

UNIVERSIDAD ESTATAL PENÍNSULA DE SANTA ELENA  
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR  
CARRERA DE BIOLOGÍA MARINA



TRABAJO DE TITULACIÓN

Previo a la obtención del título de:

BIÓLOGO MARINO

TEMA

APLICACIÓN DE UNA DIETA RICA EN CAROTENOIDES PRODUCIDA POR  
*Dunaliella spp.*, SOMETIDA AL ESTRÉS PARA LA ALIMENTACIÓN DE  
*Litopenaeus vannamei*.

AUTOR:

JORGE PAÚL GONZÁLEZ GAVILANES

TUTOR:

Blga. JANETH ISABEL GALARZA TIPÁN, MSc.; PhD.

La Libertad- Ecuador

2023

UNIVERSIDAD ESTATAL PENÍNSULA DE  
SANTA ELENA

FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR  
CARRERA DE BIOLOGÍA MARINA

APLICACIÓN DE UNA DIETA RICA EN CAROTENOIDES  
PRODUCIDA POR *Dunaliella spp.*, SOMETIDA AL ESTRÉS PARA LA  
ALIMENTACIÓN DE *Litopenaeus vannamei*.

TRABAJO DE TITULACIÓN  
Previo a la obtención del título de  
BIÓLOGO MARINO

AUTOR:  
JORGE PAÚL GONZÁLEZ GAVILANES

TUTOR:  
Blga. JANETH ISABEL GALARZA TIPÁN, MSc.; PhD.

La Libertad- Ecuador

2023

## **DEDICATORIA**

La presente tesis está dedicada a Dios, ya que gracias a él he logrado concluir mi carrera, también con todo mi corazón dedico este trabajo a mis padres, que sin su apoyo no lo habría logrado y hacer de mí una gran persona, a mis hermanos y sobrinos por sus palabras y su compañía, a mis abuelitas que no están físicamente con nosotros, sé que desde el cielo me cuidan y me guían en el diario vivir, también a mi tutora de tesis que con su paciencia y conocimientos me brindo las habilidades, a mis amigos Steven, Nicolle, Milena, Gary y Rogger que contribuyeron de alguna manera a cumplir mis objetivos.

## **AGRADECIMIENTO**

En primer lugar, doy gracias a Dios por permitirme tener tan buena experiencia dentro de la universidad, gracias a mi universidad por permitirme convertirme en un profesional en lo que tanto me apasiona, gracias a cada maestro que hizo parte de este proceso integral de mi crecimiento intelectual en la materia y como recuerdo y prueba viviente en la historia; esta tesis, que perdurará dentro de los conocimientos y desarrollo de las demás generaciones que están por llegar.

## TRIBUNAL DE GRADUACIÓN



Blgo. Duque Marín Richard, Mgt.

**DECANO**  
**Facultad de Ciencias del Mar**



Ing. Villón Moreno Jimmy, M.Sc.

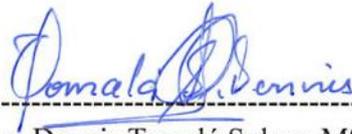
**DIRECTOR**  
**Carrera de Biología**



ISABEL JANETH  
GALARZA TIPAN

Blga. Janeth Isabel Galarza Tipan, MSc. Ph.D

**DOCENTE TUTOR**



Blga. Dennis Tomalá Solano MSc.

**DOCENTE DE ÁREA**



Ab. María Rivera González, Mgtr

**SECRETARIO GENERAL**

## DECLARACIÓN EXPRESA

La responsabilidad por los datos, ideas y resultados expuestos en esta tesis de grado, me corresponden exclusivamente, y el patrimonio intelectual de la misma compartida con la Universidad Estatal Península de Santa Elena.



---

Jorge Paul González Gavilanes

C.I. 1600709248

# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	6
3. JUSTIFICACIÓN .....	8
4. OBJETIVOS.....	10
4.1 Objetivo General .....	10
4.2 Objetivos Específicos.....	10
5. HIPÓTESIS .....	11
6. MARCO TEÓRICO.....	12
6.1 Importancia de las microalgas - generalidades .....	12
6.2 Tipos de carotenoides .....	13
6.3 Microorganismos que producen carotenoides .....	13
6.4 Generalidades del género <i>Dunaliella</i> .....	15
6.5 Taxonomía de <i>Dunaliella</i> .....	15
6.6 Morfología en condiciones normales o "Fase verde" .....	16
6.7 Ambiente .....	17
6.8 Morfología bajo estrés o "Fase roja" .....	18
6.9 Condiciones de estrés en <i>Dunaliella spp.</i> para la producción de $\beta$ -caroteno .....	19
6.10 Parámetros de estrés .....	19
6.9.1 Intensidad lumínica .....	19
6.9.2 Salinidad.....	21
6.9.3 Temperatura .....	21
6.9.4 Inhibición de nitrógeno .....	22
6.10 Los carotenoides en la acuicultura .....	22
6.11 Importancia de los carotenoides en el camarón .....	25
7. METODOLOGÍA .....	27
7.1 Origen de la cepa <i>Dunaliella spp.</i> .....	27
7.2 Medios de cultivo y pruebas de crecimiento vegetativo .....	27
7.2.1 Preparación de medio de cultivos.....	27
7.3 Inoculación de la cepa <i>Dunaliella spp</i> en medio sólido y líquido.....	30
7.4 Crecimiento vegetativo de <i>Dunaliella spp.</i> .....	31
7.4.1 Evaluación de medios de cultivo.....	31
7.5 Inducción a la carotenogénesis de <i>Dunaliella spp.</i> .....	32

7.6	Análisis químico proximal de polvo de <i>Dunaliella spp</i> , y alimento comercial (Nicovita Origin Precriá) .....	37
7.6.1	Determinación de proteína bruta .....	37
7.6.2	Determinación de ceniza .....	37
7.6.3	Determinación de fibra.....	38
7.7	Elaboración del alimento a base carotenos producidos por <i>Dunaliella spp</i> , y Nicovita Origin Precriá .....	38
7.8	Diseño experimental para análisis de supervivencia de <i>Litopenaus vannamei</i> . ....	40
7.8	Elaboración de raciones .....	43
7.9	Análisis estadístico.....	45
8.	RESULTADOS.....	47
8.1	Comparación del crecimiento de <i>Dunaliella spp</i> a diferentes medios de cultivos .....	47
8.2	Productividad de biomasa.....	48
8.3	Concentración celular de <i>Dunaliella spp</i> . durante la etapa de carotenogénesis ...	50
8.4	Análisis de pigmentos .....	53
8.4.1	Análisis de carotenos .....	56
8.5.	Determinación de la dosis de <i>Dunaliella spp</i> . en la dieta .....	57
8.5.1	Análisis proximal del alimento.....	57
8.5.2	Biometría.....	59
8.5.2.	Talla .....	59
9.2.2	Peso.....	62
9.3	Raciones alimenticias para <i>Litopenaeus vannamei</i> .....	63
10.	Análisis físico químicos del medio de cultivo de <i>Litopenaus vannamei</i> .....	68
10.1	Parámetros Físicos.....	68
10.2	Parámetros Químicos .....	71
11.	DISCUSIONES.....	72
12.	CONCLUSIONES.....	78
13.	BIBLIOGRAFÍA:.....	80
14.	ANEXOS:.....	90

## INDICE DE FIGURAS

<b>Ilustración 1:</b> Comparación de <i>D. salina</i> Polle, J, et al., 2020 .....	16
<b>Ilustración 2:</b> Cambios morfológicos a nivel celular de <i>Dunaliella sp.</i> bajo condiciones de estrés (Del Campo J., 2000) .....	18
<b>Ilustración 3</b> 5 Días de someter bajo estrés a <i>Dunaliella spp.</i> .....	90
<b>Ilustración 4:</b> Inicio de la inducción a estrés <i>Dunaliella spp.</i> .....	90
<b>Ilustración 5:</b> Día 15 de estrés <i>Dunaliella spp.</i> .....	90
<b>Ilustración 6:</b> Día 10 de estrés <i>Dunaliella spp.</i> .....	90
<b>Ilustración 7:</b> Medición de parámetros físico-químicos durante el cultivo.....	91
<b>Ilustración 8:</b> Pesaje de muestras <i>L. vannamei</i> .....	91
<b>Ilustración 9:</b> Alimento con 10% de <i>Dunaliella spp.</i> - Inicio del experimento .....	91
<b>Ilustración 10:</b> Control- Inicio del experimento .....	91
<b>Ilustración 11:</b> Alimento con 20% <i>Dunaliella spp</i> de. - Inicio de experimentación .....	91
<b>Ilustración 12:</b> Control-Final de la experimentación.....	91
<b>Ilustración 13:</b> Alimento con 10% de <i>Dunaliella spp</i> - Final de experimentación .....	91
<b>Ilustración 14:</b> Alimento con 20% de <i>Dunaliella spp.</i> - Final de experimentación. ....	91
<b>Gráfico 1:</b> Comparación del crecimiento de <i>Dunaliella sp.</i> , en dos medios de cultivo, Guillard F/2 y Nitrofoska .....	48
<b>Gráfico 2:</b> Concentración celular durante la carotenogénesis de <i>Dunaliella spp</i> .....	53
<b>Gráfico 3:</b> Pigmentos totales producidos por <i>Dunaliella spp.</i> durante la prueba de estrés.....	56
<b>Gráfico 4:</b> Análisis de carotenoides totales en <i>Dunaliella spp</i> durante 20 días.....	57
<b>Gráfico 5:</b> Intervalos de talla <i>L. vannamei</i> .....	61
<b>Gráfico 6:</b> Intervalos de peso de <i>L. vannamei</i> .....	63
<b>Gráfico 7:</b> Parámetro oxígeno en la experimentación.....	68
<b>Gráfico 8:</b> Parámetro salinidad en la experimentación .....	69
<b>Gráfico 9:</b> Parámetro temperatura en la experimentación.....	70
<b>Gráfico 10:</b> Parámetro amonio registrado durante la experimentación con <i>L. vannamei</i> .....	71

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Beneficios de la harina de microalga en dieta de cultivo de camarones .....	23
<b>Tabla 2:</b> Soluciones del medio Guillard F/2 .....	28
<b>Tabla 3:</b> Composición química del medio Nitrofoska.....	30
<b>Tabla 4:</b> Composición química del aglutinante de AQUACC natural bind+.....	39
<b>Tabla 5:</b> Composición garantizada completa (Nicovita Company,2019) .....	40

## GLOSARIO

**Microalga:** Organismo microscópico marino/dulceacuícola, fotoautótrofo, unicelular o colonial.

**Agar:** Polisacárido que se obtiene a partir de macroalgas.

**Cepa:** Grupo de organismos de la misma especie. Pueden provenir de una misma zona o bien ser el resultado de un programa de reproducción específico.

**Medio Cultivo:** Preparación artificial que contiene nutrientes químicos que permite el crecimiento de células, microorganismos, tejidos y vegetales, en determinado periodo de tiempo.

**Cosecha:** Procedimiento utilizado para la extracción de las células producidas en los diferentes niveles de cultivo. En acuicultura es el momento en el que los organismos cultivados son recogidos para su utilización o para labores de mantenimiento.

**Análisis proximal:** Determinación físico-química de muestras, obteniéndose: humedad, grasa, fibra, cenizas, carbohidratos solubles y proteína en los alimentos.

**Humedad:** Cantidad de agua existente en una muestra con respecto a la máxima posible.

**Estrés:** cambio drástico de situación agobiante lo que activa nuevas rutas de defensa

**Carotenos:** Pigmentos naturales anaranjados o rojos, propios de algunas células vegetales

**Biometría:** Compilación de medidas de peso y talla de algún organismo animal o vegetal.

## **ABREVIATURA**

**A1:** Control

**A2:** alimento 1 (10% *Dunaliella spp.*)

**A3:** alimento 2 (20% *Dunaliella spp.*)

**R1:** réplica 1

**R2:** réplica 2

**R3:** réplica 3

**RE=** Reservorio

**R=** Replica

**DC Inóculo=**  $N \times 10^4 \times FD$

**DC=** densidad celular (cel/ml)

**N=** promedio del conteo celular de los cuadrantes (A, B, C, D),

**10<sup>4</sup>=** factor de conversión de 0.1 µl - 1ml

**FD**= factor de dilución (cuando se considera necesario diluir la muestra).

**$\mu$** : Velocidad de crecimiento

**$\ln X_1$** : Logaritmo natural de células finales

**$\ln X_0$** : Logaritmo natural de células iniciales

**P**: Productividad

**$X_2$** : Producción de biomasa en 1 L de medio de cultivo ( $\text{g L}^{-1}$ )

**Vol**: volumen del cultivo en litros

**$\mu_2$** : Tasa máxima de crecimiento específico

$$Ca = 11.24 * A_{661.6} - 2.04 * A_{644.8}$$

**Ca**= Clorofila *a*

**Cb**= Clorofila *b*

**C(x+c)** = Carotenoides totales

**A661,6**= Valor resultado del análisis en espectrofotómetro a 661,6 nm

**A644,8**= Valor resultado del análisis en espectrofotómetro a 644,8 nm

**TCE**= Tasa de crecimiento específico

**Pf**= Peso final

**Pi**= peso inicial

**t**= tiempo

**FCA** =Factor de conversión alimenticia

**Pf**= peso final

**Pi**= peso inicial

**RD**: Ración diaria

**Biomasa**= pesos en gramos de la biomasa total

**CE**= Tasa de crecimiento específica

**FCA**= factor de conversión alimenticia

**RS**= ración semanal

**RD**= ración diaria

## RESUMEN

La microalga *Dunaliella* es una de las principales fuentes naturales de  $\beta$ -caroteno, y ha sido considerablemente estudiada por tener un amplio campo de aplicaciones en la bioindustria. En Ecuador se reportan pocos estudios del empleo de la biomasa microalgal como dieta en camarones, y ningún estudio sobre la aplicación de *Dunaliella* rica en carotenos. Por lo que, en este trabajo se cultivó *Dunaliella ssp* en medio Guillard F/2. Posteriormente se estimuló a la producción de carotenos bajo condiciones de estrés, empleando una intensidad lumínica de  $400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , inhibición de nitrógeno en el medio, una temperatura de  $24^{\circ}\text{C}$  y una salinidad normal de 35 ppt, durante 20 días. A continuación, se realizó los análisis de concentración en mg/ml de carotenoides totales resultantes del periodo de estrés. Este proceso se repitió hasta conseguir obtener una cantidad considerable de biomasa húmeda para la elaboración del alimento; esta biomasa fue colectada mediante centrifugación y secada a una temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas.

Con la finalidad de aplicar la biomasa de *Dunaliella spp.* en un cultivo experimental de *L.vannamei*, se realizó la adhesión del 10% y 20% de la biomasa microalgal a un balanceado comercial empleando un aglutinante comercial, como dieta control el balanceado comercial sin ningún tipo de alteración. Los ejemplares de *L.vannamei* contaron con un peso inicial de  $3.5 \pm 0.5$  gramos, cada unidad experimental con una capacidad de 40 litros con agua de mar filtrada, se colocaron 10 organismos a una concentración de 28 ppt de salinidad, fueron alimentados con las dietas por 45 días al 6% de la biomasa en 4 raciones diarias. Se tomaron valores de peso y talla cada semana de todos los organismos con la ayuda de una balanza analítica y una cinta métrica.

Se encontró una mejor concentración celular  $189 \times 10^5$  cel/ml y productividad celular de 0.07 en la cepa cultivada en medio Guillard F/2. En la fase de estrés para *Dunaliella spp.*, se logró 5.7 mg/ml de carotenos, durante 20 días

Una vez terminada la experimentación se encontró que la dieta con el 20% de biomasa rica en carotenos de *Dunaliella spp.*, ayudó al incremento tanto en peso como en talla de los juveniles de *L. vannamei* resultando un promedio de peso de 7.64 g y talla 10.4 cm. Es decir, la ganancia de peso en los juveniles de *L. vannamei* fue más significativa que el aumento en su talla.

**Palabras clave:** *Dunaliella spp*, carotenoides, estrés, *L. vannamei*, alimento, biomasa.

## ABSTRAC

The microalgae *Dunaliella* is one of the main natural sources of  $\beta$ -carotene, and has been studied considerably because it has a wide range of applications in the bioindustry. In Ecuador, few studies have been reported on the use of microalgal biomass as a diet for shrimp, and no studies on the application of carotene-rich *Dunaliella*. Therefore, in this work *Dunaliella spp* was cultured in Guillard F/2 medium. Subsequently, carotene production was stimulated under stress conditions, using a light intensity of  $400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , nitrogen inhibition in the medium, a temperature of  $24^{\circ}\text{C}$  and a normal salinity of 35 ppt, for 20 days. Then, the concentration analysis in mg/ml of total carotenoids resulting from the stress period was performed. This process was repeated until a considerable amount of wet biomass was obtained for the preparation of the feed; this biomass was collected by centrifugation and dried at a temperature of  $37^{\circ}\text{C}$  for 24 hours.

In order to apply the biomass of *Dunaliella spp*. in an experimental culture of *L. vannamei*, 10% and 20% of the microalgal biomass was added to a commercial feed using a commercial binder, and the commercial feed was used as control diet without any type of alteration. The *L. vannamei* specimens had an initial weight of  $3.5 \pm 0.5$  grams, each experimental unit had a capacity of 40 liters with filtered seawater, 10 organisms were placed at a concentration of 28 ppt of salinity, they were fed with the diets for 45 days at 6% of the biomass in 4 daily rations. Weight and length values were taken every week for all organisms with the help of an analytical balance and a tape measure.

A better cell concentration of  $189 \times 10^5$  cel/ml cells/ml and cell productivity of 0.07 was found in the strain cultivated in Guillard F/2 medium. In the stress phase for *Dunaliella spp*. 5.7 mg/ml of carotenes was achieved during 20 days.

Once the experimentation was finished, it was found that the diet with 20% of biomass rich in *Dunaliella spp*. carotenes helped to increase both weight and size of *L. vannamei* juveniles, resulting in an average weight of 7.64 g and size of 10.4 cm. In other words, the weight gain in *L. vannamei* juveniles was more significant than the increase in length.

**Key words:** *Dunaliella spp*, carotenoids, stress, *L. vannamei*, food, biomass.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las microalgas son organismos unicelulares en su mayoría fotosintéticos capaces de acumular altas concentraciones de metabolitos secundarios como respuesta a los cambios de condiciones ambientales (Pourkarimi, S., et al, 2020). Por tal motivo, se han convertido en una fuente de nutrición para la industria de la acuicultura mediante su experimentación y crecimiento de biomasa, en algunos cultivos como el de especies de larvas de peces, crustáceos y moluscos. Así mismo se han adicionado en productos alimenticios, farmacéuticos y cosméticos, y su uso depende en gran parte, del avance en los estudios a nivel fisiológico, bioquímico y molecular del cultivo de estos microorganismos (Raja et al., 2016).

Estos microorganismos pueden tener una organización colonial o filamentosa y unicelular; crecen de manera autotrófica o heterotrófica, son responsables de la producción primaria de la mayoría de los sistemas acuáticos y se distribuyen prácticamente en todo el planeta, cubriendo lugares diversos, incluso limitada por factores ambientales. Los lugares donde se distribuyen van desde los mares con abundante material orgánico hasta ambientes que tienen condiciones extremas; casi imposibles para los seres vivos más evolucionados, como cuerpos de agua hipersalinos (Oren, 2018).

