



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
(BIOLOGÍA MARINA)

Evaluación de la calidad lipídica de la microalga *Tetraselmis chuii*
cultivada en medios experimentales, y su efecto en larvas de *Litopenaeus*
vannamei

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:
ROBERTO PADILLA ARMAS

TUTOR PRINCIPAL
DRA. MARTHA GABRIELA GAXIOLA CORTÉS
FACULTAD DE CIENCIAS-UNAM
MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DR. DANIEL ROBLEDO RAMIREZ
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
DR. GUSTAVO MONTEJANO ZURITA
FACULTAD DE CIENCIAS-UNAM
DR. PEDRO GALLARDO ESPINOSA
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
M En C. SANTIAGO CAPELLA VIZCAINO
FACULTAD DE QUÍMICA-UNAM

SISAL, YUCATÁN, MAYO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología
Universidad Nacional Autónoma de México
Coordinación del Posgrado, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología
Circuito Exterior s/n. Ciudad Universitaria, México, D.F. 04510
Teléfono y Fax: (52-55) 56-22-58-03, 5829, 5990 y 5991
Correo electrónico: posgrado@mar.icmyl.unam.mx
http://www.unam.mx/ciencias_del_mar_posgrado



**Evaluación de la calidad lipídica de la microalga
Tetraselmis chuii cultivada en medios experimentales, y
su efecto en larvas de *Litopenaeus vannamei***

T E S I S

Que para obtener el grado académico de

Maestro en Ciencias

(Biología Marina)

P R E S E N T A

ROBERTO PADILLA ARMAS

DIRECTOR DE TESIS: **DRA. MARTHA GABRIELA GAXIOLA CORTÉS**

COMITÉ TUTORAL: **DR.DANIEL ROBLEDO RAMIREZ
DR.GUSTAVO MONTEJANO ZURITA
DR.PEDRO GALLARDO ESPINOSA
M en C. SANTIAGO CAPELLA VIZCAINO**

SISAL, YUCATAN, MAYO 2015

*A mis padres por haberme apoyado siempre en mi formación
como estudiante y como persona.*

Este trabajo fue realizado en las Instalaciones de la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación de Sisal, de la Facultad de Ciencias de la UNAM, bajo la dirección de Martha Gabriela Gaxiola Cortés, con el apoyo financiero del Proyecto CONACyT Ciencia Básica 167670. Se agradece el apoyo técnico de Iveth Gabriela Palomino, Adriana Paredes, Patricia Balan, Elsa Noreña, Manuel Valenzuela, Miguel Arévalo, Camren Galindo y Eduardo Pacheco

Agradecimientos

A mi asesora la Dra Gabriela Gaxiola por su confianza y apoyo en la elaboración de este trabajo así como a los miembros de mi comité tutorial por sus valiosos comentarios y sugerencias.

A la Mtra. Gabriela Palomino por soportarme tantas horas de indecisiones, repeticiones, apoyo y su amistad, así como al gran equipo de Alimento Vivo Paty, Adriana y Conchi porque sin su ayuda no hubiera sido posible.

A la Dra. Elsa Noreña por brindarme su apoyo, esfuerzos y atención en tantos análisis en el área de química.

A los maestros Eduardo Pacheco y Carmen Galindo por sus aportaciones en la estadística de este trabajo.

Y por último y no menos importante, a mi hermana y mi sobrina por motivarme en la realización de esta tesis, a los buenos amigos hechos en Sisal (Yazmin, Esau, Iratzio, Abraham y los "SKALA ROOTS") con lo que he compartido tantas experiencias y han hecho más amena la estancia durante la maestría, así como a los que están en la distancia pero siempre están ahí (Alex, Bego, JJ, Jime, Fer y Freddy).

DISCUSIÓN.....	39
CONCLUSIÓN	40
CAPÍTULO II.	Cultivos con glicerol como fuente de
carbono.	41
METODOLOGÍA.....	42
Recuperación de la biomasa	42
Medición de las microalgas	43
Análisis de ácidos grasos y lípidos totales.....	43
Cuantificación de clorofila <i>a</i> , <i>b</i> y carotenoides	43
Cuantificación de proteínas.....	44
Estadística.....	44
RESULTADOS: CULTIVO CON GLICEROL COMO FUENTE DE CARBONO CULTIVOS EN FASE	
FINAL EXPONENCIAL	45
Cinética de crecimiento.....	45
Tamaño de la microalga	46
Pigmentos.....	46
Proteína	47
Lípidos totales	47
Perfil ácidos grasos.....	47
Análisis multivariado	50
RESULTADOS : CULTIVOS CON GLICEROL COMO FUENTE DE CARBONO EN FASE	
ESTACIONARIA.....	51
Cinética de crecimiento.....	51
Tamaño de la microalga	52
Pigmentos.....	53
Proteína	53
Lípidos totales	54
Perfil ácidos grasos.....	54
Análisis multivariado	56
DISCUSIÓN.....	57
CONCLUSIÓN	61
CAPITULO III.	Evaluación de <i>T.chuii</i> en la alimentación de larvas
tempranas de <i>L.vannamei</i>	63
Diseño experimental para <i>L. vannamei</i>	63
Origen de las larvas y condiciones de cultivo	63

Esquema de alimentación.....	63
Indicadores zootécnicos	64
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	65
CONCLUSIÓN	68
CONCLUSIONES GENERALES	69
Bibliografía	71
ANEXOS	77
Bioensayo de T.chuii con Glicerol como fuente de carbono	77
Correlación análisis multivariado	78

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de la ruta de formación de DHA a partir de ácido α -linolenico por la vía $\Delta 6$ -desaturasa / $\Delta 6$ -elongasa y las enzimas involucradas	15
Figura 2: Esquema de la ruta de formación de ácido dihomo- γ -linolenico y ácido eicosatetraenoico por la vía $\Delta 9$ -elongasa / $\Delta 8$ -desaturasa y las enzimas involucradas.	16
Figura 3: Ciclo vital de un camarón peneido típico: 1: maduración y reproducción; 2: nauplio; 3: protozoas; 4: mysis; 5: postlarvas; 6: juveniles; 7: adultos. A: estuarios; B: Mar abierto	17
Figura 4: esquema de escalado del cultivo desde la cepa al inóculo.....	29
Figura 5: se muestra la imagen de la cámara de Neubauer y el modo de realizar el conteo directo.	30
Figura 6: disposición de los matraces en el cepario durante el cultivo de selección de medio. 32	
Figura 7: cinética de crecimiento de los cultivos UAS, UAS+SA, Acetato, Glicerol, Acetato+SA y Glicerol+SA, con una duración de 12 días.....	35
Figura 8: Se muestran los porcentajes promedios de tipos de saturación de los ácidos grasos entre los tratamientos. Los índices con la misma letra indican que existen diferencias significativas $p < 0.05$	36
Figura 9: se muestra el área de cultivo cubierta así como los tratamientos en cada posición y luxes utilizados.	42
Figura 10: muestra la pantalla de la cámara del microscopio que permite realizar las mediciones de las microalgas.....	43
Figura 11: cinética de crecimiento de los cultivos UAS, Control 0M y con glicerol en las concentraciones; 0.05M, 0.1M, 0.15M y 0.2M cosechados en la fase final exponencial.....	45
Figura 12a y b: longitud de <i>T.chuii</i> en el cultivo con glicerol como fuente de carbono en fase final exponencial.	46
Figura 13a y b: ancho de <i>T.chuii</i> en el cultivo con glicerol como fuente de carbono en fase final exponencial	46
Figura 14: muestra las distancias del análisis multivariado para los ácidos grasos de interés, lípidos totales, pigmentos y proteínas de los cultivos cosechados en la fase final exponencial cuando están afectados por la variable luz y por la variable glicerol.	50
Figura 15: cinética de crecimiento de los cultivos UAS, Control 0M y con glicerol en las concentraciones; 0.1M y 0.2M cosechados durante la fase estacionaria.	51
Figura 16a y 16b: longitud de <i>T.chuii</i> en el cultivo con glicerol como fuente de carbono en fase estacionaria.....	52
Figura 17a y 17b: ancho de <i>T.chuii</i> en el cultivo con glicerol como fuente de carbono en fase estacionaria.	53
Figura 18: muestra los resultados de los lípidos totales como % del cultivo con glicerol como fuente de carbono en fase estacionaria.....	54
Figura 19: muestra las distancias del análisis multivariado para los ácidos grasos de interés, lípidos totales, pigmentos y proteínas de los cultivos cosechados en la fase estacionaria cuando están afectados por la variable luz y por la variable glicerol	57
Figura 20: Fotografía que muestran los microorganismos adheridas a las PzI del tratamiento T.ch+Gly.....	66

Figura 21: Fotografía que muestran los microorganismos colonizando los cordones fecales del tratamiento T.ch+Gly	66
Figura 22: imágenes que muestran algunos de los microorganismos oportunistas que aparecieron en los cultivos de Tch+Gly.....	69

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Principales géneros de microalgas utilizados en la acuicultura	8
Tabla 2: Tratamientos con acetato de sodio, glicerol y ácido salicílico para el cultivo de <i>T.chuii</i> en concentraciones expresadas en moles y luxes utilizados.	31
Tabla 3: Condiciones de análisis por cromatografía de gases con detector de ionización en llama (CG/FID).	34
Tabla 4: Composición relativa de ácidos grasos (% del total de ácidos grasos identificados) de la microalga <i>Tetraselmis chuii</i>	37
Tabla 5: Tratamientos para el cultivo de <i>T.chuii</i> con glicerol como fuente de carbono en fase final exponencial con concentraciones expresadas en moles y luxes utilizados.	41
Tabla 6: Tratamientos para el cultivo de <i>T.chuii</i> con glicerol como fuente de carbono en fase estacionaria con concentraciones expresadas en moles y luxes utilizados.....	42
Tabla 7: tabla resumen de los resultados obtenidos para % proteína, % lípidos totales y pigmentos ($\mu\text{g}/\text{mL}$) en el cultivo con glicerol como fuente de carbono en la fase final exponencial.	47
Tabla 8: Resumen de los ácidos grasos principales y de interés (expresados como porcentaje del total de los ácidos grasos identificados) del cultivo con glicerol como fuente de carbono cosechado en fase final exponencial.....	48
Tabla 9: tabla resumen de los resultados obtenidos para % proteína, % lípidos totales y pigmentos ($\mu\text{g}/\text{mL}$) en el cultivo con glicerol como fuente de carbono en la fase estacionaria.	53
Tabla 10: tabla resumen de los ácidos grasos principales y de interés (expresados como % del total de los ácidos grasos identificados) del cultivo con glicerol como fuente de carbono cosechado en fase exponencial. (Tr=traza resultados menores a 0.05%).	55
Tabla 11: Esquema de alimentación de estadios larvales tempranos de <i>Litopenaus vannamei</i> para los tratamientos de <i>T.chuii</i> en condiciones UAS y <i>T.chuii</i> experimental 0,2M glicerol.	64
Tabla 12: Esquema de alimentación de estadios larvales tempranos de <i>Litopenaus vannamei</i> para el tratamiento de <i>Chaetoceros gracilis</i> y <i>tetraselmis chui</i> (Treece and Yates 1990)	64
Tabla 13: estadios e índices de desarrollo durante el transcurso del experimento.	67
Tabla 14: % de supervivencia de las larvas de <i>L. vannamei</i>	67
Tabla 15: Tasa de crecimiento absoluto (TCA), relativo (TCR) y específico (TCE) para el peso (μg) de larvas de <i>L. vannamei</i>	68

RESUMEN

La microalga *Tetraselmis chuii* fue evaluada con respecto a su capacidad de crecimiento mixotrófico, producción de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAS) de interés para el cultivo de *Litopenaus vannamei*, así como lípidos totales, pigmentos, proteína y tamaño de microalga para su posterior evaluación el larvas tempranas de *L.vannamei* (NV-PZII). Inicialmente se realizó un experimento en condiciones mixotróficas y autotróficas en el que se utilizaron el glicerol y el acetato en concentración 0.1M en presencia y ausencia de ácido salicílico (SA) 10^{-4} M a 950 Lux, un control en condiciones de cultivo de la Unidad Académica de Sisal (UAS) a 6,000 Lux 24°C y en presencia de SA 10^{-4} M. La densidad celular de la microalga en condiciones UAS con 1.55×10^6 Cel·mL⁻¹ fue significativamente superior al resto de los cultivos $p > 0.05$. La presencia de SA en los tratamientos experimentales disminuyó la producción de PUFAS $p > 0.05$ y produjo un efecto negativo en la producción de EPA y ALA mientras que para el LA el efecto del ácido salicílico fue positivo. El uso del glicerol en los cultivos mixotróficos aumentó proporción de EPA y LA en comparación con el Acetato $p > 0.05$ y obtuvo el mayor porcentaje de PUFAS con 26.1 ± 1.7 %. Posteriormente se realizaron dos experimentos utilizando el glicerol en distintas concentraciones a 1,600 Lux cosechados al final de la fase de crecimiento exponencial y en la fase estacionaria. El tratamiento Glicerol 0.2M cosechado durante la fase estacionaria obtuvo mayor porcentaje de PUFAS con $39.9 \pm 1.9\%$ parece aumentar los lípidos totales $22.03 \pm 0.81\%$ así como la proporción de EPA $13.0 \pm 0.6\%$ y altos niveles de LA y ALA respecto al control. Los niveles de proteína y pigmentos de este tratamiento fueron muy similares al tratamiento UAS, además reduce su tamaño por lo que su ingestión para los estadios larvales tempranos de peneidos se facilita. Finalmente el tratamiento Glicerol 0.2M se evaluó como dieta exclusiva para la alimentación de larvas tempranas de *L.vannamei* (NV-PZIII) así como a una dieta control de *T.chuii* en condiciones UAS y un esquema de alimentación compuesto por *T.chuii* y *Chaetoceros gracillis*. El tratamiento Glicerol 0.2M resultó no ser viable para este fin debido a la alta contaminación producida por la interacción de la epifauna presente en el agua de los nauplios y el glicerol residual presente en las microalgas que impedía el desarrollo de las larvas en PZI.

ABSTRACT

The microalgae *Tetraselmis chuii* was evaluated with respect their ability of mixotrophic growth, production of polyunsaturated fatty acids (PUFAS) of interest for the cultivation of *Litopenaus vannamei*, as well as total lipids, pigments, protein and size of microalgae for subsequent evaluation on early larvae of *L.vannamei* (NV-PZII). Initially an experiment was carried out in mixotrophic and autotrophic conditions in which glycerol and acetate were used in concentration 0.1M in the presence and absence of salicylic acid (SA) 10^{-4} M to 950 Lux, a control under conditions of cultivation of the Unidad Académica de Sisal (UAS) to 6,000 Lux 24 ° C and in the presence of SA 10^{-4} M. The cell density of the microalgae grown in UAS conditions with 1.55×10^6 Cel·mL⁻¹ was significantly higher than the rest of the cultures $p < 0.05$. The presence of SA in experimental treatments decreased the production of PUFAS $p < 0.05$ and produced a negative effect on the production of EPA and ALA while for the effect of the salicylic acid was positive. The use of glycerol in mixotrophic cultures increased proportion of EPA compared to acetate $p < 0.05$, and obtained the highest percentage of PUFAS with $26.1 \pm 1.7\%$. Two experiments using glycerol in different concentrations to 1,600 Lux harvested at the end of the exponential growth phase and stationary phase were subsequently conducted. The Glycerol 0.2 treatment harvested during the stationary phase received the highest percentage of PUFAS $39.9\% \pm 1.9\%$, appears to increase the total lipids $22.03 \pm 0.81\%$ as well the proportion of EPA $13.0 \pm 0.6\%$ and high levels of LA and ALA respected to the control. Levels of protein and pigments of this treatment were very similar to the UAS treatment, also reduces its size making their intake for the early larval stages of penaeid. Finally the treatment Glycerol 0.2 was evaluated as exclusive diet for early *L.vannamei* larvae (NV-PZIII) as well as a diet with *T.chuii* in UAS conditions control and a feeding scheme composed of *T.chuii* and *Chaetoceros gracilllis*. Glycerol 0.2 treatment turned out to be viable for this purpose due to high pollution caused by the interaction of the epifauna present in the water of the nauplii and residual glycerol in microalgae that it prevented the development of larvae in the PZI.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de los camarones marinos, se ha convertido en una actividad rentable y generadora de divisas en varios países de América Latina mediante su exportación (Lobato 1988). En México la exportación total de camarón en el año 2012 fue de aproximadamente 29,000 toneladas con un valor de 283,000 millones de dólares, siendo el camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* uno de los peneidos más cultivados (CONAPESCA 2012).

Uno de los pasos críticos en la producción de estos organismos se encuentra en las etapas de desarrollo de larvas y postlarvas donde se producen las mayores tasas de mortalidad (Mourente et al 1995; Brito et al., 2004). Durante los primeros estadios la nutrición de estos organismos se basa en la filtración de microalgas, principalmente de diatomeas y flagelados, por lo que la cantidad y calidad del alimento son unos de los factores más críticos que afectan al desarrollo de las larvas aportando los elementos básicos para su metabolismo (Núñez et al., 2002).

Las larvas de camarones peneidos requieren de ácidos grasos poliinsaturados de la familia de los omega 3 y 6 especialmente ácidos grasos esenciales como los C20:5n3 y C22:6n3, ya que estos se relacionan con el crecimiento, la osmorregulación y la respuesta inmune (Palacios et al., 2004; Piña et al., 2006; Nonwachai y et al., 2010). En crustáceos la capacidad de síntesis de *novo* y la bioconversión de estas dos familias de ácidos grasos es limitada, por lo que deben de ser incorporados mediante la ingesta de microalgas o de los organismos que las consumen (Lavens y Sorgelos, 1996; Wen y Chen 2003; Nowachai et al., 2010).

Algunas especies de microalgas no contienen estos ácidos grasos esenciales en cantidades significantes, pero contienen altas concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados C6 y C8 con enlaces dobles y triples que son precursores de estos (Volkman et al., 1989; Guedes et al., 2011). Aunque la composición de ácidos grasos depende mayormente de la selección de cepa, los perfiles de estos pueden ser influenciados por las condiciones de cultivo (Vazhappilly y Feng 1998; Mata et al., 2010)

En este estudio se modificó la calidad lipídica de la microalga *Tetraselmis chuii* mediante cultivo, para su evaluación final en la alimentación de los estadios larvales del camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei*.

Generalidades de las microalgas

Las algas son un grupo polifilético de organismos, macro y microscópicos, de naturaleza procariota y eucariota, que, en general, son capaces de realizar la fotosíntesis oxigénica dentro de su perfil metabólico y que colonizan tanto ambientes acuáticos como terrestres (Prescott et al., 1999). Las microalgas son las algas que poseen una organización microscópica, pudiendo encontrarse microalgas unicelulares, filamentosas o coloniales. Cierta número de microalgas presentan asociación simbiótica con otros organismos aunque generalmente pueden encontrarse en vida libre e incluso poseer movilidad debida a la presencia de flagelos (Tomaselli, 2004).

La biodiversidad de microalgas es enorme y representa un recurso casi sin explotar. Se estima que existen entre de 200,000 y varios millones de especies pero sólo unos cuantos cientos de ellas son cultivadas en laboratorios y muy pocas han sido descritas en detalle y estudiadas por su potencial económico (Norton et al., 1996; Tredici, 2004).

Las microalgas requieren de aproximadamente de unos 19 elementos en mayor o menor concentración para un crecimiento normal. Además requieren de una temperatura adecuada, así como de la energía lumínica óptima para realizar la fotosíntesis, sin embargo al tratarse de un amplio grupo de organismos estos requerimientos variarán considerablemente entre especies. Durante la fotosíntesis utilizan la energía lumínica, junto con agua y dióxido de carbono para producir oxígeno y carbohidratos, convirtiendo la energía lumínica en energía química (Hosikian et al., 2010). Esta energía es utilizada principalmente para el crecimiento y reproducción llegando a complementar un ciclo completo en algunos días (Sheehan et al., 1998). Debido a que carecen de estructuras complejas invierten la mayor parte de la energía obtenida en su división. La división celular puede ocurrir de diversas formas, la más común se realiza mediante la fisión binaria en la que a través de la constricción de la pared celular o la invaginación de la membrana da como resultado dos células iguales. La reproducción sexual esta poco estudiada aunque aparece documentada por Shoichiro y Watanabe (1989) en una microalga primitiva de la familia *Prasinophyceae* la cual se produce por la fusión de dos células que dan lugar a un cigoto, sin embargo esto solo ocurre cuando las microalgas provienen de diferentes cepas. También Huber et al., (1986) realizando un estudio electroforético en el género *Tetraselmis* hallaron fenotipos característicos de heterocigosidad lo cual podría indicar ocurrencia de reproducción sexual.

Actualmente la producción de microalgas es de alrededor de 5.000 t/ año de materia seca con un valor aproximado de $1,25 \times 10^9$ dólares EE.UU. / año para aplicaciones en un amplio espectro de usos en industrias farmacéutica, cosmética, energética y sobre todo alimentaria (Muller-Feuga, 2000; Spolaore et al., 2006).

La producción de metabolitos de interés a partir de microalgas se logra mediante la modificación de las condiciones de crecimiento, pudiéndose extraer diversos compuestos químicos de gran valor tales como pigmentos, antioxidantes, b-carotenos, polisacáridos, triglicéridos, vitaminas, biomasa y ácidos grasos (Mata et al., 2010). Los ácidos grasos altamente poliinsaturados, HUFA por sus siglas en inglés, proveniente de microalgas tienen un mercado biotecnológico muy prometedor tanto para la alimentación humana como animal. Actualmente la producción comercial de HUFA, como el ácido ecosapentanoico (EPA) y el docosahexaenoico (DHA) proviene principalmente de aceites de pescado, sin embargo los costos de purificación son elevados (Barclay et al., 1994; Vazhappilly y Chen, 1998). Algunas de las ventajas que presentan los HUFA producidos por microalgas respecto a los aceites de pescado son la ausencia de olor y sabor desagradable, un reducido riesgo de contaminación química y un mejor potencial de purificación (Barclay et al., 1994; Vazhappilly y Chen, 1998; Pulz y Gross, 2004;). Algunas especies de microalgas tienen un alto contenido en HUFA, especialmente EPA y DHA, como lo son: *Monodus subterraneus*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Chlorella minutissima*, *Porphyridium cruentum*, y *Cryptocodinium cohnii* que han sido cultivadas en medios heterotróficos, utilizando carbono orgánico como fuente de carbono, consiguiendo cantidades significantes de EPA o DHA ($18\text{--}96 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) (Vazhappilly y Chen, 1998). Actualmente el DHA producido por una cepa del dinoflagelado *Cryptocodinium cohnii* está siendo comercializado por Martek Biosciences en Maryland (EEUU) mediante el crecimiento en fermentadores de manera heterotrófica obteniendo muy buenos resultados. (Radmer y Fisher, 1996).

Más de 40 especies de microalgas se utilizan actualmente en la acuicultura a nivel mundial, en función de las necesidades particulares de los organismos en cultivo (Pulz y Gross, 2004). Las microalgas son el alimento natural de muchas especies usadas en acuicultura y suponen la fuente principal de alimentación en estadios larvales y juveniles para muchas especies de crustáceos (Griffith et al., 1973; Jones, 1998;

Martinez-Cordova et al., 1998; Muller-Feuga, 2000). Estas contienen los requerimientos nutricionales y nutrientes de alto valor necesarios para el desarrollo y crecimiento entre los que se encuentran pigmentos, vitaminas y ácidos grasos altamente poliinsaturados (HUFA) (Brown et al., 1997; Pedrazzoli et al., 1998). Además de un perfil nutricional adecuado, existen otros criterios para la selección de las microalgas como: una buena digestibilidad, movilidad o un tamaño y forma celular que facilite su correcta ingestión (Glaude y Maxley 1994;). Es en la acuicultura donde el uso de microalgas tiene potenciales ventajas sobre la producción para consumo humano o piensos para animales terrestres ya que no precisa de cosechado, secado, almacenamiento y además presenta altas eficiencias de conversión. (Benemann, 1992). Algunas de las principales especies de microalgas utilizadas en acuicultura se encuentran en la Tabla 1.

Tabla 1: Principales géneros de microalgas utilizados en la acuicultura

Taxón	Géneros
Bacillariofitas	<i>Skeletonema, Chaetoceros, Phaeodactylum, Nitzschia, Thalassiosira</i>
Prymnesiofitas	<i>Isochrysis, Pavlova</i>
Prasinofitas	<i>Tetraselmis</i>
Clorofitas	<i>Chlorella, Scenedesmus, Dunaliella</i>
Cyanofitas	<i>Spirulina</i>
Eustigmatofita	<i>Nannochloropsis</i>
Criptofita	<i>Rhodomonas</i>

Tipos de cultivos

Cultivo foto-autótrofo

Los organismos foto-autótrofos son organismos que producen nueva biomasa a partir de recursos inorgánicos (dióxido de carbono y nutrientes minerales) y energía luminosa (Sages, 1994). Por lo tanto las condiciones de cultivo deben de proporcionar a las microalgas de estos dos requerimientos básicos para un crecimiento óptimo. Para ello se suministra la energía lumínica necesaria para la fotosíntesis a través de la luz solar o lámparas de luz y se realizan inyecciones de CO₂ por medio de tanques en el sistema de aireación.

Actualmente la mayoría de los sistemas de producción fotoautótrofos a gran escala son en estanques a cielo abierto y poco sofisticados (Borowitzka, 1999). La gran ventaja de estos estanques abiertos reside en su simplicidad resultando en bajos costos de producción y de operación. Estos sistemas pueden ser naturales como lagos lagunas y estanques o en estanques artificiales (Ugwu et al., 2008). Uno de los sistemas en estanque artificial usualmente utilizado son los llamados “raceways” donde las microalgas, agua y nutrientes avanzan por un circuito cerrado movidos por medio de una rueda de palas. Estos raceways deben de ser someros para permitir la difusión de la luz en la columna de agua (Singh et al., 2012). Sin embargo estos estanques a cielo abierto presentan numerosas desventajas como contaminación por otros organismos como bacterias, otras algas y depredadores, un bajo control sobre la temperatura y la iluminación incidente (Brennan et al., 2010) además de pérdidas por evaporación, difusión de CO₂ a la atmósfera y el requerimiento de grandes extensiones de tierras (Ugwu et al., 2008).

Para solventar estos problemas se están desarrollando numerosos sistemas cerrados y controlados para la producción de biomasa, son los llamados foto-biorreactores. Estos sistemas de producción presentan grandes ventajas ya que carecen de intercambio directo de gases con el ambiente minimizando la contaminación y permitiendo un mayor control de parámetros como pH, luz, concentración de CO₂ por medio de sensores (Singh et al., 2012) y la capacidad de poder ser utilizados en exterior aprovechando la luz natural (Borowitzka, 1999). Además el cultivo de microalgas en foto-biorreactores a menudo resulta en un incremento notable en la productividad, con incrementos de hasta un 60 y un 300%, y con alta reproductibilidad (Cohen y Arad, 1989)

Existen una infinidad de diseños de foto-biorreactores, sin embargo aún presentan limitaciones de productividad debidas al auto sombreado, producido por la alta densidad de células en el cultivo que limitan la luz disponible para su crecimiento (Cerón et al., 2005). El biofouling que se produce en las superficies y sensores, el estrés hidrodinámico, que causa daños a las células y problemas de escalabilidad del sistema (Singh et al., 2012; Day y Tsavalos 1996). Por lo que actualmente no existe un foto-biorreactor individual que reúna todas las características para ser un foto-biorreactor completo (Singh et al., 2012)

Mientras en acuicultura los sistemas predominantes son los sistemas en interior siendo el sistema “big bag” el más ampliamente utilizado a gran escala (más de 1000 L). Este sistema consiste en la utilización para el cultivo de largas bolsas de 0.5 m de diámetro con un sistema de aireación que generalmente operan en un sistema tipo *bach* (Borowitzka, 1999).

