



Método de dispersión de biopelículas en cultivos de la diatomea bentónica *Amphora* sp. para facilitar el conteo directo
Method of biofilm dispersion in cultures of benthic diatom *Amphora* sp. to facilitate direct count

Sylvia Leal *, Rafael Curbelo **, Xiomara Vega **, Nayivis Núñez **, Joicye Hernández *

* Centro de Investigaciones Marinas, Universidad de La Habana, Calle 16 No. 114, CP 11300, Ciudad Habana, Cuba. sylvia@cim.uh.cu

** Centro de Producción de Postlarvas de Camarón “Yaguacam”, Ministerio de la Industria Alimenticia, Carretera Cienfuegos-Trinidad, km 63½, Yaguanabo, Cienfuegos, Cuba.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo brindado por la Red Temática “Desarrollo y manejo sustentable de sistemas de producción acuícola”, integrada por varios grupos de investigación y cuerpos académicos de México y Cuba, aprobada por la Secretaría de Educación Pública de México en diciembre del 2009 y dirigida por el Cuerpo Académico “Ecofisiología de Organismos Acuáticos y Cultivos de Apoyo”, perteneciente a la Universidad Autónoma de Sinaloa en México.

Resumen

Las diatomeas bentónicas secretan sustancias extracelulares que le permiten la adhesión al sustrato y entre ellas mismas. El objetivo del presente trabajo es sugerir un nuevo método de dispersión que facilite el conteo de las microalgas bentónicas en las cámaras que se utilizan para estos fines. Se diseñaron dos experimentos completamente aleatorizados con diferentes sustancias químicas, a distintas proporciones (etanol, hexano, pentano, diclorometano y acetona, a concentraciones de 5, 10 y 15% (v/v) cada una, formaldehído al 0,5, 0,75, 1, 2, 4 y 6% (v/v), además de sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) a 2, 3 y 4% (p/v)). En cada caso se realizaron cinco réplicas de 10 mL cada una, las que se tomaron de un cultivo de la diatomea *Amphora* sp. en fase exponencial. Los resultados obtenidos demostraron que el pentano en sus tres proporciones, así como el hexano al 5% y el diclorometano al 10% lograron dispersar las células con respecto al control, aunque ninguna de ellas logró disgregar totalmente los grumos. Se sugiere el pentano al 5% (v/v) para emplearse en la dispersión de la mayor cantidad de grumos que forma esta especie, debido a que fue la sustancia que obtuvo el valor máximo de densidad, es la que menos cuesta y la que menor concentración requiere; además de que no daña la célula y hace posible observar la calidad de la microalga en la observación directa.

Abstract

Benthic diatoms secrete extracellular substances that allow the adhesion to the substrate and among themselves. The aim of the present paper was to suggest a new dispersion method that facilitates the count of benthic diatoms within the chambers used for these purposes. Two experiments were designed totally at random with different chemical substances, at different proportions (ethanol, hexane, pentane, dichloromethane and acetone, at concentrations of 5, 10 and 15% (v/v) each, formaldehyde at 0.5, 0.75, 1, 2, 4 and 6% (v/v); besides ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) at 2, 3 and 4% (p/v). In each case, five replicas of 10 mL each were carried out, which were obtained from a culture of diatom *Amphora* sp. in exponential phase. The obtained results demonstrated that pentane in the three tested concentrations, as well hexane at 5% and dichloromethane at 10% (v/v) were able to disperse the cells with respect to the control group; although none of them could disintegrate clots completely. Pentane at 5% (v/v) is suggested to be used to disperse the largest quantity of clots that this species forms, since it obtained the maximum value of density and, from the economic point of view, is the cheapest and the one that requires a smaller concentration. This substance does not damage the cell and it makes possible to note the quality of microalgae in direct observation.

Palabras clave: cultivo de microalgas bentónicas, método de dispersión, biopelículas, conteos, *Amphora*.
Key words: benthic microalgae culture, dispersion methods, biofilms, counts, *Amphora*.