Las microalgas del género *Dunaliella* son las más experimentadas a nivel de su producción de biomasa (Oren, 2015) y son usualmente utilizadas como fuente de alimento en la acuicultura (Spectorova et al., 2015). Hasta el momento, *Dunaliella spp.* se cultiva por dos propósitos comerciales: i) producción de glicerol y ii) producción de carotenoides, especialmente el  $\beta$ -caroteno (Borowitzka y Borowitzka, 1998; Raja et al., 2018).

Las adaptaciones de estas microalgas son muy importantes, ya que la mayoría de las explotaciones comerciales de *Dunaliella spp.* son realizadas en exteriores para aprovechar la luz natural y terrenos no aptos para la agricultura (Borowitzka y Borowitzka, 1998; Raja et al., 2018). Los mismos que en condiciones de cultivo se han introducido factores de estrés para inducir a la producción de  $\beta$ -carotenos como son los de: i) medio F/2 Guillard (0,88 mmol.  $L^{-1}$  de nitrógeno) a  $27 \pm 2^{\circ}C$ , pH de 7,8; ii) fotoperiodos de 12 h luz: 12 h oscuridad, aireaciones continuas (150 ml.  $L^{-1}$ ) y iii) en diferentes salinidades (40 y 250 UPS) e irradiancias (195 y 295 molphotons  $m^{-2}s^{-1}$ ,  $M^{-2}$ ,  $s^{-1}$ ), (Wongsansilp, T., 2019) obteniendo resultados promedios altos y estables con respecto a la productividad de lípidos (29.2 %), biomasa (0.020 g  $L^{-1}$ ), ácidos grasos insaturados (23.25%) y ácidos grasos saturados (76.75%), (Orset y Young, 2000).

La administración de dietas alimenticias basadas en microalgas para peneidos ha tenido una gran acogida en la acuicultura ya que, al poseer un sistema inmunológico innato sin capacidad de memoria, se opta por la inmunoestimulación como

estrategia profiláctica para prevenir infecciones, esto se proyecta como una alternativa de prevención a los agentes virales, ya que existen evidencias que señalan un efecto protector de los  $\beta$ -glucanos y peptidoglucanos. (Rendón y Balcazar, 2016). En la actualidad se han caracterizado aproximadamente 600 compuestos que están siendo estudiados por generar estos efectos, algunos con resultados muy alentadores para la industria acuícola como: lipopolisacáridos, glicoproteínas, productos de  $\beta$ -1,3/1,6 glucano, vitaminas (C, E, A, D), carotenos, minerales y pro bióticos (Orset, 2000)

Trabajos realizados previamente mostraron la eficiencia de *Dunaliella spp.* al ser utilizada como aditivo en el alimento de *L.vannamei* durante una infección con WSSV (Medina-Félix et al.,2014). Mientras que Madhumathi y Rengasamy (2016), reportan la habilidad de *Penaeus monodon* de convertir el  $\beta$ -caroteno en astaxantina, reflejado en una mejora de la actividad inmunológica y resistencia a enfermedades. Estos investigadores evaluaron la adición dosis/frecuencia de *Dunaliella spp.* cultivada en un medio limitado en nitrógeno para la acumulación masiva de  $\beta$ -carotenos, con la finalidad de aumentar la respuesta fisiológica e inmune de *L. vannamei* frente a una infección con *V. parahaemolyticus*.

Conociendo la importancia de aplicar carotenoides en las dietas de camarones, en el presente trabajo se aplicará una dieta rica en carotenoides producida por *Dunaliella spp.*, sometida a estrés aislada desde la Península de Santa Elena para la alimentación de camarón juveniles (*Litopenaus vannamei*).

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

En Ecuador las dietas para camarones se han basado en su mayoría en estudios comparables a los de las especies terrestres, el implemento de alimento artificial en condiciones controladas ha demostrado, que en su mayoría tienen repercusiones negativas en los organismos, conllevando a alteraciones en la actividad alimentaria, presentar infecciones concomitantes, causadas por bacterias oportunistas, o a su vez transmisiones de virus y hongos.

Las innumerables dietas artificiales que existen, traen problemas en la salud del camarón, el síndrome de caparazón blando está asociado a las deficiencias nutricionales o problemas de calidad del alimento. Prácticas de alimentación inadecuadas tales como el mal almacenamiento de los sacos y el uso de alimentos rancios o de baja calidad. Otro problema que se presenta por desequilibrio alimenticio es el síndrome del camarón encalambrado, con deficiencias en iones Ca y Mg que obliga al animal a nadar de forma jorobada.

La enfermedad azul o el síndrome de deficiencia de pigmentos, presenta una coloración pálida, está asociada con bajas concentraciones de carotenoides en la dieta, por otro el fortalecimiento del sistema inmune disminuye, al no incluir carotenos en la alimentación del camarón, problema que se ha hecho evidente a lo largo de los años en Ecuador al no mejorar la resistencia a las infecciones experimentales con el virus de la mancha blanca. Las consecuencias más

representativas para la industria es tener problemas en la reproducción y baja calidad de larvas juveniles esto se da por coloraciones blanquecinas de los ovarios en hembras maduras.

Todas estas deficiencias han conllevado a análisis de riesgos económicos, el aumento de la gravedad en las enfermedades extrañaba mayores pérdidas productivas y económicas y, por consiguiente, escenarios más arriesgados. En cuanto a los daños por enfermedades, un aumento del 1% en la mortalidad por enfermedades da lugar a una pérdida de 25,5 dólares ha-1 y un incremento del 1,4% en la probabilidad de pérdida (Pam, 2021).

### 3. JUSTIFICACIÓN

La especie *Dunaliella spp.* es de las principales fuentes naturales de  $\beta$ -caroteno, ya que acumula y produce una gran cantidad de este compuesto, que sobrepasa a las fuentes vegetales. Además de que no tiene ninguna relación con áreas de agricultura, posee un cultivo con un corto periodo de crecimiento; reduciendo los gastos y tiempo en cada siembra que se haga.

Los crustáceos poseen carotenoides en alguna mezcla en el caparazón, así en los ojos, sangre, huevos, hepatopáncreas y ovarios que son captados y aprovechados en base a su alimentación. Los carotenoides tienen beneficios que desencadenan diversos procesos fisiológicos y muy diferentes patrones de comportamiento intraespecífica de comunicación, camuflaje y protección; en la parte de producción esto tendrá un aumento en el mercado por el aspecto del organismo llevándolo a estándares más altos en calidad.

Existe un sin número de beneficios de la aplicación de *Dunaliella spp.*, dentro de estos podemos contar con la ayuda como precursores de la vitamina A, antioxidante, mejorar la tasa de reproducción, a que sean más resistentes a enfermedades y aumentan la ganancia de peso. La información científica demuestra que camarones *Litopenaeus vannamei* en etapa juvenil alimentados con carotenoides producidos por *Dunaliella spp.* fueron resistentes a una infección por la mancha blanca. Así también, dietas ricas en *Dunaliella* han demostrado mayor supervivencia y mejora

en los componentes de la respuesta inmune. La determinación de las condiciones de cultivo estresantes de *Dunaliella spp*, y la aplicación de dietas ricas en carotenos será un avance imprescindible para la acuicultura

En Ecuador, por sus múltiples beneficios mostrados anteriormente. El desarrollo de esta propuesta contribuirá a reducir la importación de fuentes alternativas en alimentos para las dietas de camarones, a cambio se podrán hacer cultivos intensivos de esta microalga dentro de nuestro territorio, aprovechando las condiciones propicias que tiene el clima en la zona costera.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo General

Aplicar una dieta rica en carotenoides producida por *Dunaliella spp.*, sometida a estrés aislada desde la Península de Santa Elena para la alimentación de *Litopenaeus vannamei* en etapa juvenil.

### 4.2 Objetivos Específicos

- Determinar la tasa de crecimiento y productividad del cultivo *Dunaliella spp.*, aislada de la Península de Santa Elena
- Establecer las condiciones de estrés para estimular a los cultivos de *Dunaliella spp.*, a producir los carotenoides.
- Evaluar el crecimiento y supervivencia de *Litopenaeus vannamei* en etapa juvenil alimentados con carotenoides producidos por *Dunaliella spp.*

## 5. HIPÓTESIS

**HN:** Las dietas ricas en carotenoides producidas por *Dunaliella spp.* no ayudará en la

mejora del crecimiento y la supervivencia del camarón *Litopenaeus vannamei*.

**HA:** Las dietas ricas en carotenoides producidas por *Dunaliella spp.* ayudará en la mejora del crecimiento y la supervivencia del camarón *Litopenaeus vannamei*.

## 6. MARCO TEÓRICO

### 6.1 Importancia de las microalgas - generalidades

Las microalgas son organismos fotosintéticos que crecen en una variedad de hábitats acuáticos, incluidos lagos, libras, ríos, océanos e incluso aguas residuales. Pueden tolerar una amplia gama de temperaturas, salinidades y valores de pH; distintas intensidades de luz; y condiciones en reservorios o desiertos. Las microalgas tienen mayor capacidad de generar biomasa, debido a que tienen una mayor eficiencia fotosintética (Khan et al. 2018).

En la actualidad el uso de microalgas se ha generalizado lográndose su empleo en campos importantes como la salud humana, purificación de aguas residuales, prevención de la contaminación acuática, industria farmacéutica, acuicultura, producción de pigmentos, cosmética, producción de sustancias como vitaminas, ácidos grasos, o pigmentos; para la industria agraria con la producción de fertilizantes; para acuicultura y producción de antibióticos, entre otros (González, A., 2015).

Se han investigado varias especies de microalgas por su potencial como productos de valor añadido con notables cualidades farmacológicas y biológicas, una de ellas es *Dunaliella spp.* (Khan et al. 2018).

## 6.2 Tipos de carotenoides

“Los carotenoides son compuestos liposolubles, conformados por cadenas insaturadas de cerca de 40 carbonos, se caracterizan por poseer anillos en los extremos de cada carbono. Son clasificados como tetraterpenoides, es decir contienen dobles enlaces conjugados” (Sy et al., 2015).

Considerando los elementos químicos presentes en sus moléculas, los carotenoides pueden dividirse en dos grandes grupos: carotenos, que son hidrocarburos, y xantófilas, que contienen átomos de oxígeno. Éste puede estar presente en forma de grupo hidroxilo (zeinoxantina, lactucaxantina, etc.), metoxilo (esferoidenona, espiriloxantina, etc.), epóxido (anteraxantina, licopeno-1,2-epóxido, etc.), carbonilo (capsantina, esferoidenona, etc.) o carboxilo (norbixina, neurosporaxantina, etc.), principalmente. Otros grupos oxigenados presentes en carotenoides son acetatos (fucoxantina, dinoxantina, etc.), lactonas (peridinina, uriólido, etc.) y sulfatos (caloxantina-3-sulfato, nostoxantina- 3-sulfato, etc.), (Britton, 1998 y Zepeda, E., 2017).

## 6.3 Microorganismos que producen carotenoides

Los principales carotenoides de origen marino con actividad antioxidante reconocida en modelos *in vitro* e *in vivo* son:  $\beta$ -caroteno, fucoxantina, astaxantina y la cantaxantina, producidos por la célula microalgal cuando se encuentra en una condición de estrés. (Ezquerro, B., et al., 2021).

En las bacterias los carotenoides se localizan especialmente en la membrana plasmática y compensan el daño foto-oxidativo (Krinsky, 1979). En *B. atrophaeus* los carotenoides proporcionan a la membrana resistencia al daño por luz UV-A (Moeller et al., 2018). En algunas cepas de *Azospirillum* tienen un importante rol en la protección del daño oxidativo contra la nitrogenasa (Nur et al., 2020). Además, son importantes en los procesos de fijación biológica del oxígeno en condiciones donde no existe (Hartmann and Hurek, 1988; Baldani et al., 2019). Se ha demostrado que también actúan como un factor de virulencia en patógenos como el *Staphylococcus aureus* (Liu et al., 2017) y *Mycobacterium spp.* (Gao et al., 2003; Proveddi et al., 2018) al evitar la acción de fagocitosis de estos organismos.

Los carotenoides por parte de las algas, por ejemplo, del alga verde halófila *Dunaliella salina*, que contiene principalmente isómeros E y Z de  $\beta$ -caroteno en distintas proporciones. Los productos derivados en la síntesis de carotenoides por sistemas bacterianos son particularmente interesantes debido a su alta proporción de (Z)-isómeros (hasta 50%) y su liposolubilidad, lo que da como resultado una biodisponibilidad superior a la del  $\beta$ -caroteno obtenido por síntesis química. Sin embargo, la síntesis química del  $\beta$ -caroteno aún domina el mercado por la rentabilidad de su tiempo en el que se produce (Schweiggert y Carle, 2016).

## 6.4 Generalidades del género *Dunaliella*

El género *Dunaliella* fue definido en 1905 por (Teodoresco, 1905), desde entonces se han descrito 28 especies que viven en numerosos ambientes, desde dulceacuícolas, marinos

hasta aquellos en condiciones de hipersalinidad (Borowitzka y Siva, 2017). Tienen propiedades importantes, y por consecuencia, un atractivo valor económico por ejemplo *Dunaliella salina*, que el año 1966 fue propuesta como recurso natural para obtención de  $\beta$ -carotenos (Masyuk, 1966) y en 1980 para producción de glicerol (Ben-Amotz, 1980).

## 6.5 Taxonomía de *Dunaliella*

Dominio: Eukarya

Reino: Plantae

Subreino: Viridiplantae

División: Chlorophyta

Clase: Chlorophyceae

Orden: Volvocales

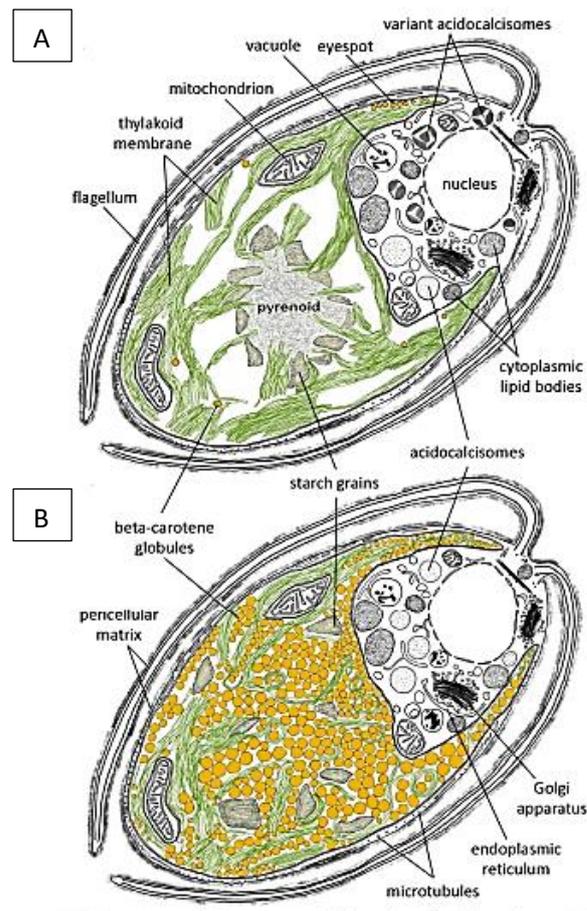
Familia: Dunaliellaceae

Género: *Dunaliella*

(Teodoresco, 1905)

## 6.6 Morfología en condiciones normales o "Fase verde"

La célula tiene una longitud de aproximadamente 5 a 18  $\mu\text{m}$  y carece de pared celular, y dos flagelos que se denotan claramente (Ben-Amotz et al., 1982) (Ilustración 1 A).



**Ilustración 1:** Comparación de *D. salina* Polle, J, et al., 2020

A) Morfología fase verde o vegetativa B) Morfología fase roja o estresada

Su morfología varía de ovoide a casi esférica, piriforme, elipsoide y cilíndrica esto es dependiente de la fase en la que se encuentre; usualmente su forma es radialmente simétrica, sin embargo, bajo condiciones adversas de estrés puede presentar asimetría. (Zepeda. E., 2017).

Cada célula contiene un plásmido esto es el cloroplasto en forma de copa con un pirenoide, generalmente colocado dentro del centro inferior del plásmido. Las manchas oculares anteriores son visibles al microscopio óptico. En condiciones óptimas de crecimiento la coloración es verde (Borowitzka M. y Siva C., 2017).

En el estudio morfológico realizado por Borovkov, A., et al, 2019, describe las células en la que denomina ‘fase verde’. En donde en la fase inicial del cultivo, las células comprendían un color verde intenso, con pared celular apretada, las inclusiones estaban ausentes en el cloroplasto y el pirenoide era claramente visible.

**(Ilustración 1. A).**

## **6.7 Ambiente**

*Dunaliella spp. a* está adaptada a ambientes hipersalinos (Avron M., Ben-Amotz., 1992 y Ben-Amotz A., Polle, J., Subba Rao D., 2009). Tienen un mejor crecimiento en ~1,5 M NaCl, pero pueden tolerar una amplia gama de salinidades desde la concentración de sal marina (~0.5 M NaCl) hasta soluciones de salmuera saturada (~4.5M NaCl) (Ben-Amotz, A. 1974, Ginzburg, M. 1988 y Borowitzka, L., 1981). Dentro de Santa Elena-Ecuador, se la encuentra en las piscinas salinas de Ecuasal (Romero., S., 2019).

## 6.8 Morfología bajo estrés o ‘‘Fase roja’’

Existen diferencias en la simetría de la célula cuando esta es sometida a estrés, está relacionada con la concentración de sales en el medio y procesos de osmorregulación, por los cuales la célula regula su concentración interna de solutos mediante la producción del glicerol. Sin embargo, en su fase estacionaria puede desarrollar una capa externa a la membrana plasmática, la cual es rica en polisacáridos. (Ben-Amotz y Avron, 1983).

Un estudio realizado por Borovkov, A., et al, 2019, a nivel morfológico describe que en la ‘‘fase roja’’ o fase de carotenogénesis bajo condiciones de estrés de crecimiento y reproducción, se observaron células con granulación del citoplasma en la forma de glóbulos lipídicos con coloración amarillenta que aparecieron desde el inicio de la segunda fase (**Ilustración 1. B.**). Al mismo tiempo, las células de *Dunaliella spp.* se tornaron más redondas y de una coloración naranja y rojo teja. Además, algunas células de *Dunaliella* formaron los procesos similares a pseudópodos



**Ilustración 2:** Cambios morfológicos a nivel celular de *Dunaliella sp.* bajo condiciones de estrés (Del Campo J., 2000)

## **6.9 Condiciones de estrés en *Dunaliella spp.* para la producción de $\beta$ -caroteno**

Entre los componentes químicos importantes que requiere una microalga para su desarrollo son:  $CO_2$ , N, S, P y una fuente lumínica que produzca la energía para su crecimiento. En condiciones naturales crecen utilizando la luz solar, sin embargo, a nivel de laboratorio pueden utilizar luz led, fluorescente o incandescente. Algunos metabolitos suelen aparecer frente a condiciones adversas como son los lípidos, proteínas, carbohidratos y otros micronutrientes como pueden ser carotenoides y vitaminas para ayudar a el organismo a proteger la célula (Agudelo, E., 2020).

Bajo estos antecedentes *Dunaliella spp.*, es una microalga productora de  $\beta$  - carotenos, para que esta producción se genere dentro de la célula es necesario cumplirse con un estrés de diversos factores como: salinidad, temperatura, ausencia de nitrógeno y temperatura. (García G. et al., 2005; Lamers et al., 2010).

