El cultivo de *Nannochloropsis oculata* se realizó de acuerdo a lo recomendado por Helm *et al.*, (2006), como medio fertilizante se utilizó el medio Guillard f/2 (Tabla 2)

Tabla 2: Medio de cultivo F/2 de Guillard

| <b>Nutrientes</b>                                                       | <b>Cantidad</b>     |
|-------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| <i>Macronutrientes</i>                                                  |                     |
| Nitrato (NaNO <sub>3</sub> )                                            | 75,0 g/l            |
| Fosfato (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O)            | 5,0 g/l             |
| <i>Metales traza</i>                                                    |                     |
| Cloruro férrico(FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O)                   | 3,5 g por 900 ml    |
| EDTA de sodio (Na <sub>2</sub> EDTA)                                    | 4,36 g por 900 ml   |
| Sulfato de cobre (CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O)                 | 0,98 gr por 100 ml  |
| Sulfato de zinc (ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)                  | 2,20 gr por 100 ml  |
| Cloruro de cobalto (CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O)               | 1,00 gr por 100 ml  |
| Cloruro de manganeso (MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O)             | 18,00 gr por 100 ml |
| Molibdato de sodio(Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O) | 0,63 gr por 100 ml  |
| <i>Vitaminas</i>                                                        |                     |
| Biotina                                                                 | 1,0 mg              |
| B12                                                                     | 1,0 mg todo por l   |
| Tiamina HCl                                                             | 20 mg               |

Fuente: Helm *et al.*, (2006)

El cultivo se inició con un volumen de 2 litros con 250 ml de inoculo de *N. oculata*, cada 3 días se traspasó a volúmenes de 5, 20 y 80 litros de agua desinfectada con hipoclorito al 10% durante 24 horas, posteriormente se aplicó tiosulfato y el agua fue fertilizada con Guillard f/2 (Fig. 2). La temperatura utilizada durante todo el cultivo fue 18±2°C, con luz (4000 Lux aproximadamente) y aireación 24 horas (Helm *et al.*, 2006).

Los cultivos fueron cosechados al inicio de la etapa estacionaria de crecimiento cuando la densidad celular superó los  $4,55 \times 10^6$  cél/ml.

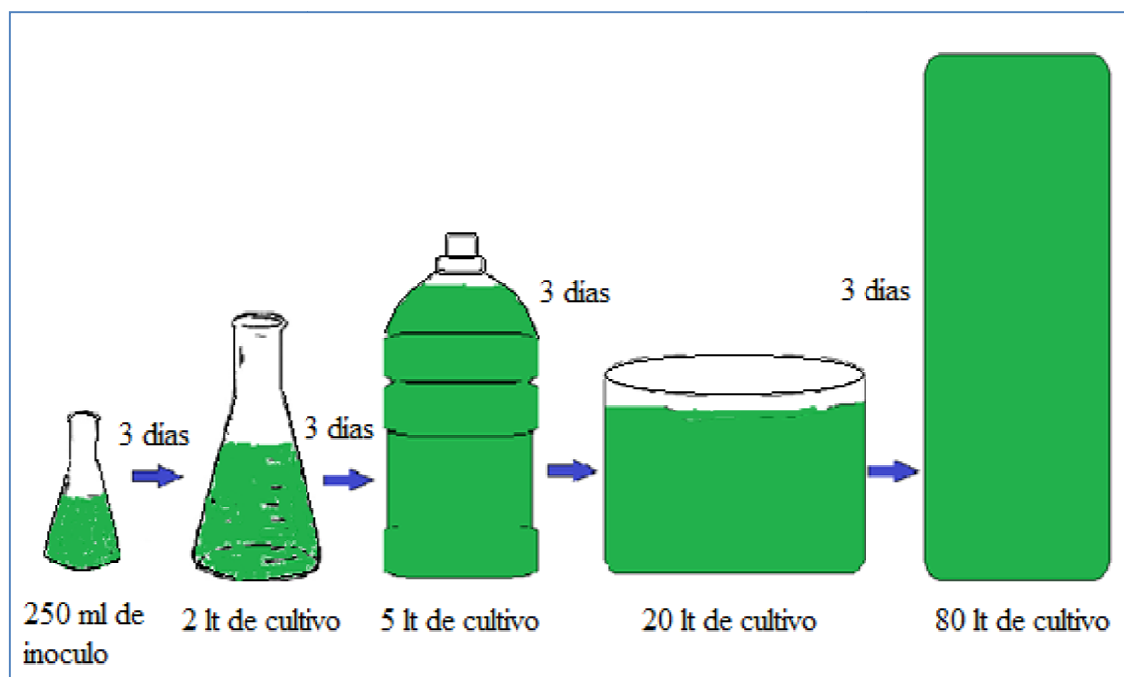


Figura 2: Etapas de la producción de microalgas

El recuento celular se realizó diariamente con un hemocitómetro Neubauer de 0.1 mm de profundidad (Fig. 3), a través de un microscopio. La tasa de crecimiento específica ( $N^{\circ}$  divisiones de las células/día) de este cultivo fue utilizada como tasa control para valuar los cultivos posteriores (viabilidad de cultivo), mediante la siguiente ecuación (Odum y Barrett, 2006):

$$TEC = \frac{\ln N_t - \ln N_o}{t} \quad (4.1.1)$$

Donde:

$\ln N_t$ : logaritmo natural del numero de células en el tiempo  $t$  (final)  
 $\ln N_o$ : logaritmo natural del numero de células al inicio (inoculación)  
 $t$ : el tiempo expresado en días de cultivo en cada volumen

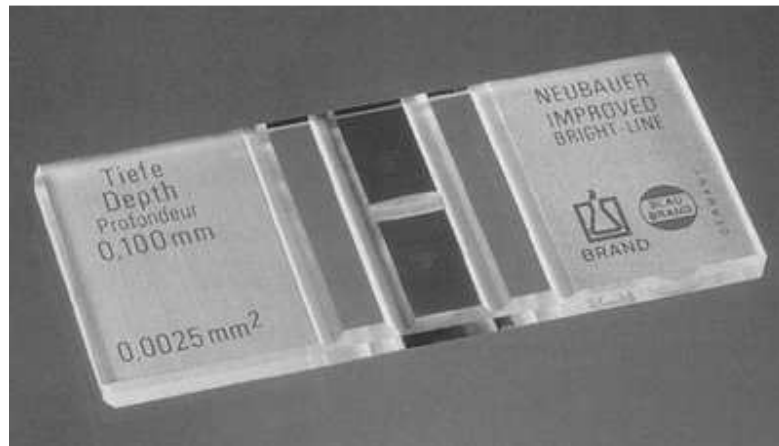


Figura 3: Hemacitómetro de Neubauer.

#### 4.2.Floculación

La floculación se llevó a cabo a través de la metodología modificada descrita por Brown *et al*, (2003) utilizando como agente floculante FLOCOTACPLUS. Una vez obtenido un cultivo que se encuentre al inicio de la fase estacionaria, se traspasaron 20 litros a una estructura cónica creada especialmente para facilitar el proceso de cosecha, esta estructura se construyó con la base de un asiento y un bidón de 20 litros modificado para tal proceso (Fig. 4).



Figura 4: Recipiente cónico, construido para realizar la floculación



Se ajustó el pH a 10.2 – 10.4 agregando NaOH 2N, se agitó vigorosamente, luego se adicionó una solución del polielectrolito (40 ml al 0,05% de FLOCOTAC PLUS). Después de 15 a 20 minutos, los floculados de microalga sedimentaron en la base del recipiente. El exceso de agua se extrae por la parte superior del recipiente, mientras que las células concentradas se vacían a un recipiente, en el cual se ajusta el pH hasta 7.0 con HCl 4N. Esta mezcla se deja reposar y se extrae el exceso de agua de la superficie (Fig.5).

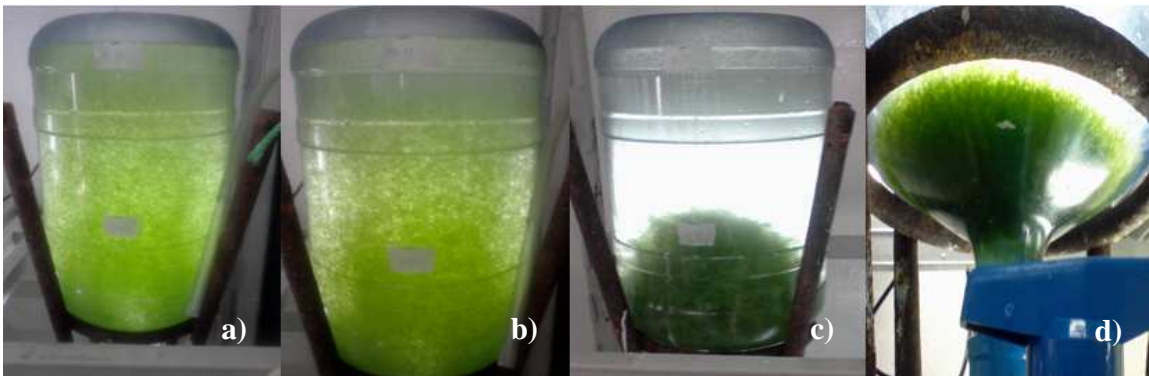


Figura 5: Agregación y sedimentación de las células de microalgas por medio de la adición del floculante, lo que permite sedimentar en la base del recipiente.  
a) Las células se agrupan formando flóculos. b) Los flóculos comienzan a decantar al fondo del recipiente. c) Los flóculos se han agrupado y sedimentado en el centro del recipiente. d) Sedimentación completa de los flóculos en el fondo del recipiente después de 15-20 minutos.

