



UNIVERSIDAD DE ANTOFAGASTA
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR Y DE RECURSOS BIOLÓGICOS
CARRERA DE INGENIERIA EN ACUICULTURA

Seminario para optar al Título de Ingeniero Acuicultor
**“Desarrollo biotecnológico de un nuevo recurso planctónico como
fuente de ácidos grasos omega-3 de tipo EPA y DHA para la
industria acuícola alimentaria”**

Sebastián Nicolás Zepeda Castro
Licenciado en ciencias de la Acuicultura

Dra. María Teresa Mata Contreras
Profesor tutor

Dr. Carlos Riquelme Salamanca
Profesor Patrocinante

Antofagasta
2021

Agradecimientos

Agradezco especialmente al Dr. Carlos Riquelme y a la Dra. María Teresa Mata por el tiempo dedicado para orientar el desarrollo de este trabajo como mis profesores guías y por compartir sus conocimientos durante mi proceso estudiantil. Recalcando infinita gratitud, al ser recibido como tesista enriqueció mis habilidades profesionales para llevar a cabo los nuevos desafíos en el campo de las ciencias de la Acuicultura, gracias también al apoyo sin cesar de Paola Marticorena de la Rosa y a los docentes que forman parte del Laboratorio del Centro de Bioinnovación en las dependencias de la Universidad de Antofagasta, quienes junto a un equipo multidisciplinario aportaron con sus criterios y colaboración en el proceso de experimentación. ¡Gracias totales!

Dedicatoria

Dedico este trabajo en la realización de mi seminario de título a Dios y Familia que ha sido mi pilar fundamental en la vida para seguir en este amplio trayecto académico. Que, a pesar de la distancia, siempre conté con su inmenso apoyo incondicional. Cuya presencia ha resultado indispensable para alcanzar mis metas.

Muchas gracias Daniza Yanett y Rafael Armando los amo con todo mí ser.

Lista de tablas

N° de tablas	Descripción	N° de Páginas
Tabla.1	Tabla resumen con el origen y composición de potenciales y nuevas fuentes de EPA y DHA para la industria acuícola.	16
Tabla. 2	Nutrientes utilizados en el agua mar para las microalgas <i>Phaeodactylum tricornutum</i> , <i>Dunaliella salina</i> y <i>Tetraselmis</i> sp.	21
Tabla. 3	Nutrientes y metales trazas necesarios para proporcionar a los cultivos microalgales.	42
Tabla. 4	Solución de Metales trazas “oligoelementos” 1X	42

Lista de figuras

N° de Figuras	Descripción	N° de Páginas
Figura. 1	Actuales fuentes alternativas de omega-3. Tomada de Mispeces 2018.	14
Figura. 2	Flujograma de la metodología de trabajo.	20
Figura. 3	Dimensiones de las diferentes células microalgales observadas por medio de Microscopia con un aumento de 40X: A. <i>Phaeodactylum tricornutum</i> , B. <i>Tetraselmis</i> sp. y C. <i>Dunaliella salina</i> .	21
Figura. 4	Matraces de 4 litros con las cepas microalgales empleadas en los ensayos. A. Cultivo exponencial <i>Phaeodactylum tricornutum</i> , B. <i>Tetraselmis</i> sp y C. <i>Dunaliella salina</i> .	22
Figura. 5	Pre-alimentación y mantención en los ciclos de alimentación del organismo <i>O. marina</i> donde A. Ciclo de 7 días y B. Ciclo de 4 días alimentado con la microalga <i>Tetraselmis</i> sp. A una concentración microalgal de 500.000 cél/mL alimentado por una semana para luego hacer limpieza y no alimentar durante 4 días (fase de ayuno).	23
Figura. 6	Seguimiento del consumo del alimento microalgal durante 7 días. Con 2 concentraciones iniciales de protozoos A. 5.000 cél/mL y B. 10.000 cél/mL para saber el crecimiento poblacional de <i>O. marina</i> y el consumo del alimento a lo largo de 7 días de seguimiento.	24
Figura. 7	Comparación de las 3 microalgas en peso seco para las concentraciones seleccionadas. A. <i>Tetraselmis</i> sp., C. <i>Dunaliella salina</i> fueron 250.000 cél/mL correspondientes a 0,15 g/L a excepción de B. <i>Phaeodactylum tricornutum</i> por ser de menor tamaño con una concentración equivalente de 2.500.000 céls/ml.	26
Figura. 8	Reajuste de biomasa de los ensayos con <i>Phaeodactylum tricornutum</i> y peso seco del cultivo <i>Oxyrrhis marina</i> . Las concentraciones de la microalga Phaeophita <i>Phaeodactylum tricornutum</i> A. 750.000 cél/mL, B. 2.500.000 cél/mL por ser 4 veces más pequeña que las otras 2 microalgas chlorophitas y para <i>Oxyrrhis marina</i> C. 5.000 cél/mL, D. 10.000 cél/mL.	26

Figura. 9	Curvas depredador presa, <i>O. marina</i> (arriba: 5.000 cél/mL, abajo: 10.000 cél/mL) a lo largo de 7 días alimentado con 3 concentraciones de <i>Tetraselmis</i> sp. (150.000 cél/mL, 250.000 cél/mL, 500.000 cél/mL).	28
Figura. 10	Curvas depredador presa, <i>O. marina</i> (arriba: 5.000 cél/mL, abajo: 10.000 cél/mL) a lo largo de 7 días alimentado con 3 concentraciones de <i>Dunaliella salina</i> (150.000 cél/mL, 250.000 cél/mL, 500.000 cél/mL).	29
Figura. 11	Curvas depredador presa, <i>O. marina</i> (arriba: 5.000 cél/mL, abajo: 10.000 cél/mL) a lo largo de 7 días alimentado con 2 concentraciones de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> (750.000 cél/mL y 2.500.000 cél/mL).	30
Figura. 12	Comparación de la producción de <i>O. marina</i> en función del tiempo y del alimento suministrado. Eficiencia del crecimiento de <i>Oxyrrhis marina</i> alimentado con las mejores concentraciones microalgales para la cepa <i>Dunaliella salina</i> (barras rojas) y para la cepa <i>Phaeodactylum tricornutum</i> (barras verdes).	31
Figura. 13	Concentración de <i>O. marina</i> generada con las 3 mejores concentraciones de microalga (<i>Tetraselmis</i> sp., <i>Dunaliella salina</i> y <i>Phaeodactylum tricornutum</i>).	32
Figura. 14	Contenido de lípidos y contenido de EPA y DHA en muestras de <i>O. marina</i> . A 10.000 cél/mL alimentado con levadura, <i>Tetraselmis</i> sp., <i>Dunaliella salina</i> y <i>Phaeodactylum tricornutum</i> luego de 48 horas.	33
Figura. 15	Anexo 2. Consumo del alimento microalgal de la cepa <i>Dunaliella salina</i> y el tratamiento control utilizando el organismo <i>O. marina</i> .	43
Figura. 16	Anexo 2. Consumo del alimento de la cepa <i>Phaeodactylum tricornutum</i> . Por parte del organismo depredador <i>O. marina</i> y tratamiento con las 3 raciones microalgales.	44
Figura. 17	Anexo 2. Consumo del alimento microalgal de la cepa <i>Dunaliella salina</i> y el tratamiento control utilizando las mejores 2 concentraciones para la producción del organismo <i>Oxyrrhis marina</i> .	45
Figura. 18	Anexo 2. Consumo del alimento de la cepa <i>Phaeodactylum tricornutum</i> . Por parte del organismo depredador <i>Oxyrrhis marina</i> y reajuste con las 2 raciones microalgales aumentadas	46

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviaturas	Definición
P.t	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>
D.S	<i>Dunaliella salina</i>
T	<i>Tetraselmis sp.</i>
O. marina	<i>Oxyrrhis marina</i>
UMA5	Medio de cultivo modificado
DHA	Ácido docosahexaenoico
EPA	Ácido eicosapentaenoico
AGPI n-3	Ácido graso Poliinsaturado de cadena larga
USD	Dólar norteamericano
mL	Mililitros
L	Litros
ISA	Anemia infecciosa del salmón
Dinoflagelado	Grupo extenso de protistas flagelados
CBIA	Centro de Bioinnovación Antofagasta
Acuicultura	Conjunto de actividades, técnicas y conocimientos de cultivo de especies acuáticas vegetales y animales

Índice

Agradecimientos.....	1
Dedicatoria.....	2
Lista de tablas.....	3
Lista de figuras.....	4
LISTA DE ABREVIATURAS.....	6
Resumen.....	9
Abstract.....	10
1. Introducción.....	11
1.1. Problemática y desafíos en el área de alimentación de la industria acuícola.....	11
1.2 La importancia de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga omega-3 en la industria alimentaria.....	12
1.2.1 Desafíos en la producción de ácidos grasos para la industria acuícola: Fuentes alternativas de ácidos grasos omega-3.....	13
1.3 La importancia de la mejora trófica en la alimentación en acuicultura.....	14
1.4. Aspectos generales del protista heterótrofo <i>O. marina</i>	16
1.4.1 Potencialidad de <i>O. marina</i> como fuente alternativa de ácidos grasos.....	16
2. Hipótesis y Objetivos.....	19
2.1 Hipótesis.....	19
2.2 Objetivos.....	19
Objetivo General.....	19
Objetivo específico.....	19
3. Materiales y métodos.....	20
3.1 Diseño experimental.....	20
3.2 Obtención de las cepas.....	21
3.3 Preparación del agua de mar.....	21
3.4 Medio de cultivo.....	21
3.4.1 preparación del medio de cultivo para microalgas.....	22
3.5 Cultivo del alimento microalgal.....	22
3.6 Ensayos de crecimiento de <i>O. marina</i> con las diferentes dietas: <i>Phaeodactylum tricornutum</i> , <i>Tetraselmis</i> sp y <i>Dunaliella salina</i>	23
3.6.1 Periodo de hambruna previa a la aplicación de las diferentes dietas a <i>O. marina</i> ..	23
3.6.2 Curva depredador presa.....	24
3.7 Seguimiento de la biomasa en las curvas depredador/presa.....	24
3.7.1 Recuento de células.....	24
3.7.2. Seguimiento del crecimiento del organismo depredador por citometría de flujo....	24

3.7.3	Peso seco de sólidos suspendidos totales (SST)	25
3.8	Ensayos para evaluación del contenido en ácidos grasos EPA y DHA.....	26
3.8.1	Extracción y cuantificación de ácidos grasos EPA y DHA.....	27
3.9	Análisis estadístico	27
4.	Resultados.....	28
4.1	Crecimiento del cultivo de <i>Oxyrrhis marina</i> alimentado con las diferentes microalgas. Curvas depredador-presa.....	28
4.1.1	Cultivo de <i>O. marina</i> alimentado con la microalga <i>Tetraselmis</i> sp.	28
4.1.2	Cultivo de <i>O. marina</i> alimentado con la microalga <i>Dunaliella salina</i>	29
4.1.3.	Cultivo de <i>O. marina</i> alimentado con la microalga <i>Phaeodactylum tricornutum</i> . ..	30
4.1.4	Seguimiento del crecimiento del organismo depredador <i>O. marina</i> por citometría de flujo con cepas microalgales seleccionadas.	31
4.2	Producción de biomasa de <i>O. marina</i> en relación a las concentraciones seleccionadas para cada dieta microalgal.	31
4.3	Producción de ácidos grasos omega-3 a partir de la biomasa de <i>O. marina</i> con alimentos seleccionados y levadura como alimento alternativo.	32
5.	Discusión	34
5.1	Crecimiento celular del cultivo <i>O. marina</i> en función de las dietas suministradas.	34
5.2	Comparación del contenido en ácidos grasos omega-3 (EPA y DHA) en <i>O. marina</i> en función del alimento suministrado a los cultivos.	35
5.3	Aplicación para la producción de biomasa rica en ácidos grasos omega- 3 en la industria acuícola.	36
6.	Conclusiones	37
7.	Referencias bibliográficas	38
8.	Anexos.....	42

Resumen

Los alimentos de origen marino, son una fuente rica de proteínas, vitaminas y minerales, además de ser la principal fuente dietética natural de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga omega-3 (n-3): eicosapentaenoico (EPA; 20: 5n-3) y docosahexaenoico (DHA; 22: 6n-3). Estos ácidos grasos esenciales generan en la salud humana múltiples beneficios. Sin embargo, los pescados y mariscos, la principal vía de incorporación de estos en la dieta, no producen omega-3 por sí solos, sino que los incorpora a través de la dieta, viéndose afectados también en su crecimiento, desarrollo fisiológico y respuesta inmune en cada etapa del ciclo productivo por la disponibilidad de estos ácidos grasos esenciales. Las fuentes para la obtención de ácidos grasos omega-3 no son muy numerosas actualmente, por esto es que la búsqueda de fuentes alternativas constituye un desafío tecnológico importante, de alto potencial de desarrollo y que desde el punto de vista económico es una muy buena oportunidad para entrar a competir a un mercado cuya demanda ha venido en alza y se proyecta que seguirá aumentando a futuro, permitiendo mejorar también el factor limitante para el cultivo comercial de diferentes especies mediante la incorporación de dietas alternativas. En base a estos antecedentes es que se presenta el protista heterótrofo *Oxyrrhis marina* como una posible solución a la problemática actual, ya que se ha reportado que este organismo posee altos niveles de ácido grasos (EPA y DHA) y que estos dependen del tipo de presa que se suministra a través de la dieta. Por lo cual, en este trabajo se realizó una evaluación de los efectos de la dieta suministrada para una cepa de *O. marina* nativa de la región de Antofagasta. Para ello se estudiaron 3 dietas microalgales (*Tetraselmis* sp, *Dunaliella salina* y *Phaeodactylum tricornutum*) en volúmenes de 200 mL con diferentes proporciones depredador/presa, en concreto 3 concentraciones de alimento (150.000 cél/mL, 250.000 cél/mL y 500.000 cél/mL) y 2 concentraciones distintas para el organismo protozoo *O. marina* (5.000 cél/mL y 10.000 cél/mL). Dado que *O. marina* tiene la capacidad no sólo de transformar si no de sintetizar de novo dichos los ácidos grasos omega-3 de interés sin necesidad de incorporarlos desde las presas, también se incorporó levadura seca que no presenta dichos ácidos grasos en su composición como control alimenticio de bajo costo. Los resultados obtenidos permitieron conocer las raciones de alimento idóneas: 250.000 cél/mL para *Tetraselmis* sp y *Dunaliella salina*, así como 2.500.000 cél/mL para *Phaeodactylum tricornutum* tras reajuste a peso seco equivalente, en combinación con 10.000 cél/mL de *Oxyrrhis marina*. El mejor crecimiento se obtuvo con *Dunaliella salina* al día 4, sin embargo, se obtiene mejor producción de EPA y DHA con *Phaeodactylum tricornutum*, siendo en contraste muy baja la productividad de estos ácidos grasos con el suministro de la levadura como alimento de bajo costo. Por lo tanto, *Oxyrrhis marina* se muestra como una potencial fuente de ácidos grasos para la industria acuícola alimentaria, destacando la importancia de un adecuado control del tipo y proporción del alimento, así como el tiempo de cosecha del protista para potenciar y optimizar la obtención de biomasa rica en estos ácidos grasos de interés, específicamente EPA y DHA.

Abstract

Marine foods are a rich source of proteins, vitamins and minerals, as well as being the main natural dietary source of long chain omega-3 (n-3) polyunsaturated fatty acids: eicosapentaenoic (EPA; 20: 5n- 3) and docosahexaenoic (DHA; 22: 6n-3). These essential fatty acids generate multiple benefits for human health. However, fish and shellfish, the main way of incorporating these into the diet, does not produce omega-3s by themselves, but incorporates them through the diet, also being affected in their growth, physiological development and immune response in each stage of the production cycle by the availability of these essential fatty acids. The sources for obtaining omega-3 fatty acids are not very frequent at the moment, which is why the search for alternative sources constitutes an important technological challenge, with high development potential and that from the economic point of view is a very good opportunity to enter to compete in a market whose demand has been on the rise and it is projected that it will continue to increase in the future, also allowing to improve the limiting factor for the commercial cultivation of different species through the incorporation of alternative diets. Based on these antecedents, the heterotrophic protist *Oxyrrhis marina* is presented as a possible solution to the current problem, since it has been reported that this organism has high levels of fatty acids (EPA and DHA) and that these depend on the type of prey. that is supplied through the diet. Therefore, in this work an evaluation of the effects of the diet provided for a strain of *O. marina* native to the Antofagasta region was carried out. For this, 3 microalgal diets (*Tetraselmis* sp, *Dunaliella salina* and *Phaeodactylum tricornutum*) were studied in volumes of 200 mL with different predator / prey ratios, specifically 3 food concentrations (150,000 célls / mL, 250,000 célls / mL and 500,000 célls / mL) and 2 different concentrations for the protozoan organism *O marina* (5,000 célls / mL and 10,000 célls / mL). Since *O. marina* has the ability not only to transform but to synthesize de novo the omega-3 fatty acids of interest without the need to incorporate them from the dams, dry yeast that does not present said fatty acids in its composition was also incorporated as low cost food control. The results obtained allowed to know the suitable food rations: 250,000 célls / mL for *Tetraselmis* sp and *Dunaliella salina*, as well as 2,500,000 célls / mL for *Phaeodactylum tricornutum* after readjustment to equivalent dry weight, in combination with 10,000 célls / mL of *O. marina*. The best growth was obtained with *Dunaliella salina* on day 4, however, it is better obtained from EPA and DHA with *Phaeodactylum tricornutum*, the productivity of these fatty acids being in contrast very low with the supply of yeast as a low-cost food. Therefore, *Oxyrrhis marina* is shown as a potential source of fatty acids for the food aquaculture industry, highlighting the importance of an adequate control of the type and proportion of the food, as well as the harvest time of the protist to enhance and optimize the obtaining of biomass rich in these acids. fats of interest, specifically EPA and DHA.