## **6.10 Parámetros de estrés**

### **6.9.1 Intensidad lumínica**

Las microalgas responden de manera específica a la intensidad de luz a la que son expuestas, por ejemplo "cuando la intensidad de la luz es alta, la concentración de los pigmentos involucrados en la fotosíntesis (como la clorofila *a* y carotenoides primarios) disminuye y los agentes fotoprotectores o pigmentos accesorios,

carotenoides secundarios como el  $\beta$  -caroteno y la astaxantina, incrementan sus concentraciones en la célula” (Hu, 2013).

Los carotenoides secundarios producidos se almacenan en cuerpos lipídicos en el citoplasma, e impiden que llegue una cantidad excesiva de energía lumínica a las partes celulares encargada de su fotosíntesis (Vetchel et al., 1992 y Zepeda, E., 2017)

La radiación fotosintéticamente activa (PAR, por sus siglas en inglés) constante, suplementada en conjunto con la radiación ultra violeta, induce a un incremento en el contenido de carotenoides en las microalgas del género *Dunaliella* (Zepeda, E., 2017).

Por su parte Sánchez y Saavedra et al. (1996), mencionan que, con el uso de lámparas fluorescentes de luz roja en cultivos de *D. bardawil*, la densidad celular y el contenido de carotenoides incrementó un 10% en contraste con cultivos irradiados con luz blanca; esto nos refiere que la luz roja estimula el crecimiento, el volumen de las células y la acumulación de carotenoides totales.

### **6.9.2 Salinidad**

El estrés osmótico causado por las variaciones de salinidad, puede inhibir los procesos de fotosíntesis en la célula, al producirse este impedimento de hacer fotosíntesis también se reduce su capacidad de crecimiento. Sin embargo, se ha observado que, en algunas cepas, al incrementar la salinidad del medio se producen un aumento en las concentraciones de carotenoides (Borowitzka y Borowitzka, 1988 y (Zepeda, E., 2017).

En el estudio realizado por Serpa, R., y Calderón A., (2002) encontraron altas densidades celulares y/o altas concentraciones de carotenoides totales a salinidades de 1.5 M a 2.5 M, mientras que las mayores tasas de producción de carotenoides en mg de carotenoides/litro de cultivo\* día, se encontraron en salinidades de 1.5 a 3.5 M pudiendo llegar a 4.5 M.

### **6.9.3 Temperatura**

La temperatura es otro factor que tiende a interferir en la producción de algunos pigmentos fotosintéticos. Zepeda, E., (2017), rescata de algunos autores en especies del género *Dunaliella*, la disminución de la temperatura en el cultivo de 34 a 17 °C, produce un incremento de 7.5 veces los niveles de  $\beta$ -caroteno. Sin embargo, otros refutan y describen que "ha temperaturas altas pueden inducir la formación de radicales activos de oxígeno en las células y conducir a procesos de estrés oxidativo, lo que estimula la carotenogénesis".

#### **6.9.4 Inhibición de nitrógeno**

“El nitrógeno es un elemento esencial de los constituyentes estructurales de la célula, así como de proteínas, enzimas, clorofila, moléculas de transferencia de energía y ácidos nucleicos, este considerado como uno de los nutrientes más críticos para el crecimiento algal ” (Kim et al., 2016). La carencia de nitrógeno, junto a la alta intensidad luminosa son los factores ambientales más eficaces en la acumulación de carotenos en *Dunaliella spp.* (Lamers et al., 2010).

En el estudio de García, M. et al, (2020) demostró que la limitación de nitrógeno en el medio de cultivo provoca un incremento en la concentración de biomasa y materia orgánica de la microalga *Dunaliella tertiolecta*. Por lo contrario, existe una disminución de la concentración celular y el contenido de  $\beta$ -caroteno, resaltando que el aumento de la salinidad ha favorecido el incremento del mismo.

#### **6.10 Los carotenoides en la acuicultura**

El uso de harina de microalgas en la dieta empleada en acuicultura, está ligada por las bases nutricionales de la misma, el principal componente que las hace atractivas en este campo es su alto contenido de proteínas seguidos de los pigmentos beneficiosos y los carotenoides, tales como: clorofila, luteína, astaxantina y  $\beta$ -caroteno, ácidos grasos poliinsaturados, compuestos como vitaminas y minerales (Yaakob, Z., et al., 2014)

A lo largo de la historia en la acuicultura se ha empleado como alimento vivo (Coutteau 1996). Sin embargo, posteriormente se ha aprovechado su uso como harina, en forma de aditivo en las dietas formuladas para mejorar las actividades biológicas y nutricionales, así como fomentar el color del pigmento de peces y camarones (Ju et al. 2012).

Algunas investigaciones apuntan a que en unos años la harina de microalgas pura podría sustituir parcialmente la harina de pescado en la dieta del camarón blanco del Pacífico (Hanel et al. 2007; Ju et al. 2012). Algunos beneficios generales de la harina de microalgas como alimento para la acuicultura se describen a continuación en **tabla 1**.

**Tabla 1:** Beneficios de la harina de microalga en dieta de cultivo de camarones

<b>Componente nutricional</b>	<b>Beneficio</b>
Suplemento de biomasa microalgal en alimento:	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mayor ganancia de peso, tasa de crecimiento específica, alimentación tasa de conversión y mejores tasas de supervivencia en animales de granja</li> <li>• Digestibilidad del alimento mejorada</li> <li>• La respuesta inmune mejorada</li> <li>• Mejora de la calidad nutricional y sensorial de carne</li> <li>• Las propiedades antilipídicas, antiglicémicas, cardioprotectoras, antioxidantes y antihipertensivas mejoran la calidad de vida de los criadores</li> </ul>
Carbohidratos de microalgas:	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fuente metabólica primaria de energía</li> <li>• El componente principal de la energía neta y energía metabolizable en formulaciones de piensos</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Beneficios farmacéuticos y nutracéuticos de polisacáridos/oligosacáridos bioactivos</li> </ul>
Lípidos de microalgas:	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fuente de energía</li> <li>• Fuente primaria de grasa para el engorde</li> </ul>
Proteínas de microalgas:	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nutriente esencial para el crecimiento y mejora carnosidad del animal</li> </ul>
Ácidos grasos poliinsaturados	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Contenido mejorado de PUFA del animal cultivado</li> <li>• Mejora del metabolismo de los lípidos</li> <li>• Mejora el perfil graso, niveles de colesterol y ácido oleico</li> </ul>
Pigmentos derivados de microalgas y carotenoides	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Protege contra la oxidación, estrés (anti oxidante)</li> <li>• El contenido mejorado de antioxidantes en la carne</li> <li>• Mejor salud reproductiva, especialmente en acuicultura</li> </ul>
Fibra dietética derivada de microalgas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vaciado gástrico fácil</li> <li>• Reducción de los lípidos séricos, niveles de colesterol y glucosa</li> <li>• Ayuda en la eliminación de toxinas de los animales</li> </ul>

(Nagarajan, D., et al., 2021).

## 6.11 Importancia de los carotenoides en el camarón

El caroteno es una valiosa composición bioquímica conocida como pigmento alimentario, mientras que el  $\beta$ -caroteno es el principal precursor de la vitamina A y

potente antioxidante para los animales, es considerado como un componente básico para muchas reacciones químicas. (Borowitzka y Siva, 2007).

“Las formas mono-, di-, y poli bicíclicas de hidroxicarotenoides y cetocarotenoides son los más relevantes en nutrición de animales acuáticos. El primero incluye pigmentos tales como  $\beta$ -criptoxantina, luteína, y zeaxantina, los cuales son los pigmentos carotenoides más comunes de los ingredientes alimenticios convencionales” (Meyers y Latscha 1997, y Rodríguez-Concepción, 2013).

A pesar de que en el reino animal se puede detectar carotenoides, no sintetizan sus propios carotenoides, sino más bien, estos son tomados de otros organismos como plantas y algunos microorganismos. Es decir, los animales dependen estrictamente de una dieta rica en estos elementos para cubrir sus necesidades nutricionales, algunos de estos forman parte de los crustáceos como astaxantina,  $\beta$ -caroteno, equineonona y cantaxantina, los que pueden ser procedencia dietética o derivados por transformación metabólica de algún carotenoide de la dieta (Rodríguez-Concepción, 2013).

En el caso de crustáceos como el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) contienen carotenoides en su exoesqueleto, así como en los ojos, sangre, huevos, hepatopáncreas y ovarios. Diferentes experimentos han mostrado una mortalidad significativa de adultos de camarón alimentados con una dieta libre de carotenoides, en comparación con individuos que recibieron una dieta suplementada con carotenoides.

Yamada et al. (1990) reportaron una tasa de sobrevivencia de 91.4% para individuos de *P. japonicus* dando una dieta suplementada con astaxantina (100 mg/kg), comparado con una tasa de sobrevivencia de 85.7% para el grupo control. Un resultado destacable es que, a las 4 semanas de crecimiento, se observó una mayor tasa de sobrevivencia (91.3%) para el camarón alimentado con astaxantina comparado con una sobrevivencia de 51.7% para la dieta no suplementada.

Se ha comprobado que el empleo de harina de microalga rica en carotenoides en la alimentación de camarones potencia el efecto del crecimiento (Rodríguez-Concepción, 2013).

## 7. METODOLOGÍA

### 7.1 Origen de la cepa *Dunaliella spp.*

La cepa de la microalga con la cual se trabajó en esta tesis corresponde al proyecto: INCYT-PNF-2017M3112; CUP: 91870000.0000.384095. Con el permiso del Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica (MAATE): MAATE-DBI-CM-2022-0264.

### 7.2 Medios de cultivo y pruebas de crecimiento vegetativo

#### 7.2.1 Preparación de medio de cultivos

##### **Medio Guillard F/2:**

La fase de laboratorio fue realizada en el laboratorio CIBPA-UPSE en donde se prepararon dos medios nutritivos: Guillard F/2 y Nitrofoska. El agua de mar/dulce autoclavada a 15 presión se dejó enfriar por al menos 1 hora, e inmediatamente se incorporó los nutrientes, ajustando el pH a 7.4. **(Tabla 2).**

**Tabla 2:** Soluciones del medio Guillard F/2

<b>Solución básica de nutrientes:</b>	<b>(g/L)</b>
PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> Na.2H <sub>2</sub> O	5
NO <sub>3</sub> Na	75
SiO <sub>3</sub> Na2.9H <sub>2</sub> O	15-30
	mg
<b>Solución metales traza 1 ml:</b>	<b>(mg/L)</b>
SO <sub>4</sub> Zn	0,022
Cl <sub>2</sub> Co.6H <sub>2</sub> O	0,01
Na <sub>2</sub> Mo <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,006
SO <sub>4</sub> Cu.5H <sub>2</sub> O	0,01
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,18
Cl <sub>3</sub> Fe.6H <sub>2</sub> O	3,15
Na <sub>2</sub> .EDTA	4,36
Agregar 1 ml. de esta solución por cada litro de agua a enriquecer.	
<b>Solución de vitaminas:</b>	<b>(mg)</b>
Cianocobalamina (B <sub>12</sub> )	0,5
Tiamina HCl (B <sub>1</sub> )	0,1
Biotina (vit. H)	0,5
Esta solución debe ser acidificada a pH 4.5 antes de autoclavarse. Agregar 0.1 ml. por cada litro de agua salada.	

(Guillard, R., 1975).

**Solución 1:** Se preparó esta solución con 100 ml de agua destilada o agua purificada, calentar para disolver los químicos y por último autoclavar.

**Solución 2:** Se disolvió los químicos en 100 ml de agua destilada o agua purificada, y autoclavar.

**Solución 3:** Se preparó la solución de metales traza con 50 ml de agua destilada o purificada y se ajustó el pH acidificándolo con HCl; toda la solución 3 en 100 ml

de agua destilada o purificada y se agregó 0,10 ml de la solución de metales traza previamente preparada, ajustar el pH con 1N de NaHO, y, por último, autoclavar.

#### **Solución 4:**

Esta solución se acidificó a pH 4.5 antes de autoclavar. Agregar 0.1 ml. por cada litro de agua salada. Para emplear la solución 1, 2 y 3 se distribuye 1 ml por cada litro de medio que se desee preparar, y 0.5 ml de solución 4.

#### **Medio de cultivo Nitrofoska:**

Es un fertilizante foliar comercial, empleado ampliamente en agricultura, su preparación para el cultivo de microalgas es relativamente sencilla, se disolvió 1 g de este medio en 1 litro de agua (1 g L<sup>-1</sup>) con un agitador magnético y sobre un calentador eléctrico Joanlab, y luego se esterilizó en la autoclave a 121 °C a 1 libra de presión en un periodo de 10 a 15 minutos. A continuación, se detalla la composición química el fertilizante foliar Nitrofoska (**Tabla 3.**):

**Tabla 3:** Composición química del medio Nitrofoska

<b>Nutrientes principales</b>	<b>Proporción</b>
Nitrógeno total (N)	12 %
(Nítrico)	6,5 %
(Amoniacal)	5,5 %
Anhidrido fosfórico ( $P_2O_5$ ) soluble en agua y en citrato	12%
Oxido de potasio ( $K_2O$ ) procedente de sulfato y soluble en agua	17%
<b>Nutrientes secundarios</b>	
Oxido de Magnesio (MgO) soluble en agua	2%
Anhidrido sulfúrico ( $SO_3$ ) soluble en agua	8%
Oxido de Calcio (CaO)	5,0%
<b>Micronutrientes</b>	
Hierro (Fe)	0,2%
Cobre (Cu)	0,0003%
Zinc (Zn)	0.1%
Boro (B)	0,002%
Molibdeno (Mo)	0,0005%

### 7.3 Inoculación de la cepa *Dunaliella spp* en medio sólido y líquido

Se prepararon cajas petri con medio sólido Nitrofoska y Guillard F/2 empleando bacto-agar a una relación de 2 % (w/v); se agregó una dosificación de Gentamicina en relación 1ml/500 ml para evitar la contaminación por bacterias y 0,27 g/500ml de fluconazol para evitar la contaminación por hongos, cada caja fue rotulada.

Las muestras con mayor concentración celular, se necesitó realizar diluciones de las muestras: 1:10, 1:100, 1:1000 (Arredondo, B., y Voltolina, D., 2007). Para la siembra en sólido, se dividió en la caja Petri en cuatro partes iguales con ayuda de

un marcador en la parte exterior de la placa. Se Tomó una alícuota con el aza microbiológica y se realizó el respectivo rayado en las cajas de acuerdo a las diluciones que se haya hecho. La inoculación de la cepa se procedió en medio líquido, colocando 100  $\mu$ l de la muestra colectada en 900 $\mu$ l de medio a utilizar.

#### **7.4 Crecimiento vegetativo de *Dunaliella spp.***

##### **7.4.1 Evaluación de medios de cultivo.**

Este experimento se llevó a cabo durante 7 días, para ello se utilizaron dos medios de cultivo, medio “F/2” de Guillard y medio Nitrofoska. En los dos casos se utilizó agua de mar filtrada y esterilizada por calor húmedo en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Los cultivos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 1000 ml iniciando con un inóculo de  $17 \times 10^5$  células/ml para Nitrofoska y Guillard “F/2” se mantuvieron a una temperatura de  $20.5 \pm 1$  °C dentro del laboratorio de CIBPA; el pH osciló entre los 8.9 y 9.2 a lo largo del experimento. Los cultivos estuvieron expuestos a una intensidad de luz de 60  $\mu$ mol.

Se evaluó la densidad del cultivo mediante conteos celulares, cada 24 horas, en la cámara de Neubauer, utilizando un microscopio OMAX (Becker, 1994). Para evaluar la densidad celular se utilizó la siguiente fórmula:

$$\mathbf{DC\ In\acute{o}culo} = N \times 10^4 \times \mathbf{FD}$$

Donde:

**DC**= densidad celular (cel/ml)

**N**= promedio del conteo celular de los cuadrantes (A, B, C, D),

**10<sup>4</sup>**= factor de conversi3n de 0.1  $\mu$ l - 1ml

**FD**= factor de diluci3n (cuando se considera necesario diluir la muestra).

### **7.5 Inducci3n a la carotenog3nesis de *Dunaliella spp.***

Efecto interactivo de la intensidad de luz y ausencia de nitr3geno en el medio de cultivo. Para este experimento se tom3 la biomasa de los cultivos de crecimiento vegetativo que llegaron a su m3ximo concentraci3n celular en su fase exponencial. La cosecha se llev3 a cabo con la ayuda de una centrifuga HERMLE Z306 a una velocidad de 3500rpm por 3 minutos para evitar que la c3lula se rompiera. Se separ3 en matraces Erlenmeyer por triplicado y un control negativo con un volumen de 150ml de medio Guillard F/2 con ausencia de la soluci3n 1 (Nitrato de Sodio) y 10 ml de concentrado de biomasa de *Dunaliella spp.* la concentraci3n celular fue 15.4 x cel/ml; 18.3 x cel/ml, 16.3 x cel/ml; 17.6 x cel/ml esto corresponde a control, replica 1, replica 2 y replica 3 respectivamente.

Las pruebas de estr3s fueron efectuadas dentro de una c3mara c3bica cubierto totalmente de blanco para concentrar y focalizar la luz en el tratamiento. Las

lámparas fueron ubicadas frente a los cultivos, de manera que alcancen altas concentraciones de fotones de luz. La intensidad de luz fue aumentando cada 24 horas desde los 100  $\mu\text{M}$  hasta llegar a 400  $\mu\text{M}$ , se usó un luxómetro de amplio espectro para este fin. La temperatura se midió diariamente con termómetro y se mantuvo controlada entre los 24°C, por medio de aberturas colocados en los extremos del sistema de cultivo. El pH se midió los días 4, 8, 12, 16, 20 y oscilo entre los 8 y 9. El volumen evaporado por el calor de las lámparas se complementó añadiendo agua de mar esterilizada para no alterar la concentración celular en los conteos. A los medios de cultivo se privó de nitrógeno, y se expuso a la intensidad lumínica las 24 horas de cada día sin ningún tipo de descanso, hasta que se cumplieron los 20 días de estrés.

En este experimento se evaluó la respuesta celular frente al estrés a través de conteos celulares por número de días, mientras alcanzaban la carotenogénesis y saber cómo afecta la viabilidad del cultivo. Un control de resistencia celular frente al estrés para evaluar la concentración celular que logro sobrevivir. De manera que se aplicó la misma fórmula añadiendo agua destilada para no alterar las concentraciones.

$$\text{DC Inóculo} = N \times 10^4 \times \text{FD}$$

Donde:

DC= densidad celular (cel/ml)

N= promedio del conteo celular de los cuadrantes (A, B, C, D),

**10<sup>4</sup>**= factor de conversión de 0.1 µl - 1ml

**FD**= factor de dilución (cuando se considera necesario diluir la muestra).

La carotenogénesis total de la microalga alcanzó a los 20 días de haberles sometido a estrés; al finalizar el experimento cada cultivo fue cosechado utilizando una centrifuga a 3500rpm por 3 minutos, se lavó con NaCl al 1% (Takagi et al., 2006) y se llevó nuevamente a la centrifuga con las especificaciones anteriores con el fin de obtener una alícuota limpia. Las muestras se almacenaron en un congelador marca INDURAMA, a -80°C en el laboratorio de CIBPA.

Esta biomasa húmeda se guardó en placas de vidrio después se pesó y se las llevó a la estufa a una temperatura de 36 °C por 24 horas (Sánchez- Varo, 2000). Inmediatamente se utilizó un mortero para obtener la muestra en polvo. Se guardó muestras para análisis de pigmentos y otra para la elaboración de alimento. La concentración y productividad de la biomasa seca obtenida se determinó mediante las siguientes ecuaciones.