INTRODUCCIÓN

Las diatomeas bentónicas en cultivo tienen la capacidad de colonizar toda la superficie del reservorio donde habiten y forman biopelículas, que al aumentar su concentración, crean pequeños grumos de células que se desprenden y suspenden en el agua y constituyen partículas de diferentes tamaños, de las que se pueden alimentar algunos organismos. La cuantificación de estas microalgas por conteo directo se dificulta por los productos que secretan para formar sus colonias y adherirse al sustrato. Hasta el momento, la forma de suministrar el alimento en cultivo es cualitativa, que requiere de la experiencia y habilidad del cultivador, que la aplica por la coloración del cultivo. Por otra parte, es importante mantener las concentraciones adecuadas de alimento debido a que le provoca daños a las postlarvas y puede deteriorar la calidad del agua.

No todas las especies tienen la misma adhesión al sustrato o entre ellas, cuando forman colonias (Roberts, Kawamura & Tanaki, 2000). Se encontró, por ejemplo, que *Navicula* sp., ante un burbujeo fuerte, en el momento de tomar la muestra, logra desprenderse de las paredes del recipiente y además se separan entre sí; sin embargo *Amphora* sp. no se comporta del mismo modo (Leal, Miranda, Curbelo & Hernández, 2010). Estas observaciones no coinciden con las de Takeda (1986), donde este autor forma cuatro grupos de diatomeas epífitas de macroalgas, según su grado de adhesión, considera a *Amphora* spp. menos fuertemente adherida que especies de *Navicula* de pequeño tamaño y atribuye el grado de adhesión a la forma y tamaño de la célula, a la motilidad y al mucus que excretan.

Existen autores que utilizan el método de enumeración directa para contar diatomeas bentónicas (*Nitzschia laevis*, *N. termalis* var *minor*, *Navicula incerta* y *Amphiprora paludosa* var *hialina*), sin especificar si emplean algún método de dispersión (Simental & Sánchez-Saavedra, 2003; Sánchez-Saavedra, 2006).

La cuantificación de las células es importante cuando utilizamos estas especies con fines de alimentación, para saber la cantidad de alimento que se proporciona y realizar los ajustes correspondientes. Los métodos de dispersión propuestos, para lograr conteos confiables con cámaras de enumeración directa, son por agitación mecánica, con esferas de vidrio o a través de ultrasonido de baja frecuencia (Votolina, 1991). Estos resultan muy laboriosos en laboratorios de producción continua, por lo que el objetivo del presente trabajo fue encontrar una sustancia química capaz de disolver la matriz que forman estas microalgas, con el fin de individualizarlas y facilitar su conteo.

MATERIALES Y MÉTODOS

La especie de microalga bentónica que se empleó en los experimentos fue *Amphora* sp. (Clase Bacillariophyceae), aislada de estanques de reproductores del Centro de Producción de Postlarvas de Camarón “Yaguacam”, ubicado en la provincia de Cienfuegos, Cuba, y se mantiene en monocultivo en el propio centro con clave AMP-1. Fue aislada por el método de siembra en placa de agar (Band, 2007) con medio de cultivo Guillard f/2 (Guillard, 1975). Cuando se observó crecimiento de las colonias, se pasaron al mismo medio de cultivo pero en forma líquida.

Se diseñaron dos experimentos completamente aleatorizados con diferentes sustancias químicas, a distintas proporciones, para lograr la dispersión de las células integradas en las biopelículas, con vista a ser contadas bajo el microscopio. Ellas fueron, en un primer experimento: etanol, hexano, pentano, diclorometano y acetona a concentraciones de 5, 10 y 15% (v/v) cada una, y formaldehído a 2, 4 y 6% (v/v). Un segundo experimento se realizó con formaldehído al 0,5, 0,75 y 1% (v/v), y sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) a 2, 3 y 4% (p/v). En todos los casos se realizaron cinco réplicas. Cada unidad experimental contenía 10 mL de muestra, que se tomaron de un cultivo de 5 L de la diatomea bentónica

Amphora sp. en fase exponencial. En el primer experimento se tomaron las muestras al 3er día de cultivo y para el segundo, al 4to.