Sin embargo el principal problema de este sistema es la necesidad de su uso en interior para controlar la temperatura y debido al gran diámetro de las bolsas se requiere de la utilización de luz artificial. Esto unido a que los trabajos de operación son intensos y que a menudo una mezcla inadecuada produce colapsos en los cultivos hacen que este sistema sea costoso para la producción (Borowitzka, 1999).

Cultivo Heterotrófico

Generalmente las microalgas son consideradas como foto-autótrofas obligadas (requieren luz para su crecimiento) sin embargo ciertas microalgas son capaces de crecer en presencia de sustratos orgánicos (Wen y Chen, 2003). El cultivo heterótrofo utiliza un sustrato de carbono orgánico como azúcares o ácidos orgánicos como única fuente de carbono y energía. A menudo glucosa y acetato son las fuentes de carbono utilizadas para el cultivo de heterótrofo sin embargo otras fuentes de carbono incluyen mono-, di- y polisacáridos tales como fructosa, sacarosa, lactosa, almidón, aceites vegetales tales como aceites de linaza, maíz y canola que pueden promover el crecimiento y / o la producción de PUFA (Wen y Chen, 2003). Para reducir el costo de las fuentes de carbono orgánico, además de aguas residuales, diversas materias primas están siendo examinadas por su capacidad para apoyar el crecimiento de algas (Liang, 2013). Uno de estos sustratos de bajo costo que están surgiendo como subproducto de la producción de biodiesel es el glicerol crudo, que ha sido probado obteniendo resultados similares al glicerol puro o glucosa (Abad y Turon, 2012).

Este modo de cultivo al prescindir de la energía lumínica para el crecimiento de las células permite aumentar en gran medida la densidad celular y la productividad (Chen, 1996). Además las microalgas pueden ser cultivadas en fermentadores cuya tecnología ya se encuentra estandarizada para usos a gran escala en recipientes de más de 500,000 L reduciendo sustancialmente los costos de producción de biomasa y permitiendo un mayor grado de control. Otra ventaja que presenta es la gran densidad de células (>75g/L peso seco) que permiten reducir los esfuerzos de su cosechado (Lee, 2004).

No obstante el cultivo heterotrófico también presenta algunas desventajas como: el número de especies de microalgas que son capaces de crecer heterotróficamente es limitado, existe un incremento en el costo del medio de cultivo al añadir sustratos orgánicos, aumenta el riesgo de contaminación y competencia con otros microorganismos por dichos sustratos, puede ocurrir inhibición del crecimiento por exceso de compuestos orgánicos y la incapacidad de producir metabolitos inducidos por la luz (Chen, 1996).

Mixotrófico

El cultivo mixotrófico es una variante del cultivo heterotrófico donde CO₂ y carbono orgánico se asimilan de forma simultánea mientras el metabolismo respiratorio y el fotosintético operan simultáneamente (Lee, 2004). Mediante el cultivo mixotrófico se obtiene una alta productividad posiblemente debida a un efecto sinérgico del carbono orgánico y la luz, (Cid et al., 1992, Cerón et al., 2005) donde la tasa de crecimiento es aproximadamente la suma del crecimiento heterotrófico y foto-autotrófico (Lee, 2004). Este crecimiento requiere bajas intensidades de luz ya que las altas intensidades de luz no estimulan el crecimiento mixotrófico (Ukeles y Rose, 1976) pudiendo llegar, en algunas cepas, inhibir la toma de glucosa como sustrato orgánico (Lee, 2004). Las bajas intensidades de luz necesaria se traducen en una reducción en los costos energéticos (Cid et al., 1992) con el beneficio sobre el heterotrófico de poder de producir metabolitos fotosintéticos (Chen, 1996). Según Scheerer y Parthier los bajos niveles de lípidos insaturados encontrados en los cultivos heterotróficos son debidos a la reducción de la membrana de los cloroplastos la cual contiene cantidades considerables de lípidos insaturados (Scheerer y Parthier, 1982). Las microalgas que crecen bajo el régimen mixotrófico pueden aumentar los niveles de clorofila, carotenoides y el contenido de ácidos grasos altamente insaturados (Cerón et al., 2005). Además la luz deja de ser un factor limitante del crecimiento (Andrade y Costa, 2007) y reduce foto inhibición del cultivo (Chojnacka y Noworyta, 2004).

El cultivo mixotrófico generalmente se produce en sistemas cerrados debido a que uno de los mayores problemas del cultivo mixotrófico en sistemas abiertos es la contaminación bacteriana principalmente por *Rhodospseudomona spp.* Para ello la principal fuente de carbono utilizada en exteriores es el ácido acético ya que reduce considerablemente la contaminación bacteriana (Lee, 2004). Este tipo de cultivo permite reemplazar los foto-birreactores tubulares horizontales por reactores verticales de

burbujeo reduciendo el área de tierra necesaria, además, reduce el uso de dióxido de carbono cuyo precio es prohibitivo para su uso a gran escala (Cerón et al., 2005).

Uno de los mercados en donde mejor ha resultado el cambio del modo de cultivo, de autotrófico a mixotrófico, ha sido el cultivo de *Chlorella* que pasó de 200 toneladas por año en 1975 hasta llegar a las 2000 toneladas anuales en los 90's cambiando el modo de producir cultivos masivos, recortando costes de producción para generar una fuente de proteína económica para poder abastecer la creciente demanda de *Chlorella* como alimento básico para rotíferos y alevines en la industria de la maricultura (Lee 2004).

Tetraselmis chuii

Tetraselmis chuii fue descrita por Butcher en 1959 y se clasifica en la clase Prasinophyceae, dentro de la división Chlorophyta. De forma ovoide y con un tamaño entre 12-14 de largo por 9-10 μm de ancho presenta una gran distribución en los ecosistemas acuáticos continentales tropicales, encontrándose principalmente en estuarios y charcos de marea ricos en nutrientes (Aboal Sanjurjo et al 2012).

Son microalgas que se caracterizan por estar en constante movimiento debido a sus cuatro flagelos isodinámicos dispuestos en parejas enfrentadas, cuya fosa flagelar se caracteriza por la presencia de abundantes “pelos” en la zona inferior de la hendidura. Presentan estigmas en posición variable de la parte anterior a la posterior que le permite detectar la dirección e intensidad de la luz, así como vacuolas pulsátiles cuya función es la excreción y regulación de la presión osmótica además de una fina pared celular llamada teca. También presentan pirenóide de pequeño tamaño rodeado por pequeños granos de almidón (Hori et al., 1986). Estas células de color verde debido a la presencia de clorofila *a* y *b*, aunque también presenta otros pigmentos como los carotenoides.

La reproducción de *Tetraselmis chuii* es asexual y se produce mediante división celular binaria, momento en el cual las células pierden el estado móvil, y las dos células hijas ya están completamente flageladas antes de la liberación de la teca (Butcher 1959).

El género *Tetraselmis* es ampliamente utilizado en acuicultura y es muy adaptable a las condiciones de cultivo tanto en exterior con luz natural como en condiciones de laboratorio con iluminación artificial (Griffith 1973). También se ha reportado que este género es capaz de utilizar sustrato orgánico como principal o única fuente de carbono

(Day y Tsavalos 1996, Cid et al., 1992). Debido a su facilidad para crecer en una amplia gama de condiciones ambientales físico-químicas Harel y Place describen este género como “uno de los ejemplos de adaptación a cambios ambientales extremos” (Harel y Place 2004).

En cuanto a las condiciones óptimas de crecimiento según Murtidjo (2003) recomienda: un pH de aproximadamente 7 a 8, una salinidad entre 27 ppt -32 ppt, una temperatura entre 23-25 ° C y una intensidad de la luz de 3,000 lux para las necesidades de la fotosíntesis. Sin embargo Ghezelbahs et al en 2008 reportaron que las mayores densidades celulares obtenidas con esta microalga fueron en cultivos realizados a 4,500 Lux y una salinidad de 40 ppt. La intensidad lumínica utilizada en distintos trabajos con *Tetraselmis chuii* ha variado desde los 1,000 lux hasta los 8,800 lux (Costa et al 2004; Meseck et al 2007; Khairy y El-Sayed 2011)

Esta microalga debido a su papel como productor primario en la cadena alimentaria acuática tiene una alta relevancia ecológica. Por ello ha sido utilizada como representante de fitoplancton marino en múltiples estudios ecotoxicológicos como la toxicidad de hidrocarburos policíclicos aromáticos, de oxitetraciclina y fluorfenicol, de fracciones solubles en agua de biodiesel, o de productos farmacéuticos como diazepam, clofibrato, y ácido clofibrato (Nunes et al., 2005, Ferreira et al., 2007, Leite et al., 2011, Vieira y Guillerminho 2012). También ha sido utilizada en estudios de los efectos de metales pesados como plomo, cadmio, cobre y mercurio resultando ser un modelo recomendando para estimar el efecto tóxico de xenobioticos en aguas marinas tropicales (Cordero et al., 2005). *Tetraselmis chuii* también ofrece una alta tolerancia al arsénico, e incluso un buen crecimiento, aun a niveles tan altos como 50mg·L⁻¹ (Irgolic et al., 1977).

Lípidos en microalgas

El metabolismo lipídico de las algas es similar al de plantas superiores, especialmente en la biosíntesis de ácidos grasos y triglicéridos. La fracción lipídica que encontramos en las microalgas generalmente están compuestas por triacilgliceroles, ácidos grasos libres, ceras, esteroides, hidrocarburos, glucolípidos, fosfolípidos, pigmentos así como compuestos inusuales tales como ácidos grasos halogenados e hidroxilados, alquenonas de cadena larga, entre otros (Hernyez et al., 2009). El contenido lipídico en las microalgas por lo general constituyen del 20 al 50% de su peso seco (Arredondo y

Vázquez-Duhalt, 1991) el cual varía en función de la especie y no del género, por lo que existe gran variación en la composición entre las especies de cada grupo taxonómico (Ben-Amotz et al., 1985; Hu et al., 2008). Además las condiciones físicas y químicas de cultivo, tales como la fase de crecimiento, la disponibilidad y la clase de nutrientes, la salinidad, fuentes de carbono, periodos e intensidad de luz, la temperatura, el pH, e incluso, la asociación con otros microorganismos alteran la producción y composición de los lípidos (Hernyez et al., 2009). Las estructuras de estas moléculas están compuestas por largas cadenas hidrocarbonadas, unidades de isopreno y grupos funcionales diversos (Hernyez et al., 2009).

Síntesis de ácidos grasos

La composición de ácidos grasos de las microalgas comúnmente incluye moléculas lineales de 12 a 22 átomos de carbono en número par, saturadas e insaturadas. Existe una variación en los niveles de saturación entre microalgas dulceacuícolas y marinas siendo mayor la proporción de ácidos grasos saturados y mono insaturados en las primeras, mientras que en especies marinas los ácidos grasos poliinsaturados constituyen la mayor fracción de ácidos grasos (Cohen, 1986; Hu et al., 2008; Griffiths y Harrison, 2009)

La síntesis de ácidos grasos de *novo* se producen en el interior de los cloroplastos. La síntesis comienza cuando una molécula de acetil-CoA, derivado del piruvato proveniente de la glucólisis, se carboxila por medio de la enzima acetil-CoA carboxilasa dependiente de ATP para su conversión en malonil-CoA. Esta molécula por medio de 7 ciclos de adición descarboxilativa es convertida en unidades acilo y β -reducción, catalizados por el sistema ácido graso sintetasa, hasta producir moléculas de 16 carbonos (ácido palmítico (16:0)) y de 18 carbonos (ácido oleico (18:1 n-9)) ambos ácidos grasos saturados. Estos ácidos grasos serán los precursores de las moléculas poliinsaturadas, a su vez producidas mediante mecanismos de desaturación aerobia y elongación (Hernyez et al., 2009).

Síntesis de Ácidos grasos poliinsaturados

La síntesis de ácidos grasos poliinsaturados comienza con el ácido oleico (18:1 n-9) como precursor que es desaturado por medio de la Δ 12 desaturasa para convertirse en ácido linoleico (18:2 n-6) el primero de la serie omega 6 y posteriormente en ácido α -linolenico (18:3 n-3) mediante la omega 3 desaturasa.

La vía más común para la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga es mediante las enzimas $\Delta 6$ -desaturasa/ $\Delta 6$ -elongasa. Mediante esta vía el DHA es sintetizado a partir del ácido α -linolenico (18:3 n-3) por adición de un doble enlace por la desaturasa para formar ácido estearidónico (18:4 n-3) y posteriormente elongado por $\Delta 6$ -elongasa para formar ácido eicosatetraenoico (20:4 n-3) y añadiendo otro doble enlace por medio de la $\Delta 5$ -desaturasa se obtiene el ácido ecosapentanoico (EPA) 20:5 n-3, este a su vez será elongado para formar el ácido docosapentanoico (22:5n-3) que finalmente al añadir un doble enlace por medio de la $\Delta 4$ -desaturasa formara el ácido docosahexanoico (22:6 n-3) DHA (Guedes et al 2011). Fig. 1.

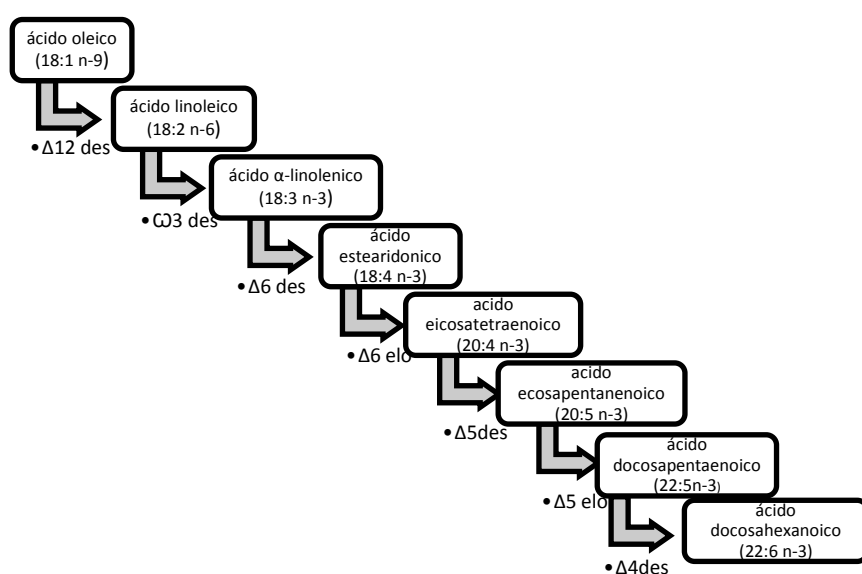


Figura 1: Esquema de la ruta de formación de DHA a partir de ácido α -linolenico por la vía $\Delta 6$ -desaturasa / $\Delta 6$ -elongasa y las enzimas involucradas

Una vía menos común es la $\Delta 9$ -elongasa / $\Delta 8$ -desaturasa donde el ácido linoleico (18:2 n-6) o el α -linolenico (18:3 n-3) son primero elongados por la enzima $\Delta 9$ -elongasa para conseguir ácido eicosadienoico (20:2 n-6) o eicosatrienoico (20:3 n-9) y posteriormente desaturado por la $\Delta 8$ - desaturasa para formar ácido dihomo- γ -linolenico (20:3 n-6) o ácido eicosatetraenoico (20:4 n-3), El ácido ecosapentanoico (EPA) 20:5 n-3 es elongado por medio de la $\omega 3$ -DPA y un doble enlace se añade por medio de la $\Delta 4$ -desaturasa para generar DHA. Fig. 2.

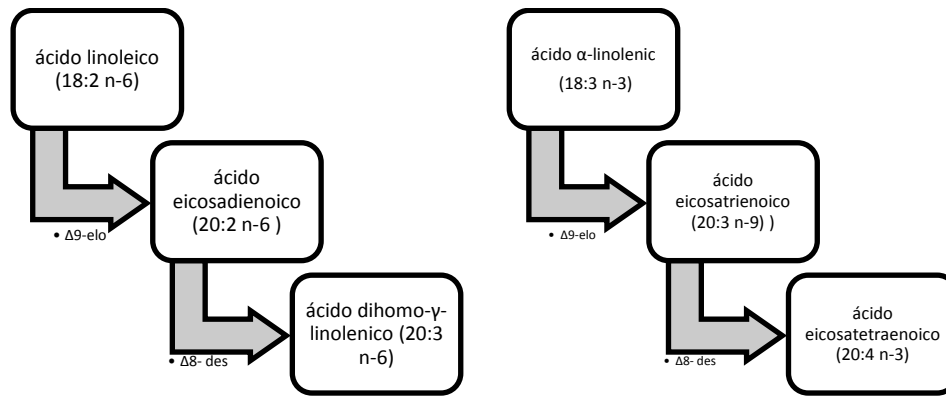


Figura 2: Esquema de la ruta de formación de ácido dihomo-γ-linolenico y ácido eicosatetraenoico por la vía Δ9-elongasa /Δ8-desaturasa y las enzimas involucradas.

Sin embargo, a pesar de varias décadas de investigación, algunos de los pasos de la biosíntesis de los ácidos grasos insaturados relevantes en microalgas, todavía no se conocen con certeza (Skulberg, 2004).

Desarrollo larvario de *Litopenaeus vannamei*

El camarón blanco *Penaeus vannamei* (Boone 1931) actualmente *Litopenaeus vannamei* (Pérez –Farfante y Kensley 1997) es un camarón peneido nativo de la costa Pacífica del continente americano. Su rango de distribución geográfico abarca desde el golfo de California en México hasta la costa norte de Perú y su distribución batimétrica se encuentra entre de los 5 y los 72 metros de profundidad. De hábitos bentónicos en su fase adulta se les localiza generalmente en fondos lodosos cercanos a la costa. La copula y el desove se realiza en mar abierto en aguas de mayor profundidad. (FAO 1980)

Como otras especies de peneidos cambia su morfología durante las distintas etapas de su ciclo biológico. Después de la eclosión las larvas de *Litopenaeus vannamei* presenta tres estadios larvarios planctónicos con diferentes subestadios: el estadio naupliar que consta a su vez de cinco subestadios (NI-NV), el estadio de protozoa compuesto por tres subestadios (PZI a PZIII) y finalmente el estadio de Mysis que lo componen otros tres subestadios (MI a MIII) (Figura 3). Finalizado su ciclo larval es considerado postlarva y migra de mar abierto hacia estuarios y lagunas cambiando sus hábitos planctónicos por semi-bentónicos (Fenucci 1988).

Durante el estadio naupliar se alimenta de las reservas del vitelo del huevo, nada intermitentemente por medio de sus antenas y es fototáctica positiva. A partir de PZI, las larvas comienzan la alimentación exógena volviéndose filtradoras de fitoplancton y su natación se da por medio de los apéndices cefálicos. Durante la fase de Mysis cambia

de hábitos alimenticios empezando a depredar zooplancton aunque continua alimentándose de fitoplancton. Esta fase se caracteriza por una natación muy característica con la cabeza hacia abajo y avanzando hacia atrás (Citano y Alvarado 1981, Fenucci, 1988). Su morfología también presenta grandes cambios donde el abdomen se alarga y se presenta la aparición del molino gástrico para el fraccionamiento de las partículas alimenticias, así como el inicio de la formación de la glándula digestiva (Libet, y Folder, 1990).

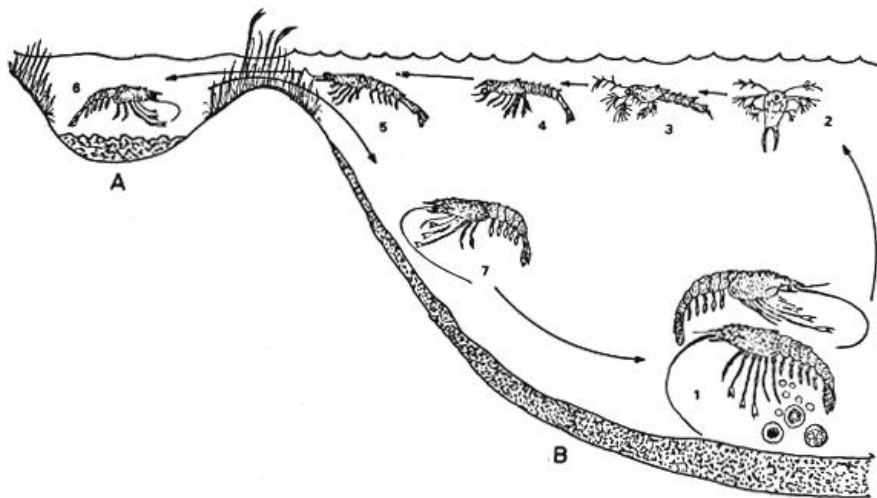


Figura 3: Ciclo vital de un camarón peneido típico: 1: maduración y reproducción; 2: nauplio; 3: protozoas; 4: mysis; 5: postlarvas; 6: juveniles; 7: adultos. A: estuarios; B: Mar abierto

ANTECEDENTES

Tetraselmis Chuii

En acuicultura este género es ampliamente recomendada para la alimentación de organismos marinos herbívoros (Griffith 1973; Khairy y El-Sayed 2011), principalmente debido a sus propiedades nutricionales como su alto contenido de proteínas, lípidos, ácidos grasos esenciales y esteroides es de gran aplicación en cultivos de peces y crustáceos, especialmente en sus estados larvarios (Khairy y El-Sayed 2011). Este género se suele utilizar generalmente en combinación con diatomeas a fin de garantizar un perfil nutricional adecuado para animales de pastoreo (Wilkenfeld et al., 1984; Gallardo et al., 1994; D'Souza Loneragan, 1999 ;Piña et al., 2005)

A continuación se citan cronológicamente algunos de los estudios realizados con esta microalga en crustáceos, especialmente camarones peneidos, así como otros trabajos en los que se presentan mejoras en el cultivo esta especie:

Tobias-Quinitio y Villegas (1981) compararon el crecimiento, la supervivencia y la composición de macronutrientes de larvas *Penaeus monodon* desde PZI a MIII alimentadas con *Chaetoceros calcitrans* y *Tetraselmis chuii*. La supervivencia y las tasas de crecimiento fueron de significativamente superiores en las lavas alimentadas con *C.calcitrans* en el segundo y tercer día de cultivo, pero no difirió durante la etapa de Mysis y el final del periodo de cultivo. Los autores señalaron que las diferencias en la supervivencia y las tasas de crecimiento durante el segundo y tercer día pudieron atribuirse al tamaño de célula de *T.chuii*, mayor que *C. calcitrans*, que no pudo ser ingerido en cantidad suficiente para el estadio de protozoa produciendo una fuerte disminución en la población. Esto explicaría el bajo contenido en lípidos de las larvas alimentadas con *T. chuii* en PZIII frente a las alimentadas con *C.calcitrans* que contenía una menor proporción de este nutriente. El porcentaje de proteína cruda del tratamiento de *T.chuii* fue superior para protozoas y Mysis.

Kuban et al., (1985) compararon la supervivencia, metamorfosis y el crecimiento de cuatro especies de larvas de peneidos (*Penaeus aztecus*, *P. setiferus*, *P. vannamei* y *P. stylirostris*) después de ser alimentados con una combinación de diatomeas (*Skeletonema costatum* y *Chaetoceros gracilis*) y otro tratamiento de solo flagelados (*Isochrysis sp.* y *Tetraselmis chuii*), ambos solos o en combinación con nauplios de

Artemia. Los resultados mostraron que todas las especies de larvas alimentadas únicamente con flagelados retrasaron su metamorfosis a Mysis. La supervivencia y el crecimiento de las larvas también fueron significativamente mejor para las larvas alimentadas con las diatomeas.

Kurmaly et al, (1989) realizaron un balance de energía de *T.chuii* frente a un microencapsulado para las larvas de *Penaeus monodon* desde PZI hasta PLI. La tasa de ingestión de *T.chuii* aumento hasta la fase MII donde comenzó a descender. La relación de tasa de ingestión y peso-específico para las larvas alimentadas con *T. chuii* mostraron una disminución constante con el peso, después de una fuerte caída en PZII. Las diferencias de asimilación entre las larvas alimentadas con la microalga y con la dieta encapsulada fueron mínimas. Sin embargo se calculó que la masa necesaria de alimento artificial necesario para cubrir los requerimientos de energía de las larvas es un 15% mayor que para *T.chuii*.

Kurmaly et al, (1989) realizaron un análisis comparativo del crecimiento y la supervivencia de las larvas *Penaeus monodon* desde PZI a PLI alimentadas con varias microalgas, entre las que se incluía *T.chuii*, dietas artificiales y en combinaciones de ambos. El tratamiento que obtuvo la mayor supervivencia fue el que incluía *T.chuii* y *Rhodomonas báltica* combinada con una dieta comercial microencapsulada en proporción 1:1 con un 68.97% de supervivencia desde PZI a MI, mientras que el tratamiento que contenía únicamente *T.chuii* la supervivencia fue del 66.15% desde PZI a PL. La mejor tasa de crecimiento obtenida fue para el tratamiento de *Rhodomonas báltica*. El análisis bioquímico obtenido para *Tetraselmis chuii* fue de un 48.8% de proteínas, un 24,7% carbohidratos, un de 4.3% lípidos y 22,2% ceniza.

Glaude y Maxey (1994) evaluaron la producción heterotrófica de varias cepas de microalgas, entre las que se incluía una cepa de *T.chuii*, con diferentes fuentes de carbono como glucosa, glicerol o una mezcla de acetato, lactato y glutamato. Para *T.chuii* el resultando fue positivo el tratamiento que contenía glucosa.

Gallardo et al (1994) crearon el primer esquema de alimentación básico para la alimentación de larvas de *Penaeus setiferus*. Este estaba compuesto por la diatomea *Chaetoceros cerutosporum*, *Tetraselmis chuii* y nauplios de *Artemia*. En los análisis realizados para calcular la concentración optima de *T.chuii* la tasa de crecimiento máxima entre PZI y PLI se obtuvo con $3 \times 10^3 \text{ Cel}\cdot\text{mL}^{-1}$, mientras que el mayor índice

de desarrollo en el estadio de PZIII fue de $1 \times 10^3 \text{ Cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ y la máxima supervivencia obtenida (52%) entre PZI y PL contaba con $3 \times 10^3 \text{ Cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ al igual que para el índice de calidad y el índice de rendimiento. En combinación con *C. cerutosporum* las mayores tasas de crecimiento y desarrollo de las larvas fueron con 2 y $3 \times 10^3 \text{ Cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ de *T.chuii*, respectivamente. Al ser alimentadas únicamente con *C. cerutosporum* la supervivencia y el índice de calidad disminuyeron, posiblemente debido a que la combinación de ambas microalgas podrían proporcionar la concentración óptima de lípidos requeridos para las larvas de *L. setiferus*. En este esquema recomendado para estadios larvales de *L. setiferus* el flagelado *T.chuii* y la diatomea *C. cerutosporum* se administran desde PZI hasta PLI.