Velocidad de crecimiento:

$$\mu = \frac{\text{Ln } X_1 - \text{Ln } X_0}{t_1 - t_0}$$

**μ**: Velocidad de crecimiento

**LnX<sub>1</sub>**: Logaritmo natural de células finales

**LnX<sub>0</sub>**: Logaritmo natural de células iniciales

(Arredondo & Voltolina, 2007)

Productividad:

$$P = X2 \times Vol \times \mu2$$

**P:** Productividad

**X2:** Producción de biomasa en 1 L de medio de cultivo ( $g \times L^{-1}$ )

**Vol:** volumen del cultivo en litros

**$\mu2$ :** Tasa máxima de crecimiento específico

Dónde: PB= Productividad de biomasa (mg/L. día), CB= Concentración de biomasa (mg/L), t cultivo= Días de cultivo

(Richmond, A., 2004).

## **2.5 Análisis de pigmentos en *Dunaliella spp.***

Se tomaron 0.03g de polvo de *Dunaliella spp.* por triplicado dentro de tubos de ensayo de vidrio después se agregó 10ml de acetona al 100% y se dejó reposar por 24 h sobre hielo en oscuridad y dentro de un congelador a 4° C. Todos los procesos siguientes se llevaron a cabo sobre hielo y en completa oscuridad, posteriormente se trasladó al vortex a 3000 rpm x 3 minutos, se trasvaso a una fiola de 30ml, para obtener la mayor cantidad de pigmentos el proceso se repitió 2 veces más con tiempo de espera diferentes (30 y 15 minutos respectivamente) hasta obtener 30 ml de muestra. (Serpa, 2005).

Se ubicaron en celdas de vidrio de 2.4 ml de capacidad por triplicado sacando una media de cada muestra, y se leyó en el espectrofotómetro de Thermo Scientific™ Espectrofotómetros Vis/UV-Vis GENESYS™ 40/50 varias longitudes de onda de luz de acuerdo a la fórmula aplicada se procedió a leer clorofila *a* y clorofila *b* y carotenos totales. La fórmula utilizada para obtener la cantidad de carotenoides en la muestra fue:

$$Ca = 11.24 * A_{661.6} - 2.04 * A_{644.8}$$

$$Cb = 20.13 * A_{644.8} - 4.29 * A_{661.6}$$

$$Cx + c = \frac{1000A_{470} - 1,9 Ca - 63.14 Cb}{214}$$

(Lichtenthaler y Buschaman, 2001)

## **7.6 Análisis químico proximal de polvo de *Dunaliella spp*, y alimento comercial**

### **(Nicovita Origin Precría)**

Los análisis químicos se enviaron a realizar en el laboratorio de Análisis químicos de la Universidad Central del Ecuador-Quito, quienes utilizaron los siguientes protocolos en donde utilizaron varios mencionados a continuación.

#### **7.6.1 Determinación de proteína bruta**

Se pesaron 0.2000 g de muestra finamente molida por triplicado sobre papel de estaño oxido de magnesio y se envuelve. Las muestras se analizaron en el quipo Leco EP528® empleando la técnica de combustión de Dumas, analizador de Nitrógeno/Proteína. (ESPE,2021) La fórmula fue:

$$\% N * 6.25 = \% \text{ Proteína}$$

#### **7.6.2 Determinación de ceniza**

Se realizó por el método de pérdida de peso, se pesaron muestras de las diferentes dietas en crisoles de porcelana, se las llevó a la estufa a 105 °C a desecar por 4 horas, se dejó enfriar en un desecador por 40 minutos para pesar en la balanza analítica. El porcentaje se obtiene al restar el peso del crisol con la muestra seca el peso del crisol con la muestra húmeda entre el contenido de muestra y multiplicar por 100 (ESPE, 2021).

### 7.6.3 Determinación de fibra

Mediante el método de hidrólisis sucesiva, con el extractor de fibra Foss, se pesaron 1 g de muestra previamente desgrasada, en el crisol de extracción por triplicado. Se colocaron en el equipo, poniendo a calentar el ácido sulfúrico al 1.25 % (0.225 N) y se agregaron 150 ml a cada crisol para hervir por 30 min, posteriormente se realizaron 3 lavados con agua destilada. Se agregaron 150 mL de hidróxido de sodio al 1.25 % (0.255 N) y octanol, se dejó hervir por 30 min más para filtrar y realizar nuevamente 3 lavados. Los crisoles se llevaron a la estufa a 120 °C por 2 h, se colocaron en el desecador por 30 min y se incineraron en la mufla a 520 °C por 20 min, nuevamente se llevaron a la estufa a 130 °C por 20 min. Para la 26 determinación de fibra se restó el peso del crisol con ceniza al peso del crisol, entre gramos de muestra por 100 (ESPE, 2021).

## 7.7 Elaboración del alimento a base carotenos producidos por *Dunaliella spp*, y

### Nicovita Origin Precriá

Las dietas se elaboraron con base a un alimento para camarones (Nicovita Origin Precriá) con un valor nutricional establecido en la **tabla 5** (NICOVITA,2018) y mezclada con diferentes concentraciones de harina de *Dunaliella spp*. (10% y 20%), se tomó estos porcentajes ya que Hasan y Chakrabarti (2009), reportan que tan solo con la cantidad mínima de inclusión de 10 y el 15 % de harina de microalga pueden satisfacer el requerimiento en una dieta, sin embargo, Ju et al. (2012), describe que

la mayoría de los estudios sobre la inclusión de harina de microalgas emplean entre el 10-20 % siendo los estos los más efectivos en *Spirulina spp.*, de esta misma forma se probó estos porcentajes en el presente estudio.

Obtenido los 10% y 20% de biomasa microalgal, y con la ayuda de una aglutinante marca AQUACC natural bind+ (**tabla 4**), se mezcló en unos recipientes metálicos mediante el método de adición hasta cubrir el pellet (2mm) en totalidad (Torrey, modelo JR, criba Torrey CI-12-1/18). Una vez cubierto los pellets, se secaron en un horno a 24 ° C por 24 horas y para su almacenamiento se guardó en bolsas plásticas a -4°C hasta su utilización (ESPE, 2021).

**Tabla 4:** Composición química del aglutinante de AQUACC natural bind+

Grasa	0.4%
Ceniza	32%
Proteína	7%
Fibra	5%
Humedad	9%

Por otra parte, la composición del alimento balanceado que se empleó fue: harina de origen marino; Harina de semillas de oleaginosas; Harina de trigo; Aceite de pescado Lecitina de soya; Cloruro de sodio; Gluten de trigo, Premezcla de

vitaminas y minerales; Cloruro de potasio, Carbonato de calcio, Óxido de Magnesio; Ácidos orgánicos (Ácido fórmico, Ácido cítrico); Preservante autorizado (Ácido propiónico), Aminoácido sintético (Metionina) (**Tabla 5**).

**Tabla 5:** Composición garantizada completa (Nicovita Company, 2019)

FISICOQUÍMICAS	
Proteína	Mínimo 40%
Grasa	Mínimo 6%
Humedad	Máximo 10%
Ceniza	Máximo 13%
Fibra	Máximo 3%
Calcio	Máximo 2.4%
NaCl	Mínimo 0.5%
Fósforo	Mínimo 1%

## 7.8 Diseño experimental para análisis de supervivencia de *Litopenaus*

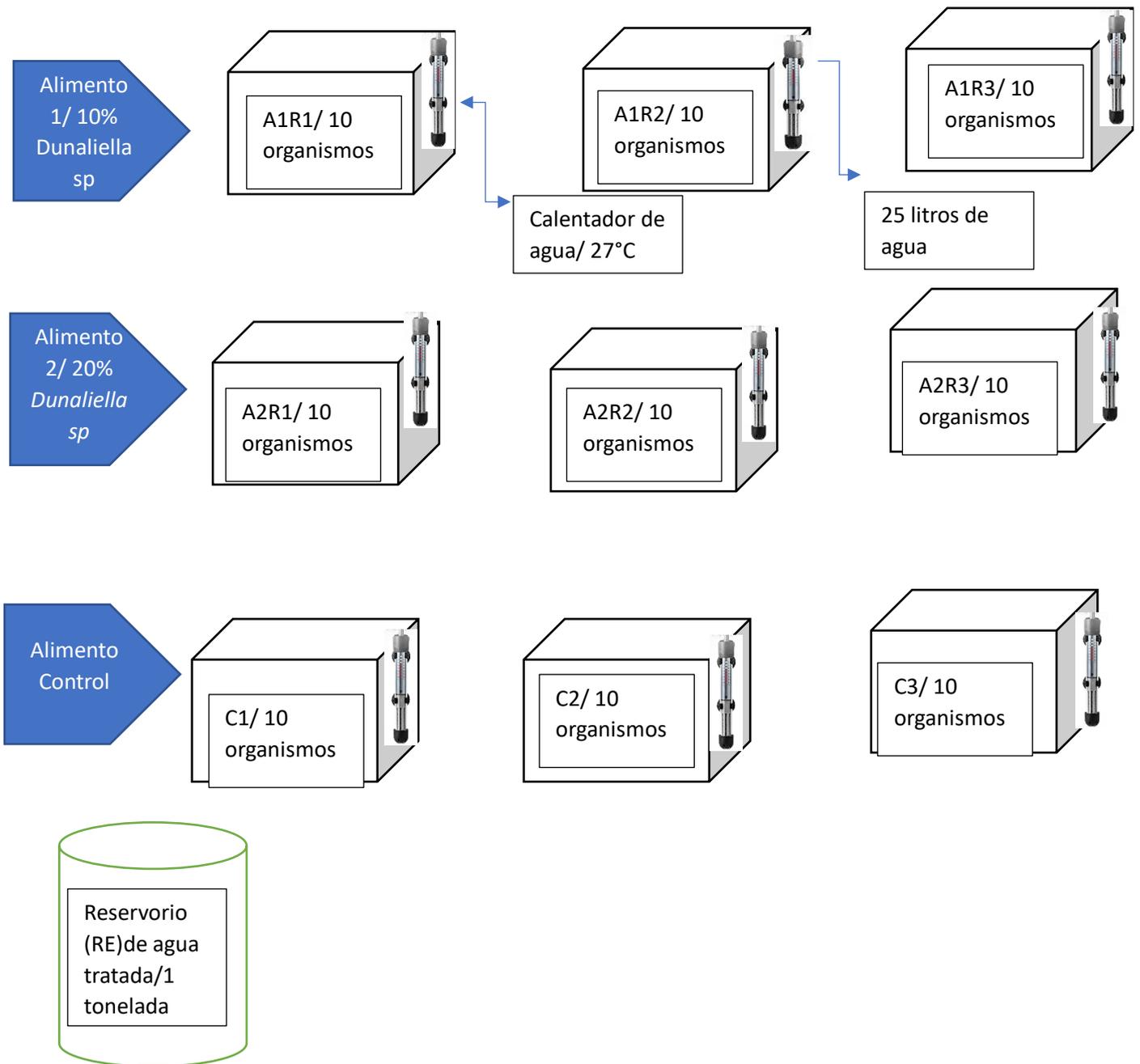
### *vannamei*.

La fase experimental se realizó en el laboratorio Vivilab.S.A ubicado en Mar Bravo en las instalaciones de laboratorio de análisis de agua para iniciar este proceso, se trasladaron camarones juveniles de 3 a 4 gramos desde la camaronera Pesalmar en un tanque de media tonelada con aireación constante. Una vez en el laboratorio, se prepararon acuarios de 40 litros con agua de mar filtrada a una concentración de 28 ppt de salinidad y controlada los parámetros físico químicos del agua, donde se

mantuvieron los camarones por una semana de aclimatación, en este lapso se aplicó una dieta 100% de Nicovita con recambios diarios del 40%, y temperatura media de 26°C. Se evaluaron 2 dietas del 10% y 20% de *Dunaliella spp.* en el alimento además de un control negativo, cada uno de los

alimentos por triplicado, utilizando acuarios con una capacidad de 40 litros, a los que se agregaron 25 litros de agua de mar ( $26 \pm 1$  ups) previamente filtrada y tratada, ya que el clima de la época estaba en temperaturas bajas se optó por utilizar calentadores de la marca SOBO high-class teniendo una temperatura estable de ( $26 \pm 1$  ° C).

Para la limpieza de los acuarios se realizaron recambios del 50 % cada día, en cada uno de los alimentos se utilizaron 10 organismos de *L. vannamei* con un peso inicial de  $3.5 \pm 0.5$  g. Los especímenes fueron alimentados con las dietas por 45 días (al 6% de la biomasa repartido en 4 raciones diarias). Se tomaron peso y talla cada semana de todos los organismos con la ayuda de una balanza analítica y una cinta métrica.



**Donde:**

RE= Reservorio

C: Control

A1: Alimento con 10% de *Dunaliella spp.*

A2: Alimento con 20% de *Dunaliella spp.*

R= Replica

Tratamiento del agua para recambios

- Se clorinó el agua de mar previamente filtrada a una concentración de 0.03 ml/ L.
- Se procedió a desclorinar, esto después de un mínimo de 6 horas de haber clorinado, se usó vitamina C 0.005 g/L, durante 2 horas
- Con la ayuda de la solución Orthotolodine se verificó la ausencia de cloro.
- Se aplicó cal y EDTA: la cual fue 0.005 g/L y EDTA fue 0.015 g/L. Se dejó durante 2 horas
- Se aplicó bacteria Emviplus durante 1 hora luego, la concentración fue de 0.005 ml/L
- Se aplicó bacteria *hachery* durante 1 hora, la concentración de 0.005 ml/L

Para la fase de adaptación de los organismos se aplicó procura, que sirve con anti estrés en los acuarios (Vivilab, 2021).

## 7.8 Elaboración de raciones

Para el control de pesos y talla de los animales se procedió de la siguiente manera: el día 7 por la noche los animales no fueron alimentados para obtener un peso sin contenido alimenticio dentro del sistema digestivo; después con la ayuda de un

chayo, con cuidado se sacaron a los organismos a un tanque con agua limpia, aireación y calentador de agua; con siguiente fueron pesado, medidos y puestos en los acuarios nuevamente, esto se repitió en los demás acuarios.

Después de obtener la biomasa de cada acuario se derivó a racionar con un porcentaje de alimentación del 6% dividida en 4 horarios (20, 25, 25, 30%) respectivamente, la fórmula que se utilizo fue la siguiente:

**Tasa de crecimiento específico:**

$$TCE = \frac{\ln(Pf) - \ln(Pi)}{t}$$

Dónde: TCE= tasa de crecimiento específico, Pf= Peso final, Pi= peso inicial, t= tiempo

**Factor de conversión alimenticia**

$$FCA = \frac{\text{consumo de alimento}}{Pf - pi}$$

Dónde: Pf= peso final; Pi= peso inicial

**Ración diaria:**

$$RD = (\text{biomasa} \times \frac{TCE}{100}) \times FCA$$

Dónde: RD= Ración diaria, biomasa= pesos en gramos de la biomasa total, TCE= Tasa de crecimiento específica y FCA= factor de conversión alimenticia

### **Ración alimenticia semanal:**

$$\mathbf{RS} = \mathbf{RD} \times 7 \text{ días}$$

Dónde: RS= ración semanal y RD= ración diaria

### **7.9 Análisis estadístico**

En todos los experimentos de este trabajo se utilizó un diseño completamente aleatorizado. Se aplicó la prueba de normalidad Shapiro-Wilks y para la homogeneidad de varianzas, la prueba Levene.

Para la comparación del crecimiento de *Dunaliella spp.*, para el experimento de diferentes medios de cultivo, para eso se optó por ANOVA de una vía con un nivel de significancia de 0.05.

Para el análisis del volumen celular y de inducción a la carotenogénesis se aplicó pruebas ANOVA de dos vías con un nivel de significancia de 0.05. para los casos donde se hallaron diferencias significativas se realizó una prueba *a posteriori* de Fisher LSD. para los casos donde no se encontró normalidad de varianza, los datos fueron transformados con la función log10. si estos datos transformados no presentaban normalidad, se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-walls.

En el experimento de camarones juveniles se aplicó, para ambos casos, desviación estándar en crecimiento de talla y aumento de peso. De la misma manera se utilizó desviación esta dar para oxígeno disuelto, temperatura, salinidad y amonio con un 95% de significancia.

Todos los análisis estadísticos se realizaron en el programa MINITAB 10.

## 8. RESULTADOS.

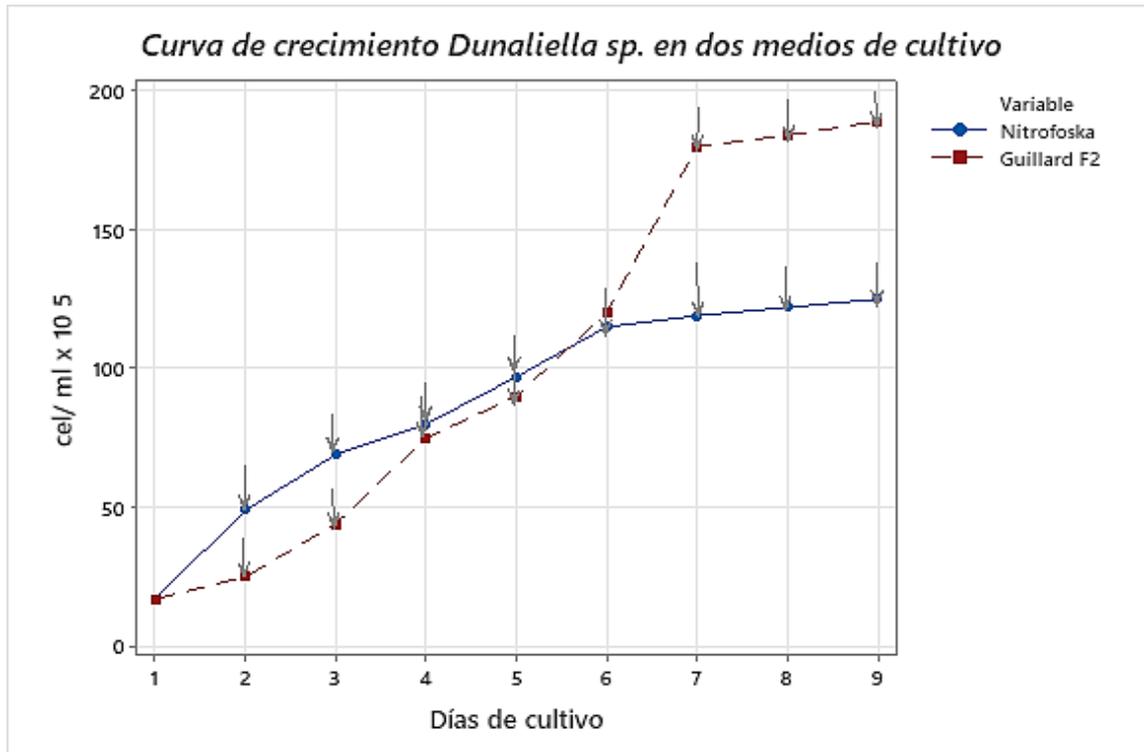
### 8.1 Comparación del crecimiento de *Dunaliella spp* a diferentes medios de cultivos

Se presenta una curva de crecimiento durante nueve días de cultivo, con una concentración inicial de  $17 \times 10^5$  células/ml en el día 0 tanto para Guillard F/2 como para Nitrofoska.

