



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

TEMA:

“Evaluación de *Dunaliella spp.* enriquecida con carotenos como alimento para larvas de camarón *Litopenaeus vannamei* de Nauplio V a post-larva 1”

TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Previa a la obtención del Título de:

BIÓLOGO

AUTORA:

FÁTIMA BEATRIZ QUIMÍ GONZABAY

TUTOR:

Ing. JIMMY AGUSTÍN VILLÓN MORENO, MSc

LA LIBERTAD – ECUADOR

2024

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

“EVALUACIÓN DE *Dunaliella* spp.
ENRIQUECIDA CON CAROTENOS COMO
ALIMENTO PARA LARVAS DE CAMARÓN
Litopenaeus vannamei DE NAUPLIO V A POST-
LARVA 1”

TRABAJO DE INTEGRACIÓN
CURRICULAR

Previa a la obtención del Título de:

BIÓLOGO

AUTORA:

FÁTIMA BEATRIZ QUIMÍ GONZABAY

TUTOR:

Ing. JIMMY AGUSTÍN VILLÓN MORENO, MSc.

LA LIBERTAD – ECUADOR

2024

DECLARACIÓN DEL DOCENTE TUTOR

En mi calidad de Docente Tutor del Trabajo de Integración Curricular, “Evaluación de *Dunaliella spp.* enriquecida con carotenos como alimento para larvas de camarón *Litopenaeus vannamei* de Nauplio V a post-larva I”, elaborado por FÁTIMA BEATRIZ QUIMI GONZABAY, estudiantes de la Carrera de Biología, Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Península de Santa Elena, previo a la obtención del título de Biólogo, me permito declarar que luego de haber dirigido su desarrollo y estructura final del trabajo, este cumple y se ajusta a los estándares académicos, razón por la cual, apruebo en todas sus partes, encontrándose apto para la evaluación del docente especialista.

Atentamente



Ing. Jimmy Agustín Villón Moreno, MSc

DOCENTE TUTOR

C.I0913270153

DECLARACIÓN DEL DOCENTE DE ÁREA

En mi calidad de Docente Especialista, del Trabajo de Integración Curricular “Evaluación de *Dunaliella spp.* enriquecida con carotenos como alimento para larvas de camarón *Litopenaeus vannamei* de Nauplio V a post-larva I”, elaborado por **Quimi Gonzabay Fátima Beatriz**, estudiantes de la Carrera de Biología, Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Península de Santa Elena, previo a la obtención del título de Biólogo, me permito declarar que luego de haber evaluado el desarrollo y estructura final del trabajo, éste cumple y se ajusta a los estándares académicos, razón por la cual, declaro que se encuentra apto para su sustentación.

Atentamente



Blga. Janeth Galarza Tipán Ph.D.
DOCENTE DE ÁREA
C.I. 10201234044

AGRADECIMIENTO

Agradezco a la Universidad Estatal Península de Santa Elena, a las autoridades, docentes de la Facultad de ciencias de mar por liderar el proceso de formación profesional.

En particular a Ing. Jimmy Villón Moreno tutor de tesis, por su invaluable apoyo, orientación y tiempo dedicado a lo largo de este proceso. Sus ideas innovadoras y profundos conocimientos han sido fundamentales para el desarrollo y culminación de este trabajo.

A la Doctora Janeth Galarza por abrirme las puertas de su laboratorio e impartirme conocimiento en relación con mi tesis agradezco su paciencia y compromiso, así como la confianza depositada en mí.

DEDICATORIA

A Dios y la Virgen María por ser mi guía durante todo el proceso académico. Su presencia me ha dado paciencia y sabiduría, para enfrentar y superar desafíos, permitiendo avanzar con fe y determinación mi carrera.

A mis padres Wider Quimí Quimí y Leticia Gonzabay quiero dedicarles un agradecimiento especial ustedes que han sido pilares fundamentales durante toda la carrera. Su amor incondicional ha sido base para construir mis logros académicos. A mis hermanas Damarys, Erika y Dayana por tenerme paciencia, especialmente a mi mascota martial por ser mi apoyo emocional

Al personal del Laboratorio de larvas Santa María por brindarme su apoyo en la ejecución práctica de mi tesis.

Fátima Beatriz Quimí Gonzabay

TRIBUNAL DE GRADO

Trabajo de Integración Curricular presentado por **Quimí Gonzabay Fátima Beatriz** como requisito parcial para la obtención del grado de Biólogo/a de la Carrera de Biología, Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Estatal Península de Santa Elena.

Trabajo de Integración Curricular **APROBADO** el: 17 de Julio del 2024.



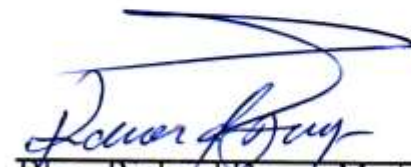
Ing. Jimmy Villón Moreno, MSc
DIRECTOR DE CARRERA
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL



Blga. Janeth Galarza Tipán Ph.D.
PROFESOR DE ÁREA
MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Ing. Jimmy Villón Moreno, MSc
DOCENTE TUTOR
MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Blgo. Richard Duque Marin, Mgt.
DOCENTE GUÍA DE LA UIC II
MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Lic. Pascual Roca Silvestre, MSc.
SECRETARIO/A DEL TRIBUNAL

DECLARACIÓN EXPRESA

Yo, **Fátima Beatriz Quimi Gonzabay**, declaro que la responsabilidad de las ideas, contenido y análisis de resultados en este Trabajo de Integración Curricular, me pertenecen en exclusividad y el patrimonio intelectual del mismo le corresponde, a la Universidad Estatal Península de Santa Elena (UPSE).



Fátima Beatriz Quimi Gonzabay

C.I: 0928508506

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	5
3. JUSTIFICACIÓN	7
4. OBJETIVOS	8
4.1 Objetivo General	8
4.2 Objetivos específicos.....	8
5 HIPÓTESIS	9
6. MARCO TEÓRICO.....	10
6.2 Descripción de cultivo fases	10
6.3 Medios de cultivo Guillard's F/2 (Medio F/2).....	10
6.4 Microalga <i>Dunaliella spp.</i>	12
6.5 Fórmula para el conteo celular:	13
6.6 Curva de crecimiento de <i>Dunaliella spp.</i> para cultivos pequeños - masivos	13
6.7 Carotenos producidos por microorganismos	15
6.8 Características de <i>Dunaliella spp.</i> estresada para la producción de carotenos.....	15
6.9 Pigmentos totales	16
6.10 Carotenos aplicados en la acuicultura.....	18
6.11 DESCRIPCIÓN DE LARVAS DE CAMARÓN <i>Litopenaeus vannamei</i>	18
6.11.1 Descripción del sistema de cultivo intensivo	18
6.11.2 Características de los estadios larvarios.....	19
6.11.3 DESCRIPCIÓN DE DIETAS DE LOS ESTADIOS	25
6.11.4 DATOS REFERENCIAL:.....	26
6.11.5 VARIABLES QUÍMICAS.....	27
6.11.6 VARIABLES FÍSICAS.....	30
6.12 ANALISIS ESTADISTICOS	33
7. METODOLOGÍA	34
7.1 Tipo de investigación	34

7.1.1 Metodología experimental:.....	34
7.2 FASE DE LABORATORIO PARA MICROALGAS.....	35
7.2.1 Producción de la Biomasa de <i>Dunaliella spp</i>	35
7.2.2 Factor de estrés en cultivo Masivo de 1 tonelada.	36
7.2.3 Protocolo para la obtención de carotenos de <i>Dunaliella spp.</i>	38
7.3 FASE DE LABORATORIO DE LARVAS DE CAMARÓN	41
7.3.1 DISEÑO DEL ESTUDIO.....	42
7.3.2 DESCRIPCIÓN DE LOS ESTADIOS LARVARIOS: NAUPLIO V A POST-LARVA 1.....	43
7.3.3 MÉTODO PARA OBSERVACIONES MICROSCOPICAS:.....	44
7.3.4 MEDICIÓN DE LONGITUD TOTAL DE <i>L. vannamei</i>	45
7.3.5 INDICE DE DESARROLLO LARVARIO.....	47
7.3.6 PROTOCOLO PARA CAROTENOS DE LARVA DE CAMARÓN y ARTEMIA	47
8. RESULTADOS.....	49
10. DISCUSIONES.....	69
10. CONCLUSIONES	74
11. RECOMENDACIONES	75
12. BIBLIOGRAFÍA	76
13. ANEXOS	85

ÍNDICE DE GRAFICAS

Grafica 1 y 2. Curva de crecimiento Para el cultivo de microalga <i>Dunaliella spp</i>	15
Grafica 3. Concetración de carotenos en relación a los bioensayos realizados.....	50
Grafica 4. Correlación de caroteno y temperatura según los días de experimentación y bioensayos.....	51
Grafica 5. Línea ajustada de caroteno según los días de experimentación y bioensayos ..	53
Grafica 6. Índice de desarrollo larval de <i>Thalassiosira</i> (T)y <i>Dunaliella spp</i> (D)	54
Grafica 7. Relación del índice de desarrollo larval y las corridas de las microalgas en la experimentación	55
Grafica 8. A y b Concentración celular de microalgas VS supervivencia de <i>Litopenaeus vannamei</i>	57

Grafica 9. Longitud de los estadios de <i>Litopenaeus vannamei</i> con cada microalga, caja de bigotes de cada estadio de camarón según las especies de microalgas evaluadas	60
Grafica 10. Longitud en los estadios nauplio, zoea mysis y post-larva de todos los bioensayos realizados por especies de microalgas	61
Grafica 11. Longitud de los camarones en sub estadio de zoea y mysis de todos los bioensayos realizados.....	62
Grafica 12 Longitud de cada especie y su repetición según cada ensayo según su longitud en el estadio de postlarva	63
Grafica 14. Caja de bigotes de la longitud de las especies <i>Dunaliella</i> spp y <i>Thalassiosira</i> sp en el estadio Post-larva	66
Grafica 14 Longitud y concentración de caroteno de cada especie	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Observación de <i>Dunaliella</i> spp. objetivo 40x.....	12
Figura 2: Conteo en cámara de Neubauer de acuerdo al tamaño de las células microalgales	13
Figura 3: Cambios morfológicos de especies de <i>Dunaliella</i> bajo condiciones estresantes	14
Figura 4. Esquema del sistema de cultivo de 1 tonelada a) líneas de aireación b) líneas de calefacción	18
Figura 5. Observación de Nauplio V en el microscopio	19
Figura 6. Observación de Zoea 1 en el microscopio.....	21
Figura 7. Observación de Zoea 2 en el microscopio.....	21
Figura 8. Observación de Zoea 3 en el microscopio.....	22
Figura 9 Observación de Mysis 1 en el microscopio	23
Figura 10 Observación de Mysis 2 en el microscopio	23
Figura 11 Observación de Mysis 3 en el microscopio	23
Figura 12. Observación de Post-larva en el microscopio.....	24
Figura 13. pH en larvas de camarón en los 6 bioensayos realizados	26
Figura 14. OD (mg/l) en larvas de camarón en los 6 bioensayos realizados.....	26
Figura 15. NH ₄ (mg/l) en larvas de camarón en los 6 bioensayos realizados.....	29
Figura 16. Salinidad (ppt) en larvas de camarón en los 6 bioensayos realizados.....	30
Figura 17. Temperatura en larvas de camarón en los 6 bioensayos realizados	31

Figura 18. Fase de cultivo de microalga de <i>Dunaliella</i> spp en medio de cultivo Guillard f/2.....	34
Figura 19. Mapa de Santa Elena y Laboratorio de larvas Santa María	41
Figura 20. Diseño experimental figura a) tanques de 1 tonelada cepa de origen natural (2 réplicas) (2 réplicas) b) tanques de 1 tonelada (2 réplicas) alga comercial (<i>Thalassiosira</i>);	43
Figura 21. Observacionesmicroscopicas.....	42
Figura 22 Programa Windows Download ImageJ bundled with 64-bit Java 8. Instructions a. longitud total para programar: b. longitud media requerida y c. objetivo micrómetro..	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Fertilizantes de medio de cultivo Guillard F/2 para algas clorofitas	11
Tabla 2. Calcular la Fase exponencial del crecimiento de la microalga <i>Dunaliella</i> sp para poder cuantificar el número de células/ml.....	36
Tabla 3. Observaciones microscópicas y características morfológicas de cada día de estrés de s de la microalga <i>Dunaliella</i> spp. con 5 días de estrés	37
Tabla 4 referencial. Mediciones de larvas de camarón en los estadios de nauplio hasta post-larva.	45
Tabla 5 referencial de mediciones de larvas de camarón Fuente: FAO, 2016: (Treece, 1930)	46
Tabla 6. se detalla los valores asignados en cada fase del desarrollo larval.....	47
Tabla 7. Detalles de los bioensayos realizados según la temperatura y concentración de..... caroteno obtenidos dentro de los 5 días de experimentación	49
Tabla 8. Detalles de la supervivencia de post-larva en cada uno de los bioensayos	56
Tabla 9. Detalles de la concentración celular de cada uno de los bioensayos.....	56
Tabla 10. Criterios de observación de contenido intestinal	58
Tabla 11. Medidas de tendencia central de las repeticiones de las especies de las microalgas del estadio de post-larva en los seis bioensayos	65
Tabla 12. Valores de carotenos de cada uno de los tratamientos en $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	66

ÍNDICE DE ANEXO

Anexo. 1. Correlación de Pearson de los parámetros de temperatura y concentración de caroteno de las microalgas	85
Anexo. 2 Pruebas estadísticas de comparación y contraste del índice de desarrollo larvario entre las especies y repeticiones de experimentación	85
Anexo. 3 Pruebas estadísticas para la comparación y contraste de la longitud de estadios y especies	86
Anexo. 4 Pruebas estadísticas para la comparación y contraste de la longitud de estadio de Post-larva y especies	86
Anexo. 5 Prueba de homogeneidad Levene IDL	86
Anexo. 6 Correlación de Pearson de los parámetros de longitud y concentración de caroteno para el estadio de Post-Larva	86
Anexo. 7 Tablas 11 de los criterios de observaciones microscópicas	87
Anexo. 8 Tablas 12 de los criterios de observaciones microscópicas	87
Anexo. 9 Tablas 13 de los criterios de observaciones microscópicas	88
Anexo. 10 Tablas 14 de los criterios de observaciones microscópicas	89
Anexo. 11 Tablas 15 TABLA DE ALIMENTACIÓN	90
Anexo. 12 Tablas general de supervivencia de <i>Litopenaeus vannamei</i>	88
Anexo. 14 Medias muestrales de los 6 bioensayos realizados por tratamientos en estadios de Nauplio	88
Anexo. 14 Medias muestrales de los 6 bioensayos realizados por tratamientos en estadios de Zoea 1	92
Anexo. 15 Medias muestrales de los 6 bioensayos realizados por tratamientos en estadios de Zoea 2	92
Anexo 15. Medias muestrales de los 6 bioensayos realizados por tratamientos en estadios de Zoea 3	92
Anexo.17 Medias muestrales de los 6 bioensayos realizados por tratamientos en estadios de Mysis 1	92
Anexo 18. Medias muestrales de los 6 bioensayos realizados por tratamientos en estadios de Mysis 2	91
Anexo 19. Medias muestrales de los 6 bioensayos realizados por tratamientos en estadios de Mysis 3	92
Anexo 20. Concentración celular de microalgas	93
Anexo 21. Tabla de media, máximos y mínimos de los estadios de nauplio a post-larva de todo los bioensayos	94

Anexo 22 Cultivo de la microalga <i>Dunaliella</i> spp	103
Anexo 23 Líneas de aireación de tanques de cultivo	103
Anexo 24 Tanques de cultivos 4 experimentales de 1 tonelada 2 con <i>Dunaliella</i> y 2 con <i>Thalassiosira</i>	103
Anexo 25 Repiques de microalgas en 1 tonelada	103
Anexo 26 Lectura de las ABS	104
Anexo 27 Conteo celular de <i>Dunaliella</i> spp.	104
Anexo 28 Observaciones de días de estrés de microalga <i>Dunaliella</i> spp.	104
Anexo 29 Extracción de carotenos	104
Anexo 30 Resultado de protocolo de extracción de carotenos	105
Anexo 31 DIA 1 tanque de 1 tonelada para estrés.....	106
Anexo 32 DIA 2 tanque de 1 tonelada para estrés.....	106
Anexo 33 DIA 4 tanque de 1 tonelada para estrés.....	107
Anexo 34 DIA 3 tanque de 1 tonelada para estrés.....	107
Anexo 35 DIA 5 tanque de 1 tonelada para estrés.....	108

GLOSARIO

Microalga: Organismos de diferentes variedades o linajes de microalgas aisladas que han sido cultivadas para la investigación, por lo general son organismos microscópicos fotosintéticos.

Cepa: Una variante genética de una especie que se ha aislado y cultivado en laboratorio en un medio sólido o líquido.

Medio de cultivo: Son sustancias que se utilizan para el crecimiento de microorganismo o tejidos en ambientes controlados, considerando óptimas condiciones como pH adecuado y condiciones físicas.

Carotenos: Son una clase de pigmentos que por lo general se los encuentran en algas, bacterias y plantas responsables de colores rojos, naranjas y amarillo.

Estrés: El estrés en microorganismo acuáticos se da por cambios drásticos del medio ambiente que los rodea como la calidad de agua y temperaturas, lo cual provoca respuestas en su fisiología como crecimiento o hinchamiento.

Longitud: Unidad de medida de SI (sistema internacional de Unidades), para medir distancias pequeñas.

Biomasa: Materia orgánica proveniente de plantas, animales y microorganismos utilizada con fuente de energía.

Macerado: Es un proceso de trituración para extraer compuestos de interés.

Sobrenadante: Es un líquido precipitado después de una mezcla ha sido centrifugada o dejada en reposo, para que las partículas queden en el fondo.

ABREVIATURAS

D1: Control de Dunaliella

D2: Replica de control de Dunaliella spp

T1: Control de Thalassiosira

T2: Replica del control de Thalassiosira

Ca: Clorofila a

Cb: Clorifla b

C(x-c): Carotenos totales

Dc: Densidad celular (cel/ml)

10⁴: Factor de dilución

µg·mL⁻¹: Cantidad de microgramos disuelta en un mililitro de solución

rpm: Revoluciones por minuto

g: Unidad de masa equivalente a una milésima parte de 1 kg

vol: Volumen del cultivo en litros

IDL: Índice de desarrollo larval

mm: Milímetros

NV: Nauplio 5

Z: Zoea

M: Mysis

Pl: Post-larva

nm: nanómetros

Resumen

La microalga *Dunaliella spp.* es una de las especies idóneas para la producción de carotenos totales, expresando cambios morfológicos y de coloración. Dentro de la acuicultura las microalgas juegan un papel fundamental para la alimentación en los primeros estadios larvarios de *Litopenaeus vannamei* de interés acuícola en el Ecuador. Sin embargo, uno de los principales problemas en las primeras fases de cultivos es la asimilación y pigmentación por alimentos comerciales, por lo que surge la necesidad de experimentar con microalgas. La presente investigación de tipo experimental, realizada en el laboratorio de larvas Santa María y CIBPA, se evaluó el efecto de la microalga *Dunaliella spp.* con estrés de 5 días a temperatura ambiente y limitación de nutrientes, en comparativa de la microalga comercial control *Thalassiosira* para alimentación de larvas de camarón de Nauplio V hasta postlarval, durante un periodo de 6 meses, constando 6 corridas de experimentación. Posteriormente, se aplicó las dos microalgas con la misma concentración celular cel/ml junto con los alimentos del protocolo de producción, utilizando 4 tanques con capacidad de 1 tonelada con 90.000 larvas en cada tratamiento. Se registró la concentración de carotenos mg/l por cada día de estrés, el índice de desarrollo larvario por estadios al igual de la longitud total y supervivencia. Los resultados obtenidos mediante la prueba de kruskall Wallis $p > 0.05$ determinó que no hubo diferencias significativas entre tratamientos, así mismo la prueba U de Mann Whitney $p > 0.05$ presento los mismos análisis al no existir diferencias entre las especies de microalgas. En base a esto, se evidencio que las longitudes finales en el estadio de p11 eran similares y que el porcentaje promediado de la supervivencia de todos los bioensayos para *Dunaliella spp.* fue de 93.04 y *Thalassiosira* 92.25% destacando que no existen diferencias significativas.

Palabras claves: microalgas, estrés, carotenos, larvas de camarón, índice de desarrollo larvario, longitud y supervivencia.

ABSTRACT

The microalga *Dunaliella* spp. is one of the ideal species for the production of total carotenes, expressing morphological and color changes. Within aquaculture, microalgae play a fundamental role in feeding the first larval stages of *Litopenaeus vannamei*, which is of interest to aquaculture in Ecuador. However, one of the main problems in the early stages of cultivation is the assimilation and pigmentation of commercial foods, which is why the need to experiment with microalgae arises. This experimental research, carried out in the Santa María larval laboratory and CIBPA, evaluated the effect of the microalga *Dunaliella* spp. with 5-day stress at room temperature and nutrient limitation, compared to the commercial control microalga *Thalassiosira* for feeding Nauplius V shrimp larvae up to postlarva1, for a period of 6 months, consisting of 6 experimental runs. Subsequently, the two microalgae were applied with the same cell concentration cel/ml together with the food of the production protocol, using 4 tanks with a capacity of 1 ton with 90,000 larvae in each treatment. The concentration of carotenes mg/l for each day of stress was recorded, as well as the larval development index by stages as well as the total length and survival. The results obtained by the Kruskal-Wallis test $p > 0.05$ determined that there were no significant differences between treatments, likewise the Mann-Whitney U test $p > 0.05$ presented the same analysis as there were no differences between the microalgae species. Based on this, it was evident that the final lengths in the p11 stage were similar and that the average survival percentage of all the bioassays for *Dunaliella* spp. was 93.04 and *Thalassiosira* 92.25% highlighting that there were no significant differences.

Keywords: microalgae, stress, carotenes, shrimp larvae, larval development index, length and survival

INTRODUCCIÓN

Dentro de la acuicultura, las microalgas son microorganismos potenciales sostenibles que han sido ampliamente utilizadas para la alimentación de organismos acuáticos debido a que poseen una fuente única de nutrientes para organismos microscópicos (Khatoon et al., 2017). En el caso de las larvas de camarón, el cultivo de microalgas en la acuicultura es fundamental porque son las principales formadoras de biomasa debido a sus cualidades de tamaño reducido (Sánchez, 2020).

La capacidad de las microalgas, especialmente del género *Dunaliella spp.*, ha sido objeto de numerosos estudios debido a su fácil cultivo por su condición halotolerante y su capacidad de sintetizar compuestos bioactivos y pigmentos, como clorofilas y carotenos, esenciales en su respuesta de captación de luz y la fotoprotección (Arredondo & Voltolina, 2017) (Hernández & Labbé, 2014). Este género cuenta con una alta capacidad de producción de compuestos ricos en lípidos y carotenos, captando gran cantidad de radiación solar (García & Pastuzo, 2016).

Un estudio realizado por (López et al., 2013) revela que mediante el cultivo de la microalga *Dunaliella spp.* en dos fases una de crecimiento en fase verde y otra de pruebas de estrés para acumulación de caroteno la producción de estos pigmentos puede optimizarse mediante variaciones en las condiciones de cultivo, como el aumento de las concentraciones salinas, temperaturas extremas 32 a 40°C, elevada intensidad luminosa y limitación de nutrientes (Piña et al., 2004). Asimismo, la microalga marina *Tetraselmis sp.*, una clorofita flagelada, tiene una tasa de crecimiento rápido y puede soportar una

amplia gama de temperaturas y valores de pH (Rahman et al., 2017). De la misma forma, (Khatoon et al., 2017) aplicaron esta microalga con un alto contenido de nutrientes, lo cual aumentó la supervivencia de postlarvas de camarón y mejoró el estrés oxidativo.

En Ecuador, el estudio de (Naranjo et al., 1999) evaluó tres microalgas—*Chaetoceros gracilis*, *Isochrysis galbana* y *Dunaliella sp.*—aplicadas en larvas de camarón y artemia en cada subestadio, registrando el desarrollo larvario, la sobrevivencia, la velocidad de metamorfosis y el crecimiento. En dichos estudios se observó un gran efecto con *C. gracilis* y mezclas de microalgas.

Dunaliella salina contiene tres grupos de pigmentos: clorofilas, carotenoides y ficobilinas, destacando la clorofila a y b y los carotenos, que representan aproximadamente el 0,5% y 1,5% del peso de la biomasa celular, respectivamente (Jin & Polle, 2009). El cultivo de microalgas ha promovido innovaciones metodológicas para la obtención de diversos compuestos, como pigmentos, mediante espectrofotometría, una técnica que mide la cantidad de luz absorbida (Gómez, 1997). Para la extracción de carotenos de la microalga y larva, se tomó como referencia el estudio de (Arredondo & Voltolina, 2017) y (Millan et al., 2023), basado en el protocolo de (Lichtenthaler & Wellburn, 1983). Este protocolo describe la trituración de muestras de artemia y microalgas con solvente de acetona al 100% en hielo, en oscuridad y durante 24 horas en refrigeración. Se utilizó 2,5 ml de muestra para leer la absorbancia a 661.6 nm (clorofila a), 644.8 nm (clorofila b) y 470 nm (carotenoides totales), presentándose las concentraciones de estos pigmentos en mg/l. Para medir el desarrollo larval de *L. vannamei*, se aplicó el índice de desarrollo larval, evaluando el crecimiento en longitud

total (mm) y el contenido intestinal (Jamali et al., 2015); (Bermudes et al., 2017); (FAO, 2018); (Skretting, 2018) (García et al., 2003).

Se ha identificado que la deficiencia dietética en las larvas de camarón *Litopenaeus vannamei* está vinculada a la asimilación inadecuada de alimentos, lo cual se relaciona con respuestas de baja calidad en el desempeño productivo y la manifestación de algunas enfermedades. Por otro lado, el estudio de (Pacheco & Sánchez, 2023) y (López, 2002) menciona que el desarrollo larval y la supervivencia del camarón dependen del tipo, calidad y cantidad del alimento ingerido en esta etapa. Algunos estudios han determinado el efecto significativo de los alimentos comerciales para larvas de camarón y también el déficit de los medios de cultivo utilizados para distintas especies de microalgas empleadas como alimento (Medina et al., 2021).

(Aguirre-Hinojosa et al., 2012) evidenciaron que en el cultivo intensivo comercial de las larvas en los estadios de zoea y mysis de *Litopenaeus vannamei*, uno de sus principales requerimientos pigmentarios se satisface tanto por los carotenoides naturales encontrados en las microalgas, como es el caso del estudio de (Pacheco & Sánchez, 2023), quienes mencionan que el desarrollo larval y la supervivencia del camarón dependen del tipo, calidad y cantidad del alimento ingerido, específicamente microalgas diatomeas y clorofitas.

Dunaliella salina ha desarrollado estrategias adaptativas que favorecen su supervivencia en ambientes acuáticos con altas concentraciones de sal, deficiencia de

nutrientes y alta irradiación solar (Yaser et al., 2019). Esta especie es de gran interés para la acuicultura porque juega un papel primordial en la nutrición de algunos *peneidos*, que requieren microalgas como fuente de alimento durante sus primeros estadios larvarios (Sato, 1980), (Currie, 2000). Otros estudios han abordado el aprovechamiento de esta microalga con la finalidad de producir β -caroteno natural y glicerol, utilizado como materia prima en varias industrias (Ben, 1993). La pigmentación en los primeros estadios de larvas de camarón es fundamental para observar la asimilación de las diferentes dietas aplicadas. Por tal motivo, se evaluó la *microalga Dunaliella spp.* enriquecida con carotenos con 5 días de estrés limitando nutrientes y a temperatura ambiental, para comprobar su efecto en el desarrollo de larvas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* de nauplio V a post-larva 1.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La falta de pigmentos en larvas de camarón *Litopenaeus vannamei* durante sus primeros estadios larvarios constituye una problemática significativa para la industria acuícola. Esta falta de coloración, debido a la naturaleza translúcida de los organismos, depende en gran medida de su alimentación, lo que convierte este problema en un desafío recurrente, especialmente en el uso de dietas líquidas y sólidas. Una dieta inadecuada o desequilibrada juega un papel crucial en la calidad de las larvas de camarón.

El alimento balanceado para larvas de camarón debe contener una combinación adecuada de nutrientes esenciales. La falta de estos nutrientes puede resultar en la no ingesta del alimento, lo que ensucia el medio ambiente acuático, provocando pérdidas de organismos, deformidades, baja resistencia a enfermedades y retraso en el desarrollo larval. Además, factores como el aumento del pH y del amonio también están relacionados con una dieta deficiente, lo que lleva a alteraciones en la actividad alimentaria y puede causar infecciones por bacterias oportunistas o transmisiones de virus.

Para abordar este problema, una de las dietas con mayor importancia y valor nutricional son las microalgas chlorophytas y diatomeas, que actualmente son las más utilizadas. Sin embargo, uno de los principales desafíos es la consecución de cultivos y cepas puras, la obtención de biomasa inicial, los métodos de recuperación y la producción masiva de la biomasa.

En Ecuador, existen investigaciones dentro de las universidades acerca de la aplicación de la microalga *Dunaliella spp.* en moluscos, pero no de forma estresada aplicada a larvas de camarón. La escasez de investigaciones exhaustivas sobre la eficacia de la microalga *Dunaliella spp.* enriquecida con carotenos con 5 días de estrés de limitación de nutrientes y temperatura ambiental aplicada a larvas de camarón *Litopenaeus vannamei* representa un vacío en el conocimiento. La carencia de información en base a datos de esta dieta viva en cuanto a impacto en la supervivencia y desarrollo es limitada representa un vacío en el conocimiento en productores en la fase crucial que es el desarrollo larval. Por ello se planteó la siguiente interrogante ¿Tendrán el mismo beneficio la microalga *Dunaliella spp.* enriquecida con carotenos y en comparativa de microalgas convencionales *Thalassiosira* en su aplicación a larvas de camarón *Litopenaeus vannamei* de Nauplio V a Post-larva1?.

3. JUSTIFICACIÓN

En Ecuador, actualmente se han desarrollado numerosas aplicaciones de las microalgas en diversos campos tecnológicos, incluyendo cultivos masivos, tanto vivos como procesados, destacando particularmente su utilización en la acuicultura. Una alimentación adecuada en las primeras etapas de las larvas de camarón *Litopenaeus vannamei* asegura que no existan repercusiones significativas en su supervivencia y rendimiento posterior.