1. Introducción

1.1. Problemática y desafíos en el área de alimentación de la industria acuícola.

Debido a la escasez de información existente sobre los requerimientos nutricionales para dieta de diferentes organismos como peces, camarones y pectínidos, tanto en su fase larvaria como en la adulta, la adecuada alimentación de estos constituye actualmente el principal factor limitante para el cultivo comercial de estos organismos. En su mayoría los estudios se realizan en condiciones de laboratorio controladas “bajo techo” recibiendo dietas artificiales como también dietas basadas en alimento vivo. Esta situación ha generado la necesidad de diseñar y experimentar con nuevos sistemas de cultivo para las larvas, siendo relevante en este aspecto la búsqueda de nuevas presas, con un tamaño y un perfil nutritivo adecuado a las distintas etapas de las larvas en cultivo. Entre los nutrientes fundamentales, los lípidos juegan un papel importante como colchón mecánico para el soporte de los órganos vitales, y como una fuente importante de energía metabólica (ATP). En particular, los ácidos grasos libres, derivados de los triglicéridos (grasas y aceites) representan la principal fuente de combustible aeróbico para el metabolismo energético del músculo del pez, sirviendo como vehículo biológico en la absorción de vitaminas liposolubles A, D, E y K, indispensables para el mantenimiento e integridad de las membranas celulares. En el caso de la alimentación del salmón, el remplazo del aceite marino por aceite vegetal impone limitaciones nutricionales, especulándose que una de las causas de la expansión del virus ISA se debería a esta sustitución ya que la ausencia de ácidos grasos omega-3 de origen marino puede provocar un debilitamiento de la respuesta inmune del pez (Valenzuela *et al.*, 2012). En concreto es por esto que, la recuperación de la industria acuícola del salmón, después de la crisis originada por el virus de la anemia infecciosa del salmón (ISA), ha generado nuevamente una demanda de aceite de pescado en Chile que supera con creces la producción interna, por lo que, la industria de alimentos para la acuicultura ha debido recurrir a la importación de aceite de pescado, especialmente desde Perú, con el consiguiente incremento de los costos que esto significa. La sostenida disminución del recurso pesquero por sobreexplotación en los países con mayor actividad en este rubro (Chile y Perú) ha generado una importante disminución de la disponibilidad de harina y aceite de pescado. Actualmente la demanda de aceite de pescado sigue aumentando, llegando a superar la oferta, alcanzado precios muy altos en el mercado internacional y se espera que sigan subiendo. Se proyecta un crecimiento continuado en la demanda de aceite de pescado por la Industria Acuícola en Chile, lo que genera un déficit importante de este recurso, pero la alternativa a la cual se está recurriendo cada vez más es el uso de aceites vegetales con contenido relativamente alto del ácido graso omega-3 alfa linolénico (aceite de canola y soya, entre otros) requiriéndose nuevas fuentes alternativas que reemplacen el aceite de pescado que necesita la industria. Esta situación ha motivado a la industria de nutrición tanto humana como animal, a realizar esfuerzos a través de investigación y desarrollo para la búsqueda de alternativas de remplazo del aceite y la harina de pescado, como fuentes de ácidos grasos en especial de los ácidos grasos poliinsaturados omega-3.

1.2 La importancia de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga omega-3 en la industria alimentaria.

Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga pertenecen al grupo omega-3 y son indispensables para la salud humana (Kitajka *et al.*, 2004; Sijtsma y De Swaaf, 2004; Mendes *et al.*, 2009; Simopoulos, 1991; Arts *et al.*, 2001; Calder y Yaqoob, 2009). El ácido eicosapentaenoico (EPA; 20: 5 *n*-3) y el ácido docosahexaenoico (DHA; 22: 6 *n*-3) son componentes esenciales en la nutrición humana ya que pueden tratar enfermedades cardiovasculares, demostrado en cientos de experimentos in vivo e in vitro, aparte de varios ensayos clínicos (Connor *et al.*, 2000). Se ha demostrado que una ingesta adecuada de ácidos grasos omega-3, incluido el DHA en una etapa temprana de la vida cumple funciones clave en el crecimiento y desarrollo de los bebés como la salud cardiovascular en los adultos (Hamilton *et al.*, 2016) evitando el aumento de la presión arterial, reduciendo la enfermedad coronaria y la depresión (Joordens *et al.*, 2007). Estos beneficios derivados de su consumo habitual están bien documentados en la literatura científica médica y nutricional. En este aspecto, existen también beneficios para el resto de organismos, por ejemplo, para el crecimiento del pez, su estado, desarrollo fisiológico y respuesta inmune, en cada etapa del ciclo productivo cuando se incluye EPA y DHA en sus dietas alimenticias. Hay evidencia para apoyar que la adición de aceite de pescado directamente o por medio de la harina de pescado puede proporcionar una alta gama de beneficios, ya que sumado a los beneficios directos al organismo, cuando los animales están destinados al consumo humano existe la ventaja adicional que un animal alimentado con una dieta rica en omega-3 de cadena larga, a su vez hará una útil contribución al consumo alimenticio del usuario final. Por esto, la Organización para la Alimentación y Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) respaldan y aconsejan su consumo habitual. La fuente principal de los EPA y DHA naturales disponibles para la alimentación humana viene directamente de los pescados y mariscos, sin embargo, estos no producen omega-3 por sí solos, sino que se adiciona a través de la dieta. Para asegurar los niveles adecuados de EPA y DHA, se debe incluir como habíamos comentado harina de pescado u otra fuente en los alimentos de peces cultivados entregando los requerimientos nutricionales mínimos para lograr un máximo crecimiento y un máximo almacenaje de los nutrientes en el tejido y prevenir la ocurrencia de síntomas por deficiencia. En este sentido, tanto para las empresas proveedoras de ingredientes para dietas de peces, como para las compañías productoras de alimentos, es relevante la búsqueda de una o diversas opciones que en algún momento sean el reemplazo definitivo del omega-3 marino que actualmente se adiciona a las dietas, siendo este altamente demandados por la industria alimentaria y la industria acuícola.

1.2.1 Desafíos en la producción de ácidos grasos para la industria acuícola: Fuentes alternativas de ácidos grasos omega-3.

Como fuentes alternativas de obtención de omega-3, en el ámbito de la acuicultura, se han estudiado las microalgas para ser utilizadas como alimento de rotíferos y peces. Los organismos tipo fitoplancton son los más fáciles de producir utilizando un buen programa de fertilización, sin embargo, las fuentes proveedoras de ácidos grasos son escasas en dinoflagelados marinos, relacionándose en general con la producción de toxinas o pigmentos (Singh S. *et al.*, 2005). Las especies de microalgas más utilizadas son *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri*, *Tetraselmis suecica*, *Chaetoceros gracilis* y *C. calcitrans* (Farías-Molina, 2001; Velasco *et al.*, 2007). Generalmente, se usa la mezcla de dos microalgas en las fases iniciales, una flagelada y una diatomea, y cuando las larvas alcanzan tallas mayores, se recomienda incluir también especies como *Tetraselmis* (Helm *et al.*, 2006; Farías-Molina, 2001; Velasco, 2008) ya que la calidad nutricional del alimento suministrado es un factor crítico que determina la calidad y salud de las larvas, contribuyendo al éxito en las operaciones de acuicultura (Brown, 2002). Actualmente se comercializan alrededor de 20 especies de microalgas, los candidatos más destacados como fuentes de ácidos grasos incluyen los géneros *Nannochloropsis* y *Phaeodactylum* debido a su alto contenido de EPA y DHA (Schüler *et al.*, 2017). *Phaeodactylum tricornutum* es una microalga perteneciente a la clase *Bacillariophyta*, intensificando su estudio debido a su gran producción de EPA y su rápido crecimiento, evitando costos de producción y bajo requerimiento de sílice en comparación a otras diatomeas empleándose en la industria por su composición bioquímica celular y su valor nutritivo (Pérez *et al.*, 2008; Steinrücken *et al.*, 2018). Algunas de estas fuentes novedosas de omega-3 ya son productos disponibles comercialmente (Tabla 1). Dado este panorama, y las oportunidades que efectivamente tiene esta industria en los mercados nacionales e internacionales, es importante abordar el desafío que impone la recuperación de este sector productivo, teniendo un alto potencial en la mejora de los cultivos reconociendo la importancia de la interacción entre los distintos microorganismos del plancton asegurando un buen suministro y tipo de alimentos naturales que prefiere cada especie en particular. Entre las especies heterotróficas *Schizochytrium* spp. parece ser una alternativa más cercana para ser incorporada a la dieta (Sahin *et al.*, 2018), no obstante, sus costes no permiten que éstos sean incorporados en dietas de engorde de peces y su producción se destina prácticamente a dietas de destete larvario y a consumo humano directo. Entre otras fuentes alternativas está el krill, el cual provee de importantes ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga EPA y DHA con gran biodisponibilidad al encontrarse como fosfolípidos (Albalat *et al.*, 2016). También está la opción de la mejora del aprovechamiento de los subproductos pesqueros a través de la mejora de la eficiencia de la economía circular. Otra de las opciones, que no es de origen marino, son los organismos modificados genéticamente (OGM) (Delarue y Guriec, 2014). Actualmente se plantea la posibilidad de transformar plantas para que sean productoras de omega-3 o modificar microalgas para que produzcan mayor cantidad de lípidos EPA y DHA. En el primer caso, los trabajos más avanzados se han producido con *Camelina sativa* la cual ya ha sido probada en

salmones (Hixson *et al.*, 2014). Dentro de todas estas alternativas, la que se presenta en fase industrial en algunos países, es la obtención de lípidos a partir de microalgas, las cuales, cuando son cultivadas en condiciones adecuadas, permiten obtener fosfolípidos con alta proporción de DHA, no obstante, su aplicación es limitada y constituye un importante desafío por sus elevados costes de producción y procesado. (Valenzuela *et al.*, 2014). Mientras que otras están en desarrollo y podrían estar disponibles en un futuro próximo (Tocher *et al.*, 2019).

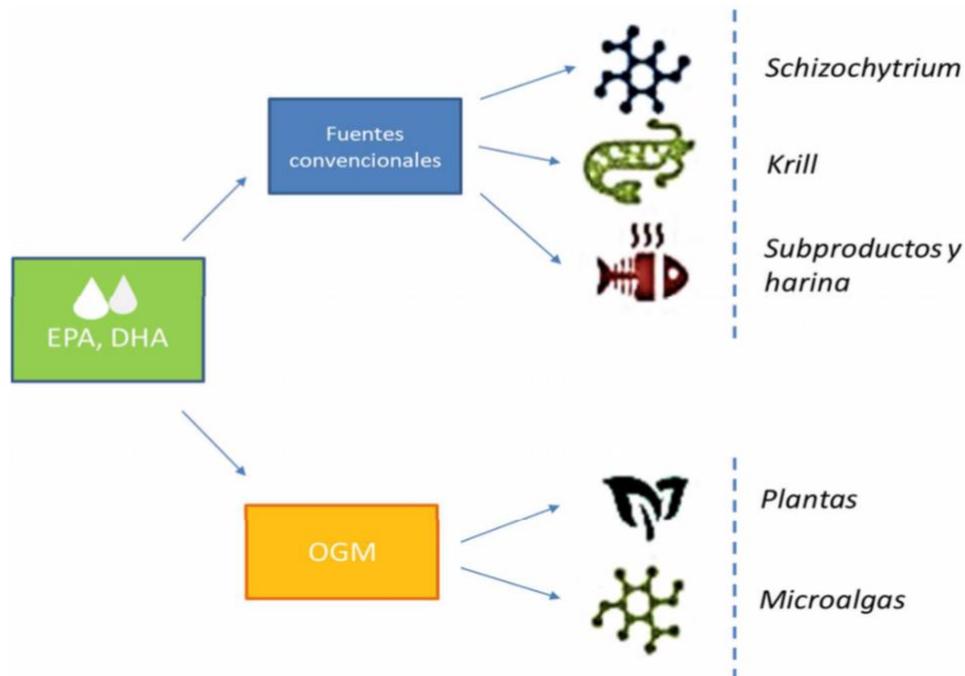


Figura 1. Actuales fuentes alternativas de omega-3. Tomada de Mispeces 2018.

1.3 La importancia de la mejora trófica en la alimentación en acuicultura.

Identificar una dieta específica que cumpla con los requisitos necesarios para optimizar el crecimiento y la sobrevivencia, sobre todo en la etapa larval, es uno de los factores más limitantes para el crecimiento y la supervivencia de larvas de moluscos pectínidos (Uriarte y Farías, 1999; Vivanco *et al.*, 2014). Existen antecedentes que indican que se necesita incorporar eslabones tróficos intermedios a los que actualmente se emplean tradicionalmente en la acuicultura (microalgas, rotíferos y Artemias), utilizados como miembros importantes de las redes tróficas planctónicas en la transferencia de la materia orgánica, formando en gran parte el anillo microbiano o red trófica microbiana (microbial loop), la cual corresponde a un agregado al esquema clásico de la cadena trófica en ecosistemas acuáticos planctónicos. Diferentes estudios (Martínez, 1991; Marty *et al.*, 1992; Delaunay *et al.*, 1993), han informado que las larvas de los pectínidos tienen un alto requerimiento de EPA en las fases larvarias tempranas y una disminución hacia la fase tardía y posmetamórfica, mientras que los requerimientos de DHA parecen mantenerse altos durante toda la vida larvaria e incluso después de la metamorfosis. Por otro lado, las larvas

de peces no se alimentan activamente en los primeros estadios, sino que sobreviven consumiendo la reserva de alimentos de su saco vitelino, para luego poder suministrar una dieta en los estadios posteriores correspondientes. Es por ello que también necesitan EPA y DHA en relación al poco tiempo antes de la absorción completa del saco vitelino. Los alevines tempranos comienzan a consumir alimentos naturales, que normalmente consisten primero en el plancton más pequeño, por ejemplo, algas microscópicas y rotíferos. A medida que aumenta el tamaño de su boca, los alevines comen plancton cada vez mayor y larvas/crisálidas de insectos siendo este utilizado también como el alimento favorito de los peces, variando considerablemente dependiendo de la especie y de su fase de desarrollo. Paulatinamente, a medida que crece, sus preferencias alimenticias van cambiando hasta parecerse más a los peces adultos. La incorporación en las diferentes fases de alimentación de fuentes alternativas de ácidos grasos es fundamental y alternativas como el uso de aceites vegetales con alto contenido de ácido graso omega-3 alfa Linolénico (ALN) (canola, linaza, chía) puede ser una opción, sin embargo, la conversión del ALN en EPA y DHA es muy baja en humanos, animales y peces de cultivo, con lo cual hay riesgo de deficiencia nutricional de EPA y/o DHA. En este ámbito, el protista heterótrofo, *Oxyrrhis marina*, que puede biosintetizar de novo los ácidos grasos poliinsaturados del tipo omega-3 EPA y DHA (Lund *et al.*, 2008) y en el que se han identificado una amplia gama de genes asociados con la síntesis y el metabolismo de aminoácidos, lo que indica la gran capacidad biosintéticas de esta especie que cambia dentro del ciclo de crecimiento como respuesta a diversos factores bióticos y abióticos (Davidson *et al.*, 1992; Flynn *et al.*, 1993), lo hacen un atractivo candidato como alimento alternativo rico en omega-3 para la acuicultura, sumado a su potencialidad como mejora a la red trófica suministrada como alimento. Actualmente son reconocidos como miembros importantes de las redes tróficas planctónicas en la transferencia de la materia orgánica, ya que forman parte del llamado anillo microbiano o red trófica microbiana, donde una parte importante de la producción primaria fluye a través de los protistas heterótrofos antes de la transferencia del carbono hacia metazoos omnívoros y carnívoros de mayor tamaño como las larvas de molusco y peces de importancia comercial para Chile. Existe una alta complejidad estructural y funcional de los sistemas marinos pelágicos, abarcando desde los virus hasta vertebrados superiores, con interacciones múltiples a diferentes niveles y en este entorno, el crecimiento y la mortalidad debida a la depredación son los factores más importantes (Jeong *et al.*, 2015). *O. marina* han sido y siguen siendo utilizados históricamente como modelo para examinar conceptos asociados con la dinámica de la población (Gause *et al.*, 1936; Fenton *et al.*, 2010), donde las altas tasas de crecimiento pero bajas en mortalidad debido a la depredación pueden causar aumentos rápidos en la abundancia de sus células (Jeong *et al.*, 2015). En este aspecto, para comprender las funciones de un dinoflagelado en los ecosistemas marinos y sus interacciones con otros organismos relacionados (como una presa potencial o un depredador) es necesario seguir realizando estudios en este ámbito.