A partir del segundo día de cultivo se registró un favorable y acelerado crecimiento para el medio Nitrofoska con una concentración de  $49 \times 10^5$  células/ml, la misma que al alcanzó al sexto día de crecimiento la fase exponencial temprana, con una densidad celular máxima de  $125 \times 10^5$  cel/ ml.

Mientras, el medio Guillard F/2 al segundo día de cultivo registró un crecimiento de  $25 \times 10^5$  células/ml, y a lo largo del periodo conservó un crecimiento moderado, al cuarto día de cultivo con  $75 \times 10^5$  células/ml, al quinto día aumentó su concentración a  $90 \times 10^5$  células/ml; la fase logarítmica exponencial alcanzó al séptimo día de cultivo con una densidad de  $189 \times 10^5$  células/ml, por lo que su fase estacionaria se extendió hasta noveno día de cultivo. (**Grafica 1**).

De acuerdo a estos resultados la microalga *Dunaliella spp* en medio Guillard F/2 obtuvo un mejor crecimiento y concentración celular comparado con el medio Nitrofoska, por tal razón fue el medio que se seleccionó para continuar con la parte experimental de este trabajo.



**Gráfico 1:** Comparación del crecimiento de *Dunaliella sp.* en dos medios de cultivo, Guillard F/2 y Nitrofoska

## 8.2 Productividad de biomasa.

### Velocidad de crecimiento

$$\mu = \frac{\ln X_1 - \ln X_0}{t_1 - t_0}$$

## Guillard F/2

Donde:

$$\mu = \frac{\text{Ln } 189 - \text{Ln}17}{9 - 1}$$

$$\mu = \frac{2,38 - 1,23}{8}$$

$$\mu = 0,13$$

## Nitrofoska

Donde:

$$\mu = \frac{\text{Ln } 125 - \text{Ln}17}{9 - 1}$$

$$\mu = \frac{2,09 - 1,23}{8}$$

$$\mu = 0,10$$

La velocidad de crecimiento más acelerada se obtuvo en medio Guillard F/2 con 0,13 células/día mientras que en el medio Nitrofoska alcanzó una velocidad de crecimiento de 0,10 células/ día.

## Productividad

$$P = X2 \times Vol \times \mu2$$

## Guillard F/2

Donde:

$$P = 0,52 \times 1L \times 0,13$$

$$=0,35$$

## Nitrofoska

Donde:

$$P = 0,37 \times 1L \times 0,10$$

$$=0,24$$

En cuanto a productividad se encuentra una diferencia significativa entre el medio Guillard F2 y Nitrofoska, donde el medio Guillard F2 obtuvo una productividad de 0,07 g/L, es decir por cada litro cultivado se obtendrá 0,07 g de biomasa húmeda, ya que para Nitrofoska es de 0,04 g/L.

### 8.3 Concentración celular de *Dunaliella spp.* durante la etapa de carotenogénesis

Para conocer la pérdida de biomasa durante el tiempo de ser sometida a estrés, se realizó un conteo celular. Los datos se presentan en la **figura 2** donde se observa el eje de las X que corresponde al periodo en días en que la cepa de *Dunaliella spp.*, fue sometida a condiciones de intensidad lumínica extrema  $400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , así como inhibición de nitrógeno en el medio de cultivo Guillard F/2 durante 20 días,

mientras que el eje Y detalla la concentración celular que se mantuvo durante el estrés, dada en  $\times 10^5$  cel/ml.

En las tres réplicas experimentales, se registró muerte celular, por lo que se asume que se debe al cambio drástico de los parámetros alterados a los que fueron sometidas. La concentración celular al inicio del estrés fue de:  $18.3 \times 10^5$  cel/ml,  $16.3 \times 10^5$  cel/ml,  $17.6 \times 10^5$  cel/ml correspondiente a replica 1 (R1), replica 2 (R2) y replica 3 (R3) respectivamente, culminando con  $15 \times 10^5$  cel/ml (R1),  $13.3 \times 10^5$  cel/ml (R2),  $14.1 \times 10^5$  cel/ml (R3), demostrando la disminución en la concentración celular (**Tabla 5**). Esto no sucedió con la prueba control, cuya concentración celular experimentó un ligero crecimiento celular con  $15.4 \times 10^5$  cel/ml al inicio del estrés y una concentración final de  $17 \times 10^5$  cel/ml, es decir existió un aumento de  $10.2 \times 10^5$  cel/ml, **gráfico 2**. Se cree que este ligero crecimiento se debe a que el medio de cultivo de control mantenía ciertos nutrientes, ya que no fue desprovisto de nitrógeno, mientras que los sometidos a estrés, al no tener este nutriente y estar sujetos a esta radiación lumínica extrema cambiaron su ruta metabólica para lograr sobrevivir, de esta manera crean una protección celular ante estos parámetros, traducándose en la producción de carotenos y una disminución en su concentración ante el medio hostil.

De acuerdo a los resultados de concentración celular durante el estrés, se encontró que en promedio existió una pérdida de  $0,56 \times 10^5$  cel/ml en la concentración celular, esto representa una pérdida en promedio del 18,8 % desde el día de inducción a estrés hasta el término de la misma, esto sugiere que se debería probar nuevos medios de cultivo con la finalidad de aumentar la concentración celular en fase vegetativa con la finalidad de enfrentar la pérdida celular causada por el estrés.

Al aplicar un análisis de correlación entre la inhibición de nitrógeno, intensidad de luz y la densidad celular se observó que existe una correlación negativa ( $p=-50$ ) entre las dos variables; por lo tanto, las altas intensidades de luz dan como resultado concentraciones celulares menores o estables, todo esto a una intensidad de luz de  $400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , empleando la misma concentración de salinidad (35 ppt) (Tabla 5).

**Tabla 5:** Concentración celular de *Dunaliella spp* durante fase de estrés.

<b>Días</b>	<b>Control cel/ml</b>	<b>R1 cel/ml</b>	<b>R2 cel/ml</b>	<b>R3 cel/ml</b>
<b>1</b>	$15.4 \times 10^5$	$18.3 \times 10^5$	$16.3 \times 10^5$	$17.6 \times 10^5$
<b>4</b>	$15.8 \times 10^5$	$18 \times 10^5$	$16 \times 10^5$	$17 \times 10^5$
<b>8</b>	$16 \times 10^5$	$17.2 \times 10^5$	$15.7 \times 10^5$	$16.2 \times 10^5$
<b>12</b>	$16.3 \times 10^5$	$17 \times 10^5$	$15 \times 10^5$	$16 \times 10^5$
<b>16</b>	$16.6 \times 10^5$	$16.1 \times 10^5$	$14.2 \times 10^5$	$15.3 \times 10^5$
<b>20</b>	$17 \times 10^5$	$15 \times 10^5$	$13.3 \times 10^5$	$14.1 \times 10^5$

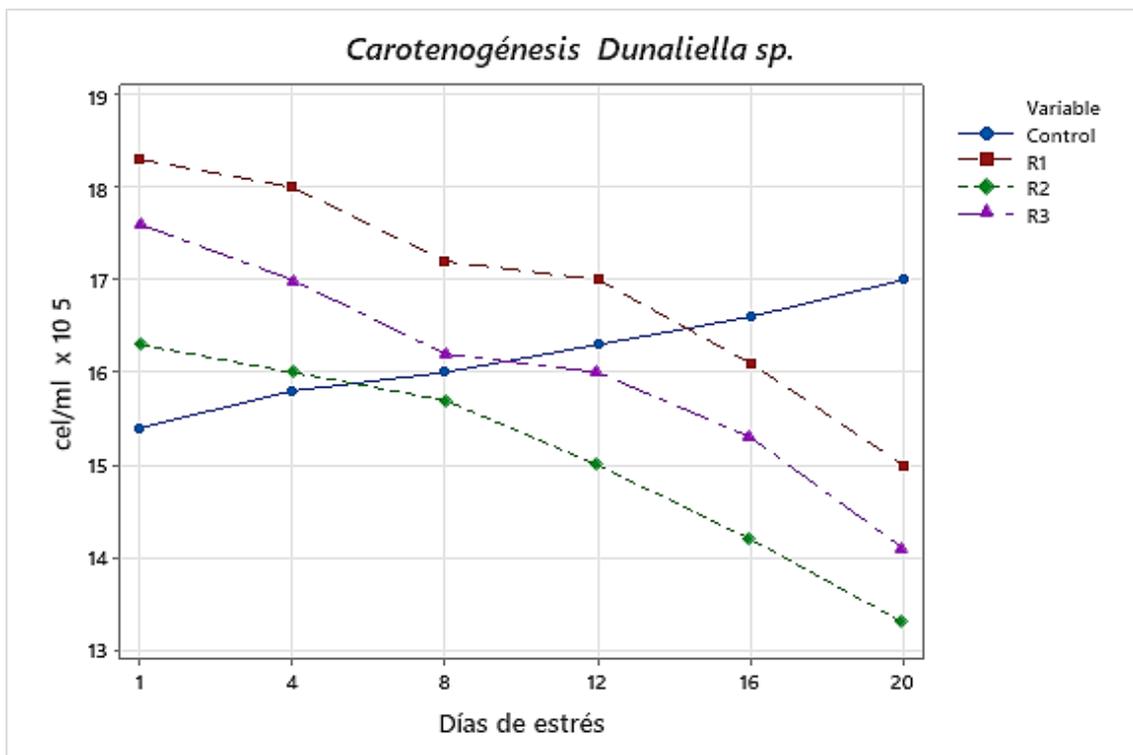


Gráfico 2: Concentración celular durante la carotenogénesis de *Dunaliella spp*

#### 8.4 Análisis de pigmentos

En base a las dos pruebas de estrés que se realizaron, se obtuvo valores de Clorofila *a* (Ch *a*), Clorofila *b* (Ch *b*) y carotenoides totales (CT). (Tabla 6). Dando como resultado 3 muestras control cuyos valores variaron de 4.31- 3.99 y 4.18 mg/ml para Ch *a* y 3.09 -2.61 y 2.90 mg/ml para Ch *b*, mientras que los valores en carotenoides se mantuvieron en rangos de 3.46- 3.41 y 3.46 es decir existió poca variación en entre ellos.

De la misma manera se efectuó el análisis de cada muestra con sus respectivas réplicas, en donde Muestra 1-1 significa Muestra 1-réplica 1 (Gráfico 3). En la

Muestra 1-1 se evidencia una predominancia de pigmento de Ch *a* con 16.43 mg/ml, dominancia intermedia en Ch *b* (8.94 mg/ml) y valores menores de CT (4.58 mg/ml). En tanto la Muestra 1-2 el valor de Ch *a* bajó 1 mg/ml con respecto a la anterior dando como resultado 15.03 mg/ml, pero mantuvo los valores en Ch *b* (8.91 mg/ml) y aumentó los valores de CT con 5.57 mg/ml. En la muestra 1-3 el valor de Ch *a* siguió disminuyendo llegando a 14.76 mg/ml, los valores de Ch *b* no variaron drásticamente de las réplicas anteriores arrojando valores de 8.37 mg/ml, en cuanto a los CT también se mantuvieron altos en rango no muy variable de la réplica 2, con valores de 5.28 mg/ml.

Desde la perspectiva de análisis de pigmentos por prueba experimental, en la muestra 1 (réplica 1, 2 y 3) existió una variación en los resultados tanto de Ch *a* y Ch *b* ya que en ambos casos se presenta una variación estándar de 0.98, mientras que existió menor variación en análisis de CT con valores de 4.58-5.57 y 5.28 mg/ml con una desviación estándar de 0,50 (**Grafico 3**).

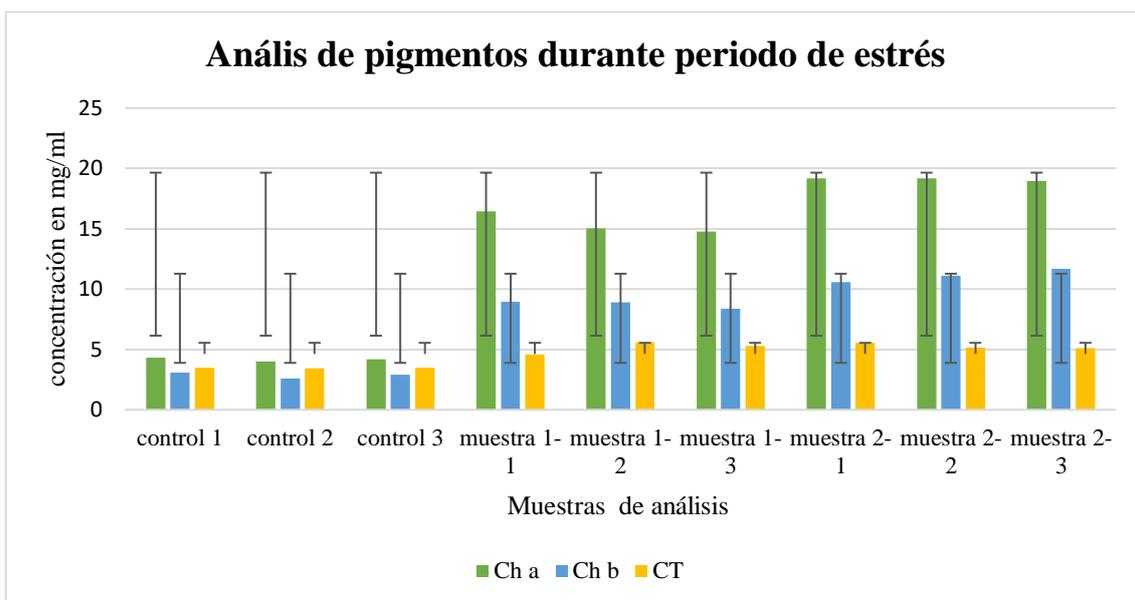
En la Muestra 2-1 existió una dominancia de pigmento Ch *a* con 19.17 mg/ml, seguido de Ch *b* con 10.56 mg/ml y una concentración menor de CT con 5.54 mg/ml. En la muestra 2-2 se mantuvo concentración de Ch *a* con 19.17 mg/ml con respecto a la réplica 1, y un aumento de 11.12 mg/ml y disminuyó la concentración de CT con respecto a la réplica 1 con un valor de 5.14 mg/ml. Para la muestra 2-3 se encontró una disminución de la Ch *a* en 18.96 mg/ml, mientras que existió un ligero aumento en Ch *b* con respecto a la réplica 2 con 11.68, en cuanto CT se

presentó un mantenimiento de estos valores con respecto a la réplica 2 con 5.12 mg/ml (**Tabla 6**).

De manera general se observó una correlación clara entre el aumento de CT y la disminución de Ch *a*. (**Tabla 6**):

**Tabla 6:** Análisis pigmentos en fase de estrés.

<b>Muestras</b>	<b>Ch <i>a</i></b>	<b>Ch <i>b</i></b>	<b>CT</b>
<b>control 1</b>	4,31092	3,09573	3,4689
<b>control 2</b>	3,992	2,617	3,41671
<b>control 3</b>	4,18928	2,90994	3,46872
<b>muestra 1-1</b>	16,43916	8,945	4,588
<b>muestra 1-2</b>	15,03472	8,91066	5,5739
<b>muestra 1-3</b>	14,76484	8,37507	5,281
<b>muestra 2-1</b>	19,1788	10,56066	5,5456
<b>muestra 2-2</b>	19,17584	11,12	5,1469
<b>muestra 2-3</b>	18,96748	11,6862	5,1219

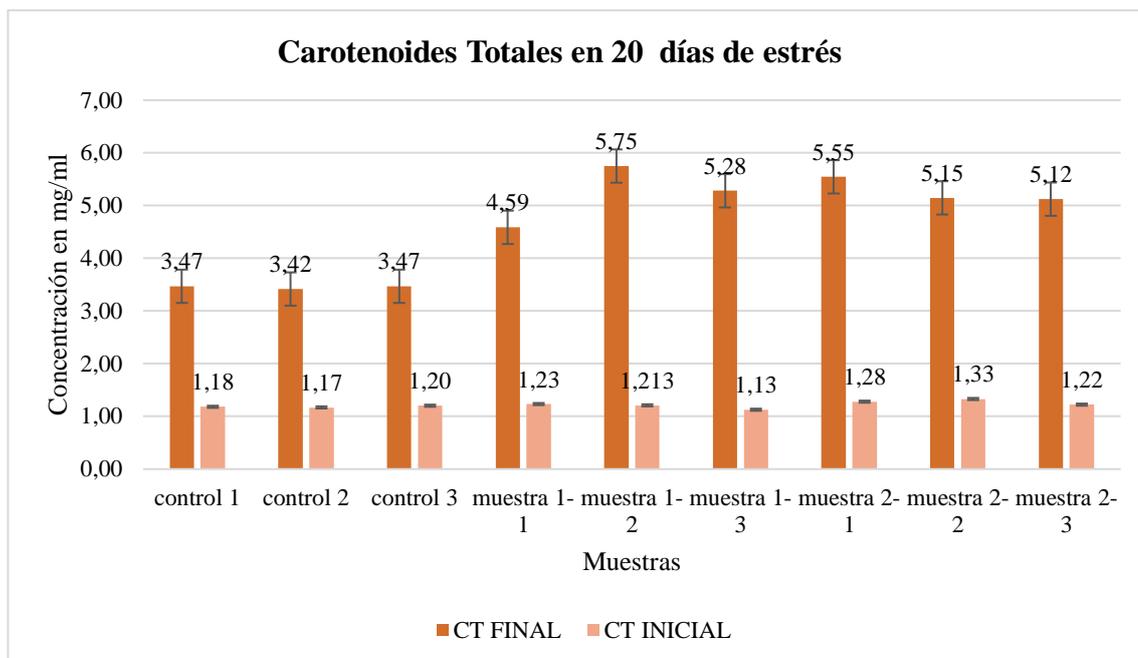


**Gráfico 3:** Pigmentos totales producidos por *Dunaliella spp.* durante la prueba de estrés.

#### 8.4.1 Análisis de carotenos

Tomando en cuenta solo el análisis de carotenoides, se observó un incremento de los mismos en las muestras sometidas a estrés lumínico e inhibición de nitrógeno con respecto a los controles.

Desde el día 1 de estrés todos los experimentos tuvieron intervalos entre 1,13 – 1,33 mg/ml de carotenos totales; al cabo de los 20 días de estrés se observa un ligero incremento, que en los controles obtuvieron una concentración en promedio de 3.44 mg/ml, en comparación con las muestras sometidas a estrés que alcanzaron una concentración promedio de 5.21 mg/ml siendo la muestra que expresó una mayor concentración de CT la muestra 1-2 con 5.7 mg/ml (**Gráfico 4**).



**Gráfico 4:** Análisis de carotenoides totales en *Dunaliella spp* durante 20 días

## 8.5. Determinación de la dosis de *Dunaliella spp.* en la dieta

### 8.5.1 Análisis proximal del alimento

Se analizó el alimento control que se proporcionó en la experimentación (balanceado), la biomasa de *Dunaliella spp* cultivada., así como el nuevo alimento elaborado usando el 10% y el 20% de la biomasa de *Dunaliella spp.* agregada. Los análisis que se realizaron constaron en: proteína bruta, extracto etéreo, fibra bruta, cenizas y extractos libres de nitrógeno (**Tabla 6**).

Los valores más altos que mantiene la biomasa de *Dunaliella spp.* son de extractos libres de nitrógeno con 75.5 %, seguido de la fibra bruta con 10.1%, a continuación,

la proteína bruta de 8.2 %, 5.5 % de cenizas y en menor proporción 0.7 % de extracto etéreo.