La elección de evaluar a *Dunaliella spp.* enriquecida con carotenos como objeto de estudio se basa en la necesidad de abordar los desafíos críticos para mejorar la productividad y sostenibilidad de la acuicultura de camarones, especialmente durante las etapas de desarrollo larvario. Esta microalga, conocida por ser una fuente natural rica en carotenos, tiene la capacidad de acumular y producir una gran cantidad de este compuesto, superando incluso a las fuentes vegetales. Evaluar *Dunaliella spp.* en condiciones de cultivos con estrés de limitación de nutrientes y temperatura ambiental natural representa un avance crucial para la acuicultura.

La investigación busca abordar una necesidad crítica dentro de la industria acuícola proporcionando información valiosa sobre el uso de *Dunaliella spp.* enriquecida con carotenos como estrategia nutricional para mejorar el desarrollo y la calidad de las larvas de camarón *Litopenaeus vannamei*, específicamente en las etapas de Nauplio V a post-larva 1. La aplicación de estos conocimientos podría tener un impacto significativo en la sostenibilidad y rentabilidad de la producción acuícola de larvas de camarón.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Evaluar la microalga *Dunaliella spp.* enriquecida con carotenos en el desarrollo de larvas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* de nauplio V a Postlarva 1.

4.2 Objetivos específicos

- Cuantificar el porcentaje de carotenos producidos por la microalga *Dunaliella spp.* mediante pruebas espectrofotométricas.
- Examinar el desarrollo larval de *Litopenaeus vannamei* de nauplio V a Postlarva 1, mediante observaciones microscópicas.
- Comparar el efecto de la *Dunaliella spp.* enriquecida con carotenos y alga comercial (*Thalassiosira*) evaluando el desarrollo y crecimiento de larvas de camarón *Litopenaeus vannamei* de nauplio V a Postlarva 1.

5 HIPÓTESIS

H0: La aplicación de la microalga *Dunaliella spp.* enriquecida con carotenos no tendrá efecto significativo en el desarrollo y crecimiento para larvas de camarón *Litopenaeus vannamei* de nauplio V a Postlarva 1, en comparación de la microalga comercial *Thalassiosira*.

6. MARCO TEÓRICO

6.1 Importancia de las microalgas

Son organismos fotosintéticos que habitan en una variedad de ambientes acuáticos, como lagos, ríos, aguas residuales y sustratos rocosos. Sus parámetros ambientales pueden tolerar una gran escala de temperaturas, salinidades y valores altos de pH, con el único beneficio de incrementar su productividad de biomasa (González, 2015).

Los laboratorios de fitoplancton producen masivamente microalgas para uso acuícola. Entre las microalgas clorofitas y diatomeas, destaca *Dunaliella spp.*, conocida por su alta producción de carotenos totales, lo que le otorga un valor añadido y notables cualidades biológicas.

6.2 Descripción de cultivo fases

Las microalgas son organismos microscópicos de diferentes micrómetros, una de las cualidades únicas es que conservan una maquinaria fotosintética idónea de transformas energía termo solar en biomasa con una eficiencia por triplicado mayor que las plantas vasculares (Arcas & Andrade, 2008).

Para dar inicio al cultivo de microalgas es necesario contar el inóculo puro que de manera continua tenga la capacidad de entregar cultivos de calidad (Ynga & Niño, 2017).

6.3 Medios de cultivo Guillard's F/2 (Medio F/2)

Uno de los medios de cultivo seleccionado para la producción de microalgas es Guillard's F/2 para organismos de agua salada (Guillard & Ryther, 1962). Este medio es soluble en agua y de origen natural, compuesto principalmente por materia inorgánica, lo que facilita el mantenimiento de cultivos axénicos (Nichols & Bold, 1965). Por lo tanto, en esta investigación se emplearon los fertilizantes descritos en la tabla 1.

Tabla 1. Fertilizantes de medio de cultivo Guillard F/2 para algas clorofitas

SOLUCIÓN 1	(g/100 ml)
<i>NaNO₃</i>	7.5
<i>NaH₂PO₄ – H₂O</i>	0.5
SOLUCIÓN 3	(g/100 ml)
<i>FeCl₃.6H₂O</i>	0.32
<i>Na₂SiO₃.9H₂O</i>	0.44
<i>METALES TRAZAS</i>	0.10 ml
<i>Cu SO₄.5H₂O</i>	
<i>ZnSO₄.7 H₂O</i>	
<i>Zn Cl</i>	
<i>CoCl₂.6H₂O</i>	
<i>MnCl₂.4H₂O</i>	
<i>Na₂ M₀4.2H₂O</i>	
SOLUCIÓN 4	(g/100 ml)
<i>Cianocobalamina</i>	0.5
<i>Tiamina</i>	0.1
<i>Biotina</i>	1

Método de aplicación: para cultivos de 250 ml a 2 litros

Para cultivos de 250 ml a 2 litros, se lleva a cabo la preparación de las cantidades indicadas de nitrato, fosfatos y vitaminas en 100 ml de agua destilada para autoclavar. Luego, se fertiliza con 1 ml por litro de cultivo.

Método de aplicación: para cultivos de masivos litros 50 L

Fertilizar con 0.25 ml de solución por litro de cultivo.

Método de aplicación: para cultivos de masivos litros 1000 L

Fertilizar con 125 ml de solución por tonelada de cultivo.

6.4 Microalga *Dunaliella* spp.

La microalga *Dunaliella salina* descrita por (Teodorescu, 1905) perteneciente a la clase *Chlorophyceae*, de la cual se conocen varias especies con diferentes variedades y formas unicelulares y biflageladas, se encuentran entre las más estudiadas debido a su producción de pigmentos soportando ambientes salinos e hipersalinos (Morales et al., 2020).

D. salina es un alga fotosintética que convierte el dióxido de carbono de la atmósfera en energía y material celular debido a sus diferentes tipos de clorofila de la célula, los pigmentos que esta enmascarada son expresados por medio de coloración anaranjada presente de carotenos (Sánchez, 2020).



Figura 1. Observación de *Dunaliella* spp. objetivo 40x.

Fuente: Fátima Quimi

La figura 2 muestra el patrón del conteo del hematocitómetro, las células que se encuentran en las cuadrículas A, B, C y D son contadas dependiendo de micrómetro celular, el volumen del agua en cada cuadrado es de 1/10.000 en un milímetro.

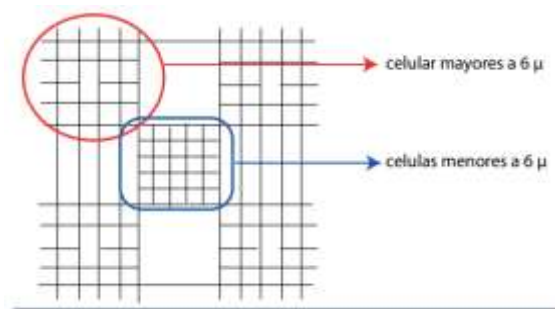


Figura 2: Conteo en cámara de Neubauer de acuerdo al tamaño de las células microalgales.

Fuente: Ynga & Niño, 2017.

6.5 Fórmula para el conteo celular:

$$DC = \frac{N 1 + N 2 + N 3 + N 4}{4} \times 10^4$$

DC = densidad celular

N = promedio del conteo celular por cuadrantes

10^4 = factor de conversión

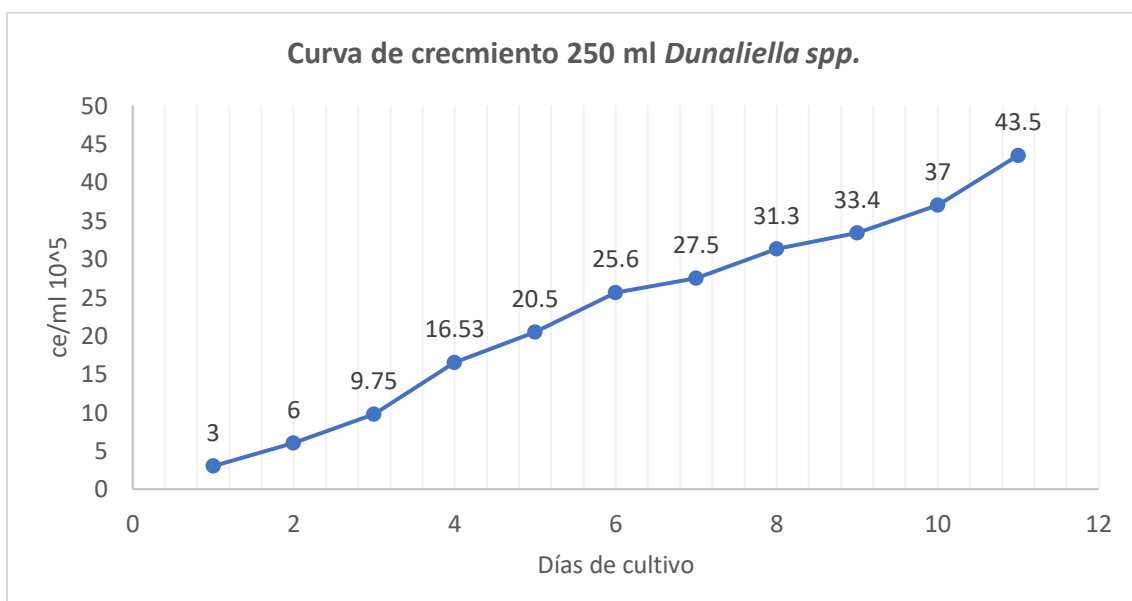
6.6 Curva de crecimiento de *Dunaliella spp.* para cultivos pequeños - masivos

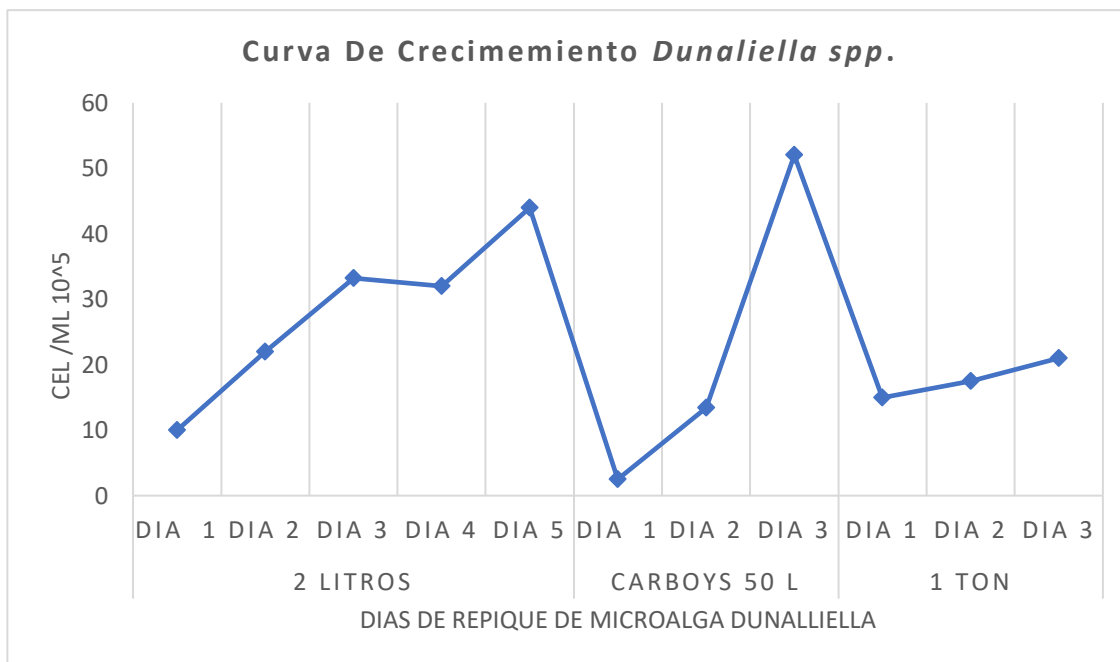
Para determinar la densidad celular, se utilizó un microscopio Omax M82ES 640x480 junto con un hematocitómetro o una cámara de Neubauer. Estos datos son fundamentales para calcular el volumen celular que se suministrará a las larvas. Además,

permiten evaluar la condición de los cultivos de microalgas al detectar la presencia de contaminantes, considerando parámetros poblacionales como la tasa de crecimiento exponencial, expresada en su división celular y temperatura controlada de 20°C (Ynga & Niño, 2017).

Se puede evidenciar las curvas correspondientes a un cultivo de 250 ml de *Dunaliella spp.* en 11 días de cultivos con condiciones controladas su fase inicial de 3 cel/ml 10⁵ y su fase exponencial de 43.5 cel/ml 10⁵. Posteriormente se detalla la curva de crecimiento en los cultivos masivos dos litros y carboys con temperatura de 20 °C iniciando su cultivo con 10x10⁵ cel/ml y con 5 días de cultivo 43 x10⁵, el cultivo de carboys 50 litros 4 x10⁵ cel/ml con tres días de cultivos 50x10⁵ cel/ml y finalmente el cultivo masivo de 1 tonelada empezando con 12.5 x10⁵ cel/ml con tres días de cultivo con la densidad celular de 20 x10⁵ cel/ml.

Curva de crecimiento de *Dunaliella spp.* 250 ml





Grafica 1 y 2. Curva de crecimiento Para el cultivo de microalga *Dunaliella spp.* se utilizó fiolas de 250 ml y para cultivos masivos cultivos de 2 litros, en 2 carboys de 50 litros y posteriormente los 1000 litros en tanques cilíndricos.

Fuente: Elaboración propia.

6.7 Carotenos producidos por microorganismos

Los carotenos se presentan en diferente coloración como amarillo, roja y naranja dado estas características dentro de campo acuícola son utilizados para suministrar en sus dietas a crustáceos y peces, debido a los compuestos polienos, miscibles en lípidos y solubilizantes orgánicos.

6.8 Características de *Dunaliella spp.* estresada para la producción de carotenos

El género *Dunaliella* ha surgido como uno de los principales productores de carotenos de origen natural, reconocido en diversas industrias alimenticias y medicinales (Gómez, 1997), (Hernández et al., 1999).

Una característica clave de este género es su capacidad para acumular β -caroteno, como respuesta fisiológica a condiciones estresantes durante su cultivo (Romero et al., 2008). Estos factores de estrés incluyen el aumento de la salinidad, la temperatura y la limitación de nutrientes (Guevara et al., 2005). A pesar de la abundante información disponible sobre la producción de β -caroteno, se sabe poco sobre la obtención de otros carotenoides igualmente importantes comercialmente, como antioxidantes expresados en microorganismos, que poseen propiedades bioactivas (López-Elías, 2013) (Gutiérrez, 1996). Como se puede observar en la Figura 3 los cambios morfológicos y de coloración de las especies de *Dunaliella*.

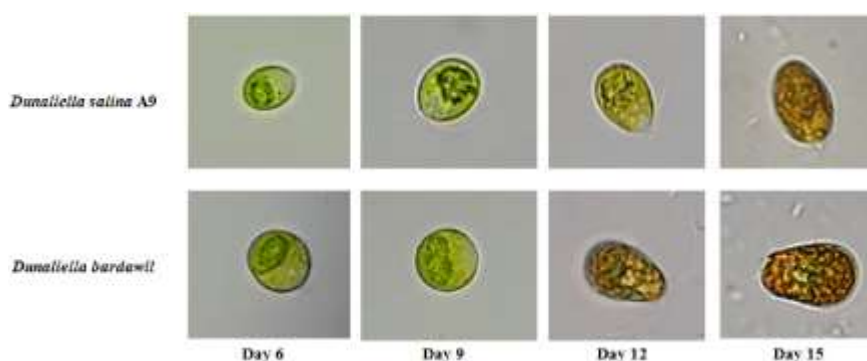


Figura 3: Cambios morfológicos de especies de *Dunaliella* bajo condiciones estresantes.

Fuente: Algae, 1644

6.9 Pigmentos totales

Los pigmentos naturales son biomoléculas presentes en la biomasa de microalgas, entre los que se encuentran carotenoides, ficobilinas y clorofilas, astaxantinas las cuales pueden corresponder hasta con el 0.50 % a 1.50% del peso seco de la biomasa, los pigmentos con mayor importancia a nivel de investigación son los carotenos, debido a los átomos de carbono que la conforman (García & Pastuzo, 2016).

La influencia de la variabilidad de condiciones de los cultivos de la microalga *Dunaliella* para la producción de pigmentos consisten en el aumento a condiciones extremas de salinidad, temperatura y limitación de la absorción de nutrientes (Yépez & Morales, 1998), (Gómez & González, 2005).

Salinidad

Los cambios de salinidad provocan estreses osmóticos, puede dificultar los procesos de fotosíntesis en l celular, esta dificultad para realizar la fotosíntesis disminuye la capacidad de crecimiento. Varias investigaciones han descrito que varias cepas de la microalga *Dunaliella spp.* al incrementar las salinidades expresa mayor cantidad de carotenos (Zepeda, 2017).

Temperatura

La temperatura influye en la fotosíntesis de las microalgas, puede afectar la producción de pigmentos, como mencionan la información científica de varios autores que la temperatura de 18 a 35 ° aumenta los niveles de carotenos, sin embargo, a temperaturas mucho más altos como los 40 °C estimulan la carotenogenesis (Zepeda, 2017).

6.10 Carotenos aplicados en la acuicultura

Se han utilizados las microalgas de diferentes formas en harina, vivas, congelada y procesadas para diferentes crustáceo y peces, debido a sus componentes nutricionales lo cual las hace atractivas en este campo principalmente por los pigmentos que producen, vitaminas astaxantinas, ácidos grasos polisaturados y minerales.

Dentro de la acuicultura se la aplicado viva, pero porque potencializada es decir con días de estrés aplicando a alimentado a larvas de camarón, en la presente investigación se estresará las microalgas por cinco días con parámetros de salinidad a 35 ‰ y temperatura solar.

6.11 DESCRIPCIÓN DE LARVAS DE CAMARÓN *Litopenaeus vannamei*

6.11.1 Descripción del sistema de cultivo intensivo

Las fases larvarias en un sistema de producción empiezan con los estadios y subestadios, en consideración de los parámetros físicos y químicos de agua y las técnicas aplicada, las importante es la temperatura controlada en las cuales se aplican revisiones frecuentes en el desarrollo larvario en relación con los cambios morfológicos de organismos , su alimentación principal se basa en fitoplancton las cepas de microalgas aptas para la acuicultura en base a sus requerimientos nutricionales, artemia comercial, balanceado comercial y probióticos (AQUALAB S.A, 1998).

Los laboratorios de larvas de camarón suelen utilizar sistemas de acuicultura intensiva para criar y cultivar las larvas de camarón en condiciones controladas. Estos sistemas pueden variar en diseño y complejidad, pero generalmente incluyen los siguientes componentes (ver figura 4):

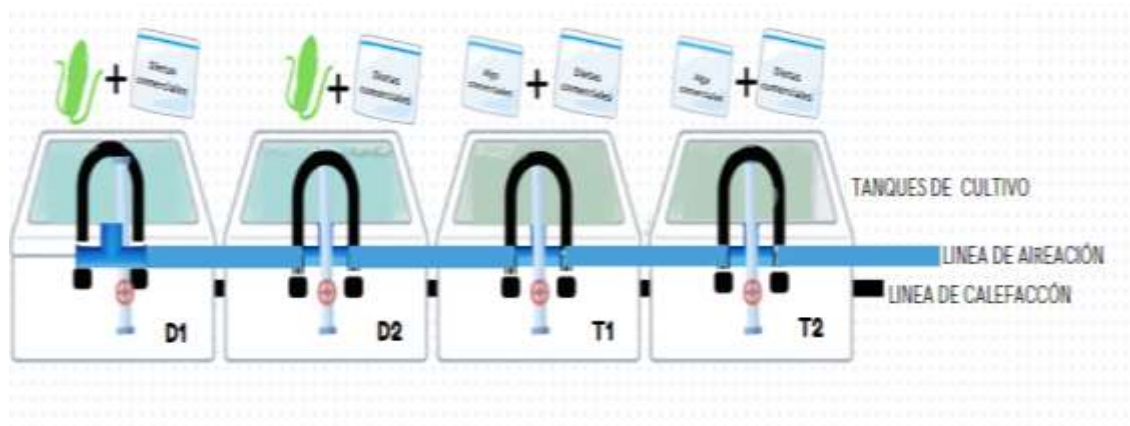


Figura 4. Esquema del sistema de cultivo de 1 tonelada a) líneas de aireación b) líneas de calefacción.

Fuente: Elaboración propia.

6.11.2 Características de los estadios larvarios

Aproximadamente tienen una duración cercana a las 3 a 4 semanas dependiendo de las especies y condiciones de los cultivos, esto es fundamental para los cambios en su morfología externa e interna como hepatopáncreas, rostrum, antenas y anténula, en la etapa de nauplio nadan por medio del movimiento de los tres pares de apéndices parecido a un remo produciendo movimiento en forma de zig-zag tienen fototrópicos y nadan en dirección de la luz; en la etapa zoea (nado hacia al frente), logran nadar con la primera y segunda antena, como en la etapa naupliar, con la ayuda de los desarrollados primero y segundo maxilípedos; se evidencia durante la etapa mysis (nado hacia atrás), antena reducidas y nadar se vuelve una función del pereiópodo, con cierta ayuda de los tres pares de maxilípedos, la forma del cuerpo es encorvado, con la cabeza hacia abajo; en esta etapa no son atraídos por la luz (Martínez, 2018); citado por (Cabrera & Lara, 2015).

6.11.2.1 Estadios Larvarios

Nauplio V: Esta fase la longitud es de 0.5 mm de promedio, dentro de las características principales es que tiene fototactismo positivo, cuerpo más o menos aplanada, estructuras hinchadas semejante a perillas presentes en las bases de las mandíbulas, órganos presentes no visibles, su alimentación constituye a reservas vitelinas (ver figura 5).



Figura 5. Observación de Nauplio V en el microscopio.

Fuente: Fátima Quimi.

Zoea 1: Seguido de la fase naupliar, se presenta el estadio de zoea se subdivide en tres subestadios, donde se visualiza en cefalotórax y abdomen, su longitud del cuerpo 0.86 a 1.3 mm., cuerpo aplanado, ojos sésiles presentes, primer y segundo maxilipedos funcionales, proceso en desarrollo furcal y sistema digestivo visible (ver figura 6).



Figura 6. Observación de Zoea 1 en el microscopio.

Fuente: Fátima Quimi.

Zoea 2: Una de las características visibles en este estadio es longitud del cuerpo 1.3 - 2.mm, ojos pedunculados presentes, rostrum y espinas supraorbitales desarrollado, segmentación abdominal aparente (ver figura 7).

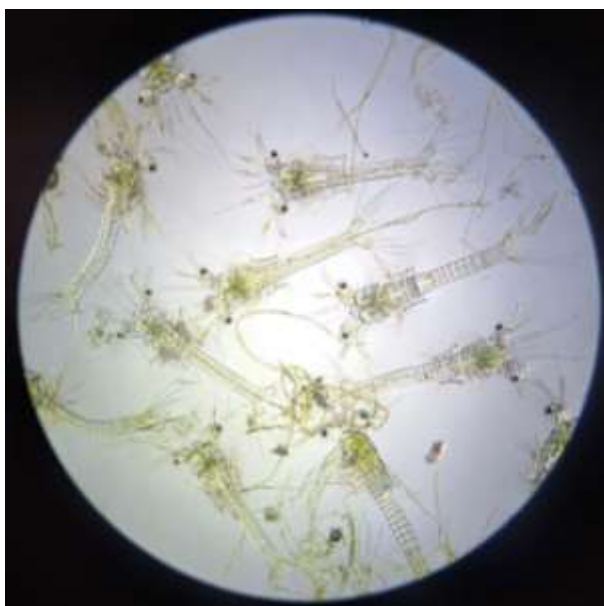


Figura 7. Observación de Zoea 2 en el microscopio.

Fuente: Fátima Quimi.

Zoea 3: En estos subestadios la longitud del cuerpo 2.14 - 2.5 mm, segmentación abdominal marcada; espinas dorsales y laterales están presentes en la mayoría de metameros. Los urópodos no están completamente desarrollados. Presencia de las quelas en el tercer maxilipedo (ver figura 8).

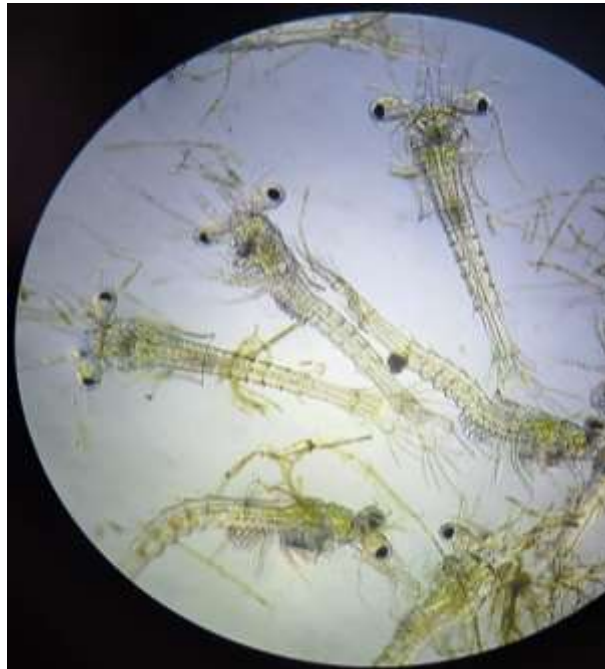


Figura 8. Observación de Zoea 3 en el microscopio

Fuente: Fátima Quimi

Mysis 1: Esta tercera fase también tiene 3 subestadios, cada uno de ellos con un promedio de duración de 28 a 36 horas, presentan fase carnívora, su morfología la longitud del cuerpo es de (2.5 – 3 mm). Cuerpo típico desarrollado en forma de camarón, pereiópodos bien desarrollados, primera y segunda antenas reducidas, urópodos desarrollados, presentes vestigios del pleópodo principal, su nado es hacia atrás con pequeños saltos, su cabeza es ancha (ver figura 9).



Figura 9. Observación de Mysis 1 en el microscopio.

Fuente: Fátima Quimi

Mysis 2: Longitud de cuerpo (3- 3.50 mm), presentes los vestigios de pleópodos no segmentados, presencia del telson, su alimentación dentro de los cultivos es suplementada por otro tamaño de alimento balanceado (ver figura 10).

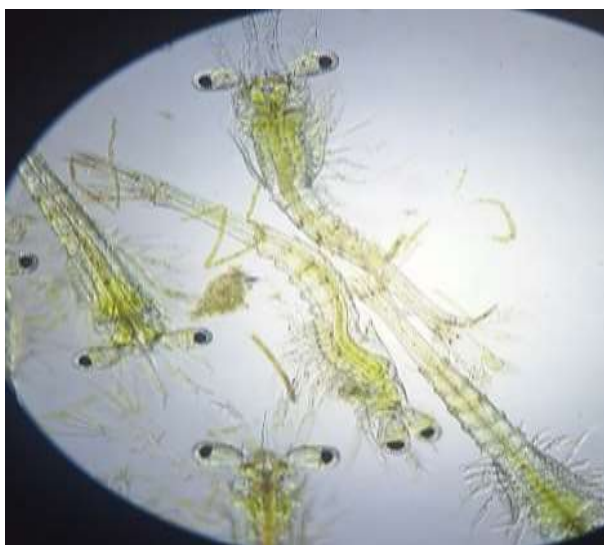


Figura 10. Observación de Mysis 2 en el microscopio

Fuente: Fátima Quimi

Mysis 3: Longitud de cuerpo (3.70 – 4 mm). pleópodos segmentados desarrollados (ver figura 11).



Figura 11. Observación de Mysis 3 en el microscopio

Fuente: Fátima Quimi

Post-larva: Al complementarse la formación de los periopodos pasan a la fase de pre-juvenil, donde la morfología se asemeja a la de un adulto, su nado vuelve hacia adelante, comuna cabeza más ancha que la mysis 3, su dieta es completamente seca de balanceado, la longitud de cuerpo (3.70 - 4.52 mm), pleópodos segmentados desarrollados (ver figura 12).

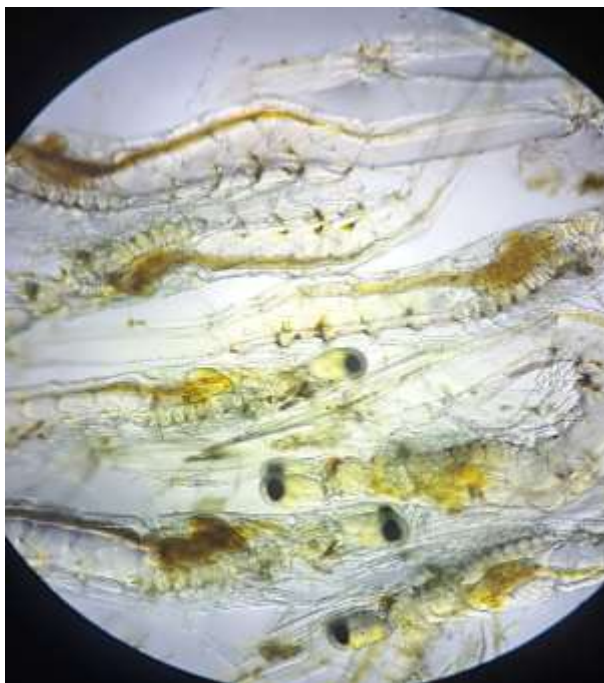


Figura 12. Observación de Post-larva en el microscopio.

Fuente: Fátima Quimi.

6.11.3 DESCRIPCIÓN DE DIETAS DE LOS ESTADIOS ALIMENTACIÓN

La alimentación representa un aspecto crucial para las larvas de camarón *Litopenaeus vannamei*, ya que los tipos de alimentos seleccionados influyen directamente en su calidad, lo que a su vez impacta en su desarrollo y supervivencia. La elección de la dieta puede variar según el protocolo o la técnica aplicada en la producción, lo cual puede determinar el éxito o el fracaso del cultivo (Arellano, 1993; Skretting, 2018).

Cálculo de la Biomasa

Para el cálculo de la Biomasa se utiliza la siguiente formula:

$$B = PxNt$$

B= Biomasa

P= peso promedio

Nt= número de individuos actuales

Conversión alimenticia

Se define como la cantidad de alimento suministrados en gramos para obtener un gramo de organismo. Es una medida del peso del alimento abastecido en kg por la biomasa existente.

$$TCA = \text{peso de alimento suministrados (g)} / \text{Biomasa (g)}$$

6.11.4 DATOS REFERENCIAL:

Dieta líquida: Dentro del laboratorio de larvas de camarón la dieta líquida se agrega en baldes, por millón de nauplio 2 g se disuelve en agua, la suministración variara del técnico. Por lo general sus partículas micro encapsuladas tienen una consistencia suave y humedecida, facilitando filtración, se utilizó los alimentos como Royal seafood, HGS-7 y Biomin Aquaestar, Zeolita, Shrimp Lyte (Prokura), y vitamina C (González, 2022). Ver tablas referenciales en anexos, se calculó de acuerdo a la tabla de alimentación de la laboratorio y referencias del empaque de cada alimento.