Marín-Magán, y Cañavate (1995), utilizaron *T. chuii* en un estudio para evaluar la preferencia de las larvas de *Penaeus japonicus* durante PZII-PZIII y el estadio de MI entre la microalga y microcapsulas de pared proteica con tamaños similares. El resultado sugiere las larvas de protozoa ingirieron ambas en proporciones similares. Mientras que las larvas en MI mostraron una ingestión de *T.chuii* muy por debajo del control.

En 2000 postlarvas de *Litopenaeus setiferus* fueron alimentadas bajo cuatro regímenes alimentación que incluían combinaciones de nauplios de Artemia, una dieta comercial de micropartículas, y una combinación de *Tetraselmis chuii* y *Chaetoceros gracilis*. El tratamiento que incluía la mezcla de microalgas mostró una tasa de crecimiento significativamente más alta que los tratamientos donde estas estaban ausentes pudiendo influir como fuente de vitaminas u otros micronutrientes para necesarios para las postlarvas.(Brito et al., 2000)

Durante un estudio sobre el efecto de la alimentación en larvas de camarón limpiador *Lysmata amboinensis*, Cunha et al.,(2008) utilizaron las microalgas *Tetraselmis chuii*, *Chaetoceros gracillis* y un tratamiento de ayuno como alimentación experimental para el estadio de PZI. Al finalizar las primeras 24h observaron que el contenido de proteína soluble era significativamente mayor en los camarones alimentados con *Chaetoceros gracillis*, mientras que la actividad de la enzima tripsina de las larvas alimentadas con *Tetraselmis chuii* fue significativamente mayor que el resto de los tratamientos.

Esta microalga generalmente es cultivada en medio *F* o *F/2* (Guillard, 1975) sin embargo en un experimento realizado por Khairy y El-Sayed (2011) utilizando cuatro

medios de cultivo diferentes, incluyendo este, observaron que las mayores concentraciones celulares fueron alcanzadas con el medio Erdschriber obteniendo una diferencia significativa. Además el contenido de proteína total así como el contenido de lípidos totales también fueron significativamente superiores, especialmente el contenido en ácidos grasos poliinsaturados

Kokou et al., (2012) reportaron la presencia de actividad antimicrobial para esta microalga ante cuatro de cepas de bacterias *Vibrio* utilizadas: *V. lentus*, *V. splendidus*, *V. scophthalmiy* y *V. parahaemolyticus* impidiendo su crecimiento en 44 horas después de su inoculación y no pudiendo ser detectados al final del experimento. Esto apoya lo encontrado por Makridis et al., (2006) donde *T. chuii* reduce la carga microbial presente un cultivo de *Artemia* enriquecida, especialmente las bacterias del genero *Vibrio* y algunas cepas gram negativas.

Litopennaus vannamei

Las larvas de los camarones peneidos generalmente son alimentadas con diferentes especies de microalgas, y la cantidad y calidad de estas son unos de los factores más críticos que afectan a su desarrollo (Núñez et al., 2001). Los cultivos con dietas mono específicas pueden causar deficiencias nutricionales afectando al crecimiento y supervivencia de la larva (Piña et al., 2005). Algunas microalgas pueden incrementar la supervivencia de las larvas mientras que otras tienen buen crecimiento pero baja supervivencia o viceversa. Estas diferencias pueden ser debidas al tamaño o la composición química de la microalga (Tobias-Quinitio, 1981).

La diatomea *Chaetoceros gracilis* es la microalga que mejores resultados ha dado como alimento exclusivo de larvas de *Litopennaeus vannamei*. También microalgas como *Chaetoceros calcitrans*, *Isochrysis galbana*, *Skeletonema sp*, *Tetraselmis suecica* y *Tetraselmis chuii* han sido utilizadas con más o menos éxito en diferentes combinaciones (Simón, 1978; Kuban, 1985; Sangha, 2000; Piña et al., 2005). Sin embargo las larvas de *L. vannamei* durante los primeros subestadios de protozoa demuestran una clara preferencia por el uso de diatomeas frente a los flagelados, (Núñez et al., 2001; Piña et al., 2005). Según algunos autores (Tobias-quinitio y Villegas, 1982; Gallardo et al., 1994; Núñez et al., 2001) esta preferencia puede ser debido a la

diferencia entre el tamaño la boca de las larvas de los peneidos y el tamaño de las células flageladas, generalmente mucho mayor que las diatomeas, que impiden su ingestión. Esto contradice a las observaciones al microscopio realizadas por Galgani et al (1988) donde aseguran que las larvas de *L.vannamei* son capaces de absorber partículas de tamaños inferiores a 35µm en PZI y de 50 µm para PZII. Además el flagelado *Tetraselmis chuii* es utilizado en esquemas de alimentación de *L.vannamei* desde la fase naupliar (Trece and Yates 1990) al igual que para *L.notialis* y *L.schmitti* Leal et al (1985).

En general, los elementos nutricionales requeridos de las microalgas para un alta supervivencia en larvas de peneidos son: un contenido de proteínas mayor del 25% de su masa seca, un 8–30% de carbohidratos y alrededor de un 10% de lípidos, especialmente ácidos grasos como los C20:5n3 y C22:6n3 (Tobías-Quinito y Villegas, 1982)

Las larvas de peneidos tienen un requerimiento absoluto de ácidos grasos insaturados de cadena larga especialmente de EPA y DHA ya que parecen promover su crecimiento (Piña et al., 2005). También se ha observado que la resistencia al estrés en larvas de crustáceos está relacionada con la presencia de niveles adecuados de PUFAS principalmente EPA, 20:5n-3 y DHA, 22:6n-3 (Dhert et al., 1992). En particular ante estrés salino la administración de dietas con alto contenido de HUFA en postlarvas de *L.vannamei* tiene un efecto beneficioso en la supervivencia. Esto se encuentra relacionado con la modificación de la composición de ácidos grasos de las branquias y con el aumento de superficie de estas, mejorando los mecanismos osmorreguladores Na^+/K^+ -ATPasa y la actividad de la anhidrasa carbónica (Palacios et al., 2004).

Montaño y Navarro (1996) realizaron un estudio sobre la composición de ácidos grasos entre larvas de *L.vannamei* de vida libre y cultivada encontraron que los niveles de DHA y EPA eran significativamente mayores en los primeros, mientras que los procedentes de cultivos la cantidad de 18:3n-3 era mucho mayor. Estas diferencias en la composición de ácidos grasos se debieron principalmente a la dieta natural de las larvas en estado salvajes.

Los ácidos grasos poliinsaturados también afectan significativamente la respuesta inmune de las larvas de *Litopenaeus vannamei*. Nonwachai y colaboradores (2010)

realizaron un estudio donde las larvas fueron alimentadas con microalgas cultivadas heterotróficamente con un alto contenido DHA y ARA. Posteriormente las larvas fueron expuestas ante la bacteria *Vibrio harveyi* mostrando una mejora en parámetros inmunológicos como total de hemocitos, actividad de fenoloxidasa, actividad superóxido dismutasa, y actividad bactericida.

Litopenaeus vannamei presenta una fuerte adaptación a este estadio inicial de herbivoría presentado una producción de la enzima tripsina a partir de PZI mucho mayor que en otros peneidos (Jones et al., 1993). Esto le permite extraer rápidamente más componentes digeribles de la microalga obteniendo una baja eficiencia de asimilación pero una alta ganancia de energía neta. La producción y actividad de la tripsina tiene un pico entre PZII y Mysis I como consecuencia de los cambios en los hábitos alimenticios (hábito raptorial), morfológicos (aparición de la glándula digestiva) entre otros (Lovett y Felder, 1989; Gallardo et al., 1994). Mientras la actividad de la lipasa que está presente desde la fase naupliar alcanza la mayor actividad durante los estadios de PZII Y PZIII (Rivera-Pérez, 2010).

Salicilatos, glicerol y ácido acético

Salicilatos

Los salicilatos constituyen un grupo de compuestos derivados del ácido salicílico (SA), una fitohormona muy utilizada en medicina cuyo producto más popular es el ácido-acetil-salicílico más conocido como *Aspirina* producida por la Bayer Company desde 1898 (Raskin, 1992). Los salicilatos han sido ampliamente utilizados en muchos tratamientos en plantas superiores observándose efectos como la inducción a la floración, crecimiento, desarrollo, inhibición de la síntesis de etileno, incremento de la fotosíntesis, resistencia ante patógenos, disminución de estrés y expresión de genes entre otros. (Enyedi et al., 1992; Raskin, 1992; Gutiérrez-Coronado, 1998; Rhoads y McIntosh, 1992; Jordán y Casaretto, 2006). Sin embargo la literatura acerca de su aplicación en microalgas es muy escasa, la cual se cita a continuación:

En 2002 Czerpak y colaboradores realizaron el primer estudio de la actividad del ácido salicílico en microalgas con la especie *Chlorella vulgaris* en diferentes concentraciones. El mayor efecto del SA resultó en un incremento en el número de células 23-40 % respecto al control. También el contenido de ADN y ARN se aumentó en un 60 %. El SA estimulo intensamente la producción de azúcares un 40.7% y las proteínas en un

60% además se observó una excreción extracelular de proteínas, algo nunca antes observado en microalgas. La intensidad fotosintética se vio incrementada en un 32.6 % así como el contenido de clorofila a y b en las células que aumentaron en un 28-50 % y 36-70 % respectivamente, el contenido de carotenoides también se incrementó en un 33-57 %.

En 2006 Kovácik y su equipo estudiaron el efecto del cobre, el ácido salicílico y una combinación de ambos sobre la producción de ácidos fenólicos y aminoácidos libres en *Scenedesmus quadricauda*. Los resultados mostraron que el cobre produjo una disminución en la producción de clorofila mientras que SA la estimulaba. La producción de proteínas solubles totales y fenoles solubles se deprimieron con el tratamiento Cu, mientras que SA no tuvo ningún efecto.

En 2012 Gao y colaboradores consiguieron por medio del ácido salicílico la inducción en la expresión transcripcional de ocho genes de carotenoides. La acumulación de astaxantina en *Haematococcus pluvialis* se incrementó significativamente consiguiendo una concentración de 2.74 mg/L.

Glicerol y ácido acético

El ácido acético y el glicerol han sido utilizados en diversos trabajos como fuentes de carbono orgánico tanto para cultivos heterótrofos como mixotróficos. Algunos de estos estudios se citan a continuación:

En 1995 Vazhappilly y F.Chen estudiaron el crecimiento heterotrófico de 20 cepas de microalgas con potencial para la producción de EPA y DHA utilizando glucosa y acetato como fuentes de carbono. La mayoría de la microalgas estudiadas mostraron un crecimiento positivo en glucosa mientras que de las doce que podrían crecer en acetato solo la microalga *Cryptocodinium. Cohnii* mostro un buen crecimiento en acetato mientras que otras tres microalgas presentaron un crecimiento moderado en este medio.

En 1997 el equipo de investigación encabezado por Kitano aislaron tres cepas de microalgas silvestres que identificaron como *Navicula saprophila*, *Rhodomonas salina* y *Nitzschia sp.* Estas cepas fueron cultivadas en presencia de ácido acético como sustrato a diferentes temperaturas con y sin iluminación. La proporción de EPA

aumentó en presencia del ácido acético en *Rhodomonas salina* y *Nitzschia sp.* Sin embargo, la cepa de *Navicula saprophila* mostró la mayor productividad y contenido de EPA, además su biomasa fue mejorada bajo condiciones mixotróficas en la presencia de ácido acético. A bajas temperaturas y en ausencia de ácido acético el contenido de EPA decayó considerablemente para las cepas de *Rhodomonas salina* y *Nitzschia sp.* Contrariamente en presencia del sustrato estas cepas mostraron los niveles más altos de EPA.

En 2001 la microalga *Cryptocodinium cohnii* fue cultivada con acetato de sodio como fuente de carbono manteniendo a pH constante y otro cultivo que contenía glucosa como sustrato. Los resultados revelaron que la acumulación de lípidos en el cultivo con acetato de sodio fue significativamente mayor que en glucosa. (Ratledge et al., 2010)

En 2005 Cerón y colaboradores investigaron el uso de varias fuentes de carbono, entre las que se incluía el glicerol, en el cultivo mixotrófico y heterotrófico de la microalga *Phaeodactylum tricorutum*. Los resultados mostraron que esta microalga solamente era capaz de crecer heterotróficamente en glucosa. Sin embargo bajo condiciones mixotróficas podía crecer en diferentes sustratos como el glicerol, que mostro ser el medio más estimulador para la producción de clorofila, carotenoides y ácidos grasos. Cabe destacar que el uso de glicerol en esta microalga aumentó considerablemente los niveles EPA.

En 2005 se investigó la capacidad de utilización de glicerol como fuente de carbono de la cianobacterias *Spirulina platensis* en cultivo heterotrófico. Los resultados mostraron un decaimiento en la producción de los pigmentos clorofila a y ficocianina, mientras que el crecimiento fue comparable a las condiciones del control al igual que el contenido de lípidos. Sin embargo se encontraron variaciones en el los perfiles de ácidos a distintas concentraciones, destacando un incremento significativo en la producción del ácido graso poliinsaturado γ -linoleico a la mayor concentración de glicerol (Yrade y Costa,2007).

JUSTIFICACIÓN

La microalga *Tetraselmis chuii*, ha sido ampliamente utilizada en la alimentación de peneidos en combinación con diatomeas desde los estadios larvales de nauplios y PZI (Alfonso 1985; Trece and Yates 1990; Gallardo et al 1995) ya que presenta un amplio perfil de ácidos grasos altamente insaturados, sin embargo en varios artículos publicados donde se muestran dichos perfiles la proporción de EPA y DHA es baja llegando incluso a estar alguno ausente (Dunstan et al., 1992, Brown et al., 1997). El cultivo mixotrófico de microalgas podría estimular la producción ácidos grasos altamente insaturados, como el ácido eicosapentanoico (EPA) usando glicerol o ácido acético como fuente de carbono (Kitano et al., 1997; Cerón et al., 2005).

Como se mencionó anteriormente Glaude y Maxey 1994 probaron la producción heterotrófica en *T.chuii* dando positivo en glucosa y negativo en acetato y una combinación de compuestos orgánicos que incluía glicerol. Sin embargo en ese estudio se observa que en distintas especies del mismo género, como en el caso *T. suecica*, se reportaron tres resultados diferentes según las cepas utilizadas, mientras que para *T. chuii* solo fue probada en una cepa. Además existe el precedente de *P. tricornutum*, una microalga que al ser cultivada con glicerol como fuente de carbono de manera heterotrófica no presentaba crecimiento, mientras que en un ambiente mixotrófico crece satisfactoriamente estimulando incluso la producción de EPA (Cerón et al., 2005).

En este estudio también se pretende evaluar el efecto del ácido salicílico en *T.chuii*. No se ha encontrado que el ácido salicílico haya sido probado en esta microalga ni en ninguna otra microalga bajo condiciones mixotróficas, sin embargo se espera un comportamiento similar al utilizado en cultivos fototróficos aumentando el número células y producción de clorofila (Czerpak et al., 2002; Kovácik et al., 2006). Además en los escasos antecedentes acerca del uso de ácido salicílico en microalgas no existe ninguna evaluación de cómo afecta a la producción de lípido ni ácidos grasos poliinsaturados.

Un mejoramiento en la calidad lipídica de *T.chuii*, especialmente en ácidos grasos altamente polinsaturados como DHA y EPA, podría afectar positivamente a los cultivos larvales de *L.vannamei* ya que estos ácidos grasos parecen estar relacionados con el crecimiento, la osmorregulación y la respuesta inmune (Palacios et al., 2004; Piña et al., 2006; Nonwachai y et al., 2010).

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar los cambios en la producción de ácidos grasos y la composición bioquímica de la microalga *Tetraselmis chuii* cultivada en dos medios mixotróficos (glicerol y ácido acético) suplementada con ácido salicílico, y su efecto en el desempeño nutricional de las larvas tempranas de *Litopenaeus vannamei*.

Objetivos particulares

- a) Realizar un cultivo preliminar con los sustratos orgánicos (glicerol y ácido acético) y ácido salicílico para reconocer cuál de los medios tiene mayor repercusión en la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados de *T.chuii* y definir las cinéticas de crecimiento.
- b) Seleccionar el medio que posea mayor repercusión en la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados (especialmente DHA y EPA) y realizar cultivos a distintas concentraciones en las fases final exponencial y estacionaria de la curva de crecimiento.
- c) Determinar las variaciones en el perfil de ácidos grasos, lípidos totales, proteínas, pigmentos, cinética de crecimiento y biomasa de *Tetraselmis chuii* cultivadas con el medio seleccionado en las distintas fases de crecimiento y concentraciones.
- d) Seleccionar la fase de crecimiento y la concentración en la que el medio seleccionado produzca una mayor producción de ácidos grasos poliinsaturados (especialmente DHA y EPA) para ser utilizada como alimento para las larvas tempranas de *L.vannamei*
- e) Determinar los índices de crecimiento y supervivencia de las larvas tempranas de *L. vannamei* (NV-PZIII) alimentadas con tres dietas de microalgas:
 - T.chuii* producida en condiciones estándar de la UAS (Unidad Académica de Sisal);
 - T.chuii* y *Chaetoceros gracillis* (dieta estándar utilizada en la UAS para larvas de *L. vannamei*.)
 - T.chuii* producida bajo el tratamiento experimental seleccionado.

HIPÓTESIS

El uso de cultivo mixotrófico utilizando glicerol y ácido acético como fuentes de carbono aumentará la producción de ácidos grasos altamente poliinsaturados (EPA y DHA) en *Tetraselmis chuii*.

El salicilato suplementado en los medios de cultivo estimulará el metabolismo heterotrófico de la microalga *Tetraselmis chuii* aumentando la producción de ácidos grasos poliinsaturados y mayor biomasa.

Los mayores niveles de ácidos grasos poliinsaturados EPA y DHA de *T.chuii* provenientes de los cultivos mixotróficos, suplementados con salicilatos, en comparación con *T. chuii* producidas en condiciones de la Unidad Académica de Sisal, tendrán un efecto positivo en las larvas de *L.vananmei*, lo cual repercutirá en un mejor crecimiento y supervivencia.

METODOLOGIA GENERAL DE LOS CULTIVOS CAPITULO I Y II

Los cultivos de microalgas se llevaron a cabo en el cepario del área de producción de alimento vivo en la Unidad Académica Sisal, en Hunucmá, Yucatán. El cepario se encuentra a una temperatura controlada de 24°C y un fotoperiodo continuo. Las cepas de la microalga utilizadas en este experimento han sido donadas por el laboratorio de alimento vivo de la Unidad Académica Sisal (UAS).

Los cultivos se iniciaron a partir de la cepa *T.chuui* que se conserva en el cepario del área de producción de alimento vivo de la UAS en tubos de ensayo de 10 mL y se escalaron a un matraz de 250mL con agua de mar filtrada y desinfectada utilizando el medio F/2 como fertilizante durante 10 días sin aireación. Posteriormente se trasladó el volumen a 1800mL durante otros 10 días con aireación moderada. Finalmente con el volumen final de 1800mL se procedió de la manera más aséptica posible a inocular los tratamientos con un volumen de 50mL que corresponde al 10% del volumen final. (Fig. 4). Los tratamientos se distribuyeron en el área de cultivo de una manera totalmente aleatoria.

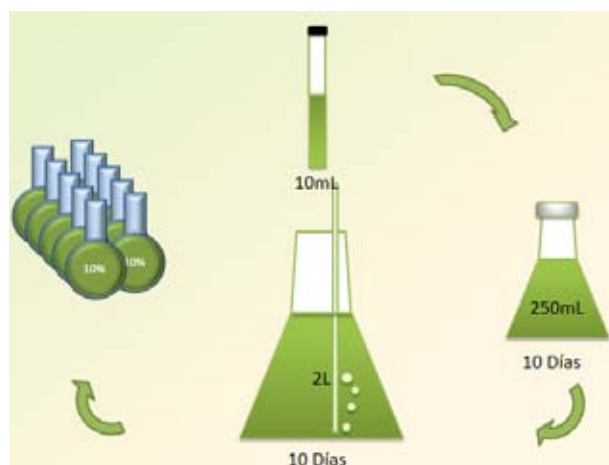


Figura 4:esquema de escalado del cultivo desde la cepa al inóculo.

Todos los distintos tratamientos se realizaron por triplicado en matraces tipo bola de 500mL con aireación moderada, y una salinidad del agua de mar filtrada fijada en $30\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ la cual ha sido desinfectada con 0.3 mL de cloro por litro y desactivada con 0.15mL de tiosulfato de sodio. Posteriormente se añadió la cantidad recomendada de la solución A y B del medio F/2 (Guillard, 1975) y las cantidades necesarias de ácido

salicílico, glicerol o ácido acético para conseguir la concentraciones deseadas y se esterilizó en autoclave a 1.06 kg cm^{-2} durante 60 minutos.

Seguimiento de los cultivos

Para determinar la cinética de crecimiento se realizó un seguimiento diario obteniendo $250 \mu\text{L}$ de muestras en las que se observó su estado y posteriormente se fijaron con una solución de lugol antes de proceder a su conteo. Los conteos de microalgas se realizan por el método de contaje directo al microscopio óptico en una cámara de Neubauer de 0.1 mm de profundidad. (Figura 5)

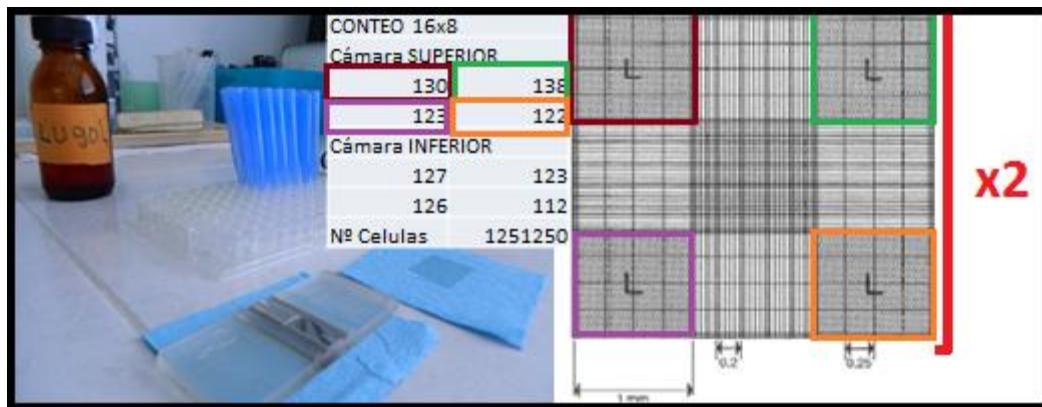


Figura 5: se muestra la imagen de la cámara de Neubauer y el modo de realizar el conteo directo.

CAPÍTULO I.

Selección del medio de cultivo

Inicialmente se realizó un cultivo preliminar con el objetivo de reconocer cuál de los medios de cultivos fototróficos y mixotróficos, de la microalga *T.chuii* sometida a distintos tratamientos experimentales que incluían glicerol, ácido acético y ácido salicílico tenían una mayor repercusión en la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados de interés para la alimentación de larvas tempranas de *L.vannamei* (principalmente EPA y DHA) y definir las cinéticas de crecimiento de la microalga.

METODOLOGÍA

Este cultivo se realizó utilizando cinco tratamientos diferentes en condiciones mixotróficas, autótroficas y en presencia y ausencia de ácido salicílico así como un control autótrófico que representa las condiciones de producción de *T.chuii* en la UAS (medio F/2 y 6,000 Lux de iluminación) como se muestra en la Tabla 1. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado, distribuidos de manera aleatoria y con aireación moderada. Los cultivos autótrofos estuvieron bajo una condición de iluminación de 6,000 Lux mientras que para los cultivos mixotróficos la iluminación fue de 950 Lux para impedir la inhibición de la toma de sustrato orgánico (Ukeles y Rose 1976) (Figura 6). El cosechado del cultivo se realizó a los 12 días de cultivo que es cuando se observó que todos los tratamientos se encontraban en fase estacionaria.

Tabla 2: Tratamientos con acetato de sodio, glicerol y ácido salicílico para el cultivo de *T.chuii* en concentraciones expresadas en moles y luxes utilizados.

Tratamientos	Componentes del medio de cultivo
6.000 Lux	
UAS	F/2
UAS+SA	F/2 + ácido salicílico 10^{-4} M
1.600 Lux	
Acetato	F/2 + Acetato de sodio 0.1M
Glicerol	F/2 + Glicerol 0.1M
Acetato + SA	F/2 + Acetato de sodio 0.1M + ácido salicílico 10^{-4} M
Glicerol + SA	F/2 + Glicerol + ácido salicílico 10^{-4} M

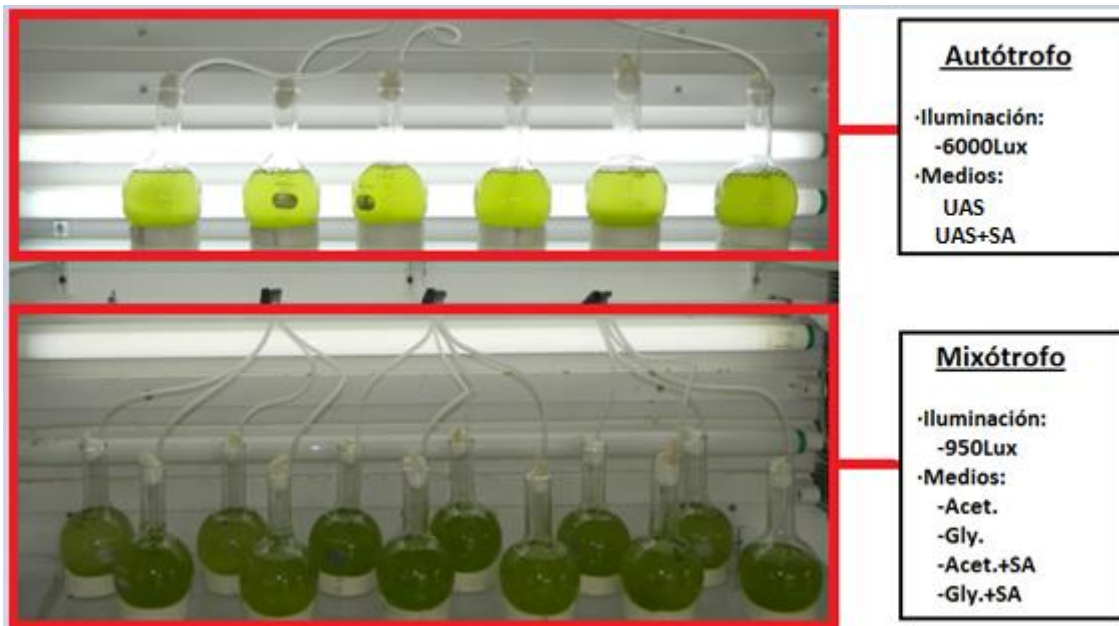


Figura 6: disposición de los matracos en el cepario durante el cultivo de selección de medio.

Recuperación de la biomasa

Alcanzada la fase estacionaria en todos los tratamientos se procedió al cosechado de los cultivos. Para eliminar el exceso de agua se extrajeron 400 mL de los cultivos que se distribuyeron en tubos falcon de 50 mL para su proceder al centrifugado. Este se realizó en una centrífuga (IEC centra MP4R) a 5,000 rpm durante 10 min. Se retiró el exceso de agua y la pastilla celular de microalga resultante se llevó a congelación en nitrógeno líquido durante 10 minutos y fue almacenado durante toda la noche en refrigeración a -40 °C. Posteriormente en una liofilizadora LABCONCO FREEZONE 2.5 a 0.520 mBar y a -45°C se liofilizo durante 24 horas. Finalmente el concentrado obtenido se pulverizó y homogenizó en un mortero de cerámica hasta obtener un polvo fino y homogéneo.