El alimento control se basó en un balanceado comercial para camarones el mismo que contó con valores altos de extractos libres de nitrógeno con 41.1 %, seguido de la proteína bruta con 39.9 %, 9.9% de cenizas y en menor proporción extracto etéreo con 7.9% y 1.2% de fibra bruta.

Los análisis bioquímicos fueron necesarios para conocer composición exacta del balanceado comercial con la agregación de la biomasa microalgal, mientras que el mayor porcentaje de proteína se encuentra en el balanceado comercial con 39.9 %, mientras que la biomasa e *Dunaliella spp*, 8.8%. En cuanto a la fibra bruta con 10.1%, este resultado revela una complementariedad entre ellos.

Para la elaboración del alimento se calculó la ración alimenticia diaria, se pesó el balanceado comercial más el agregado del 10% de biomasa de *Dunaliella spp.*, para las dietas destinadas con este porcentaje y el 20% para las dietas restantes. Al cabo de los análisis bromatológicos para el alimento con 10% de biomasa *Dunaliella spp* se determinó un 93% de extractos libres de nitrógeno, el 43% de proteína, 11.01 de fibra bruta, 10% de cenizas y 7% de extractos etéreos, mientras que para el alimento enriquecido con el 20% de biomasa microalgal, se determinó el 98% de extractos

libres de nitrógeno, 55% de proteína bruta, seguido de 13% de cenizas y en menor proporción 7.3 de extracto etéreo (**Tabla 6**).

**Tabla 6:** Análisis proximal de las diferentes dietas de *Dunaliella spp.* utilizadas en el presente experimento.

<b>Muestra</b>	<b>Proteína bruta</b>	<b>Extracto etéreo</b>	<b>Fibra bruta</b>	<b>Cenizas</b>	<b>Extractos libres de nitrógeno</b>
<i>Dunaliella spp.</i>	8.2	0.7	10.1	5.5	75.5
<b>Control</b>	39.9	7.9	1.2	9.9	41.1
<b>Control+ 10% de D.</b>	43	7	11,01	10	93
<b>Control + 20% de D.</b>	55	7,3	11,2	13	98

## **8.5.2 Biometría**

### **8.5.2. Talla**

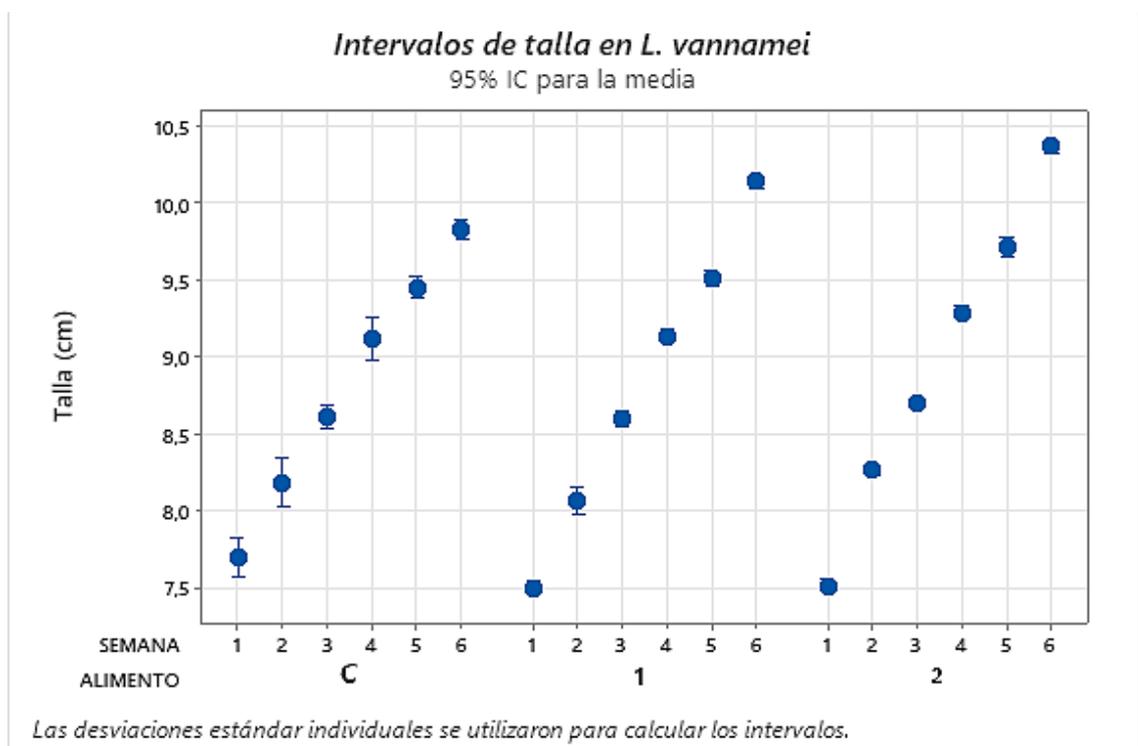
Se realizó el cultivo experimental durante 6 semanas, el gráfico muestra el eje de las X con datos correspondientes a semanas de cultivo y el alimento suministrado que se describe con la palabra alimento; en el eje de las Y se encuentra la talla dada en centímetros (cm), los números que se representan en la gráfica muestran los promedios totales que se muestrearon en cada semana.

La primera semana se obtuvo una media estándar de 7.7 cm en talla para los individuos de *L.vannamei* alimentados con balanceado comercial (control), 7.53 cm para los ejemplares alimentados con el balanceado comercial más 10% de biomasa de *Dunaliella spp.* (control), y 7.5 cm para ejemplares alimentados con balanceado comercial más 20% de biomasa microalgal (alimento 2).

En la segunda semana de experimentación existió un incremento de talla en todos los alimentos siendo de 8.25 cm para el control y para el alimento 2, mientras que para el alimento 1 la talla media muestreada fue de 8 cm.

En la semana tres se encontraron diferencias menores entre los alimentos empleados, el alimento control con 8.65 cm, 8,6 cm para el alimento 1 y encontrando un aumento significativo en el alimento 2 con 8.7 cm. En la semana cuatro se continuó con una diferencia mínima entre los alimentos empleados: 9.2 cm para alimento 1, 9.2 cm para el alimento 1 y 9,3 cm para alimento 2.

En la quinta semana observó una disparidad de los datos entre alimentos empleados, siendo el control con 9,45 cm, alimento 1 con 9.5 cm, alimento 2 con 9,8 cm en promedio de tallas. La sexta o última se semana se encontró que el alimento que representó los valores en tallas más pronunciados fue el alimento 2 con un promedio en tallas de 10.4 cm, seguido del alimento 2 con 10% de biomasa microalgal con 10,1 cm de promedio en tallas, mientras que el alimento control un promedio en talla de 9.8 cm (**Grafico 5**). A pesar de que existió un crecimiento mayor en centímetros en los alimentos empleados, esta no fue muy significativa.



**Gráfico 5:** Intervalos de talla *L. vannamei*

### 9.2.2 Peso

En la gráfica se presenta datos de peso monitoreados durante las 6 semanas de experimentación de acuerdo al alimento empleado, control, alimento 1 (balanceado comercial más 10% de biomasa microalgal) alimento (balanceado comercial más 20% de biomasa microalgal).

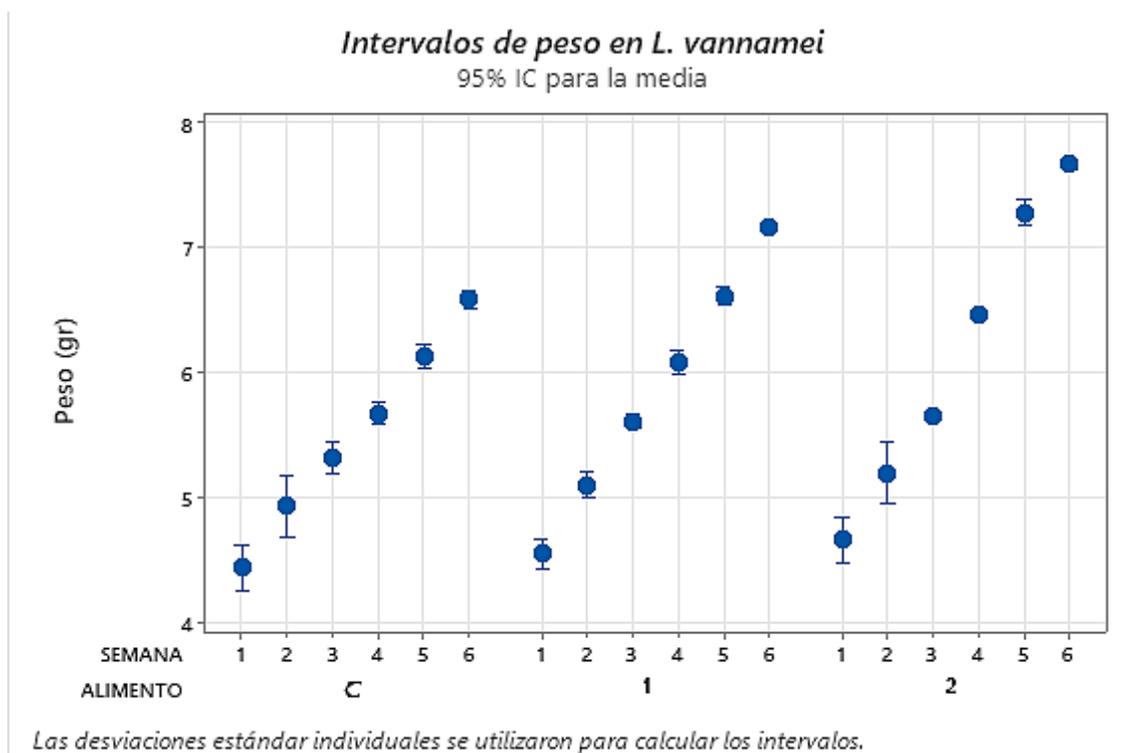
Los ejemplares de *L. vannamei* que se emplearon en la experimentación comprendían en promedio entre 4 a 5 gramos de peso inicial. 4.47 g para control, 4.54 g para alimento 1 y 4.61 g para alimento 2.

En la segunda semana se presenta un notorio incremento del peso, que es significativo para alimento 1 con 5.36 g, seguido de alimento control con 5.13 g incrementando el peso 0,75 g para alimento 2 y 0,59 g más que la semana uno para alimento 1, sin embargo, para el control solo existió un aumento de 0.44 g.

La tercera semana continúa con un incremento en peso, este incremento se detona lento para el control con 5.37 g, mientras que se registra un incremento más acelerado para alimento 1 con 5.63 g y 5.67 g para alimento 2.

Al final de la experimentación tanto el alimento 1 y el 2 obtuvieron unos incrementos superiores en cuanto al peso en comparación con el alimento control; es el caso del alimento 2 que inició con 4.61 g en promedio de peso y alcanzó 7.64 g al final de la experimentación, incrementando 3.03 g del peso inicial en seis

semanas, seguido del alimento 1 que inició con de 4.54 g en promedio de peso y culminó con un peso promedio de 7.14 g al final de la experimentación, incrementando 2.6 g desde el inicio de la experimentación (**Gráfico 6**).



**Gráfico 6:** Intervalos de peso de *L. vannamei*

### 9.3 Raciones alimenticias para *Litopenaeus vannamei*

El ensayo se realizó durante 6 semanas de cultivo usando 3 réplicas por cada experimentación, la alimentación fue a saciedad en tres raciones diarias, la tasa de alimentación se ajustó considerando el consumo de alimento (Benitez *et al.*, 2018).

Se presenta en tabla 5 en anexos, un apartado de las semanas en que se tomó los datos, el porcentaje de agregado de biomasa de *Dunaliella spp.*, al alimento, donde C corresponde al control y los números a la cantidad de réplicas empleadas, A que corresponde al Alimento, R a la réplica y los números a las veces en que se ha realizado la réplica.

Además, un apartado de Biomasa total dada en gramos, esto responde a la biomasa total que se mantenía en los estanques de experimentación. Se describen también valores de ración diaria y ración semanal que se calcularon usando la formula respectiva, encontrada en la sección de metodología. Además de la cantidad en gramos de biomasa de *Dunaliella spp* empleada y el valor exacto en gramos del balanceado comercial. La **Tabla 7**, muestra las raciones diarias y semanales para *L. vannamei* según el porcentaje de biomasa de *Dunaliella spp* y del alimento comercial.

**Tabla 7:** Raciones alimenticias para *Litopenaeus vannamei*

Semana	Porcentaje de <i>Dunaliella spp.</i>	Biomasa Total (g)	Ración diaria/ semanal (g)	Biomasa microalgal (g)	Balanceado(g)
1	0% A1+A2+A3 (Alimento Control)	133,16	7,98 /55,92	0	55.92
1	Alimento 1: 10% A2R1+A2R2+A2R3	136,59	8,19/ 57,36	5.73	51.63
1	Alimento 2: 20% A3R1+A3R2+A3R3	139,9	8,39/ 58,75	11.75	47
2	0% A1+A2+A3 (Alimento Control)	148,01	8,88/ 62,16	0	62.16
2	Alimento 1: 10% A2R1+A2R2+A2R3	153,09	9,18/ 64,29	6.42	57.87
2	Alimento 2: 20% A3R1+A3R2+A3R3	155,98	9,35/ 65,51	13.10	52.41
3	0% A1+A2+A3 (Alimento Control)	159,63	9,57/ 67,04	0	67.04
3	Alimento 1: 10% A2R1+A2R2+A2R3	168,19	10,09/ 70,63	7.06	63.57

3	Alimento 2: 20% A3R1+A3R2+A3R3	169,69	10,18/ 71,26	14.25	57.01
4	0% A1+A2+A3 (Alimento Control)	170,14	10,20/ 71,45	0	71.45
4	Alimento 1: 10% A2R1+A2R2+A2R3	182,41	10,94/ 76,61	7.66	68.95
4	Alimento 2: 20% A3R1+A3R2+A3R3	193,58	11,61/ 81,3	16.26	65.04
5	0% A1+A2+A3 (Alimento Control)	183,73	11,02/ 77,16	0	77.16
5	Alimento 1: 10% A2R1+A2R2+A2R3	191,6	11,49/ 80,47	8.04	72.43
5	Alimento 2: 20% A3R1+A3R2+A3R3	218,17	13,09/ 91,63	18.32	73.31
6	0% A1+A2+A3 (Alimento Control)	197,42	11,84/ 82,91	0	82.91
6	Alimento 1: 10% A2R1+A2R2+A2R3	214,61	12,87/ 90,13	9.03	81.1
6	Alimento 2: 20% A3R1+A3R2+A3R3	229,82	13,78/ 96,52	19.30	77.22

**A1:** Control

**A2:** alimento 1 (10% *Dunaliella*),

**A3:** alimento 2 (20% *Dunaliella*)

**R1:** réplica 1

**R2:** réplica 2

**R3:** réplica 3

## 10. Análisis físico químicos del medio de cultivo de *Litopenaus vannamei*

### 10.1 Parámetros Físicos

#### 10.1.1 Oxígeno

A lo largo del experimento el oxígeno disuelto, dentro de las unidades experimentales se presentaron leves variaciones de 6,12 a 6,45 mg/L en la primera semana y de 6,12 a 6,74 mg/L en la segunda semana, en la tercera semana de 6,12 a 6,23 mg/L. Debido a que el rango mínimo de oxígeno que debe tener el cultivo es de 4 mg/l, se observa en la gráfica que el oxígeno tuvo rangos favorables todas las semanas de prueba; es decir el alimento en experimentación no provocó ninguna alteración química en el medio de cultivo que llegue afectar ese parámetro o amenazar la salud de los ejemplares (**Gráfico 7**).

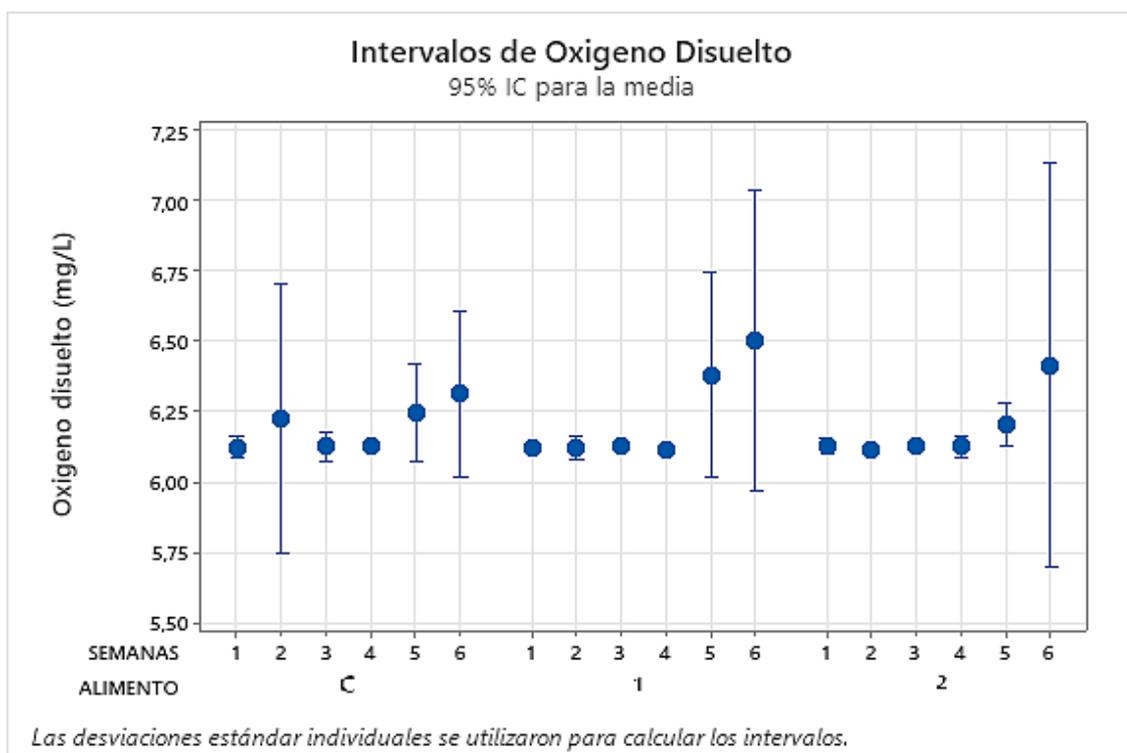
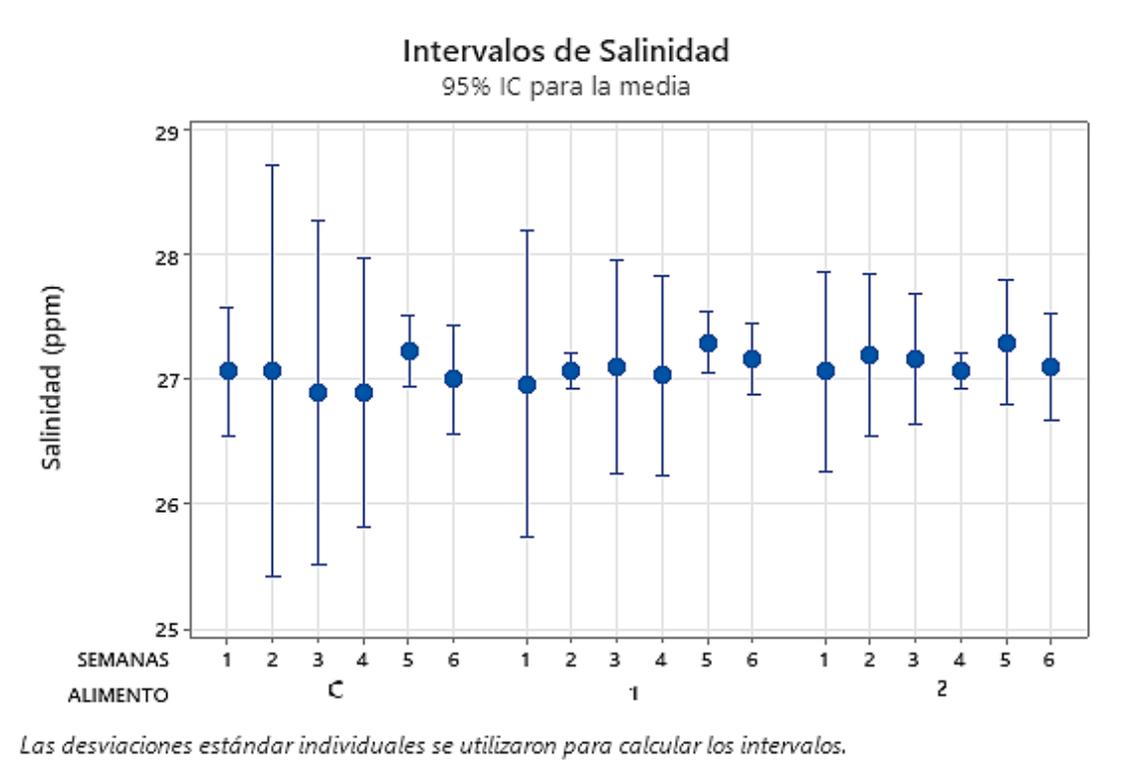