Tabla 1. Nuevas fuentes de EPA y DHA para la industria acuícola. Tabla resumen con el origen y composición de potenciales y nuevas fuentes de EPA y DHA para la industria acuícola.

Table 1

Summary of the origins and compositions of some potential new sources of EPA and DHA.

Product	Development Partners	Source	Type	Lipid Content ^b	Composition ^a					Reference
					EPA ^c	DHA ^c	% of TFA ^d	% of Product	Total n-3 LC-PUFA	
AlgaPrime™ DHA	Corbion (TerraVia/Bunge) ^e	Microalgae	Algal biomass	60	0	48	48	28	[42]	
DHAgold™	DSM Nutritional Products	Microalgae	Algal biomass	49	1.0	44.4	45.8	22.5	[43]	
DHA Natur™	ADM Animal Nutrition	Microalgae	Algal biomass	50–60	0.25	34	34.3	17.2–20.6	[44]	
ForPlus™	Alltech Coppens ^f	Microalgae	Algal biomass	61	0.3	29	29.3	17.9	[45]	
Nymega™	Heliae Development ^g	Microalgae	Algal biomass	65	~0.1	20	~31	21	[46]	
Veramaris ^h Oil	Veramaris ^h	Microalgae	Oil	100	~16	~34	~54	~54	[47]	
Camelina sativa	Rothamsted Research/UoS	GM camelina	Oil	100	20	0	24	24	[48]	
Camelina sativa	Rothamsted Research/UoS	GM camelina	Oil	100	9	11	28	28	[49]	
Latitude™	BASF/Cargill	GM canola	Oil	100	7	1	12	12	[50]	
Aquaterra™/Nutriterra™ ⁱ	CSIRO/Nuseed/GRDC	GM canola	Oil	100	0.5	10	12	12	[51]	
Yarrowia lipolytica ^j	DuPont	GM yeast	Yeast biomass	~50	~50	0	50	25	[52]	

^a Compositional data were extracted or extrapolated from various sources and, in some cases, may differ in detail from final commercialised products. ^b Percentage of product; ^c Percentage of total fatty acids (TFA); ^d Includes 20:4n-3 and 22:5n-3 (if any); ^e Initially developed by Terravia Holdings (formerly Solazyme) and to be commercially produced and marketed in joint venture with Bunge. Acquired by Corbion after Terravia filed for bankruptcy with subsequent buyout of Bunge; ^f Initially developed by Alltech and, after acquiring Coppens International feed company, was included in many of Alltech Coppens aquafeeds although this may not continue in the future with the closure of the microalgal facility in the USA; ^g Initially developed by Heliae Development LLC and distributed in partnership with Syndel Laboratories Ltd.; ^h Initially developed by DSM and to be produced and marketed by Veramaris^h, a 50:50 joint venture with Evonik; ⁱ Oil from GM canola to be marketed as Aquaterra™ and Nutriterra™ for aquaculture and human consumption, respectively; ^j An oil from GM *Y. lipolytica* was once marketed in capsule form as New Harvest™ EPA for human consumption. Compositional data extracted or extrapolated from the publications or publicly available materials cited in last column. ADM, Archer Daniels Midland Company; CSIRO, Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation; GRDC, Grains Research and Development Corporation; UoS, University of Stirling.

1.4. Aspectos generales del protista heterótrofo *O. marina*.

Oxyrrhis marina superficialmente, es fácil de reconocer (Dodge, 1982) y aislar del entorno natural (Lowe *et al.*, 2011), de cuerpo alargado oval, asimétricamente posterior, cinturón imperfecto en el lado derecho, un robusto colgante de lóbulo con forma de tentáculo entre los dos flagelos que divide el amplio surco ventral no desarrollado, incoloro y con una longitud de 10–37 µm, típico de aguas poco profundas, pozas litorales y supra litorales (Johnson, 2000; Kimmance *et al.*, 2006). Es una especie ampliamente estudiada (Montagnes *et al.*, 2011a) que presenta una amplia distribución geográfica (Watts *et al.*, 2011). Es considerado un microorganismo cosmopolita y su presencia ha sido reportada en Bélgica, Dinamarca, Rumania, Irlanda, Alemania, Inglaterra, España, Italia, Francia, Rusia, USA, México, Finlandia, U.K, Corea, Japón, Australia, Sudáfrica, Brasil (Watts *et al.*, 2011) y Cuba (Gómez *et al.*, 2014). Entre sus características a destacar es que puede ser cultivado con una amplia variedad de especies de presas en experimentos de alimentación basados en laboratorio (Kent, 1880; Barker, 1935; Droop, 1953) siendo una buena alternativa proyectada al cultivo como recurso biotecnológico, debido a su facilidad de cultivo, amplia distribución y tolerancia a un amplio rango de condiciones ambientales (Lowe *et al.*, 2011b).

1.4.1 Potencialidad de *O. marina* como fuente alternativa de ácidos grasos.

Las cepas de microalgas tienen un enorme potencial para contribuir a la bioeconomía, desde la producción de varios productos, así como alimentos para animales y suplementos alimenticios de alto valor, representando un recurso prometedor para la biotecnología en la producción de ácidos grasos poliinsaturados (LC-PUFA) sin embargo hay pocos estudios en

relación a la potencialidad de dinoflagelados protistas como *O. marina*. En este aspecto, hay prometedores antecedentes basado en estudios que han sido motivados debido a sus características citológicas y genéticas inusuales al biosintetizar de novo los ácidos grasos poliinsaturados del tipo omega-3 EPA y DHA (Lund *et al.*, 2008), siendo capaz de sintetizar el set completo de aminoácidos, donde tiene reductoisomerasa de ácido Ketol, que participa en la síntesis de los aminoácidos esenciales Valina, Leucina e Isoleucina el cual posee un buen contenido nutricional que depende directamente de su dieta. Siendo capaz por tanto de mejorar tróficamente la calidad nutricional de algas consideradas de mala calidad y así suministrar de manera eficiente el ácido docosahexaenoico (DHA) al siguiente nivel trófico (Hartz, 2010). Al analizar un conjunto de datos de transcriptoma obtenido de *Oxyrrhis marina*, (Lowe *et al.*, 2011) identificaron una amplia gama de genes asociados con la síntesis y el metabolismo de aminoácidos, lo que indica las capacidades biosintéticas de esta especie.

Respecto a la relación con las presas dentro de la red trófica, el organismo *O. marina* ha sido utilizado ampliamente como un modelo de depredador para investigar la alimentación selectiva con diferentes especies de presas (Goldman *et al.*, 1989; Flynn *et al.*, 1996; Hansen *et al.*, 1996; Davidson *et al.*, 2005). Triemer (1982) notó cambios en la forma después de la ingestión del alimento, la variación en el tamaño se produce según la concentración de los alimentos y el estado del cultivo (Kimmance, S. A., Atkison, D., Montagnes, D. J. S, 2006), no obstante, el tamaño óptimo de presas es más pequeño que el de sí mismo (Hansen, 1992; Hansen *et al.*, 1996; Davidson *et al.*, 2011), demostrando que *O. marina* discrimina entre presas según el tamaño, la composición bioquímica y la carga (Hammer *et al.*, 1999, 2001; Wootton *et al.*, 2007). Sobrevive también a través de la absorción de moléculas orgánicas disueltas, usando este mecanismo en ambientes saprobianos obteniendo los nutrientes a partir de materiales orgánicos inertes (Lowe *et al.*, 2011b). Exhibe fototaxismo positivo (Droop, 1954; Hartz, 2010) y un ciclo pronunciado de día aumentando las tasas de alimentación y crecimiento durante el día (Jakobsen y Strom, 2004). Hay pocos estudios sobre los patrones de alimentación de los protistas heterótrofos comunes (Park *et al.*, 2011) por lo tanto, vale la pena explorar las interacciones y relación con el contenido de lípidos. Actualmente existen estudios sobre la composición de ácidos grasos y/o la producción de DHA de *O. marina* alimentado con presas de algas (Breteler *et al.*, 1999; Veloza *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2016), dando como resultado una alta concentración durante brotes explosivos y extensos, siendo estudiados como candidatos potenciales para un tipo de recurso de biocombustible (de la Jara *et al.*, 2003; Fuentes-Grünwald *et al.*, 2012, 2016). En particular, el dinoflagelado heterótrofo *O. marina* produce altos niveles de DHA cuando se alimenta de diversas presas de algas, bacterias, nano o micro-flagelados, dinoflagelados fototróficos, nanoflagelados heterótrofos, ciliados y levaduras (Jeong *et al.*, 2017) proporcionan una base para comprender las interacciones entre protistas heterótrofos y su contenido nutricional en relación a presas que sean de gran relevancia en este aspecto. Por todas estas características es que, este microorganismo ha despertado el interés de la comunidad

científica mundial, lo cual se ha visto reflejado en el aumento de las publicaciones, presentando un gran interés biotecnológico para diferentes industrias entre ellas la de alimentación acuícola. Bajo este contexto y en el ámbito de la alimentación larval en acuicultura, el estudio de mejora trófica puede cerrar la brecha de nutrientes esenciales entre el bucle microbiano y niveles tróficos superiores, para lograr así aumentar la sobrevivencia larval de los cultivos, el principal cuello de botella en la Acuicultura Chilena.

En base a los antecedentes presentados, fundamentado en la potencialidad del protista heterótrofo *Oxyrrhis marina* como fuente de ácidos grasos omega-3 de tipo EPA y DHA para la industria acuícola alimentaria y conociendo que la composición nutricional de *O. marina* depende de su dieta, es que, el objetivo general de este estudio se centró en evaluar la producción de ácidos grasos EPA y DHA en el protista heterótrofo *O. marina* en base a la dieta suministrada, todo esto enfocado a la mejora de la productividad y contenido, proyectándose como un nuevo recurso planctónico rico en ácidos grasos omega-3 para la industria acuícola alimentaria.

2. Hipótesis y Objetivos

2.1 Hipótesis

Fundamentado en la potencialidad del protista heterótrofo *Oxyrrhis marina* como fuente de ácidos grasos omega-3 de tipo EPA y DHA para la industria acuícola alimentaria y conociendo que la composición nutricional de *Oxyrrhis marina* depende de su dieta es que, se propone la siguiente hipótesis:

“Es posible mejorar la productividad y contenido de EPA y DHA de la biomasa de *Oxyrrhis marina* en base al control de su dieta empleando para ello presas y proporciones de alimentación seleccionadas”

2.2 Objetivos

Objetivo General

Evaluar la producción de ácidos grasos EPA y DHA en el protista heterótrofo *O. marina* en base a las dietas suministradas.

Objetivo específico

- a- Evaluar la proporción más óptima depredador/presa para el crecimiento de *O. marina* empleando 3 dietas microalgales como alimento vivo.
- b.- Evaluar la composición de EPA y DHA, en el organismo *O. marina*, en función de las dietas microalgales suministradas.
- c.- Evaluar la incorporación de levadura como alimento alternativo de bajo costo para la producción de EPA y DHA por parte de *O. marina*.

3. Materiales y métodos

3.1 Diseño experimental

El diseño experimental consistió en alimentar al organismo heterótrofo protozooplanctónico, *Oxyrrhis marina*, a 2 concentraciones (5.000 y 10.000 cél/mL) con 3 tipos de dietas a base de organismos autótrofos (microalgas), que incluyeron 2 chlorophytas: *Tetraselmis* sp. (Ts) y *Dunaliella salina* (Ds) a concentraciones de 150.000, 250.000 y 500.000 céls/ml y una phaeophyta: *Phaeodactylum tricornutum* (Pt) a concentraciones de 750.000 y 2.500.000 céls/ml, todos por triplicado. Para cada tratamiento se realizaron curvas depredador/presa durante 7 días y el seguimiento se realizó mediante conteo celular por microscopía y mediante citometría de flujo. Una vez determinadas las mejores relaciones de alimento se calculó la concentración equivalente en peso seco de levadura para los estudios posteriores de cuantificación de ácidos grasos. De los ciclos de alimentación con las dietas seleccionadas más el tratamiento con levadura se tomaron muestra a las 24 y 48 horas, así como de cada una de las microalgas y la levadura como control y se evaluó la producción de ácidos grasos EPA (ácido eicosapentaenico) y DHA (ácido docosahexaenico).

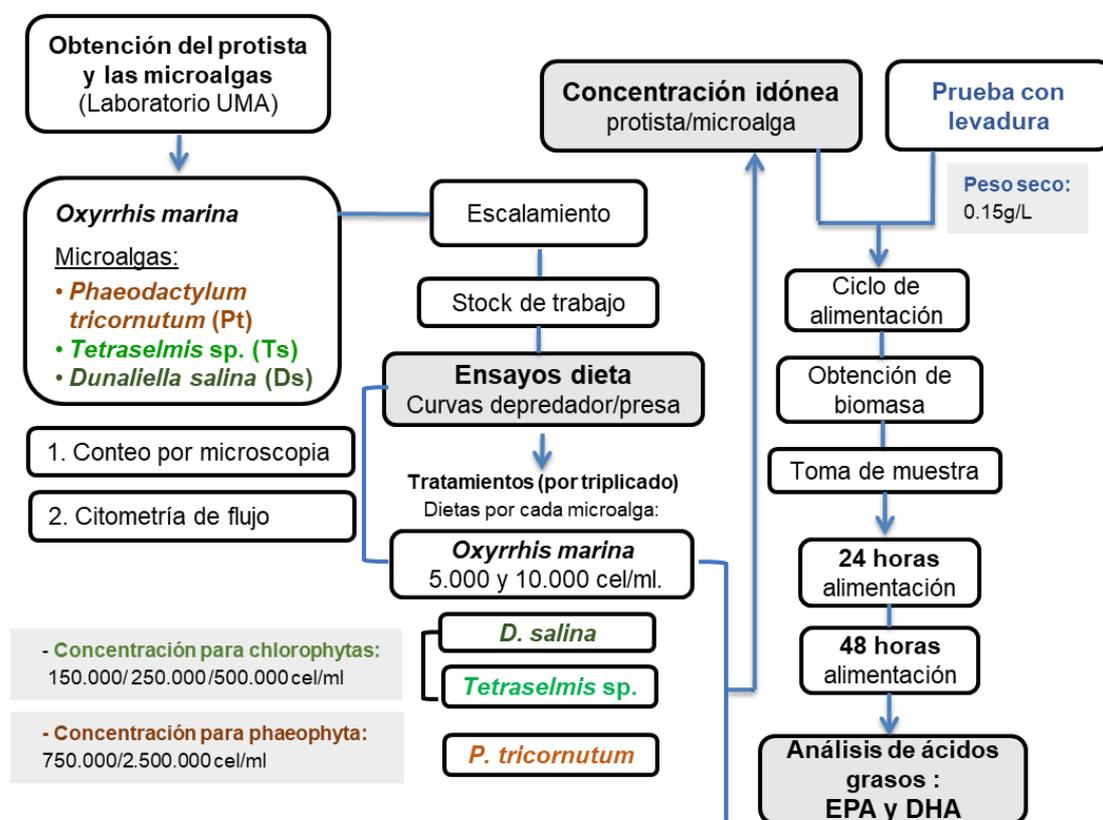


Figura 2. Flujograma de la metodología de trabajo.

3.2 Obtención de las cepas

Los organismos utilizados fueron aislados desde las costas de la Bahía San Jorge, Antofagasta (23,3°S) y pertenecen al cepario de la Unidad de Microbiología Aplicada (UMA) de la Universidad de Antofagasta. El protozoo empleado en este estudio corresponde al organismo *Oxyrrhis marina* y las microalgas evaluadas como alimento fueron *Phaeodactylum tricornutum*, *Tetraselmis* sp. y *Dunaliella salina*.