Análisis ácidos grasos

Este análisis permite obtener el porcentaje de cada ácido graso de la muestra respecto al total de ácidos identificados cromatográficamente. El análisis consiste en una serie de procesos que constan de extracción de los lípidos con disolventes, saponificación y reextracción de los ácidos grasos, formación de los derivados metílicos y análisis por cromatografía de gases capilar con detector de ionización de llama. La cuantificación se hace utilizando el ácido nonadecanóico como estándar interno, que se añade a la muestra después de la extracción de los lípidos.

Extracción de los lípidos

El proceso se inició partir de 50 mg de microalga liofilizada y pulverizada en un mortero a la que se le añadió 4 mL de la mezcla de extracción diclorometano: metanol en proporción 2:1. La extracción se llevó a cabo en un baño ultrasónico a 60°C durante 30 min y posteriormente se centrifuga a 5,000 rpm durante 10 minutos para aclarar la alícuota. Este proceso de extracción se repitió dos veces a fin de maximizar el rendimiento. Una vez re combinados los extractos se llevó a sequedad completa mediante la evaporación de los disolventes bajo corriente de Nitrógeno calentando a 50 °C.

Saponificación del extracto lipídico, obtención y metilación de los ácidos grasos

Una vez extraídos los lípidos totales se añadieron 100µL del ácido C19:0 en metanol y se procedió a la saponificación. Para ello se añadió 1 mL de una solución hidróxido de potasio/metanol (20% w/v) y se calentó a 80°C por 60 min en una estufa. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se añadieron 5 mL de solución de NaCl (20% w/v) y 5 mL de hexano. La muestra se homogenizó en un vortex y fue centrifugada a 2000 rpm durante 5 min. La fase superior fue descartada conservando la solución acuosa de lípidos saponificados

Para obtener los ácidos grasos se añadió una la solución HCl al 35% hasta reducir el pH a 1-2. Una vez alcanzado el pH requerido se adicionaron 2 mL de hexano, se homogenizó en un vortex y se centrifugó a 2000 rpm por 5 min. La fase acuosa (inferior) fue descartada mientras que la fase hexano (superior) se secó con Na₂SO₄ anhidro descartando la fase solida resultante. El hexano fue evaporado sin llegar a la sequedad bajo una corriente de N₂ y calentando a 50°C.

Con el fin de mejorar su comportamiento cromatográfico los ácidos grasos extraídos se derivaron formando los ésteres metílicos correspondientes. Para llevar a cabo la reacción de metilación, al extracto seco se añadió 1 mL de BF₃/MeOH (10% w/v) y se calentó en la estufa a 80°C por 60 min. Una vez atemperado se añadieron 2 mL de solución de NaCl (20% w/v) y 2 mL de hexano, la mezcla fue homogenizada en un vortex y centrifugada a 2000 rpm por 5 minutos para recuperar la fase superior (hexano), que contiene a los ésteres formados. Finalmente la muestra se secó con Na₂SO₄ anhidro descartando la fase sólida y la solución se conservó en atmósfera de N₂ y refrigeración hasta el análisis por cromatografía de gases.

Analisis cromatográfico para la determinación del perfil de ácidos grasos

Una vez concluido el tratamiento previo de las muestras para obtener los ésteres metílicos de los ácidos grasos presentes en las mismas, los ácidos grasos individuales se identificaron por cromatografía de gases capilar. Las muestras reconstituidas con hexano se inyectaron en un cromatógrafo de gases con detector de ionización en llama (FID, por sus siglas en inglés) Perkin Elmer modelo Clarus 500 equipado con un inyector automático. Las muestras se inyectaron en las condiciones cromatográficas descritas en la Tabla 3.

Tabla 3: Condiciones de análisis por cromatografía de gases con detector de ionización en llama (CG/FID).

PARÁMETRO	VALOR
Columna	Zebtron ZB-WAX de Phenomenex, 20 m de longitud, 0.18 mm de diámetro interno y 0.18 μm de grosor de película (Num.Cat. 7FD-G007-08).
Temperatura inicial del horno	100°C, 0 min
Rampa 1	10°C/min hasta 250°C durante 5 min
Acarreador	Hidrógeno, flujo de 0.68 mL/min
Temperatura de inyector	250°C
Modo de inyección	Split, Razón 30:1 Inyección automática
Volumen de inyección	2 μL
Detector	FID
Temperatura del detector	250°C
Llama del detector	Con una mezcla de H ₂ (45 mL/min) y aire (450 mL/min)

Los compuestos individuales se identificaron de acuerdo a su tiempo de retención, tomando como referencia un estándar con una mezcla de los compuestos de interés (Supelco® 37 Component FAME Mix, Num. Cat. 47885-U). El perfil de ácidos grasos de cada muestra se generó calculando el porcentaje de área de cada compuesto en relación al área total de ácidos identificados.

Estadística

Para determinar las diferencias entre la cinética de crecimiento y porcentajes de ácidos grasos de interés se realizó un análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) ($p < 0.05$) con el software STATISTICA. La ponderación de las diferencias entre tratamientos se realizó mediante la prueba de *post hoc Tukey* (Zar, 1996; Underwood, 1997).

RESULTADOS

Cinética de crecimiento

Las microalgas cultivadas bajo la condición de 6,000 Lux (UAS y UAS+SA) iniciaron la cinética de crecimiento con una leve disminución en el número de células durante los dos primeros días seguido de un crecimiento exponencial de cuatro días de duración donde el tratamiento UAS alcanzó 1.55×10^6 Cel·mL⁻¹ mientras que el tratamiento UAS+SA obtuvo 1.45×10^6 Cel·mL⁻¹ ($p > 0.05$). En la fase estacionaria el tratamiento UAS registro la mayor densidad celular en el décimo día de cultivo con 1.67×10^6 Cel·mL⁻¹ y 1.61×10^6 Cel·mL⁻¹ al final del cultivo siendo significativamente superior al cultivo UAS + SA que también obtuvo la mayor densidad en el décimo día con 1.55×10^6 Cel·mL⁻¹ y 1.43×10^6 Cel·mL⁻¹ al final del experimento.

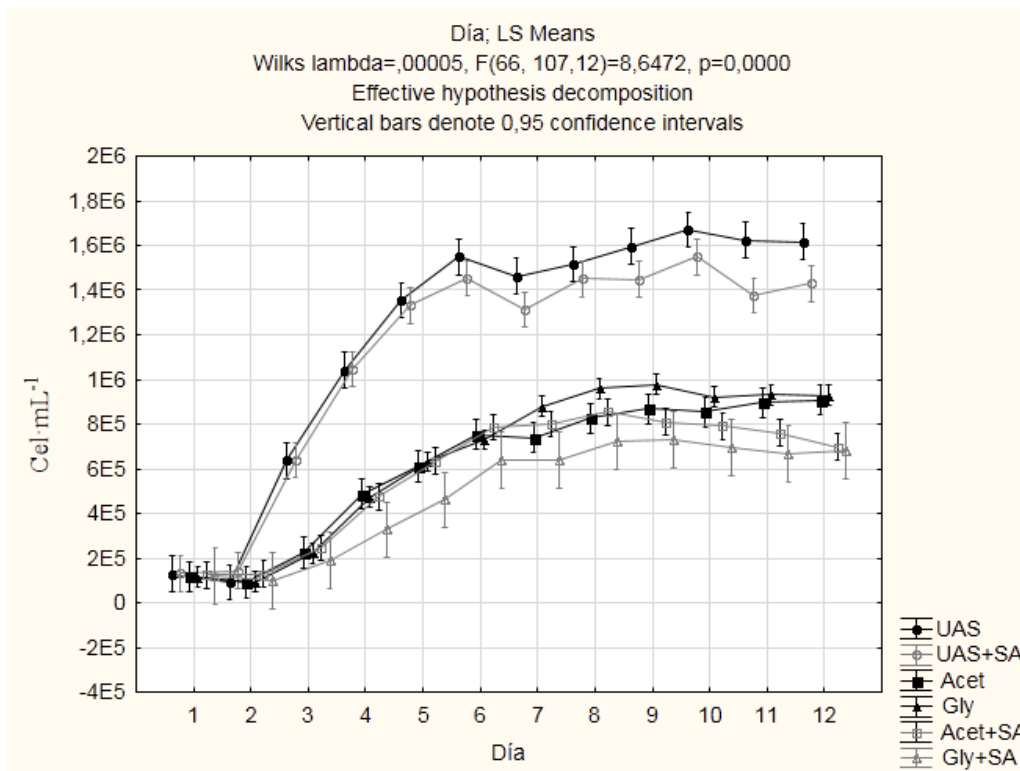


Figura 7: cinética de crecimiento de los cultivos UAS, UAS+SA, Acetato, Glicerol, Acetato+SA y Glicerol+SA, con una duración de 12 días

Los cultivos mixotróficos también mostraron una fase de adaptación de dos días seguido por un crecimiento de seis días de duración a excepción del tratamiento con

Glicerol que continuo hasta el noveno día. Al inicio de la fase estacionaria los cultivos mixotróficos alcanzaron una densidad celular de $0.64 \times 10^6 \text{ Cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ para el Glicerol+SA, $0.75 \times 10^6 \text{ Cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ para el Acetato, $0.78 \times 10^6 \text{ Cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ para Acetato+SA y en el noveno día el tratamiento de Glicerol obtuvo $0.98 \times 10^6 \text{ Cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ antes de entrar en la fase estacionaria siendo esta la mayor densidad obtenida en todos cultivos mixotróficos. Al final del cultivo las densidades celulares de los tratamientos Glicerol y Acetato fueron significativamente superiores a sus homólogos con ácido salicílico y no se encontraron diferencias significativas entre estos dos últimos. (Figura 7)

Perfil de ácidos grasos

El perfil de ácidos grasos de *T. chuii* presenta una composición porcentual similar independientemente de los tratamientos de cultivo, donde los ácidos grasos monoinsaturados se encuentran en mayor proporción, seguidos de los saturados y en menor medida los poliinsaturados.

Respecto a la proporción relativa de ácidos grasos poliinsaturados de la microalga *T. chuii* sometida a los distintos tratamientos el mayor porcentaje promedio obtenido fue para el tratamiento de Glicerol con un $26.1 \pm 1.7\%$ seguido por el tratamiento UAS con $24.6 \pm 0.8\%$ y el Acetato $23.4\% \pm 0.6$ $p > 0.05$ (Figura 8). No obstante entre los tratamientos a los que se aplicó el ácido salicílico en comparación con los tratamientos homólogos en donde el ácido salicílico estuvo ausente se observa una tendencia a reducir la proporción relativa de ácidos grasos poliinsaturados en favor de los monoinsaturados. (Figura 8)

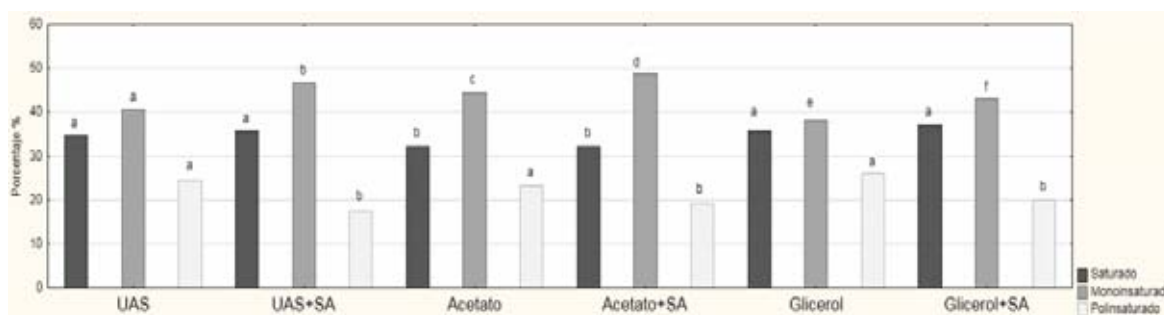


Figura 8: Se muestran los porcentajes promedios de tipos de saturación de los ácidos grasos entre los tratamientos. Los índices con la misma letra indican que existen diferencias significativas $p < 0.05$

Tabla 4: Composición relativa de ácidos grasos (% del total de ácidos grasos identificados) de la microalga *Tetraselmis chuii*.

Ácidos Grasos	6,000Lux		950Lux			
	UAS	UAS+SA	Acetato	Acetato+SA	Glicerol	Glicerol+SA
SATURADOS						
C6:0	-	-	-	-	-	-
C8:0	-	tr	-	0.1±0.0	-	tr
C10:0	-	tr	-	0.1±0.1	0.1±0.1	tr
C12:0	-	tr	-	0.1±0.0	0.1±0.1	tr
C13:0	-	tr	-	tr	0.1±0.0	tr
C14:0	0.5±0.1	0.5±0.0	0.4±0.0	0.5±0.0	1.1±0.2	0.7±0.3
C15:0	0.1±0.0	0.1±0.0	tr	0.1±0.0	0.4±0.1	0.3±0.1
C16:0	32.3±1.0	33.5±0.6	30.1±0.7	29.3±0.2	32.1±1.6	33.4±1.4
C17:0	0.3±0.0	0.5±0.3	0.3±0.0	1.0±0.1	0.5±0.1	0.9±0.1
C18:0	1.1±0.2	0.8±0.0	1.1±0.2	0.8±0.0	1.2±0.3	1.2±0.1
C20:0	0.3±0.0	0.1±0.0	tr	tr	0.1±0.0	0.2±0.1
C24:0	0.2±0.0	0.2±0.0	0.1±0.1	0.2±0.0	0.2±0.0	0.2±0.0
<i>Subtotal saturados</i>	34.8±1.4	35.8±1.1	32.2±1.0	32.1±0.6	35.8±2.6	36.9±2.1
MONOINSATURADOS						
C14:1	-	0.2±0.0	tr	0.1±0.0	0.1±0.1	tr
C15:1	-	-	-	0.5±0.5	tr	-
C16:1	0.3±0.0	0.3±0.0	0.9±0.1	1.0±0.2	2.9±0.5	2.2±0.2
C17:1	1.2±0.0	1.0±0.1	1.3±0.1	1.1±0.0	1.8±0.2	1.2±0.1
C18:1n9c/t	35.7±0.4	41.9±0.4	38.7±0.3	42.6±0.4	31.3±1.0	37.3±0.1
C20:1n9	3.3±0.2	3.3±0.1	3.5±0.2	3.3±0.1	2.0±0.2	2.5±0.3
C22:1n9	tr	tr	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	tr
<i>Subtotal Monoinsaturados</i>	40.6±0.7	46.7±0.7	44.5±0.7	48.6±1.2	38.1±2.0	43.3±0.8
POLIINSATURADOS						
C18:2n6 (LA)	2.9±0.0 ^a	3.7±0.1 ^b	2.2±0.0 ^b	3.5±0.2 ^c	2.8±0.2 ^c	3.9±0.1 ^b
C18:3n6	0.3±0.0	0.2±0.0	0.1±0.1	0.2±0.0	0.2±0.0	0.2±0.0
C18:3n3 (ALA)	14.6±0.3 ^a	9.7±0.1 ^b	14.6±0.1 ^b	10.5±0.2 ^a	15.5±1.0 ^a	10.9±1.1 ^b
C20:2	-	tr	tr	0.1±0.0	tr	-
C20:4n6 (ARA)	0.4±0.0 ^a	0.3±0.0 ^{a,b}	0.4±0.0 ^a	0.5±0.0 ^b	0.4±0.0 ^b	0.5±0.0 ^b
C20:3n3	0.1±0.0	tr	0.1±0.1	tr	0.1±0.0	-
C20:5n3(EPA)	6.2±0.4 ^a	3.3±0.2 ^b	5.9±0.3 ^c	4.4±0.1 ^a	6.7±0.3 ^a	4.1±0.4 ^b
C22:2	0.2±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0
C22:6n3 (DHA)	-	tr ^a	-	tr ^a	0.1±0.1 ^a	tr ^a
<i>Subtotal Poliinsaturados</i>	24.6±0.8	17.5±0.5	23.4±0.6	19.2±0.6	26.1±1.7	19.8±1.7
<i>Subtotal n-3</i>	20.9±0.7	13.1±0.3	20.4±0.4	14.9±0.4	22.5±1.4	15.1±1.5
<i>Subtotal n-6</i>	3.5±0.0	4.3±0.1	2.8±0.1	4.2 ±0.2	3.5±0.3	4.6±0.1
n-6/n-3	0.17	0.32	0.14	0.28	0.16	0.30

(ALA)= α -Linolénico ,(LA)= Linoléico, (ARA)=Araquidónico, (EPA)=Eicosapentanoico,(DHA)=Docosahexanoico, (n-3)=omega 3, (n-6)=omega 6, (n-6/n-3)= relación omega 6 / omega3,(Tr)=traza resultados menores a 0.05%). Número de mediciones por tratamiento=6

Ácidos grasos poliinsaturados de interés

α -Linolénico 18:3n3 (ALA)

En los cultivos fototróficos existen diferencias significativas para este ácido graso poliinsaturado entre el tratamiento UAS y el adicionado con ácido salicílico con un promedio de $14.6 \pm 0.3\%$ y $10.5 \pm 0.2\%$ respectivamente ($p < 0.05$). En los medios mixotróficos se observa esta misma tendencia con los medios Glicerol y Acetato frente a sus homólogos con ácido salicílico siendo significativa la diferencia entre ellos. El tratamiento Glicerol con un promedio de $15.5 \pm 1.0\%$ fue superior a todos los medios aunque no existió diferencia significativa entre este y el acetato con $14.6 \pm 0.1\%$ ($p > 0.05$). El ácido salicílico parece mostrar un efecto antagónico en los porcentajes de α -linolenico para esta microalga. (Tabla 4)

Linoléico C18:2n6 (LA)

El ácido linoléico durante cultivo fototrófico aumentó significativamente con la adición de ácido salicílico llegando hasta $3.7 \pm 0.1\%$ en comparación con el $2.9 \pm 0.0\%$ del tratamiento UAS ($p < 0.05$). De igual manera en los cultivos mixotróficos la presencia de ácido salicílico elevó los porcentajes de ácido linoléico siendo el Glicerol+SA con $3.9 \pm 0.1\%$ siendo el mayor registro para este ácido grasos sin existir diferencias significativas con el Acetato+SA. De los tratamientos mixotróficos que no contenían ácido salicílico el Glicerol fue significativamente superior al Acetato con un $2.8 \pm 0.2\%$ frente al $2.2 \pm 0.0\%$ del medio con Acetato como fuente de carbono. (Tabla 4)

Araquidónico C20:4n6 (ARA)

En los cultivos fototróficos el ácido araquidónico varió con la presencia de ácido salicílico disminuyendo con la presencia de este pero no significativamente obteniendo $0.4 \pm 0.0\%$ para el F/2 y $0.3 \pm 0.0\%$ para F/2+SA. En los cultivos mixotróficos la presencia de SA tuvo un efecto contrario aumentando la cantidad de ARA siendo significativas las diferencias del Acetato con su homólogo con SA y con el Glicerol+SA obteniendo estos dos últimos $0.5 \pm 0.0\%$ ($p < 0.05$). (Tabla 4)

Eicosapentanoico 20:5n3 (EPA)

Para este ácido graso las diferencias entre los tratamientos fototróficos fueron bastante significativas ya que con $6.2 \pm 0.4\%$ el tratamiento UAS superó en un 2.9% al UAS+SA que obtuvo el porcentaje promedio más bajo. Dentro de los mixotróficos la presencia de SA mantiene la tendencia observada en los tratamientos fototróficos siendo

siempre significativa la diferencia entre la presencia y ausencia de ácido salicílico en las fuentes de carbono. Otra diferencia significativa en el cultivo mixotrófico se da entre el Acetato y el Glicerol que con $6.7\pm 0.3\%$ es el mayor porcentaje de EPA conseguido superando los $5.9\pm 0.3\%$ del acetato. (Tabla 4)

Docosahexanoico 22:6n3 (DHA)

El ácido docosahexanoico estuvo totalmente ausente para los tratamientos UAS, Acetato y Glicerol+SA, mientras que los tratamientos Acetato+SA y UAS+SA los porcentajes fueron muy bajos, menores a los dos decimales, siendo únicamente el Glicerol con $0.1\pm 0.1\%$ el único que pareciera promover la producción de DHA aunque no de manera significativa. (Tabla 4)

DISCUSIÓN

En cuanto a la cinética de crecimiento los retrasos en el crecimiento observados al inicio de los cultivos son debidos a un periodo de adaptación fisiológica de las células donde se incrementan los metabolitos involucrados en la división celular y fijación de carbono (Meyer, 1997).

En otros trabajos donde el glicerol o el ácido acético han sido utilizados como sustrato orgánico en condiciones mixotróficas, las concentraciones celulares suelen ser superiores a las conseguidas en los cultivos autotróficos (Ceron, 2005; Kitano et 1997). Sin embargo en este experimento el cultivo autotrófico (UAS) fue el que registro la mayor densidad, siendo una diferencia significativa con los cultivos mixotróficos. Esto sugiere que las microalgas no asimilan correctamente estos sustratos orgánicos bajo estas condiciones, pudiendo existir algún proceso inhibitorio del crecimiento debido a las concentraciones de sustratos orgánicos o bien, a una limitación de la toma de estos producida por una iluminación incorrecta. En el caso de *Euglena gracilis*, *P.triconium*, *Agmenellum quadruplicatum*, *Goniotrichium elegans*, *Navicula pelliculosa* o *Nostoc sp* la incorporación eficiente del ácido acético o la metabolización de glicerol solo es posible a determinadas condiciones de luz siendo incapaces de crecer en oscuridad. (Cook, 1967; Ingram et al., 1973; Kaplan et al., 1986; Kitano et al., 1997; Ceron, 2005)

En condiciones autotróficas, el perfil de los ácidos grasos poliinsaturados de interés coincide bastante con lo descrito por Dustan et al., (1992) para esta microalga cultivada en condiciones similares (medio F/2 Guillard y ≈ 6000 Lux). Al igual que el perfil del tratamiento UAS, el ALA fue el que contribuyo en mayor medida al total de PUFA,

aunque la proporción obtenida fue casi un 10% mayor. Sin embargo para ARA, LA y EPA los resultados fueron muy parecidos así como la ausencia de DHA.

Los ácidos grasos saturados y monoinsaturados variaron significativamente entre los tratamientos mixotróficos adicionados con glicerol y acetatos debido a que grado de insaturación de los ácidos grasos está influenciado por la fuente de carbono usada en cultivos mixotróficos. (Wood et al., 1999).

CONCLUSIÓN

Se puede concluir que el ácido salicílico bajo ambas condiciones de cultivo fototrófico y mixotrófico parece producir un efecto negativo tanto para el crecimiento como la composición de los ácidos grasos poliinsaturados EPA y ALA a excepción del LA donde el efecto del ácido salicílico fue positivo. Para el ARA la presencia de SA en el medio de cultivo solo fue negativo en la condición fototrófica mientras que en los mixotróficos parece aumentar los porcentajes de este ácido grasos.

En el uso del glicerol en los cultivos mixotróficos la proporción relativa de EPA y el LA aumenta significativamente en comparación con el Acetato.

El crecimiento de los cultivos fototróficos fue superior a los mixotróficos en cuanto al número de células con diferencias entre los picos más altos de cada condición de hasta 41.47%

En cuanto a la composición relativa de ácidos grasos de interés el tratamiento Glicerol tiene un mayor porcentaje de EPA, parecer promover la síntesis de DHA y represento el mayor porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados totales con $26.1 \pm 1.7\%$

Por lo tanto el Glicerol es el medio seleccionado para ser probado a distintas concentraciones, para cultivar *T. chuii* y ser evaluado como alimento de larvas tempranas de *Litopenaeus vannamei*.

CAPÍTULO II.

Cultivos con glicerol como fuente de carbono.

Seleccionado el glicerol como fuente de carbono orgánico en el cultivo de *T.Chuii* para la alimentación de las larvas de *L.vannamei* se procedió a realizar dos experimentos con glicerol en distintas concentraciones (Tablas 3 y 4) que fueron cosechados en dos fases diferentes de crecimiento, la fase final exponencial (9 días) y la estacionaria (12 días). Además de la cinética de crecimiento y el perfil de ácidos grasos a estos cultivos se les contabilizó el porcentaje total de lípidos, porcentaje de proteína, pigmentos y tamaño de las células.

Para los cultivos en los que se evaluó al glicerol como fuente de carbono se decidió modificar la iluminación de los medios mixotróficos aumentando la intensidad de 950 a 1,600 Lux debido a que en un ensayo anterior (Glicerol I incluido en los anexos) se observó que la luz estaba limitando el crecimiento de los cultivos mixotróficos, mientras que para tratamiento UAS se mantuvo a 6,000Lux.

Además para garantizar una iluminación más homogénea e impedir interferencias de radiaciones externas el área de cultivo fue cubierta con cartulinas tal y como se muestra en la Figura 9.

Tabla 5: Tratamientos para el cultivo de *T.chuii* con glicerol como fuente de carbono en fase final exponencial con concentraciones expresadas en moles y luxes utilizados.

Tratamientos	Componentes del medio de cultivo
6.000 Lux	
UAS	F/2
1.600 Lux	
0M	F/2
0.05M	F/2 + Glicerol 0.05M
0.1M	F/2 + Glicerol 0.1M
0.15M	F/2 + Glicerol 0.15M
0.2M	F/2 + Glicerol 0.2M

Tabla 6: Tratamientos para el cultivo de *T.chuii* con glicerol como fuente de carbono en fase estacionaria con concentraciones expresadas en moles y luxes utilizados

Tratamientos	Componentes del medio de cultivo
6.000 Lux	
UAS	F/2
1.600 Lux	
0M	F/2
0.1M	F/2 + Glicerol 0.1M
0.2M	F/2 + Glicerol 0.2M

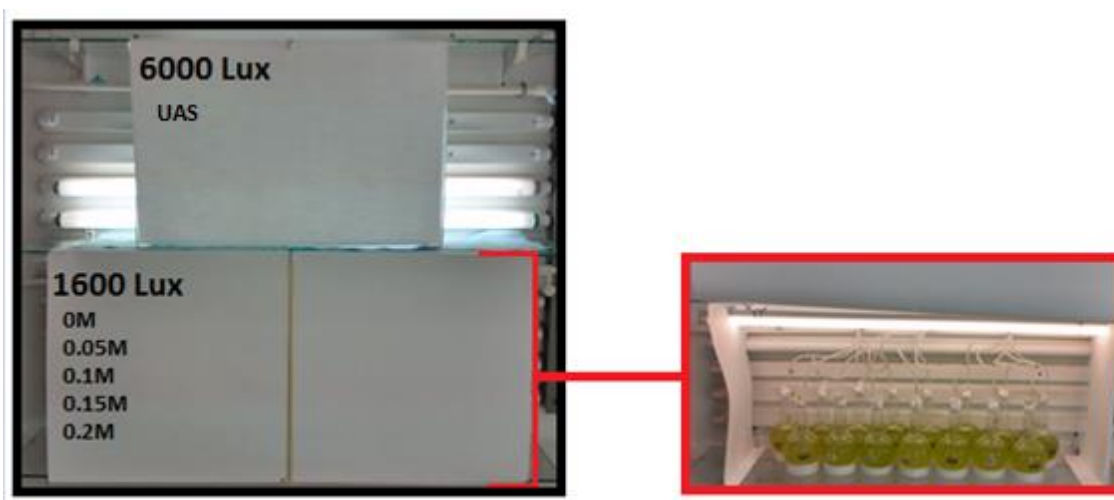


Figura 9: se muestra el área de cultivo cubierta así como los tratamientos en cada posición y luxes utilizados.