La eficiencia de la floculación se evaluó a través de la siguiente ecuación propuesta por Zuharlida *et al.*, (2009):

$$\text{Eficiencia floculación/cosecha (\%)} = \frac{C_i - C_f}{C_i} \times 100 \quad (4.2.1)$$

Donde

$C_i$ : Concentración de las células en suspensión antes del tratamiento

$C_f$ : Concentración final de las células en suspensión

#### 4.3.Métodos de conservación

La conservación de las muestras se realizó usando la congelación y la refrigeración, para los cuales se usaron distintas temperaturas, para la congelación se uso  $-18^{\circ}\text{C}$  y para la

refrigeración 0 y 5°C. Para el almacenamiento de las muestras se recolectó individualmente 60 muestras de 50 ml aproximadamente, utilizando envases plásticos, desinfectados con alcohol y rotulados, evitando la contaminación de los floculados. Se almacenaron 20 muestras por cada temperatura sin luz ni aireación, durante un periodo máximo de 16 semanas. Las muestras almacenadas a 0 y 5°C fueron conservadas en un refrigerador marca Whirlpool, en el cual mediante regulación se accedió a ambas temperaturas necesarias dentro de sus compartimientos. Las muestras almacenadas a -18°C fueron almacenadas directamente en un Freezer de 322 lts (Fensa modelo FFH 4450), el cual fue programado para mantener la temperatura necesaria.

#### **4.4. Evaluación de la vida útil de los concentrados floculados**

##### **4.4.1. Viabilidad celular**

La viabilidad celular de las microalgas floculadas se evaluó a través de un procedimiento de tinción con azul de Evans, descrito por Heasman *et al*, (2001) y Zuharlida *et al*, (2009). El cual consistió en extraer y homogenizar una muestra de cada uno de los floculados almacenados a las distintas temperatura. Luego se extrajo 1 ml que fue disuelto 10 veces con 9 ml de agua de mar filtrada en un tubo de ensayo; una vez homogenizados, se realizaron dos recuentos celulares con un hemacitómetro Neubauer de 0.1 mm de profundidad. Posteriormente, se realizó la tinción con 0,5 ml de la solución stock de azul de Evans (1%) a 10 ml de microalgas, se dejó durante 15-20 minutos a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo se realizaron dos recuentos celulares con un hemacitómetro Neubauer de 0.1 mm de profundidad, para observar las células muertas a través de un microscopio (Fig. 6).

Este procedimiento se realizó antes y después de la floculación y una vez por semana en las muestras almacenadas a cada una de las temperaturas hasta el final de la experiencia, evaluando las distintas temperaturas de almacenamiento.

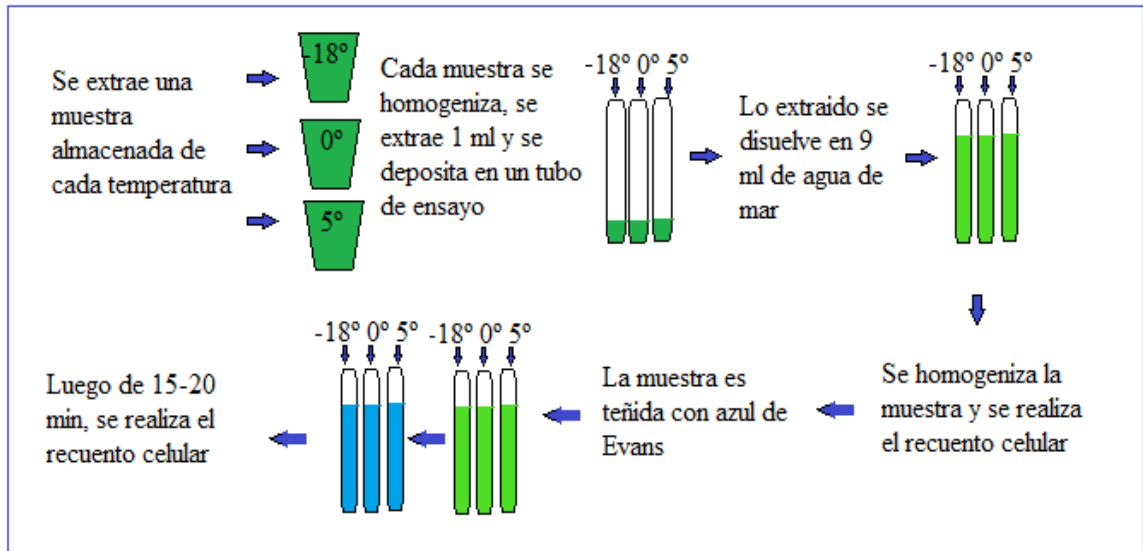


Figura 6: Diseño experimental de la evaluación de la viabilidad celular.

Las diluciones y recuentos celulares se realizaron a temperatura ambiente ( $15 \pm 2^\circ\text{C}$ ), para todas las muestras. Este método permite determinar el número de células muertas en cada muestra, el porcentaje de células viables se calculó a través de la ecuación propuesta por Zuharlida *et al*, (2009).

$$\text{Viabilidad celular (\%)} = \frac{\text{N}^\circ \text{CV}}{\text{N}^\circ \text{CT}} \times 100 \quad (4.4.1)$$

Donde:

CT: Células totales en la muestra

CV: Células viables, las que no son afectadas por la tinción

#### 4.4.2. Viabilidad de cultivo

Para evaluar la viabilidad de cultivo, una vez a la semana se extrajo una muestra de floculados almacenados de cada temperatura (-18, 0 y  $5^\circ\text{C}$ ). Éstas se utilizaron como inóculo iniciador en un cultivo en etapa de masivo. El inóculo se adiciono en un matraz de 2 litros de agua previamente fertilizada con Guillard f/2, el cual se mantuvo a  $19 \pm 1^\circ\text{C}$  con aireación y luz 24 horas. La re-suspensión de las microalgas floculadas, se desarrollo inicialmente mediante la agitación manual, seguida por una agitación a través de aireación. Se realizó un repique cada 3 días en volúmenes sucesivos de 5 y 20 litros, en los cuales se

ejecutó el recuento celular antes y después del repique, con un hemocitómetro Neubauer de 0.1 mm de profundidad (Fig. 7).

La viabilidad de cultivo de los floculados de microalgas floculadas se evaluó a través de la tasa específica de crecimiento (TEC) (N° divisiones de las células/día), mediante la ecuación de Odum y Barrett, (2006):

$$TEC = \frac{\ln N_t - \ln N_o}{t} \quad (4.1.1)$$

Donde:

$\ln N_t$ : logaritmo natural del número de células en el tiempo t (final)

$\ln N_o$ : logaritmo natural del número de células al inicio (inoculación)