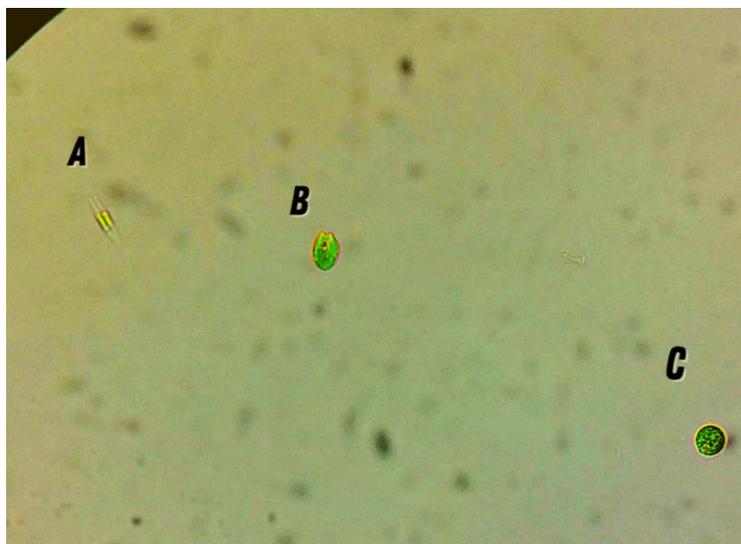


Figura 3. Dimensiones de las diferentes células microalgales observadas por medio de Microscopia con un aumento de 40X: A. *Phaeodactylum tricornutum*, B. *Tetraselmis* sp. y C. *Dunaliella salina*.

3.3 Preparación del agua de mar

El agua de mar fue obtenida desde el reservorio de agua de la Unidad de Microbiología Aplicada (UMA), esta fue filtrada a 10, 5, 1 y 0.5 μm . El agua de mar filtrada se llevó a cada sistema de cultivo (bolón de 1 L) para ser autoclavada a 121°C durante 15 minutos, para ser utilizada posteriormente.

3.4 Medio de cultivo

Se utilizó el medio de cultivo UMA5 (tabla 2) el cual corresponde a una modificación del medio de cultivo clásico para microalgas f/2 (Guillard & Ryther, 1962).

TABLA 2. Nutrientes utilizados en el agua mar para las microalgas *Phaeodactylum tricornutum*, *Tetraselmis* sp y *Dunaliella salina*.

COMPONENTE	Gramos por litro de medio de cultivo
NaNO ₃ (nitrato de sodio)	0,3825
NaH ₂ PO ₄ (sodio fosfato monobásico)	0,03375
NaHCO ₃ (Bicarbonato)	0,168
Oligoelementos	0,2 ml/L
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O(metasilicato)	0,03

3.4.1 preparación del medio de cultivo para microalgas

Obtenida previamente el agua de mar, para cada proceso de inoculación, se realizó una etapa de desinfección, para esto fueron utilizados filtros de cartucho a 10, 5, 1 y 0.5 μm para cada sistema de cultivo en volúmenes de 2 hasta 20 L; posteriormente se añadió, al agua de mar filtrada con hipoclorito de sodio comercial (NaClO), cloro en polvo a una concentración final de $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, por un periodo de 24 horas. Ya desinfectada, el agua de mar se adiciono tiosulfato sódico, necesario para neutralizar el cloro. Para llevar a cabo la neutralización, se preparó una solución stock sobre saturada 1:1 de tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) a 0.3 g/L en una proporción de 6 mL por 20 L y se esperó un tiempo mínimo de 2 horas para finalizar la neutralización, suministrando los diferentes compuestos. Se agregó el medio de cultivo, incorporando metasilicato de sodio, en el caso de *Phaeodactylum tricornutum* y bicarbonato de sodio para *Dunaliella salina* y *Tetraselmis* sp.

3.5 Cultivo del alimento microalgal.

Las cepas microalgales fueron conservadas en placas de Petri, con medio de cultivo sólido. Previo al inicio de las experiencias, estas fueron inoculadas en un tubo de ensayo con 10 mL de medio de cultivo UMA5, de ahí traspasados a matraces de Erlenmeyer (250 mL) con 200 mL de medio de cultivo líquido y posteriormente al a bolones de 1 litro. Finalmente fueron escalados hasta 20 litros de capacidad, para obtener inóculos de 7 días de cultivo que estuvieran en fase exponencial.

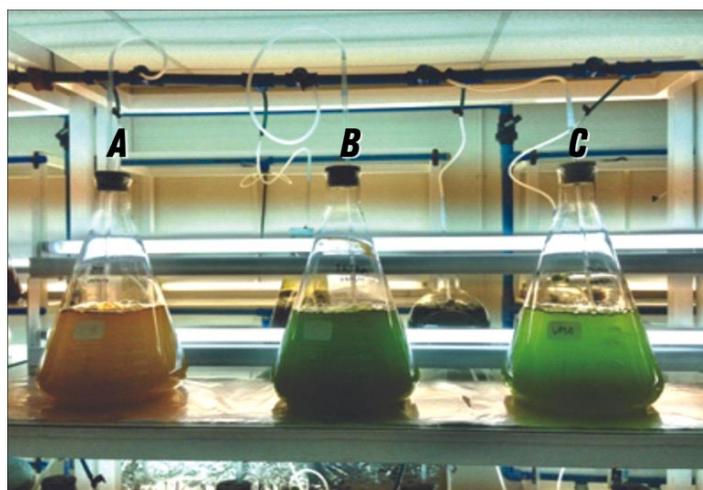


Figura 4. Matraces de 4 litros con las cepas microalgales empleadas en los ensayos. A. Cultivo exponencial *Phaeodactylum tricornutum*, B. *Tetraselmis* sp y C. *Dunaliella salina*.

Para el cultivo en 20 L, una vez que los sistemas de cultivo contenían el agua de mar tratada se les incorporaron los componentes del medio UMA5 (Tabla 2). Posteriormente se agregó el inóculo microalgal que correspondía al 10% del volumen final del sistema de cultivo y se esperó por un lapso de 7 días para que la microalga entrara en fase exponencial.

Los cultivos se mantuvieron en una sala controlada a 20°C, con intensidad lumínica constante de $183,5 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (2 tubos fluorescentes OSRAM Universal). Previo al inicio de los ensayos con las diferentes dietas, se inoculó cada alimento microalgal en 3 matraces de 4 litros con un volumen de 3,5 litros de agua de mar esterilizada mediante autoclave (figura 4).

3.6 Ensayos de crecimiento de *O. marina* con las diferentes dietas: *Phaeodactylum tricornutum*, *Tetraselmis* sp y *Dunaliella salina*.

3.6.1 Periodo de hambruna previa a la aplicación de las diferentes dietas a *O. marina*.

El organismo protozoo *Oxyrrhis marina* se mantiene con la microalga *Tetraselmis* sp. La concentración microalgal fue a 500.000 cél/mL donde estuvo alimentándose por una semana. Al transcurrir los 7 días se hizo limpieza y no se alimentó por un lapso de 4 días, correspondiente a la fase de ayuno, para que el organismo se adapte a otras raciones de alimento microalgal y poder ser evaluadas (figura 5).

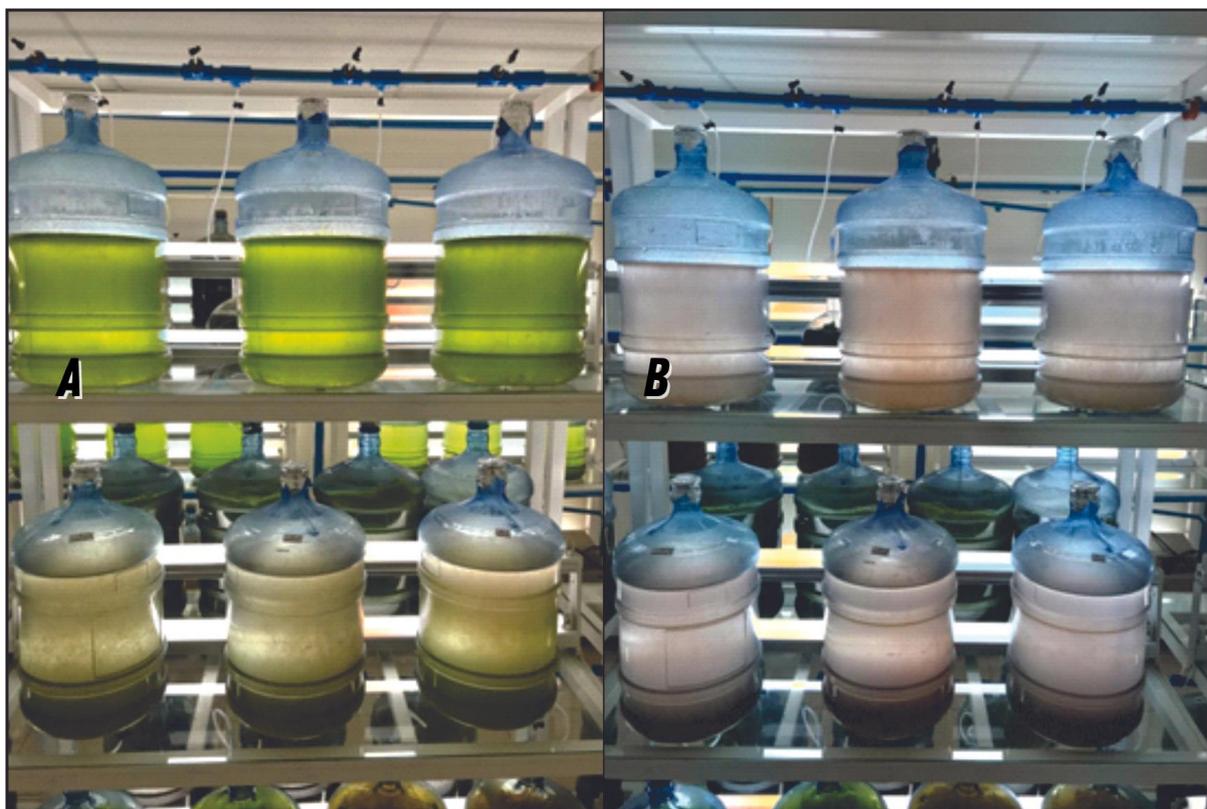


Figura 5. Pre-alimentación y mantención en los ciclos de alimentación del organismo *O. marina* donde A. Ciclo de 7 días y B. Ciclo de 4 días alimentado con la microalga *Tetraselmis* sp. A una concentración microalgal de 500.000 cél/mL alimentado por una semana para luego hacer limpieza y no alimentar durante 4 días (fase de ayuno).

3.6.2 Curva depredador presa.

Las cepas microalgales evaluadas para realizar las curvas depredador presa fueron *Tetraselmis* sp. (T), *Dunaliella salina* (DS) y *Phaeodactylum tricornutum* (Pt) a 3 concentraciones diferentes (150.000, 250.000 y 500.000 céls/ml) y 2 concentraciones iniciales de protozoos (5.000 y 10.000 cél/mL). Para la microalga Pt se evaluaron dos concentraciones diferentes (750.000 y 2.500.000 céls/ml) ya que el organismo depredador *Oxyrrhis marina* en los primeros ensayos al día 1 las consumió rápidamente y se recalculó el número celular para un peso seco equivalente. Los cultivos se mantuvieron en las mismas condiciones que los inóculos microalgales, en una sala controlada a 20°C, con intensidad lumínica constante de 183,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (2 tubos fluorescentes OSRAM Universal) durante 7 días de crecimiento.

3.7 Seguimiento de la biomasa en las curvas depredador/presa.

3.7.1 Recuento de células.

Se realizó un seguimiento durante 7 días continuados para conocer la cantidad de microalga consumidas y la cantidad de protozoos generados. Se llevó a cabo el recuento utilizando un microscopio, cámara Newbauer y micropipeta, tomando muestras diarias almacenadas en tubos eppendorff de 1 mL con solución de Lugol (0.20 μl).



Figura 6. Seguimiento del consumo del alimento microalgal durante 7 días. Con 2 concentraciones iniciales de protozoos **A.** 5.000 cél/mL y **B.** 10.000 cél/mL para saber el crecimiento poblacional de *O. marina* y el consumo del alimento a lo largo de 7 días de seguimiento.

3.7.2. Seguimiento del crecimiento del organismo depredador por citometría de flujo.

Se evaluó la eficiencia del crecimiento del cultivo en *Oxyrrhis marina* frente a las raciones de alimento idóneas con *Dunaliella salina* y *Phaeodactylum tricornutum*, mediante citometría de flujo. El citómetro de flujo BD Accuri C6 proporciona recuentos de células

absolutos directamente, eliminando la necesidad de usar un hemocitómetro o cuentas de conteo. Su sistema de bomba peristáltica, controlada por microprocesador, mide con precisión el volumen (en ul) y lo reporta en las tablas de estadísticas del software BD Accuri C6. Las densidades de las poblaciones totales y cerradas se calculan de forma automática y se pueden mostrar selectivamente en formato tabular, la automatización logro contrastar las cuentas de conteo permitiendo conocer la eficiencia optima en el cultivo cuando se alimentó controladamente. Esta técnica es específica y permite revisar en una pequeña porción de agua (muestras de 4.0 mL) que organismos se encuentran, cuanto crecen los organismos y cuanto disminuye el alimento detectado por medio de la autofluorescentes de clorofila, agrupándolos como superposiciones de histogramas en el software BD Accuri C6, lo que permite la comparación simultánea de las cepas en una sola gráfica en diferentes regiones de un plano para distinguir su dispersión y morfología poblacional. El control sin tinción bajo los parámetros Forward Scatter (FSC) y Side Scatter (SSC) se utilizó para determinar las poblaciones en los cultivos, analizados en el citómetro de flujo. Se evaluó el alimento microalgal entregado, *Dunaliella salina* y *Phaeodactylum tricornutum*, donde se les ubicó en ambos cuadrantes, inferior izquierdo (no consumidas) y lado inferior derecho (consumidas) permitiendo analizar los efectos de los tratamientos (dietas microalgales) en el aumento del número celular de *Oxyrrhis marina*. Para el cultivo control de *Oxyrrhis marina* todas las células del organismo depredador se agruparon hacia el lado superior derecho del grafico (*Oxyrrhis marina* Alimentado). Observando que, la población microalgal es consumida por parte del organismo depredador. (Anexo 2). Para contrastar los datos de forma automatizada se analizaron en el BD Accuri C6 dando a conocer la eficiencia del crecimiento de *Oxyrrhis marina* a través del tiempo. Para evidenciar mejor estos datos se realizó un gráfico con los valores entregados y se comparó el alimento con respecto al crecimiento de *Oxyrrhis marina*.

3.7.3 Peso seco de sólidos suspendidos totales (SST)

Se comprobó la cantidad de biomasa obtenida en los cultivos mediante determinación de peso seco, para esto se utilizaron 50 mL de cultivo y se llevó al sistema de filtración usando bomba de vacío (PR, modelo VP 235) con filtros de 0.45 micras de nitrato de celulosa (Sartorius Stedim). Posteriormente los filtros fueron llevados a una estufa (MEMMERT, UM 600- 2400W, Alemania) a 105°C por 24 horas. El peso seco se utilizó con la finalidad de conocer los equivalentes en g/L de las 3 microalgas utilizadas y calcular el peso seco equivalente a aplicar para los ensayos con la levadura.

Para el cálculo de la concentración de microalga se utilizó la siguiente fórmula:

$$SST (g \cdot L^{-1}) = \frac{(P2 - P1)}{V}$$

Dónde:

P1: peso filtro seco (g)

P2: peso filtro + microalga seca (g)

V: volumen de cultivo (L)

SST: sólidos suspendidos totales ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

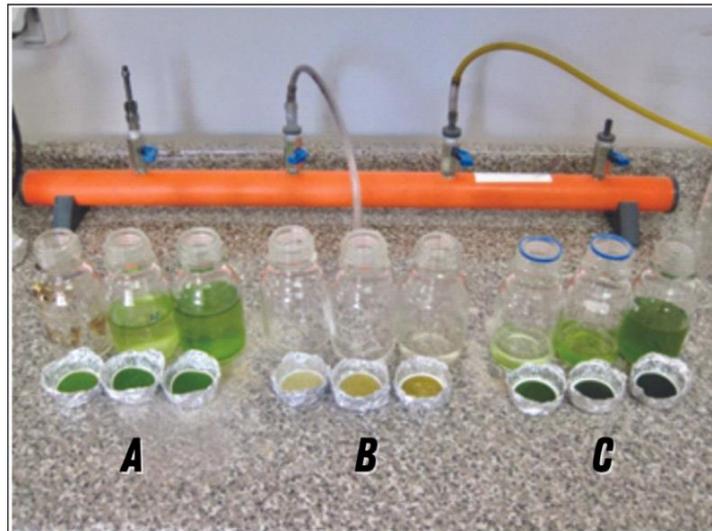


Figura 7. Comparación de las 3 microalgas en peso seco para las concentraciones seleccionadas. A. *Tetraselmis* sp., C. *Dunaliella salina* fueron 250.000 cél/mL correspondientes a 0,15 g/L a excepción de B. *Phaeodactylum tricornutum* por ser de menor tamaño con una concentración equivalente de 2.500.000 céls/ml.