Dieta seca: Se alimenta la larva con dieta seca, en la que se incluyen alimentos en polvo y gránulos por lo general suelen contener combinaciones de nutrientes esenciales vitaminas entre otros, su aplicación depende del estadio y la cantidad de siembra se empieza con 5 gr por millón encada tanque, las dietas comerciales, se disuelven en agua y se procede a alimentar a los tanques cada 4 horas para las dosis en polvo o secos Royal sea food 5- 50 micras (*Ver tabla en anexos 11 pag 83*).

Dieta viva: La dieta viva para las larvas en los primeros estadios larvarios consiste principalmente en algas, que son la principal fuente de alimentación desde que llegan los nauplios hasta alcanzar la etapa de PL 1 (Brito et al., 2006). Los autores cuantificaron las microalgas *Thalassiosira*. y *Dunaliella spp.* mediante una fórmula específica:

$$\frac{\text{Cantidad deseada } \frac{\text{cel}}{\text{ml}} \times \text{volumen de tanque}}{\text{Cantidad total microalgas cel/ml}}$$

Esta fórmula proporciona un valor en litros, mismo que sirve para aplicar en 1 dando un promedio de la dosificación es sus estadios larvarios de:

- Zoea 1 y 2 = 50,000 cel/ ml
- Zoea 3 = 60,000 cel/ml
- Mysis 1, 2, y 3 = 10,000 cel/ml
- Post- larva 1 = 10,000 cel/ml

La microalga *Dunaliella spp.* se aplicó por duplicado para mantener la densidad celular durante todos los días de cada experimentación, *Thalassiosira* se aplicó tres veces durante toda la experimentación una solo vez al día debido a que esta microalga se replica muy rápido, se estableció el método de ampliación entre la microalga clorofita y la diatomea para mantener las densidades celulares de las dos microalgas (ver en anexos tablas generales pag.101).

6.11.5 VARIABLES QUÍMICAS

6.11.5.1 pH (potencial de hidrogeno):

Es la concentración de iones hidrógeno de una solución, este parámetro indica el grado de acidez, si el agua esta acida o básica, en la acuicultura es el consumo de CO2 el

proceso de fotosíntesis que conduce a un aumento de pH y la producción de CO₂ con la respiración conduce a una baja del pH. Los valores oscilan de 6,5 hasta 9 en el agua, es considerada como buena para el cultivo de camarones. Si el pH es inferior a 5 todo el tiempo, generalmente el agua tendrá ácido sulfúrico elevado y será nocivo para larvas de camarones, si esto sucede habrá que hacer un tratamiento recomendado la aplicación de cal. Para la medición de pH se utilizó test y kit por colorimetría (FAO, 2018).

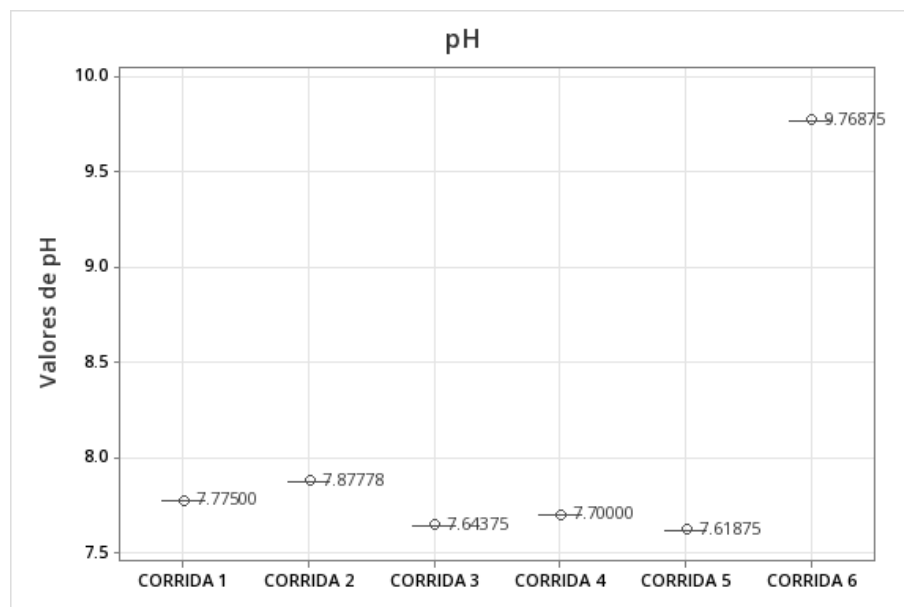


Figura 13. pH en larvas de camarón en los 6 bioensayos realizados

Fuente: Elaboración propia

6.11.5.2 Oxígeno Disuelto (OD):

El oxígeno disuelto (OD) en los tanques de larvas es la cantidad oxígeno medida en la columna de agua, para larvas de camarón las concentraciones de oxígeno en los tanques de larvicultura son de 3 a 5 mg/l, aunque pueden variar las concentraciones de oxígeno de 5 a 12 mg/l son las más recomendadas, la disminución de oxígeno se por la presencia de bacterias oportunistas y gran cantidad de microalgas, es fundamental

mantener adecuados los niveles de oxígeno ya que favorecen el crecimiento y viabilidad larvas, para medir este parámetros se utilizó el equipo DO91900, agitando la sonda para medir la cantidad de oxígeno disuelto (Lema,2023).

Entre los rangos del oxígeno en por corrida se mantuvieron, con pocas variaciones en la corrida 3 en el tratamiento de *Dunaliella* 5.8 mg/l así mismo, se elevó el oxígeno en la corrida 4 a 7 mg/l, demostrado que en las demás corridas y tratamientos se mantuvieron en los rangos de 6.2 -6,8 mg/l proporcionalmente (Grafico 14).

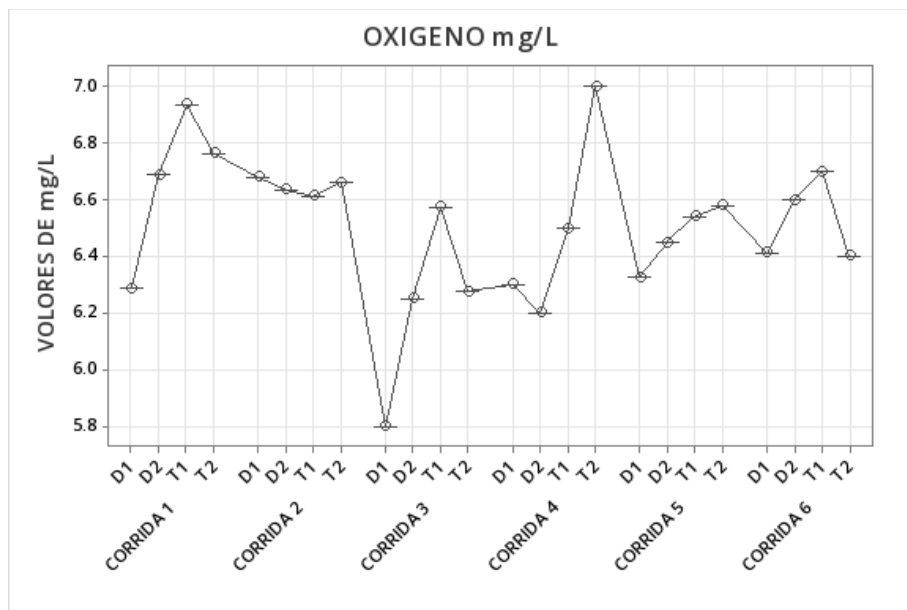


Figura 14. OD (mg/l) en larvas de camarón en los 6 bioensayos realizados

Fuente: Elaboración propia

6.11.5.3 Amonio NH₄:

El amonio es una de los factores limitantes más importantes en los sistemas de cultivo intensivo de camarón esto se debe a la acumulación de desechos tóxicos

nitrogenados. Dado los compuestos de amonio es el más tóxico en comparación al nitrito y nitrato, el amonio está presente en formas ionizadas (NH_4) y en forma no ionizada (NH_3), el aumento de amonio se relaciona con exceso de alimentación en los tanques de larvas de camarón, por ellos se debe controlar los suministros de las dietas aplicadas. Se utilizó el equipo YSI 9300 - KIT para determinar el amonio (Cobo., et al 2014).

Se presenta en la Figura 15 la concentración de amonio promediadas de todos los bioensayos por corridas donde en la corrida 2 se observan 0.6 mg/l en los 4 tratamientos, manteniendo rango de 0.3 a 0.4 mg/l de amonio en las demás corridas experimentales.

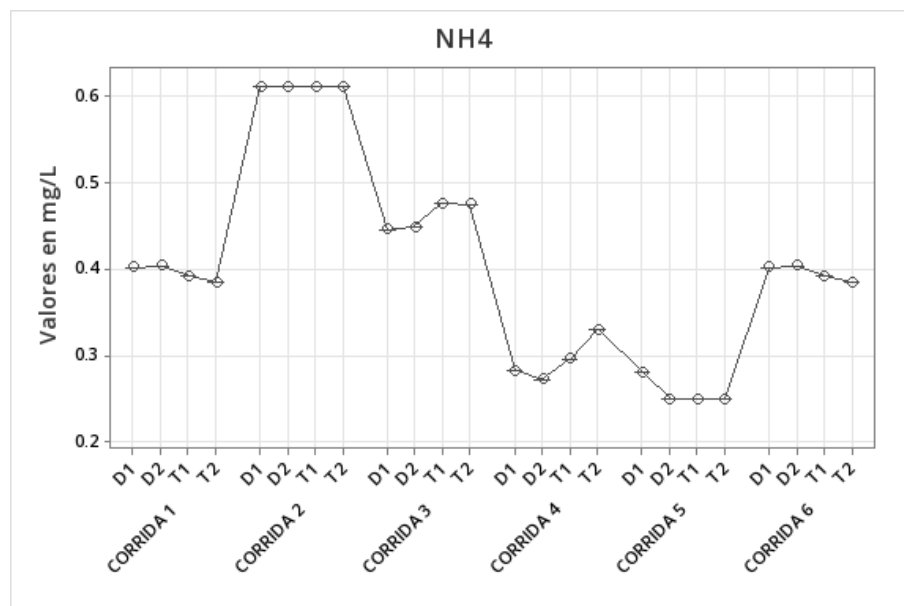


Figura 15. NH_4 (mg/l) en larvas de camarón en los 6 bioensayos realizados

Fuente: Elaboración propia

6.11.6 VARIABLES FISICAS

6.11.6.1 Salinidad:

La salinidad, medida en g/kg ‰, representa la cantidad total de materia sólida disuelta en un litro de agua de mar. La interacción iónica en el agua de mar determina su conductividad eléctrica, siendo mayor la conductividad a mayor salinidad. Por lo general, el agua de mar tiene una salinidad de 35 ppm, pero en los laboratorios de larvas se maneja una salinidad que va desde 30 ppm en los estadios de siembra hasta 25 ppm en el estadio de post-larva. La medición de la salinidad se realizó con un refractómetro con compensación de temperatura automática y se ajustó diariamente con agua salobre desde el estadio de nauplio V hasta el de postlarva I. Los registros de este parámetro en todos los bioensayos muestran una salinidad promedio de 26 a 28 ‰.

Como se puede observar en la Gráfica 16, se registraron ligeras variaciones, excepto en la corrida 1 donde la salinidad promedio fue de 26.15 ‰, mientras que en las demás corridas experimentales se mantuvo en 28 ‰.

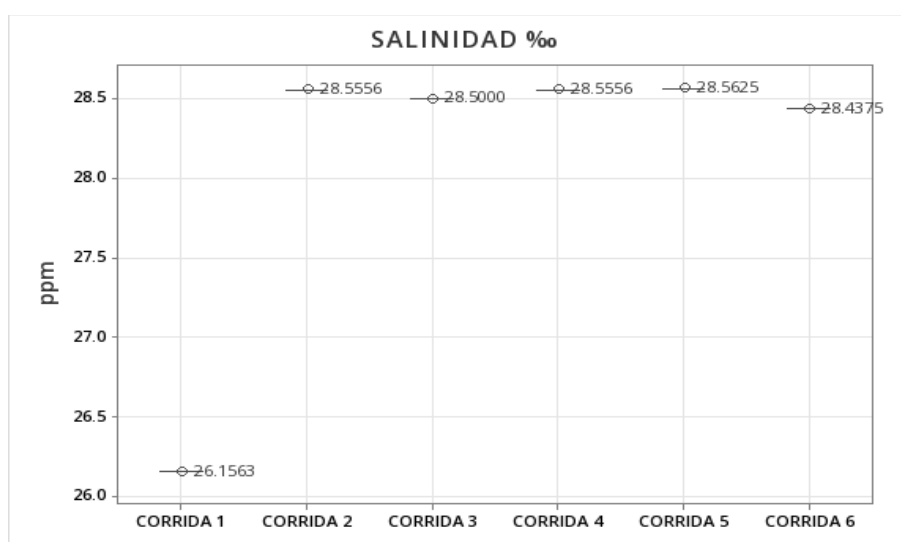


Figura 16. Salinidad (ppt) en larvas de camarón en los 6 bioensayos realizados

Fuente: Elaboración propia

6.11.6.2 Temperatura:

La temperatura para la especie *Litopenaeus vannamei*, requerida para su desarrollo oscila entre 30- 34°C para los primeros estadios larvarios, si dentro del cultivo existen baja temperatura de 25- 27 °C provoca retraso larval entre otros factores de mala asimilación de alimento. La temperatura es considerada uno de los parámetros con más importancia en relación a la calidad del agua, debido a que de este parámetro depende los cambios acelerados o retardados de metamorfosis, a mayor temperatura cambios de estadio a menor temperatura retraso larval. El registro de la temperatura se realizó con el multiparámetro digital DO91900, todos los días durante la fase de experimentación, se introdujo la sonda para medir la temperatura con rangos 32°C y 34°C durante todas las experimentaciones (Ver figura 17) (Lema,2023).

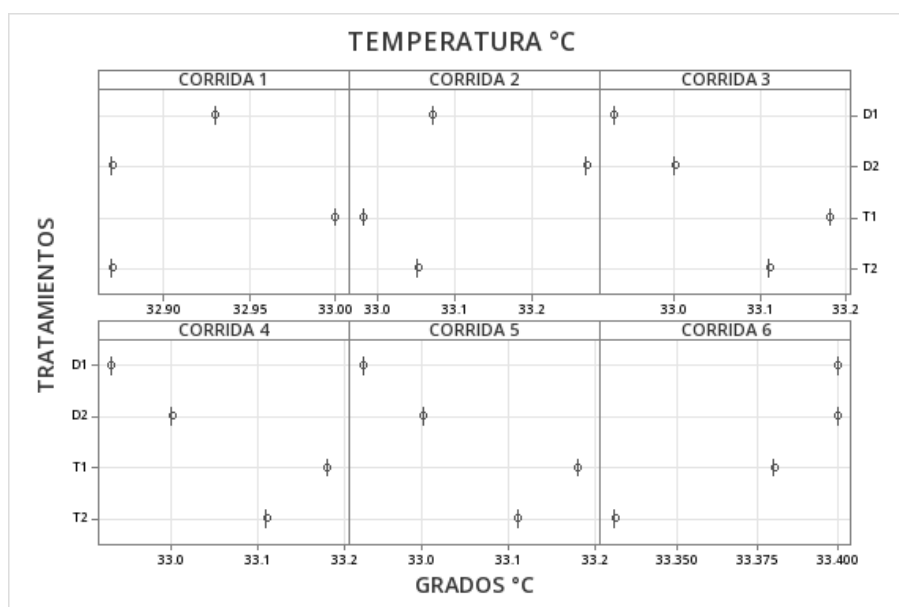


Figura 17. Temperatura en larvas de camarón en los 6 bioensayos realizados

Fuente: Elaboración propia

6.12 ANALISIS ESTADISTICOS

Se empleará la Prueba de Kruskal-Wallis para detectar posibles diferencias significativas entre los tratamientos. La prueba U de Mann-Whitney será utilizada para comparar las medias de dos muestras provenientes de la misma población, así como para determinar si las medias de dos muestras son iguales o diferentes. Además, se aplicará la correlación de Pearson para examinar la relación entre el porcentaje de carotenos y la temperatura. Para llevar a cabo el análisis estadístico descrito y evaluar las diferencias significativas en cada uno de los tratamientos, se utilizó el programa Restudio en su última versión, PAST 4.09 y mintab.

7. METODOLOGÍA

7.1 Tipo de investigación

La presente investigación está desarrollada con un método experimental aplicado con enfoque cualitativo y cuantitativo, debido a que se registraran datos numéricos de larvas de camarón *L. vannamei* y caracterización de asimilación la microalga estresada 5 días PM018 *Dunaliella spp del* laboratorio CIBPA en comparación del control con la microalga comercial *Thalassiosira* para larvas de camarón, se utilizaron 4 tanques experimentales de 1 tonelada 2 repeticiones para cada microalga, se controló los parámetros físicos y químicos durante los 6 corridas de experimentación.

Este trabajo se desarrolló con microalgas (PM018), aislada desde la Península de Santa Elena, perteneciente al proyecto CUP: 91870000.0000.384095, que tiene el permiso del Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica (MAATE): código MAATE-DBI-CM-2022-0264.

7.1.1 Metodología experimental:

Esta investigación es de enfoque experimental debido a que el investigador manipula una o más variables de estudio, para controlar el aumento o disminución de esas variables y su efecto en las conductas observadas. Dicho de otra forma, un experimento consiste en hacer un cambio en el valor de una variable (variable independiente) y observar su efecto en otra variable (variable dependiente).

El trabajo tiene dos fases de laboratorio la de producción de microalga con 5 días de estrés en su cultivo masivo de 1 tonelada y la experimentación aplicada a larvas de camarón.

7.2 FASE DE LABORATORIO PARA MICROALGAS.

7.2.1 Producción de la Biomasa de *Dunaliella spp*

El cultivo de microalgas se realizó de manera secuencial, empleando el medio f/2 de Guillard (1975) como medio de cultivo. Para obtener la biomasa de *Dunaliella spp.* el proceso comenzó con cultivos pequeños se utilizó agua de mar estéril con una salinidad de 35 ‰ y temperatura controlada de 20 °C, donde se inoculó el agar en tubos de ensayo de 10 ml, seguido de repiques a 250 ml y luego a 1.5 litros. Posteriormente, se pasó a la fase de cultivos masivos, aumentando gradualmente la cantidad de agua a 50 litros hasta completar su tercer día de fase exponencial y finalmente se pasó al cultivo de 1 tonelada, con su tercer día de fase exponencial el cultivo paso a ser estresado por 5 días a temperatura ambiente y limitación de nutrientes (ver figura 18) y (tabla 2).

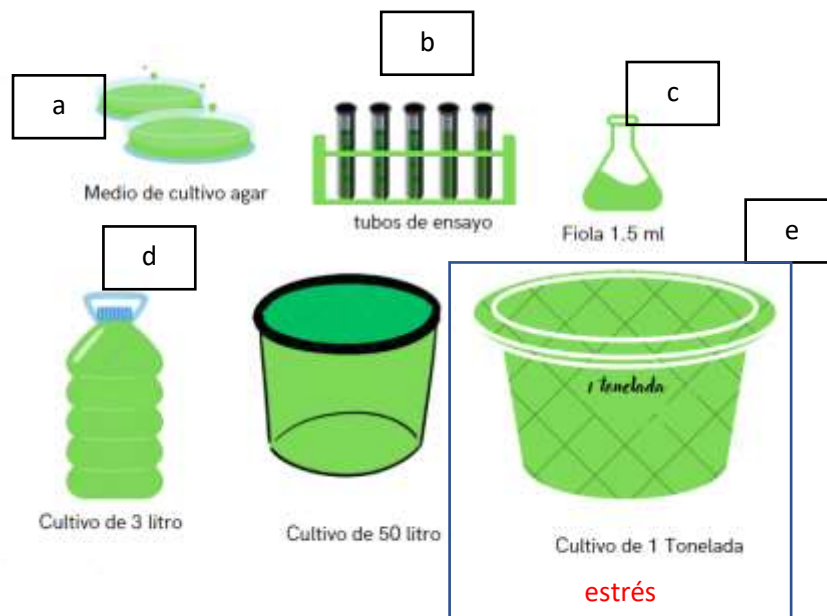


Figura 18. Fase de cultivo de microalga de *Dunaliella spp* en medio de cultivo Guillard f/2, se fertilizo 1 ml de solución 1, 2 y 4 por litro de cultivo.

Fuente: Elaboración propia

Tabla 2. Calcular la Fase exponencial del crecimiento de la microalga *Dunaliella spp* para poder cuantificar el número de células/ml

Producción de la Biomasa	
a) Cepario – matrax	7 días
b) Recipiente de 250 ml	Duración 11 días – fase exponencial
c) Recipiente de 1.5 L	3 días fase exponencial
d) Recipiente de 50 litros	Se cultiva 3 días
Temperatura controlada de 20°C	
e) Recipiente de 1 tonelada (800L)	Repique para estresar
Estrés para obtención de carotenos: limitación de nutrientes y temperatura ambiental	
5 días de estrés	
Fase de alimentación	2.000.000 – 800.000 (cel/ ml)

Fuente; Elaboración propia

La producción de pigmentos o carotenoides en este estudio está influenciada por un factor ambiental como es la temperatura, disminución de nutrientes (Meléndez-Martínez et al.,2005).

7.2.2 Factor de estrés en cultivo masivo de 1 tonelada.






La temperatura ambiental y limitación de nutrientes, manteniendo la salinidad de 35‰ en toda la producción de microalgas desde los cultivos pequeños hasta masivos.

Temperatura solar ambiental: La temperatura ambiental es un factor crucial en el cultivo de microalgas debido a que influyen significativamente en su crecimiento y fotosíntesis, inicialmente en los cultivos pequeños con temperatura controlada de 20 °C, posteriormente en este estudio los cultivos masivos exteriores de 1 tonelada para la producción de carotenos se sometieron a estrés por 5 días, alcanzando una temperatura ambiental extrema a 40 °C con variabilidad ambiental en los demás días de estrés de 30

°C respectivamente, un factor crucial es la interacción de luz – temperatura debido a que la temperatura incrementa de manera equitativa con la intensidad lumínica, este parámetro no daña al cultivo por la capacidad y las condiciones extremas que puede soportar la microalga (Guevara et al., 2016).

Limitación de nutrientes: es un método empleado para la acumular de carotenos en la microalga, implica restricción de la disponibilidad de ciertos nutrientes esenciales, como el medio de cultivo Guillard f/2, en su respuesta a este déficit afecta en gran medida a la fotosíntesis (García et al., 2020).

Tabla 3. Observaciones microscópicas y características morfológicas de cada día de estrés de la microalga *Dunaliella spp.* con 5 días de estrés

Día Observaciones	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5
COLORACIÓN	verde natural	verde amarillento	verde pálido	verde semi pálido	amarillo
CÉLULA.	con flagelos y mucha movilidad	con flagelos y movilidad	Algunas células con flagelos y poca movilidad	pocas células con flagelos y poca movilidad poca ancha	Muy poca movilidad y sin flagelo células anchas
Fotografías					

Fuente: Elaboración propia

Días de estrés: Durante toda la experimentación se consideró estresar los cultivos de *Dunaliella spp.* por cinco días debido a que la densidad celular bajaba gradualmente. Para evitar problemas del cultivo se cubiertos con plástico; además, los cultivos estuvieron expuestos a un fotoperiodo natural de 12 horas luz y 12 horas oscuridad con salinidad a 35 ‰, se evidencia los cambios morfológicos celulares de las microalgas ver en (tabla 3).

Posteriormente al quinto día de estrés se conservó las microalgas estresadas en con una tele negra, para su posterior aplicación a larvas de camarón durante 8 días.

7.2.3 Protocolo para la obtención de carotenos de *Dunaliella spp.*

Los porcentajes de carotenos se los midió en las unidades de mg/L de la cepa de *Dunaliella spp.* Con absorbancia de clorofila a y b para determinar carotenos totales por (Arredondo & Voltolina, 2017).

Fórmula de clorofilas y carotenos.

$$C_a = 11.24A_{661.6} - 2.04A_{644.8} =$$

$$C_b = 20.13A_{644.8} - 4.29A_{661.6} =$$

$$C_{x+c} = \frac{1000A_{470} - 1.9C_a - 63.14 C_b}{214}$$

Solvente acetona pura: 100%

7.2.3.1 Pasos para la extracción de carotenos de microalgas utilizando acetona al 100%:

1. Preparación de la muestra:

Se recolecto la biomasa de la microalga *Dunaliella spp.* en cada uno de los 5 días estrés, para la obtención de la biomasa húmeda, se utilizó la centrifuga HERMELE Z30,

tubos falcón de 250 ml a 3500 rpm por 5 minutos, se repetía el proceso una vez más, con ayuda de mechero se pasaba los tubos falcón de 250 ml para secar la muestra.

Se peso exactamente 0.3 gramos de biomasa húmeda de microalgas estresadas y se las transfirió a un tubo de ensayo. Se Agrego 10 ml de acetona al 100% al tubo que contiene las microalgas.

2. Extracción:

Se mantuvo en reposo la muestra a 4°C durante 24 horas, en la oscuridad para permitir la extracción de los carotenos o pigmentos.

3. Homogeneización:

Transcurrido el período de reposo, se colocó la muestra para homogeneizarla con ayuda de un vortex a una velocidad de 2500 rpm durante 3 minutos para asegurar una extracción eficiente de pigmentos.

4. Separación del sobrenadante:

Se deja reposar la muestra por 30 minutos a temperatura de 4 °C en la oscuridad, para separar el sobrenadante de los residuos celulares.

5. Enfriamiento:

Se transfirió el sobrenadante a un recipiente previamente enfriado con hielo para mantener las condiciones óptimas y preservar la integridad y calidad de los compuestos extraídos.

6. Segunda extracción:

Se añadió 10 ml adicionales de acetona al 100% al residuo remanente y repitiendo el proceso de homogeneización en el vortex a 2500 rpm durante 3 minutos. Se deja reposar

por 15 minutos y posteriormente se transfiere el sobrenadante al mismo recipiente enfriado con hielo.

7. Tercera extracción:

Repetir el proceso de homogeneización con el vortex descrita anteriormente, pero esta vez reducir el tiempo de reposo a 5 minutos para extraer cualquier caroteno sobrante

8. Volumen final:

Comprobó que el volumen total del sobrenadante en el recipiente sea aproximadamente de 30 ml. En caso contrario, ajustar el volumen agregando acetona al 100% según sea necesario para alcanzar la cantidad requerida.

9. Lectura de absorbancia (ABS):

Preparar un blanco utilizando en la celda de vidrio y colocar 2.5 ml de acetona al 100%.

Realizar las lecturas de absorbancia de las muestras utilizando 2.5 ml del sobrenadante obtenido en el espectrofotómetro UV- VIS Genesis™ model i5, utilizando la longitud de onda específica requerida para la detección de carotenos.

Posteriormente realizados los pasos, leer con absorbancia (ABS) de la fórmula que se requiera. Relacionado así la densidad óptica, se medirá la densidad a una longitud de onda de 661.6 ,644.8 ,470 nm. La cual se expresará por su espectro de absorción que indica el grado de absorbancia o colorimetría contiene la especie de *Dunaliella spp.*

Los carotenos en general han sido ampliamente utilizados para diversos beneficios en la acuicultura por sus pigmentos naturales y funciones antioxidantes, las células de la microalga *Dunaliella spp.* enriquecidas con caroteno con limitación de nutrientes

disminuyen su actividad fotosintética y por lo consiguiente el exceso de irradiación causa daño celular aumentando su tamaño y produciendo caroteno como posible fotoprotector.

Los Beta -carotenos es el típico caroteno de las microalgas presupuestan 1% de biomasa seca, aunque en condiciones de estrés como es el caso de *Dunaliella spp.* que puede llegar hasta 10% de su biomasa celular (Jin & Polle, 2009).

7.3 FASE DE LABORATORIO DE LARVAS DE CAMARÓN

El laboratorio de larvas Santa María el cual está ubicado en la calle principal de la comunidad de Palmar, cuyas coordenadas geográficas son 2°01'15.2"S 80°43'31.6"W. Dedicado a la exportación de larvas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (ver en la figura 4).



Figura 19. Mapa de Santa Elena y Laboratorio de larvas Santa María

Fuente: Extraído de Google Maps, 2023

Larvas de camarón *Litopenaeus vannamei* se sembraron en 4 tanques experimentales cada tanque tiene la capacidad de 1 tonelada. Esta fase se llevó a cabo en 6 meses de experimentación hasta completar 6 corridas, se consideró el tiempo del desarrollo larvario de 8 días de Nauplio V y Post- larva1.

El diseño de la investigación consiste en la fase de laboratorio por medio de observación microscópica de los estadios larvarios de *Litopenaeus vannamei* en cual se

tomó un factor muy importante para el crecimiento la aplicación de microalgas *Dunaliella spp* con estrés por 5 días y control *Thalassiosira* junto las dietas comerciales y parámetros físicos químicos (pH, amonio, temperatura, salinidad y oxígeno) ver tabla en anexos.

Se recopiló toda la información en una ficha de campo (ver en anexos) en el cual se registró la dosificación de las dietas líquida, sólida y viva, desde el estadio de Nauplio V hasta Post-larva 1, se visualizó el tracto digestivo para asimilación del alga por medio de coloración.

7.3.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Este estudio se basa en la experimentación de aplicar la microalga *Dunaliella spp* en condiciones de estrés, a tanques de cultivos de larvas de camarón de 1 tonelada, los diseños experimentales se los realizo por duplicado, es decir 8 días por en 6 corridas experimentales mensuales, mediante la aplicación de técnicas estadísticas y análisis no paramétricos de los organismos (ver figura 5).