t : el tiempo expresado en días de cultivo en cada volumen

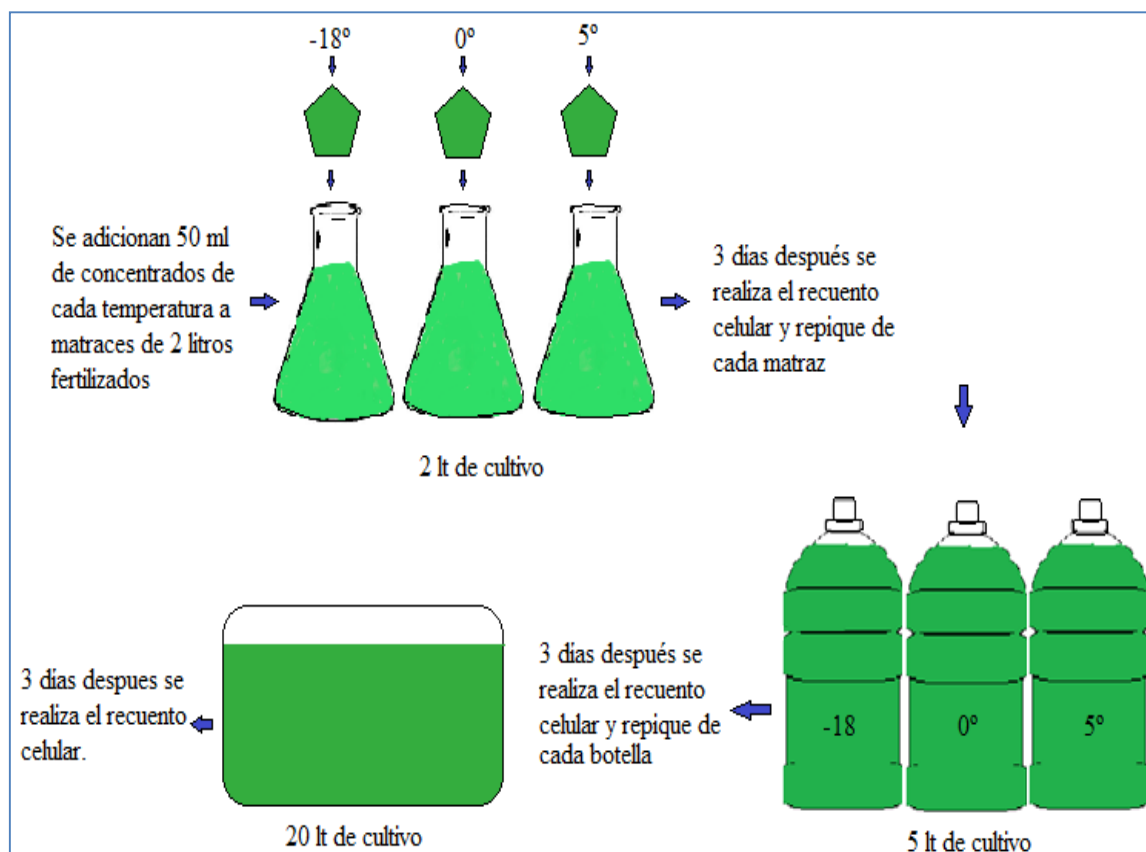


Figura 7: Diseño experimental de la evaluación de la viabilidad de cultivo

#### 4.4.3. Cultivo control

El cultivo masivo de *N. oculata*, utilizado como control, mostró una tasa de crecimiento específico para cada volumen de cultivo como se muestra en la Tabla 3. Las tasas medias de crecimiento obtenidas desde los cultivos realizados con concentrados flocculados, serán comparadas con la TEC del cultivo control.

Tabla 3: Tasa media de crecimiento específico del cultivo inicial

| Contenedor/ volumen (lt) | Promedio TEC  |
|--------------------------|---------------|
| Matraz (2)               | 0,593 ± 0,021 |
| Botella (5)              | 0,301 ± 0,014 |
| Caja plástica (20)       | 0,285 ± 0,032 |

La tasa de crecimiento promedio se expresa en n° de divisiones de célula/día

#### 4.5.Métodos estadísticos empleados

Se aplica el método estadístico de análisis de varianza donde se asumirán los siguientes supuestos:

- Los datos están normalmente distribuidos,
- Existe homogeneidad de varianzas,
- El error experimental está distribuido homogéneamente

##### 4.5.1. Análisis de varianza de un factor para la viabilidad de cultivo

Para determinar si existen diferencias significativas del número total de células viables entre las distintas temperaturas de almacenamiento (-18, 0 y 5°C), se realiza un análisis de varianza de un factor, donde la hipótesis (1) planteada es la siguiente:

H0: El número de células viables es igual para todas las temperaturas de almacenamiento.

H1: El número de células viables no es igual para todas las temperaturas de almacenamiento.

Si H0 es correcto, el estadístico F, sigue una distribución de probabilidad F de Fisher Snedocor con  $(t - 1)$   $(r - 1)$  y  $tr (n - 1)$  grados de libertad. Por esto fijado un nivel de significancia  $\alpha = 0,05$ , la regla de decisión del contraste de igualdad de medias es:

Rechazar H0 cuando  $F > F\alpha, (t - 1) (r - 1) \text{ y } tr (n - 1)$

Sí es rechazada la hipótesis (1), se busca determinar cual es la temperatura de almacenamiento que posee mayor influencia sobre la diferencia de células viables encontrada. Para ello, se realiza un análisis de varianza donde los resultados de la viabilidad celular de cada temperatura se comparan entre sí (-18-0° C, 0-5° C y -18-5° C). Si existen existe diferencia significativa, entre las temperaturas de almacenamiento se deduce cual es el grupo tiene mayor influencia.

#### **4.5.2. Análisis de varianza de un factor para TEC entre grupos**

Para determinar si existen diferencias significativas en las tasas medias de crecimiento específico de los cultivos a partir de floculados congelados a -18°C y los refrigerados a 0 y 5°C, se desarrolla un análisis de varianza de un factor, donde la hipótesis (2) planteada es la siguiente:

H0: Las tasas medias específicas de crecimiento de las distintas temperaturas son iguales para un mismo volumen de cultivo

H1: Las tasas medias específicas de crecimiento de las distintas temperaturas no son iguales para un mismo volumen de cultivo

Si H0 es correcto, el estadístico F, sigue una distribución de probabilidad F de Fisher Snedocor con  $(t - 1)$   $(r - 1)$  y  $tr (n - 1)$  grados de libertad. Por esto fijado un nivel de significancia  $\alpha = 0,05$ , la regla de decisión del contraste de igualdad de medias es:

Rechazar H0 cuando  $F > F\alpha, (t - 1) (r - 1) \text{ y } tr (n - 1)$

### 4.5.3. Análisis de varianza de un factor para TEC y cultivo control

Para determinar si existen diferencias significativas entre las tasas medias de crecimiento específico del cultivo control y de los cultivos a partir de concentrados de microalgas congelados a  $-18^{\circ}\text{C}$  y los refrigerados a  $0$  y  $5^{\circ}\text{C}$ , se desarrolla un análisis de varianza de un factor, donde la hipótesis (3) planteada es la siguiente:

$H_0$ : Las tasas medias específicas de crecimiento del cultivo control y de cultivos a partir de concentrados flocculados de microalgas almacenados a distintas temperatura son iguales.

$H_0$ : Las tasas medias específicas de crecimiento del cultivo control y de cultivos a partir de concentrados flocculados de microalgas almacenados a distintas temperatura no son iguales.

Si  $H_0$  es correcto, el estadístico  $F$ , sigue una distribución de probabilidad  $F$  de Fisher Snedocor con  $(t - 1)$   $(r - 1)$  y  $tr (n - 1)$  grados de libertad. Por esto fijado un nivel de significancia  $\alpha = 0,05$ , la regla de decisión del contraste de igualdad de medias es:

Rechazar  $H_0$  cuando  $F > F_{\alpha, (t - 1) (r - 1) \text{ y } tr (n - 1)}$

## 5. RESULTADOS

### 5.1.Floculación

Se cosecharon dos bolsas de 80 litros de cultivo de *N. oculata* con una concentración aproximada de  $4,55 \times 10^6$  (cél/ml) los cuales fueron denominados C1=cultivo bolsa 1; C2=cultivo bolsa 2. Los volúmenes cosechados se redujeron 14 veces en relación a su volumen original.

Se observó a través del microscopio, que los cultivos producidos fueron cosechados sin contaminación visible, donde la eficiencia del proceso de floculación fue:

C1: 90,2%

C2: 91,9%

A través del procedimiento de tinción pre y post-floculación, se cuantificaron los daños en la célula, en el cual se obtuvo que los cultivos (C1 y C2) no mostraran células manchadas o teñidas, los concentrados obtenidos después del proceso de floculación no mostraron células manchadas o teñidas.

### 5.2.Vida útil de los concentrados

#### 5.2.1. Viabilidad de celular

A través de un análisis de varianza (Tabla 4), con un nivel de significancia del 95%, se determinó que existen diferencias significativas al analizar conjuntamente todas las temperaturas, por lo tanto la hipótesis (1) de nulidad se rechaza. El resultado estadístico indica que el grupo que presenta mayor diferencia estadística, corresponde al almacenado a  $-18^{\circ}\text{C}$ . Mientras que el análisis de varianza, de los resultados de los floculados almacenados a  $0$  y  $5^{\circ}\text{C}$ , muestra que no existen diferencias significativas entre las células viables de ambos grupos. (Tablas 5, 6 y 7).



Tabla 4: Anova para determinar la influencia de las temperaturas de almacenamiento (-18, 0 y 5°C) en la viabilidad celular.