Para homogenizar el cultivo se despegó la biopelícula del recipiente con una varilla de vidrio, agitando de forma vigorosa hasta lograr la total separación de las paredes. Cada muestra se homogenizó, lo más posible, con burbujeo continuo y fuerte. Los conteos se hicieron en cámara de Neubauer según lo descrito por Alfonso & Leal (1999), enumerándose las células que estuvieran dispersas y las concentraciones fueron expresadas en 10^3 cél.mL⁻¹.

Los resultados fueron procesados, después de comprobar homogeneidad de varianzas y normalidad de los datos, con un análisis de varianza de dos vías y las medias fueron comparadas con la prueba de Tukey de comparación múltiple (Zar, 1999), utilizando el paquete estadístico SigmaStat 3.5, para un nivel de significación del 0,05.

RESULTADOS

Las diferentes sustancias químicas que se emplearon en el primer experimento, como posibles desintegradores de las biopelículas, revelaron que el pentano en sus tres proporciones, así como el hexano al 5% y el diclorometano al 10%, lograron dispersar las células con respecto al control; aunque ninguna de ellas logró dispersar totalmente los grumos. El ANOVA que se realizó mostró que existió diferencias entre las sustancias ($F=18,988$, $p<0,001$) y entre las concentraciones ($F=4,468$, $p<0,015$) que se utilizaron, no encontrándose diferencias significativas ($F=1,776$, $p=0,081$) para la interacción entre los dos factores.

El pentano al 5% obtuvo la densidad máxima de 745×10^3 cél.mL⁻¹, similar a las demás concentraciones de esta misma sustancia, y presentó diferencias significativas con el control ($p<0,05$). Las densidades mínimas se lograron con el formaldehído en sus tres concentraciones y el etanol al 15%, diferentes significativamente del resto de los productos pero no entre ellas, y se observó muerte celular y ruptura de las valvas con el empleo del formaldehído (Tabla 1).

Tabla 1. Concentración celular ($\times 10^3$ cel.mL⁻¹) \pm error estándar de *Amphora* sp. alcanzada con cada una de las sustancias químicas en sus diferentes concentraciones en el primer experimento. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas.

Table 1. Cellular concentration ($\times 10^3$ cel.mL⁻¹) \pm standard error of *Amphora* sp. with the products at different concentrations in the first experiment. Values that are statistically different are indicated by different letters.

Sustancias químicas	Concentraciones (%) (v/v)		
	5	10	15
Etanol	624 ^b \pm 24,718	627 ^b \pm 32,156	510 ^c \pm 15,083
Hexano	646 ^a \pm 32,955	618 ^b \pm 39,925	585 ^b \pm 22,023
Pentano	745 ^a \pm 33,429	678 ^{ab} \pm 18,748	711 ^a \pm 33,144
Diclorometano	652 ^b \pm 15,700	669 ^{ab} \pm 35,896	562 ^b \pm 21,886
Acetona	599 ^b \pm 2,915	595 ^b \pm 38,536	613 ^b \pm 34,264
	2	4	6
Formaldehído	512 ^c \pm 27,046	452 ^c \pm 39,134	501 ^c \pm 13,266
Control		623 ^b \pm 9,772	

En las muestras con formaldehído, con las proporciones utilizadas en el experimento 2 (Tabla 2), no se observó muerte ni ruptura de las valvas a las concentraciones de 1, 0,75 y 0,5% (v/v). Se obtuvo valores máximos de la densidad celular al 1% con 573×10^3 cel.mL⁻¹, similar a la concentración de 0,75% pero diferente de la de 0,5%. Esta fue la única concentración que difirió del control y del EDTA en las proporciones de 2 y 3% ($p>0,05$). El

ANOVA en este caso mostró diferencias significativas entre los solventes ($F=5,707$, $p=0.025$), las concentraciones ($F=5,058$, $p=0,015$) y la interacción de los factores ($F=4,126$, $p=0,029$).