Experimentación en laboratorio

D1: Control + *Dunaliella spp* + dietas comerciales

D2: Replica del control + *Dunaliella spp* + dietas comerciales

T1: Control + Alga comercial (*Thalassiosira*) + dietas comerciales

T2: Replica del Control + Alga comercial (*Thalassiosira*) + dietas comerciales

Parámetros en consideración temperatura y, salinidad

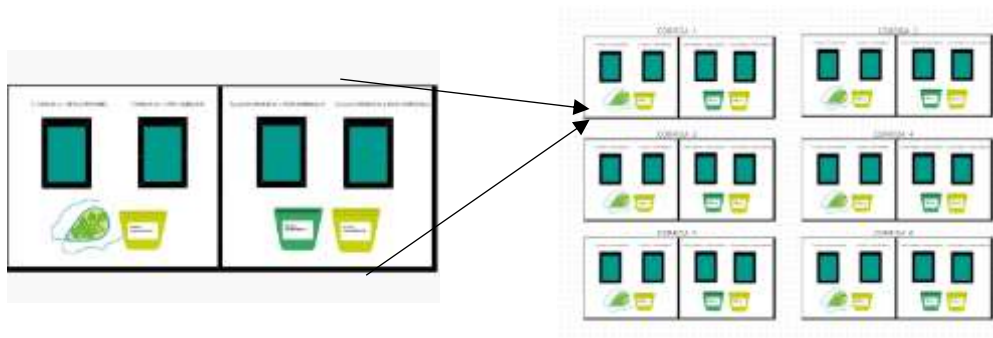


Figura 20. Diseño experimental figura a) tanques de 1 tonelada cepa de origen natural *Dunaliella spp* (2 réplicas) (2 réplicas) b) tanques de 1 tonelada (2 réplicas) alga comercial (*Thalassiosira*);

Fuente: elaboración propia

Análisis. Se reemplazo la microalga comercial y se utilizó de la microalga *Dunaliella spp.* obtenida la biomasa en el laboratorio CIBPA. Por medio de las propiedades que contienen obtención de carotenos a base de estrés lumínico solar y salinidad normal.

7.3.2 DESCRIPCIÓN DE LOS ESTADIOS LARVARIOS: NAUPLIO V A POST- LARVA 1.

Se trabajo con 90 larvas por litro de agua, considerando que el volumen de agua sea 800 litros a 1 tonelada, con volumen de siembra de 90.000 larvas de *Litopenaeus vannamei*.

7.3.3 INDICE DE DESARROLLO LARVARIO

Metodología de (Godínez et al., 2005) Modificado por (Bermudes-Lizárraga et al., 2017). La evaluación de IDL es cada 24 horas: con la revisión microscópica de la muestra de 15- 20 larvas tanque experimental con el tratamiento y control que se revisaron in vivo en un microscopio para determinar la etapa del desarrollo, las muestras no se devolvieron a los tanques por lo cual la cantidad de organismos disminuyo. El IDL se calculó con la ecuación: $ID = (\sum ini) / N$, donde i es el valor asignado a cada fase de

desarrollo larval (nauplio V=0; zoea I-III: 1-3; mysis I-III: 4-6; PL1=7), ni es la cantidad de larvas de la etapa i, y N es la cantidad total de organismos analizados en la muestra.

Tabla 4. Valores asignados en cada fase del desarrollo larval

ESTADIO LARVARIO	VALOR ASIGNADO A CADA FASE DE DESARROLLO LARVAL	DESCRIPCIÓN
NV	0	$ID = (\sum ini) / N$
Z1	1	ni es la cantidad de larvas de la etapa i
Z2	2	N es la cantidad total de organismos analizados en la muestra (3).
Z3	3	
M1	4	i es el valor asignado a cada fase de desarrollo larval (nauplio V=0; zoea I-III:
M2	5	1-3; mysis I-III: 4-6; PL1=7).
M3	6	
PL1	7	

Fuente: Bermudes-Lizárraga (2017)

En base a este índice, se evaluó el desarrollo o metamorfosis de las larvas durante su crecimiento, es decir, se empleó para determinar si alguno de los ensayos alimenticios a acelera o retarda el cambio de un estadio a otro durante el desarrollo larvario del camarón (Godinez et al., 2005).

7.3.4 MÉTODO PARA OBSERVACIONES MICROSCÓPICAS:

Se tomaron 4 muestras (250 ml cada una) en distintos puntos de los tanques, procediendo a las revisiones de cada uno de los estadios. De acuerdo con la metodología de (FAO ,2018), citado por (Skretting, 2018), para los criterios de observación y estimación del contenido intestinal se lo clasifico como vacíos (Blancos - amarillento 50%), moderado (café claro 60- 70 %) y llenos (amarillo 100%).



VACÍO

SEMI-LLENO

LLENO

Figura 21. Observaciones microscópicas

Fuente: Elaboración propia

7.3.5 MEDICIÓN DE LONGITUD TOTAL DE *L. vannamei*

Para el inicio y al final de la fase experimental las larvas de camarón, se midió la longitud total y el ancho, se tomó una muestra representativa de organismos de cada tratamiento o grupo experimental, se las fijo con lugol acidificado para conservarlas las estructuras y evitar descomposición (Moreno, 2008).

Se utilizó un recipiente de 150 ml el cual se pasó por todo el tanque de una tonelada para extraer 15 a 20 larvas de camarón y poder realizar la medición de la talla.

Tabla 5 Mediciones de larvas de camarón en los estadios de nauplio hasta post-larva.

Nauplio	Zoea 1 – Post larva	Zoea 2, Zoea 3, Mysis 1, Mysis 2, Mysis 3 y post larva
3 de la tarde	4 am.	Después de 24 horas

Fuente: Elaboración propia

El desarrollo larvario se evaluó mediante observación microscópica, lo longitud total de la larva se midió con un binocular objetivo micrómetro desde la punta del rostro hasta el final de la cola (longitud total) (Jamali et al., 2015), con hojas de papel milimétrico para referenciar las medidas en mm (milímetros), con programa *Windows Download ImageJ* bundled with 64-bit Java 8. Instructions, visualizados en el estereoscopio (ver en tabla 5).

Tabla 6 Mediciones de larvas de camarón

Estadios	LONGITUD (mm)
NV	0.5
Z1	0.8- 1
Z2	1.13-2
Z3	1.80-2.7
M1	2.6-3.5
M2	3.02-4
M3	3.5-4
PL1	4- 5.5

Fuente: (FAO, 2018)



Figura 22 Programa Windows Download ImageJ bundled with 64-bit Java 8. Instructions

a. longitud total para programar: b. longitud media requerida y c. objetivo micrómetro.

Fuente: Elaboración propia

En esta aplicación calculo la longitud en milímetros según rangos descritos bibliográficamente, con ayuda de micrómetro de escalas de (0-100), se lo calibro y para obtener la medida en mm se multiplico por $\frac{1.37\text{mm demicrómetro}(x)}{100} = 0.014\text{mm}$, para obtener la longitud de tramo medido según las escalas contadas.

7.3.6 Protocolo para carotenos de larva de camarón y artemia

Para establecer el protocolo de carotenos en larvas, se siguió los pasos indicados por (Millan et al.2023) con modificaciones, basado en la metodología de (Lichtenthaler & Wellburn, 1983).

Para la obtención de carotenos se trituraron muestras de larvas de camarón en el estadio de p11, con 3 gramos de larvas se obtuvieron 0,3 gramos biomasa que posteriormente se aplicó acetona al 100% en un baño de hielo en la oscuridad y se dejaron reposar durante 24 h en refrigeración a 4 °C. El sobrenadante se recuperó por centrifugación a 3,220 rpm durante 15 min a 4 °C. Posteriormente, se realizó una doble extracción del precipitado y se mezclaron los sobrenadantes resultantes. Luego, se utilizó una celda de cuarzo para leer las muestras en el espectrofotómetro a 661.6 nm (clorofila a) ,644.8 nm (clorofila b) y 470 nm (carotenoides totales). Las concentraciones de estos pigmentos se presentan en mg/L.

Análisis estadísticos

La información obtenida de todos los bioensayos realizados se registró y tabulo en hojas de cálculo de Microsoft Excel, luego se procedió a comprobar las diferencias significativas mediante la prueba no paramétrica anova de una vía y prueba de Levene, Kruskall-Wallis ($p > 005$) y Mann Whitney para comparar las medias de las muestras en el programa estadístico de R-estudio y Past 4.03.

8. RESULTADOS

- **Cuantificación de carotenos de *Dunaliella spp.***

Se registró el porcentaje de carotenos de la microalga *Dunaliella spp.* en diferentes bioensayos, se determinó la concentración máxima de carotenos alcanzada desde el primer día al quinto día estrés del cultivo masivo de una tonelada, se obtuvieron los siguientes resultados: bioensayo 1 la temperatura varía entre 32 y 35 °C con de carotenos en 0.58 a 2.17 mg/l observando un incremento progresivo con el tiempo, bioensayo 2 la temperatura se mantuvo constante en 30 °C excepto el día 3 (35°C) con 0.83 a 1.83 mg/l de carotenos se observó un incremento menos pronunciado que el bioensayo 1, bioensayo 3 la temperatura varía entre 32 a 38 °C con 0.73 a 2.79 mg/l se presentó variabilidad en la temperatura e aumento de la concentración de carotenos, bioensayo 4 la temperatura de 33 a 40 °C la concentración de carotenos de 1.12 a 4.03 mg /l se observó un aumento de carotenos en los últimos días, bioensayo 5 la temperatura va desde 34 a 40 °C con 1.30 a 4.78 mg/l de concentración de carotenos coincidiendo con los valores de temperaturas, y, por último el bioensayo 6 con temperatura de 32 a 38 °C con 0.43 a 2.22 mg/l observando moderado incremento de concentración de carotenos, indicando que la producción de carotenos se ve influencia por el tiempo y positivamente por la altas temperaturas ambientales (tabla 7 y Grafica 3).

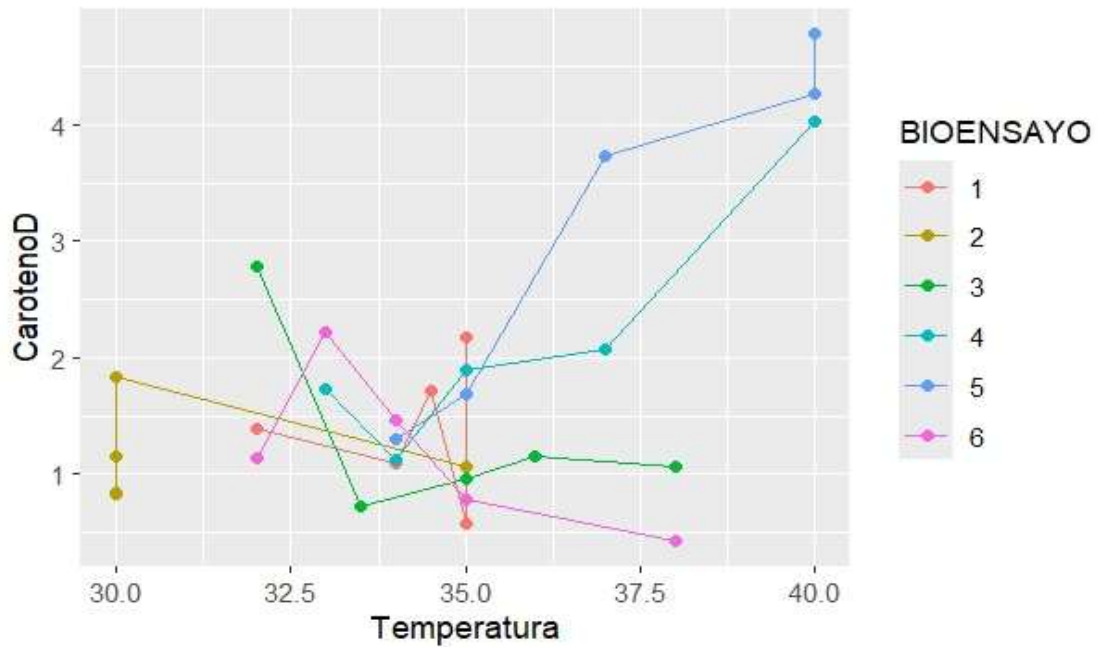
Tabla 7 Bioensayos realizados según la temperatura y concentración de caroteno obtenidos dentro de los 5 días de experimentación siendo Temperatura (T) y Carotenos (C), media (x) y desviación estándar (S)

Bioensayo	Día	Temperatura [°C]	Caroteno <i>Dunaliella spp</i> [mg/L]	T	C
1	Día 1	35	0,58	S :1.244	S : 0.6048
	Día 2	34	1,09	\bar{x} : 34.1	\bar{x} :1.39
	Día 3	32	1,39		
	Día 4	34,5	1,72		
	Día 5	35	2,17		
Día 1	30	0,83	S: 2.236068		
2	Día 2	30	0,84	\bar{x} 31	\bar{x} 1.14
	Día 3	35	1,06		
	Día 4	30	1,15		
	Día 5	30	1,83		
	Día 1	33,5	0,73		
3	Día 2	35	0,96	\bar{x} 34.9	\bar{x} 1.33
	Día 3	38	1,06		
	Día 4	36	1,15		
	Día 5	32	2,79		
	Día 1	34	1,12		
4	Día 2	33	1,73	\bar{x} 35.8	\bar{x} 2.17
	Día 3	35	1,89		
	Día 4	37	2,08		
	Día 5	40	4,03		
	Día 1	34	1,30		
5	Día 2	35	1,69	\bar{x} 37.2	\bar{x} 3.15
	Día 3	37	3,73		
	Día 4	40	4,27		
	Día 5	40	4,78		
	Día 1	38	0,43		
6	Día 2	35	0,79	\bar{x} 34.4	\bar{x} 1.20
	Día 3	32	1,14		
	Día 4	34	1,46		
	Día 5	33	2,22		

Fuente: Elaboración propia

La grafica proporcionada muestra la relación entre la temperatura y el contenido de carotenos en el cultivo masivo de 1 tonelada en 5 días de estrés en varios bioensayos, los rangos de la temperatura desde 30 y 40 ° C, se representa con colores distintos cada bioensayo, se observó que la respuesta de las microalgas al contenido de carotenos varía entre los diferentes bioensayos, los bioensayos 4 y 5 muestran una clara tendencia de

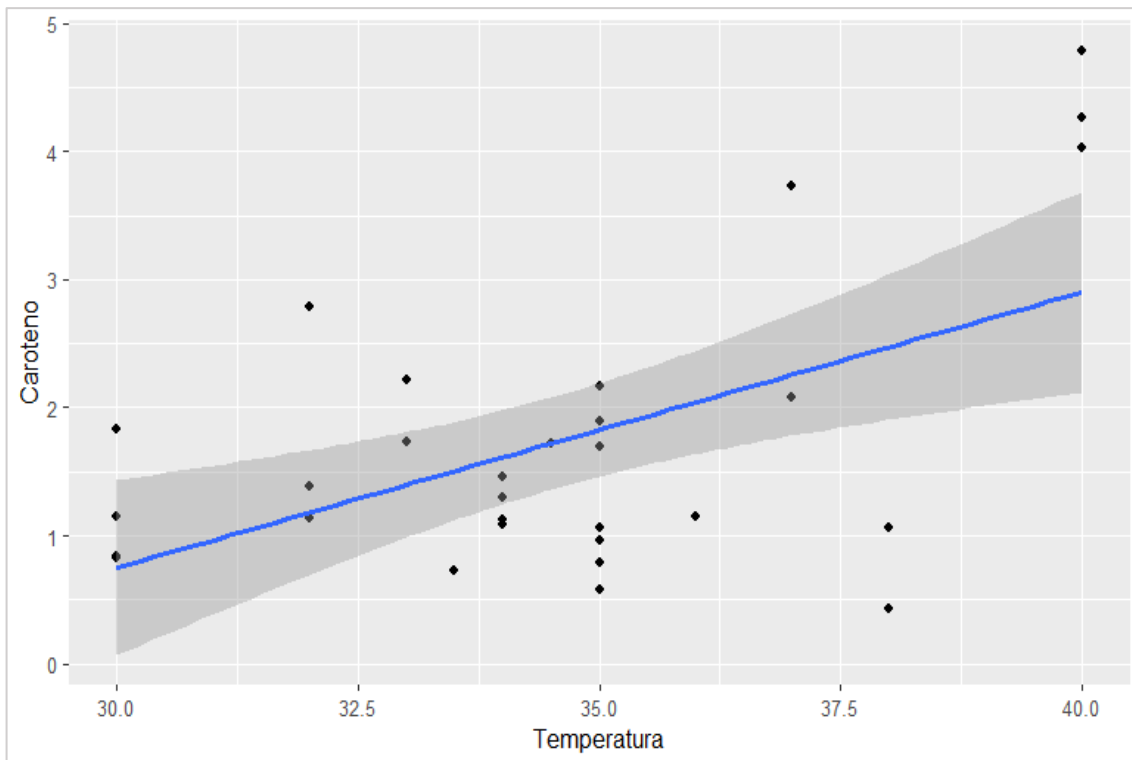
aumento de carotenos con el incremento de temperatura sugiriendo la alta tolerancia de adaptación de la microalga *Dunaliella spp.* Seguido de los bioensayos 1, 2,3 y 6 que mantuvieron rangos similares de temperatura con un leve incremento de carotenos al transcurrir de los días.



Grafica 3 Concentración de caroteno VS temperatura cada bioensayo realizado

Fuente: Elaboración propia

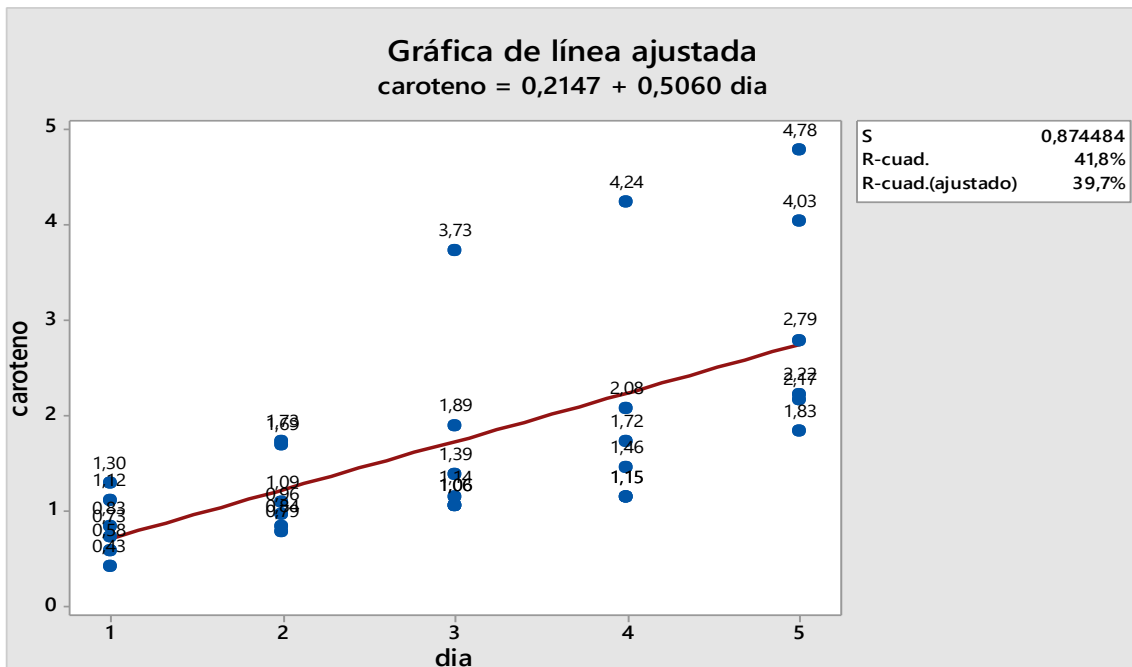
En la (Gráfica 4) Según el análisis de correlación de Pearson con un intervalo de confianza del 95% realizado mediante R, se encontró que las variables "temperatura" y "concentración de caroteno" presentan una correlación significativa (valor $p = 0.00181$) (Gráfica 4, Anexo I).



Gráfica 4. Correlación de caroteno y temperatura según los días de experimentación y bioensayos.

Fuente: Elaboración propia

Por consiguiente, en la Gráfica 5 se trazó una línea de tendencia para mostrar el porcentaje de carotenos en relación con los días de estrés, con un coeficiente de determinación (R-cuadrado) del 39.7%. Los datos indican que a medida que transcurren los días de experimentación, aumenta la concentración de caroteno, esto se debe a variable de temperatura de cada bioensayo. Por ejemplo, en los Bioensayos 4 y 5, en el quinto día de estrés, los valores de carotenoides fueron de 4.03 y 4.78 mg/l, respectivamente, en los datos obtenidos de la microalga estudiada.



Gráfica 5. Línea ajustada de caroteno según los días de experimentación y bioensayos

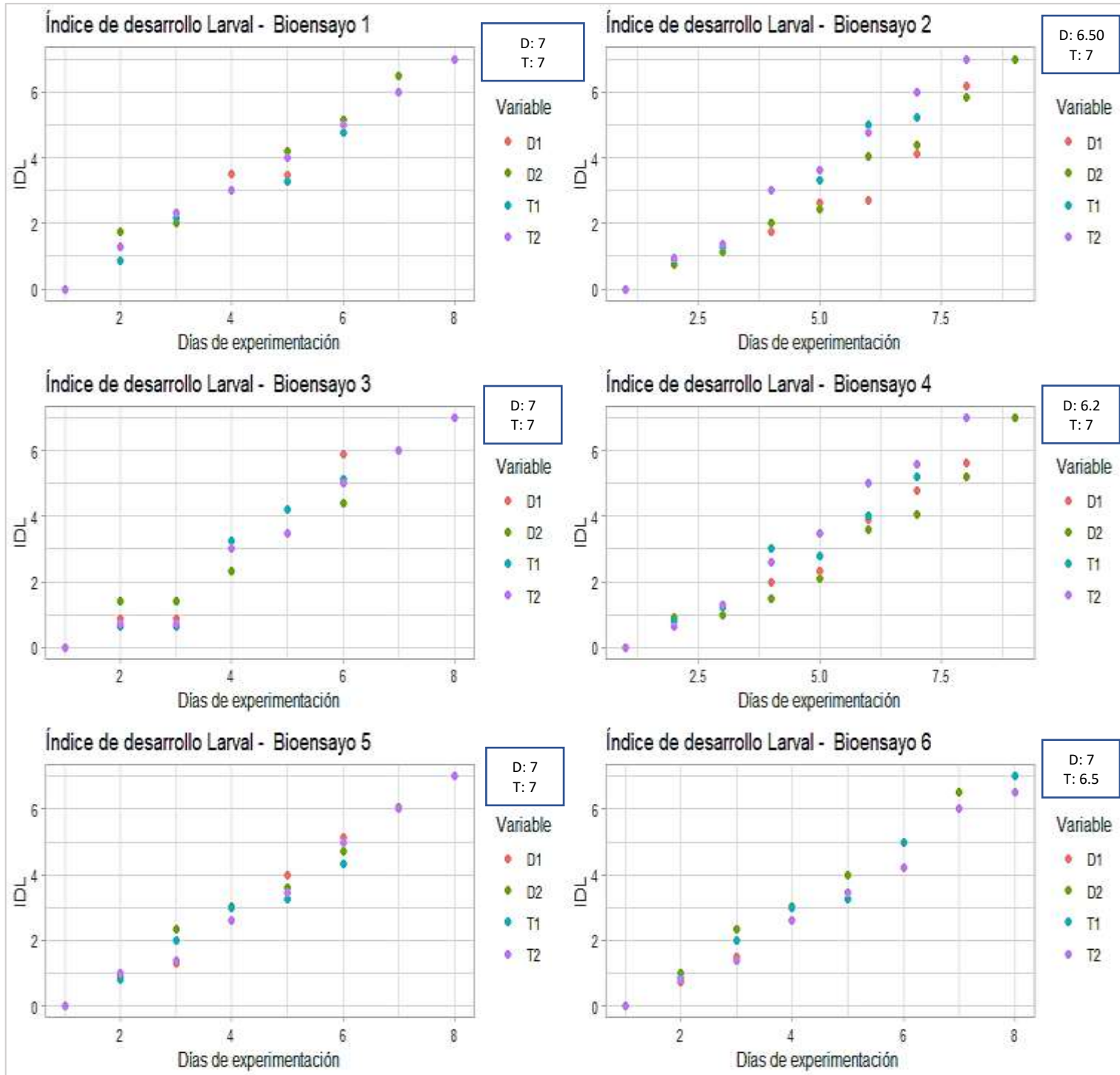
Fuente: Elaboración propia

- **Relación de desarrollo larval de *Litopenaeus vannamei* de nauplio V a Post larva.**

Según los datos obtenidos en la Gráfica 6, se observaron curvas correspondientes al índice de desarrollo larval del camarón, sometidos al control (*Thalassiosira* - T1 y T2) y al tratamiento (*Dunaliella spp.* - D1 y D2) de microalgas. Se observó que los cambios morfológicos en *Litopenaeus vannamei* no difieren significativamente entre *Thalassiosira* y *Dunaliella spp.*, ya que las medias promediadas de los estadios larvales para cada tratamiento (D1 = 3.28124, D2 = 3.31588, T1 = 3.27504, T2 = 3.29667) y las medianas (D1 = 3, D2 = 3.033, T1 = 3.13, T2 = 3.25) son similares. Se calculó el valor del índice de desarrollo larval final promedio de todos los bioensayos, dando como resultado 6.78 para *Dunaliella spp.* y 6.91 para *Thalassiosira* (Gráfica 7).

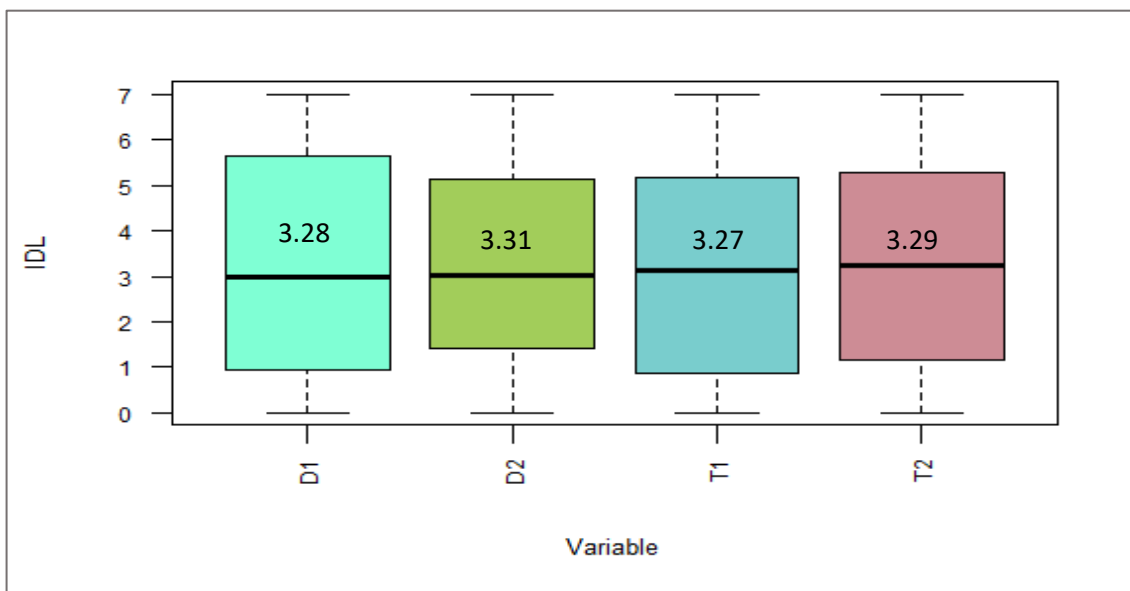
La prueba de Kruskal-Wallis no mostró diferencias significativas entre las repeticiones de cada microalga (valor p = 0.8009), y la prueba de Mann-Whitney

determinó que no hubo diferencias notables entre las especies ni por el número de bioensayos realizados ($W = 47925.3$, valor $p = 0.8826$) (Anexo II). Esto evidenció que tanto el control como el tratamiento con las diferentes microalgas no influyeron de manera significativa en el desarrollo larval del camarón. (Anexo II)



Grafica 6. Índice de desarrollo larval de *Thalassiosira* (T) y *Dunaliella spp* (D) en seis bioensayos diferentes siendo así su IDL final de cada los bioensayos realizados Bioensayo 1 D: 7 - T 7; Bioensayo 2 D: 6,50 - T 7; Bioensayo 3 D:7 - T: 7, Bioensayo 4: D:6.20 - T :7; Bioensayo 5 D: 7 - T;7 y Bioensayo 6 D:7 – T: 6.5.

Fuente: Elaboración propia



Grafica 7. Relación del índice de desarrollo larval y las corridas de las microalgas en la experimentación.

La **Gráfica 8a y 8b** representa el promedio de supervivencia de cada estadio de *Litopenaeus vannamei* y la concentración de células de cada especie de microalga. Se observó que el número de células/ml de las microalgas *Dunaliella spp* fue de 64,415; Z = 49,550; M = 43,639; PL = 37,892, y se aplicó por duplicado para mantener la densidad celular. Para *Thalassiosira*, los valores fueron NV = 59,200; Z = 51,792; M = 43,417; PL = 36,983. En relación con los porcentajes de supervivencia promedio de cada uno de los bioensayos, *Dunaliella spp* presentó un 100% en el estadio N, 97.17% en Z, 95.75% en M y 93.042% en PL, mientras que para *Thalassiosira*, los valores fueron de 100% en NV, 96.833% en Z, 94.917% en M y 92.25% en PL. Además, se detallan los valores de la

concentración celular de los 6 bioensayos realizados en cada uno de los estadios en la tabla 9 y la supervivencia en el estadio de post-larva en la tabla 8.

Tabla 7. Detalles de la supervivencia de post-larva en cada uno de los bioensayos.