Análisis de varianza

| F. de variación      | SS      | Gl | MS      | Fc    | P       | Ft    |
|----------------------|---------|----|---------|-------|---------|-------|
| Entre grupos         | 4,5E+14 | 2  | 2,2E+14 | 9,864 | 0,00025 | 3,190 |
| Dentro de los grupos | 1,1E+15 | 48 | 2,3E+13 |       |         |       |
| Total                | 1,5E+15 | 50 |         |       |         |       |

Tabla 5: Anova entre los grupos -18 y 0°C

Análisis de varianza

| F. de variación      | SS      | Gl | MS      | Fc     | P      | Ft    |
|----------------------|---------|----|---------|--------|--------|-------|
| Entre grupos         | 3,1E+14 | 1  | 3,1E+14 | 12,551 | 0,0012 | 4,149 |
| Dentro de los grupos | 8,1E+14 | 32 | 2,5E+13 |        |        |       |
| Total                | 1,1E+15 | 33 |         |        |        |       |

Tabla 6: Anova entre los grupos -18 y 5°C

Análisis de varianza

| F. de variación      | SS      | Gl | MS      | Fc     | P       | Ft    |
|----------------------|---------|----|---------|--------|---------|-------|
| Entre grupos         | 3,6E+14 | 1  | 3,6E+14 | 13,429 | 0,00088 | 4,149 |
| Dentro de los grupos | 8,7E+14 | 32 | 2,7E+13 |        |         |       |
| Total                | 1,2E+15 | 33 |         |        |         |       |

Tabla 7: Anova entre los grupos 0 y 5°C

Análisis de varianza

| F. de variación      | SS      | Gl | MS      | Fc    | P     | Ft    |
|----------------------|---------|----|---------|-------|-------|-------|
| Entre grupos         | 1,5E+12 | 1  | 1,5E+12 | 0,091 | 0,764 | 4,149 |
| Dentro de los grupos | 5,4E+14 | 32 | 1,6E+13 |       |       |       |
| Total                | 5,4E+14 | 33 |         |       |       |       |

Las células almacenadas a  $-18^{\circ}\text{C}$  (Anexo II) mostraron viabilidad celular hasta la semana 5, la cual se mantuvo superior al 75%. Desde la semana 6 a la 10 la viabilidad celular promedio para esta temperatura fue cercana al 50% mientras que desde la semana 12 a la 16, la viabilidad celular promedio fue cercana al 10% (Fig. 7).

Las muestras almacenadas a  $0$  y  $5^{\circ}\text{C}$  (Anexos III - IV) muestran menos de un 3% de descenso en el total de células viables en el tiempo, obteniendo durante todo el período de estudio (16 semanas) sobre 97,5% de viabilidad celular (Fig.7).

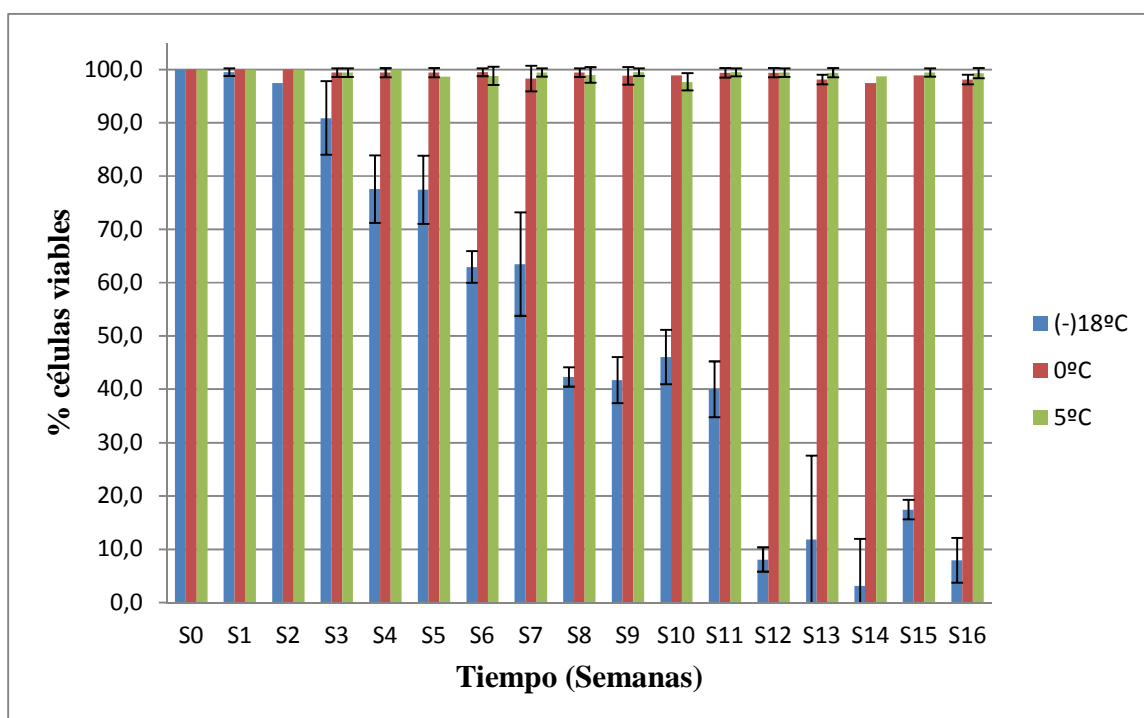


Figura 8: Porcentaje en el que las células concentradas mantienen su vida útil.

### 5.2.2. Viabilidad de cultivo

#### Tasa específica de crecimiento

Los cultivos realizados a partir de los floculados almacenados a  $-18^{\circ}\text{C}$  no mostraron viabilidad de cultivo mas allá de tres semanas en las que el cultivo reveló crecimiento, los cuales mostraron tasas de crecimiento de 0,23, 0,15 y 0,25 respectivamente, solo en matraces de 2 litros (Anexo V). Como consecuencia de lo anterior no se realizó el análisis

estadístico de las TEC en las muestras almacenadas a -18°C. Los cultivos realizados a partir de los concentrados floculados de *N. oculata* de los grupos almacenados a 0 y 5°C mostraron viabilidad de cultivo (Anexos VI - VII), mostraron una tasa de crecimiento específico fluctuó entre 0,265 y 0,622 N° de divisiones de células /día, durante 16 semanas dependiendo del volumen y temperatura de cultivo (Tabla 8).

Tabla 8: Tasa media de crecimiento específico (promedio de 16 semanas) de los cultivos de los concentrados almacenados a 0 y 5°C

| Volumen   | Grupos | Promedio TEC  |
|-----------|--------|---------------|
| Matraz    | 0°C    | 0,622 ± 0,016 |
| 2 litros  | 5°C    | 0,588 ± 0,015 |
| Botella   | 0°C    | 0,300 ± 0,005 |
| 5 litros  | 5°C    | 0,283 ± 0,003 |
| Masivo    | 0°C    | 0,265 ± 0,004 |
| 20 litros | 5°C    | 0,280 ± 0,006 |

La tasa de crecimiento promedio se expresa en n° de divisiones de célula/día

No existe diferencia significativa, a un nivel de confianza del 95% (Tabla 9,10 y 11), entre las tasas de crecimiento de los cultivos a partir de floculados de microalgas almacenados a 0 y 5° C, evaluando los distintos volúmenes de cultivo (2, 5 y 20 l), por lo anterior la hipótesis (2) de nulidad se acepta.

Tabla 9: Anova para determinar la influencia de las temperaturas de almacenamiento en las tasas medias de crecimiento para un volumen de cultivo de 2 litros.

Análisis de varianza (volumen: 2 L)

| F. de variación      | SS     | Gl | MS     | Fc     | P      | Ft     |
|----------------------|--------|----|--------|--------|--------|--------|
| Entre grupos         | 0,0087 | 1  | 0,0087 | 0,5595 | 0,4602 | 4,1708 |
| Dentro de los grupos | 0,4687 | 30 | 0,0156 |        |        |        |
| Total                | 0,4774 | 31 |        |        |        |        |

Tabla 10: Anova para determinar la influencia de las temperaturas de almacenamiento en las tasas medias de crecimiento para un volumen de cultivo de 5 litros.

Análisis de varianza (volumen: 5 L)

| F. de variación      | SS     | Gl | MS     | Fc     | P      | Ft     |
|----------------------|--------|----|--------|--------|--------|--------|
| Entre grupos         | 0,0021 | 1  | 0,0021 | 0,5552 | 0,4619 | 4,1708 |
| Dentro de los grupos | 0,1186 | 30 | 0,0039 |        |        |        |
| Total                | 0,1208 | 31 |        |        |        |        |

Tabla 11: Anova para determinar la influencia de las temperaturas de almacenamiento en las tasas medias de crecimiento un volumen de cultivo de 20 litros.

Análisis de varianza (volumen: 20 L)

| F. de variación      | SS     | Gl | MS     | Fc     | P      | Ft     |
|----------------------|--------|----|--------|--------|--------|--------|
| Entre grupos         | 0,0017 | 1  | 0,0017 | 0,3735 | 0,5456 | 4,1708 |
| Dentro de los grupos | 0,1425 | 30 | 0,0047 |        |        |        |
| Total                | 0,1443 | 31 |        |        |        |        |

A través del análisis de varianza (Tablas 12 y 13), con un nivel de confianza del 95% se determinó que no existe diferencia significativa entre las tasas medias de crecimiento específico del cultivo inicial y de los cultivos a partir de floculados refrigerados a 0 y 5°C, por lo tanto la hipótesis (3) de nulidad es aceptada.