METODOLOGÍA

Recuperación de la biomasa

Para estos cultivos, las microalgas producidas de las réplicas del mismo tratamiento fueron homogenizadas mediante aireación antes de ser centrifugadas a fin de conseguir un mayor tamaño de muestra para realizar la determinación de la composición química (nitrógeno elemental, pigmentos, lípidos totales y ácidos grasos). Al igual que en el cultivo preliminar se extrajeron 400 mL del cultivo que se dispusieron en tubos falcon de 50 mL y se le eliminó el exceso de agua centrifugando los tubos a 5000 rpm durante 10 min en una centrífuga (IEC centra MP4R). La pastilla celular de microalga concentrada fue lavada con agua destilada y recombinada con los demás tubos del mismo tratamiento, que finalmente volvieron a ser centrifugados dando como resultado un concentrado por tratamiento (Pooled).

Medición de las microalgas

Se tomaron mediciones de las microalgas en el momento del cosechado de los cultivos. Las mediciones se realizaron mediante el uso de un microscopio con cámara adaptada y pantalla con software incorporado que permite tomar medidas en tiempo real. Estas medidas se tomaron desde los extremos longitudinales y los perpendiculares tal y como se muestra en la Figura 10 a fin de obtener el largo y ancho de las microalgas.



Figura 10: muestra la pantalla de la cámara del microscopio que permite realizar las mediciones de las microalgas.

Análisis de ácidos grasos y lípidos totales

El análisis de ácidos grasos se realizó siguiendo la misma metodología mencionada en la selección del medio de cultivo con la diferencia de que esta vez se utilizaron 100mg de microalga liofilizada para poder tener una mejor resolución en los resultados del cromatograma.

Además durante la extracción de los lípidos, una vez recombinados los extractos y llevados a la sequedad completa, estos fueron almacenados toda la noche en el desecador para posteriormente realizar las pesadas a peso constante mediante el uso de una balanza analítica para determinar los lípidos totales por diferencia de peso con los viales también a peso constante.

Cuantificación de clorofila *a*, *b* y carotenoides

La clorofila y los carotenoides totales se extrajeron a partir de 3 mg de biomasa liofilizada a los que se les añaden 5 ml de mezcla de extracción de acetona:metanol en proporción 2:1. Para maximizar la extracción la alícuota se almacenó en tubos oscuros y refrigerados a 4°C durante 24h. Los extractos se clarifican por centrifugación 5000 rpm

durante 10 min a 4°C. Finalmente se mide la absorbancia a las longitudes de onda de 480, 664 y 647 nm en un espectrofotómetro ESPECTRONIC modelo 21D.

El contenido de clorofila y carotenoides totales se estima de acuerdo a las fórmulas establecidas por Jeffrey y Humphrey (1975):

$$\text{Clorofila } a \text{ } (\mu\text{g/ml}) = 11.93 A_{664 \text{ nm}} - 1.93 A_{647}$$

$$\text{Clorofila } b \text{ } (\mu\text{g/ml}) = 20.36 A_{647 \text{ nm}} - 5.50 A_{664}$$

$$\text{Carotenoides totales } (\mu\text{g/ml}) = 4 A_{480 \text{ nm}}$$

Donde A es la absorbancia de la muestra a diferente longitud de onda.

Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se llevó a cabo mediante la medición de nitrógeno elemental de la muestra con el analizador elemental COSTECH ELEMENTAL INSTRUMENT. Para ello se pesaron 5 mg de microalga liofilizada y pulverizada en mortero que se introducen en el analizador. El principio básico del analizador elemental es la reducción por medio de la combustión de la muestra a sus elementos básicos C, N, H y S que posteriormente, por medio de una columna cromatográfica, estos elementos serán separados y el lector mostrará las señales correspondientes al contenido de N total de la muestra.

Para calcular la concentración de proteínas contenida a partir del nitrógeno contenido en la muestra se utiliza el factor de conversión recomendado para microalgas por Lourenço et al (2007) de 4.58 ya que no existen estudios previos de factores de conversión para esta microalga en específico.

Estadística

En los cultivos con glicerol para determinar las diferencias entre las cinéticas de crecimiento y el tamaño de las microalgas se realizó un análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) ($p < 0.05$) con el software STATISTICA. La ponderación de las diferencias entre tratamientos se realizó mediante la prueba de *post hoc* Tukey (Zar, 1996; Underwood, 1997). Mientras que para los análisis de ácidos grasos de interés, lípidos totales, pigmentos y proteínas, que fueron analizados a partir de un *pooled*, se realizó un análisis exploratorio mediante el uso de diagramas de caja y bigotes con el

software STATISTICA y un análisis multivariado para obtener la correlación existente entre todos ellos.

RESULTADOS: CULTIVO CON GLICEROL COMO FUENTE DE CARBONO CULTIVOS EN FASE FINAL EXPONENCIAL

Cinética de crecimiento

En este cultivo de 9 días de duración, todos los tratamientos pasaron a la fase de crecimiento exponencial a partir del segundo día tras el periodo de adaptación. El tratamiento UAS fue el que obtuvo la mayor concentración final promedio con 1.74×10^6 Cel·mL⁻¹, siendo esta una diferencia significativa con los tratamientos que contenían Glicerol y el control 0M. Los promedios de los cultivos a 1,600 lux abarcaron desde los 1.54×10^6 Cel·mL⁻¹ del tratamiento 0.05M a los 1.64×10^6 Cel·mL⁻¹ del 0.2M siendo entre estas dos concentraciones la única diferencia significativa, mientras que el tratamiento control 0M con 1.59×10^6 Cel·mL⁻¹ no obtuvo una diferencia significativa frente a los tratamientos que incluían Glicerol. Todos los tratamientos a excepción del 0.2M alcanzaron la máxima concentración promedio en el octavo día de cultivo mientras que el 0.2M la alcanzo en el noveno día. (Figura 11)

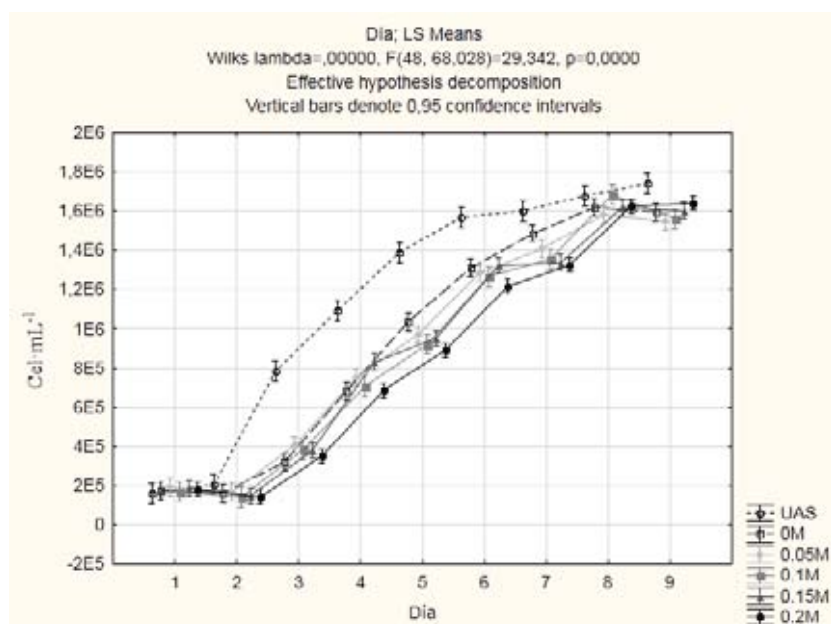


Figura 11: cinética de crecimiento de los cultivos UAS, Control 0M y con glicerol en las concentraciones; 0.05M, 0.1M, 0.15M y 0.2M cosechados en la fase final exponencial.

Tamaño de la microalga

Los resultados muestran una diferencia significativa de largo y ancho entre el tratamiento UAS que tenía un promedio de $12.5 \pm 1.0 \mu\text{m}$ de largo y $9.25 \pm 0.7 \mu\text{m}$ de ancho con el tratamiento 0M a distinta intensidad lumínica con un promedio de $11.8 \pm 0.8 \mu\text{m}$ de largo y $8.5 \pm 0.8 \mu\text{m}$ de ancho. (Figuras 12a y 13a). Dentro de los tratamientos a distintas concentraciones de glicerol solamente el tratamiento 0.2M con $11.14 \pm 0.9 \mu\text{m}$ mostro una diferencia significativa de longitud con el control mientras que para el ancho no existieron diferencias significativas (Figuras 12b y 13b). La luz parece ser un factor determinante en las diferencias de tamaño de las microalgas tanto para el largo como el ancho medido mientras que el glicerol tiene una tendencia a disminuir en longitud con el aumento de concentración.

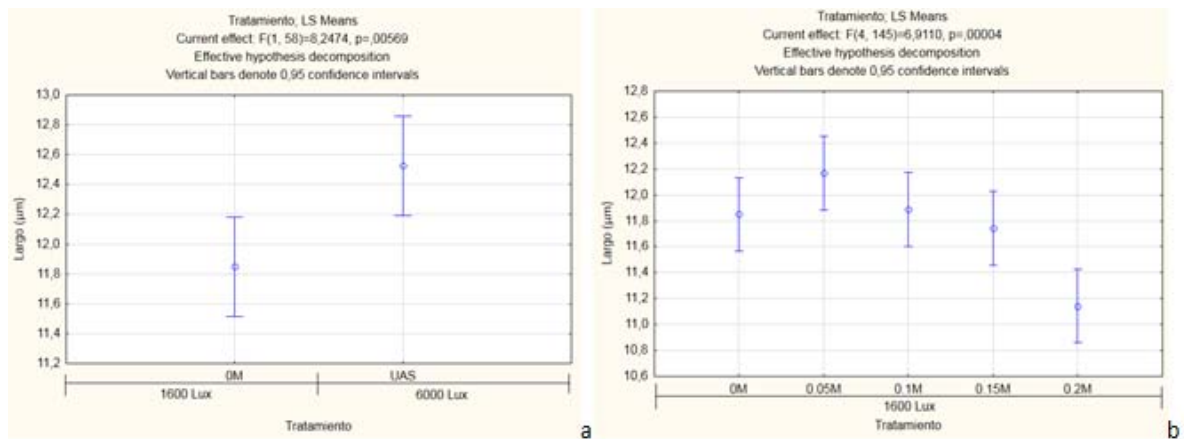


Figura 12a y b: longitud de *T.chuii* en el cultivo con glicerol como fuente de carbono en fase final exponencial.

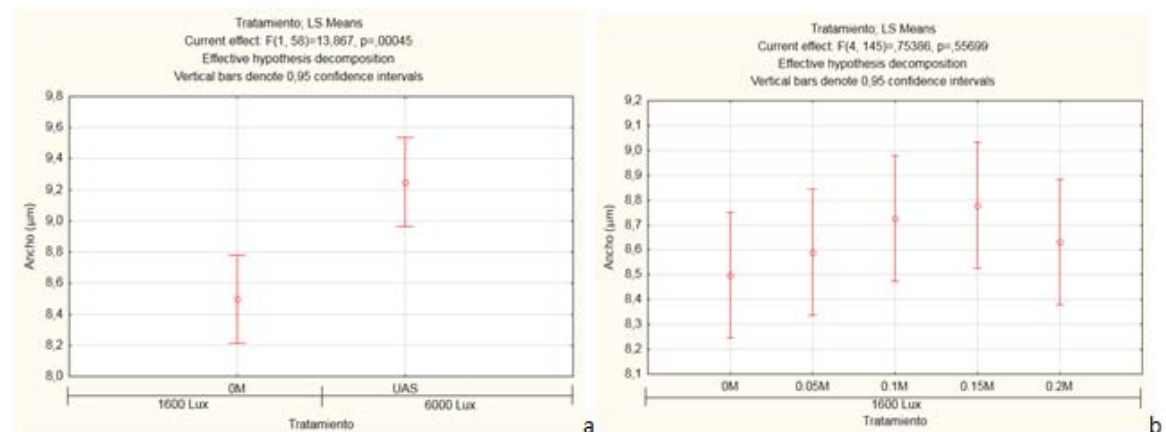


Figura 13a y b: ancho de *T.chuii* en el cultivo con glicerol como fuente de carbono en fase final exponencial

Pigmentos

En el tratamiento UAS a 6,000Lux el contenido de clorofila *a*, *b* y carotenoides fue de 2.29 ± 0.09 , 1.52 ± 0.03 y $0.5 \pm 0.02 \mu\text{g/ml}$ respectivamente, mientras que para el

tratamiento 0M la clorofila *a* y *b* fue de 2.73 ± 0.16 y 1.78 ± 0.08 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente y 0.88 ± 0.05 $\mu\text{g/ml}$ para carotenoides. Todos los tratamientos con Glicerol obtuvieron concentraciones inferiores al Control 0M para todos los pigmentos, y entre los tratamientos 0.05M, 0.1M, 0.15M y 0.2M únicamente el tratamiento 0.2M con 2.28 $\mu\text{g/ml}$ de clorofila *a* que fue ligeramente superior al resto de las concentraciones. (Tabla 7)

Tabla 7: tabla resumen de los resultados obtenidos para % proteína, % lípidos totales y pigmentos ($\mu\text{g/mL}$) en el cultivo con glicerol como fuente de carbono en la fase final exponencial.

Trat.	Proteína%	Lípidos %	Chlor a ($\mu\text{g/mL}$)	Chlor b ($\mu\text{g/mL}$)	Carot ($\mu\text{g/mL}$)
UAS	7.14 ± 0.07^a	14.27 ± 0.15^a	1.36 ± 0.05^a	0.93 ± 0.03^a	0.50 ± 0.02^a
0M	9.13 ± 0.06^b	16.47 ± 0.15^b	2.73 ± 0.16^b	1.78 ± 0.08^b	0.88 ± 0.05^b
0.05M	8.51 ± 0.06^c	$16.37 \pm 0.35^{b,c}$	$2.18 \pm 0.05^{a,c}$	1.42 ± 0.05^c	$0.74 \pm 0.06^{c,d}$
0.1M	8.76 ± 0.02^d	$16.13 \pm 0.38^{b,c}$	$2.20 \pm 0.04^{a,c}$	1.43 ± 0.03^c	0.75 ± 0.02^c
0.15M	8.73 ± 0.09^d	15.90 ± 0.26^c	2.15 ± 0.07^c	$1.42 \pm 0.08^{a,c}$	0.70 ± 0.02^d
0.2M	8.76 ± 0.02^d	16.17 ± 0.12^b	2.28 ± 0.03^a	1.47 ± 0.01^c	0.74 ± 0.01^c

(UAS)= Condiciones de la Unidad Académica de Sisal, (M)= moles de glicerol, (Chlor a)=Clorofila a, (Chlor b)=clorofila b, (carot)= Carotenoides, Superíndices con las mismas letras indican que no son diferencias. Mediciones por tratamiento=3

Proteína

Las proteínas presentes en *T. chuii* variaron en relación con los tratamientos. Para el tratamiento UAS cultivado a 6,000Lux presentó un valor promedio de $7.14 \pm 0.07\%$ mientras que para el control 0M a 1600Lux este valor promedio fue de $9.13 \pm 0.06\%$ siendo esta la mayor diferencia entre los tratamientos. En cuanto al glicerol se observa que este tiene un efecto antagónico en la producción de proteínas obteniendo el menor porcentaje el tratamiento 0.05M con $8.51 \pm 0.06\%$ de promedio mientras que para el resto de concentraciones no existieron diferencias siendo el promedio para el tratamiento 0.15M de $8.73 \pm 0.09\%$ y de $8.76 \pm 0.02\%$ para 0.1M y 0.2M. (Tabla 7)

Lípidos totales

El mayor porcentaje de lípidos fue obtenido en el tratamiento 0M con $16.5 \pm 0.1\%$ frente al $14.3 \pm 0.1\%$ del tratamiento a 6,000Lux del UAS. La presencia de glicerol parece tener un efecto negativo disminuyendo el porcentaje de lípidos al aumentar la concentración de glicerol, siendo los tratamientos 0.15M y 0.2M con $15.9 \pm 0.3\%$ y $16.2 \pm 0.1\%$ respectivamente diferencias respecto al control 0M. (Tabla 7)

Perfil ácidos grasos

En este experimento los ácidos saturados y monoinsaturados son afectados principalmente por la intensidad lumínica, registrando el mayor porcentaje de saturados

en el cultivo UAS con 37.7 ± 1.5 % y el menor de 26.7 ± 2.4 % el 0M. En los monoinsaturados ocurre lo contrario siendo el cultivo 0M con 40.0 ± 2.3 % el mayor porcentaje registrado mientras que el UAS con 31.8 ± 0.9 % el menor. En cuanto a la concentración de glicerol se observa una tendencia a la reducción en la saturación de los ácidos grasos monoinsaturados con el aumento de la concentración, mientras que los ácidos grasos poliinsaturados, pese a disminuir a una baja concentración de glicerol (0.05M y 0.1M) respecto al control, en los tratamientos 0.15M y 0.2M los porcentajes de estos aumentaron aunque no significativamente. Dentro de los ácidos grasos poliinsaturados la luz parece ser un factor condicionante en cuanto a las proporciones de las familias omega 3 y 6 siendo la relación n-6/n-3 del tratamiento a 6,000lux de 0.24 mientras que para el tratamiento 0M esta relación fue de 0.11. Para el caso del glicerol esta relación disminuyó a 0.9 en los tratamientos 0.05M, 0.1M y 0.15M mientras que el 0.2M fue de 0.1. (Tabla 8)

Tabla 8: Resumen de los ácidos grasos principales y de interés (expresados como porcentaje del total de los ácidos grasos identificados) del cultivo con glicerol como fuente de carbono cosechado en fase final exponencial.

Ácidos Grasos	UAS	Control 0M	0.05M	0.1M	0.15M	0.2M
C16:0	35.0±1.3	25.3±2.3	32.9±0.7	32.7±0.8	33.2±4.5	29.2±6.7
C16:1	0.5±0.0	0.3±0.0	1.7±0.1	1.8±0.1	2.1±0.2	2.2±0.2
C18:1n9c/t	27.8±0.6	35.1±1.7	29.7±0.9	29.1±1.4	24.7±6.9	27.2±2.9
C18:2n6 (LA)	5.1±0.1 ^a	2.5±0.1 ^b	1.9±0.1 ^c	1.9±0.1 ^c	2.3±0.2 ^b	2.4±0.3 ^b
C18:3n3(ALA)	17.8±0.8 ^a	20.9±1.0 ^b	18.7±0.3 ^c	19.2±0.3 ^c	21.2±1.3 ^b	22.2±1.9 ^b
C20:4n6 (ARA)	0.8±0.1 ^a	0.6±0.1 ^b	0.5±0.0 ^c	0.5±0.0 ^{c,b}	0.5±0.0 ^b	0.6±0.0 ^b
C20:5n3 (EPA)	5.6±1.2 ^a	7.0±0.7 ^{a,b,d}	7.1±0.2 ^b	7.2±0.1 ^b	7.5±0.8 ^{b,d}	7.9±0.5 ^d
C22:6n3(DHA)	tr	tr	tr	tr	tr	tr
Subtotal saturados	37.7±1.5	26.7±2.4	35.5±0.8	35.3±1.0	36.3±5.0	32.1±7.1
Subtotal Monoinsaturados	31.8±0.9	40.0±2.3	35.4±1.2	35.0±1.7	31.4±7.4	33.9±3.6
Subtotal Poliinsaturados	30.4±2.7	32.2±1.9	29.1±0.6	29.7±0.9	32.3±2.6	34.0±2.8
Subtotal n-3	23.6±2.1	28.3±1.7	26.1±0.5	26.7±0.5	28.8±2.3	30.4±2.5
Subtotal n-6	6.4±0.6	3.5±0.1	2.7±0.1	2.8±0.2	3.2±0.2	3.3±0.3
n-6/n-3	0.27	0.12	0.10	0.10	0.11	0.11

(ALA) = α -Linolénico ,(LA)= Linoléico, (ARA)=Araquidónico, (EPA) =Eicosapentanoico,(DHA) =Docosahexanoico, (n-3) =omega 3, (n-6)=omega 6,(n-6/n-3)= relación omega 6 / omega3, (UAS)=condiciones Unidad Académica de Sisal , (Tr)=traza resultados menores a 0.05%), Superíndices con las mismas letras indican que no son diferencias Número de mediciones por tratamiento=3

Ácidos grasos poliinsaturados de interés

α -Linolénico 18:3n3 (ALA)

Para el ácido graso α -Linolenico el tratamiento UAS obtuvo un $17.8\pm 0.8\%$ mientras que para el tratamiento Control 0M, sometido a menor irradiación, el porcentaje obtenido graso pasó a ser $20.9\pm 1\%$. El glicerol influyo negativamente en la producción de este ácido graso afectando en mayor medida a los tratamientos con menores concentraciones, 0.05M y 0.1 M con $18.7\pm 0.3\%$ y $19.2\pm 0.33\%$, mientras que para los tratamientos 0.15M y 0.2M con 21.2 ± 1.3 y $22.15\pm 1.9\%$ existió una tendencia a aumentar con la concentración aunque sin diferencias respecto al control 0M. (Tabla 8)

Linoléico C18:2n6 (LA)

Los resultados de promedios de los porcentajes para el ácido linoleico revelan que la intensidad de luz es un factor que aumenta considerablemente la proporción de este ácido graso duplicando el porcentaje de $2.5\pm 0.1\%$ en el 0M a $5.1\pm 0.1\%$ en el UAS. Respecto a los tratamientos con glicerol se registró un descenso respecto al control 0M de este ácido graso en los tratamientos 0.05M y 0.1M con $1.9\pm 0.1\%$. Posteriormente este porcentaje va aumentando en las siguientes concentraciones hasta alcanzar el $2.4\pm 0.3\%$ en el 0.2M sin llegar a superar al control. (Tabla 8)

Araquidónico C20:4n6 (ARA)

El ácido araquidónico presento muy pocas variaciones, siendo la única diferencia entre tratamientos mixotrofos la de los medios 0.05M con un $0.2\pm 0.2\%$ y el 0.2M con $0.3\pm 0.1\%$ aunque sin llegar a superar al Control 0M con $0.6\pm 0.1\%$. Mientras que el tratamiento UAS con $0.8\pm 0.1\%$ obtuvo el mayor porcentaje registrado. (Tabla 8)

Eicosapentanoico 20:5n3 (EPA)

Los porcentajes de EPA relativo a los ácidos grasos identificados siguieron una tendencia a aumentar con la concentración de glicerol obteniendo el mayor promedio el tratamiento 0.2M con un $7.9\pm 0.5\%$ mientras que el tratamiento 0M obtuvo $7.0\pm 0.7\%$. El tratamiento UAS con $5.6\pm 1.2\%$ presento una amplia dispersión en los promedios por lo que no existe una diferencia entre este y el tratamiento 0M. (Tabla 8)

Docosahexanoico 22:6n3 (DHA)

Para este ácido graso poliinsaturado al obtener los mayores resultados de 0.03% fue considerado traza por lo que ningún tratamiento parece promover la síntesis de este ácido graso. (Tabla 8)

Análisis multivariado

El análisis multivariado indicó que cuando la intensidad lumínica condiciona el cultivo los pigmentos clorofila *a*, *b* y carotenoides se encuentran muy correlacionados con las proteínas del orden de 0.99 de correlación y sus distancias son menores debido a que los pigmentos se encuentran engarzados en proteínas formando los complejos pigmento-proteína en las membranas de los tilacoides. Los pigmentos también poseen una alta correlación con los lípidos totales entre 0.97-0.98 ya que estos forman parte de la fracción lipídica. Sin embargo cuando el glicerol es el condicionante los pigmentos solo se correlacionan entre si y los lípidos totales ya no poseen tanta correlación con estos tan solo del orden de 0.74-0.84 y sus distancias son mayores (Figura14). (Correlaciones en Tablas I y II del anexo)

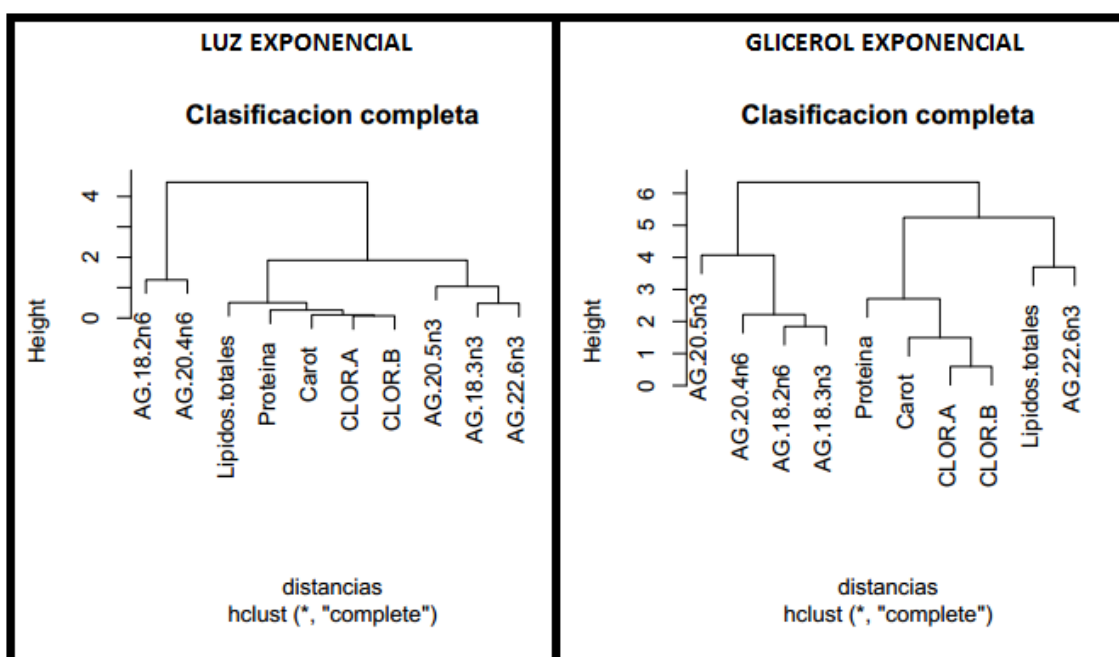


Figura 14: muestra las distancias del análisis multivariado para los ácidos grasos de interés, lípidos totales, pigmentos y proteínas de los cultivos cosechados en la fase final exponencial cuando están afectados por la variable luz y por la variable glicerol.

RESULTADOS : CULTIVOS CON GLICEROL COMO FUENTE DE CARBONO EN FASE ESTACIONARIA

Cinética de crecimiento

El tratamiento UAS inicio la fase de crecimiento exponencial en solo dos días, mientras que para los cultivos que se encontraban a menor irradiación (0M, 0.1M y 0.2M) este tiempo se prolongó un día más. Para el tratamiento UAS la fase exponencial se mantuvo hasta el sexto día donde comenzó la fase estacionaria la cual se caracterizó por fuertes variaciones en la densidad celular. Sin embargo para el resto de los cultivos no fue hasta el noveno día cuando entraron en la fase estacionaria del cultivo. La mayor densidad promedio obtenida al final del cultivo correspondió al UAS con 2.12×10^6 Cel·mL⁻¹ seguido por el tratamiento 0M con 2.07×10^6 Cel·mL⁻¹ no existiendo diferencias significativas entre ellos.