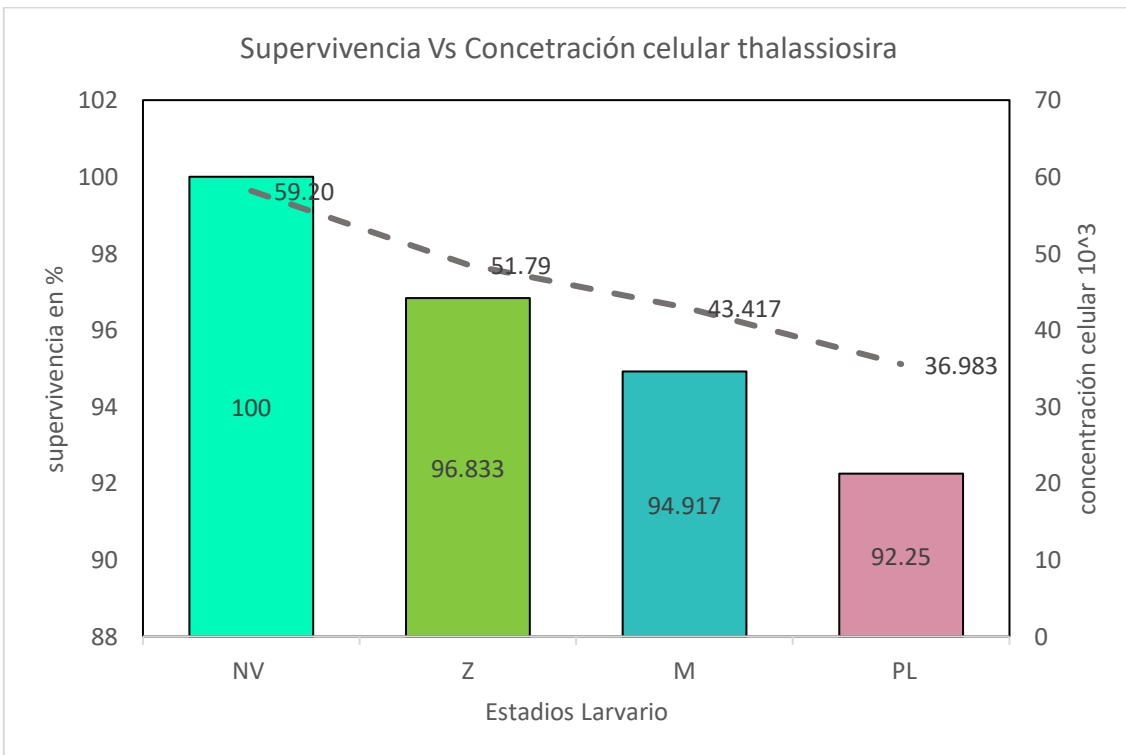
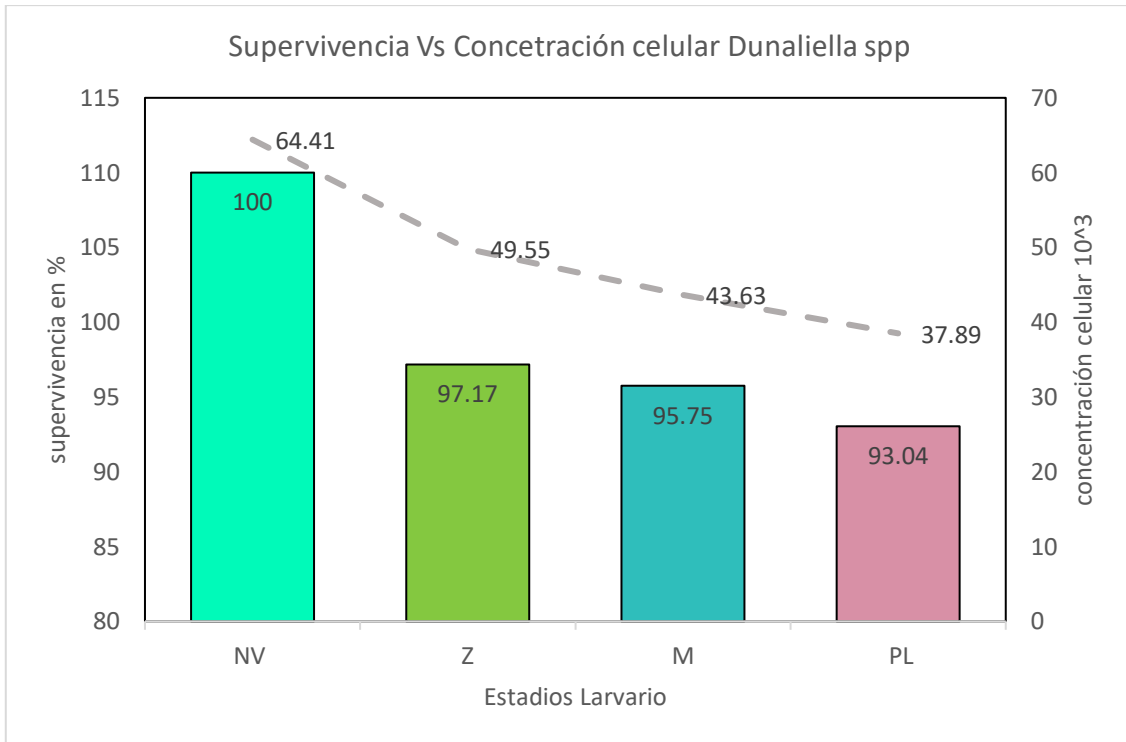
Tabla de Supervivencia de Estadios de Post-larva				
	D1	D2	T1	T2
Bioensayo 1	94	94	93	93
Bioensayo 2	92	93	90	91
Bioensayo 3	94	95	93	93
Bioensayo 4	92	89	91	90
Bioensayo 5	94	93.5	93	94
Bioensayo 6	93	93	92	94
Promedios 1	93.166	92.916	92	92.5
Promedios 2	93.042%		92.25%	

Fuente: Elaboración propia

Tabla 8. Detalles de la concentración celular de cada uno de los bioensayos en cada uno de los estadios larvarios de experimentación ver tabla general (Anexos 11 pag 93).

Concentración celular cel/ml promediado de NV- PL								
	Nauplio V	Zoea I	Zoea II	Zoea III	Mysis I	Mysis II	Mysis III	Post-larva
D1	63.333	55.500	47.330	44.333	47.000	38.333	43.333	37.367
D2	65.500	57.500	49.000	43.667	44.833	43.667	42.667	38.417
Promedio	64.417		49.556			43.639		37.892
T1	60.567	56.000	51.660	39.667	45.333	48.000	39.667	37.467
T2	57.833	62.160	54.330	46.917	35.333	47.167	45.000	36.500
Promedio	59.200		51.792			43.417		36.983

Fuente: Elaboración propia



Grafica 8. A y b Concentración celular de microalgas VS supervivencia de *Litopenaeus vannamei*

Fuente: Elaboración propia

Para las observaciones microscópicas en cada uno de los estadios se registraron los datos de contenido intestinal los datos fueron promediados de los 6 bioensayos realizados para las dos microalgas de estudio *Dunaliella spp.* y *Thalassiosira*, se demuestra los criterios para el control y calidad de larvas no fueron significativamente diferentes entre ambas microalgas (ver tabla general en anexos 7- 10 tabla genera pag.86).

Tabla 9. Criterios de observación de contenido intestinal

Tabla general de las observaciones microscópicas				
Criterios de contenido intestinal	Tratamientos			
	D1	D2	T1	T2
Lleno	84%	92%	82%	93%
Moderado	16%	8%	18%	7%
Vacío	0%	0%	0%	0%

Fuente: Elaboración propia

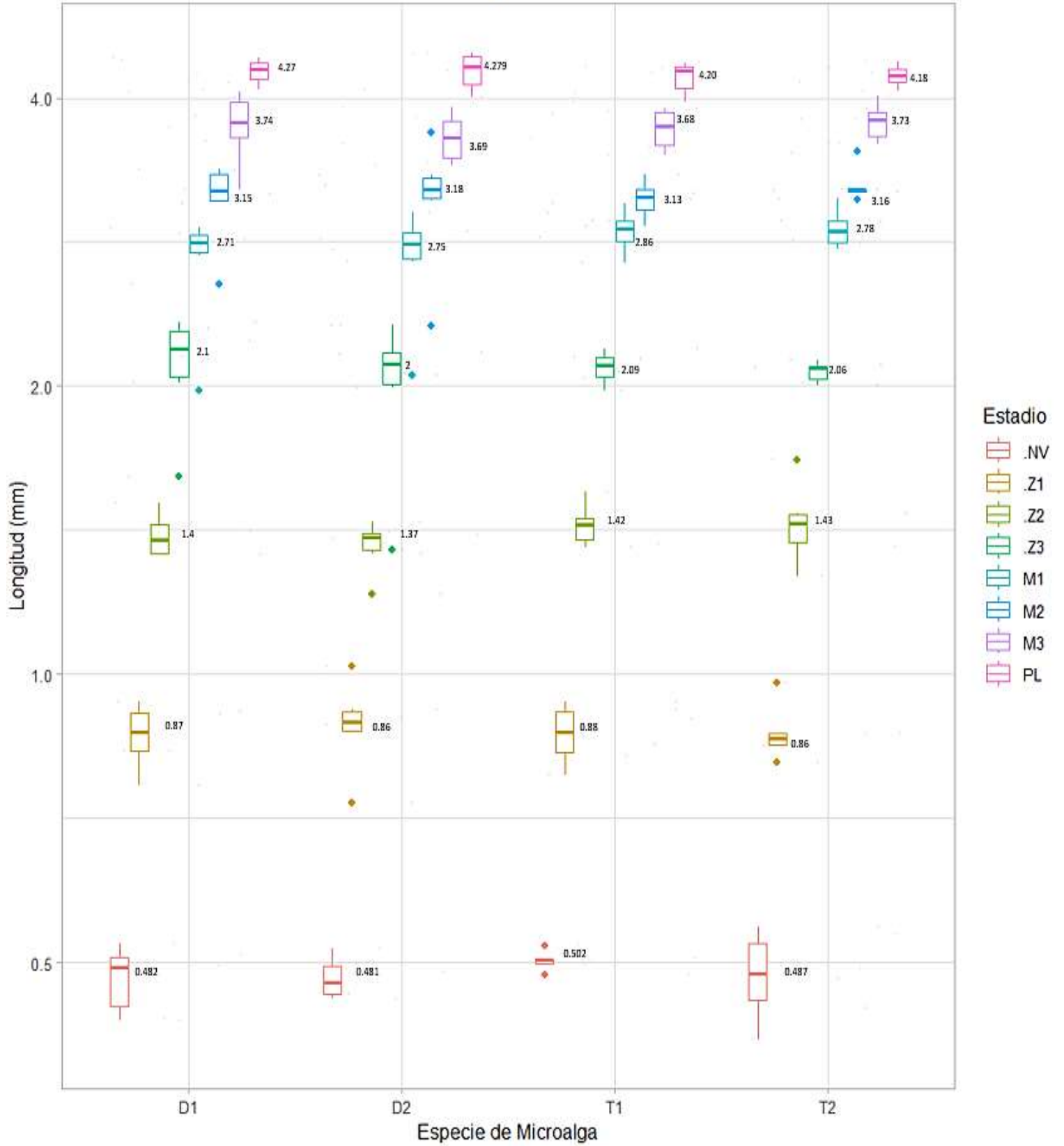
- **Evaluación el desarrollo y crecimiento de larvas de camarón *Litopenaeus vannamei* de nauplio V a Post- larva**

Se realizo pruebas de normalidad y homogeneidad Levene de varianza previo a la utilización de los análisis de estadísticos.

La comparación del efecto de microalga enriquecida con carotenos y la microalga comercial, se muestra mediante la evaluación del desarrollo y crecimiento de las larvas comparando sus estadios y subestadios en los 6 bioensayos realizados en la **Grafica 9**, que detalla los resultados por repetición y especie de microalgas. A partir de los datos de longitud y estadio de *Litopenaeus vannamei*, se observa que, en las repeticiones de los tratamientos, las larvas de camarón tienen un desarrollo y longitudes similares entre los de Zoea y Mysis, pero que difieren en las etapas de Nauplio y Post-larva entre especies de microalgas (**Grafica 10**) En este sentido, la prueba de Mann Whitney realizada indicó que no existen diferencias significativas de longitud entre los estadios y subestadios de

Litopenaeus vannamei por especie de microalga ($W = 1131$, p -valor = 0.8811), así mismo la prueba de Kruskal-Wallis no presentó cambios significativas entre las repeticiones de cada microalga (p -valor = 0.466) respectivamente en cada uno de los estadios larvarios (Anexo III). Esto demuestra que tanto la microalga comercial como la microalga estresada *Dunaliella spp.* tienen igual beneficio para alimentar a larvas de camarón.

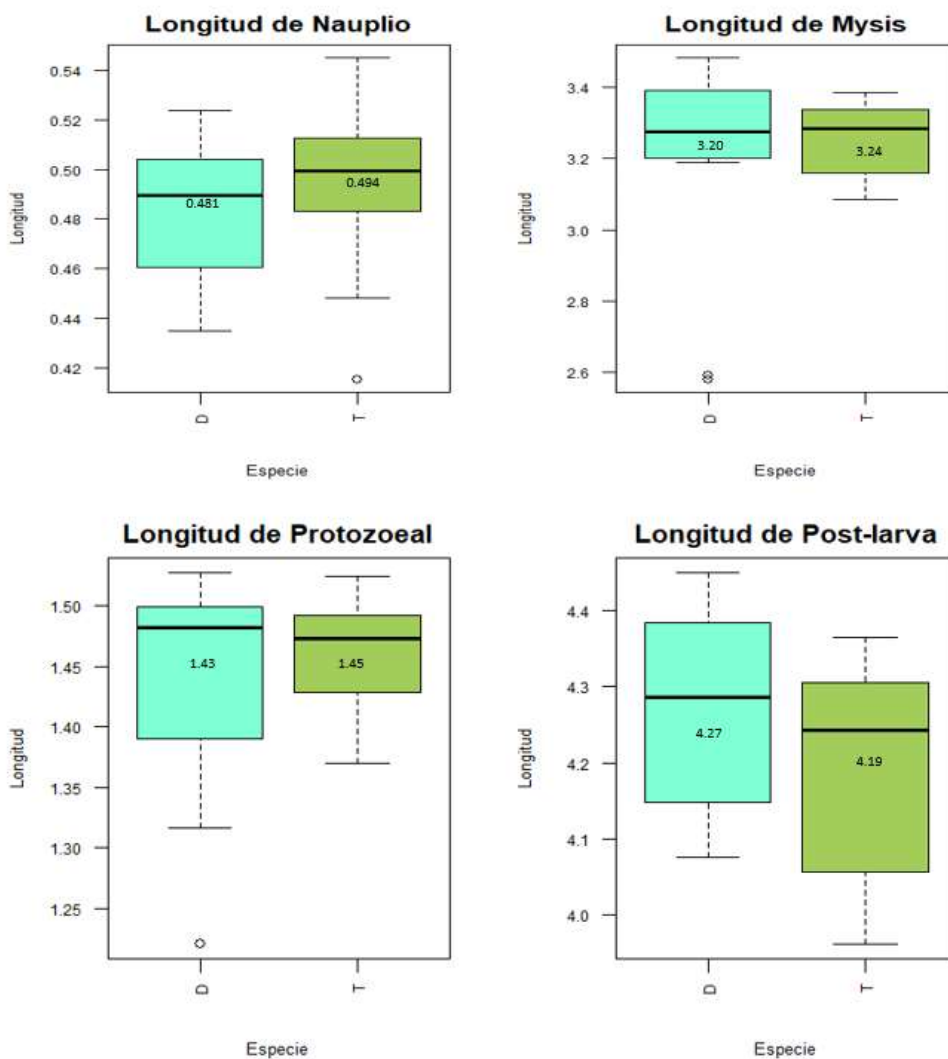
Longitud de los diferentes estadios de *Litopenaeus vannamei*



Grafica 9. Longitud de los estadios de *Litopenaeus vannamei* con cada microalga, caja de bigotes de cada estadio de camarón según las especies de microalgas evaluadas (ver tabla en anexos 21 pag 94) de (máximo longitudinal= max), (minino=min), (media = \bar{x}), Tratamientos *Dunaliella spp.* (D1- D2) y *Thalassiosira* (T1- T2) .

Fuente: Elaboración propia

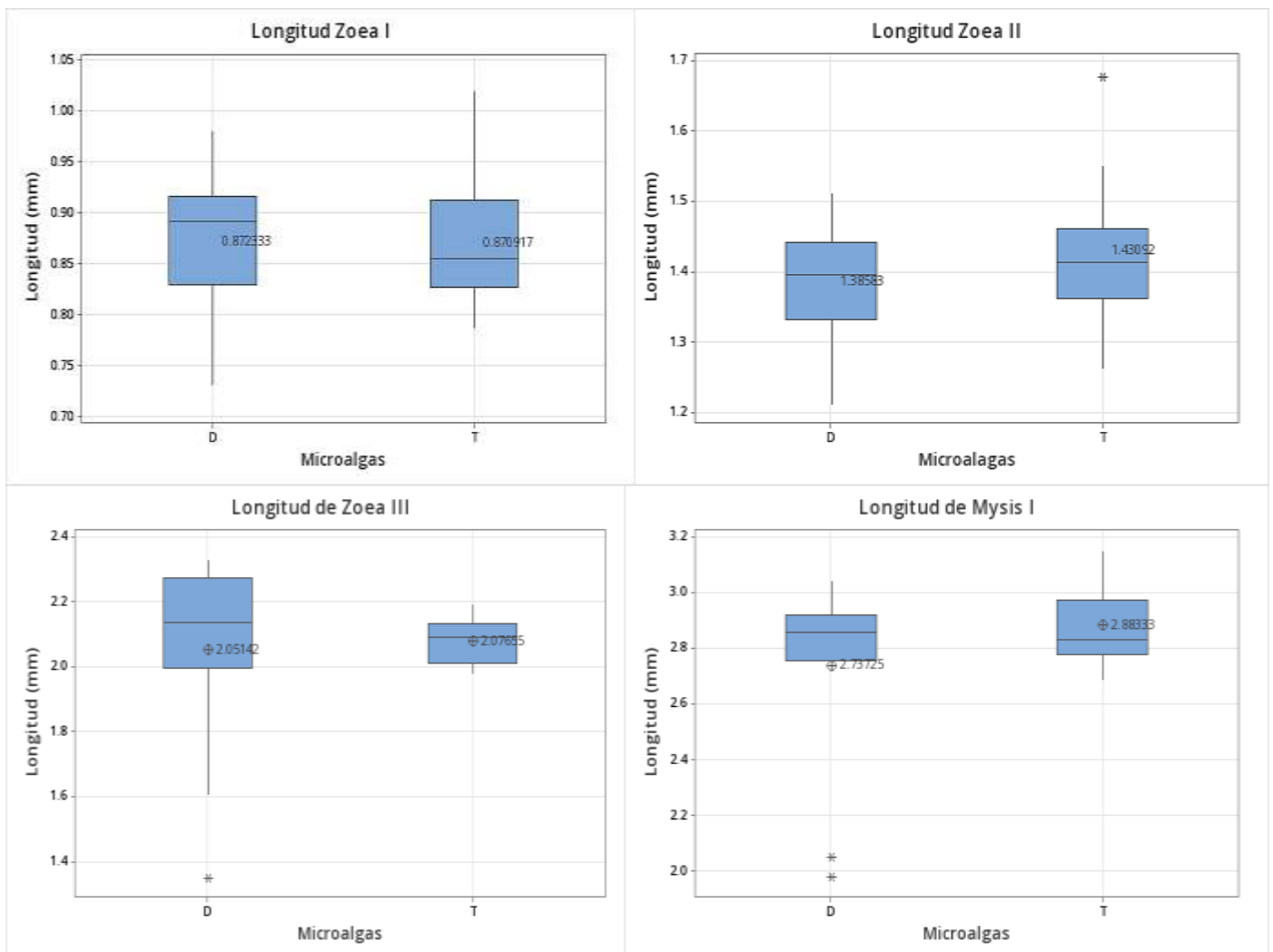
Se muestran las cajas de bigotes de cada estadio de camarón según las especies de microalgas evaluadas, la estadística no paramétrica de Mann Whitney para nauplio p-valor=0.383, zoea p-valor=0.802, mysis p-valor=0.861, post larvas p-valor=0.141.

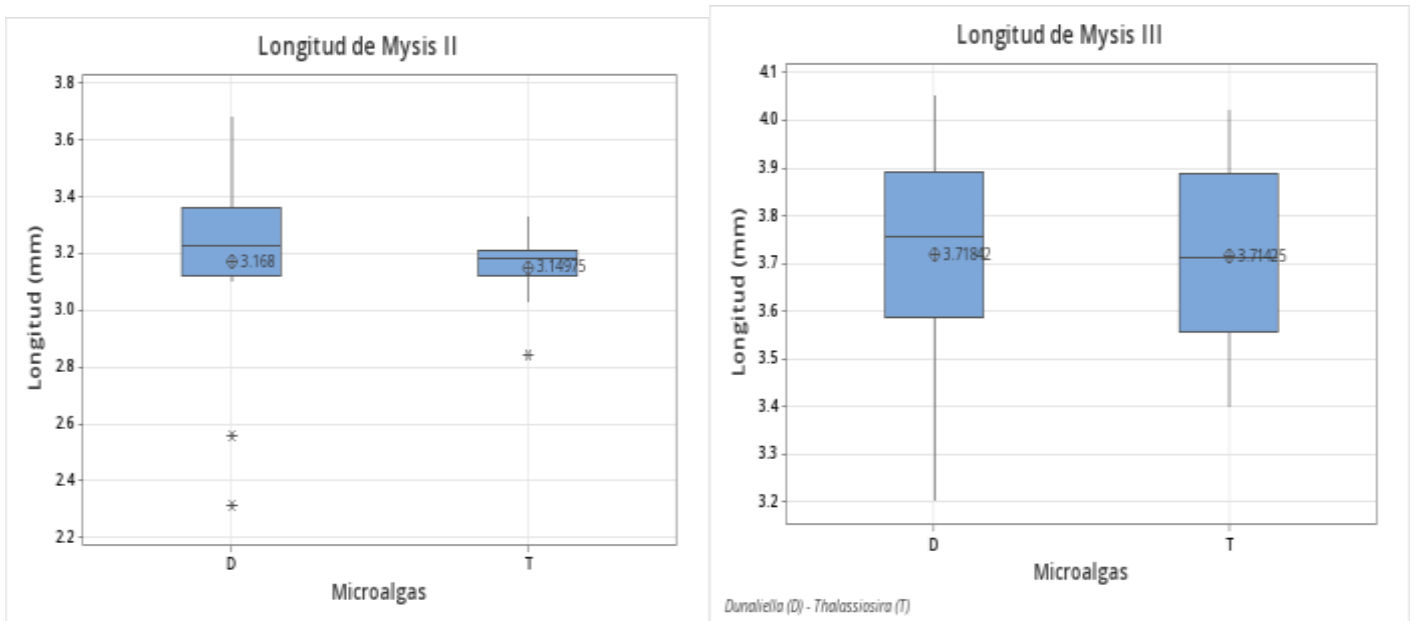


Grafica 10. Longitud en los estadios nauplio, zoea mysis y post-larva de todos los bioensayos realizados por especies de microalgas.

No se describieron diferencias significativas para ninguno de los tratamientos de cada uno de los subestadios de zoea y mysis de todos los bioensayos realizados. Este hecho se demuestra en la (Grafica 11) para cada uno de los tratamientos al aplicar la prueba no paramétrica *Kruskal Wallis* para zoea I -valor=0.385, zoea II p-valor=0.443 , zoea III p-valor=0.711 , mysis I p-valor=0.361 , mysis II p-valor=0.443 y mysis III p-valor=0.443 y *Mann Whitney* para zoea I p-valor=0.644 , zoea II p-valor=0.285 , zoea III p-valor=0.402 , mysis I p-valor=0.707 , mysis II p-valor=0.225 y mysis III p-valor=0.840, evidenciando que no hay variaciones notables entre tratamiento y especies de microalgas. Luego analizando sus medias promediadas de los bioensayos realizados se describió diferencias mínimas entre longitudes en cada subestadio. (Anexos 13 19 pag. 92) se muestra cajas de bigotes para cada subestadio en cada uno de los bioensayos por tratamiento.

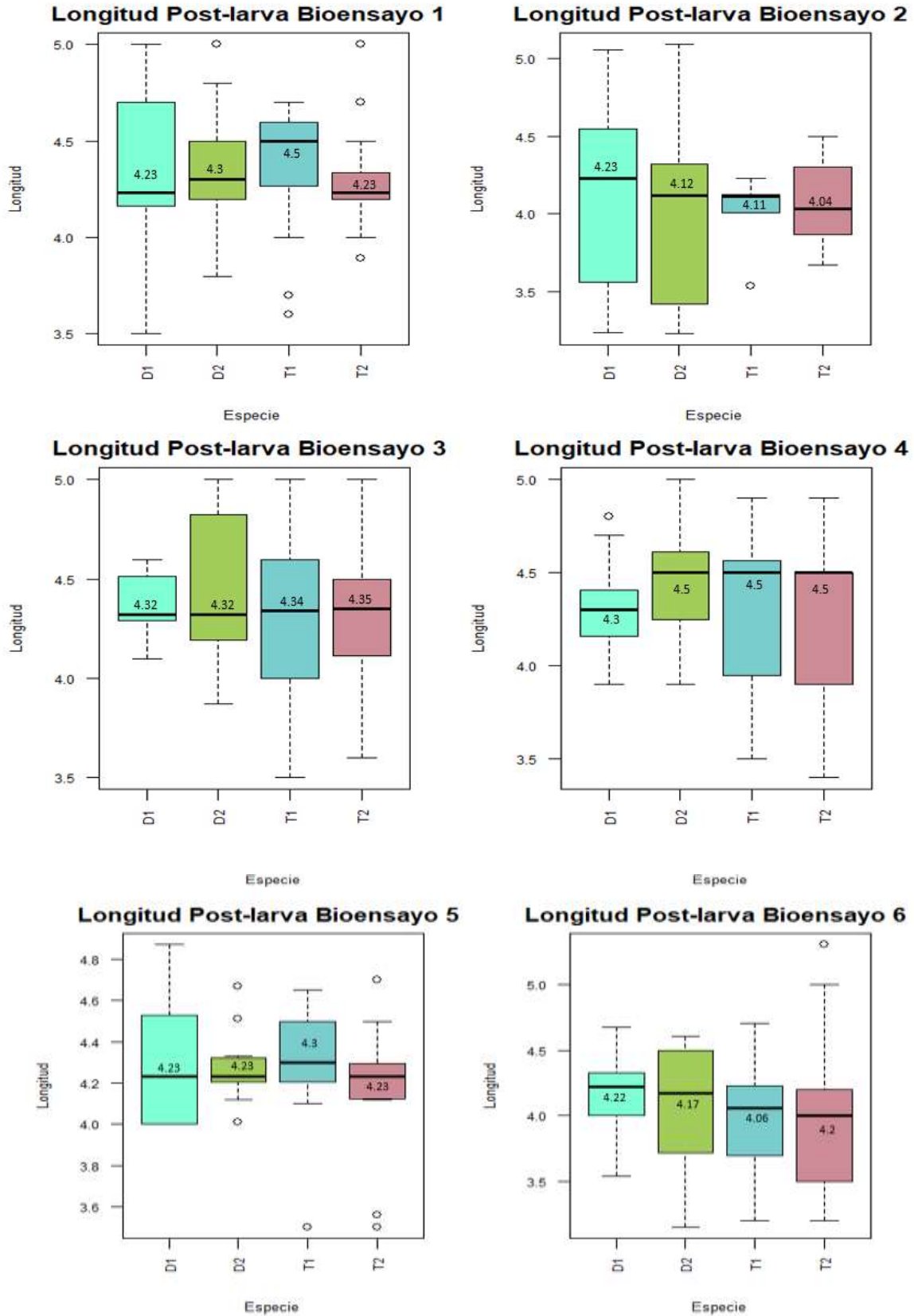
Subestadios de Zoea y Mysis





Grafica 11. Longitud de los camarones en subestadio de zoea y mysis de todos los bioensayos realizados.

La Gráfica 12 muestra cajas de bigotes con los datos de longitud de los camarones en el estadio de post-larvas según las repeticiones de cada tipo de microalga. Se observó que los valores mínimos de longitud para *Dunaliella spp.* (mín = 3.48 mm) y *Thalassiosira* (mín = 3.6 mm) difieren entre sí. Además, se calculó que el valor máximo longitudinal para *Dunaliella spp.* (máx = 5.70) es mayor que el de *Thalassiosira* (máx = 5) (Tabla 11). En consecuencia, las pruebas estadísticas realizadas respecto al estadio de post-larva mostraron que Kruskal-Wallis no presentó diferencias significativas entre las repeticiones de cada microalga (p-valor = 0.5871) (Anexo IV).



Grafica 12 Longitud de cada especie y su repetición según cada ensayo según su longitud en el estado de post-larva

Tabla 10. Medidas de tendencia central de las repeticiones de las especies de las microalgas del estadio de post-larva en los seis bioensayos.

Bioensayo	Etiqueta	Mínimo	Máximo	Promedio	Q1	Q2	Q3
1	D1	3,50	5,00	4,39>	4,12	4,23	4,8
	D2	3,8	5,00	4,35	4,2	4,3	4,5
	T1	3,6	4,70	4,36	4,23	4,5	4,6
	T2	3,89	5,00	4,3	4,2	4,231	4,32
2	D1	3,48	5,12	4,15	3,54	4,23	4,55
	D2	4,19	5,53	4,08	3,40	4,12	4,50
	T1	4,12	4,60	4,05<	4,01	4,11	4,14
	T2	4,01	4,50	4,06	3,85	4,04	4,31
3	D1	4,29	4,6	4,38 >	4,29	4,32	4,53
	D2	4,19	4,83	4,32	4,19	4,32	4,87
	T1	4,30	4,57	4,32	4	4,34	4,7
	T2	4,30	4,8	4,37 >	4,03	4,35	4,5
4	D1	4,70	5,23	4,31	4,12	4,3	4,49
	D2	4,50	5,70	4,44	4,2	4,5	4,7
	T1	4,36	5,00	4,29	3,7	4,5	4,6
	T2	4,50	5,00	4,24	3,6	4,5	4,5
5	D1	4,50	5,00	4,29	4	4,23	4,56
	D2	4,50	5,00	4,27	4,2	4,23	4,32
	T1	4,50	5,00	4,25	4,2	4,3	4,5
	T2	4,23	5,00	4,19	4,12	4,23	4,35
6	D1	4,12	5,00	4,16	4	4,22	4,33
	D2	4,10	5,00	4,08	3,70	4,17	4,5
	T1	4,00	5,00	4,02<	3,68	4,06	4,30
	T2	3,99	5,00	3,96 <	3,5	4	4,2

Fuente: Elaboración propia

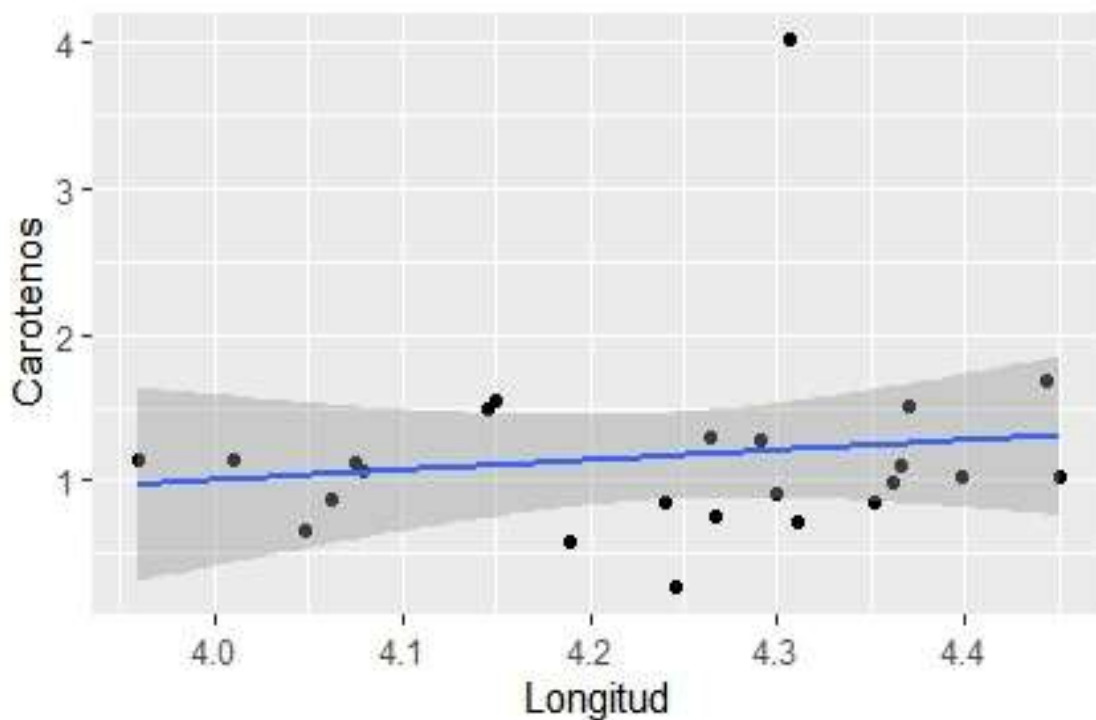
Los análisis de carotenos en las larvas de camarón resultaron fundamentales para determinar las diferentes tonalidades obtenidas al aplicar ambas microalgas, permitiendo así comparar su influencia en la pigmentación $\mu\text{g}\cdot\text{mL}$ de estos organismos. En este contexto, se utilizó la longitud del estadio más avanzado de esta especie de camarón para calcular el promedio de las repeticiones de cada especie, con el fin de luego calcular la correlación de Pearson (p-value 0.516) en relación a la concentración de caroteno (Gráfica 13). Posteriormente, en la Tabla 12 se detallan los porcentajes de carotenos de las larvas para cada uno de los tratamientos. Se observa que la concentración mínima de caroteno (0.87 mg/L) se registró en el promedio de longitud de 4.25 mm del camarón para

la microalga *Thalassiosira*, mientras que la concentración más alta de caroteno fue de 1.46 mg/L en el promedio de longitud de 4.19 mm para *Dunaliella spp.* El análisis estadístico indicó que no existe una correlación significativa entre la longitud de *Dunaliella spp* y la concentración de caroteno (p -valor = 0.2035, IC=95%).