Tabla 12: Anova para determinar la influencia de las temperaturas de almacenamiento en la tasa media de crecimiento en los cultivos a partir de floculados refrigerados (0 y 5°C) de *N. oculata* para un volumen de cultivo de 2 litros

Análisis de varianza (volumen 2L)

| F. de variación      | SS     | Gl | MS     | Fc     | P      | Ft     |
|----------------------|--------|----|--------|--------|--------|--------|
| Entre grupos         | 0,0092 | 2  | 0,0046 | 0,3242 | 0,7253 | 3,2849 |
| Dentro de los grupos | 0,4700 | 33 | 0,0142 |        |        |        |
| Total                | 0,4792 | 35 |        |        |        |        |

Tabla 13: Anova para determinar la influencia de la floculación y almacenamiento en la tasa media de crecimiento en los cultivos a partir de floculados refrigerados de *N. oculata* para un volumen de cultivo de 5 litros.

Análisis de varianza (volumen 5 L)

| F. de variación      | SS     | Gl | MS     | Fc     | P      | Ft     |
|----------------------|--------|----|--------|--------|--------|--------|
| Entre grupos         | 0,0024 | 2  | 0,0012 | 0,3435 | 0,7117 | 3,2849 |
| Dentro de los grupos | 0,1192 | 33 | 0,0036 |        |        |        |
| Total                | 0,1217 | 35 |        |        |        |        |

## 6. DISCUSIÓN

El cultivo inicial de *N. oculata* fue generado sin contaminación visible alcanzando  $4,55 \times 10^6$  cél/ml cosechados al inicio de la fase estacionaria de crecimiento, la concentración celular alcanzada está por debajo de la lograda en otros estudios por Brown *et al.*, (1999). La tasa de crecimiento alcanzada fue cercana al  $0,6 \text{ día}^{-1}$  un poco menor a la alcanzada por López *et al.*, (2007) y Sánchez *et al.*, (2008), cercana a  $0,7 \text{ día}^{-1}$ . Esta diferencia podría deberse a los medios de cultivo utilizados, la temperatura, intensidad de la luz, aporte de  $\text{CO}_2$ , los que generalmente suelen ser distintos en cada experiencia.

El método de floculación utilizado para la concentración de microalgas, se consideró exitoso al lograr concentrar sobre el 90% de las células suspendidas del cultivo inicial, superior a lo alcanzado por Knuckey *et al.*, (2006), quién solo logró concentrar el 80% de las células a través del mismo método pero usando como agente floculante cloruro férrico. Lo cual indica que FLOCTAC PLUS es un floculante apropiado para obtener altos porcentajes de floculación. Además, el floculante utilizado permitió la re-suspensión fácilmente a través de un proceso de agitación manual o mecánica, algo difícil de lograr para el proceso de floculación según lo mencionado por Knuckey *et al.*, (2006)

La conservación de los concentrados floculados se realizó utilizando los métodos de almacenamiento de refrigeración y congelación como lo sugieren Guerra *et al.*, (2003) y Lubián, (2010), este procedimiento no provocó contaminación visible al analizar los floculados a través de un microscopio. Las temperaturas utilizadas en este estudio se basaron en lo sugerido por Brown *et al.*, (2003). Las muestras almacenadas directamente a  $-18^\circ \text{C}$ , mostraron una corta vida útil esto podría deberse a que experimentaron un proceso de congelación lenta, lo que generó la debilidad y posterior ruptura de la pared celular al descongelar las muestras, lo cual se evidencia al ser evaluadas luego de un proceso de tinción en el tiempo.

La vida útil se demostró a través de la viabilidad celular y de la viabilidad de cultivo, en las muestras almacenadas a  $0$  y  $5^\circ \text{C}$ , ambos grupos mantuvieron la viabilidad celular sobre el 97% de las células totales por 16 semanas, siendo este resultado superior a lo obtenido por Heasman *et al.*, (2001) para varias especies de microalgas donde el almacenamiento máximo fue de 15 semanas y la viabilidad celular alcanzó el 85%, utilizando como agente floculante quitosano, además de aditivos y preservantes. Se demostró que el concentrado mantiene sus características y puede ser utilizado como alimento para algún organismo acuático o con el fin de producir futuros cultivos si fuesen necesarios, con ello se demuestra que se mantiene la vida útil como lo expresan Bravo, (2004) y CENABAST, (2011).

La viabilidad de cultivo para ambos grupos (0 y 5° C) se mantuvo por 16 semanas, sin mostrar diferencias significativas ( $p > 0,05$ ). Por lo tanto, es posible mantener concentrados de *N. oculata* refrigerados con el fin de producir futuros cultivos si fuese necesarios. Este resultado proporciona evidencia inequívoca de viabilidad como afirma Castillo, (2005) y con esto comprobar la continuidad de la vida útil por 16 semanas o más.

Las tasas específicas de crecimiento obtenidas de los cultivos que se realizaron a partir de concentrados floculados y refrigerados a 0 y 5°C, no mostraron diferencias significativas con las tasas específicas de crecimiento del cultivo control. Estos resultados indican que las TEC no se ven influenciadas por el proceso químico (floculación) ni por el proceso físico (refrigeración) al que se someten las células ya que las TEC son similares a las obtenidas por López *et al.*, (2007) y Sánchez *et al.*, (2008).

D'souza *et al.*, (2002), recomiendan evaluar la extensión de la vida útil de las microalgas a través de la concentración y refrigeración de microalgas, con el fin de simplificar otros cultivos. Mc Causland *et al.*, (1999), Heasman *et al.*, (2000), Brown *et al.*, (2001), Heasman *et al.*, (2001), Knuckey *et al.*, (2006), mencionan como una buena alternativa reemplazar el alimento fresco con concentrados de microalgas por floculación. Brown *et al.*, (2001) han demostrado que concentrados de microalgas pueden sustituir hasta en un 80% las microalgas frescas. Esto indica que los concentrados floculados almacenados a bajas temperaturas como 0 y 5°C que puedan extender su vida útil en varias semanas son aptos para ser utilizados como alimento para distintos organismos acuáticos, lo que en este estudio se puede extender por 16 semanas o más.

## 7. CONCLUSIÓN

El agente floculante FLOCOTAC PLUS al 0,05%, permite concentrar con éxito más del 90% de las células de los cultivos de *N. oculata*.

Los floculados almacenados a -18° C son viables durante 5 semanas de almacenamiento. Mientras que los floculados refrigerados a 0 y 5° C muestran viabilidad celular y viabilidad de cultivo hasta 16 semanas de conservación.

En consecuencia, es posible utilizar, después de 16 semanas floculados almacenados a 0 y 5° C como inóculo de cultivos masivos de *N. oculata* para alimento, aguas verdes y en otros usos en *hatchery* de cultivo de moluscos y larvas de peces.



## 8. REFERENCIAS

- ACUINUGA, 2008. Ficha técnica. Catálogo de productos, Fitoplancton, Nannochloropsis al 18% pp: 1 [En línea]. [Citado el: 10 de julio de 2012]. [http://www.acuinuga.com/00\\_plugins/docs.php?id=1269](http://www.acuinuga.com/00_plugins/docs.php?id=1269)
- ALGAENERGY, 2011. Catálogo de productos, Acuicultura, Nannochloropsis gaditana Premium 15%. pp: 1 [En línea]. [Citado el: 10 de julio de 2012]. <http://www.algaenergy.es/images/stories/pdfs/nanno%2015.pdf>
- Becker, W. 2006. Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. In A. Richmond (Ed.). The Nutritional Value of Micropalgae for Aquaculture. Cap 21. 380-391.
- Bravo, S. y Cueto, D. 2004. La visa útil de un activo y política de reemplazo de activos. Escuela de Administración de Negocios para graduados. ESAN. pp: 133-134.
- Brown M., Knuckey R. and Robert R. 2003. Microalgal concentrates prepared by flocculation are effective “off-the-shelf” hatchery diets for mollusks. *Aquafeed* 6: 12-14.
- Brown M., Knuckey R., Nalesso, R., Frampton, D., Blackburn, S and Hart P, 2001. Alternatives to live microalgae as hatchery feed: *Thraustochytrids* and algal concentrates. Larvi 2001 - Fish and Shellfish Larviculture Symposium. EAS Special Publication No.30: 90-93.
- Brown, M., Mular, M., Miller, I., Farmer, C. and Trenerry, C. 1999. The vitamin content of microalgae used in aquaculture. *Journal of Applied Phycology*, 11: 247-255.
- Brown, M. and Robert, R. 2002. Preparation and assessment of microalgal concentrates as feeds for larval and juvenile Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture* 207: 289-309.
- Castello, F. 1993. Acuicultura marina: Fundamentos biológicos y tecnología de la producción. Ed. Universitat de Barcelona pp: 734
- Castillo, J. 2005. Cartometría de flujo en la evaluación de potencial de membrana y viabilidad celular. Magister en Ciencias, pp 121. Universidad de Concepción. <http://www.citometriadeflujo.co.cl/pdf/pmementes.pdf>
- Center of Freshwater Biology, UNH, 2012. Phytoplankton. <http://cfb.unh.edu/phycokey/phycokey.htm>