Gráfico 7: Parámetro oxígeno en la experimentación

### 10.1.2 Salinidad

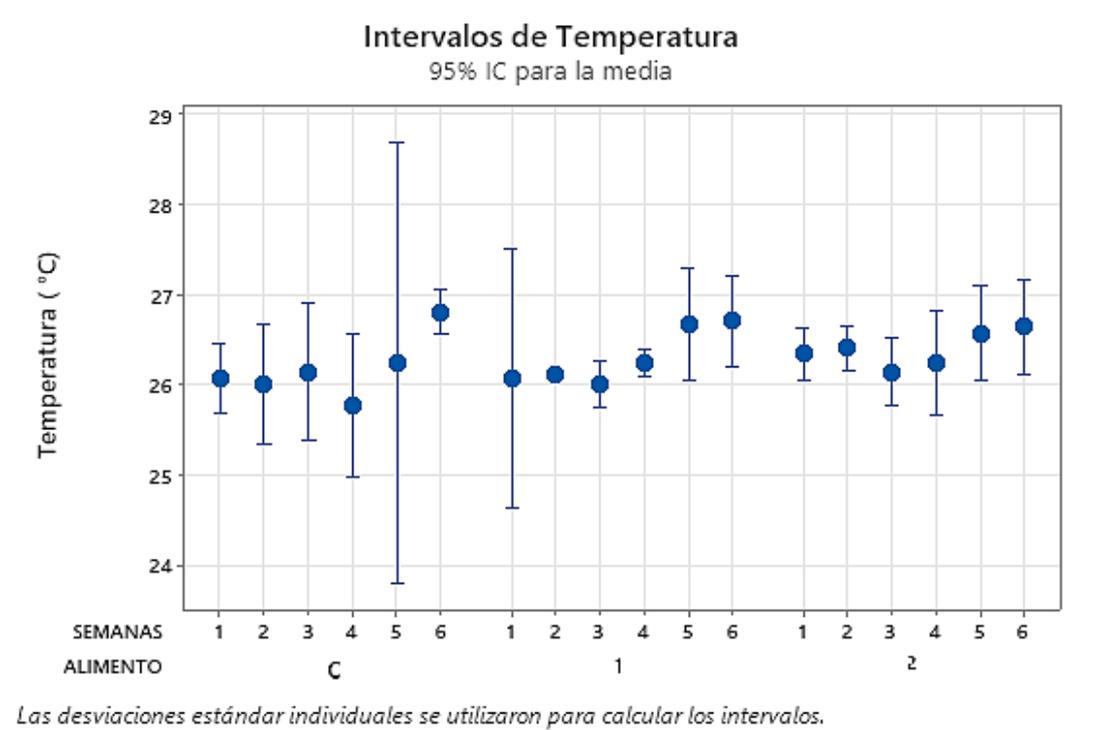
La salinidad obtuvo ligeras variaciones durante la experimentación registrándose la mayor salinidad a 27,2 ppt en la quinta semana del alimento 2 con 10% de biomasa de *Dunaliella spp.*, mientras que la menor salinidad en la cuarta y quinto semana con el empleo del alimento control. La escasa fluctuación de este parámetro es indicativa de que no ha existido alteraciones drásticas en la composición del medio que pueda alterar el estado del cultivo, a pesar del empleo de la biomasa de *Dunaliella sp.* como constituyente del alimento suministrado (**Gráfico 8**).



**Gráfico 8:** Parámetro salinidad en la experimentación

### 10.1.3 Temperatura

Entre los rangos de temperatura de las semanas en experimentación se mantuvieron con leves variaciones de  $26^{\circ}\text{C} \pm 5$ , existiendo un aumento de temperatura de casi un grado, en la quinta semana con  $26.7^{\circ}\text{C}$  con el empleo del alimento enriquecido con 20% de biomasa de *Dunaliella spp.* sin embargo, esta se mantiene en los rangos óptimos de  $23$  a  $30^{\circ}\text{C}$  para el cultivo de camarón, lo que deriva en una nula alteración en la calidad de los ejemplares (**Gráfico 9**).



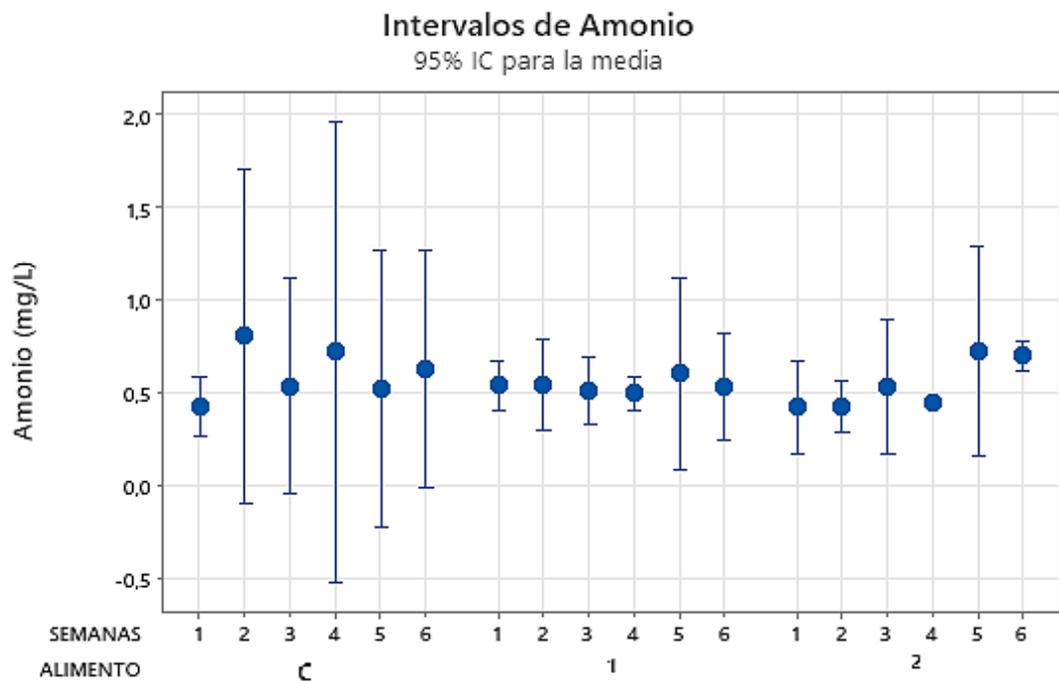
**Gráfico 9:** Parámetro temperatura en la experimentación

## 10.2 Parámetros Químicos

### 10.2.1 Amonio

El amonio es uno de los parámetros más importantes e imprescindibles de mantener, este factor podría convertirse en toxico e interferir en el buen funcionamiento del sistema inmunológico de los ejemplares, aumentando su susceptibilidad a patógenos.

En el **Gráfico 10** se presenta una gráfica de la escasa alteración que existió durante el tiempo de experimentación para este parámetro, se registran rangos menores de amonio en los experimentos 1 y 2 con 10% y 20% de biomasa de *Dunaliella spp.*, en contraste con el aumento de 1,20 y 1,30 mg/L de amonio durante el experimento 1 correspondiente al control.



Las desviaciones estándar individuales se utilizaron para calcular los intervalos.

**Gráfico 10:** Parámetro amonio registrado durante la experimentación con *L. vannamaei*

## 11.DISCUSIONES

El cultivo de *Dunaliella spp.*, se llevó a cabo en un periodo de nueve días, con un fotoperiodo de 12/12 luz oscuridad; se probó el crecimiento celular en medio Guillard F/2 y el fertilizante foliar Nitrofoska,

Se evidenció el mayor crecimiento celular de la microalga en el medio de cultivo Guillard F/2 con una densidad celular de  $189 \times 10^5$  cel/ml, a pesar de que no existió una diferencia marcada, si fue significativa entre estos dos medios, debido a que la densidad final para Nitrofoska fue de  $125 \times 10^5$  cel/ml; contrastando con el estudio realizado por (Colusse., et al, 2020) donde se probó medio de cultivo Conway, Johnson y Guillard F/2 durante 15 días, donde experimentaron un crecimiento favorable en el medio Conway llegando a  $229 \pm 5,29 \times 10^4$  cel/ml, mientras los cultivos con Guillard F/2 y Jonhson solo evidenciaron resultados de  $162 \pm 10,69$  y  $121 \pm 3,05 \times 10^4$  cel/ml..

Con respecto a la productividad celular en los cultivos (Colusse., et al, 2020) también reportan una producción de biomasa de  $0,25 \text{ g L}^{-1}$  para medio Conway, seguida de  $0,19 \text{ g L}^{-1}$  para medio F/2 y  $0,16 \text{ g L}^{-1}$  para Johnson, este estudio presenta un aumento en la productividad microalgal llegando a  $0,52 \text{ g L}^{-1}$  en medio Nitrofoska, el que por sí solo generó dicho resultado, sin embargo, en un estudio de

Arroussi, et al, 2015, menciona que para lograr resultados exponenciales en de *D. salina* y *D. tertiolecta* de 1.25 y 0.8 g L<sup>-1</sup> respectivamente empleó aditivos y hormonas.

Para inducción de estrés el presente estudio empleó longitudes de onda de 400  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  la una salinidad de 35 ppt con iluminación constante y el medio de cultivo desprovisto de nitrógeno. Usando este método de estrés se obtuvieron 5,57 mg/ml de carotenos en la muestra 1-2. Este resultado está relacionado con la coloración verde amarillenta de las células, lo que significa poca producción de carotenos.

Las células estresadas experimentaron cambios a nivel morfológico bajo condiciones de estrés, volviéndose esférica y perdiendo sus flagelos, estos cambios se presentaron 7 días después de la inducción a estrés, esto coincide con los datos presentados por Riahi H, Hejazi M, y Shariatmadari Z. (2022), mencionando que la morfología cambia inicialmente debido a la exposición a iluminación y salinidad, resultados similares para *D. salina* aislada de un marisma salino de Gave-Khooni, en donde se hicieron pruebas de estrés solo con concentraciones de salinidad de hasta 4 M (Hadi et al., 2018).

Riahi, H. Hejazi M, y Shariatmadari Z. (2022), reportan una cantidad máxima de carotenos de 2,78  $\mu\text{g/ml}$ , a partir de un cultivo de 2,5 M NaCl, pero bajo las mismas

condiciones, desprovistos de nitrógeno y a  $400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  la de iluminación, al igual que Hadi et al. (2018), quienes afirman que un incremento de NaCl 2,5 M en el medio favorece la biosíntesis de carotenoides, ambos estudios emplean metodologías de agotamiento de nutrientes, es decir las cepas son cultivadas a estas salinidades, hasta llegar al final de su fase exponencial, donde además son mantenidas a altas intensidades lumínicas y se inicia la fase de estrés para provocar carotenogenesis.

La disminución de concentración celular en fases de inducción a estrés son esperadas, debido a que las células se enfrentan a un medio extremo donde trata de sobrevivir y en su respuesta activa rutas metabólicas dando como resultado la producción de algunos compuestos entre ellos los carotenos (Benavente, J., et al 2016 y García, J., et al 2020), en base a lo el autor menciona esto se evidenció en el presente estudio ya que se detectó una disminución de la concentración celular desde el día de inducción a estrés, pasando de  $18.3 \times 10^5$  a  $15 \times 10^5$  en la réplica 1,  $16.3 \times 10^5$  a  $13.3 \times 10^5$  en la réplica 2 y  $17.6 \times 10^5$  a  $14.1 \times 10^5$  en la réplica 3.

Respecto a los análisis bioquímicos, de células estresadas presentan un 5,5% de cenizas, estos difieren con los demás estudios del mismo género de *Dunaliella*, en donde *Dunaliella viridis* y *D. bardawil*, se reportan con valores en cenizas de 23 y 23.7 %, esto se debe a que los valores reportados son de células en estado vegetativo, además siendo producidas a 3 M de salinidad (Vanita, A., et al, 2017 y Bombo, G., et al, 2023).

El contenido de fibra que posee *Dunaliella spp*, en este estudio es de 10,1 % mientras que para *Dunaliella viridis* es 9,06 % es decir los valores en ambos casos son similares (Bombo, G., et al, 2023). En general, las especies del género *Dunaliella* tienen un alto contenido de proteínas en relación a los lípidos y carbohidratos, como describe el estudio de (Khatoon, H., 2017), donde se encontró un total de 36,2% de proteína, mientras que los valores de lípidos se encontraron en 18,02 %, debido a que en este estudio no se realizó un análisis lipídico a la cepa, se presenta 8.2% de proteína.

Los resultados de los análisis bioquímicos proximales están relacionados con las condiciones de cultivo (García, J., 2017). En este estudio para el crecimiento vegetativo de la microalga se empleó salinidades de 35 ppt, mientras que para inducir a la carotenogénesis las condiciones de alta iluminación y deficiencia de nitrógeno, estimulan a la microalga a producir carotenoides, mientras que la producción de proteínas fue afectada negativamente (Leland S. Jahnke, A., y White, 2019 ; Zepeda, E., 2017), este argumento es compartido por Rismani, S., y Shariati, M., (2017), quienes obtuvieron mayores contenidos de lípidos para *Dunaliella salina* cultivada bajo estrés salino (3 M NaCl) asegurando que los valores de carotenos aumentan usando mayores concentraciones de NaCl. ,esto nos sugiere que para aumentar el porcentaje de carotenos o disminuir sus días de producción se debe emplear salinidades superiores a las normales.

Los resultados encontrados en este estudio con respecto a la dieta enriquecida con el 10% biomasa de *Dunaliella* estresada incorporada al balanceado comercial dio como resultado final un promedio de 7,14 g de los ejemplares de *L.vannamei* con un promedio de talla de 10.1 cm, mientras con la dieta enriquecida con el 20% de la biomasa estresada alcanzó un peso de 7,75 g en promedio del experimento, respecto al control. En cuanto a la talla, también se obtuvieron resultados favorables con el empleo de la dieta con adhesión de 20% de biomasa microalgal alcanzando un crecimiento de 10,4 cm; estos resultados los comparten Ibarra, E., y Proaño, J., 2017, quienes emplearon la *microalga* *Tetraselmis chuii* como alimento en harina a camarones *P. vannamei* juveniles, mejorando su crecimiento y su tasa de crecimiento específica. Para Akbari, P, et al, 2023 su mejor resultado se vio reflejado a 12% de biomasa estresada empleada, el autor sugiere que esto se debe a una rápida asimilación de las proteínas que posee la microalga.

González, M., et al (2020). destaca que los camarones *L. vannamei* que fueron alimentados con cantidades altas de harina de microalgas tuvieron un crecimiento ligeramente mayor que aquellos que poseían una alimentación control con harina de pescado, información respaldada con el presente estudio. Por su parte Allen, K, et al. (2019) y Kumar et al. (2018), observaron que la sustitución del aceite de pescado por harina de microalga *Schizochytrium sp.* y aceite vegetal aumentó el peso de los camarones y el valor nutricional del músculo del camarón. Por otra parte, un estudio realizado por López, et al, 2016, sugiere una respuesta inmune favorable en camarones infectados con el síndrome de la mancha blanca,

empleando solo 1% de esta biomasa microalgal rica en carotenos, obteniendo el 83% de la supervivencia en un cultivo de 30 días.

A pesar de que los valores de carotenos más altos fueron con 5.7 mg/ml y los de proteína 8.2 %, relativamente bajos frente a otros estudios, el alimento suministrado en este trabajo logró una mejoría notoria en el aumento del peso de los juveniles de *L. vannamei* al emplear 20% de biomasa de *Dunaliella spp* sometida a estrés, y ligero aumento favorable en talla a este mismo porcentaje de biomasa. Estos resultados, se debe a que la microalga del género *Dunaliella* no posee una pared celular rígida sino más bien una estructura frágil que se rompe fácilmente, esto aumenta la biodisponibilidad de los nutrientes que posee (Borowitzka, MA, 2018)., es decir, aunque los porcentajes sean menores a los reportados esto fueron bien asimilados por los ejemplares en experimentación.

Con este trabajo se demuestra la utilidad biotecnológica que presenta *Dunaliella spp* productora de carotenos sobre la alimentación de camarón *L. vannamei*. y queda como precedente que Santa Elena cuenta con microalgas con potencial para varias áreas, en este caso de la acuicultura, los cuales deben ser profundamente estudiados para lograr resultados que impacten la industria ecuatoriana.

## 12.CONCLUSIONES

*Dunaliella spp.*, se adaptó muy bien a los dos medios de cultivo Nitrofoska y Guillard F/2, sin embargo, se encontró una mejor concentración celular  $189 \times 10^5$  cel/ml y productividad celular de 0.07 en la cepa crecida en medio Guillard F/2.

Se estableció las condiciones de estrés para estimular la producción de carotenos en la cepa de *Dunaliella spp.*, a salinidad de 35 ppt, medio de cultivo desprovisto de nitrógeno e intensidad de luz de  $400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , para la obtención de hasta 5.7 mg/ml de carotenos, durante 20 días de estar sometida a estas condiciones.

Las dietas con el 20% de biomasa de *Dunaliella spp.*, enriquecida con carotenos, suministrada a *L. vannamei*, juveniles durante 6 semanas, fueron capaz de incrementar el peso 7.64 g y talla 10.4 cm de estos organismos, siendo más relevante la ganancia en peso logrado.

### **13.RECOMENDACIONES**

Se recomienda analizar otras variables en la optimización, tales como pH, temperatura, iluminación, concentración de fosfatos, vitaminas y/u otros nutrientes del medio de cultivo

Es conveniente comparar la producción de pigmentos en distintos volúmenes de producción.

Es recomendable cuantificar y cualificar el contenido de antioxidantes en las microalgas *Dunaliella spp.*, ya que presentan una alta actividad.

## 14.BIBLIOGRAFÍA:

Agudelo, E., (2020). Las microalgas como fuente de nutrientes en vías de desarrollo.