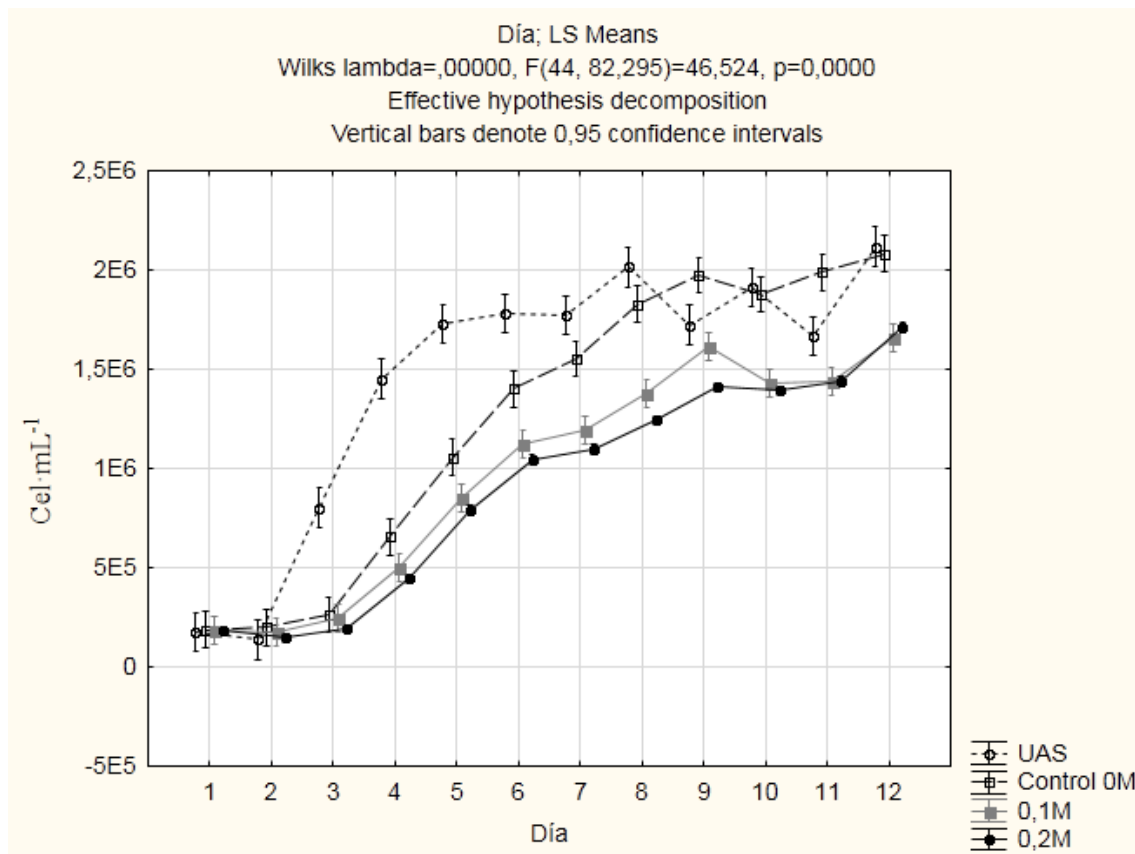


Figura 15: cinética de crecimiento de los cultivos UAS, Control 0M y con glicerol en las concentraciones; 0.1M y 0.2M cosechados durante la fase estacionaria.

Entre los cultivos mixotróficos no existieron diferencias significativas entre los tratamientos 0.1M con una densidad celular de $1.63 \times 10^6 \text{ Cel} \cdot \text{mL}^{-1}$ y 0.2M con $1.71 \times 10^6 \text{ Cel} \cdot \text{mL}^{-1}$ sin embargo estos si fueron significativamente inferiores al control 0M. También puede observarse como las pendientes son menores según aumenta la concentración de glicerol, alargando la fase exponencial en un crecimiento más lento. En el tratamiento 0.1M puede apreciarse como a partir del noveno día, cuando comienza la fase estacionaria, la densidad celular disminuye durante dos días con un incremento en el doceavo día, mientras que en el tratamiento 0.2M tras un leve descenso en el décimo día este sigue aumentando hasta superar al 0.1M en densidad celular a la fecha de la cosecha.

Tamaño de la microalga

Al finalizar el cultivo el tratamiento UAS obtuvo el mayor tamaño promedio con $9.56 \pm 0.84 \mu\text{m}$ de ancho por $14.86 \pm 1.1 \mu\text{m}$ de largo sin embargo la diferencia con el control 0M con 14.38 ± 1.02 de largo y 9.56 ± 0.83 de ancho no fue significativa (Figuras 16a y 17a). Dentro de los tratamientos mixotróficos se observa una tendencia a disminuir el tamaño con la concentración de glicerol siendo el tratamiento 0.2M el de menor tamaño con $8.40 \pm 0.70 \mu\text{m}$ de ancho por $12.72 \pm 0.78 \mu\text{m}$ de largo. Entre los tratamientos que contenían glicerol las medidas correspondientes a la longitud fueron diferencias significativas respecto al control mientras que para el ancho no hubo diferencias significativas. (Figuras 16b y 17b)

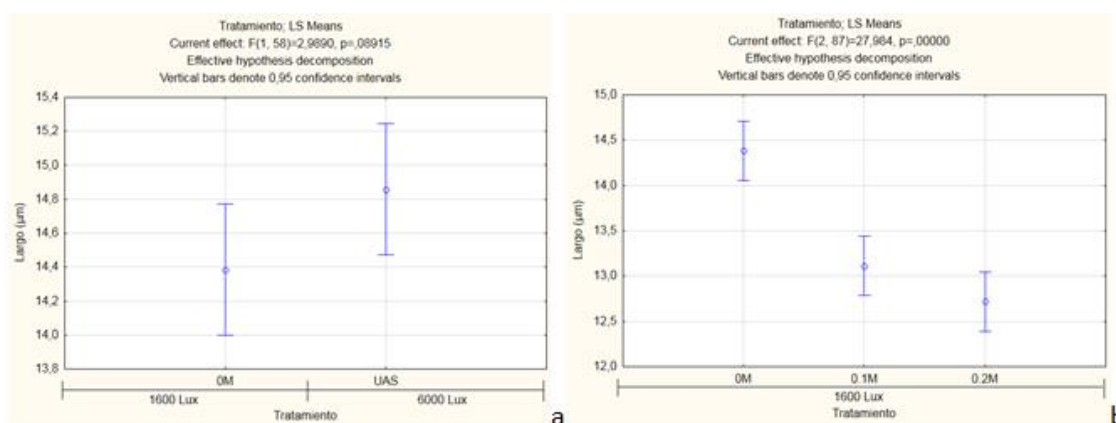


Figura 16a y 16b: longitud de *T. chuii* en el cultivo con glicerol como fuente de carbono en fase estacionaria

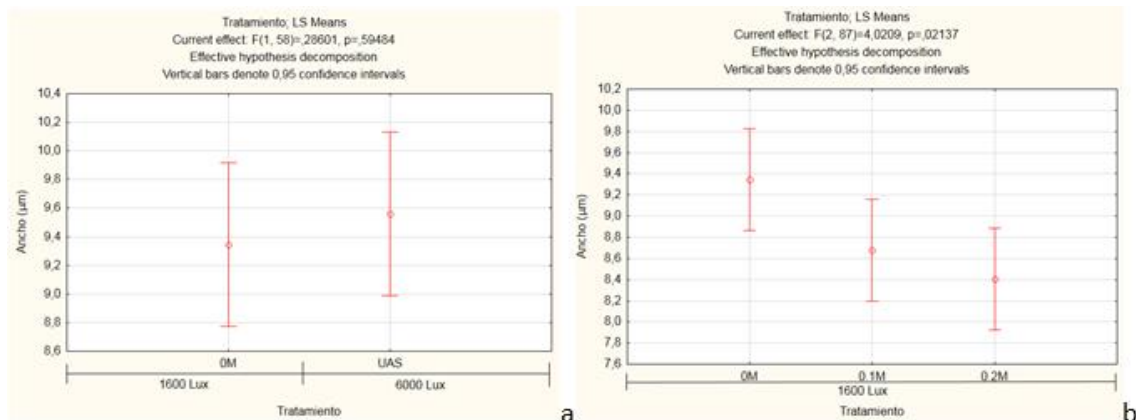


Figura 17a y 17b: ancho de *T. chuii* en el cultivo con glicerol como fuente de carbono en fase estacionaria.

Pigmentos

En este cultivo las concentraciones de clorofila a, b y carotenoides variaron con la cantidad de luz a la que fueron expuestos los medios control UAS y 0M siendo este último el que arroja los valores más altos en todos los pigmentos con $3.81 \pm 0.14 \mu\text{g/mL}$ para clorofila a, 2.25 ± 0.09 en clorofila b y $1.98 \pm 0.09 \mu\text{g/ml}$ para los carotenoides. Mientras que para las condiciones UAS las concentraciones fueron de $2.29 \pm 0.09 \mu\text{g/mL}$ para clorofila a, 1.52 ± 0.03 en clorofila b y $1.43 \pm 0.06 \mu\text{g/ml}$ para los carotenoides. En cuanto a los cultivos mixotróficos se observa una disminución en la concentración de pigmentos según se incrementan las concentraciones de glicerol siendo el tratamiento 0.2M el que menor cantidad de pigmentos registró con $2.57 \mu\text{g/mL}$ para clorofila a, 1.46 ± 0.03 en clorofila b y $1.32 \pm 0.04 \mu\text{g/ml}$ para los carotenoides. (Tabla 9)

Tabla 9: tabla resumen de los resultados obtenidos para % proteína, % lípidos totales y pigmentos ($\mu\text{g/mL}$) en el cultivo con glicerol como fuente de carbono en la fase estacionaria.

Trat.	Proteína%	Lípidos %	Chlor a ($\mu\text{g/mL}$)	Chlor b ($\mu\text{g/mL}$)	Carot ($\mu\text{g/mL}$)
UAS	8.32 ± 0.33^a	16.73 ± 0.23^a	2.29 ± 0.09^a	1.52 ± 0.03^a	1.43 ± 0.06^a
0M	11.17 ± 0.93^b	18.27 ± 0.15^b	3.81 ± 0.14^b	2.25 ± 0.09^b	1.98 ± 0.09^b
0.1M	$10.34 \pm 1.38^{b,c}$	17.90 ± 0.36^b	2.91 ± 0.20^c	1.64 ± 0.12^c	1.53 ± 0.10^c
0.2M	8.38 ± 0.58^c	22.03 ± 0.81^c	2.57 ± 0.04^d	1.46 ± 0.03^d	1.32 ± 0.04^d

(UAS)= Condiciones de la Unidad Académica de Sisal, (M)= moles de glicerol, (Chlor a)=Clorofila a, (Chlor b)=clorofila b, (carot)= Carotenoides, Superíndices con las mismas letras indican que no son diferencias. Mediciones por tratamiento=3

Proteína

Los porcentajes de proteína se vieron afectados por las variables de la intensidad de luz del cultivo y presencia de glicerol. El tratamiento UAS presentó un valor promedio de

8.32±0.33% mientras que a 1,600Lux este valor promedio fue de 11.17±0.93 % siendo esta la mayor diferencia entre los tratamientos. Respecto al glicerol se observa que este tiene un efecto negativo en cuanto la producción de proteínas siendo tratamiento 0.2M el que menor porcentaje de proteínas presentó con 8.38±0.58%. (Tabla 8)

Lípidos totales

En cuanto a los lípidos totales se observa que la intensidad de luz está relacionada con las diferencias observadas entre los cultivos 0M y UAS que presentaron valores de 18.27±0.15% y 14.27±0.15% respectivamente. Dentro de los tratamientos que contenían glicerol como fuente de carbono el tratamiento 0.1M disminuyó ligeramente el promedio de lípidos respecto al control 0M mientras que a mayor concentración el tratamiento 0.2M obtuvo la mayor proporción promedio de lípidos totales con un 22.03±0.81%. (Figura 18)

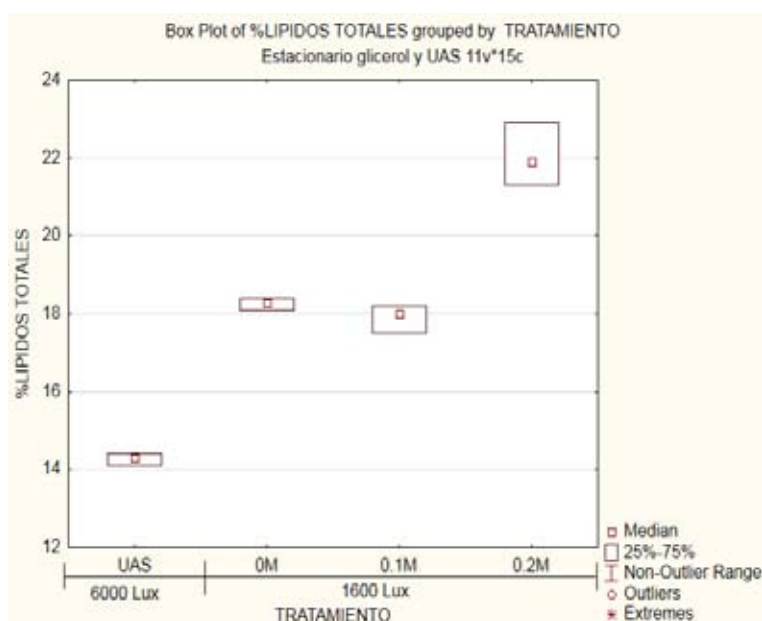


Figura 18: muestra los resultados de los lípidos totales como % del cultivo con glicerol como fuente de carbono en fase estacionaria

Perfil ácidos grasos

La intensidad lumínica parece ser un factor relacionado con las proporciones de ácidos grasos poliinsaturados en la microalga durante el estado estacionario siendo el tratamiento UAS con 37.6±2.1% superior al 29.1±5.8% obtenido por el tratamiento Control 0M. La relación n-6 /n-3 del tratamiento UAS fue de 0.19 mientras que para el control 0M esta disminuyó a 0.11 debido a que la síntesis de ácidos grasos de la familia

omega 6 fue la mitad de la obtenida en el tratamiento más iluminado UAS. Entre los cultivos en los que el glicerol actuaba como fuente de carbono se aprecia un aumento considerable de ácidos grasos poliinsaturados con la adición de glicerol llegando a suponer hasta un $39.9 \pm 1.9\%$ en el tratamiento 0.2M. Las relaciones n-6 /n-3 entre el control y las dos concentraciones glicerol se mantuvieron constantes a 0.11 ya que los porcentajes de ambas familias aumentaron de manera proporcional. (Tabla 10)

Tabla 10: tabla resumen de los ácidos grasos principales y de interés (expresados como % del total de los ácidos grasos identificados) del cultivo con glicerol como fuente de carbono cosechado en fase exponencial. (Tr=traza resultados menores a 0.05%).

Ácidos Grasos	UAS	Control 0M	0.1M	0.2M
C16:0	18.8±3.7	26.6±0.4	29.6±0.3	29.7±3.3
C16:1	3.3±0.6	7.6±1.3	3.3±0.1	2.7±0.1
C18:1n9c/t	33.9±2.8	30.5±8.4	25.8±0.9	20.8±4.7
C18:2n6 (LA)	5.2±0.4 ^a	2.5±0.4 ^b	3.1±0.0 ^c	3.4±0.2 ^d
C18:3n3 (ALA)	20.0±0.8 ^a	17.1±3.3 ^{a,b}	18.6±0.2 ^a	21.4±1.0 ^b
C20:4n6 (ARA)	1.4±0.1 ^a	0.7±0.1 ^b	0.9±0.0 ^c	1.1±0.0 ^a
C20:5n3 (EPA)	9.9±0.7 ^a	8.1±1.8 ^b	11.8±0.3 ^c	13.0±0.6 ^d
C22:6n3 (DHA)	-	tr	tr	-
Subtotal saturados	20.4±3.9	27.8±0.7	31.8±1.0	32.4±3.4
Subtotal Monoinsaturados	41.9±3.8	43.1±10.7	33.0±1.0	27.7±5.0
Subtotal Poliinsaturados	37.6±2.1	29.1±5.8	35.2±0.6	39.9±1.9
Subtotal n-3	30.0±1.5	25.3±5.1	30.5±0.5	34.5±1.6
Subtotal n-6	7.3±0.5	3.5±0.6	4.4±0.1	5.0±0.2
n-6/n-3	0.24	0.14	0.14	0.15

(ALA) = α -Linolénico, (LA)= Linoléico, (ARA)=Araquidónico, (EPA) =Eicosapentanoico, (DHA) =Docosahexanoico, (n-3) =omega 3, (n-6)=omega 6, (n-6/n-3)= relación omega 6 / omega 3, (UAS)=condiciones Unidad Académica de Sisal, (Tr)=traza resultados menores a 0.05%), Superíndices con las mismas letras indican que no son diferencias. Número de mediciones por tratamiento=3

Ácidos grasos poliinsaturados de interés

α -Linolénico 18:3n3 (ALA)

Debido a la alta dispersión que presentaron resultados para este ácido graso en el tratamiento Control 0M con $17.1 \pm 3.3\%$ no se hallaron diferencias con el resto de los tratamientos, aunque los promedios de los porcentajes obtuvieron una tendencia a aumentar con la concentración de glicerol siendo el mayor porcentaje el obtenido en el tratamiento 0.2M con $21.4 \pm 1.0\%$ mientras que para el tratamiento UAS el porcentaje promedio fue de $20.0 \pm 0.8\%$.(Tabla 10)

Linoléico 18:2n6 (LA)

La producción de ácido linoléico parece estar relacionada con la intensidad lumínica a la que están sometidos los tratamientos siendo el UAS con $5.2\pm 0.4\%$ el que mayor porcentaje presentó frente al 0M que fue de $2.5\pm 0.4\%$. Entre los tratamiento con glicerol parece ser que este tiene un efecto positivo que aumenta con la concentración siendo el 0.2M con $3.4\pm 0.2\%$ el mayor porcentaje obtenido a 1600lux. (Tabla 10)

Araquidónico C20:4n6 (ARA)

En este ácido graso obtuvo los mayores porcentajes en los tratamientos UAS y 0.2M con 1.4 ± 0.1 y 1.1 ± 0.0 respectivamente. Sin embargo el tratamiento control, sometido a menos iluminación, presentó el menor valor registrado con 0.7 ± 0.1 . Los porcentajes aumentaron ligeramente con la concentración de glicerol. (Tabla 10)

Eicosapentanoico 20:5n3 (EPA)

La proporción relativa del ácido graso eicosapentanoico en la microalga varía con las variables de intensidad lumínica y en mayor medida con la presencia de glicerol. Al aumentar la intensidad lumínica los porcentajes promedios de este ácido graso disminuyen como revela la diferencia entre los tratamientos 0M con $9.9\pm 0.7\%$ y el UAS con $8.1\pm 1.8\%$. La presencia de glicerol en los cultivos también aumenta la proporción de EPA siendo el tratamiento 0.2M con $13.0\pm 0.6\%$ el mayor porcentaje obtenido mientras que el 0.1M con $11.8\pm 0.3\%$ también fue superior al control 0M. (Tabla 10)

Docosahexanoico 22:6n3 (DHA)

El ácido graso docosahexanoico estuvo ausente en los tratamientos UAS y 0.2M, mientras que para los tratamiento 0M y 0.1M las pequeñas variaciones de centésimas que presentaron fueron consideradas como trazas. (Tabla 10)

Análisis multivariado

El análisis multivariado indicó que cuando la luz es el factor condicionante en el cultivo cosechado en la fase estacionaria los pigmentos clorofila *a* y *b* se encuentra muy correlacionado entre sí, casi del orden de 1.00 de correlación y las distancias entre estos y los lípidos totales son menores con una correlación de entre 0.97-0.98 debido a que forman parte de la fracción lipídica. Sin embargo cuando el glicerol es el factor variable los lípidos totales tiene más correlación con los ácidos grasos 18:3n3, 18:2n6 y 20:5n3 del orden entre el 0.94 y 0.98. Esta es una correlación lógica entre ácidos grasos ya que

el ácido graso 18:2n6 es precursor del 18:3n3 que a su vez lo es de 20:5n3.(Figura 19)
(Correlaciones en Tablas III y IV del anexo)

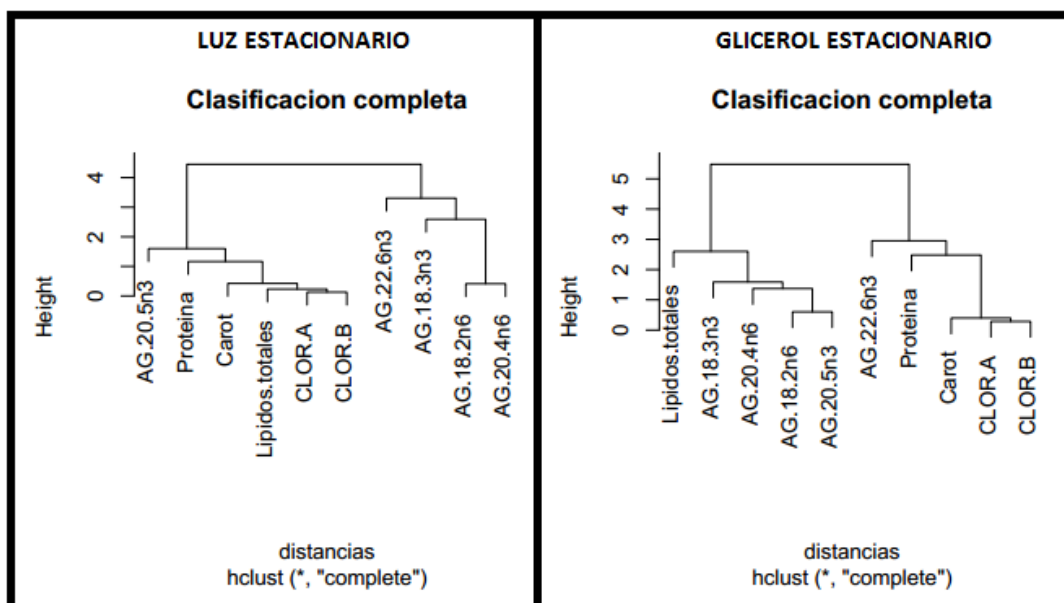


Figura 19: muestra las distancias del análisis multivariado para los ácidos grasos de interés, lípidos totales, pigmentos y proteínas de los cultivos cosechados en la fase estacionaria cuando están afectados por la variable luz y por la variable glicerol

DISCUSIÓN

Cinética de crecimiento

En el cultivo cosechado en la fase exponencial las diferencias observadas respecto a la densidad celular entre los tratamientos control 0M (1,600 Lux) y UAS (6,000 Lux) revelan que, aun siendo este último significativamente superior, se trata una diferencia bastante baja en relación con los 4,400 lux de diferencia entre los tratamientos. Esto podría indicar que se está produciendo un proceso de fotoinhibición en esta fase del cultivo, pudiendo ser la condición de 6,000 lux excesiva y producir procesos de fotooxidación dentro de la célula limitando su crecimiento (Barnes y Mann 1999). Este efecto fue observado por Ghezlbash et al (2008) al exponer a 6,500 lux esta microalga a la misma salinidad de $30\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. En cuanto a la presencia de glicerol en los cultivos cosechados en la fase estacionaria puede observarse como las pendientes de las curvas de crecimiento disminuyen respecto al control ralentizando el crecimiento de la microalga. Esto último no se corresponde con lo encontrado en otras especies de microalgas que son capaces de asimilar el carbono orgánico de manera mixotrófica donde la tasa de

crecimiento es aproximadamente la suma del crecimiento heterotrófico y fotoautotrófico (Kitano et al 1997, Lee 2004, Cerón et al., 2005).

Tamaño de la microlaga

En los tratamientos con glicerol la disminución del tamaño podría estar relacionado con el hecho de que este actúa en la célula como osmorregulador (Hu, 2004), y debido a la diferencia de concentración de glicerol entre el medio y el interior de la célula se podría producir, por medio de la osmosis, una pérdida agua del interior de la célula para mantener el equilibrio osmótico con la consecuente pérdida de volumen.

Pigmentos

Las diferencias en las concentraciones de pigmentos relacionadas con la intensidad lumínica pudiera ser debido a un proceso de fotoinhibición producido por la condición de 6,000lux, que al ser excesiva, no permitiría la absorción de luz por parte de los sistemas fotosintético reduciéndose así el contenido de pigmentos (Barnes y Mann 1999). Mientras que para el tratamiento 0M cuando la luz es un factor limitante de crecimiento los organismos fotosintéticos tienden a almacenar pigmentos auxiliares que les permiten la captación de energía suficiente para su crecimiento (Piqueres y Vega 1998). En el caso del glicerol, que actúa como fuente de carbono, los resultados menores a los reportados por el control 0M se corresponden con lo reportado para otras microalgas cuando se añade otra fuente de carbono como acetato, etanol o glucosa (Bermudez et al 2003). Este efecto inhibitorio de síntesis de clorofila cuando se utilizan sustratos orgánicos fue propuesto por Lewitus y Caron (1991). El uso de glicerol como fuente de carbón en microalgas puede inducir cambios bioquímicos y estructurales en los sistemas fotosintéticos como una reducción de contenido de ficoeritrina, una disminución del embalaje de los tilacoides, número de tilacoides por célula y tamaño de las partículas que forman el fotosistema II (Lewitus et al., 1991) reduciendo por lo tanto el contenido en pigmentos.

En cuanto a la producción de carotenoides los resultados contradicen a lo encontrado por Cerón et al., (2005) para el cultivo de *Phaeodactylum tricorutum* en glicerol ya que el contenido de estos disminuye en todos los casos con el incremento en la concentración de carbono orgánico.

Proteína

La proporción de proteína de la microalga posee una correlación de 0.99 con las concentraciones de clorofila a, b y carotenoides a diferentes intensidades de luz. Esto es

debido a que los pigmentos no se encuentran libres en las células sino que se encuentran engarzados dentro de las proteínas fotosintéticas en las membranas de los tilacoides. (Tomaselli 2004). Además moléculas de pigmentos como la clorofila a están compuestas por un anillo tetrapirrólico que contiene cuatro átomos nitrógeno que es contabilizado como proteína total ya que esta se obtiene a partir del nitrógeno elemental de la muestra.

El aumento en el porcentaje de proteínas con la disminución de intensidad de la luz se corresponde con lo encontrado por Ghezelbash et al (2008) para esta microalga en similares condiciones de cultivo. Esto es debido a que cuando la luz es un factor limitante de crecimiento los organismos destinan el nitrógeno a la formación de pigmentos mientras que cuando la luz es abundante el nitrógeno es destinado a la biosíntesis y no al almacenamiento de pigmentos auxiliares (Piqueres y Vega 1998)

Los menores porcentajes de proteínas obtenidos en los tratamientos con glicerol pudieran ser debidos a que la microalga tras asimilar el glicerol del medio por difusión simple y tras los procesos de fosforilización y oxidación se obtiene gliceraldehído 3 fosfato el cual entra en la glucólisis obteniendo así la energía necesaria para el crecimiento pudiendo inhibir rutas metabólicas como la ruta pentosa fosfato (Aubert et al 1994) que en condiciones normales se produce en los cloroplastos ricos en complejos proteína-pigmentos.