- Central de Abastecimiento del Sistema Nacional de Servicios de Salud (CENABAST) Bases administrativas para la adquisición de productos requeridos en los programas alimentarios PNAC-PACAM. Resolución afecta n° 191. [En línea]. [Citado el: 10 de octubre de 2012].  
<http://www.cenabast.cl/descargables/CapturaDemandaAlimentos/pdf/191.PNAC-PACAM.pdf>
- Cysewski, G.R. and Lorenz, R.T. 2006. Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. In A. Richmond (Ed.), Industrial Production of Microalgal Cell-mass and Secondary Products – Species of High Potential. Cap 14. P 281-288.
- D'souza, F., Knuckey, R., Hohmann, S. and Pendrey, R.2002. Flocculated microalgae concentrates as diets for larvae of the tiger prawn *Penaeus monodon* (Fabricius). Aquaculture Nutrition. 8: 113–120.
- Guerra, A., Díaz, E., Polanco, E., Ledesma, F., Fernández, J., Trespalcios, J., Da Silva, J., Luna, L., Corral, M., Ruesga, S. e Iglesias, V. 2003. Impulso, desarrollo y potenciación de la Ostricultura en España. Tecnología, capítulo 4. Fundación Alonso Marín Escudero.
- Heasman, M., Sushames T., Diemar J., O'Connor, W. and Foulkes L. 2001. Production of Micro-algal Concentrates for Aquaculture Part 2: Development and Evaluation of Harvesting, Preservation, Storage and Feeding Technology. NSW Fisheries Final Report Series No. 34: 1440-3544.
- Heasman, M., Diemar, J., O'Connor, W., Sushames, T. and Foulkes, L.2000. Development of extended shelf-life micro-algae concentrate diets harvested by centrifugation for bivalve molluscs – a summary. Aquacult. Res. 31: 637-659.
- Helm, M., Bourne, N. y Lovatelli, A. 2006. Cultivo de bivalvos en criadero. Un manual práctico. FAO Documento Técnico de Pesca. No. 471. pp 184.
- Holme, M, Zeng, H. and Southgate, P. 2009. A review of recent progress toward development of a formulated microbound diet for mud crab, *Scylla serrata*, larvae and their nutritional requirements. Aquaculture. 286: 164-175.
- Hoshida, H., Ohira, T., Minematsu, A., Akada, R. and Nishizawa, Y. 2005. Accumulation of eicosapentaenoic acid in *Nannochloropsis sp.* in response to elevated CO2 concentrations. Journal of Applied Phycology. 17: 29-34.
- Jones, D., Kamarudin M. and Le Vay, L. 1993. The potential for replacement of live feeds in larval culture. J. World Aquacult. Soc. 24(2):199-210.

- Knuckey, R., Brown, M., Robert, R. and Frampton, D. 2006. Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds. *Aquacultural Engineering*. 35: 300-313.
- Loera-Quezada, M. y Olgún E. 2010. Las microalgas oleaginosas como fuente de biodiesel: retos y oportunidades. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal* 1, pp 91- 116.
- Lopéz, A., Müller, M. y Boccanfuso, J. 2007. Producción masiva de *Nannochloropsis oculata* en tanques exteriores. Años 2001-2003. Informe técnico Cultivo de peces: Cultivo del Lenguado. Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP). [En línea]. [Citado el: 25 de agosto de 2012]. <http://www.revistapuerto.com.ar/PDFBiologia/109.pdf>
- Lubían, L., 2010. Obtención de biomasa concentrada de microalgas marinas para su utilización como alimento larvario de especies marinas. Plan Nacional de Cultivos Marinos. Jacumar, pp 1-4 [En línea]. [Citado el: 31 de julio de 2012]. [http://www.magrama.gob.es/app/jacumar/planes\\_nacionales/Documentos/12 MICR OALGAS MARINAS.PDF](http://www.magrama.gob.es/app/jacumar/planes_nacionales/Documentos/12_MICROALGAS_MARINAS.PDF)
- Mc Causland, M., Brown, M., Barrett, S., Diemar, J. and Heasman, M., 1999. Evaluation of live and pasted microalgae as supplementary food for juvenile Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Aquacult. Res.* 174: 323-342.
- Molina E., Sánchez J., García F., Acién F., López D. and Segura C., 1994. Preservation of the marine microalga, *Isochrysis galbana*: influence on the fatty acid profile. *Aquaculture* 123: 377-385.
- MONZÓN BIOTECH S.L, 2010. Producción de *Nannochloropsis sp.* [En línea]. [Citado el: 10 de julio de 2012]. <http://mznbiotech.com/nannochloropsis-sp>
- Nunes, M., Pereira, A., Ferreira, J. and Yasumaru, F. 2009. Evaluation of the microalgae paste viability produced in a mollusk hatchery in Southern Brazil. *J. World Aquacult. Soc.* 40: 87-94.
- Odum E. y Barrett G., 2006. Fundamentos de ecología. Ed. Pág. 598
- Otero, A., García, D. and Fabregas, J. 1997. Factors controlling eico-sapentaenoic acid production in semicontinuous cultures of marine microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 9: 465-469
- Parwadani, L. 2011. The use of algae concentrates, dried algae and algal substitutes to feed bivalves. *Makara, Sains*, Vol. 15, No. 1. pp1-9

- Pésico, M, Moris, M, Tranier, E, Sanáis, A., Saubidet, A. and Beligni, M. 2011. Evaluación de un sistema exterior de cultivo masivo de la microalga marina *Nannochloropsis oculata*, en una zona templada oceánica de Argentina. Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal 2, pp 30-48
- Ponis, E., Probert, I., Véron, B., Le Coz, J., Mathieu, M. and Robert, R. 2006. Nutritional value of six *Pavlovophyceae* for *Crassostrea gigas* and *Pecten maximus* larvae Aquaculture 254: 544-553.
- Ruíz, A. 2011. Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente. Tesis para optar al Grado de Máster Universitario en Ingeniería Hidráulica y Medio Ambiente. Universidad Politécnica de Valencia. pp 91. [En línea]. [Citado el: 10 de octubre de 2012].  
<http://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/12831/Ruiz%20Martinez%20Ana%20-%20Tesina%20Fin%20Master%20-%202011.pdf?sequence=1>
- Sánchez, H., Jucscamaita, J., Vargas, J. y Oliveros, R. 2008. Producción de la microalga *Nannochloropsis oculata* (Droop) Hibberd en medios enriquecidos con ensilado biológico de pescado. Ecología Aplicada, 7:1,2
- Southgate, P. 2012. Aquaculture Farming Aquatic Animals And Plants. In Lucas and Southgate (Eds.), Feeds and Feed Production. Cap 9: 188-212.
- Sukenik, A., Zmorab, O. and Carmeli, Y. 1993. Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. II. *Nannochloropsis* sp. Aquaculture, 117: 313-326
- Tzovenis, I., G. Triantaphyllidis, X., Naihong, E., Chatzinikolaou, K. Papadopoulou, G., Xouri, G and Tafas, T. 2004. Cryopreservation of marine microalgae and potential toxicity of cryoprotectants to the primary steps of the aquacultural food chain. Aquaculture, 230: 457-473
- Zuharlida, H., Fatimah, Y., Mohd M., Mohamed, D. and Arbakariya A. 2009. Effect of different flocculants on the flocculation performance of microalgae, *Chaetoceros calcitrans*, cells. African Journal of Biotechnology Vol. 8 (21): 5971-5978