Figura 8. Reajuste de biomasa de los ensayos con *Phaeodactylum tricornutum* y peso seco del cultivo *Oxyrrhis marina*. Las concentraciones de la microalga *Phaeophita Phaeodactylum tricornutum* A. 750.000 cél/mL, B. 2.500.000 cél/mL por ser 4 veces más pequeña que las otras 2 microalgas *chlorophitas* y para *Oxyrrhis marina* C. 5.000 cél/mL, D. 10.000 cél/mL.

3.8 Ensayos para evaluación del contenido en ácidos grasos EPA y DHA.

Una vez determinadas las mejores relaciones de alimento y calculada la concentración equivalente en peso seco de levadura se realizaron ciclos de alimentación con las dietas seleccionadas más el tratamiento con levadura y se tomaron muestra a las 24 y 48 horas, así

como de cada una de las microalgas y la levadura como control y se evaluó la producción de ácidos grasos EPA (ácido eicosapentaenoico) y DHA (ácido docosahexaenoico). Las concentraciones seleccionadas fueron: 250.000 cél/mL para las algas *Chlorophitas* y para la *Phaeophita* 2.500.000 cél/mL suministrados con medio de cultivo UMA5. (Anexo 1, preparadas con 7 días en fase exponencial para el experimento de consumo a 24 y 48 horas).

3.8.1 Extracción y cuantificación de ácidos grasos EPA y DHA.

La extracción de lípidos totales se realizó mediante el método de gravimetría, seguido de un proceso de metilación para posteriormente ser analizadas en un cromatógrafo de gases. El perfil de ácidos grasos fue obtenido por transesterificación directa y cromatografía de gases (6890N Series Gas Chromatograph, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) tal como detalla Rodríguez-Ruiz *et al.* (1998).

Cromatografía (GC-FID) es un sistema de cromatografía de gases Shimadzu 2010 equipado con un detector de ionización de llama (FID) y un inyector split / splitless para analizar la composición de FAME. FID es uno de los detectores más utilizados en cromatografía de gases y funciona pasando la muestra orgánica previamente volatilizada a través de una llama. Generado a partir de hidrógeno puro y aire comprimido, luego, estos iones son detectados por un electrodo polarizado ubicado cerca de la llama. En todos los casos, las muestras (1 µL) fueron inyectado en una columna capilar RESTEK (30 m, 0,32 mm de d.i., 0,25 µm de espesor de película). La temperatura del inyector se mantuvo a 250 °C en modo split con un Split proporción de 1:20, y se utilizó nitrógeno como gas portador a un caudal constante de 1,25 ml / min. La temperatura del horno se programó inicialmente a 80 °C durante 5 min, se aumentó a 165 °C a 4 °C / min durante 2 min, y luego se aumentó de nuevo a 180 °C a 2 °C / min durante 5 minutos. Era calentado a una velocidad de 2 °C / min a 200 °C durante 2 min seguido a 4 °C / min a 230 °C durante 2 min y finalmente se mantuvo a esa temperatura durante 2 min alcanzando 250 °C a 2°C/min. La temperatura del detector se mantuvo a 280°C.

Los FAME individuales se identificaron comparando sus tiempos de retención con los de estándares FAME mixtos (FAME Mix C4-C24, Supelco Analytical) y cuantificados comparando su área de pico con los de estándares FAME y un estándar interno (canoil tripentade ~ 10 ppm / muestra, Nu-Check Pre, Inc., Elysian, MN, EE. UU.). Finalmente, el contenido de ácidos grasos del tipo EPA y DHA se calculó como porcentaje en relación a la biomasa liofilizada (% en peso) y lípidos totales (% p / p). (Anexo 3).

3.9 Análisis estadístico

Las diferencias en los tratamientos se evaluaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA). Sí. Los resultados de ANOVA fueron significativos ($p < 0.05$), las comparaciones entre las medias se realizaron utilizando el análisis post-hoc de Tukey. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software Statgraphics Centurion XVI (Statgraphics Technologies, Inc., Virginia).

4. Resultados

4.1 Crecimiento del cultivo de *Oxyrrhis marina* alimentado con las diferentes microalgas. Curvas depredador-presa

4.1.1 Cultivo de *O. marina* alimentado con la microalga *Tetraselmis sp.*

En la figura 9 se describe la curva depredador/presa para *Tetraselmis sp.* para las 3 raciones de alimento microalgal estudiadas (150.000 cél/mL, 250.000 cél/mL, 500.000 cél/mL) y 2 concentraciones distintas del cultivo de *Oxyrrhis marina* a (5.000 cél/mL y 10.000 cél/mL), habiendo diferencias ya en las primeras 48 horas y siendo posible establecer un patrón de crecimiento diferencial en base a los tratamientos. Los resultados indican que para la cepa *Tetraselmis sp.*, es mejor inocular con 10.000 cél/mL de protozoos y 250.000 cél/mL de microalga logrando un mayor crecimiento y una producción de 85.000 cél/mL de *Oxyrrhis marina* al día 5. El peso seco equivalente par la dosis microalgal con mejor rendimiento fue de 250.000 cél/mL equivalente fue de 0,15 g/L.

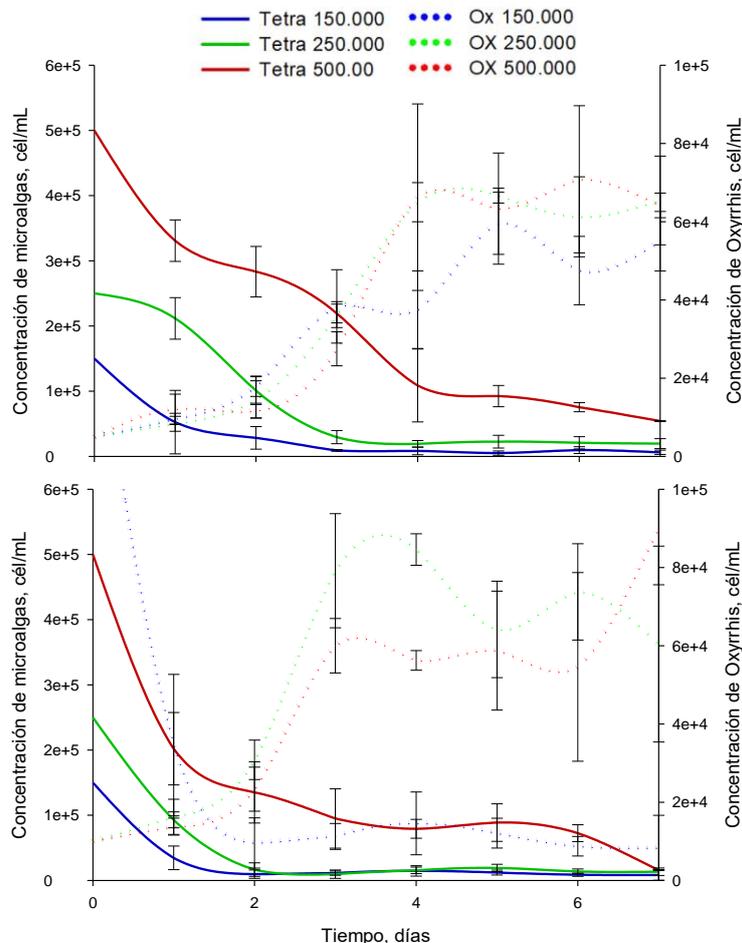


Figura 9. Curvas depredador presa, *O. marina* (arriba: 5.000 cél/mL, abajo: 10.000 cél/mL) a lo largo de 7 días alimentado con 3 concentraciones de *Tetraselmis sp.* (150.000 cél/mL, 250.000 cél/mL, 500.000 cél/mL).

4.1.2 Cultivo de *O. marina* alimentado con la microalga *Dunaliella salina*.

Los resultados de las curvas depredador/presa con *Dunaliella salina* (figura 10) para las 3 raciones de alimento microalgal estudiadas (150.000 cél/mL, 250.000 cél/mL, 500.000 cél/mL) y 2 concentraciones distintas del cultivo de *Oxyrrhis marina* a (5.000 cél/mL y 10.000 cél/mL) indican que el caso de la cepa microalgal *Dunaliella salina* es mejor inocular con 5.000 cél/mL de protozoos y 500.000 cél/mL de microalga, obteniéndose diferencia significativas respecto a los otros tratamientos con un efecto positivo al producir en promedio 93.000 cél/mL de *Oxyrrhis marina*. Para todas las proporciones de alimento estudiadas se produjo el consumo del alimento casi en su totalidad ya a las 24 horas con un crecimiento progresivo de *O. marina* que alcanza el máximo se productividad para la proporción de alimento indicada a las 48hrs.

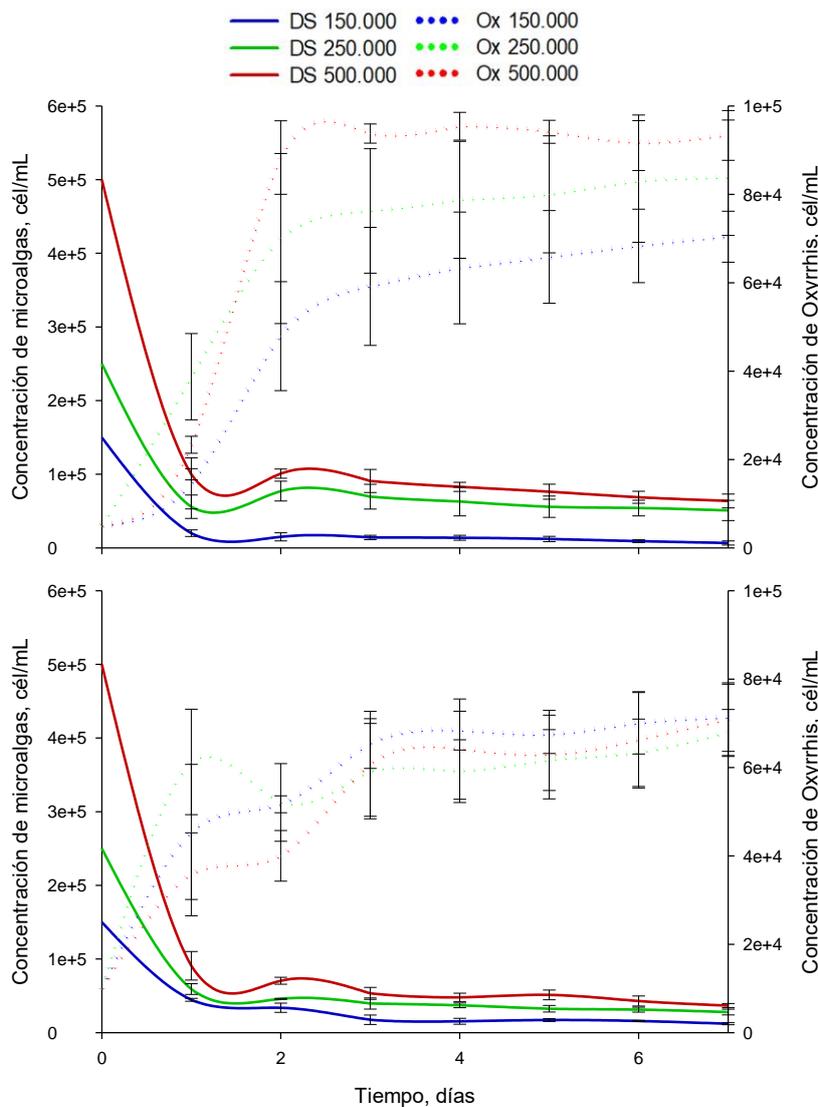


Figura 10. Curvas depredador presa, *O. marina* (arriba: 5.000 cél/mL, abajo: 10.000 cél/mL) a lo largo de 7 días alimentado con 3 concentraciones de *Dunaliella salina* (150.000 cél/mL, 250.000 cél/mL, 500.000 cél/mL).

4.1.3. Cultivo de *O. marina* alimentado con la microalga *Phaeodactylum tricornutum*.

Durante el estudio de las curvas depredador/presa se observó que las dimensiones de la diatomea *Phaeodactylum tricornutum* era 4 veces más pequeña en relación a las Chlorophitas (*Tetraselmis* sp y *Dunaliella salina*) por lo que se incorporaron 2 nuevas raciones de alimento microalgal reajustadas a peso seco equivalente (750.000 cél/mL, 2.500.000 cél/mL) en combinación con las 2 concentraciones de *Oxyrrhis marina* (5.000 cél/mL y 10.000 cél/mL) como se describe en la Figura 11. El análisis de peso seco equivalente para 2.500.000 cél/mL fue de 0,15 g/L. Para el caso de la cepa *Phaeodactylum tricornutum* los resultados indican que es mejor inocular con 10.000 cél/mL de protozoos y 2.500.000 cél/mL de microalga, produciendo diferencias significativas con los otros tratamientos y logrando una productividad de 92.000 cél/mL de *Oxyrrhis marina* al séptimo día. Al igual que para el caso de *Dunaliella salina*, para todas las proporciones de alimento estudiadas se produjo el consumo del alimento casi en su totalidad ya a las 24 horas.

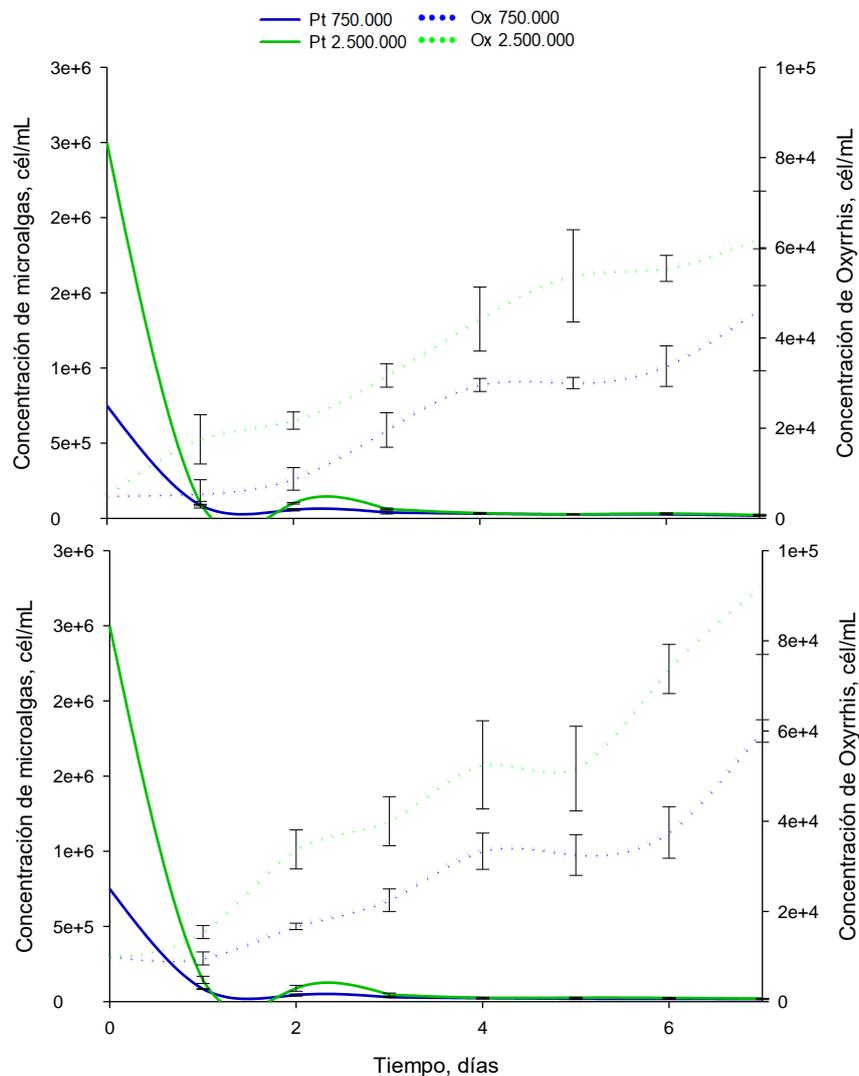


Figura 11. Curvas depredador presa, *O. marina* (arriba: 5.000 cél/mL, abajo: 10.000 cél/mL) a lo largo de 7 días alimentado con 2 concentraciones de *Phaeodactylum tricornutum* (750.000 cél/mL y 2.500.000 cél/mL).

4.1.4 Seguimiento del crecimiento del organismo depredador *O. marina* por citometría de flujo con cepas microalgales seleccionadas.