Tabla 11. Valores de carotenos de cada uno de los tratamientos en $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

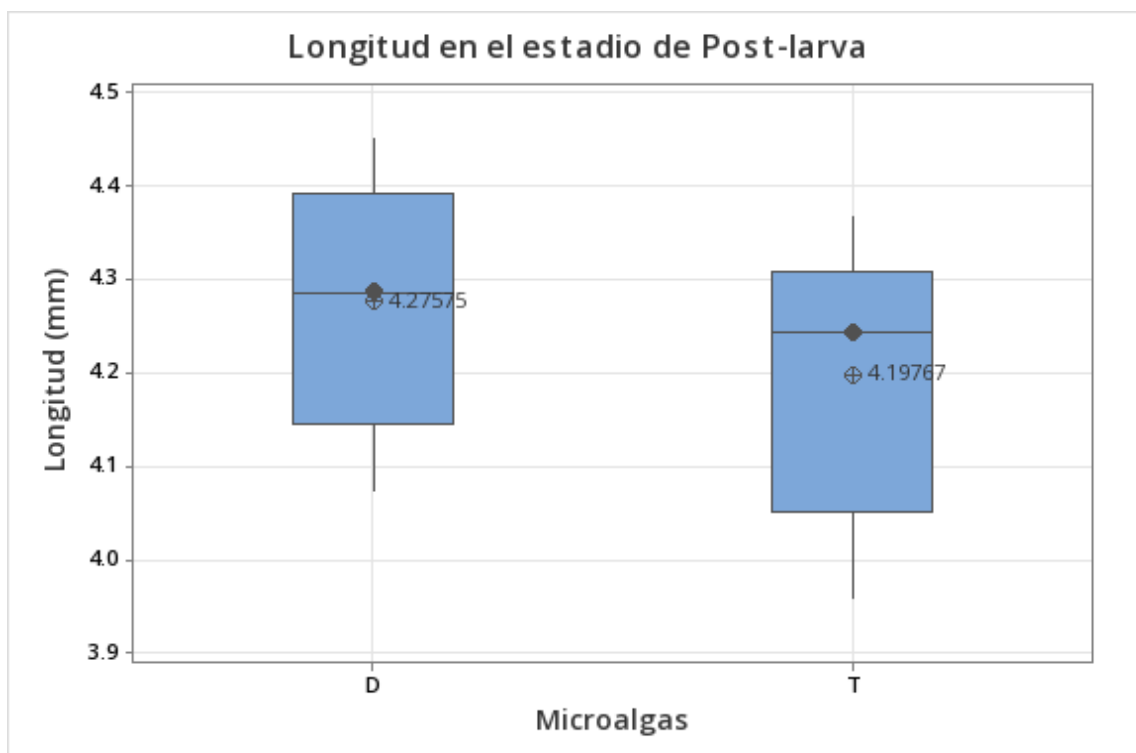
Concentración mg/L de carotenos de larva de camarón en el estadio de post-larva								
Tratamiento	Bioensayo 1	Bioensayo 2	Bioensayo 3	Bioensayo 4	Bioensayo 5	Bioensayo 6	Promedio	Media
D1	1.02	1.5	1.51	4.01	1.3	1.55	1.815	1.460
D2	0.99	1.07	1.02	1.69	0.75	1.12	1.10	
T1	0.86	0.67	0.71	1.27	0.27	1.14	0.82	0.86
T2	0.92	0.87	1.11	0.85	0.58	1.15	0.913	

Fuente: Elaboración propia

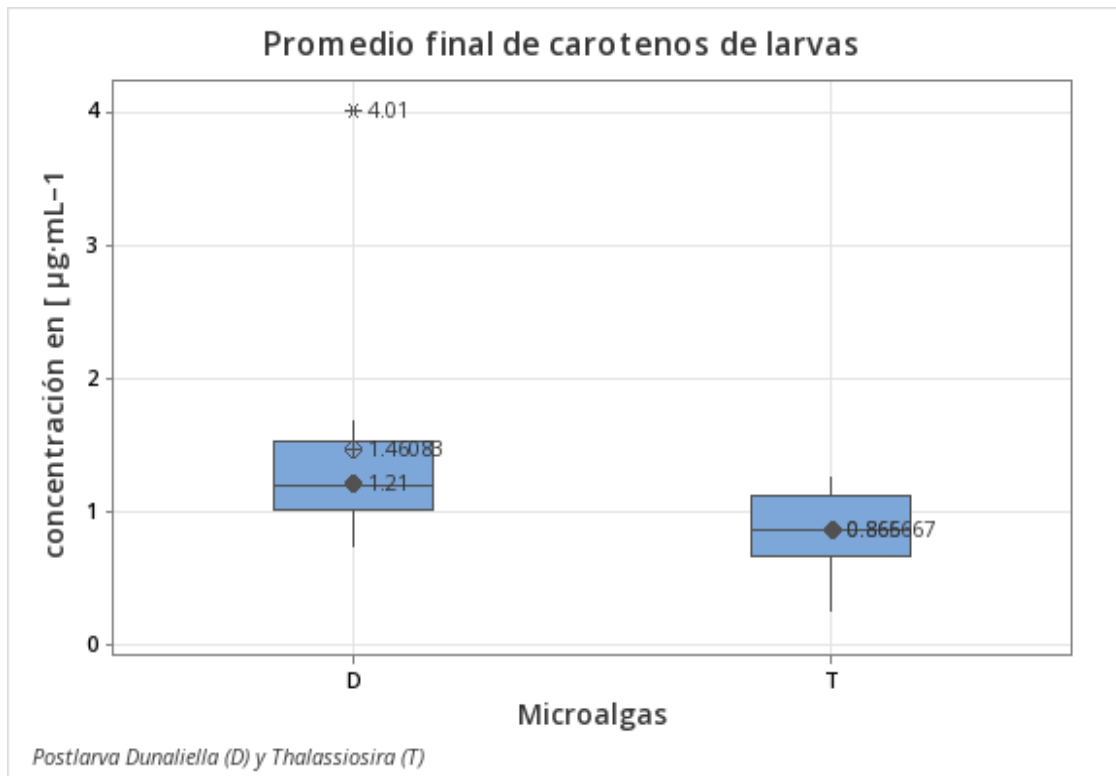


Grafica 13. Correlación de Pearson de los longitud y carotenos de larvas de camarón

Se comparo las longitudes medias promedio de post-larva de las dos microalgas *Dunaliella spp.* y *Thalassiosira* ya que con los datos mostrados en la Grafica 14 de los bioensayos realizados arrojaron diferencias mínimas obteniéndose 4.27 mm y 4,19 mm respectivamente. De igual forma en la gráfica 15 se presenta el promedio de carotenos adquiridos en las larvas de camarón con las dos microalgas de estudio siendo *Dunaliella spp.* la que muestra mayor porcentaje de carotenos siendo 1.46 mg/l, por lo contrario de *Thalassiosira* 0.886 mg/l respectivamente.



Grafica 14 Longitud y concentración de caroteno de cada especie D (*Dunaliella spp.*) y T (*Thalassiosira*).



Fuente: Elaboración propia.

Estos hallazgos sugieren que no se encontraron diferencias significativas en el Índice de Desarrollo Larval (IDL) con ($p > 0.005$) y en cuanto a longitud total entre los diferentes tratamientos con microalgas aplicadas y estadios larvarios no se observaron valores relevantes significativos con ($p\text{-valor} = 0.8811$). Además, la tasa de supervivencia más alta se observó en las larvas alimentadas con *Dunaliella spp.* (93.04%), la cual fue similar a la obtenida con *Thalassiosira* (92.25%). Al analizar el estadio de post-larva, no se encontraron diferencias significativas entre las microalgas, sin embargo, analizando sus medias existe una diferencia notable entre las repeticiones de cada microalga. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula y se rechaza la hipótesis alternativa.

10. DISCUSIONES

(Sedjati et al., 2019) Cosecho el cultivo de *Dunaliella* en el 6 día fase verde, con parámetros de temperatura ambiente de 24°C, en consideración de su fase pico logarítmica, la mayor producción de carotenos en su estudio fue (21µg. g-1 de biomasa húmeda) con salinidad de 25 ‰, mientras que salinidad de 35‰ fue de (9.54 µg. g-1 de biomasa húmeda). Como demuestra este estudio con parámetros de temperatura ambiental de variable, deficiencia de nitrógeno y salinidad de 35‰ en el 5 día de estrés *Dunaliella spp* con cambios morfológicos notables su mayor contenido de carotenos fue de 4,78 mg/l.

El estudio de (Tinoco et al., 2015) caracterizo el uso de microalga *Dunaliella* como suplemento alimenticio, los pigmentos expresados en coloración amarillo, con condiciones extremas de 5 a 40 °C, 40 °C almacenadas al aire con actividad de agua menor la degradación de carotenos se produce más rápido. De acuerdo con los cambios morfológicos y celulares de la microalga en este estudio con temperatura ambiental de 30° a 40 °C y coloración amarilla.

No obstante (García et al, 2018) demostró que la concentración de carotenos de la microalga *Dunaliella sp.* sin estrés es de 0.157 mg/l – 0.52 mg/l, basado en estos valores referenciales del autor, se destaca que en la presente investigación coincide con la cantidad de carotenos de la microalga sin estrés 0.43 mg/l, aumentando diariamente de los bioensayos realizados. (López et al., 2013) con el medio de cultivo f/2 en su cultivo exterior de 7- 8 días lo carotenos totales fueron 1.80 mg/l en cultivos normales y temperatura de 29 °C. lo que se demuestra en el este estudio que en los primeros días de estrés se expresan proporcionalmente de 0.43 hasta 1.5 mg/l de carotenos obtenidos respectivamente.

Contrario a lo que demuestra (Yimei Xi, 2022) en su estudio con condiciones controladas dió a conocer que la microalga verde *Dunaliella spp.* es un organismo adecuado para estudiar la señalización del estrés debido a que carece de capas de pared celular, utilizó luz intermitente de 50 Hz con la luz continua obtuvo de biomasa húmeda con valores altos de carotenos de 10 mg/l en 20 días y en 5 días de 4.20 mg/l sin estrés.

Así mismo (González, 2022) al estresar las microalgas 295 molphotons con fotoperiodo de 12 h luz y oscuridad obtuvo en 20 días 5, 7 mg/ml como máximo valor durante su experimentación, la expresión de carotenos dependerá de las condiciones de cultivo al que se encuentren expuestas y el tipo de ambiente que los rodea.

Así mismo otro aporte a la investigación corresponde a (Escobedo et al., 2021) y demás antecedentes de diferentes investigaciones mencionan que la iluminación artificial, la temperatura y luz solar son factores claves que puede mejorar la cantidad de biomasa de microalgas, mejorando la fotosíntesis y permitiendo aumentar los productos de interés en las microalgas.

Por otro lado, La investigación de López, 2017 y colaboradores junto con la información científica de (Medina et al.,2021) coinciden que las altas concentraciones de carotenos en la microalga *Dunaliella spp.* mejora la respuesta del sistema inmune del camarón lo que conlleva a organismo más resistentes a diferentes enfermedades. De la misma forma (Madhumathi & Rengasamy, 2011) observaron la microalga *Dunaliella* viva junto a los pellets a 35 ppt durante 20 días de estrés a temperatura ambiente (27 - 30°C), en el alimento de *Litopenaeus monodon*, donde obtuvieron como control positivo obtuvieron 100 % supervivencia y crecimiento igual en las diferentes concentraciones de microalgas 2×10^4 , 5×10^4 , 10×10^4 cel/ml. Sin embargo, durante la investigación actual se obtuvo una concentración de celular de 6×10^4 , 5×10^4 , 4×10^4 y 3.8×10^4 cel/ml por los estadios de nauplio, mysis y post-larva, respectivamente de los bioensayos realizados.

Los resultados de (Godínez et al., 2005) aplicando diferentes concentraciones de distintas microalgas, mencionan que estas influyen en el índice de desarrollo larval junto con las sub alimentación aplicada sobre la cual las larvas se encuentran expuestas siendo así la densidad celular 90.000 cel/ml con una supervivencia de 92% como resultado en su investigación. De acuerdo con los aportes de esta investigación el índice de desarrollo larval en cada uno de los estadios se puede observar que en la corrida 2 y 4 los valores fueron menor en cuanto a la concentración celular promediada de los estadios larvarios de 54.000 y 46.000 cel/ml y supervivencia de 90 y 89 % que en las otras corridas experimentales. Lo cual coincide con los resultados de la investigación referencial.

Los estudios de (Piña et al., 2004) y (Jaime et al., 2000) examinaron el crecimiento y desarrollo de larvas de camarón *Litopenaeus vannamei* en las etapas desde zoea I hasta mysis III, utilizando diferentes tratamientos de microalgas diatomeas y clorofitas, rotíferos y larvas de artemia con diversas concentraciones celulares. A pesar de aplicar concentraciones variables de microalgas, no se encontraron diferencias significativas en la supervivencia y crecimiento de las larvas, con una longitud promedio de mysis III de 3.6 mm y un Índice de Desarrollo Larval (IDL) de 6.2, con una supervivencia del 50%. En cuanto a los promedios generales del IDL, *Dunaliella spp.* en etapa de mysis con longitud de 3.20 mm mostró un IDL de 6.78 con una supervivencia del 93.04%, mientras que *Thalassiosira* 3.24 mm presentó un IDL de 6.91 con una supervivencia del 92.04%.

En contraste, (Torres-Ochoa et al., 2019) utilizaron tanques de cilindro de 70 litros con 11,900 larvas de camarón *Penaeus vannamei*, aplicando microalgas endémicas del Golfo en diversas combinaciones con probióticos. Observaron una mayor supervivencia y un tamaño máximo en mysis I de 3 mm con la mezcla de microalgas y probióticos,

mientras que los tratamientos solo con microalgas no mostraron diferencias significativas. Además, en un estudio con tanques experimentales de 1 tonelada y densidades de siembra de 90,000 larvas alimentadas con dos microalgas en diferentes concentraciones, junto con dietas comerciales, no se encontraron diferencias significativas en los bioensayos realizados.

El estudio realizado por (Jaime, 2006) utilizó una combinación de harina de spirulina y microalgas de varios géneros, incluida *Dunaliella*, aplicadas a *L. schmitti*. En cuanto a la longitud total, se encontraron diferencias significativas en el aumento de tamaño del crustáceo, que varió entre 1.98 y 3.16 mm. Además, el estudio de (Pérez & Pasquier, 2007) & (Pérez, 2007) demostraron que el uso de microalgas *Tetraselmis*, tanto congeladas como vivas, resultó en una mayor supervivencia y diferencias significativas en el crecimiento longitudinal en comparación con la dieta viva. Específicamente, se observaron longitudes de 0.5 mm en Nauplio V, 0.95 mm en Zoea I, 1.5 mm en Zoea II y 2.5 mm en ZIII. En conclusión, estos estudios destacan que la talla en cada uno de los estadios, desde nauplio hasta post-larva, varía dependiendo de la alimentación proporcionada.

Este estudio presenta los resultados de los promedios de los 6 bioensayos realizados utilizando microalgas clorofitas *Dunaliella spp.* y diatomeas *Thalassiosira* por cada estadio nauplio 0.48 mm, zoea 1.43 mm, mysis 3.20 y post-larva 4.27 así mismo para el tratamiento de *Thalassiosira* nauplio 0.494 mm, zoea 1.45mm, mysis 3.24mm y post-larva 4,19 respectivamente, de igual modo para los subestadios de Zoea y Mysis para *Dunaliella spp* Zoea I 0.87 mm Zoea II 1.38 mm Zoea III 2.05 mm y *Thalassiosira* Zoea I 0.877mm, Zoea II 1.43 mm Zoea III 2.07mm respectivamente. Semejante a los valores

del estudio de (Jamali et al., 2015) en cuanto al crecimiento y supervivencia de larvas de camarón *Litopenaeus vannamei* desde el estadio de zoea I hasta zoea III, alimentando con diferentes microalgas diatomeas y clorofitas, donde lo mejores resultados obtuvo de longitud con las mezclas de *Tetraselmis* Zoea I 1.05 mm, Zoea III 2,20 mm, Zoea II 3.08 mm y diatomeas *Chaetoceros* y *Isochryis* Zoea I 1.05 mm, Zoea III 2,32 mm, Zoea II 4,35mm , utilizando similares densidades celulares de 10.000 cel/ml y 50.000 cel/ml obtuvo mayor supervivencia, para que se tenga un cultivo exitoso varios autores mencionan que utilizar dietas mixtas de microalgas mejora la supervivencia y calidad nutricional de larvas de camarón *Litopenaeus vannamei*.

10. CONCLUSIONES

Los análisis de carotenos totales de la microalga *Dunaliella spp.* revelaron diferencias significativas en la coloración y concentración de carotenos a medida que transcurrían los días de estrés, con una salinidad de 35 ‰ y temperaturas máximas de 40°C. Específicamente, los bioensayos 4 y 5 mostraron las concentraciones más altas de carotenos en la microalga de estudio, con 4.03 y 4.78 mg/L respectivamente.

En cuanto al índice de desarrollo larval (IDL), la inclusión de *Dunaliella spp.* como alimento microalgal para las larvas de camarón *Litopenaeus vannamei* no reveló diferencias notables en comparación con la otra microalga, *Thalassiosira*. Sin embargo, se observó un ligero retraso larval en los bioensayos II (IDL de 6.50) y IV (IDL de 6.20) con *Dunaliella spp.*, aunque mantuvo los rangos IDL en los demás bioensayos. En términos de supervivencia, *Dunaliella spp.* mostró un promedio mayor en el último estadio de post-larva, con un 93.04%, mientras que *Thalassiosira* registró un 92.25%. Ambas microalgas mantuvieron rangos similares en los criterios de observación microscópica de llenos, semillenos y vacíos.

Las variables de longitud total en cada estadio larvario de *Litopenaeus vannamei* no mostraron diferencias significativas entre las microalgas, y al comparar las medias de longitud por estadio, se evidenciaron diferencias mínimas, lo que sugiere que ambas microalgas tienen efectos y beneficios similares en la acuicultura. Por último, los valores de correlación entre los carotenos de las larvas y la longitud no mostraron una correlación significativa. En el estadio de post-larva, el tratamiento con *Dunaliella spp.* mostró una concentración promedio de carotenos de 1.46 mg/L, mientras que para *Thalassiosira* fue de 0.866 mg/L.

11. RECOMENDACIONES

- Realizar estudio a futuro de supervivencia en camaronas para determinar si los organismos alimentados con la microalga *Dunaliella spp* tienen mayor resistencia.
- Realizar bioensayos con diferentes días de estrés, solo aplicando la microalga junto con diferentes probióticos para observar cambios de coloraciones y resistencia a diferentes patógenos.
- Se propone realizar varios ensayos con densidades de siembra mayores, aplicado *Dunaliella spp* en los estadios de Zoea hasta Mysis III.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre-Hinojosa, E., Piña-Valdez, P., Garza-Aguirre, M. C., Guzmán-Ramírez, L. D., Montoya-Olvera, R., Torres-Quiroga, J. O., & Nieves-Soto, M. (2012). Efecto de las xantofilas de la flor de cempasúchil *Tagetes erecta* L. en la acumulación de astaxantina y la sobrevivencia de postlarvas del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Revista mexicana de ingeniería química*, *11*(2), 249-257. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-27382012000200004&lng=es&tlng=es.
- Alicia González Céspedes (2015). Que son las microalgas interés y uso. <https://www.cajamar.es/storage/documents/microalgas-1444391623-ca345.pdf>
- Andrade de Pasquier, G., & Pérez E., EP (2007). Comparación de métodos de estimación de parámetros de crecimiento del camarón blanco *Litopenaeus schmitti* en el occidente de Venezuela. *Interciencia*. Vol. 32, (1), 41-47. 0378-1844. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2295507>
- Antulio Prieto Arcas y Cruz Gómez Andrade (2008). Influencia De La Intensidad Luminosa Sobre El Crecimiento De Dos Cepas De *Dunaliella* Salina Aisladas De Salinas Venezolanas. *Tecnociencia*. Vol 10. [file:///C:/Users/HP/Downloads/tecnociencia,+Tecnociencia+Articulo+6+10\(1\)+08.pdf](file:///C:/Users/HP/Downloads/tecnociencia,+Tecnociencia+Articulo+6+10(1)+08.pdf)
- Arellano, E. (1993). Guías Técnicas en el cultivo de larvas de camarón. Boletín de la Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. CENAIM 1: 35-86
- Barbarito Jesús Jaime Ceballos (2006). Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales (Orientación en Acuicultura). *Tesis*, 34(47). <file:///C:/Users/HP/Downloads/dunaliella%20tesis/DISCUSIONES/JAIME%20CEBALLOS%20BARBARITO%20TESIS%20DOCTORADO%202006.pdf>

- Bárbaro Jaime, Miguel Artiles, Liana Fraga Y José Galindo (2000) Sustitución De Chaetoceros Muelleri por Chlorella Vulgaris Secada Por "Spray" En La Alimentación De Protozoos De Litopenaeus Schmitti. *Volumen 34, No. 2, 2000, Pp. 127-142*
- Ben-Amotz, A. (1993). Producción de β -Caroteno y Vitaminas por el Alga Halotolerante Dunaliella. En: Attaway, DH, Zaborsky, OR (eds) Productos naturales bioactivos y farmacéuticos. Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-2391-2_11
https://doi.org/10.1007/978-1-4899-2391-2_11
- Bermudes-Lizárraga JF, Nieves-Soto M, Flores-Higuera FA, López-Peraza DJ (2017). Supervivencia, desarrollo y crecimiento de larvas de Penaeus vannamei alimentadas con dietas tradicionales y no-tradicionales. *Rev MVZ Córdoba* ,28(1), e2682. <https://doi.org/10.21897/rmvz.2682>
- Bertha Arredondo & Domenico Voltolina (2017) Determinación de pigmentos totales por métodos espectrofotométricos. 75 (78). ISBN 9786077634218
- Brito, D ., Milani, N. y Pereira G. (2006). Tasa de filtración e ingestión de simocephalus vetulus (muller)(crustacea: cladocera) alimentada con Selenastrum capicornutum printz y Chlorella vulgaris. *Interciencia*, 31(10), 753-757. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442006001000012&lng=es&tlng=es.
- Cabrera, S., & Lara, S. (2015). Comparación del crecimiento de post-larvas de camarón blanco del Pacífico Litopenaeus vannamei, sometidas a dos condiciones experimentales: una alimentada con alimento comercial más biofloc y la otra sin biofloc (*Tesis de pregrado*). *Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León* ,43(52),. <http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/bitstream/123456789/3183/1/225664.pdf>
- Currie, D.J. 2000. Aquaculture: an opportunity to benefit mankind. *World Aquaculture*. 31(1):44-49 p.

D. Medina Félix, A.I. Campa Córdova, J.A. López Elias, L.R. Martínez Córdova G. Figueroa Preciado, E. Cortés Jacinto, A. Luna González, F. Mendoza Cano, N. Huerta Aldaz (2021). Efecto dosis/frecuencia de la administración de *Dunaliella* sp. ala dieta de *Litopenaeus vannamei* durante una infección con *Vibrio parahaemolyticus*. <https://revistabiociencias.uan.edu.mx/index.php/BIOCIENCIAS/article/view/1100/789>

Daniel E Godínez, IA, MSc; Arnulfo H Díaz, BP, MSc; María del C Gallo, MVZ, MSc.(2005). Índice de desarrollo y supervivencia de larvas del camarón azul *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson, 1871), alimentadas condiferentes concentraciones de *Chaetoceros calcitrans* (Paulsen), *Rev Col Cienc Pec Vol. ,18:1,*. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-06902005000100004

Elifonso Isirdia Pérez (2007). Evaluation of the growth and survival in of white shrimp *Litopenaeus vannamei* larvae using like food source alive and congealed microalgae. REDVET. *Revista electrónica de Veterinaria 1695-7504. Volumen VIII Número 5.* <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n050507/050706.pdf>

Enrique Gilberto Zepeda Lupio (2017). Crecimiento e inducción a la carotenogénesis de la microalga *Dunaliella* sp. en diferentes condiciones de cultivo. *Centro de investigación (CICESE)*. <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/1261/3/TESIS%20FINA%20L%20COMPLETA%20Enrique%20Zepeda.pdf>

Escobedo, Manuel Jiménez, & Calderón, Augusto Castillo. (2021). Biomasa microalgal con alto potencial para la producción de biocombustibles. *Scientia Agropecuaria, 12(2), 265-282.* <https://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2021.030>

FAO (2018) Manejo sanitario y mantenimiento de la bioseguridad de los laboratorios de postlarvas de camarón blanco (*Penaeus vannamei*) en América Latina. <https://www.fao.org/3/y5040s/y5040s.pdf>

- García Morales, J., López Elías, J. A., Medina Félix, D., García Lagunas, N., & Fimbres Olivarría, D. (2018). Effect of nitrogen and salinity stress on the β -carotene content of the microalgae *Dunaliella tertiolecta*. *Biotecnia*, 22(2), 13–19. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v22i2.1241>
- García, Moncayo & Pastuzo (2016) Caracterización de pigmentos por espectrofotometría en una cepa de *Dunaliella viridis*. *Rev. Cient. Cien. Nat. Ambien*, 10(2):76-81. https://www.researchgate.net/figure/Figura-4-Produccion-de-pigmentos-fotosinteticos-de-Dunaliella-viridis-UGB-SE-3001_fig3_323345186
- 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. <https://doi.org/10.1023/A:1023892520443>
- Génesis Milena González Serrano (2022). Análisis Del Crecimiento De Larvas De Camarón (*Litopenaeus Vanammei*) En El Laboratorio Larvalabso, Mar Bravo – ECUADOR. *Tesis 23 (15)*. <https://repositorio.upse.edu.ec/bitstream/46000/8075/1/UPSE-TBM-2022-0008.pdf>
- Gheraldine Ynga & Alexander Niño (2017). Manual para la producción de microalgas marinas. *Bol Inst Mar Perú*, Vol 43, N°. especial. ISSN 0378-7702. <https://rnia.produce.gob.pe/wp-content/uploads/2019/09/Manual-microalgas-produccion.pdf>
- Gómez Patricia & González Mariela (2005). The effect of temperature and irradiance on the growth and carotenogenic capacity of seven strains of *Dunaliella salina* (Chlorophyta) cultivated under laboratory conditions. *Biological Research*, 38(2-3). <https://doi.org/10.4067/S0716-97602005000200005>
- Gómez-Luna, L.M. (1997). Cultivo y aplicación de las microalgas *Dunaliella salina* y *Chlorella vulgaris* en Cuba. Tesis de Doctorado. *Universidade da Coruña*, 231 p. <https://core.ac.uk/download/pdf/61897834.pdf>

- Gómez-Luna, Liliana, Tormos-Cedeño, Lilisbeth, & Ortega-Díaz, Yadenis. (2022). Cultivo y aplicaciones de *Chlorella vulgaris*: principales tendencias y potencialidades en la agricultura. *Tecnología Química*, 42(1), 70-93.
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-61852022000100070&lng=es&tlng=es
- Guevara, Miguel, Lodeiros, César, Gómez, Olga, Lemus, Nathalie, Núñez, Paulino, Romero, Lolymer, Vásquez, Aléikar, & Rosales, Néstor (2005). Carotenogénesis de cinco cepas del alga *Dunaliella* sp. (Chlorophyceae) aisladas de lagunas hipersalinas de Venezuela. *Revista de Biología Tropical*, 53 (3-4), 331-337.
http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442005000200003&lng=en&tlng=en.
- Guía para laboratorio y cultivo de camarón (1998) AquaLab
https://www.ecobusiness.fund/fileadmin/user_upload/Sustainability_Academy/Recursos/Guia_para_laboratorio_y_cultivo_de_camaron.pdf
- Guillard & Ryther (1962). Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran, *Can J Microbiol* ;8:229-39. doi: 10.1139/m62-029. PMID: 13902807.
- Hadi Jamali, Nasrollah Ahmadifard, Daruosh Abdollah (2015). Evaluation of growth, survival and body composition of larval white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed the combination of three types of algae, *Int Aquat Res* 7:115–122. 10.1007/s40071-015-0095-9
- Hartmut Lichtenthaler (1983). Determinación de carotenoides totales y clorofilas a y b de hoja en diferentes solventes. Article in *Biochemical Society Transactions*.
<https://www.researchgate.net/publication/313724134>