Tabla 2. Concentración celular ($\times 10^3$ cel.mL⁻¹) \pm ES de *Amphora* sp. alcanzada con cada uno de las sustancias químicas en sus diferentes concentraciones en el segundo experimento. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas.

Table 2. Cellular concentration ($\times 10^3$ cel.mL⁻¹) \pm standard error of *Amphora* sp. with the products at different concentrations in the second experiment. Values that are statistically different are indicated by different letters.

Producto	Concentraciones (%) (v/v)			
	0.5	0.75	1	
Formaldehído	452 ^c \pm 5,568	560 ^{ab} \pm 17,255	573 ^a \pm 23,958	
	2	3	4	
EDTA	478 ^b \pm 26,422	504 ^b \pm 28,914	470 ^{bc} \pm 25,739	
Control		561 ^{ab} \pm 24,413		

DISCUSIÓN

Las diatomeas bentónicas generan una matriz que las mantiene unidas al sustrato. Esta matriz no sólo la componen polisacáridos, sino además lípidos, proteínas, incluso ácidos nucleicos, generalmente llamadas sustancias extracelulares poliméricas (Dobretsov, 2010).

Debido a la tendencia de estas microalgas de formar agregados, Almaguer, Alfonso & Leal (2004) señalan que es muy difícil obtener muestras homogéneas para cuantificar su crecimiento a través de la enumeración directa en las cámaras de conteo.

Pocos son los trabajos que refieren la forma en que se realizan los conteos de estas especies. Algunos autores mencionan que lo hacen de forma volumétrica (Gallardo & Buen, 2003; Leal *et al.*, 2010), y otros realizan los conteos de forma directa, bajo el microscopio, como es el caso de Alcoverro, Conte & Mazzella (2000), que fijan la muestra con formaldehído para su conteo en microscopio invertido los ocho primeros días de cultivo de la microalga *Cylindrotheca closterium*; pero no especifican como disgregan el mucílago que estas microalgas forman, ni las concentraciones de la sustancia empleada, así como si la usan para preservar o fijar la muestra.

Para moluscos, se utilizan superficies que sumergen en estanques fertilizados y de forma natural se adhieren diatomeas bentónicas, que sirven de alimento a postlarvas de especies ramoneadoras, como el abulón (Daume, Krsinich, Farrell & Gervis, 2000; Searcy-Bernal, Velez-Espino & Anguiano-Beltrán, 2001); sin embargo esta técnica sigue siendo variable y poco predecible porque se hace de forma empírica (Araya, Bahamondez, Barahona & Silva-Aciades, 2010). En el caso de emplearlas como alimento de postlarvas de camarón, los cultivos se realizan de forma monoespecífica, en tanques o cilindros; pero no refieren cuantificación debido a que la suministran de forma cualitativa, a criterio del cultivador. Por lo anterior, si queremos conocer cuál es la concentración adecuada y la calidad del alimento que estamos dando, es importante encontrar una forma rápida y fácil de cuantificar los cultivos en sistemas productivos.

Lo que la literatura refiere para separar esas biopelículas en las muestras es el uso de ultrasonido de baja frecuencia, que no daña las células previo al conteo (Voltolina, 1991). Otra opción es la extracción de pigmentos, en especial de clorofila *a*, para relacionarla con la densidad celular (Almaguer *et al.*, 2004).

En procesos de producción continua, a gran escala, el uso de ultrasonido y de extracción de clorofila *a*, no resultan métodos prácticos debido a que requieren laboriosidad y equipos



específicos. Los fluorímetros presentan una alternativa viable, debido a que se pueden realizar lecturas de clorofila *in vivo*, reduciendo el tiempo de las determinaciones tradicionales. Esta lectura infiere errores, pues no siempre la concentración celular se corresponde con la concentración de los pigmentos presentes; ya que ésta depende de diferentes factores como el estado fisiológico de la célula y la fase de crecimiento del cultivo, así como de las condiciones físico-químicas a que están sometidos los cultivos (Alfonso & Leal, 1999). Por otra parte, el uso del fluorímetro implica una preparación previa de las muestras con ultrasonido que facilite la desintegración de las biopelículas.