Para determinar la eficiencia del crecimiento del cultivo en *Oxyrrhis marina* frente a las raciones de alimento idóneas con *Dunaliella salina* y *Phaeodactylum tricornutum* se evaluó por medio de citometría de flujo. Se observa que las células microalgales fueron consumidas ubicándolas en el cuadrante inferior derecho (Anexo 2), los resultados representados en un gráfico de barras se presentan en la figura 12, obteniendo con la microalga *Dunaliella salina* un 65% de las células de *O. marina* para las mejores 2 raciones de alimento (250.000 cél/mL y 500.000 cél/mL) (figura 12. barras roja). Se observa un efecto positivo con diferencias significativas al día 0, 3 y 7 ($P < 0,05$), en cuanto con la microalga *Phaeodactylum tricornutum* cuando se reajustaron las raciones de alimento, obteniendo al día 7 un 74% de producción de *Oxyrrhis marina* (figura 12. barras verdes) diferenciándose de *Dunaliella salina* cuando se obtuvo un 45% de eficiencia en el cultivo al día 7. Se infiere que el crecimiento óptimo del organismo depredador es mejor aumentando la ración de alimento a 2.500.000 cél/mL de *P. tricornutum* para 7 días de cultivo.

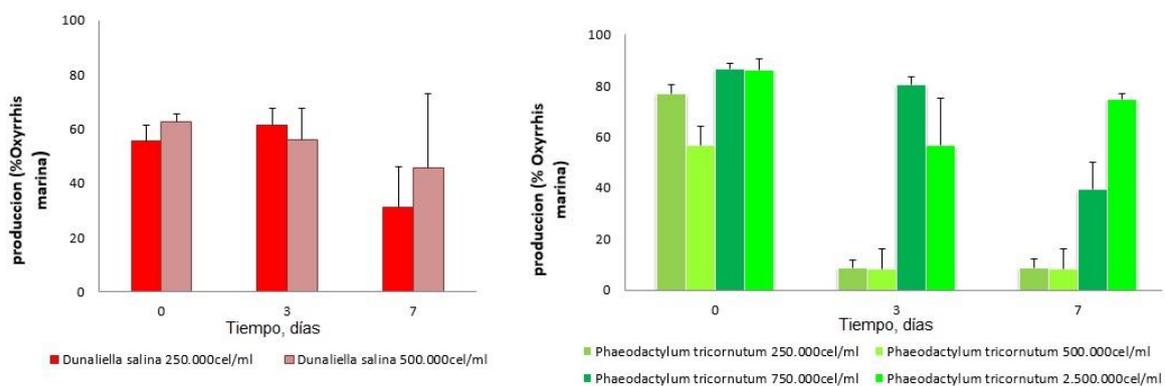


Figura 12. Comparación de la producción de *O. marina* en función del tiempo y del alimento suministrado. Eficiencia del crecimiento de *Oxyrrhis marina* alimentado con las mejores concentraciones microalgales para la cepa *Dunaliella salina* (barras rojas) y para la cepa *Phaeodactylum tricornutum* (barras verdes).

4.2 Producción de biomasa de *O. marina* en relación a las concentraciones seleccionadas para cada dieta microalgal.

En base a la selección para las proporciones óptimas con las 3 cepas microalgales (*Tetraselmis* sp, *Dunaliella salina* y *Phaeodactylum tricornutum*) utilizadas como alimento vivo (figura 13) se observa una mejor cosecha al día 2 con *Dunaliella salina*, con un máximo crecimiento del cultivo *Oxyrrhis marina*, produciéndose un total de 93.000 cél/mL a diferencia de los otros tratamientos con la cepa *Tetraselmis* sp., donde se produjo 85.000 cél/mL al día 4, observando aumento de la eficiencia en el crecimiento del organismo depredador con un día más de cultivo. En cambio, con la cepa *Phaeodactylum tricornutum*

se presentó la mayor concentración de *O. marina* con muchos más días de cultivo, con crecimiento máximo de 92.000 cél/mL al día 7.

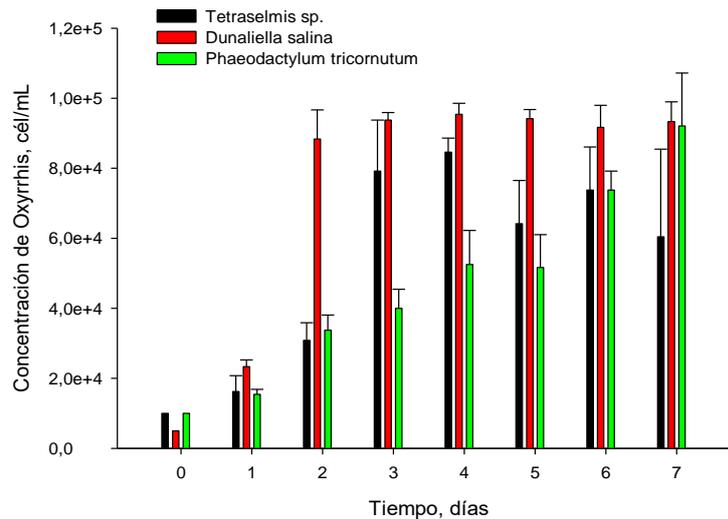


Figura 13. Concentración de *Oxyrrhis marina* generada con las 3 mejores concentraciones de microalga (*Tetraselmis sp.*, *Dunaliella salina* y *Phaeodactylum tricornutum*).

4.3 Producción de ácidos grasos omega-3 a partir de la biomasa de *O. marina* con alimentos seleccionados y levadura como alimento alternativo.

Los resultados presentados muestran el contenido de ácidos grasos EPA y DHA con respecto al total de lípidos en *Oxyrrhis marina* a las 48 hrs. tras ser alimentado con cada una de las tres cepas microalgales (*Tetraselmis sp.*, *Dunaliella salina* y *Phaeodactylum tricornutum*) y la levadura utilizando la concentración de microalgas óptima en base a los ensayos de evaluación previos con las diferentes dietas. Para la levadura, la dosis seleccionada fué de 0,15 g/L y para *Oxyrrhis marina* a 10.000 cél/mL. También se incluyen cada una de los organismos empleados en las dietas como control.

En la figura 14 se presentan los resultados de la composición de lípidos y el contenido de EPA y DHA de los cuatro elementos presas y de *Oxyrrhis marina*, destacando que la levadura no posee estos compuestos. Se observan diferencias significativas en el contenido total de lípidos y EPA y DHA cuando se utilizó levadura y las dietas algales (*Tetraselmis sp.*, *Dunaliella salina* y *Phaeodactylum tricornutum*). La dieta microalgal que presentó mejor contenido de ácido grasos fue con la diatomea *Phaeodactylum tricornutum* obteniendo un significativamente mayor contenido ácidos grasos de tipo omega-3, EPA y DHA (particularmente mas DHA), mientras que con la cepa *Dunaliella salina* también presento niveles altos particularmente mayor contenido de EPA, a diferencia de la cepa *Tetraselmis sp.* con un mayor contenido de DHA. Con la levadura usada como referencia económica de bajo costo y que no presenta estos compuestos por sí mismo se observó productividad de ambos ácidos grasos, lo que indica *Oxyrrhis marina* logró generarlos por sí mismo, sin

embargo, el contenido fue significativamente menor que con *O. marina* alimentado con las microalgas.

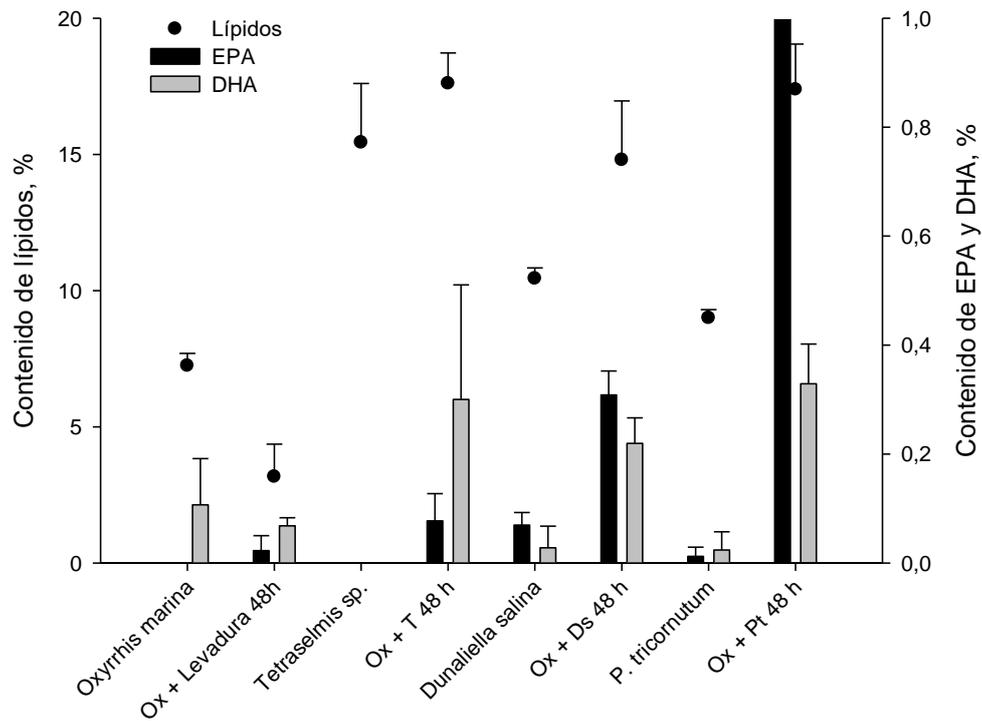


Figura 14. Contenido de lípidos y contenido de EPA y DHA en muestras de *O. marina*. A 10.000 cél/mL alimentado con levadura, *Tetraselmis sp.*, *Dunaliella salina* y *Phaeodactylum tricornutum* luego de 48 horas.

Los resultados del análisis de producción de ácidos grasos específicos EPA y DHA, permitió conocer los diferentes perfiles de producción que presenta *O. marina* al consumir las diferentes dietas, obteniéndose que la mejor dieta suministrada fue con *Phaeodactylum tricornutum* utilizando todas las condiciones óptimas, presentando la mayor cantidad de ácidos grasos específicos EPA y DHA.

5. Discusión

El cultivo de microalgas ha ganado mucho interés estos días por la necesidad de recursos renovables con la capacidad de sintetizar productos valiosos como pigmentos, carbohidratos y ácidos grasos entre otros compuestos (Spolaore *et al.*, 2006; Cardozo *et al.*, 2007), pero también existen otros grupos de interés poco estudiados como los protistas heterótrofos. Respecto a los ácidos grasos, en el análisis económico realizado por Watters (2012) en el que evalúa el precio unitario de EPA-DHA en diferentes productos disponibles en supermercados, se concluye que el valor más bajo se observa para el aceite de pescado con un precio EPA-DHA de \$ 60 por kg, en cambio el precio es mayor, en torno a \$180 por kg de EPA-DHA para la sardina congelada, mientras que los suplementos nutracéuticos prenatales de DHA y omega-3 muestran un rango de costos de \$ 870 a 2500 por kg. Estos altos costos y la necesidad de nuevas fuentes ricas en estos ácidos grasos, tanto para la salud humana como animal han motivado a la industria de nutrición a realizar esfuerzos a través de investigación y desarrollo en la búsqueda de alternativas con respecto al remplazo de las fuentes tradicionales de ácidos grasos en especial de los ácidos grasos poliinsaturados omega-3. En este aspecto, *Oxyrrhis marina* se muestra como una alternativa por sus características y contenido en EPA y DHA, variable según la dieta suministrada, siendo fundamental los resultados en relación a la optimización de la alimentación para este fin obtenidos en el presente estudio.

5.1 Crecimiento celular del cultivo *O. marina* en función de las dietas suministradas.

Cuando se alimentó al organismo heterótrofo, *Oxyrrhis marina*, con 3 tipos de dietas a base de organismos autótrofos (microalgas) y un alimento inerte a modo de control (levadura) para reducir costos de producción, la mayor productividad de la biomasa (g·L⁻¹ día⁻¹) se obtuvo con *Dunaliella salina* seguida de la cepa *Phaeodactylum tricornutum*. El análisis de consumo del alimento mostró que las presas microalgales fueron consumidas diferencialmente, pero en general se consumió toda la presa entre 24 y 48 horas tras ser alimentado *O. marina*. Fenton y colaboradores (2010) en sus estudios donde establecieron tasas de crecimiento de sus cultivos en función del volumen para determinar la producción, indicaban que la cantidad de material asimilado por un organismo es un componente clave de la mayoría de los modelos poblacionales por lo que controlar y manipular experimentalmente estas variables es un desafío y en este punto, es difícil interpretar cómo los parámetros de presa afectan la preferencia de alimentación de los protistas heterótrofos en general y en este aspecto los resultados del ensayos realizados en este trabajo constituyen un aporte en esta área de estudio. Para evidenciar mejor estos datos se realizó también un análisis por citometría de flujo lo que ha permitido entregar datos respecto a la ración de alimento óptima para que el cultivo de *O. marina* mejore la productividad de la biomasa. Se ha logrado establecer en este estudio las dosis adecuadas para alimentar a *O. marina* con las microalgas seleccionadas empleadas: *Dunadiella salina* y *Phaeodactylum tricornutum*, evaluadas a 3 concentraciones distintas (500.000 cél/mL, 250.000 cél/mL y 150.000 cél/ml) en el caso de las chloropytas, mientras que con la microalga *Phaeodactylum*

tricornutum hubo que reajustar la dieta a una mayor concentración equivalente en peso seco (750.000 cél/ml y 2.500.000 cél/ml) debido a su menor tamaño, por lo que se concluye que es importante emplear dosis de alimento en base a la biomasa suministrada y no al número celular.

5.2 Comparación del contenido en ácidos grasos omega-3 (EPA y DHA) en *O. marina* en función del alimento suministrado a los cultivos.

Converti y colaboradores (2009) indicaron que el contenido lipídico de las microalgas analizadas está negativamente correlacionado con sus tasas de crecimiento, lo que podría significar que una tasa de crecimiento elevado reduce el contenido lipídico, debido a que son un material bien conservado donde la reserva de lípidos probablemente cause una tasa de crecimiento desacelerado. Dada la plasticidad de *O. marina* como organismo experimental demostrada tanto en este como en otros estudios, donde investigadores consiguieron resultados con distintas dietas microalgales y una alternativa como la levadura (Yoon et al., 2017) se sugiere que este organismo puede ser utilizado para la producción eficiente de EPA y DHA. A diferencia de las presas de algas, la levadura es un compuesto más fácil de obtener y de menor costo para el uso eficiente como alimento de *O. marina*, por lo tanto, si la composición de ácidos grasos es similar o mayor que alimentado con especies de presas de algas convencionales se podrá reemplazar el alimento microalgal, como presas vivas, por uno que sea similar o inerte de menor costo.

En nuestro estudio se ha obtenido el contenido de EPA y DHA generado por *O. marina*, alimentado con 3 microalgas y levadura. En estudios previos (Yoon et al., 2017) en los que se alimentó *O. marina* con las microalgas *A. carterae* y *Chlorella* sp. así como levadura seca en polvo, los ácidos grasos EPA y DHA fueron similares cuando se alimentó con levadura, sin embargo, la mejor alimentación con microalga, demostró en los periodos de hambruna al día 1, 3 y 7 que el ácido graso más abundante fue el DHA, presentando 15.7–25.9% de DHA en el día 7 (condición de saciedad), proporción que se reducía a 1.2–6.7% en el día 11 (condición de hambre). En particular, cuando *O. marina* se alimentó de levadura seca, el 95% del DHA se redujo después de que la presa fuera completamente digerida, siendo este un punto clave a considerar ya que la producción de estos compuestos se ve afectada en los tiempos de cosecha de la biomasa (Montagnes et al., 2011). Nosotros hemos conseguido evaluar y optimizar bajo estos criterios una metodología enfocada al cultivo de *O. marina* con respecto a la producción eficiente de ácidos grasos omega-3 (EPA y DHA), alimentando con distintas presas (*Phaeodactylum tricornutum*, *Dunaliella salina*, *Tetraselmis* sp. y levadura). La composición de ácidos grasos omega-3 de *O. marina* alimentado con la dieta *Phaeodactylum tricornutum* fue de aproximadamente 10-30% mayor que *O. marina* alimentado con *Dunaliella salina* y *Tetraselmis* sp. cuando las dietas fueron comparadas. Donde se ha obtenido mayor productividad de biomasa del cultivo de *O. marina* con 92.000 cél/mL en la proporción óptima con la diatomea *Phaeodactylum tricornutum*, hemos conseguido mayor contenido de EPA y DHA a las 48 horas, particularmente mayor producción de EPA. Sin embargo, no se obtuvieron los mismos

resultados en este estudio con respecto a la levadura, ya que el contenido fue poco significativo a diferencia de los obtenidos por otros autores en sus investigaciones, siendo el contenido de EPA y DHA con levadura en este estudio mucho más bajo a diferencia de lo obtenido con las presas microalgales en la proporción óptima a las 48 horas. Es importante destacar que a pesar que las presas por si solas presentan contenido de EPA y DHA, el contenido de estos ácidos grasos en *O. marina* mejoran cuando estos son comparados en la proporción óptima a 48 horas, por lo que *O. marina* estaría mejorando el contenido en estos ácidos grasos en la red trófica en concordancia con estudios que indican que los organismos heterótrofos por lo general tienen mejor contenido de lípidos y composición de ácidos grasos de mayor calidad que las microalgas (Tang y Taal, 2005; Burja *et al.*, 2006; Veloza *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2014).