- Helena Khatoon,, Noorazilah Haris a, Sanjoy Banerjee Norazira Abdu RahmancHasina Begumb, Sohel Mianc Ambok Bolong Abol-Munafia, Azizah Endut (2017). Efectos de diferentes salinidades sobre el crecimiento y composición próxima de *Dunaliella* sp. aislado del Mar de China Meridional en diferentes fases de crecimiento. *Seguridad de procesos y protección ambiental* 112 .280–28
- Hernández-Nazario, L., M.M. Quintana-Cabrales, H. Morris-Quevedo y M. Fernández-González (1999). Contenido de algunas vitaminas en cultivos de microalga *Chlorella* sp. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición* 13: 9-13. <https://www.imbiomed.com.mx/articulo.php?id=8357>
- Hernández-Pérez, Alexis, & Labbé, José I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de biología marina y oceanografía*, 49 (2), 157-173. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572014000200001>
- Jessica Paola Lema Navarro. (2023). Relación Entre Calidad De Agua Y Amonio Tóxico En Un Período De Producción Del Cultivo De Camarón *Litopenaeus Vannamei* En Santa Elena. <https://repositorio.upse.edu.ec/bitstream/46000/10101/1/UPSE-TBI-2023-0057.pdf>
- Jin y Polle (2009). Determinación de pigmentos totales por métodos espectrofotométricos . 2 edición *Revista científica*. pp 76.
- Juan Manuel Pacheco Vega & M. del Pilar Sánchez Saavedra. (2023). Evaluación de la calidad de la larva de *Litopenaeus vannamei* al suministrar como alimento la microalga *Chaetoceros muelleri* cultivada en un medio agrícola. <file:///C:/Users/HP/Downloads/Pacheco-VegaySanchez-Saavedra2003CIVA.pdf>
- Jonathan García Morales, José Antonio López Elías, Diana Medina Félix, Norma García Lagunas y Diana Fimbres Olivarría (2020). Effect of nitrogen and salinity stress on the β -carotene content of the microalgae *Dunaliella tertiolecta* *Biotecnia* vol.22 no.2 Hermosillo. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v22i2.1241>

- Leonardo García, Shirley Moncayo & María de los Ángeles Pastuzo.(2016) Caracterización de pigmentos por espectrofotometría en una cepa de *Dunaliella viridis*, aislada de las salinas de Ecuasal. file:///C:/Users/HP/Downloads/5-garcia-et-al-2016-102-76-81.pdf
- López (2002). EVALUACIÓN NUTRICIA DE MICROALGAS MARINAS EN CULTIVOS COMERCIALES DE LARVAS DE CAMARÓN BLANCO (*Litopenaeus vannamei*). <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/2657/1/152451.pdf>
- López-Elías, JA, Fimbres-Olivarría, D, Medina-Juárez, LA, Miranda-Baeza, A, Martínez-Córdova, LR, & Molina-Quijada, DMA. (2013). Producción de biomasa y carotenoides de *Dunaliella tertiolecta* en medios limitados en nitrógeno. *Phyton (Buenos Aires)*, 82(1), 23-30.http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-56572013000100004&lng=es&tlng=es.
- Luis Enrique Gutiérrez-Millán (1996). Ácido desoxiribonucleico, proteína y pigmentos durante la carotenogénesis inducida en una nueva cepa de *Dunaliella salina* (chlorophyta), aislada de una laguna hirsalina de baja california. *Tesis Pag 13*. <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/3447/1/108991.pdf>
- M.L Cobo, S Sonnenholzner, M. Wille , P. Sorgeloos (2014). Tolerancia de larvas del camarón *Litopenaeus vannamei* al amoníaco. *Aquacultura.edición#105,Pag (46- 50)*. https://issuu.com/revista-cna/docs/aqua_cultura_105/46
- Madhumathi & MR Rengasamy (2011). Antioxidant status of *Penaeus monodon* fed with *Dunaliella salina* supplemented diet and resistance against WSSV, *vol. 3 N° 10, ISSN: 0975-5462*. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n050507/050706.pdf>
- Martha I Millán-Almaraz, Diana J López-Peraza, Mario Nieves-Soto, Mario M Peraza-Yee (2023). Efecto de 4 dietas de microalgas sobre la composición proximal, concentración de clorofila y contenido total de carotenoides en *Artemia franciscana*, *Ciencias Marinas Artículo de investigación, Vol.49*. <https://doi.org/10.7773/cm.y2023.3381>

- Martínez, M., Asiaín, A., Reta, J., Morales, V., Fernández, B., & Garduño, M. (2018). Uso de *Saccharomyces cerevisiae* para el control de calidad y 49 cantidad de agua en el cultivo de camarón blanco. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 9(7), 1339-1349
- Meléndez-Martínez, Antonio J, Vicario, Isabel M, & Heredia, Francisco J. (2005). Pigmentos carotenoides: consideraciones estructurales y fisicoquímicas. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 57(2), 109-117.
http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222007000200002&lng=es&tlng=es.
- Naranjo, José, Porchas, Marco A, Robles, Miguel, Magallón, Francisco J, Valdez, José, & Villarreal, Humberto. (1999). Sobrevivencia, metamorfosis y crecimiento de larvas del camarón *Penaeus californiensis* (Decapoda: Penaeidae) alimentadas con diferentes microalgas. *Revista de Biología Tropical*, 47 (4), 917-922.
http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77441999000400027&lng=en&tlng=es.
- Natália A. B. Tinoco, Cláudia M. L. L. Teixeira, Claudia M. Rezendea (2015). O Gênero *Dunaliella*: Biotecnologia e Aplicações. Volume 7, Número 4. ISSN 1984-6835.
- Nichols H.W., & H.C. Bold (1965) *J. Phycology* 1, 34-38
- Norazira Abdu Rahman, Helena Khatoon, Norhayati Yusuf, Sanjoy Banerjee, Noor Azilah Haris, Fathurrahman Lananan, Katayama Tomoyo (2017). *Tetraselmis chuii* biomass as a potential feed additive to improve survival and oxidative stress status of Pacific white-leg shrimp *Litopenaeus vannamei* postlarvae, *Int Aquat Res* ,9:235–247. Doi 10.1007/s40071-017-0173-2
- Skretting (2018). Manual para larvicultura
<https://libreriaskretting.ec/admin/public/uploads/catalogos/manual-larvicultura-skretting.pdf>

- Pablo Piña, Mario Nieves, Domenico Voltolina y Cesar O. Chavira Ortega (2004). CRECIMIENTO, DESARROLLO Y SOBREVIVENCIA DE MYTIS DE *Litopenaeus vannamei* ALIMENTADAS CON NAUPLIOS DE *Artemia* Y CON EL ROTÍFERO *Brachionus plicatilis*. *Rev. Invest. Mar.* 25(3):245-251
- Romero, L., M. Guevara, H. D'Armas y C. Lodeiros (2008). Cuantificación de Carotenoides Totales y β -caroteno en dos Cepas de *Dunaliella salina* (Chlorophyta, Vovlocales) Aisladas de Lagunas Hipersalinas de Venezuela. *Boletín del Instituto Oceanográfico de Venezuela* 47: 67-76
- S Sedjati, GW Santosa , E Yudiati, E Supriyantini, A Ridlo, and FD Kimberly (2019). Chlorophyll and Carotenoid Content of *Dunaliella salina* at Various Salinity Stress and Harvesting Time. 4th International Conference on Tropical and Coastal Region Eco Development. Earth and Environmental Science. doi:10.1088/1755-1315/246/1/01202
- Sánchez-Varo, R.M. (2020). Producción de carotenos por *Dunaliella salina*. *Biología de microalgas*. pp 1-36
- Sato, N. y N. Murata. 1980. Temperature shift-induced responses in lipids in the blue green alga *Anabaena variabilis*. The central role of diacylmonoalactosylglycerol in thermo adaptation. *Biochimica and Biophysica Acta.* 619:349-355 p.
- Torres-Ochoa, E., Cadena-Roa, M. A., Rojas Contreras, M., Cota Sáñez, M. R., Pacheco-Vega, J. M., Zavala-Leal, O. (2019). Zootechnical evaluation of *Penaeus vannamei* larvae fed endemic microalgae and a probiotic from the Gulf of California. *Revista Bio Ciencias* 6, e404. : <https://doi.org/10.15741/revbio.06.e404>
- Yaser Abdollahi & Nasrollah Ahmadifard & Naser Agh & Kaveh Rahmanifarah & Mohammad Amin Hejazi (2019). β -Carotene-enriched *Artemia* as a natural carotenoid improved skin pigmentation and enhanced the mucus immune responses of platyfish *Xiphophorus*

<https://ciencia.ucp.pt/ws/portalfiles/portal/90157403/89729345.pdf>

Yépez, M. y E. Morales. 1998. Efecto de la concentración de nitrato y cloruro de sodio sobre la densidad celular y contenido de pigmentos y proteínas de *Dunaliella viridis*. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas. Universidad de Zulia, Maracaibo Venezuela*, 32(1),112. <https://produccioncientificaluz.org/index.php/boletin/article/view/325>

Yimei Xi, Jianwen Bian, Guanghong Luo, Fantao Kong, Zhanyou Chi (2022). Enhanced β -carotene production in *Dunaliella salina* under relative high flashing light. *Algal Research* Volume 67,102857. ISSN 2211-92647. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102857>

13. ANEXOS

Anexo. 1. Correlación de Pearson de los parámetros de temperatura y concentración de caroteno de las microalgas

```

Pearson's product-moment correlation

data: DatosCORTempCar$Temperatura and DatosCORTempCar$Caroteno
t = 3.4468, df = 28, p-value = 0.00181
alternative hypothesis: true correlation is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 0.2309498 0.7571845
sample estimates:
      cor
0.5458057

```

Anexo. 2 Pruebas estadísticas de comparación y contraste del índice de desarrollo larvario entre las especies y repeticiones de experimentación

```

wilcoxon rank sum test with continuity correction

data: DATOSMANNT_Quimi$IDL and DATOSMANND_Quimi$IDL
W = 4741, p-value = 0.8826
alternative hypothesis: true location shift is not equal to 0

Kruskal-wallis rank sum test

data: IDL by Variable
Kruskal-wallis chi-squared = 0.063564, df = 1, p-value = 0.8009

```

Anexo. 3 Pruebas estadísticas para la comparación y contraste de la longitud de estadios y especies

```

Kruskal-wallis rank sum test

data: Longitud by Estadio
Kruskal-wallis chi-squared = 44.082, df = 3, p-value = 0.998

Wilcoxon rank sum exact test

data: LONESPT$Longitud and LONESPD$Longitud
W = 1131, p-value = 0.8811
alternative hypothesis: true location shift is not equal to 0
    
```

Anexo. 4 Pruebas estadísticas para la comparación y contraste de la longitud de estadio de Post-larva y especies

```

Kruskal-wallis rank sum test

data: Longitud by Especie
Kruskal-wallis chi-squared = 0.29482, df = 1, p-value = 0.5871

Wilcoxon rank sum test with continuity correction
    
```

Anexo. 5 Prueba de homogeneidad Levene IDL

Test for equal means

	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p (same)
Between groups:	0.376227	3	0.125409	0.02267	0.9954
Within groups:	1073.4	194	5.53297		Permutation p (n=99999)
Total:	1073.77	197			0.9954

Components of variance (only for random effects):

Var(group): -0.109277 Var(error): 5.53297 ICC: -0.0201481

omega²: 0

Levene's test for homogeneity of variance, from means p (same): 0.9032

Levene's test, from medians p (same): 0.9159

Welch F test in the case of unequal variances: F=0.02274, df=107.6, p=0.9953

Anexo. 6 Correlación de Pearson de los parámetros de longitud y concentración de caroteno para el estadio de Post-Larva

```

data: DatosCorLonCar$Longitud and DatosCorLonCar$Caroteno
t = 1.3105, df = 22, p-value = 0.2035
alternative hypothesis: true correlation is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-0.1506573 0.6066387
sample estimates:
cor
0.2690935
    
```


Anexo. 7 Tablas11 de los criterios de observaciones microscópicas

Criterios para la observación y estimación del organismo									
Análisis general de los criterios de clasificación para el control de calidad de larva skretting, 2018									
OBSERVACIONES MICROSCOPICAS D1									
Criterios	Puntuación	Nv	Z1	Z2	Z3	M1	M2	M3	PL1
Contenido intestinal <i>Dunaliella spp 1</i>									
Lleno (amarillo) 80-100%	10	x	x	x	x	x	x	x	x
Moderados (café) 60-70%	5	2%							
Vacío (blanco- amarillento) 50%	0								
Criterios para la observación y estimación del organismo									
Criterios	Puntuación	Nv	Z1	Z2	Z3	M1	M2	M3	PL1
Contenido intestinal <i>Dunaliella spp 2</i>									
Lleno (amarillo) 80-100%	10	x	x	x	x	x	x	x	x
Moderados (café) 60-70%	5	3%		2%		1%			
Vacío (blanco- amarillento) 50%	0								
Criterios para la observación y estimación del organismo									
Criterios	Puntuación	Nv	Z1	Z2	Z3	M1	M2	M3	PL1
Contenido intestinal <i>Dunaliella spp 3</i>									
Lleno (amarillo) 80-100%	10	x	x	x	x	x	x	x	x
Moderados (café) 60-70%	5	1%							
Vacío (blanco- amarillento) 50%	0								
Criterios para la observación y estimación del organismo									
Criterios	Puntuación	Nv	Z1	Z2	Z3	M1	M2	M3	PL1
Contenido intestinal <i>Dunaliella spp 4</i>									
Lleno (amarillo) 80-100%	10	x	x	x	x	x	x	x	x
Moderados (café) 60-70%	5	3%	2%	1%					
Vacío (blanco- amarillento) 50%	0								
Criterios para la observación y estimación del organismo									
Criterios	Puntuación	Nv	Z1	Z2	Z3	M1	M2	M3	PL1
Contenido intestinal <i>Dunaliella spp 5</i>									
Lleno (amarillo) 80-100%	10	x	x	x	x	x	x	x	x
Moderados (café) 60-70%	5								
Vacío (blanco- amarillento) 50%	0								
Criterios para la observación y estimación del organismo									
Criterios	Puntuación	Nv	Z1	Z2	Z3	M1	M2	M3	PL1
Contenido intestinal <i>Dunaliella spp 6</i>									
Lleno (amarillo) 80-100%	10	x	x	x	x	x	x	x	x
Moderados (café) 60-70%	5					1%			
Vacío (blanco- amarillento) 50%	0								16

Anexo. 8 Tablas12 de los criterios de observaciones microscópicas

Criterios para la observación y estimación del organismo									
Análisis general de los criterios de clasificación para el control de calidad de larva skretting, 2018									
OBSERVACIONES MICROSCOPICAS T1									
Criterios para la observación y estimación del organismo									

Criterios	Puntuación	Nv	Z1	Z2	Z3	M1	M2	M3	PL1
Contenido intestinal <i>Thalassiosira 1</i>									
Lleno (amarillo) 80-100%	10	x	x	x	x	x	x	x	x
Moderados (café) 60-70%	5	1%		2%					
Vacío (blanco- amarillento) 50%	0								
Criterios para la observación y estimación del organismo									
Criterios	Puntuación	Nv	Z1	Z2	Z3	M1	M2	M3	PL1
Contenido intestinal <i>Thalassiosira 2</i>									
Lleno (amarillo) 80-100%	10	x	x	x	x	x	x	x	x
Moderados (café) 60-70%	5	2%				1%			
Vacío (blanco- amarillento) 50%	0								
Criterios para la observación y estimación del organismo									
Criterios	Puntuación	Nv	Z1	Z2	Z3	M1	M2	M3	PL1
Contenido intestinal <i>Thalassiosira 3</i>									
Lleno (amarillo) 80-100%	10	x	x	x	x	x	x	x	x
Moderados (café) 60-70%	5	1%				1%			
Vacío (blanco- amarillento) 50%	0								
Criterios para la observación y estimación del organismo									
Criterios	Puntuación	Nv	Z1	Z2	Z3	M1	M2	M3	PL1
Contenido intestinal <i>Thalassiosira</i>									
Lleno (amarillo) 80-100%	10	x	x	x	x	x	x	x	x
Moderados (café) 60-70%	5	2%	1%		1%				
Vacío (blanco- amarillento) 50%	0								
Criterios para la observación y estimación del organismo									
Criterios	Puntuación	Nv	Z1	Z2	Z3	M1	M2	M3	PL1
Contenido intestinal <i>Thalassiosira 5</i>									
Lleno (amarillo) 80-100%	10	x	x	x	x	x	x	x	x
Moderados (café) 60-70%	5	1%			1%				
Vacío (blanco- amarillento) 50%	0								
Criterios para la observación y estimación del organismo									
Criterios	Puntuación	Nv	Z1	Z2	Z3	M1	M2	M3	PL1
Contenido intestinal <i>Thalassiosira</i>									
Lleno (amarillo) 80-100%	10	x	x	x	x	x	x	x	x
Moderados (café) 60-70%	5	2%	1%			1%			
Vacío (blanco- amarillento) 50%	0								18

Anexo. 9 Tablas13 de los criterios de observaciones microscópicas

Criterios para la observación y estimación del organismo									
Análisis general de los criterios de clasificación para el control de calidad de larva skretting, 2018									
OBSERVACIONES MICROSCOPICAS D2									
Criterios	Puntuación	Nv	Z1	Z2	Z3	M1	M2	M3	PL1
Contenido intestinal <i>Dunaliella spp 1</i>									
Lleno (amarillo) 80-100%	10	x	x	x	x	x	x	x	x
Moderados (café) 60-70%	5								
Vacío (blanco- amarillento) 50%	0								

Criterios para la observación y estimación del organismo									
Criterios	Puntuación	Nv	Z1	Z2	Z3	M1	M2	M3	PL1
Contenido intestinal <i>Dunaliella spp 2</i>									
Lleno (amarillo) 80-100%	10	x	x	x	x	x	x	x	x
Moderados (café) 60-70%	5	2%		2%					
Vacío (blanco- amarillento) 50%	0								
Criterios para la observación y estimación del organismo									
Criterios	Puntuación	Nv	Z1	Z2	Z3	M1	M2	M3	PL1
Contenido intestinal <i>Dunaliella spp 3</i>									
Lleno (amarillo) 80-100%	10	x	x	x	x	x	x	x	x
Moderados (café) 60-70%	5								
Vacío (blanco- amarillento) 50%	0								
Criterios para la observación y estimación del organismo									
Criterios	Puntuación	Nv	Z1	Z2	Z3	M1	M2	M3	PL1
Contenido intestinal <i>Dunaliella spp 4</i>									
Lleno (amarillo) 80-100%	10	x	x	x	x	x	x	x	x
Moderados (café) 60-70%	5	1%			2%	1%			
Vacío (blanco- amarillento) 50%	0								
Criterios para la observación y estimación del organismo									
Criterios	Puntuación	Nv	Z1	Z2	Z3	M1	M2	M3	PL1
Contenido intestinal <i>Dunaliella spp 5</i>									
Lleno (amarillo) 80-100%	10	x	x	x	x	x	x	x	x
Moderados (café) 60-70%	5								
Vacío (blanco- amarillento) 50%	0								
Criterios para la observación y estimación del organismo									
Criterios	Puntuación	Nv	Z1	Z2	Z3	M1	M2	M3	PL1
Contenido intestinal <i>Dunaliella spp 6</i>									
Lleno (amarillo) 80-100%	10	x	x	x	x	x	x	x	x
Moderados (café) 60-70%	5								
Vacío (blanco- amarillento) 50%	0								8

Anexo. 10 Tablas14 de los criterios de observaciones microscópicas

Criterios para la observación y estimación del organismo									
Análisis general de los criterios de clasificación para el control de calidad de larva skretting, 2018									
OBSERVACIONES MICROSCOPICAS T2									
Criterios para la observación y estimación del organismo									
Criterios	Puntuación	Nv	Z1	Z2	Z3	M1	M2	M3	PL1
Contenido intestinal <i>Thalassiosira 1</i>									
Lleno (amarillo) 80-100%	10	x	x	x	x	x	x	x	x
Moderados (café) 60-70%	5	2%							
Vacío (blanco- amarillento) 50%	0								
Criterios para la observación y estimación del organismo									
Criterios	Puntuación	Nv	Z1	Z2	Z3	M1	M2	M3	PL1
Contenido intestinal <i>Thalassiosira 2</i>									
Lleno (amarillo) 80-100%	10	x	x	x	x	x	x	x	x
Moderados (café) 60-70%	5								

Vacío (blanco- amarillento) 50%	0								
Criterios para la observación y estimación del organismo									
Criterios	Puntuación	Nv	Z1	Z2	Z3	M1	M2	M3	PL1
Contenido intestinal <i>Thalassiosira 3</i>									
Lleno (amarillo) 80-100%	10	x	x	x	x	x	x	x	x
Moderados (café) 60-70%	5	1%				1%			
Vacío (blanco- amarillento) 50%	0								
Criterios para la observación y estimación del organismo									
Criterios	Puntuación	Nv	Z1	Z2	Z3	M1	M2	M3	PL1
Contenido intestinal <i>Thalassiosira</i>									
Lleno (amarillo) 80-100%	10	x	x	x	x	x	x	x	x
Moderados (café) 60-70%	5	2%							
Vacío (blanco- amarillento) 50%	0								
Criterios para la observación y estimación del organismo									
Criterios	Puntuación	Nv	Z1	Z2	Z3	M1	M2	M3	PL1
Contenido intestinal <i>Thalassiosira 5</i>									
Lleno (amarillo) 80-100%	10	x	x	x	x	x	x	x	x
Moderados (café) 60-70%	5	1%							
Vacío (blanco- amarillento) 50%	0								
Criterios para la observación y estimación del organismo									
Criterios	Puntuación	Nv	Z1	Z2	Z3	M1	M2	M3	PL1
Contenido intestinal <i>Thalassiosira 6</i>									
Lleno (amarillo) 80-100%	10	x	x	x	x	x	x	x	x
Moderados (café) 60-70%	5					1%			
Vacío (blanco- amarillento) 50%	0								7

DOSIS	
G2	21:00
BIOMIN	1:00
HGS-7	500
EM	TODAS LAS DOSIS
VITAMINAS	TODAS LAS DOSIS

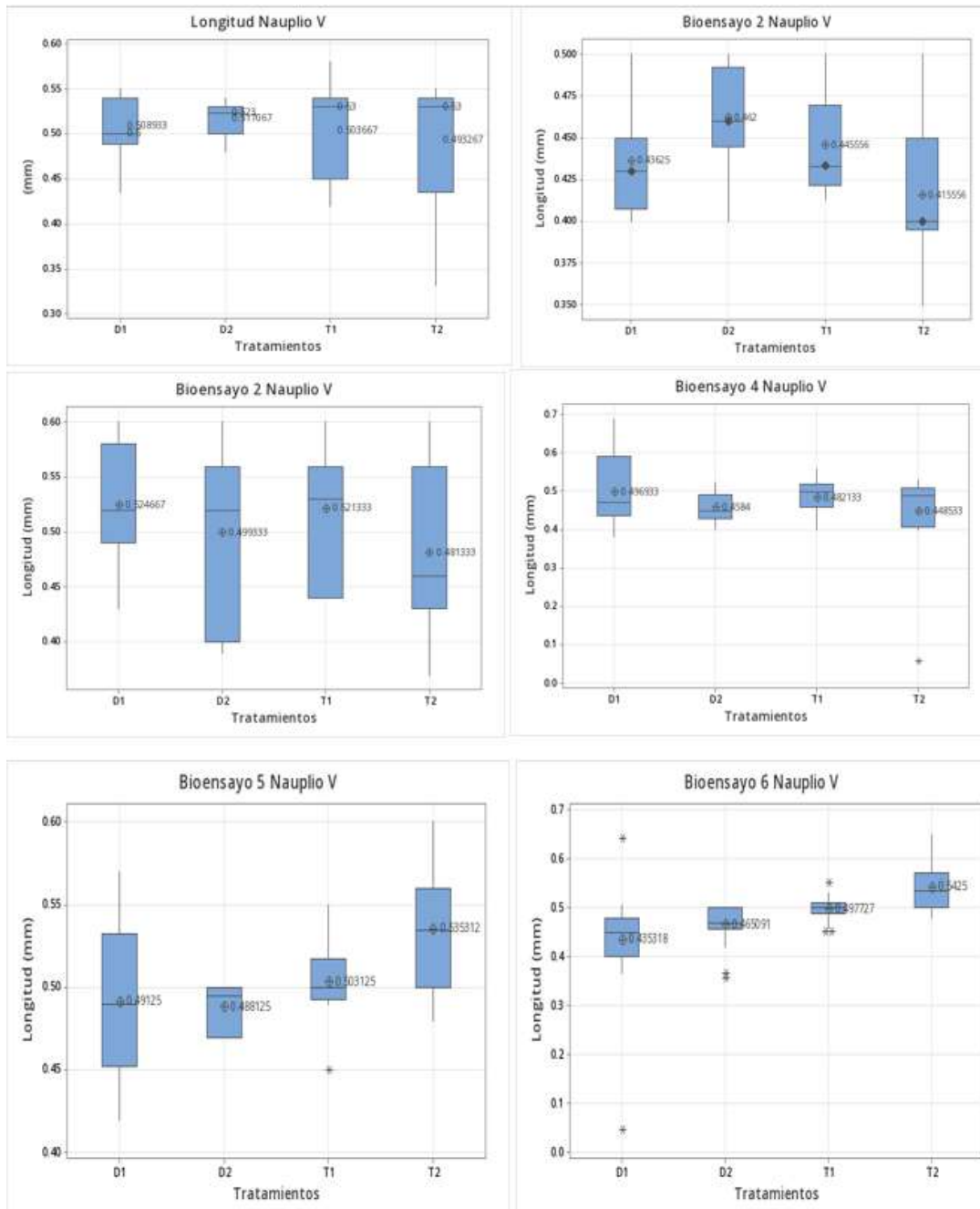
Anexo. 11 Tablas 15 TABLA DE ALIMENTACIÓN

TABLA DE ALIMENTACIÓN						
NV- Z1 600L	BALANCEADO: ROYAL SEA FOOD 5- 50 - ROYAL LIQUIDO					
	21:00	1:00	5:00			
	0.5/0.2	0.5/0.2	0.5/0.2			
	G2	Biomin	HGS-7	EM	VITAMINAS	

	0.8 g	0.8 g	1.2 g	4 ml	0.32 g	
Z2 600L	BALANCEADO: ROYAL SEA FOOD 50- 100 - ROYAL LIQUIDO					
	9:00	13:00	17:00	21:00	1:00	5:00
	0.5/0.2	0.5/0.2	0.5/0.2	0.9/04	0.9/04	0.9/04
	G2	Biomin	HGS-7	EM	VITAMINAS	
	0.8 g	0.8 g	1.2 g	4 ml	0.32 g	
Z3 600L	BALANCEADO: ROYAL SEA FOOD 50- 100 - ROYAL LIQUIDO					
	9:00	13:00	17:00	21:00	1:00	5:00
	0.9/04	0.9/04	0.9/04	1.3/04	1.3/04	1.3/04
	G2	Biomin	HGS-7	EM	VITAMINAS	
	0.8 g	0.8 g	1.2 g	4 ml	0.26 g	
M1 800L	BALANCEADO: ROYAL SEA FOOD 50- 100 - ROYAL LIQUIDO					
	9:00	13:00	17:00	21:00	1:00	5:00
	1.3/04	1.56/04	1.56/04	1.56/04	1.56/04	1.56/04
	G2	Biomin	HGS-7	EM	VITAMINAS	
	0.8 g	0.8 g	1.2 g	4 ml	0.26 g	
M2 800L	BALANCEADO: ROYAL SEA FOOD 50- 100 - ROYAL LIQUIDO					
	9:00	13:00	17:00	21:00	1:00	5:00
	1.56/04	1.56/04	1.56/04	1.56/04	1.56/04	1.56/04
	G2	Biomin	HGS-7	EM	VITAMINAS	
	0.8 g	0.8 g	1.2 g	16 ml	0.26 g	
M3 1 tonelada	BALANCEADO: ROYAL SEA FOOD 100- 200 - ROYAL LIQUIDO					
	9:00	13:00	17:00	21:00	1:00	5:00
	1.56/04	1.56/04	1.56/04	1.86/04	1.56/04	1.56/04
	G2	Biomin	HGS-7	EM	VITAMINAS	
	0.8 g	0.8 g	1.2 g	16 ml	0.26 g	
M3 Tonelada	BALANCEADO: ROYAL SEA FOOD 100- 500					
PL1 Tonelada	9:00	13:00	17:00	21:00	1:00	5:00
	1.76	1.76	1.76	1-Jan	1.76	1.76
	G2	Biomin	HGS-7	EM	VITAMINAS	
	0.8 g	0.8 g	1.2 g	16 ml	0.26 g	

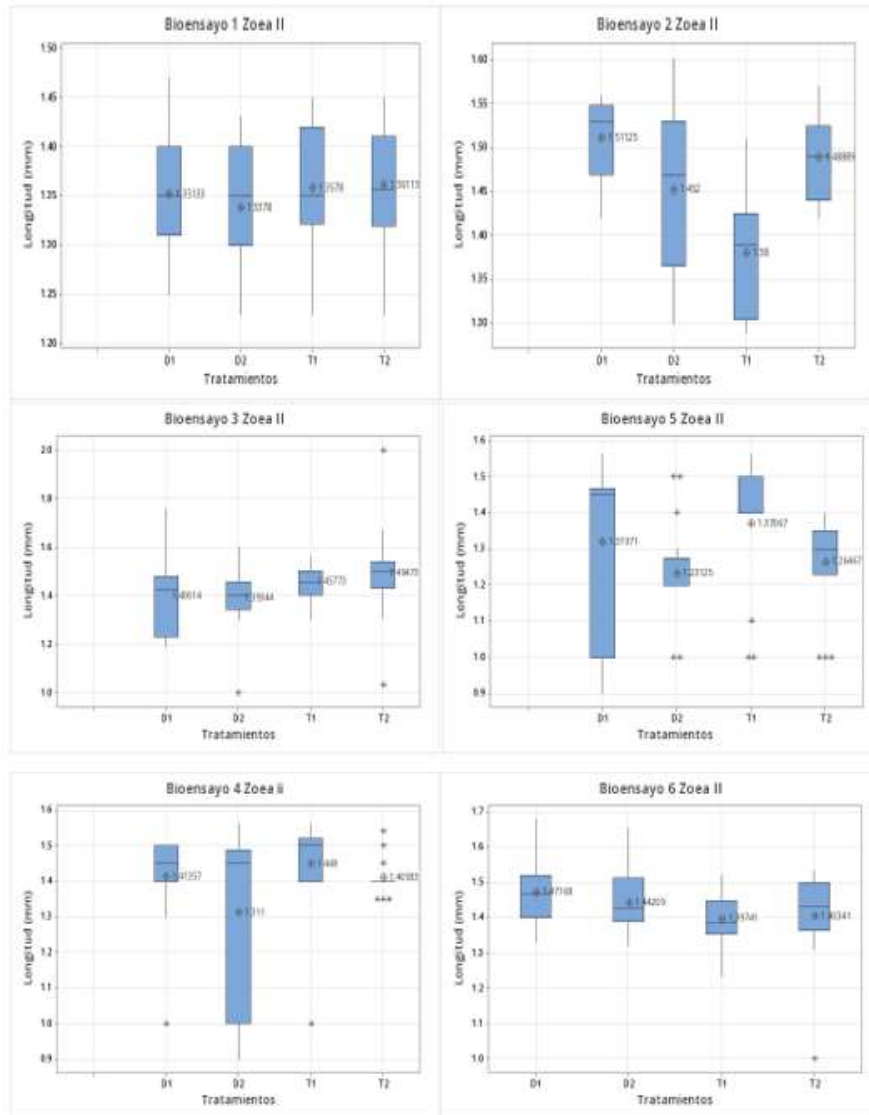
Anexo. 12 Tablas general de supervivencia de *Litopenaeus vannamei*