Los resultados obtenidos en este estudio demostraron que son varias las sustancias químicas que se pueden emplear, para individualizar las células de los grumos que forman las diatomeas bentónicas en cultivo y de esa forma facilitar el conteo directo de las mismas. Ellas son el hexano y el diclorometano al 5 y 10 % (v/v), respectivamente, así como el pentano en las tres concentraciones ensayadas. No obstante, se sugiere el pentano al 5% (v/v) para emplearse en la dispersión de los grumos de células de la diatomea bentónica *Amphora* sp. en cultivo, por ser con la que mayor concentración se obtuvo. Esta fue la sustancia que obtuvo el valor máximo de densidad celular y, desde el punto de vista económico, la menos costosa y la que menor concentración requiere; además de que no daña la célula y hace posible observar la calidad de la microalga en la observación directa.

El pentano y el hexano son disolventes apolares que pertenecen al grupo de los hidrocarburos saturados o alcanos, con cinco y seis átomos de carbono respectivamente. Estas sustancias son buenos disolventes frente a otras de su misma naturaleza, como son los exopolisacáridos de las diatomeas bentónicas. La compleja naturaleza de la matriz puede ser la causa de que ninguna sustancia química de las que se emplearon pudo disolver al 100% los grumos presentes en el cultivo, como tampoco los separa el ultrasonido de baja frecuencia según manifiesta Voltolina (1991).

El hecho de que las concentraciones de formaldehído al 6, 4 y 2% en el primer experimento exhibieran densidades por debajo y diferentes significativamente del resto de los productos ensayados se le atribuye a que existió ruptura celular, ya que, al observarse al microscopio, se vieron restos de frústulos de las diatomeas. Las concentraciones probadas resultan muy altas si tenemos en cuenta que para la conservación de muestras de fitoplancton se recomienda este producto al 1% (Sournia, 1978). Esto lo confirma que en las muestras tratadas con formaldehído al 1% se observó que no hay ruptura celular, aunque tampoco hay separación de las biopelículas.

El hecho de que no existiera diferencia entre el formaldehído al 1 y 0,75% y el control en el segundo experimento, así como la interacción de los factores, puede deberse a que si bien el cultivo estaba en fase exponencial, también coincidió que era el principio de la fase estacionaria donde hay agotamiento de nutrientes y esto pudo afectar la naturaleza de las biopelículas.

El EDTA al 1% se emplea en cultivos intensivos para el mantenimiento de la calidad de agua, como agente quelante de los metales pesados; aunque en ocasiones, cuando ocurre un deterioro de la calidad del agua, proporcionado por el alimento y los procesos catabólicos, se emplean concentraciones de 2 y hasta 3% (p/v) con resultados positivos en la separación de grumos que hacen las microalgas planctónicas (Empresa Yaguacam, 2009). En este caso no manifestó diferencia con el control, por lo que se pudiera decir que la composición de las biopelículas que algunas veces forman las diatomeas planctónicas es totalmente diferente a las que forman las diatomeas bentónicas.

Amphora sp. crea una biopelícula en el recipiente de cultivo y, para el cultivador tomar una muestra, es necesario desprenderla por medio de una varilla de vidrio si es en un recipiente pequeño, o por medio de un cepillo de caucho o espátula de goma suave (Voltolina, 1991) para grandes volúmenes, aumentando la aireación en ambos casos.



Se concluye que el pentano al 5% es un buen solvente para dispersar las biopelículas de *Amphora* sp. en cultivo, teniendo en cuenta que esta especie es utilizada en la alimentación de las primeras postlarvas de camarón en Cuba, y el método propuesto facilitará su conteo de una forma rápida y económica para realizar los ajustes de alimento que se hacen en la rutina de la larvicultura.