Lípidos totales

Los menores porcentajes de lípidos totales encontrados en los tratamientos UAS en ambos cultivos podría deberse a que una condición de alta irradiación como la de 6,000 lux podría producir en la microalga un efecto de fotoinhibición el cual, entre otros procesos, puede causar la oxidación de los lípidos reduciendo así el porcentaje total de lípidos (Barnes y Mann 1999). Además la baja concentración de pigmentos encontrados en este tratamiento puede interferir en el porcentaje total de lípidos ya que estos forman parte de la fracción lipídica de la microalga (Hernyez et al, 2009). El mayor contenido de lípidos totales encontrado en los tratamientos 0M sometidos a 1,600 Lux puede ser debido al hecho de que la microalga sometida a una menor iluminación requiere de una mayor cantidad de pigmentos para obtener la energía necesaria, los cuales se encuentran en las membranas de los tilacoides compuestos principalmente por una bicapa lipídica de mono y digalactosyldigliceridos y proteínas (Singer y Nicholson,

1972). Según Solovchenko et al. (2008), una baja intensidad luminosa induce la formación de lípidos polares (fosfolípidos y glucolípidos), que están funcional y estructuralmente asociados a la membrana celular.

En cuanto al efecto negativo en la proporción de lípidos observado en los tratamientos con glicerol del cultivo cosechado en la fase exponencial, puede ser debido al efecto, que según Lewitus et al, (1991), produce el uso de glicerol como fuente de carbón en microalgas en relación a la disminución del número, embalaje de los tilacoides y por lo tanto de los lípidos estructurales que los conforman. Sin embargo el alto porcentaje de lípidos totales encontrado en el tratamiento 0.2M del cultivo cosechado en la fase estacionaria no parece estar relacionado con los lípidos estructurales de los sistemas fotosintéticos puesto que dicho tratamiento posee los niveles más bajos de pigmentos y proteínas reportados para la condición de 1,600lux, pudiendo ser estos lípidos de almacenamiento que se encuentran en forma de triacilgliceridos, estructurales propios de la membrana celular u otros compuesto que conforman la fracción lipídica. Una posible explicación al alto contenido lipídico encontrado en el tratamiento mixotrófico cosechado en la fase estacionaria podría ser el incremento de carbono disponible que permite a las células incrementar la proporción de lípidos de almacenamiento (Roessler 1990). Además en esta fase del cultivo es cuando la muchas de las microalgas comienza a almacenar lípidos debido a la limitación de nutrientes y el descenso de la división celular (Pratoomyot et al 2005).

Ácidos grasos poliinsaturados de interés

El contenido de ácidos grasos de interés en este trabajo varió con respecto a la fase de crecimiento, intensidad de luz y a la concentración glicerol. El ácido graso más afectado por el cambio de intensidad de luz fue el LA el cual se mantuvo siempre en mayor proporción en los cultivos sometidos a una mayor irradiación (tratamientos UAS) independientemente de la fase de crecimiento. Sin embargo la fase de crecimiento si modificó las cantidades de LA obtenido en los tratamientos con glicerol siendo en todos los casos las proporciones de estos mayores al control cuando este se encontraba en la fase estacionaria. Este ácido graso, el primero de la serie omega 6, es un importante precursor de ácidos grasos poliinsaturados como ALA y DHA con los que, para el cultivo en fase estacionaria, mantuvo una alta correlación de los datos con un 0.94 y 0.98 respectivamente. Esto último unido a la baja proporción relativa de ARA encontrado en ambos cultivos podría indicar que esta microalga está utilizando la ruta

$\Delta 6$ -desaturasa/ $\Delta 6$ -elongasa para la síntesis de ácidos grasos altamente poliinsaturados una de las rutas más comunes (Guedes et al 2011).

Los ácidos α -Linolenico y ecosapentanoico también obtuvieron diferencias según la fase de crecimiento y la intensidad de la luz a la que fueron expuestos los tratamientos, encontrándose mayores contenidos de ambos ácidos grasos en los tratamientos a menor irradiación (0M) en la fase exponencial, mientras que en los cultivos cosechados en la fase estacionaria los mayores contenidos de estos ácidos grasos correspondieron a los tratamientos a mayor irradiación (UAS) excepto para el ALA donde debido a la amplia dispersión de los resultados no se muestran diferencias. Estas diferencias entre las fases de crecimiento pudieran estar relacionadas con la velocidad de crecimiento y la velocidad con la que las microalgas del tratamiento UAS agotan los nutrientes en el cultivo cosechado en la fase estacionaria, el cual alcanza dos días antes esta fase y comienzan a observarse oscilaciones en la densidad celular hasta el día de cosechado. Según Garibay et al. (2009) el contenido oleaginoso y el perfil de composición lipídica de las microalgas, puede ser controlado mediante la limitación de nutrientes.

La proporción relativa de EPA se vio incrementada respecto al control 0M en los tratamientos mixotróficos en ambos cultivos, siendo mayor el aumento en la fase estacionaria con el tratamiento 0.2M. En 2005 Cerón y colaboradores incrementaron mediante el cultivo mixotrófico con glicerol los porcentajes de EPA de la microalga *Phaeodactylum tricornutum* obteniendo las mayores concentraciones con 0.1M y adiciones de amonio.

Debido a los bajos porcentajes encontrados de los ácidos grasos poliinsaturados ARA y DHA en ambos cultivos, estos fueron considerados cantidades despreciables. Esto coincide con lo encontrado por Dustan et al (1991) y Brown et al., (1997) para esta microalga.

CONCLUSIÓN

El tratamiento mixotrófico usando glicerol a 0.2M parece tener un efecto positivo en la producción de lípidos totales en las algas cosechadas durante la fase estacionaria, obteniendo un $22.03 \pm 0.81\%$. La proporción de ácidos grasos poliinsaturados obtenidos con este tratamiento fue del $39.9 \pm 1.9\%$ con un aumento considerable de la proporción de EPA $13.0 \pm 0.6\%$ y altos niveles de LA y ALA respecto al control. Los resultados obtenidos en proteínas y pigmentos de este tratamiento fueron muy similares al

obtenido en el tratamiento UAS. El tamaño de *T. chuii* cultivada en glicerol 0.2M reduce su tamaño por lo que su ingestión para los estadios larvales tempranos de peneidos se facilita. Por lo anterior, este tratamiento fue elegido para ser evaluado como fuente de alimento para larvas temprana de *L.vannamei*.

CAPITULO III.

Evaluación de *T.chuii* en la alimentación de larvas tempranas de *L.vannamei*

Diseño experimental para *L. vannamei*

Para el experimento con larvas tempranas (desde NV a PZIII) de *litopenaus vannamei* se utilizaron tres dietas. La primera de *T. chuii* cultivada durante 12 días en medio F/2 con glicerol a una concentración de 0.2M como sustrato orgánico, otra de *T. chuii* pero en condiciones de la UAS (medio F/2 y a 6000 Lux de iluminación), y un control con la dieta estandar para larvas de *L. vannamei* compuesto por una mezcla de *T.chuii* y la diatomea *Chaetoceros gracillis* propuesta por Treece y Yates (1990). Para que el tratamiento experimental posea una composición similar al medio seleccionado se inocularon los matraces de manera que se alimentó todos los días con cultivos de 12 días.

El cultivo experimental de las larvas fue llevado a cabo en matraces tipo bola de 2L de capacidad. Un total de 150 Nauplios L⁻¹ fue colocado en cada matraz. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con 9 réplicas/tratamiento de las cuales 7 fueron utilizadas para los análisis de reservas lipídicas, lípidos totales, perfil de ácidos grasos, proteínas y supervivencia, y las dos replicas restantes para determinar los índices de desarrollo.

Origen de las larvas y condiciones de cultivo

Las larvas utilizadas se obtuvieron de los reproductores cultivados en la Unidad Académica Sisal, Yucatán, México. Después del cosechado, los nauplios fueron aclimatados a temperatura constante de 28°C introduciendo los matraces al baño maría con agua dulce recirculante. La salinidad para el cultivo fue de 35g·L⁻¹, la aireación moderada y el agua utilizada para el cultivo fue previamente esterilizada.

Esquema de alimentación

El esquema de alimentación para las dietas de *T.chuii* experimental y *T.chuii* estándar UAS se realizó ajustando las concentraciones dos veces al día (mañana y tarde) antes de alimentar para evitar exceso o déficit de alimento. El esquema ajustado se muestra en la

tabla 11. El esquema de alimentación Estándar es mostrado en la tabla 22 (combinación de *T.chuii* y *Ch.gracilllis*) propuesta por Treece y Yates (1990)

Tabla 11: Esquema de alimentación de estadios larvales tempranos de *Litopenaus vannamei* para los tratamientos de *T.chuii* en condiciones UAS y *T.chuii* experimental 0,2M glicerol.

Estadio	Concentración <i>T.chui</i>
NV	5,000 Cel·mL ⁻¹
PZI	10,000 Cel·mL ⁻¹
PZII	15,000 Cel·mL ⁻¹
PZIII	25,000 Cel·mL ⁻¹

Tabla 12: Esquema de alimentación de estadios larvales tempranos de *Litopenaus vannamei* para el tratamiento de *Chaetoceros gracilis* y *tetraselmis chui* (Treece and Yates 1990)

Estadio	Concentración <i>Ch.gracilis</i>	Concentración <i>T.chui</i>
NV	10,000 Cel·mL ⁻¹	5,000 Cel·mL ⁻¹
PZI	40,000 Cel·mL ⁻¹	10,000 Cel·mL ⁻¹
PZII	75,000 Cel·mL ⁻¹	10,000 Cel·mL ⁻¹
PZIII	85,000 Cel·mL ⁻¹	25,000 Cel·mL ⁻¹

Indicadores zootécnicos

Supervivencia

La supervivencia fue determinada al final de los experimentos contando el número de PZ III producidas en relación con el número de nauplios V cultivados.

Crecimiento e índice de desarrollo.

Se obtuvieron las medidas de longitud y peso de las larvas, extrayendo 10 larvas de cada tratamiento en cada uno de los subestadios. Las mediciones realizaron en microscopio óptico con regleta mientras que peso se calculó mediante el uso de una balanza analítica. La longitud para las PZI se realizó midiendo desde el extremo anterior del cefalotórax hasta el final de la furca sin espinas, mientras que en PZII y PZIII se la medida fue tomada desde el extremo anterior del rostrum hasta el final de la furca sin espinas.

Se determinó el crecimiento absoluto (CA) y relativo (CR) así como las tasas de crecimiento absoluto (TCA) y relativo (TCR) del peso y la longitud de acuerdo con las

formulas propuestas por Busacker et al., (1990). Además de evaluarse la tasa específica de crecimiento TCE mediante la fórmula:

$$TCE = [(Ln Y2 - Ln Y1) / (t2-t1)] \cdot 100$$

Dónde: Ln Y1 y Ln Y2 son el logaritmo natural del peso al inicio y al final de la fase de crecimiento, t2-t1 la duración del experimento en días.

Para la determinación del índice de desarrollo se utilizará la fórmula propuesta por Villegas y Kanazawa, (1979):

$$I.D = \sum A / N$$

Dónde: A es el número de organismos de cada subestadio multiplicado por el numero asignado a cada subestadio y N es el número total de larvas muestreadas. El valor del número absoluto asignado a cada subestadio larval es: PZI=1, PZII=2, PZIII=3,

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todos los tratamientos de este experimento se mantuvieron estables hasta el cuarto día de cultivo cuando el agua de los matraces del tratamiento Tch+Gly comenzó a verse ligeramente turbia y en las larvas extraídas para el índice de desarrollo se podía observar colonias de microorganismos adheridos a los apéndices del cefalotórax (Fotografía 5). Este aumento de la carga de microorganismos en el agua pudiera haber sido favorecido por la presencia de los cordones fecales de las larvas donde comienza la colonización ya que estos cordones podrían aportar desechos nitrogenados, que unido al carbono del glicerol residual contenido en el agua de las microalgas, favorecen el crecimiento de la epifauna presente en el agua de las larvas durante la siembra de los matraces y/o en el interior de los nauplios (Crab et al., 2009) (Figura 20).

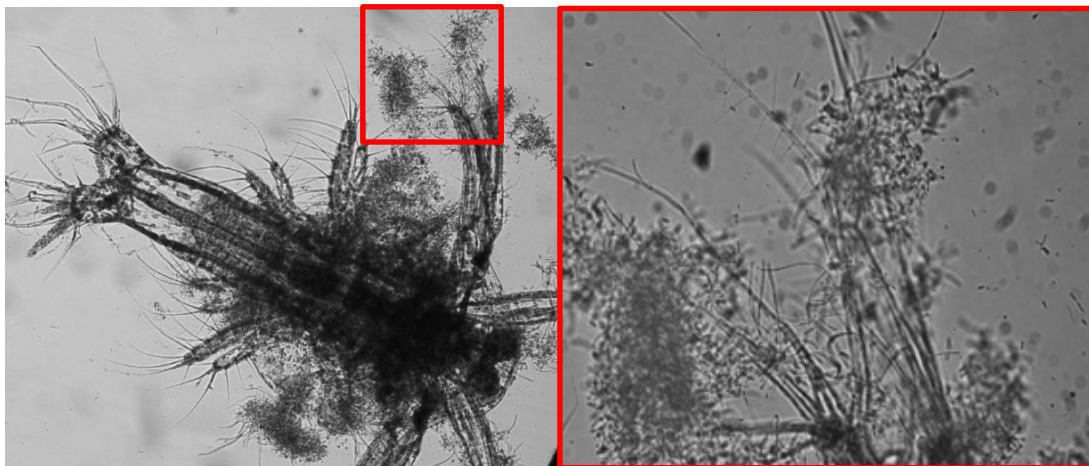


Figura 20: Fotografía que muestran los microorganismos adheridas a las PZI del tratamiento T.ch+Gly

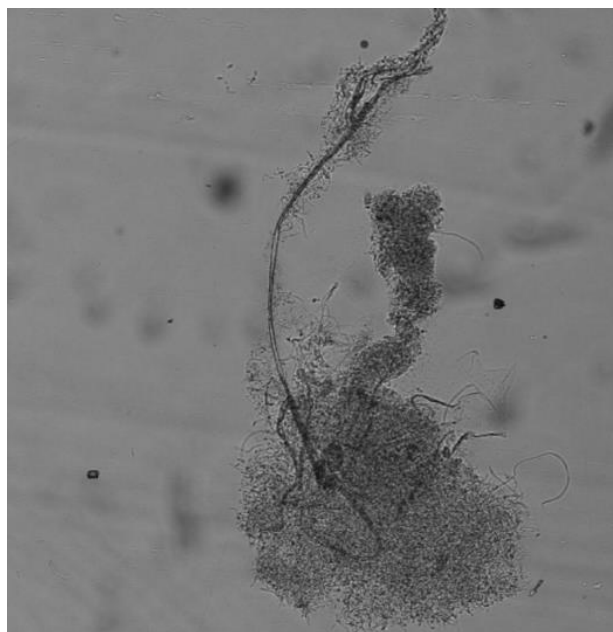


Figura 21: Fotografía que muestran los microorganismos colonizando los cordones fecales del tratamiento T.ch+Gly

Las larvas del tratamiento experimental T.ch+Gly, que continuaban en el estadio de PZI al cuarto día, resultaban muy difíciles de extraer para evaluación microscópica y determinación del estadio del desarrollo debido a la baja densidad de larvas y la alta carga de partículas en suspensión. El tratamiento control (Tch+Chae) alcanzó el índice de desarrollo 3 después de cinco días y fue desmontado mientras que el tratamiento T.ch continuaba en el índice 2 tras seis días y se decidió levantarlo (Tabla 13). La supervivencia de los tratamientos Tch+Chae y Tch fueron del 91,52 y 76,10 %

respectivamente mientras que para el tratamiento de Tch+Gly no se encontraron larvas en el quinto día (Tabla 14). La falta de asincronismo es evidente debido a que en ninguno de los días se presentan dos o más estadios larvarios de forma simultánea en los cultivos.

Tabla 13: estadios e índices de desarrollo durante el transcurso del experimento.

Tratamiento	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4		Día 5		Día 6	
	Est.	I.D	Est.	I.D	Est.	I.D	Est.	I.D	Est.	I.D	Est.	I.D
Tch+Chae	NII		PzI	1	PzI	1	PzII	2	PzIII	3		
T.ch	NII		PzI	1	PzI	1	PzI	1	Pz II	2	Pz II	2
Tch+Gly	NII		PzI	1	PzI	1	PzI	1				

Tabla 14: % de supervivencia de las larvas de *L. vannamei*

Tratamiento	Estadío	% supervivencia
Tch+Chae	PzIII	91.52
Tch	PzII	76.1
Tch+Gly	PzI	0

Indicadores zootécnicos

Los mejores resultados se obtuvieron en las larvas alimentadas con la dieta Tch+Chae (*T.chuii*+*Ch.gracilis*) con un incremento en el crecimiento absoluto de 29.3 µg frente a los 6.60 y 1.80 µg de las dietas T.ch y T.ch+Gly respectivamente. El incremento diario máximo en peso fue de 4.88 µg/día con la dieta Tch+Chae y el menor 0.6 µg /día con la dieta T.ch+Gly , lo anterior representa una diferencia de 87.71% a favor de los primeros que si consiguieron llegar hasta PzIII mientras que los segundos no lograron pasar de PzI. Por otra parte, las diferencias obtenidas en las tasas de crecimiento TCA, TCR y TCE para las larvas de *L. vannamei* con la dieta Tch+Chae también fueron muy superiores respecto a las otras dietas principalmente porque las larvas no consiguieron llegar a PzIII al día en las que estas fueron cosechadas (Tabla15). D’Souza y Loneragan (1999) reportaron una supervivencia de larvas de *L.vannamei* superior cuando fueron alimentadas con *Chaetoceros muelleri* o con mezcla de microalgas que las larvas se alimentaron con *Tetraselmis suecica*, *Isochrysis sp.* o *Dunaliella tertiolecta* sola. Además el desarrollo de las larvas alimentadas con *C. muelleri* o con mezcla de microalgas fue siempre más rápido que cuando las larvas se alimentaban con las otras

dietas. Estas diferencias también podrían estar relacionada con la preferencia de alimentación en los primeros subestadios de protozoa de diatomeas en el esquema Tch+Chae frente a los tratamiento en las que *T.chuii* es la microalga exclusiva quizá no por diferencias de tamaño como mencionan algunos autores (Tobias-quinitio y Villegas, 1982; Gallardo et al., 1994; Núñez et al., 2001) sino más bien porque las diatomeas abastecen a las larvas de ácidos grasos esenciales que se encuentran ausentes en *Tetraselmis chuii* como el DHA que son necesarios para obtener una alta supervivencia y acelerar los cambios de estadios de PzI y PzII (Piña et al., 2005; D'Souza Loneragan, 1999; Gallardo et al., 1994; Wilkenfeld et al., 1984).

Tabla 15: Tasa de crecimiento absoluto (TCA), relativo (TCR) y específico (TCE) para el peso (μg) de larvas de *L. vannamei*

Registro	Unidades	Tch+Chae	Tch	Tch+Gly
Días de cultivo	Días*	4	5	3
Estadio cosechado	N/C	PzIII	PzII	PzI
Peso inicial	μg	5.60 \pm 1.65	7.40 \pm 1.84	5.80 \pm 1.99
Peso final	μg	34.90 \pm 8.20	14.00 \pm 5.46	7.60 \pm 3.06
Crec. Absoluto (CA)	μg	29.30	6.60	1.80
Tasa crec. Absoluto (TCA)	$\mu\text{g}/\text{día}$	4.88	1.32	0.60
Crec. Relativo (CR)	%	523.21	89.19	31.03
Tasa crec. Relativo (TCR)	%/día	130.80	17.84	10.34
Tasa crec. Especifico	%/día	45.74	12.75	9.01

(Promedio \pm desviación Stándard). N/C (no corresponde). *Días a partir que la larva comienza la alimentación exógena (PzI)

CONCLUSIÓN

El tratamiento de Tch+Gly no resulta viable para el cultivo de larvas de *L. vannamei* ya que aún tras esterilizar el agua de cultivo y materiales usados en la alimentación, utilizar filtros en la aireación para los cultivos de microalgas y camarón y realizando una baja manipulación de los matraces, la epifauna presente en el agua de los nauplios se ve aumentada exponencialmente por la presencia de glicerol residual del cultivo de las microalgas (Figura 22). Este aumento en la carga de microorganismos oportunistas llegan a formar grumos que se adhieren a las larvas impidiendo que estas puedan nadar, filtrar y realizar la muda correctamente. Mientras que las microalgas, que también presentan movilidad, quedan atapadas en estos grumos y precipitan al fondo del matraz dejando de estar disponibles para el camarón. Las diferencias en las supervivencias y cambios de estadios entre los tratamientos Tch y Tch+Chae pone de manifiesto la

necesidad de implementar en los cultivos con *Tetraselmis chuii*, una segunda microalga que abastezca a las larvas de ácidos grasos esenciales como el ausentes en *Tetraselmis chuii*.

Además del cultivo Tch+Chae se puede concluir que es posible realizar un cultivo de 150 larvas en 1500mL sin realizar modificaciones en el volumen utilizando el esquema de alimentación diseñado por Treece and Yates en 1990 diseñado para un cultivo con de 100 larvas en 2L finales con aumentos de volumen obteniendo una alta supervivencia y un rápido desarrollo en el estadio de zoea.

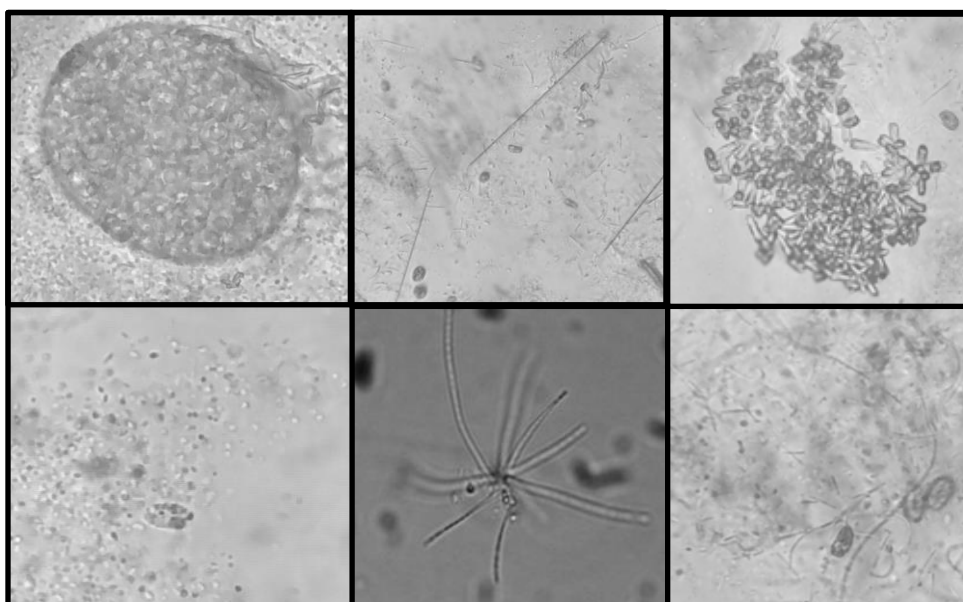


Figura 22: imágenes que muestran algunos de los microorganismos oportunistas que aparecieron en los cultivos de Tch+Gly.

CONCLUSIONES GENERALES

El tratamiento con glicerol 0.1M usado como medio de cultivo bajo la condición de crecimiento mixotrófico tuvo el mayor porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados totales incluidos el EPA y LA. Por lo tanto, la primera hipótesis planteada es rechazada en estas condiciones ya que ninguno de los tratamientos de este experimento logró aumentar de manera significativa las concentraciones de EPA y DHA. De igual manera la segunda hipótesis también es rechazada ya que los tratamientos adicionados con ácido salicílico fueron los que obtuvieron las menores concentraciones celulares así

como los menores porcentajes totales de ácidos grasos poliinsaturados tanto para los cultivos mixotrófico como autotróficos.

La modificación del medio de cultivo en régimen mixotrófico con glicerol a una concentración 0.2M y cosechado en la fase estacionaria logró mejorar la calidad lipídica de la microalga *T. chuii* frente a las condiciones utilizadas por la UAS para la alimentación de larvas de *L.vannamei* aumentando los porcentajes totales de ácidos grasos poliinsaturados totales, total de n-3 y EPA. A esta concentración también se reportaron los mayores porcentajes de lípidos totales alcanzando un $22.03\pm 0.81\%$ frente a los $14.27\pm 0.15\%$ del cultivo UAS. Los tamaños de la microalga también presentaron las mayores variaciones con la máxima concentración de glicerol reduciendo el tamaño de la microalga en $1.66\ \mu\text{m}$ de largo y $1.16\ \mu\text{m}$ de ancho lo que la haría más fácil de ingerir para los estadios larvales tempranos de peneidos. Sin embargo los contenidos de proteína y pigmentos del tratamiento 0.2M fueron muy similares los obtenidos para el cultivo en condiciones UAS. Por lo tanto, para este tratamiento, aunque se lograra aumentar la proporción relativa de EPA, debido al diseño (Pooled) y por deficiencias estadísticas no es posible aceptar o rechazar la primera hipótesis.

El tratamiento con glicerol 0.2M cosechado en fase estacionaria resulta ser inviable para la alimentación de larvas tempranas de *L. vannamei* debido a la alta contaminación producida por parte de la epifauna presente en el agua de las larvas que se adherían a los apéndices de las larvas impidiendo su locomoción y su capacidad de filtración. El glicerol residual presente en las microalgas con las que se alimentaba y los desechos nitrogenados producidos por las larvas generaron las condiciones óptimas para el desarrollo de la epifauna presente en el agua de los nauplios. Las larvas alimentadas con este tratamiento no lograron pasar de PZI y a los 4 días de experimento ya no se encontraron ejemplares en los matraces. Por lo tanto la tercera hipótesis es rechazada debido a la baja supervivencia obtenida debido a la contaminación de los cultivos y al retraso en el crecimiento que produce este tratamiento.