5.3 Aplicación para la producción de biomasa rica en ácidos grasos omega- 3 en la industria acuícola.

Actualmente para estos ácidos grasos de alto valor para la industria la mayoría de las plantas de producción fotosintéticas de microalgas ricas en omega-3 tienen como nicho de mercado principal la industria acuícola (Rahman *et al.*, 2020). Sin embargo, se prevé que el precio de mercado de VLC-PUFA crezca a una tasa anual media del 13,5% en todo el mundo, abriendo de este modo grandes oportunidades y desafíos de mercado. En nuestro estudio hemos conseguido mejorar las características en la composición de la biomasa y el contenido de EPA y DHA por parte de *Oxyrrhis marina*, dando a conocer el contenido de EPA y DHA alimentado con cada uno de los tres elementos presa como dietas. A pesar que *O. marina* es un organismo modelo popular (Montagnes *et al.*, 2011), sigue existiendo una mala comprensión de los mecanismos involucrados en su comportamiento alimentario, por lo que seguir este enfoque permitirá una mayor comprensión de los elementos funcionales que desempeñan un papel fundamental en la estructuración de las redes alimentarias microbianas acuáticas, logrando generar una biomasa productiva de buena calidad, estrategia que va acompañada por una alta demanda de energía y altos costos de producción (Norsker *et al.*, 2001; Seigné *et al.*, 2012).

En nuestro estudio hemos conseguido generar mayor contenido de omega-3 con una dieta en base a la diatomea *P. tricornutum*, siendo esta una metodología totalmente replicable, lo que hace posible su estandarización y escalamiento de producción a mayores volúmenes. Estos resultados proyectan a *O. marina* como una interesante alternativa para la industria acuícola y con respecto a suplementos nutraceuticos a base de organismos marinos, potenciando la producción de ácido graso de cadena larga omega-3 en función de la dieta. En este aspecto, hasta la fecha solo algunos géneros de microalgas son utilizados para la producción de biomasa a nivel industrial, siendo limitada en experimentos a escala de laboratorio o piloto (Liang *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010; widjaja *et al.*, 2009) en este aspecto cultivar organismos heterótrofos es más difícil y más costoso que cultivar microalgas por lo que representaría el mayor inconveniente en la proyección de estos organismos a escala industrial.

6. Conclusiones

- Los resultados obtenidos han permitido corroborar la hipótesis planteada evidenciando que es posible mejorar la productividad y contenido de EPA y DHA de la biomasa de *Oxyrrhis marina* en base al control de su dieta empleando para ello presas y proporciones de alimentación seleccionadas.
- Se obtiene la mayor productividad de *Oxyrrhis marina* utilizando *Dunaliella salina* como alimento en la proporción de 5.000 cél/mL de protista y 500.000 cél/mL de microalga, logrando una densidad celular máxima de 92.000 cél/mL tras 48 horas.
- La mayor productividad de ácidos grasos omega-3 se obtiene en las condiciones reajustadas de la dieta en base a peso seco equivalente a las otras dietas microalgales utilizando como alimento *Phaeodactylum tricornutum* a una proporción de 10.000 cél/mL de *O. marina* y 2.500.000 cél/mL de microalga.
- Con la dieta en base a *Phaeodactylum tricornutum* se logra obtener 3 veces más EPA y 2 veces más DHA respecto a las otras dietas suministradas, con un porcentaje de 1,3% de EPA y 0.3% de DHA.
- Con la dieta alternativa más económica en base a levadura, aunque se generan ácidos grasos omega-3, la concentración es significativamente menor con respecto a la obtenida empleando dietas microalgales por lo que en base a nuestros resultados, no contribuiría como alternativa económica para la producción de omega-3.
- En base a los resultados, el microorganismo *Oxyrrhis marina* se muestra como una potencial herramienta para mejorar la producción de EPA y DHA requerido por la industria acuícola, enfatizando la importancia de controlar el tipo de alimento que se suministra.

7. Referencias bibliográficas

- **Bligh E.G., Dyer W.J. 1959.** A Rapid Method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 912-917. doi.org/10.1139/o59-099.
- **Burja A.M., Radianingtyas H., Windust A., Barrow C.J. 2006.** Isolation and characterization of polyunsaturated fatty acid producing *Thraustochytrium* species: screening of strains and optimization of omega-3 production. *Applied microbiology and biotechnology*, 72(6), 1161–1169. doi:10.1007/s00253-006-0419-1.
- **Byreddy A.R., Gupta A., Barrow C.J., Puri M. 2016.** A quick colorimetric method for total lipid quantification in microalgae. *Journal of microbiological methods*, 125, 28-32. doi.org/10.1016/j.mimet.2016.04.002.
- **Droop M.R. 1959.** A note on some physical conditions for cultivating *O. marina*. *Journal of the marine biological Association of the United Kingdom*, 38(3), 599-604. doi: 10.1017/s0025315400007025.
- **Fuentes-Grünwald C., Bayliss C., Fonlut F., Chapuli E. 2016.** Long-term dinoflagellate culture performance in a commercial photobioreactor: *Amphidinium carterae* case. *Bioresource Technology*, 218, 553-540. doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.128.
- **Fuentes-Grünwald C., Bayliss C., Zanain M., Pooley C., Scolamacchia M., Silkina A. 2015.** Evaluation of batch and semi-continuous culture of *porphyridium purpureum* in a photobioreactor in high latitudes using Fourier Transform Infrared spectroscopy for monitoring biomass composition and metabolites production. *Bioresource Technology*, 189, 357-363. doi: 10.1016/j.biortech.2015.04.042.
- **Fuentes-Grünwald C., Garcés E., Alacid E., Rossi S., Camp J. 2012.** Biomass and Lipid Production of Dinoflagellates and *Raphidophytes* in Indoor and Outdoor Photobioreactors. *Marine Biotechnology*, 15(1), 37-47. doi: 10.1007/s10126-012-9450-7.
- **Fuentes-Grünwald C., Garcés E., Alacid E., Sampedro E., Rossi S., Camp J. 2012.** Improvement of lipid production in the marine strains *Alexandrium minutum* and *Heterosigma akashiwo* by utilizing abiotic parameters. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39(1), 207-216. doi: 10.1007/s10295-011-1016-6.
- **Guo Z., Zhang H., Liu S., Lin S. 2013.** Biology of the Marine Heterotrophic Dinoflagellate *O. marina*: Current Status and Future Directions. *Microorganism*. 1(1), 33-57. doi: 10.3390/microorganisms1010033.

- **Hao Z., Liu P., Yang X., Shi J., Zhang S. 2013.** Screening method for lipid-content microalgae based on sulfo-phospho-vanillin reaction. *Advanced Materials Research*, (610-613), 3532-3535. doi: <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.610-613.3532>.

- **James P., Barker., Cattolico R.A., Gatza E. 2012.** Multiparametric Analysis of Microalgae for Biofuels Using Flow Cytometry. BD Biosciences.

- **Jeong H.J. 2018.** Feeding by common heterotrophic Protists on the mixotrophic alga *Gymnodinium smaydae* (dinophyceae), one of the fastest growing dinoflagellates. *Journal Phycol*, 54(5), 734–743. doi: 10.1111/jpy.12775.

- **Jeong H.J., Yoo Y.D., Kim J.S., Seong K.A., Kang N.S., Kim T.H. 2010.** Growth, Feeding and Ecological Roles of the Mixotrophic and Heterotrophic Dinoflagellates in Marine Planktonic Food Webs. *Ocean Science Journal*, 45(2), 65-91. doi: 10.1007/s12601-010-0007-2.

- **Jeonga H.J., Lima A.S., Yoo Y.D., Lee M.J., Lee K.H., Janga T.Y., Leeb K. 2013.** Feeding by Heterotrophic Dinoflagellates and Ciliates on the Free-living Dinoflagellate *Symbiodinium* sp. (Clade E). *Journal Eukaryotic Microbiology*, 61(1), 27-41. doi:10.1111/jeu.12083.

- **Jeonga H.J., Yoo Y.D., Kanga N.S., Lima A.S., Seongb K.A., Lee S.Y., Lee M.J., Lee K.H., Kimc H.S., Shind W., Namd S.W., Yihb W., Lee K. 2012.** Heterotrophic feeding as a newly identified survival strategy of the dinoflagellate *Symbiodinium*. *Proceedings of the national academy of sciences*, (31), 12604-9. doi: 10.1073/pnas.1204302109.

- **Kang H.C., Jeong H.J., Jang S.H., Lee K.H. 2019.** Feeding by common heterotrophic protists on the phototrophic dinoflagellate *Biecheleriopsis adriatica* (Suessiaceae) compared to that of other suessioid dinoflagellates. *Algae*. Volumen 34(2), 127-140. doi: <https://doi.org/10.4490/algae.2019.34.5.29>.

- **Lee K.H., Jeong H.J., Yoon E.Y., Jang S.H., Kim H.S., Yih W. 2014.** Feeding by common heterotrophic dinoflagellates and a ciliate on the red-tide ciliate *Mesodinium rubrum*. *Algae*. 29(2), 153-163. doi: <https://doi.org/10.4490/algae.2014.29.2.153>.

- **Lee S.K., Jeong H.J., Jang S.H., Lee K.H., Kang N.S., Lee M.J., Potvin E. 2014.** Mixotrophy in the newly described dinoflagellate *Ansanella granifera*: feeding mechanism, prey species, and effect of prey concentration. *Algae*, 29(2), 137-152. doi: <https://doi.org/10.4490/algae.2014.29.2.137>.

- **Lee S.Y., Jeong H.J., Kang N.S., Jang T.Y., Jang S.H., Lim A.S. 2014.** Morphological characterization of *Symbiodinium minutum* and *S. psygmophilum* belonging to clade B. *Algae*, 29(4), 299-310. doi: <https://doi.org/10.4490/algae.2014.29.4.299>.

- Liu Y., Tang J., Li J., Daroch M., Cheng J.J. 2014. Efficient production of triacylglycerols rich in docosahexaenoic acid (DHA) by osmo-heterotrophic marine protists. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(23), 9643-52. doi: 10.1007/s00253-014-6032-9.
- Lowe C.D., Keeling P.J., Martin L.E., Slamovits C., Phillip C., Wats., Montagnes D.J.S. 2010. Who is *O. marina*? Morphological and phylogenetic studies on an unusual dinoflagellate. *Journal of plankton research*, 33(4), 555–567. doi:10.1093/plankt/fbq110.
- Lund E.D., Fu-lin E., Chu., Harvey E., Adolf R. 2008. Mechanism(s) of long chain n-3 essential fatty acid production in two species of heterotrophic protists: *O. marina* and *Gyrodinium dominans*. *Marine biology*, 155, 23-36. doi: 10.1007/s00227-008-1003-2.
- Mary L., Hamilton., Powers S., Johnathan A., Napier., Sayanova O. 2016. Heterotrophic Production of Omega-3 Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids by Trophically Converted Marine Diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Marine Drugs*. 14(3), 53. doi: 10.3390/md14030053.
- Mendes A., Reis A., Vasconcelos R., Guerra P., Lopes T da Silva. 2009. *Crypthecodinium cohnii* with emphasis on DHA production: a review. *Journal of Applied Phycology*, 21(2), 199–214. doi:10.1007/s10811-008-9351-3.
- Montagnes D.J.S., Lowe C.D., Martin L., Watts P.C., Downes-Tettmar N., Yang Z., Roberts E.C., Davidson K. 2011. *O. marina* growth, sex and reproduction. *Journal of plankton research*. 33(4), 615–627. doi:10.1093/plankt/fbq111.
- Park J., Jeong H.J., Yoo Y.D., Yoon E.Y. 2013. Mixotrophic dinoflagellate red tides in Korean waters: distribution and ecophysiology. *Harmful Algae*. 30(1), 28-40. doi: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2013.10.004>.
- Park J., Jeong H.J., Yoon E.Y., Moon S.J. 2016. Easy and rapid quantification of lipid contents of marine dinoflagellates using the sulpho-phospho-vanillin method. *Algae*. 31(4), 391-401. doi: <https://doi.org/10.4490/algae.2016.31.12.7>.
- Roberts E.C., Wootton E.C., Davidson K., Jinjeong H., Lowe C.D., Montagnes D.J.S. 2010. Feeding in the dinoflagellate *O. marina*: linking behaviour with mechanisms. *Journal of plankton research*. 33(4), 603–614. doi.org/10.1093/plankt/fbq118.
- Russo G.L., Langellotti A.L., Oliviero M., Sacchi R., Masi P. 2021. Sustainable production of food grade omega-3 oil using aquatic protists: Reliability and future horizons. *New Biotechnology*, 62, 32-39. doi.org/10.1016/j.nbt.2021.01.006

- Ruiz-Domínguez M.C., Toledo C., Órdenes D., Vílchez C., Ardiles P., Palma J., Cerezal P. **2021**. Variability of Omega-3/6 Fatty Acid Obtained Through Extraction-Transesterification Processes from *Phaeodactylum tricornutum*. *Acta Chimica Slovenica*, 68(3), 629–637. doi: 10.17344/acsi.2020.6621.

- Sanjiv K., Mishra., William I., Suh., Farooq W., Moon M., Shrivastav A., Park M.S. **2014**. Rapid quantification of microalgal lipids in aqueous médium by a simple colorimetric method. *Bioresource Technology*. 155, 330-333. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.077>.

- Sijtsma L., Swaaf M.E. **2004**. Biotechnological production and applications of the ω -3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(2), 146–153. doi: 10.1007/s00253-003-1525-y.

- Yang Z., Jeong H.J., Montagnes D.J.S. **2010**. The role of *O. marina* as a model prey: current work and future directions. *Journal of plankton Research*, 33(4), 665–675. doi: <https://doi.org/10.1093/plankt/fbq112>.

- Yoon E.Y., Park J., Jeong H.J., Rho J-R. **2017**. Fatty acid composition and docosahexaenoic acid (DHA) content of the heterotrophic dinoflagellate *O. marina* fed on dried yeast: compared with algal prey. *Algae*. 32(1), 67-74. doi: doi.org/10.4490/algae.2017.32.3.5.

8. Anexos

Anexo 1.

Medio de cultivo UMA5 modificado

Es comúnmente usado para enriquecer medios de agua de mar diseñados para microalgas marinas costeras, especialmente diatomeas. La concentración de la fórmula original, denominado “f Medio” (Guillard y Ryther 1962), ha sido reducida a la mitad (Guillard 1975). El medio original (Guillard y Ryther 1962) usa ferric sequestrene; se ha sustituido $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$. **En 950 mL de agua de mar filtrada**, agregar los siguientes componentes. Llevar a un volumen final de 1 litro con agua de mar filtrada. Autoclavar, si no se requiere silicato, omitir para reducir la precipitación.

Tabla 3: Nutrientes y metales trazas necesarios para proporcionar a los cultivos microalgales.

Component	1° Stock Solution ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \text{dH}_2\text{O}$)	Quantity Used	Concentration in Final Medium (M)
NaNO_3	75	1 mL	8.82×10^{-4}
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	5	1 mL	3.62×10^{-5}
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	30	1 mL	1.06×10^{-4}
Trace metals solution	(See following recipe)	1 mL	---
Vitamins solution	(See following recipe)	0.5 mL	---

Tabla 4: Solución de Metales trazas “oligoelementos” 1X

Component	1° Stock Solution ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \text{dH}_2\text{O}$)	Quantity Used	Concentration in Final Medium (M)
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	---	3.15 g	1.17×10^{-5}
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	---	4.36 g	1.17×10^{-5}
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	180.0	1 mL	9.10×10^{-7}
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	22.0	1 mL	7.65×10^{-8}
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	10.0	1 mL	4.20×10^{-8}
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	9.8	1 mL	3.93×10^{-8}
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	6.3	1 mL	2.60×10^{-8}

Anexo 2.