Supervivencia % de <i>Litopenaeus vannamei</i>				
Bioensayo 1				
Estadios larvarios	D1	D2	T1	T2
NV	100	100	100	100
Z	97	96	98	97
M	95	95	96	95
PL	94	94	93	93
Bioensayo 2				
Estadios larvarios	D1	D2	T1	T2
NV	100	100	100	100
Z	98	99	96	96
M	97	96	93	94
PL	92	93	90	91
Bioensayo 3				
Estadios larvarios	D1	D2	T1	T2
NV	100	100	100	100
Z	97	98	98	98
M	96	97	96	95
PL	94	95	93	93
Bioensayo 4				
Estadios larvarios	D1	D2	T1	T2
NV	100	100	100	100
Z	97	96	96	95
M	95	95	95	94
PL	92	89	91	90
Bioensayo 5				
Estadios larvarios	D1	D2	T1	T2
NV	100	100	100	100
Z	96	97	96	98
M	95	96	94	97
PL	94	93.5	93	94



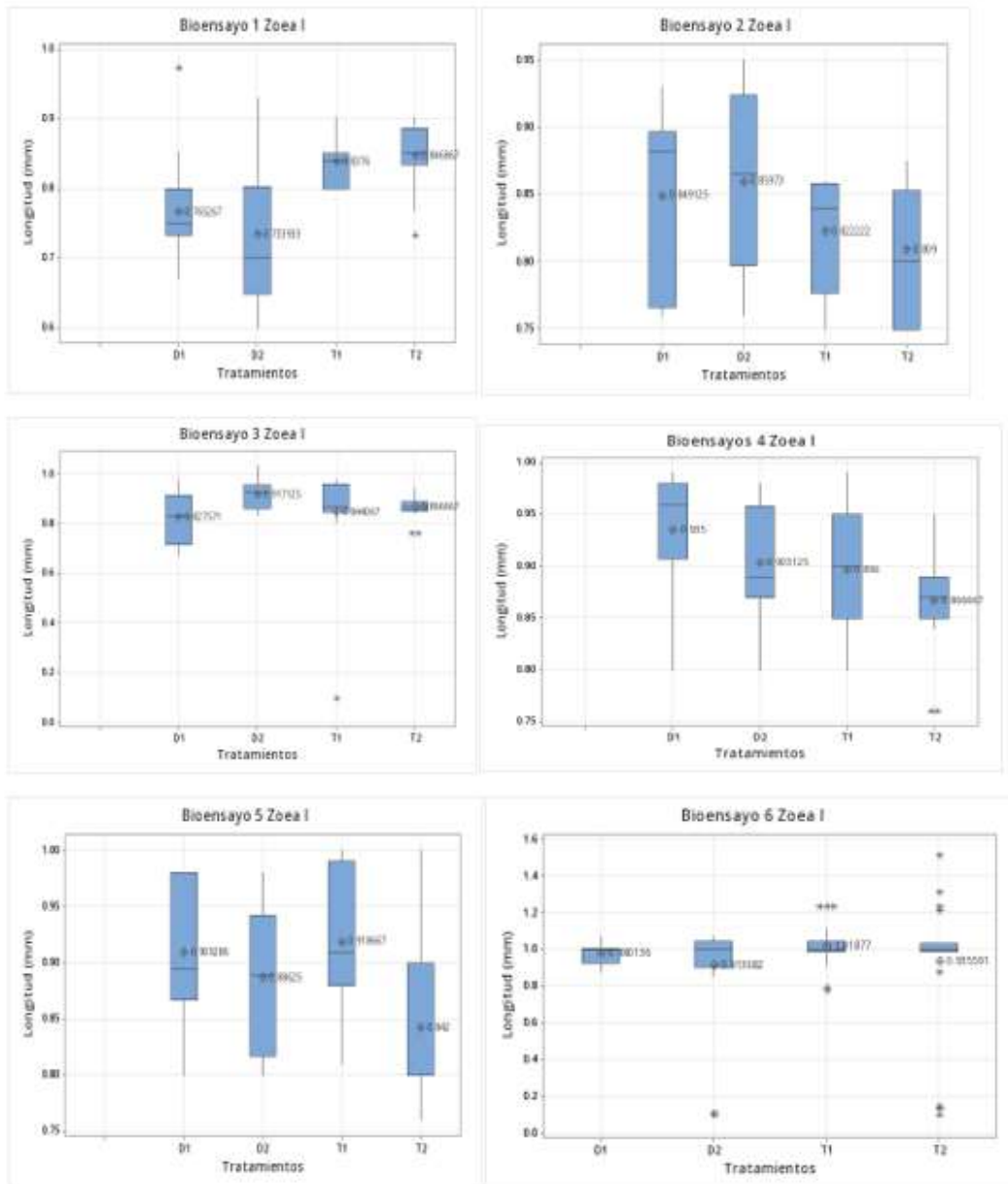
Anexo. 13 medias muestrales de los 6 bioensayos realizados por tratamientos en estadios de Nauplio V

Longitud de Zoa 2 de los 6 bioensayos



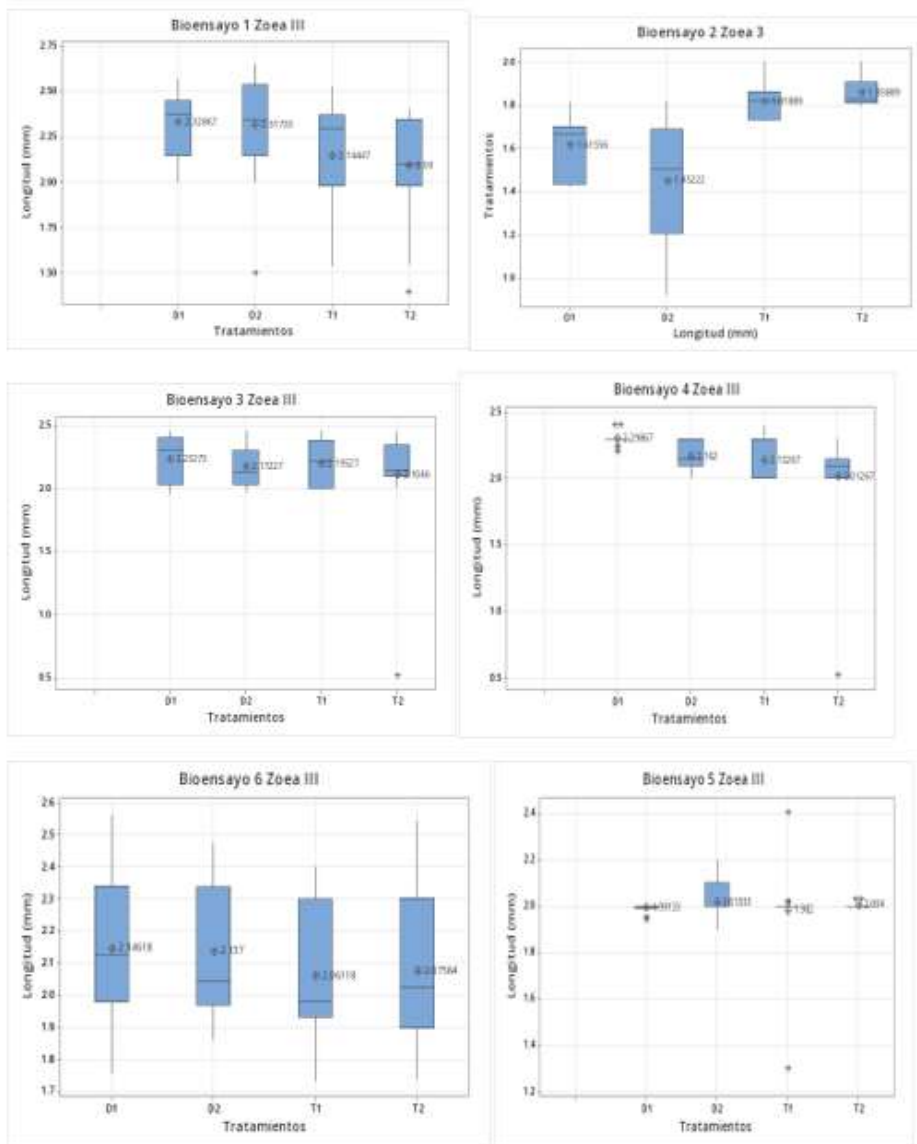
Anexo. 14 Medias muestrales de los 6 bioensayos realizados por tratamientos en estadios de Zoa I

Longitud de Zoea 1 de los 6 bioensayos



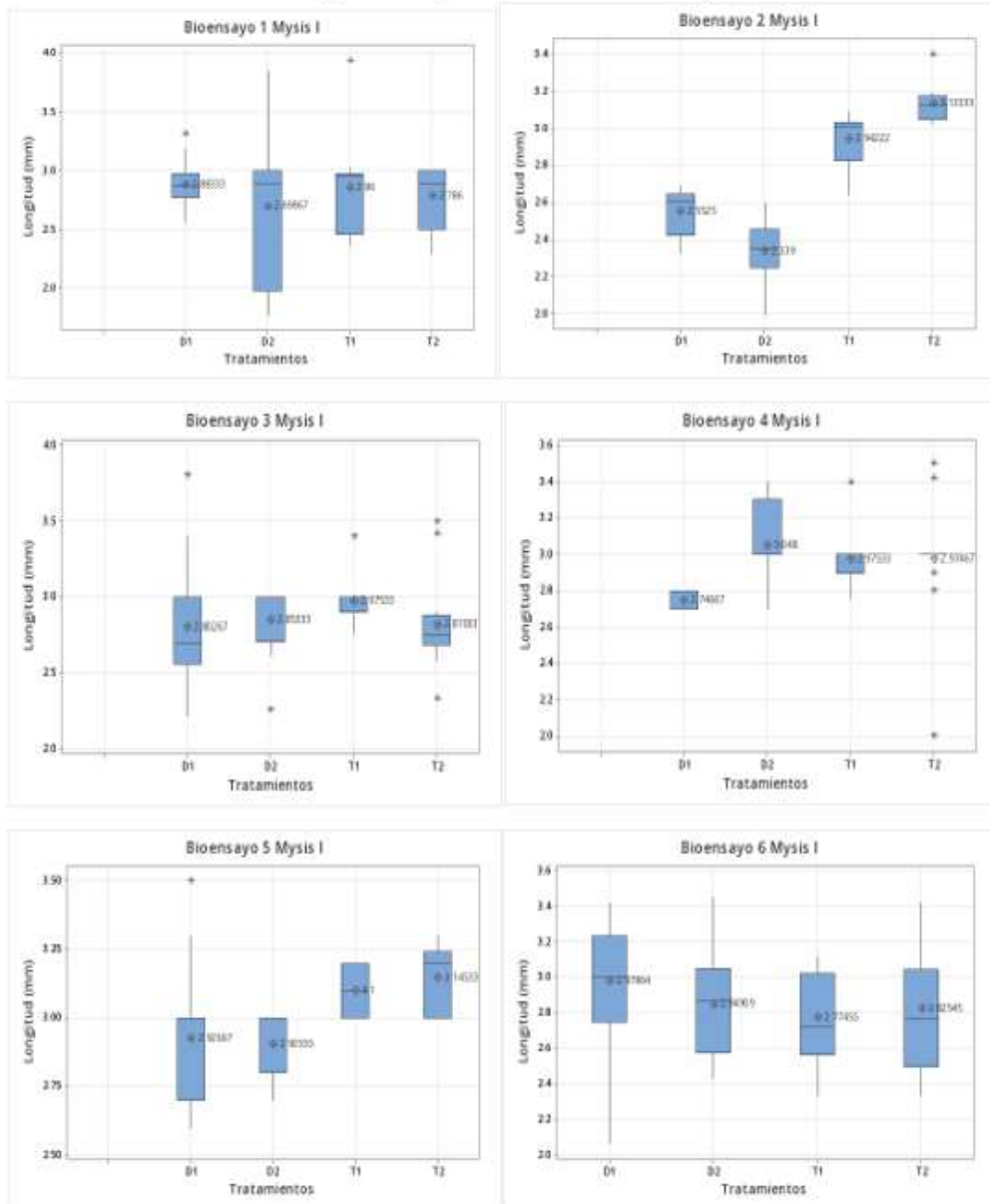
Anexo. 15 Medias muestrales de los 6 bioensayos realizados por tratamientos en estadios de Zoea 2

Longitud de Zoea 3 de los 6 bioensayos



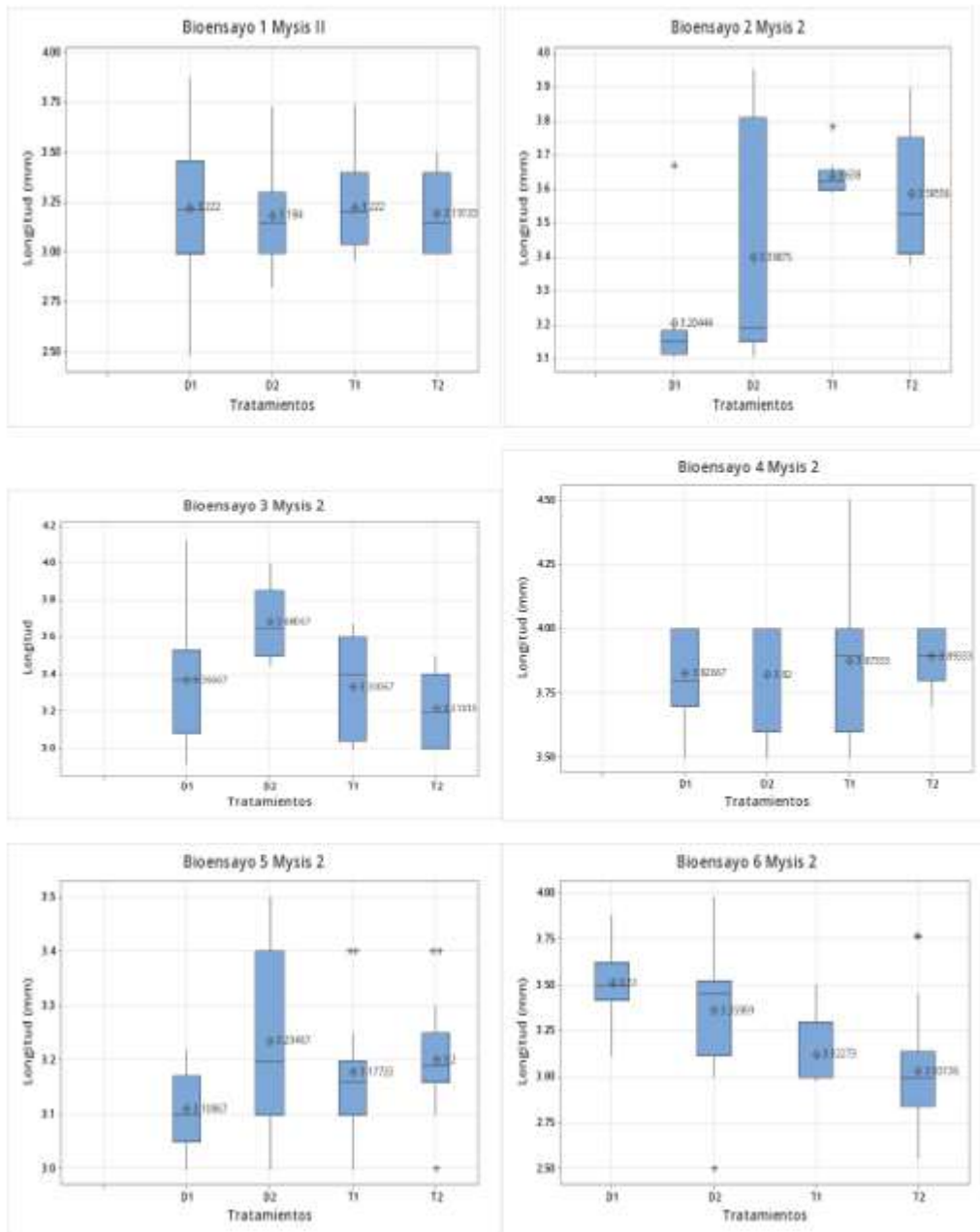
Anexo. 16 Medias muestrales de los 6 bioensayos realizados por tratamientos en estadios de Zoea 3

Longitud de Mysis 1 de los 6 bioensayos



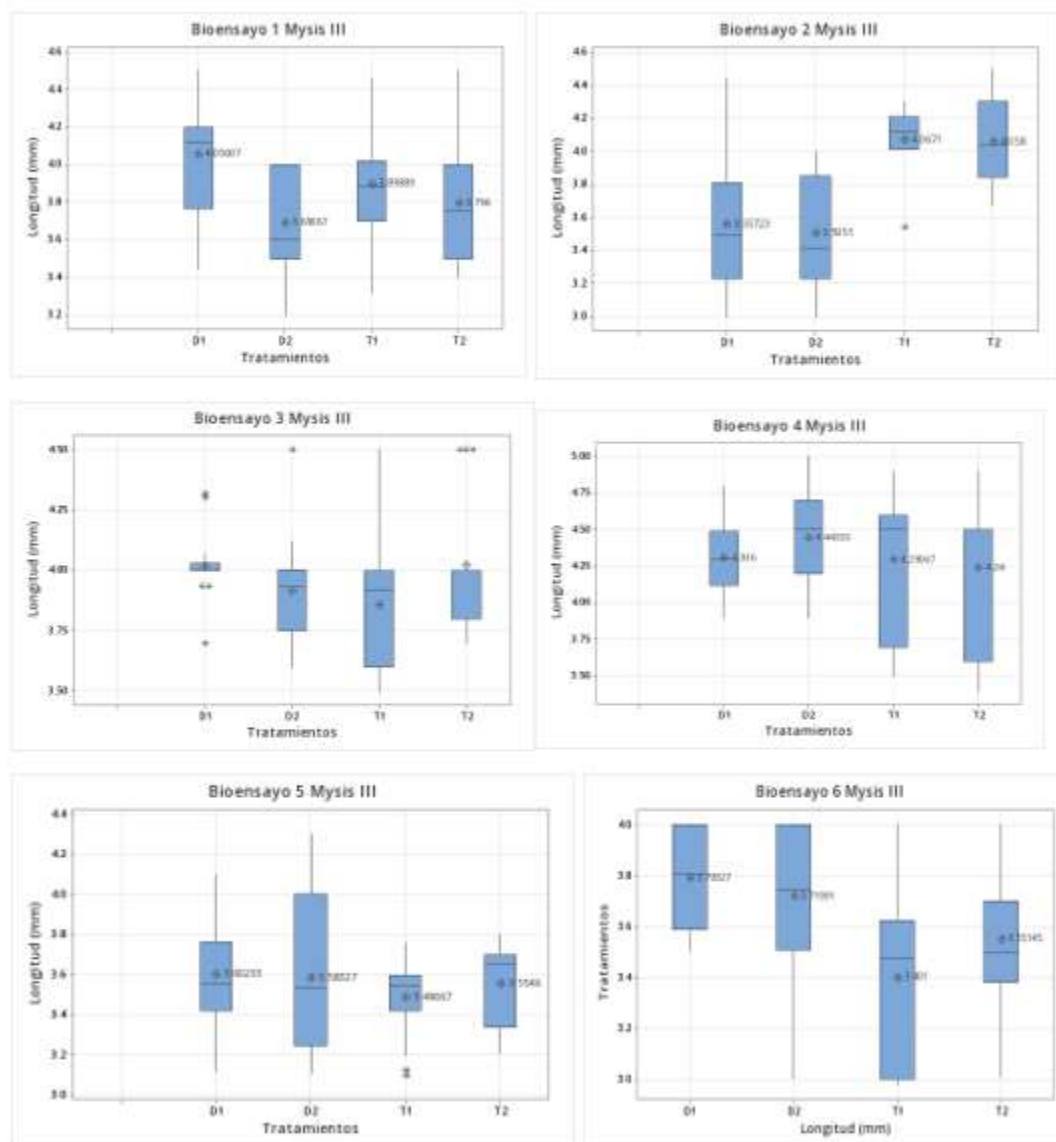
Anexo. 17 Medias muestrales de los 6 bioensayos realizados por tratamientos en estadios de Mysis I

Longitud de Mysis 2 de los 6 bioensayos



Anexo. 18 Medias muestrales de los 6 bioensayos realizados por tratamientos en estadios de Mysis 2

Longitud de Mysis 3 de los 6 bioensayos



Anexo. 19 Medias muestrales de los 6 bioensayos realizados por tratamientos en estadios de Mysis 3

Conteo celular de microalgas <i>Dunaliella</i> y <i>Thalassiosira</i> cel/ml							
ESTADIOS	Tratamientos	Bioensayo 1	Bioensayo 2	Bioensayo 3	Bioensayo 4	Bioensayo 5	Bioensayo 6
NV	D1	60.000	70,000	67.000	60,000	60.000	63.000
	D2	56.000	72,500	75.000	62,000	60.000	67.500
	T1	60.000	63,400	60.000	60,000	60.000	60.000
	T2	40.000	67,000	60.000	60,000	60.000	60.000
Z1	D1	60.000	50,000	60.000	50,000	52.000	61.000
	D2	65.000	50,000	60.000	50,000	60.000	60.000
	T1	80.000	40,000	50.000	40,000	63.000	63.000
	T2	82.000	60,000	51.000	60,000	60.000	60.000
Z2	D1	48.000	45,000	50.000	45,000	48.000	48.000
	D2	50.000	45,000	54.000	45,000	50.000	50.000
	T1	60.000	45,000	40.000	45,000	60.000	60.000
	T2	70.000	45,000	40.000	45,000	63.000	63.000
Z3	D1	60.000	40,000	40.000	30,000	48.000	48.000
	D2	62.000	45,000	40.000	35,000	40.000	40.000
	T1	50.000	38,000	34.000	36,000	40.000	40.000
	T2	42.500	40,000	32.000	43,000	62.000	62.000
M1	D1	56.000	43,000	41.000	30,000	56.000	56.000
	D2	53.000	40,000	37.000	33,000	53.000	53.000
	T1	54.000	45,000	35.000	30,000	54.000	54.000
	T2	32.000	30,000	38.000	30,000	50.000	32.000
M2	D1	30.000	40,000	40.000	40,000	50.000	30.000
	D2	40.000	52,000	40.000	50,000	40.000	40.000
	T1	56.000	40,000	40.000	40,000	56.000	56.000
	T2	48.000	50,000	50.000	50,000	48.000	37.000
M3	D1	40.000	50,000	50.000	50,000	30.000	40.000
	D2	40.000	50,000	46.000	50,000	30.000	40.000
	T1	30.000	50,000	48.000	50,000	30.000	30.000
	T2	40.000	50,000	50.000	50,000	40.000	40.000
PL1	D1	43.000	30,000	40.000	40,000	34.200	37.000
	D2	42.000	31,500	40.000	44,000	33.000	40.000
	T1	33.600	44,000	50.000	30,000	33.600	33.600
	T2	32.000	43,000	50.000	30,000	32.000	32.000

Anexo 20 *Tabla de Longitud promedio de cada uno de los bioensayos, en los estadios de Nauplio, Zoea 1, Zoea 2, Zoea 3 , Mysis 1, Mysis2 , Mysis 3 y Post- larvas*

ESTADIOS	CONTEO DE TONLADA	CONTEO DE TONLADA	CONTEO DE TONLADA	CONTEO DE TONLADA	CONTEO DE TONLADA	CONTEO DE TONLADA
NV	1.250.000	1.850.000	1.250.000	2.650.000	2.250.000	2.000.000
Z1	1.200.000	1.500.000	1.000.000	2.000.000	1.200.000	1.200.000
Z2	1.100.000	800.0000	800.0000	1.00.000	1.100.000	1.100.000
Z3	1.000.000	800.0000	800.0000	800.0000	1.000.000	1.000.000
M1	1.000.000	1.000.000	1.000.000	1.000.000	1.000.000	1.000.000
M2	800.000	800.000	800.000	950.000	800.000	890.000
M3	800.000	800.000	800.000	800.000	800.000	840.000
PL1	800.000	800.000	800.000	800.000	800.000	800.000

Anexo 21 Tabla de Longitud promedio de cada uno de los bioensayos, en los estadios de Nauplio, Zoea 1, Zoea 2, Zoea 3 , Mysis 1, Mysis 2 , Mysis 3 y Post-larvas *Dunaliella* spp (D) y *Thalassiosira* (T)

NV	D1	D2	T1	T2	Z1	D1	D2	T1	T2	Z2	D1	D2	T1	T2			
N		6	6	6	6	N		6	6	6	6	N		6	6	6	6
Min		0.435	0.458	0.485	0.415	Min		0.765	0.733	0.789	0.809	Min		1.33	1.213	1.357	1.264
Max		0.524	0.517	0.521	0.545	Max		0.98	0.918	1.018	0.935	Max		1.51	1.442	1.55	1.675
Sum		2.892	2.89	3.012	2.917	Sum		5.25	5.218	5.287	5.164	Sum		8.406	8.224	8.579	8.592
Mean		0.482	0.4816667	0.502	0.4861667	Mean		0.875	0.8696667	0.8811667	0.8606667	Mean		1.401	1.370667	1.429833	1.432
Std. error		0.01527962	0.00961827	0.00476095	0.02036405	Std. error		0.03260675	0.02827681	0.03350464	0.01714189	Std. error		0.03128684	0.03529463	0.02913808	0.0559869
Variance		0.0014008	0.00055507	0.000136	0.00248817	Variance		0.0063792	0.00479747	0.00673537	0.00176307	Variance		0.0058732	0.00747427	0.00509417	0.0188072
Stand. dev		0.03742726	0.02355985	0.0116619	0.04988153	Stand. dev		0.07986989	0.06926375	0.08206928	0.04198889	Stand. dev		0.07663681	0.08645384	0.07137343	0.1371393
Median		0.4935	0.4765	0.5025	0.487	Median		0.8695	0.892	0.87	0.856	Median		1.382	1.396	1.4225	1.414
M1	D1	D2	T1	T2	M2	D1	D2	T1	T2	M3	D1	D2	T1	T2			
N		6	6	6	6	N		6	6	6	6	N		6	6	6	6
Min		1.977	2.05	2.69	2.785	Min		2.557	2.31	2.84	3.031	Min		3.204	3.42	3.401	3.551

Max	2.97	3.04	3.1	3.145	Max	3.51	3.68	3.33	3.213	Max	4.05	3.914	3.898	4.02
Sum	16.294	16.553	17.212	17.388	Sum	18.929	19.087	18.822	18.975	Sum	22.475	22.146	22.135	22.436
Mean	2.715667	2.758833	2.868667	2.898	Mean	3.154833	3.181167	3.137	3.1625	Mean	3.745833	3.691	3.689167	3.739333
Std. error	0.1516128	0.1448142	0.06979478	0.0561213	Std. error	0.1335107	0.1881015	0.06687999	0.02908235	Std. error	0.1264965	0.07124137	0.0875589	0.07895132
Variance	0.1379187	0.125827	0.02922787	0.0188976	Variance	0.1069506	0.212293	0.0268376	0.0050747	Variance	0.09600817	0.030452	0.04599937	0.03739987
Stand. dev	0.371374	0.354721	0.1709616	0.1374685	Stand. dev	0.327033	0.4607526	0.1638219	0.07123693	Stand. dev	0.3098518	0.174505	0.2144746	0.1933905
Median	2.8405	2.856	2.8745	2.8325	Median	3.194	3.277	3.155	3.1955	Median	3.8095	3.7045	3.74	3.696
Z3	D1	D2	T1	T2	PL1	D1	D2	T1	T2					
N	6	6	6	6	N	6	6	6	6					
Min	1.61	1.35	1.98	2.004	Min	4.145	4.075	4.01	3.96					
Max	2.328	2.317	2.19	2.1	Max	4.398	4.45	4.351	4.366					
Sum	12.601	12.016	12.546	12.366	Sum	25.633	25.676	25.255	25.117					
Mean	2.100167	2.002667	2.091	2.061	Mean	4.272167	4.279333	4.209167	4.186167					
Std. error	0.1085592	0.1382133	0.03171435	0.01725688	Std. error	0.0438607	0.06933526	0.05882653	0.06185274					
Variance	0.07071057	0.1146175	0.0060348	0.0017868	Variance	0.01154257	0.02884427	0.02076337	0.02295457					
Stand. dev	0.2659146	0.338552	0.07768398	0.04227056	Stand. dev	0.1074363	0.169836	0.144095	0.1515076					
Median	2.18	2.098	2.096	2.08	Median	4.285	4.314	4.268	4.2145					



Anexo 22 Cultivo de la microalga Dunaliella spp



Anexo 23 Líneas de aireación de tanques de cultivo



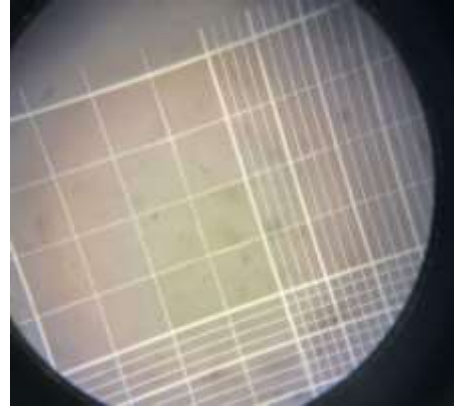
Anexos 24 Tanques de cultivos 4 experimentales de 1 toneladas 2 con Dunaliella y 2 con Thalassiosira



Anexo 25 Repiques de microalgas en 1tonelada



Anexo 26 Lectura de las ABS



Anexos 27 Conteo celular de Dunaliella spp.



Anexos 28 Observaciones de dias de estrés de microalga Dunaliella spp.



Anexo 29 Extracción de carotenos



Anexo 30 Resultado de protocolo de extracción de carotenos



Anexos 31 DIA 1 tanque de 1 tonelada para estrés



Anexo 32 DIA 2 tanque de 1 tonelada para estrés



Anexo 33 DIA 3 tanque de 1 tonelada para estrés



Anexo 23 DIA 4 tanque de 1 tonelada para estrés



Anexo 35 DIA 5 tanque de 1 tonelada para estrés