## 9. ANEXOS

Anexo I: Perfil de ácidos grasos de *Nannochloropsis oculata*

| <b>PERFIL NUTRICIONAL/ ANÁLISIS APROXIMADOS</b> |                                |          |
|-------------------------------------------------|--------------------------------|----------|
| <b>% por peso seco de alga</b>                  |                                |          |
| <b>Ácidos grasos</b>                            |                                | <b>%</b> |
| <b>C12:0</b>                                    | ácido laurico                  | 0,52     |
| <b>C14:0</b>                                    | ácido mistirico                | 4,43     |
| <b>C15:0</b>                                    | ácido pentadecanoico           | 0,50     |
| <b>C16:0</b>                                    | palmítico                      | 20,94    |
| <b>C16:1</b>                                    | ácido palmitoleico             | 22,24    |
| <b>C17:0</b>                                    | ácido heptadecanoico           | 0,23     |
| <b>C18:0</b>                                    | esteárico                      | 0,575    |
| <b>C18:1 9c</b>                                 | oleico                         | 5,20     |
| <b>C18:3n6</b>                                  | ácido linilénico               | 0,50     |
| <b>C18:3n3</b>                                  | linolénico                     | 4,23     |
| <b>C20:3n6 8,11,14c</b>                         | eicosatrienoico                | 0,55     |
| <b>C20:3n3</b>                                  | cis 8, 11,14 eicosatrienoico   | 0,20     |
| <b>C20:4n6</b>                                  | araquidónico                   | 6,03     |
| <b>C22:1n9</b>                                  | erucico                        | 0,04     |
| <b>C20:5n3 5,8,11,14,17c</b>                    | eicosapentanoico EPA           | 26,97    |
| <b>C22:6n3<br/>4,7,10,13,16,19c</b>             | ácido<br>docosaheptanoico(DHA) | 0,19     |

(Fuente: MONZÓN BIOTECH S.L, 2010)

Anexo II: Conteo para determinar viabilidad celular para las muestras almacenadas a -18°C

| <b>(-)18°C</b>      |      |       |      |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|---------------------|------|-------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Semana              | S0   | S1    | S2   | S3    | S4    | S5    | S6    | S7    | S8    | S9    | S10   | S11   | S12   | S13   | S14   | S15   | S16   |
| Conteo 1            | 81   | 102   | 74   | 48    | 81    | 79    | 82    | 87    | 74    | 86    | 72    | 64    | 63    | 66    | 61    | 76    | 50    |
| Conteo 2            | 86   | 99    | 83   | 95    | 75    | 76    | 61    | 102   | 82    | 77    | 67    | 71    | 61    | 69    | 67    | 79    | 51    |
| DS±                 | 3,53 | 2,12  | 6,36 | 33,23 | 4,24  | 2,12  | 14,85 | 10,61 | 5,66  | 6,36  | 3,54  | 4,95  | 1,41  | 2,12  | 4,24  | 2,12  | 0,71  |
| Promedio            | 83,5 | 100,5 | 78,5 | 71,5  | 78    | 77,5  | 71,5  | 94,5  | 78    | 81,5  | 69,5  | 67,5  | 62    | 67,5  | 64    | 77,5  | 50,5  |
| Cél/ml E+07         | 4,29 | 5,03  | 3,93 | 3,58  | 3,90  | 3,88  | 3,58  | 4,73  | 3,90  | 4,08  | 3,48  | 3,38  | 3,10  | 3,38  | 3,20  | 3,88  | 2,53  |
| Conteo teñidas 1    |      | 0     | 2    | 3     | 21    | 14    | 25    | 28    | 44    | 50    | 40    | 38    | 56    | 52    | 58    | 65    | 48    |
| Conteo teñidas 2    |      | 1     | 2    | 10    | 14    | 21    | 28    | 41    | 46    | 45    | 35    | 43    | 58    | 67    | 66    | 63    | 45    |
| Promedio            |      | 0,5   | 2    | 6,5   | 17,5  | 17,5  | 26,5  | 34,5  | 45    | 47,5  | 37,5  | 40,5  | 57    | 59,5  | 62    | 64    | 46,5  |
| Cél/ml teñidas E+07 | 0,00 | 0,025 | 0,1  | 0,325 | 0,875 | 0,875 | 1,33  | 1,73  | 2,25  | 2,38  | 1,88  | 2,03  | 2,85  | 2,98  | 3,10  | 3,20  | 2,33  |
| % Mortalidad        | 0,00 | 0,50  | 2,55 | 9,09  | 22,44 | 22,58 | 37,06 | 36,51 | 57,69 | 58,28 | 53,96 | 60,00 | 91,94 | 88,15 | 96,88 | 82,58 | 92,08 |

Anexo III: Conteo para determinar viabilidad celular para las muestras almacenadas a 0°C

| <b>0°C</b>          |      |       |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|---------------------|------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Semana              | S0   | S1    | S2   | S3   | S4   | S5   | S6   | S7   | S8   | S9   | S10  | S11  | S12  | S13  | S14  | S15  | S16  |
| Conteo1             | 81   | 104   | 101  | 86   | 77   | 79   | 92   | 88   | 81   | 89   | 93   | 78   | 78   | 78   | 82   | 93   | 86   |
| Conteo2             | 86   | 109   | 99   | 88   | 89   | 85   | 101  | 89   | 94   | 82   | 92   | 79   | 85   | 82   | 78   | 86   | 74   |
| DS±                 | 3,53 | 3,54  | 1,41 | 1,41 | 8,49 | 4,24 | 6,36 | 0,71 | 9,19 | 4,95 | 0,71 | 0,71 | 4,95 | 2,83 | 2,83 | 4,95 | 8,49 |
| Promedio            | 83,5 | 106,5 | 100  | 87   | 83   | 82   | 96,5 | 88,5 | 87,5 | 85,5 | 92,5 | 78,5 | 81,5 | 80   | 80   | 89,5 | 80   |
| Cél/ml E+07         | 4,29 | 5,33  | 5,00 | 4,35 | 4,15 | 4,10 | 4,83 | 4,43 | 4,38 | 4,28 | 4,63 | 3,93 | 4,08 | 4,00 | 4,00 | 4,48 | 4,00 |
| Conteo teñidas1     | 0    | 0     | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 3    | 0    | 2    | 1    | 0    | 1    | 1    | 2    | 1    | 2    |
| Conteo teñidas 2    | 0    | 0     | 0    | 0    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 0    | 2    | 2    | 1    | 1    |
| Promedio            | 0    | 0     | 0    | 0,5  | 0,5  | 0,5  | 0,5  | 1,5  | 0,5  | 1    | 1    | 0,5  | 0,5  | 1,5  | 2    | 1    | 1,5  |
| Cél/ml teñidas E+05 | 0,00 | 0,00  | 0,00 | 2,50 | 2,50 | 2,50 | 2,50 | 7,50 | 2,50 | 5,00 | 5,00 | 2,50 | 2,50 | 7,50 | 10,0 | 5,00 | 7,50 |
| % Mortalidad        | 0,00 | 0,00  | 0,00 | 0,57 | 0,60 | 0,61 | 0,52 | 1,69 | 0,57 | 1,17 | 1,08 | 0,64 | 0,61 | 1,88 | 2,50 | 1,12 | 1,88 |

Anexo IV: Conteo para determinar viabilidad celular para las muestras almacenadas a 5°C

| <b>5°C</b>          |      |       |      |       |      |      |      |      |      |      |       |      |      |      |      |       |      |
|---------------------|------|-------|------|-------|------|------|------|------|------|------|-------|------|------|------|------|-------|------|
| Semana              | S0   | S1    | S2   | S3    | S4   | S5   | S6   | S7   | S8   | S9   | S10   | S11  | S12  | S13  | S14  | S15   | S16  |
| Conteo 1            | 81   | 96    | 92   | 66    | 93   | 78   | 86   | 90   | 96   | 92   | 79    | 92   | 90   | 84   | 76   | 82    | 68   |
| Conteo 2            | 86   | 112   | 99   | 105   | 101  | 73   | 79   | 91   | 98   | 103  | 94    | 94   | 83   | 79   | 79   | 99    | 77   |
| DS±                 | 3,53 | 11,31 | 4,95 | 27,58 | 5,66 | 3,54 | 4,95 | 0,71 | 1,41 | 7,78 | 10,61 | 1,41 | 4,95 | 3,54 | 2,12 | 12,02 | 6,36 |
| Promedio            | 83,5 | 104   | 95,5 | 85,5  | 97   | 75,5 | 82,5 | 90,5 | 97   | 97,5 | 86,5  | 93   | 86,5 | 81,5 | 77,5 | 90,5  | 72,5 |
| Cél/ml E+07         | 4,29 | 5,20  | 4,78 | 4,28  | 4,85 | 3,78 | 4,13 | 4,53 | 4,85 | 4,88 | 4,33  | 4,65 | 4,33 | 4,08 | 3,88 | 4,53  | 3,63 |
| Conteo teñidas 1    | 0    | 0     | 0    | 0     | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | 3     | 1    | 1    | 0    | 1    | 0     | 0    |
| Conteo teñidas 2    | 0    | 0     | 0    | 1     | 0    | 1    | 2    | 1    | 2    | 1    | 1     | 0    | 0    | 1    | 1    | 1     | 1    |
| Promedio            | 0    | 0     | 0    | 0,5   | 0    | 1    | 1    | 0,5  | 1    | 0,5  | 2     | 0,5  | 0,5  | 0,5  | 1    | 0,5   | 0,5  |
| Cél/ml teñidas E+05 | 0,00 | 0,00  | 0,00 | 2,50  | 0,00 | 5,00 | 5,00 | 2,50 | 5,00 | 2,50 | 1,00  | 2,50 | 2,50 | 2,50 | 5,00 | 2,50  | 2,50 |
| % Mortalidad        | 0,00 | 0,00  | 0,00 | 0,58  | 0,00 | 1,32 | 1,21 | 0,55 | 1,03 | 0,51 | 2,31  | 0,54 | 0,58 | 0,61 | 1,29 | 0,55  | 0,69 |