Obtenido de:

[https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/107312/1/Las\\_microalgas\\_como\\_fuente\\_de\\_nutrientes\\_en\\_vias\\_de\\_d\\_Agudelo\\_Rivera\\_Esteban.pdf](https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/107312/1/Las_microalgas_como_fuente_de_nutrientes_en_vias_de_d_Agudelo_Rivera_Esteban.pdf)

Akbari, P., Gholamhosseini, A., Ali, M., Aminikhoei, Z., Tavabe, K., Kuchaksaraei, B. (2023). Growth, Fatty Acid Composition, Antioxidant Activity and Resistance of *Litopenaeus vannamei* Fed with *Dunaliella salina*. *Irán J Sci* 47, 35–45. Recuperado de: <https://doi.org/10.1007/s40995-022-01396-1>.

Allen, K, Habte, T., Thompson, K, Tidwell, J., y Kumar, V. (2019). Freshwater microalgae (*Schizochytrium sp.*) as a substitute for fish oil for shrimp feed. 9, 6178. Recuperado de: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41020-8>

Arredondo-Vega, B.O., & Voltolina, D. (2007). Determinación de pigmentos por espectrofotometría. Métodos y Herramientas analíticas en la evaluación de biomasa microalgal. Editado por Bertha Olivia Arredondo Vega y Domenico Voltolina. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, cap. 7, p. 64-67.

Arroussi, H., Benhima, R., Bennis, H., El Mernissi, H., Wahby. (2015). Mejora del potencial de *Dunaliella tertiolecta* como fuente de biodiésel mediante tratamiento con auxinas acoplado al estrés salino *Renovar*. 77, págs. 15 - 19, [10.1016/j.renene.2015.12.010](https://doi.org/10.1016/j.renene.2015.12.010)

Avron M., Ben-Amotz A. (1992) *Dunaliella*: physiology, biochemistry, and biotechnology. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. ISBN-10: 084936647X.

- Ben-Amotz A. (1974) Osmoregulation mechanism in the halophilic alga *Dunaliella parva*. In: Membrane Transport in Plants (Eds.U. Zimmerman and J. Dainty), Springer-Verlag, BerlinHeidelberg-New York, pp. 95-100.
- Ben-Amotz A., Polle, J.E.W., Subba Rao D.V. (2009) The alga *Dunaliella*: biodiversity, physiology, genomics and biotechnology. Science Publishers, Enfield, NH, USA. ISBN, 9781578085453.
- Ben-Amotz, A. y Avron, M. (1983). On the Factors Which Determine Massive  $\beta$ -Carotene Accumulation in the Halotolerant Alga *Dunaliella bardawil*. Plant Physiology, 72(3), 593–597.
- Ben-Amotz, A., Katz, A. y Avron, M. (1982). Accumulation of  $\beta$ -carotene in halotolerant algae: purification and characterization of  $\beta$ -carotene-rich globules from *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae). J. Phycol., 18, 529–537
- Benavente, J., Aguilar, C., Contreras, J., Méndez, A., Montañez, J., (2016). Strategies to enhance the production of photosynthetic pigments and lipids in chlorophyceae species, Biotechnology Reports, Volume 10, Pages 117-125, ISSN 2215-017X, <https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.04.001>.
- Bombo G., Cristofoli, N., Santos T., Schuler L., Maia I, Pereira H., Barreira L., Varela J. (2023). *Dunaliella viridis* TAV01: una microalga halotolerante y rica en proteínas de la costa del Algarve. 13 (4), 2146; <https://doi.org/10.3390/app13042146>
- Borovkov, A, Gudvilovich,N., Memetshaeva, A., Avsiyan,L., Lelekov, A, y Novikova, M. (2019). Morphological and morphometrical features in *Dunaliella salina* (chlamydomonadales, dunaliellaceae) during the two-phase cultivation mode. Ecologica montenegrina, 22, 157–165. doi:10.37828/em.2019.22.12

- Borowitzka M.A., Siva C.J. (2017). The taxonomy of the genus *Dunaliella* (Chlorophyta, Dunaliellales) with emphasis on the marine and halophilic species. *Journal of Applied Phycology*, 19 (5), pp. 567-590.
- Borowitzka, L.J. (1981) 4. The microflora. Adaptations to life in extremely saline lakes. *Hydrobiologia*, 81 (1), pp. 33–46.
- Borowitzka, M. A. y Hallegraeff, G. (2007). Economic importance of algae. In *Algae of Australia* (pp. 594–622). Canberra: ABRS.
- Borowitzka, MA (2018). Biología de Microalgas. En *Microalgas en Salud y Prevención de Enfermedades*; Elsevier: Ámsterdam, Países Bajos; págs. 109–131. ISBN 978-0-12-811405-6.
- Britton, G. (1998). Overview of Carotenoid Biosynthesis. En: *Carotenoids*, vol. 3, *Biosynthesis and Metabolism*, ed. G. Britton, S. Liaaen-Jensen y H. Pfander, 13-147.
- Colusse GA, Mendes CRB, Duarte MER, Carvalho JC, Noseda MD. (2020). Effects of different culture media on physiological features and laboratory scale production cost of *Dunaliella salina*. *Biotechnol Rep (Amst)*. doi: 10.1016/j.btre.2020.e00508. PMID: 32775232; PMCID: PMC7399117.
- Coutteau P, (1996) *Manual on the production and use of live food for aquaculture: Micro-Algae*. FAO Fisheries Technical Paper 361, Rome.
- Del Campo J., Moreno J, Rodríguez H, Vargas M., Rivas J, Guerrero M. (2000) Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis* sp. (Chlorophyta). *J Biotechnol*. Jan 7;76(1):51-9. doi: 10.1016/s0168-1656(99)00178-9. PMID: 10784296.

- Ezquerro, B., Josafat, M., & Chan, H., Jesús, E. (2021). Capacidad antioxidante y mecanismo de acción de los pigmentos en organismos marinos. *CienciaUAT*, 15 (2), 186-197. Epub 2021 14 de abril. <https://doi.org/10.29059/cienciauat.v15i2.1501>
- García González, M., Moreno, J., Manzano, J. C., Folrencia, F. J. y Guerrero, M. G. (2005). Production of *Dunaliella salina* biomass rich in 9-cis- $\beta$ -carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor. *Journal of Biotechnology*, 115(1): 81-90
- García, J., López, José, Medina, D., García, N. y Fimbres, D. (2020). Efecto del estrés por nitrógeno y salinidad en el contenido de  $\beta$ -caroteno de la microalga *Dunaliella tertiolecta*. *Biocencia*, 22(2), 13-19. <https://doi.org/10.18633/biocencia.v22i2.1241>
- García, J., Pavía, M., García T., Chirivella, J., y Serrano, A. (2017). Principles of Biotechnology and Bioengineering in microalgae cultures: importance, technological problems, culture types and systems, growth, limiting factors, selection, isolation, grading and biochemical characterization. *Nereis. Revista Iberoamericana Interdisciplinar de Métodos, Modelización y Simulación*. Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir. 115-130, ISSN: 1888-8550.
- García, T., y Carrillo, O., (2010). Nutrición del camarón blanco *Litopenaeus schmitti*. Universidad de la Habana.
- García-González, M., Moreno, J., Cañavate, J. P., Anguis, V., Prieto, a., Manzano, C. y Guerrero, M. G. (2003). Conditions for open-air outdoor culture of *Dunaliella salina* in southern Spain. *Journal of Applied Phycology*, 15(2-3), 177–184.
- Ginzburg M. (1988) *Dunaliella*: A Green Alga Adapted to Salt. *Advances in Botanical Research*, 14 (C), pp. 93-183. 26

- González, A., (2015). ¿Qué son las microalgas? interés y uso. Cajamar. Obtenido de:  
<https://www.cajamar.es/storage/documents/microalgas-1444391623-ca345.pdf>
- González, M., Davisb, A., Tzachi S., Morris, T., Pérez W.l., (2020). Fish oil replacement in plant-based diets for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*. 309, 152–158
- Guillard, R. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. 29-60. En: M.L. Smith y M.H. Chanley (Ed.). *Culture of Marine Invertebrates Animals*. Plenum Press, New York. 338 p.
- Hadi, M.R., Shariati, M. and Afsharzadeh, S., 2018. Microalgal biotechnology: Carotenoid and glycerol production by the green algae *Dunaliella* isolated from the Gave-Khooni Salt Marsh, Iran. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 13(5), 540. DOI:10.1007/s12257-007-0185-7
- Hanel R, Broekman D, Graaf S, Schnack D (2007) Partial replacement of fishmeal by lyophilized powder of the microalgae *Spirulina platensis* in Pacific white shrimp diets. *Open Mar Biol J* 1:1–5
- Hasan R, Chakrabarti R. (2009) Use of algae and aquatic macrophytes as feed in small scale aquaculture: a review. *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper*. No. 531, Rome
- Hu, Q. (2013). Environmental Effects on Cell Composition. En *Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology* (p. 719).
- Ibarra, E., y Proaño, J. (2017). Evaluación de poblaciones con biofloc y diferentes niveles de proteína en cultivo de camarón *Penaeus vannamei*. 45 *AcuaCuba* Vol.19, N0 2 (41-48).Obtenido en: <https://www.researchgate.net/profile/Jonathan-Proano->

Morales/publication/342672329\_Evaluacion\_de\_poblaciones\_con\_biofloc\_y\_dif  
erentes\_niveles\_de\_proteina\_en\_cultivo\_de\_camaron\_penaeus\_vannamei\_evalua  
tion\_of\_populations\_with\_biofloc\_and\_different\_levels\_of\_protein\_in\_shrimp\_c  
ultivati/links/5effe920a6fdcc4ca44b50e8/evaluacion-de-poblaciones-con-biofloc-  
y-diferentes-niveles-de-proteina-en-cultivo-de-camaron-penaeus-vannamei-  
evaluation-of-populations-with-biofloc-and-different-levels-of-protein-in-shrimp-  
cultivati.pdf

Ju Z, Deng F, Dominy W. (2012) A defatted microalgae (*Haematococcus pluvialis*) meal as a protein ingredient to partially replace fishmeal in diets of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931). *Aquaculture* 354–355:50–55

Khan, M. I., Shin, J. H., & Kim, J. D. (2018). The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microbial cell factories*, 17(1), 1-21.

Khaton, H.; Haris, N.; Banerjee, S.; Rahman, N.A.; Begum, H.; Mian, S.; Abol-Munafi, A.B.; Endut, A. (2017). Effects of different salinities on the growth and proximate composition of *Dunaliella spp.* isolated from South China Sea at different growth phases. *Process. Saf. Environ. Prot.*, 112, 280–287.

Kim, G., Mujtaba, G., y Lee, K. 2016. Effects of nitrogen sources on cell growth and biochemical composition of marine chlorophyte *Tetraselmis sp.* for lipid production. *Algae*, 31(3), 257-266

Kumar, V., (2018). Replacement of fish oil with Schizochytrium meal and its impacts on growth and lipid metabolism of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture nutrition*. 24, 1769–1781.

- Lamers, P., Van de Laak, C., Kaasenbrood, P., Lorier, J., Janssen, M., De Vos, R. y Wijffels, R. (2010). Carotenoid and fatty acid metabolism in light-stressed *Dunaliella salina*. *Biotechnology and bioengineering*, 106(4): 638-648.
- Lamers, P., Janssen, M., De Vos, R., Bino, R. y Wijffels, R. (2012). Carotenoid and fatty acid metabolism in nitrogen-starved *Dunaliella salina*, a unicellular green microalga. *J. Biotechnol.*, 162 (1), 21-27.
- Leland S. Jahnke, A., y White L., (2019). Long-term hyposaline and hypersaline stresses produce distinct antioxidant responses in the marine alga *Dunaliella tertiolecta*. *Journal of Plant Physiology*, Volume 160, Issue 10. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-01068>.
- Lichtenthaler y Buschaman, (2001). Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. Supplement 1 F4.3.1-F4. 3.8.
- López, J., Medina, F., Campa, Ángel., Martínez, Luis., Hernández, J., Mendoza, J., Rivas, M. (2016) Optimización de la supervivencia y respuesta inmune de *Litopenaeus vannamei* alimentado con dietas ricas en carotenos y mejora con el síndrome de mancha blanca. *Revista Latinoamericana de investigaciones acuáticas* 44(2), 305-312. DOI: 10.3856/vol44-issue2-fulltext-11
- March, J. & C. Pringle. (2003). Food web structure and basal resource utilization along a Tropical Island stream continuum, Puerto Rico. *Biotropica*, 35-1: 84-93.
- Meyers, S.P. and T. Latscha. 1997. Carotenoids in crustacean nutrition. In *Crustacean Nutrition: Advances in World Aquaculture*, Vol. 6. (D. Abramo, D. Conklin and D. Ageuyama, eds.) World Aquaculture Society: 164-193, Baton Rouge, Louisiana

- Nagarajan, D., Varjani, S., Lee, D.-J., & Chang, J.-S. (2021). Sustainable aquaculture and animal feed from microalgae – Nutritive value and techno-functional components. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 150,111549. doi: 10.1016/j.rser.2021.111549
- Polle, J, Roth, R., Ben-Amotz, A. y Goodenough, U. (2020). Ultrastructure of the green alga *Dunaliella salina* strain CCAP19/18 (Chlorophyta) as investigated by quick-freeze deep-etch electron microscopy. *Investigación de algas*, 49, 101953. doi: 10.1016/j.algal.2020.101953
- Pourkarimi, S., Ahmad Hallajisani, Asghar Alizadehdakhel, Amideddin Nouralishahi, Abooali Golzary (2020). Factors affecting production of beta-carotene from *Dunaliella salina* microalgae, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, Volume 29,101771, ISSN 1878-8181, <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101771>.
- Riahi H, Hejazi M, Shariatmadari Z. (2022). Optimization of  $\beta$ -carotene production by an indigenous isolate of *Dunaliella salina* under salinity-gradient stress Salehipour-Bavarsad F. 1, *Journal of Fisheries Sciences* 21(1) 235-246 DOI: 10.22092/ijfs.2022.125929.
- Richmond, A., (2004). *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Science Ltd a Blackwell Publishing company. Obtenido de: <https://alगतex.org/ebook/Handbook%20of%20microalgal.pdf>
- Rismani, S.; Shariati, M. (2017). Cambios en el contenido total de lípidos y ácidos grasos omega-3 en dos microalgas *Dunaliella Salina* y *Chlorella Vulgaris* bajo estrés salino. *Brasil. Arco. Biol. Tecnología*, 60

- Rodríguez-Concepcion, M., & Stange, C. (2013). Biosynthesis of carotenoids in carrot: an underground story comes to light. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 539(2), 110-116. Doi: 10.1016/j.abb.2013.07.009.
- Romero., S. (2019). “Abundancia del género *Dunaliella* en relación al gradiente salino de las evaporadoras de ecuasal de agosto a diciembre (época seca)”. USPSE. Obtenido de: <https://repositorio.upse.edu.ec/handle/46000/5939>
- Salguero, A., de la Morena, B., Vigar, J., Vega, J. M., Vilchez, C. y León, R. (2003). Carotenoids as protective response against oxidative damage in *Dunaliella bardawil*. *Biomolecular Engineering*, 20(4-6), 249-253.
- Sánchez-Saavedra, M. P., Jiménez, C. y Figueroa, F. L. (1996). Variable fluorescence of chlorophyll a in *Dunaliella bardawil* with different  $\beta$ -carotene content. *Scientia Marina*, 60(1), 227–231.
- Serpa, R., y Calderón A., (2002). Efecto del estrés por salinidad en cuatro cepas de *Dunaliella salinateod*. en el Perú. revista la molina-perú. issn 1726-2216
- Sy, C., Dangles, O., Borel, P., and Caris-Veyrat, C. (2015). Interactions between carotenoids from marine bacteria and other micronutrients: impact on stability and antioxidant activity. *Marine Drugs*. 13(11): 7020-7039.
- Teodoresco, E. (1905). Organización y desarrollo de *Dunaliella*, nuevo género de Volvocacée - Polyblepharidée. Beihefte zum Botanischen Centralblatt 18 (Abt. 1): 215-232.
- Vanita, A.; Narayan, MS; Murthy, KNC; Ravishankar, GA (2017). Estudio comparativo de la composición lipídica de dos algas

halotolerantes, *Dunaliellabardawil* y *Dunaliellasalina* . En t. J. ciencia de los alimentos. Nutrición, 58, 373–382.

Vetchel, B., Eichenberger, W. y Ruppel, H.G. (1992). Lipid bodies in *Eremosphaera viridis* De Bary (Chlorophyceae). Plant Cell Physiol., 33, 41-48.

Yaakob Z, Ali E, Zainal A, Mohamad M, Takriff MS (2014). An overview: biomolecules from microalgae for animal feed and aquaculture. J Biol Res; 21:6

Yamada, S., Y. Tanaka, M. Sameshima, and Y. Ito. 1990. Pigmentation of prawn (*Penaeus japonicus*) with carotenoids. 1. Effect of dietary astaxanthin, betacarotene and canthaxanthin on pigmentation. Aquaculture 87: 323-330.

Zepeda, E. (2017). Crecimiento e inducción a la carotenogénesis de la microalga *Dunaliella spp.* en diferentes condiciones de cultivo. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE).  
Obtenido de:  
<https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/1261/3/TESIS%20FINAL%20COMPLETA%20Enrique%20Zepeda.pdf>

## 15.ANEXOS:



**Ilustración 4:** Inicio de la inducción a estrés *Dunaliella* spp

**Fuente:** El autor



**Ilustración 3** 5 Días de someter bajo estrés a *Dunaliella* spp.

**Fuente:** El autor.



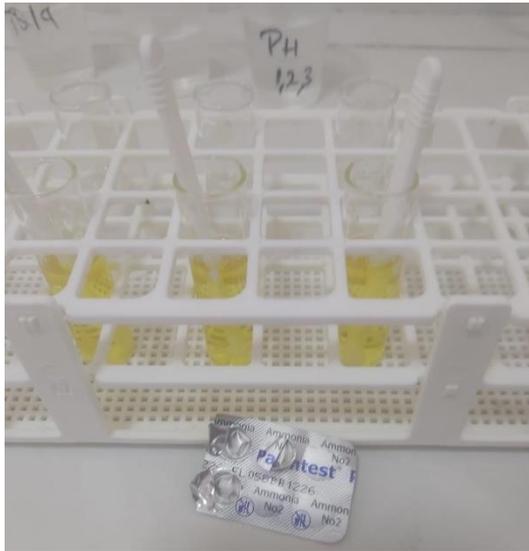
**Ilustración 6:** Día 10 de estrés *Dunaliella* spp.

**Fuente:** El autor.



**Ilustración 5:** Día 20 de estrés *Dunaliella* psp.

**Fuente:** El autor.



**Ilustración 8:** Medición de parámetros físico-químicos durante el cultivo

**Fuente:** El autor.



**Ilustración 7:** Pesaje de muestras *L. vannamei*

**Fuente:** El autor.



**Ilustración 9:** Alimento con 10% de *Dunaliella spp.* - Inicio del experimento

**Fuente:** El autor



**Ilustración 10:** Control- Inicio del experimento

**Fuente:** El autor



**Ilustración 11:** Alimento con 20% *Dunaliella spp* de. - Inicio de experimentación

**Fuente:** El autor



**Ilustración 12:** Control-Final de la experimentación

**Fuente:** El autor



**Ilustración 14:** Alimento con 10% de *Dunaliella spp*- Final de experimentación

**Fuente:** El autor



**Ilustración 13:** Alimento con 20% de *Dunaliella spp.* - Final de experimentación.

**Fuente:** El autor