Bibliografía

- Abad, S., and Turon, X. (2012). Valorization of biodiesel derived glycerol as a carbon source to obtain added-value metabolites: Focus on polyunsaturated fatty acids. *Biotechnology advances*, 30(3), 733-741.
- Aboal Sanjurjo y otros (2012) Id-Tax: catálogo y claves de identificación de organismos fitoplanctónicos utilizados como elementos de calidad en las redes de control del estado ecológico. *Publicaciones de la Administración General del Estado*, Editor: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, ISBN: 978-84-491-1200-3
- Alfonso, E., S. Leal y B. Guitart, 1985 Ensayos sobre alimentación de protozoas de *Penaeus notialis* en el laboratorio. *Rev.Inv.Mar.Cuba*, 6(1):79–86
- Barclay WR, Meager KM, Abril, JR. (1994). Heterotrophic production of long chain omega – 3 fatty acids utilizing algae and algae-like microorganisms. *J Appl Phycology*. 6:123-129.
- Barnes, R. S. K., & Mann, K. H. (1999). *Fundamentals of aquatic ecology*. John Wiley & Sons.
- Benemann, J.R.1992 Microalgae Aquaculture Feeds, *J. App. Phycology* 4: 232 -245
- Biedenbach, J. M., Smith, L. L., and Lawrence, A. L. (1990). Use of a new spray-dried algal product in penaeid larviculture. *Aquaculture*, 86(2), 249-257.
- Borowitzka, M., (1999), Economic evaluation of microalgal processes and products, In: *Chemicals from Microalgae*, Taylor and Francis Ltd, pages 387 - 409.
- Brennan, L., and Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2), 557-577.
- Brito R., Chimal E., Gelabert R., Gaxiola G., Rosas C., 2004. Effects of artificial and natural diets on energy allocation in *Litopenaeus setiferus* (Linnaeus, 1767) and *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) early postlarvae. *Aquaculture* 237, 517-531.
- Brown, M.R., Jeffrey, S.W., Volkman, J.K., Dunstan, G.A., 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture* 151, 315–331.
- Butcher, R. W. (1959). An introductory account of the smaller algae of British coastal waters: I. Introduction and Chlorophyceae. *Fishery Investigations Series IV*.
- Cerón García, M. C., Sanchez Miron, A., Fernández Sevilla, J. M., Molina Grima, E., and Garcia Camacho, F.º crustaceans. *Proc. World Maricult. Soc.*, 4: 289- 294.
- Guedes, A. C., Amaro, H. M., Barbosa, C. R., Pereira, R. D., & Malcata, F. X. (2011). Fatty acid composition of several wild microalgae and cyanobacteria, with a focus on eicosapentaenoic, docosahexaenoic and α -linolenic acids for eventual dietary uses. *Food Research International*, 44(9), 2721-2729.
- Guillard, R. R. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In *Culture of marine invertebrate animals* (pp. 29-60). Springer US.
- Gutiérrez-Coronado, M. A., Trejo-López, C., and Larqué-Saavedra, A. (1998). Effects of salicylic acid on the growth of roots and shoots in soybean. *Plant Physiology and Biochemistry*, 36(8), 563-565.
- Harel, M., and Place, A. R. (2004). 31 Heterotrophic Production of Marine Algae for Aquaculture. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*, 513.

- Hernyez, J. P., de-Bashan, L. E., Rodriguez, D. J., Rodriguez, Y., and Bashan, Y. (2009). Growth promotion of the freshwater microalga *Chlorella vulgaris* by the nitrogen-fixing, plant growth-promoting bacterium *Bacillus pumilus* from arid zone soils. *European journal of soil biology*, 45(1), 88-93.
- Hori, T., Norris, R. E., and Chihara, M. (1983). Studies on the ultrastructure and taxonomy of the genus *Tetraselmis* (Prasinophyceae). *The botanical magazine= Shokubutsu-gaku-zasshi*, 96(4), 385-392.
- Hosikian, A., Lim, S., Halim, R., and M.K. Danquah. 2010. Chlorophyll extraction from Microalgae: a Review on the process engineering aspects. *International Journal of Chemical Engineering*. Article ID 391632, 11 pages.
- Hu, Q. (2004). 5 Environmental Effects on Cell Composition. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*, 83
- Huber M.E, Lewin R.A. 1986. *An electrophoretic survey of the genus Tetraselmis* (Chlorophyta, Prasinophyceae). *Phycologia* 25: 205-209
- Iijima, N., Tanaka, S., and Ota, Y. (1998). Purification and characterization of bile salt-activated lipase from the hepatopancreas of red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 18(1), 59-69
- Ingram, L.O., Van Baalen, C., Calder, J.A., 1973. Role of reduced exogenous organic compounds in the physiology of the blue-green bacteria (algae): photoheterotrophic growth of an "autotrophic" blue-green bacterium. *J. Bacteriol.* 114, 701e705.
- Irgolic, K. J., Woolson, E. A., Stockton, R. A., Newman, R. D., Bottino, N. R., Zingaro, R. A., ... and Cox, E. R. (1977). Characterization of arsenic compounds formed by *Daphnia magna* and *Tetraselmis chuii* from inorganic arsenate. *Environmental health perspectives*, 19, 61.
- Iwamoto Industrial Production of microalgal Cell-mass and Secondary Products –Major Industrial Species . *Chlorella*. In: Richmond, A. (ed.). *Handbook of microalgal culture: Biothechnology and applied Phycology*. Blackwell Publishing, Oxford, USA, p. 255-263
- Jeffrey, S. T., and Humphrey, G. F. (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanz*, 167(19), 1-194.
- Jones D.A. 1998. Crustacean larval microparticulated diets. *Reviews in Fihseries Science*, 6 (1 and 2): 41-54
- Jones, D. A., Kamarudin, M., & Vay, L. L. (1993). The potential for replacement of live feeds in larval culture. *Journal of the World Aquaculture Society*, 24(2), 199-210.
- Jones, D. A., Kanazawa, A., and Ono, K. (1979). Studies on the nutritional requirements of the larval stages of *Penaeus japonicus* using microencapsulated diets. *Marine Biology*, 54(3), 261-267.
- Jordán, M., and Casaretto, J. (2006). Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Etileno, Ácido Abscísico, Brasinoesteroides, Poliaminas, Ácido Salicílico y Ácido Jasmónico. *Fisiología Vegetal*. Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile.
- Kaplan, D., Richmond, A.E., Dubinsky, Z., Aaronson, S., 1986. Algalnutrition. In: *Richmond, A. (Ed.), Handbook for Microalgal Mass Culture*. CRC Press, Boca Raton, FL., USA, pp. 147e198.
- Khairy, H. M., and El-Sayed, H. S. (2011). Effect of enriched *Brachionus plicatilis* and *Artemia salina* nauplii by microalga *Tetraselmis chuii* (Bütcher) grown on four different culture media on the growth and survival of *Sparus aurata* larvae. *African Journal of Biotechnology*, 11(2), 399-415.

- Kitani, H. and JN Alvarado. 1981. The larval development of the Pacific brown shrimp *Penaeus californicus* reared in laboratory. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 48: 375-389
- Kitano, M., Matsukawa, R., and Karube, I. (1997). Changes in eicosapentaenoic acid content of *Navicula saprophila*, *Rhodomonas salina* and *Nitzschia* sp. under mixotrophic conditions. *Journal of applied phycology*, 9(6), 559-563.
- Kokou, F., Makridis, P., Kentouri, M., and Divanach, P. (2012). Antibacterial activity in microalgae cultures. *Aquaculture Research*, 43(10), 1520-1527.
- Kováčik, J., Klejdus, B., Hedbavny, J., and Bačkor, M. (2010). Effect of copper and salicylic acid on phenolic metabolites and free amino acids in *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyceae). *Plant Science*, 178(3), 307-311.
- Kuban, F. D., Lawrence, A. L., and Wilkenfeld, J. S. (1985). Survival, metamorphosis and growth of larvae from four penaeid species fed six food combinations. *Aquaculture*, 47(2), 151-162.
- Kurmaly, K., Jones, D. A., Yule, A. B., and East, J. (1989). Comparative analysis of the growth and survival of *Penaeus monodon* Fabricius larvae, from protozoa 1 to postlarva 1, on live feeds, artificial diets and on combinations of both. *Aquaculture*, 81(1), 27-45.
- Lavens P and P Sorgeloos. 1996. *Manual on the production and use of live food for aquaculture*. FAO, Rome, pp. 79-251
- Le Vay, L., Jones, D. A., Puello-Cruz, A. C., Sangha, R. S., and Ngamphongsai, C. (2001). Digestion in relation to feeding strategies exhibited by crustacean larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 128(3), 621-628.
- Leal, S., E. Alfonso y A. Gainza, 1985. Recomendaciones sobre la alimentación de larvas de camarones *Penaeus notialis* y *P. schmitti* en cultivo. *Rev. Inv. Mar. Cuba*, VI(1): 87-93
- Lee, Y.-K., 2004. Algal nutrition. Heterotrophic carbon nutrition. In: Richmond, A. (Ed.), *Handbook of Microalgal Culture. Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Publishing, Oxford, UK, p. 116
- Leite, M. B. N. L., De Araujo, M. M. S., Nascimento, I. A., Da Cruz, A. C. S., Pereira, S. A., and Do Nascimento, N. C. (2011). Toxicity of water-soluble fractions of fuels derived from castor oil, palm oil, and waste cooking oil. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(4), 893-897.
- Liang, Y. (2013). Producing liquid transportation fuels from heterotrophic microalgae. *Applied Energy*, 104, 860-868.
- Lobato Gonzales Perla (Proyecto SePesca/FAO GCP/RLA/075/ITA) 1988. Estudio Socioeconómico del cultivo de camarón realizado por sociedades cooperativas en México. *Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación y la Secretaría de Pesca*. 86 p
- Lovett, D. L., and Felder, D. L. (1990). Ontogenetic change in digestive enzyme activity of larval and postlarval white shrimp *Penaeus setiferus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *The Biological Bulletin*, 178(2), 144-159.
- Marín-Magán, V., and Cañavate, J. P. (1995). Fluorometric determination of selectivity between live and inert food by *Penaeus japonicus* larvae. *Aquaculture*, 134(3), 307-311.
- Martínez-Córdova L.R., Porchas-Cornejo M.A., Villarreal-Coleman H., Calderon-Perez J.A., Naranjo-Paramo J. 1998. Evaluation of three feeding strategies on the culture of white shrimp *Penaeus vannamei* (Boone 1931) in low water exchange ponds. *Aquacult. Eng.* 21-28.

- Mata TM, Martins AA, Ceatano NS (2010). Microalgae for biodiesel production and Rather applications: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 14: 217-232.
- Meseck, S. L., Smith, B. C., Wikfors, G. H., Alix, J. H., & Kapareiko, D. (2007). Nutrient interactions between phytoplankton and bacterioplankton under different carbon dioxide regimes. *Journal of Applied Phycology*, 19(3), 229-237.
- Montaño, M., and Navarro, J. C. (1996). Fatty acids of wild and cultured *Penaeus vannamei* larvae from Ecuador. *Aquaculture*, 142(3), 259-268.
- Mourente, G. A. Medina, S. González and A. Rodríguez. (1995), Variations in lipid content and nutritional status during larval development of marine shrimp *Penaeus keraturus*. *Aquaculture* 130 (2-3):187-199
- Muller-Feuga A. (2004) Microalgae for aquaculture: the current global situation and future trends. En: Handbook of microalgal culture Richmond A. (ed). Blackwell Science, pp 352–364.
- Muller-Feuga, A. 2000. The role of microalgae in aquaculture: situation and trends. *Jour. Appl. Ichthyol.* 12: 527-534
- Murtidjo, B. A. *Pembenihan Udang Windu Skala Kecil*. Kanisius
- Nonwachai T, Purivirojkul W, Limsuwan C, Chuchird N, Velascoc M , Arun K. Dhar 2010. Growth, nonspecific immune characteristics, and survival upon challenge with *Vibrio harveyi* in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) raised on diets containing algal meal. *Fish and Shellfish Immunology* 29, 298 -304
- Nunes, B., Carvalho, F., and Guilhermino, L. (2005). Acute toxicity of widely used pharmaceuticals in aquatic species: *Gambusia holbrooki*, *Artemia parthenogenetica* and *Tetraselmis chuii*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 61(3), 413-419.
- Núñez M, Lodeiros C, De Donato M, Graziani C. 2002. Evaluation of microalgae diets for *Litopenaeus vannamei* larvae using a simple protocol. *Aquacult. Int.* 10(3): 177–187
- Palacios, E., Bonilla, A., Luna, D. and Racotta, I.S. 2004. Survival, Na⁺/K⁺-ATPase and lipid responses to salinity challenge in fed and starved white pacific shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae. *Aquaculture*. 234: 497–511.
- Pedrazzoli, A., Molina, C., Montoya, N., Townsend, S., Leon-Hing, A., Paredes, Y., Calderon, J., 1998. Recent advances on nutrition research of *P. vannamei* in Ecuador Guayaqui. *Rev. Fish. Sci.* 61, 143–151
- Piña, P., Voltolina, D., Nieves M. and M. Robles. (2006). Survival, development and growth of the Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei* protozoa larvae, fed with mono algal and mixed diets. *Aquaculture* 253, 523-530.
- Piqueres, J. M. V., & Vega, J. M. (Eds.). (1998). Avances en el metabolismo del nitrógeno: de la fisiología a la biología molecular: *IV Reunión Nacional, Marbella, 1997* (No. 50). Universidad de Sevilla.
- Pratoomyot, J., Srivilas, P., & Noiraksar, T. (2005). Fatty acids composition of 10 microalgal species. *Songklanakarin J Sci Technol*, 27(6), 1179-1187.
- Prescott, L., Harley, J., & Kalin, D. (1999). *Microbiología*. Cuarta edición. Editorial McGraw-Hill
- Pulz, O Gross W 2004 Valuable products from biotechnology of microalgae *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 65 (2004), pp. 635–648

Radmer, R.J., and T.C. Fisher, Large Scale Production of Docosahexaenoic Acid (DHA), in Proceedings of Seventh International Conference, Opportunities from Micro- and Macroalgae, International Association of Applied Algology, Knysna, South Africa, 1996, p. 60.

Raskin, I. (1992). Salicylate, a new plant hormone. *Plant physiology*, 99(3), 799.

Ratledge, C., Kanagachyran, K., Yerson, A. J., Grantham, D. J., and Stephenson, J. C. (2001). Production of docosahexaenoic acid by *Cryptocodinium cohnii* grown in a pH-auxostat culture with acetic acid as principal carbon source. *Lipids*, 36(11), 1241-1246.

Rhoads, D. M., and McIntosh, L. (1992). Salicylic acid regulation of respiration in higher plants: alternative oxidase expression. *The Plant Cell Online*, 4(9), 1131-1139.

Rivera-Pérez, C., Navarrete del Toro, M., and García-Carreño, F. L. (2010). Digestive lipase activity through development and after fasting and re-feeding in the whiteleg shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 300(1), 163-168.

Roessler PG (1990) Environmental control of glycerol lipid metabolism in microalgae: commercial implications and future research directions. *J. Phycol.* 26: 393–399.

Sage, R. F. (1994). Acclimation of photosynthesis to increasing atmospheric CO₂: the gas exchange perspective. *Photosynthesis research*, 39(3), 351-368.

Scheer, A., and Parthier, B. (1982). Dark-induced chloroplast dedifferentiation in *Euglena gracilis*. *Planta*, 156(3), 274-281.

Sheehan, J., Dunahay, T., Benemann, J., Roessler, P., 1998. A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program – Biodiesel from Algae. *National Renewable Energy Laboratory*, NREL/TP-580-24190.

Simon, C. M. (1978). The culture of the diatom *Chaetoceros gracilis* and its use as a food for penaeid protozoal larvae. *Aquaculture*, 14(2), 105-113.

Singh, R. N., and Sharma, S. (2012). Development of suitable photobioreactor for algae production—A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(4), 2347-2353.

Skulberg, O. M. (2004). 30 *Bioactive Chemicals in Microalgae. Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, 485

Solovchenko, A. E., Khozin-Goldberg, I., Didi-Cohen, S., Cohen, Z., & Merzlyak, M. N. (2008). Effects of light intensity and nitrogen starvation on growth, total fatty acids and arachidonic acid in the green microalga *Parietochloris incisa*. *Journal of Applied Phycology*, 20(3), 245-251.

Spolaore, P., C. Joannis-Cassan, et al.,. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101(2): 87-96.

Suda, S., Watanabe, M. M., Inouye, I. 1989. *Evidence for sexual reproduction* in the primitive green alga *Nephroselmis olivacea* (Prasinophyceae). *Journal of Phycology* 25 596-600

Tobias-Quinitio, E., and Villegas, C. T. (1982). Growth, survival and macronutrient composition of *Penaeus monodon* Fabricius larvae fed with *Chaetoceros calcitrans* and *Tetraselmis chuii*. *Aquaculture*, 29(3), 253-260.

Tobias-Quinitio, E., and Villegas, C. T. (1982). Growth, survival and macronutrient composition of *Penaeus monodon* Fabricius larvae fed with *Chaetoceros calcitrans* and *Tetraselmis chuii*. *Aquaculture*, 29(3), 253-260.

- Tomaselli, L. 2004. The microalgal cell. In: *Richmond, A. (ed.). Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied Phycology*. Blackwell Publishing, Oxford, USA, p. 3-19
- Tredici, M 2004 Mass Production of Microalgae In: *Richmond, A. (ed.). Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied Phycology*. Blackwell Publishing, Oxford, USA, p. 178-210
- Ugwu, C. U., Aoyagi, H., and Uchiyama, H. (2008). Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource technology*, 99(10), 4021-4028.
- Ukeles, R., and Rose, W. E. (1976). Observations on organic carbon utilization by photosynthetic marine microalgae. *Marine Biology*, 37(1), 11-28.
- Vazhappilly, R. and F. Chen (1998). Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid production potential of microalgae and their heterotrophic growth. *Journal of the American Oil Chemists Society* 75(3): 393-397.
- Vieira, L. R., and Guilhermino, L. (2012). Multiple stress effects on marine planktonic organisms: Influence of temperature on the toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to *Tetraselmis chuii* *Journal of Sea Research*, 72, 94-98.
- Volkman, J. K., Smith, D. J., Eglinton, G., Forsberg, T. E. V., & Corner, E. D. S. (1981). Sterol and fatty acid composition of four marine Haptophyceae algae. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 61(02), 509-527.
- Wen, Z. Y. and F. Chen 2003. Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. *Biotechnology Advances* 21(4): 273-294.
- Wilkenfeld, J. S., Lawrence, A. L., and Kuban, F. D. (1984). Survival, metamorphosis and growth of penaeid shrimp larvae reared on a variety of algal and animal foods. *Journal of the World Mariculture Society*, 15(1-4), 31-49.
- Wood, B.J.B., Grimson, P.H.K., German, J.B., Turner, M., 1999. Photoheterotrophy in the production of phytoplankton organisms. *J. Biotechnol.* 70, 175e183
- Yrade, M. R., and Costa, J. A. (2007). Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. *Aquaculture*, 264(1), 130-134.

ANEXOS

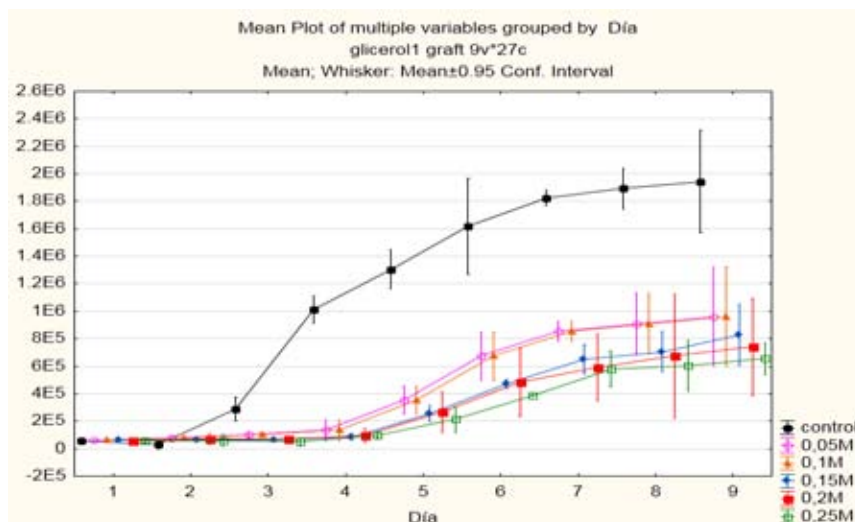
Bioensayo de *T.chuii* con Glicerol como fuente de carbono

Una vez seleccionado el glicerol como medio candidato la alimentación de las larvas se realizó un cultivo de nueve días, tiempo en el que la todos los tratamientos del cultivo de selección de medio habían finalizado la fase de crecimiento exponencial e iniciaban la fase estacionaria. Los cultivos se realizaron a diferentes concentraciones: Control (Autotrófico), 0.05M, 0.1M, 0.15M, 0.2M y 0.25M. Los cultivos autótrofos se realizaron bajo una iluminación de 6,000 Lux mientras que para los cultivos mixotróficos la iluminación fue de 950 Lux.

Cinética de crecimiento

Debido a la variación en la intensidad lumínica en el cepario respecto al cultivo de selección de medio, algunos de los matraces más externos estuvieron expuestos a radiaciones superiores a los 950 Lux fijados para el cultivo mixotrófico por lo que las cinéticas de crecimiento de las réplicas, que estaban distribuidos aleatoriamente, presentaban grandes diferencias entre ellos. Uno de los tratamientos que más se vio afectado por esta diferencia en la radiación fue el 0.2M cuyas concentraciones finales variaban de 0.60×10^6 a 0.88×10^6 Cel·mL⁻¹ entre las réplicas. Al evaluar las diferencias de crecimiento de las réplicas respecto las posiciones que ocupaban se observó que el crecimiento mixotrófico estaba siendo limitado por la luz. También se creyó oportuna la necesidad de un nuevo control 0M en la iluminación mixotrófica. Por estas razones se decidió repetir el cultivo con los cambios pertinentes y este no fue cosechado.

Gráfico anexo I: Curva de crecimiento del cultivo Glicerol I



La cinética de crecimiento para este cultivo presento una diferencia bastante significativa del tratamiento UAS, con un promedio de 9.34×10^6 Cel·mL⁻¹, frente a los que contenían el glicerol. Todos los tratamientos alcanzaron la máxima densidad al noveno día de cultivo. Dentro de los tratamientos de glicerol no se obtuvo ninguna diferencia significativa entre ellos, sin embargo las densidades promedio fueron inversamente proporcionales a las concentraciones de glicerol.

Correlación análisis multivariado

Tabla anexo I : tabla de correlación cuando la luz es el factor variable en el cultivo cosechado en la fase exponencial:

LUZ EXPONENCIAL										
	Proteína	CLOR.A	CLOR.B	Carot	Lípidos totales	AG 18.2n6	AG 18.3n3	AG 20.4n6	AG 20.5n3	AG 22.6n3
Proteína	1.000	0.993	0.996	0.994	0.991	-0.999	0.896	0.544	0.669	0.844
CLOR.A	0.993	1.000	0.999	0.999	0.977	-0.994	0.858	0.509	0.641	0.807
CLOR.B	0.996	0.999	1.000	0.999	0.981	-0.996	0.867	0.518	0.649	0.814
Carot	0.994	0.999	0.999	1.000	0.97	-0.993	0.854	0.499	0.638	0.806
Lípidos totales	0.991	0.977	0.981	0.974	1.000	-0.994	0.944	0.528	0.744	0.894
AG18.2n6	-0.999	-0.994	-0.996	-0.993	-0.994	1.000	-0.905	-0.528	-0.692	-0.852
AG 18.3n3	0.896	0.858	0.867	0.854	0.944	-0.905	1.000	0.396	0.892	0.977
AG 20.4n6	0.544	0.509	0.518	0.499	0.528	-0.528	0.395	1.000	-0.033	0.226
AG 20.5n3	0.668	0.640	0.648	0.638	0.744	-0.692	0.892	-0.033	1.000	0.926
AG 22.6n3	0.844	0.807	0.814	0.806	0.894	-0.851	0.977	0.226	0.926	1.000

Tabla anexo II : tabla de correlación cuando la concentración de glicerol es el factor variable en el cultivo cosechado en la fase exponencial:

GLICEROL EXPONENCIAL										
	Proteína	CLOR.A	CLOR.B	Carot	Lípidos totales	AG 18.2n6	AG 18.3n3	AG 20.4n6	AG 20.5n3	AG 22.6n3
Proteína	1.000	0.839	0.832	0.738	0.120	0.595	0.318	0.136	-0.131	0.017
CLOR.A	0.839	1.000	0.987	0.937	0.453	0.536	0.177	0.254	-0.324	0.259
CLOR.B	0.832	0.987	1.000	0.920	0.493	0.578	0.231	0.201	-0.261	0.272
Carot	0.738	0.937	0.920	1.000	0.492	0.323	-0.020	0.296	-0.438	0.315
Lípidos totales	0.120	0.453	0.494	0.492	1.000	0.127	0.052	0.460	-0.122	0.511
AG18.2n6	0.595	0.536	0.578	0.323	0.127	1.000	0.879	-0.018	0.408	-0.137
AG18.3n3	0.318	0.177	0.231	-0.020	0.052	0.879	1.000	-0.031	0.736	-0.314
AG20.4n6	0.136	0.254	0.201	0.296	0.460	-0.018	-0.031	1.000	-0.308	0.103
AG20.5n3	-0.130	-0.323	-0.261	-0.438	-0.122	0.408	0.736	-0.308	1.000	-0.220
AG22.6n3	0.017	0.259	0.272	0.315	0.511	-0.137	-0.314	0.104	-0.220	1.000

Tabla anexo III : tabla de correlación cuando la luz es el factor variable en el cultivo cosechado en la fase estacionaria:

LUZ ESTACIONARIO										
	Proteína	CLOR.A	CLOR.B	Carot	Lípidos.totales	AG 18.2n6	AG 18.3n3	AG 20.4n6	AG 20.5n3	AG 22.6n3
Proteína	1.000	0.919	0.905	0.865	0.915	-0.849	0.068	-0.450	0.759	-0.180
CLOR.A	0.919	1.000	0.998	0.991	0.996	-0.965	-0.103	-0.392	0.780	-0.036
CLOR.B	0.905	0.998	1.000	0.994	0.995	-0.965	-0.118	-0.349	0.770	-0.059
Carot	0.865	0.991	0.993	1.000	0.982	-0.955	-0.112	-0.356	0.778	0.011
Lípidos totales	0.915	0.996	0.995	0.982	1.000	-0.982	-0.168	-0.384	0.744	-0.055
AG 18.2n6	-0.849	-0.965	-0.965	-0.955	-0.981	1.000	0.346	0.340	-0.625	0.0503
AG 18.3n3	0.068	-0.103	-0.118	-0.112	-0.168	0.346	1.000	-0.341	0.494	0.257
AG 20.4n6	-0.450	-0.392	-0.349	-0.356	-0.384	0.340	-0.341	1.000	-0.640	-0.717
AG 20.5n3	0.759	0.779	0.770	0.779	0.744	-0.625	0.494	-0.640	1.000	0.310
AG 22.6n3	-0.180	-0.036	-0.059	0.011	-0.055	0.050	0.257	-0.717	0.310	1.000

Tabla anexo IV : tabla de correlación cuando la concentración de glicerol es el factor variable en el cultivo cosechado en la fase estacionaria:

GLICEROL ESTACIONARIO										
	Proteína	CLOR.A	CLOR.B	Carot	Lípidos totales	AG 18.2n6	AG 18.3n3	AG 20.4n6	AG 20.5n3	AG 22.6n3
Proteína	1.000	0.632	0.615	0.638	-0.728	-0.519	-0.392	-0.263	-0.532	0.456
CLOR.A	0.632	1.000	0.995	0.994	-0.629	-0.812	-0.615	0.073	-0.863	0.673
CLOR.B	0.615	0.995	1.000	0.990	-0.579	-0.824	-0.617	0.123	-0.878	0.601
Carot	0.638	0.994	0.990	1.000	-0.656	-0.828	-0.644	0.134	-0.862	0.679
Lípidos totales	-0.728	-0.629	-0.579	-0.656	1.000	0.637	0.674	0.203	0.577	-0.785
AG 18.2n6	-0.519	-0.812	-0.824	-0.828	0.637	1.000	0.936	-0.267	0.977	-0.562
AG 18.3n3	-0.392	-0.615	-0.617	-0.644	0.674	0.936	1.000	-0.209	0.877	-0.559
AG 20.4n6	-0.263	0.073	0.123	0.134	0.203	-0.267	-0.209	1.000	-0.151	-0.187
AG 20.5n3	-0.532	-0.864	-0.878	-0.863	0.577	0.977	0.877	-0.151	1.000	-0.552
AG 22.6n3	0.456	0.673	0.601	0.680	-0.785	-0.562	-0.556	-0.187	-0.553	1.000