Anexo V: Tasa específica de crecimiento de las células que poseen viabilidad de cultivo -18°C

|         |              | TEC       | DS     | TEC       | DS     | TEC       | DS     | TEC       | DS     | TEC       | DS     | TEC       | DS | TEC       | DS |           |  |
|---------|--------------|-----------|--------|-----------|--------|-----------|--------|-----------|--------|-----------|--------|-----------|----|-----------|----|-----------|--|
| (-)18°C | Semana       | <b>S1</b> |        | <b>S2</b> |        | <b>S3</b> |        | <b>S4</b> |        | <b>S5</b> |        | <b>S6</b> |    | <b>S7</b> |    | <b>S8</b> |  |
|         | Matraz (2L)  | 0,23      | ± 0,01 | 0,15      | ± 0,03 | 0,25      | ± 0,11 | 0,05      | ± 0,01 | -0,1      | ± 0,01 | ±         |    | ±         |    | ±         |  |
|         | Botella (5L) | ±         |        | ±         |        | ±         |        | ±         |        | ±         |        | ±         |    | ±         |    | ±         |  |
|         | Masivo (20L) | ±         |        | ±         |        | ±         |        | ±         |        | ±         |        | ±         |    | ±         |    | ±         |  |

|         |              | TEC       | DS | TEC        | DS | TEC        | DS | TEC        | DS | TEC        | DS | TEC        | DS | TEC        | DS |            |  |
|---------|--------------|-----------|----|------------|----|------------|----|------------|----|------------|----|------------|----|------------|----|------------|--|
| (-)18°C | Semana       | <b>S9</b> |    | <b>S10</b> |    | <b>S11</b> |    | <b>S12</b> |    | <b>S13</b> |    | <b>S14</b> |    | <b>S15</b> |    | <b>S16</b> |  |
|         | Matraz (2L)  | ±         |    | ±          |    | ±          |    | ±          |    | ±          |    | ±          |    | ±          |    | ±          |  |
|         | Botella (5L) | ±         |    | ±          |    | ±          |    | ±          |    | ±          |    | ±          |    | ±          |    | ±          |  |
|         | Masivo (20L) | ±         |    | ±          |    | ±          |    | ±          |    | ±          |    | ±          |    | ±          |    | ±          |  |

Anexo VI: Tasa específica de crecimiento de las células que poseen viabilidad de cultivo 0°C

|     |              | TEC       | DS     | TEC       | DS     | TEC       | DS     | TEC       | DS     | TEC       | DS     | TEC       | DS     | TEC       | DS     |           |        |
|-----|--------------|-----------|--------|-----------|--------|-----------|--------|-----------|--------|-----------|--------|-----------|--------|-----------|--------|-----------|--------|
| 0°C | Semana       | <b>S1</b> |        | <b>S2</b> |        | <b>S3</b> |        | <b>S4</b> |        | <b>S5</b> |        | <b>S6</b> |        | <b>S7</b> |        | <b>S8</b> |        |
|     | Matraz (2L)  | 0,34      | ± 0,04 | 0,39      | ± 0,03 | 0,72      | ± 0,07 | 0,78      | ± 0,05 | 0,51      | ± 0,08 | 0,72      | ± 0,05 | 0,77      | ± 0,06 | 0,66      | ± 0,06 |
|     | Botella (5L) | 0,33      | ± 0,07 | 0,20      | ± 0,00 | 0,29      | ± 0,06 | 0,25      | ± 0,05 | 0,38      | ± 0,00 | 0,38      | ± 0,07 | 0,23      | ± 0,09 | 0,30      | ± 0,03 |
|     | Masivo (20L) | 0,21      | ± 0,06 | 0,21      | ± 0,05 | 0,20      | ± 0,03 | 0,23      | ± 0,06 | 0,24      | ± 0,06 | 0,24      | ± 0,03 | 0,36      | ± 0,06 | 0,22      | ± 0,03 |

|     |              | TEC       | DS     | TEC        | DS     | TEC        | DS     | TEC        | DS     | TEC        | DS     | TEC        | DS     | TEC        | DS     |            |        |
|-----|--------------|-----------|--------|------------|--------|------------|--------|------------|--------|------------|--------|------------|--------|------------|--------|------------|--------|
| 0°C | Semana       | <b>S9</b> |        | <b>S10</b> |        | <b>S11</b> |        | <b>S12</b> |        | <b>S13</b> |        | <b>S14</b> |        | <b>S15</b> |        | <b>S16</b> |        |
|     | Matraz (2L)  | 0,68      | ± 0,03 | 0,58       | ± 0,02 | 0,56       | ± 0,00 | 0,73       | ± 0,01 | 0,72       | ± 0,08 | 0,62       | ± 0,02 | 0,64       | ± 0,04 | 0,54       | ± 0,02 |
|     | Botella (5L) | 0,23      | ± 0,05 | 0,21       | ± 0,10 | 0,30       | ± 0,03 | 0,41       | ± 0,04 | 0,24       | ± 0,04 | 0,30       | ± 0,03 | 0,38       | ± 0,03 | 0,36       | ± 0,05 |
|     | Masivo (20L) | 0,38      | ± 0,01 | 0,33       | ± 0,02 | 0,34       | ± 0,03 | 0,28       | ± 0,00 | 0,33       | ± 0,03 | 0,22       | ± 0,08 | 0,26       | ± 0,06 | 0,20       | ± 0,01 |

Anexo VII: Tasa específica de crecimiento de las células que poseen viabilidad de cultivo 5°C

|     |              | TEC       | DS     | TEC       | DS     | TEC       | DS     | TEC       | DS     | TEC       | DS     | TEC       | DS     | TEC       | DS     |           |        |
|-----|--------------|-----------|--------|-----------|--------|-----------|--------|-----------|--------|-----------|--------|-----------|--------|-----------|--------|-----------|--------|
| 5°C | Semana       | <b>S1</b> |        | <b>S2</b> |        | <b>S3</b> |        | <b>S4</b> |        | <b>S5</b> |        | <b>S6</b> |        | <b>S7</b> |        | <b>S8</b> |        |
|     | Matraz (2L)  | 0,31      | ± 0,01 | 0,34      | ± 0,04 | 0,65      | ± 0,01 | 0,72      | ± 0,07 | 0,51      | ± 0,01 | 0,57      | ± 0,06 | 0,74      | ± 0,03 | 0,62      | ± 0,06 |
|     | Botella (5L) | 0,32      | ± 0,00 | 0,19      | ± 0,02 | 0,27      | ± 0,05 | 0,36      | ± 0,05 | 0,36      | ± 0,01 | 0,23      | ± 0,09 | 0,25      | ± 0,04 | 0,36      | ± 0,07 |
|     | Masivo (20L) | 0,30      | ± 0,02 | 0,25      | ± 0,02 | 0,28      | ± 0,04 | 0,17      | ± 0,02 | 0,38      | ± 0,04 | 0,27      | ± 0,04 | 0,28      | ± 0,04 | 0,30      | ± 0,02 |

|     |              | TEC       | DS     | TEC        | DS     | TEC        | DS     | TEC        | DS     | TEC        | DS     | TEC        | DS     | TEC        | DS     |            |        |
|-----|--------------|-----------|--------|------------|--------|------------|--------|------------|--------|------------|--------|------------|--------|------------|--------|------------|--------|
| 5°C | Semana       | <b>S9</b> |        | <b>S10</b> |        | <b>S11</b> |        | <b>S12</b> |        | <b>S13</b> |        | <b>S14</b> |        | <b>S15</b> |        | <b>S16</b> |        |
|     | Matraz (2L)  | 0,60      | ± 0,02 | 0,65       | ± 0,09 | 0,70       | ± 0,00 | 0,68       | ± 0,01 | 0,64       | ± 0,03 | 0,58       | ± 0,00 | 0,53       | ± 0,04 | 0,59       | ± 0,07 |
|     | Botella (5L) | 0,19      | ± 0,02 | 0,22       | ± 0,06 | 0,33       | ± 0,04 | 0,31       | ± 0,02 | 0,29       | ± 0,03 | 0,31       | ± 0,02 | 0,27       | ± 0,02 | 0,29       | ± 0,03 |
|     | Masivo (20L) | 0,37      | ± 0,05 | 0,31       | ± 0,08 | 0,31       | ± 0,04 | 0,14       | ± 0,00 | 0,39       | ± 0,03 | 0,27       | ± 0,02 | 0,32       | ± 0,01 | 0,14       | ± 0,03 |