BIBLIOGRAFÍA

- Alcoverro, T., Conte, E. & Mazzella, L. (2000). Production of mucilage by the Adriatic epipellic diatom *Cylindrotheca closterium* (Bacillariophyceae) under nutrient limitation. *J. Phycol.*, (36), 1087-1095.
- Alfonso, E. & Leal, S. (1999). *Manual para la creación y mantenimiento de un cepario de microalgas*. Universidad de La Habana, Centro de Investigaciones Marinas
- Almaguer, Y., Alfonso, E. & Leal, S. (2004). Aislamiento y cultivo de dos especies de diatomeas bentónicas. *Rev. Invest. Mar.* 25(1), 57-64.
- Araya, R., Bahamondez, C., Barahona, K. & Silva-Aciades, F. (2010). Utilización de una biopelícula microalgal multiespecífica para optimizar la fijación larval y el crecimiento de abalón (*Haliotis rufescens*) en un criadero comercial. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 45(1), 59-69.
- Band S., C. J. (2007). Aislamiento, purificación y mantenimiento de cepas de microalgas. En: Arredondo y Voltolina, (Eds.), *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal* (pp. 1-16), Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Baja California Sur, México.
- Daume, S., Krsinich, A. Farrell, S. & Gervis, M. (2000). Settlement early growth and survival of *Haliotis rubra* in response to different algal species. *Journal of Applied Phycology* 12, 479-488.
- Dobretsov, S. (2010). Marine biofilms. In: Dürr, S. and Thomason, J.C. (Eds.), *Biofouling* (Cap 9), Wiley-Blackwell.
- Empresa Yaguacam (2009). Monitoreo biológico y veterinario de larvas y postlarvas. Cuba, Ministerio de la Industria Alimenticia, Procedimientos Operaciones de Trabajo, Cría de Larvas, 30 pp.
- Gallardo, W. G. & Buen, S. M. A. (2003). Evaluation of mucus, *Navicula*, and mixed diatoms as larval settlement inducers for the tropical abalone *Haliotis asinina*. *Aquaculture* 221, 357-364.
- Guillard, R. R. L. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith, L. and Chanley, M. H. (Eds.), *Culture marine invertebrate animals* (pp. 29-59), NY.
- Leal, S., Miranda, A., Curbelo, R. & Hernández, H. (2010). Las diatomeas bentónicas como fuente de alimento en el cultivo larvario de camarón y otros organismos acuáticos. México, Nuevo León, *X Simposio Internacional de Nutrición Acuícola*, CD-ROM, pp. 559-580.
- Roberts, R., Kawamura, T. & Tanaki, H. (2000). Diatoms for abalone culture: a workshop for abalone farmers. New Zeland, 4th International Abalone Symposium, Cawthron Report No. 547, p. 28.
- Sánchez-Saavedra, M. P. (2006). The effect of cold storage on cell viability and composition of two benthic diatoms. *Aquaculture Engineering* 34, 131-136.
- Searcy-Bernal, R., Velez-Espino, L. & Anguiano-Beltrán, R. (2001). Effect of biofilm density on grazing and growth rates of *Haliotis fulgens* postlarvae. *Journal of Shellfish Research* 20, 587-591.
- Simental, J. A. & Sánchez-Saavedra, M. P. (2003). The effect of agricultural fertilizer on growth rate of benthic diatoms. *Aquacultural Engineering* 27, 265-272.
- Sournia, A. (Ed.) (1978). *Phytoplakton manual*. United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization (UNESCO), Paris, 337 pp.



- Takeda, N. (1986). Adhesive strength of epiphytic diatoms on various seaweeds. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 52(5):817-821.
- Voltolina, D. (1991). A comparison of methods for the dispersion of cultures o benthic diatoms. *Cryptogamie Algol.* 12(3):183-187.
- Zar, J. H. (1999). *Biostatistical Analysis*. 4ta Ed. Prentice Hall, Inc.

Recibido: diciembre de 2011.

Aceptado: marzo de 2012.