Tasa de consumo evaluada bajo citometría de flujo para los inóculos de 250 mL con 200 ml de volumen

- Ensayo con la microalga *Dunaliella salina*

Se evaluó que concentración microalgal es la óptima para que el organismo depredador consuma todo el alimento además de saber que concentración de *Oxyrrhis marina* es la idónea para producir el cultivo, se observó mayor consumo del alimento en 2 de las 3 concentraciones microalgales al día 2, presentando una densidad del cultivo *Oxyrrhis marina*, Con diferencia significativa a los días 0, 3, 7 ($P < 0,05$).

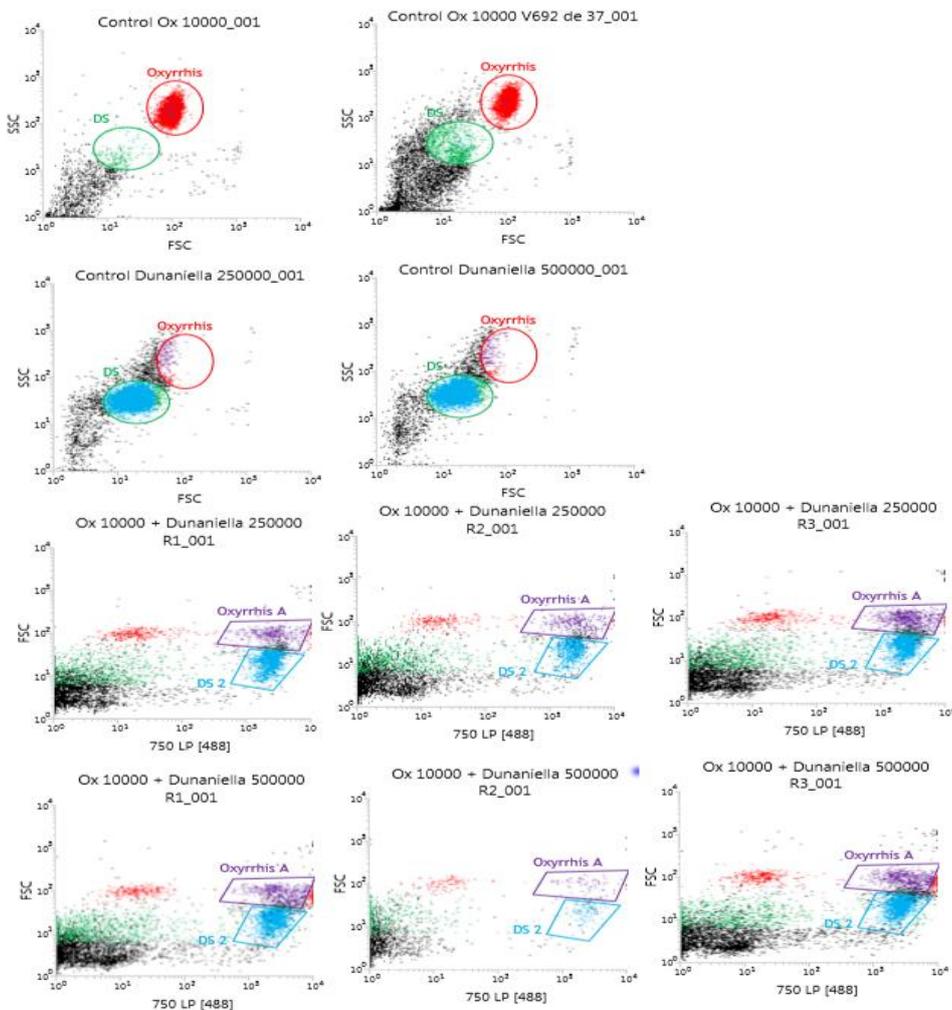


Figura 15. Consumo del alimento microalgal de la cepa *Dunaliella salina* y el tratamiento control utilizando el organismo *Oxyrrhis marina*.

- **Ensayo con la microalga *Phaeodactylum tricornutum*.**

El organismo depredador en presencia del alimento microalgal *Phaeodactylum tricornutum*. Se observó que consumió gran parte del alimento cuando se administró a tres concentraciones de inóculos y concentración de protozoos, presentando una densidad mayor del cultivo de *Oxyrrhis marina* con respecto a los controles al día 0, 3 y 7 ($P < 0,05$).

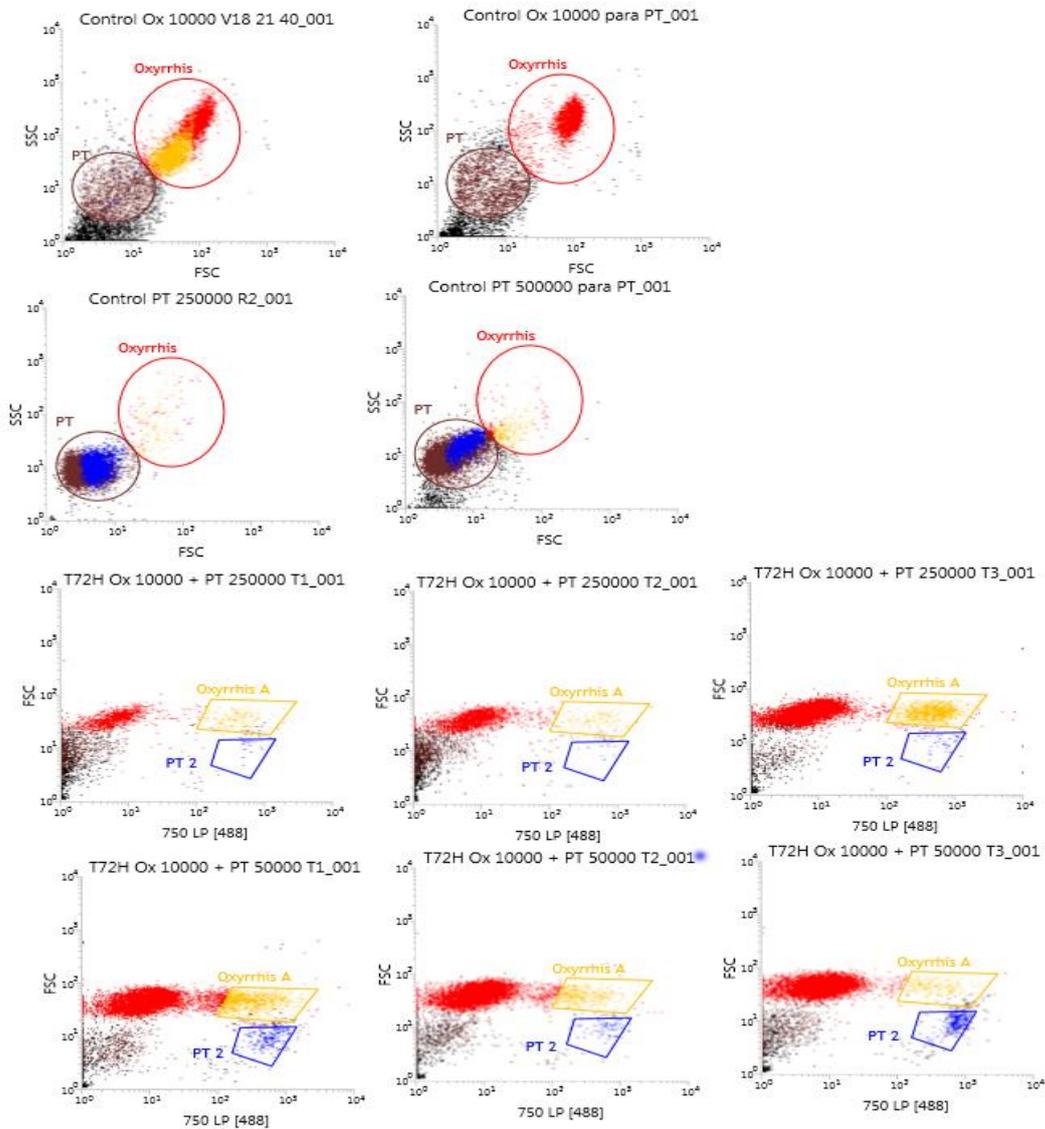


Figura 16. Consumo del alimento de la cepa *Phaeodactylum tricornutum*. Por parte del organismo depredador *Oxyrrhis marina* y tratamiento con las 3 raciones microalgales

- Segundo ensayo utilizando las mejores raciones de alimento con la cepa *Dunaliella salina* para una mejor productividad de del organismo depredador *Oxyrrhis marina*.

La tasa de consumo por parte de *Oxyrrhis marina*, se observó que el organismo depredador consumió gran parte de las células microalgales con las mejores 2 raciones de alimento con un máximo en las tasas de consumo al día 3 y 7, con diferencia significativa en el día 5 ($P < 0,05$). Produciendo una densidad del organismo depredador es mejor inocular con 5.000 cél/mL de protozoos y 500.000 cél/mL de microalga, donde se producen en promedio 93.000 cél/mL

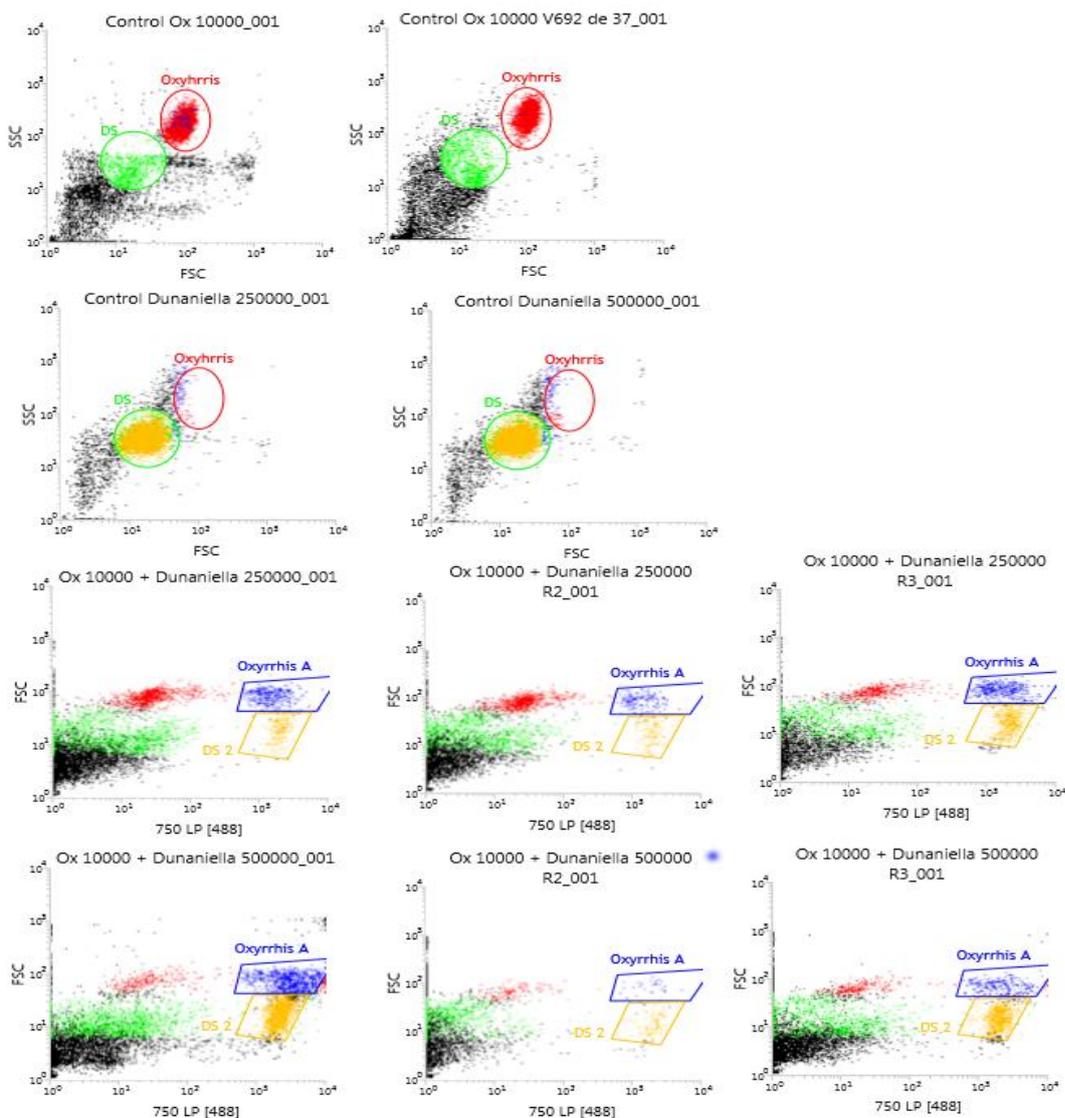


Figura 17. Consumo del alimento microalgal de la cepa *Dunaliella salina* y el tratamiento control utilizando las mejores 2 concentraciones para la producción del organismo *Oxyrrhis marina*.

- Segundo ensayo utilizando las mejores raciones de alimento con la cepa *Phaeodactylum tricornutum* para una mejor productividad de del organismo depredador *Oxyrrhis marina*.

El organismo depredador en presencia del alimento microalgal *Phaeodactylum tricornutum*. Se observó que consumió gran parte del alimento cuando se reajustaron las nuevas raciones de alimento, el consumo y el crecimiento del organismo depredador fue más eficiente al aumentar las ración de alimento con un máximo en el día 3 y 7, con diferencia significativa al día 8 ($P < 0,05$) (figura 11).

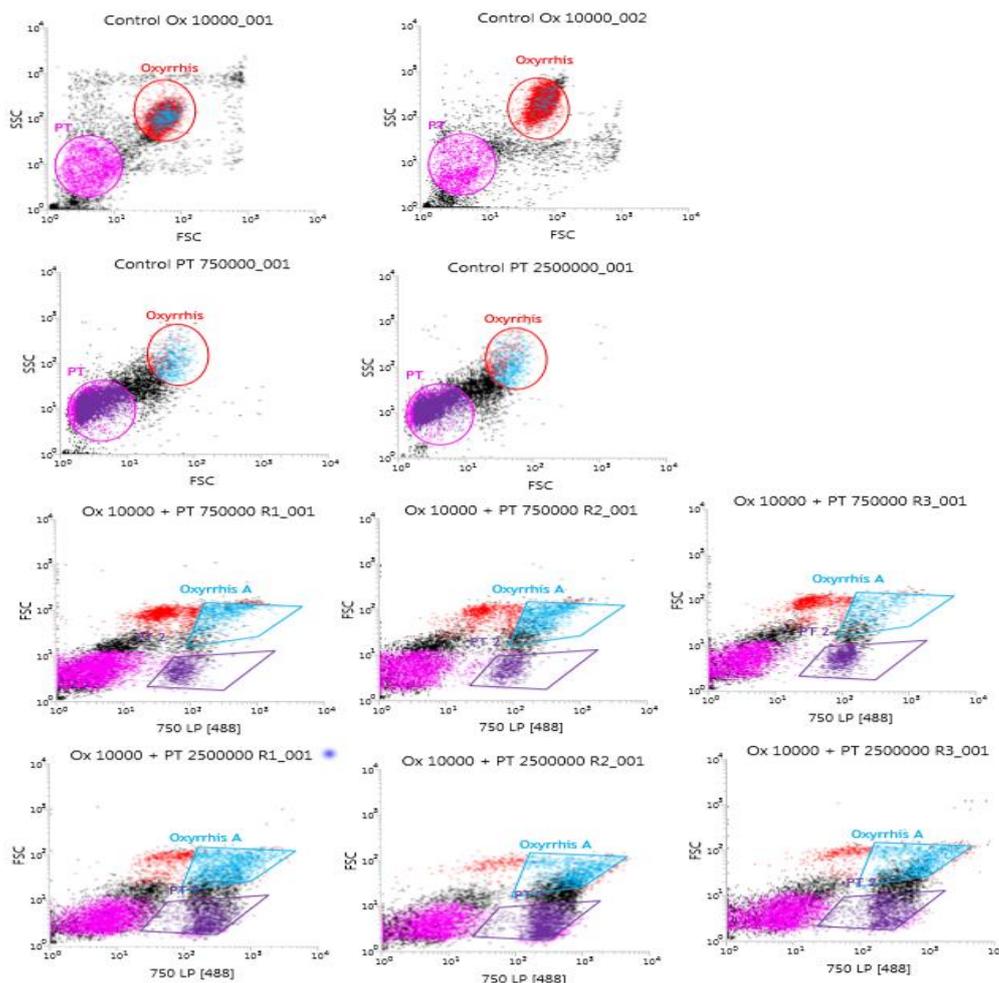


Figura 18. Consumo del alimento de la cepa *Phaeodactylum tricornutum*. Por parte del organismo depredador *Oxyrrhis marina* y reajuste con las 2 raciones microalgales aumentadas

Anexo 3.

Protocolo de gravimetría de lípidos con alúmina.

Se necesita microalga liofilizada, alumina, nueve tubos de vidrio seis para centrifugar y tres que deben pesarse, esto es por muestra.

1. Se pesan 200 mg de muestra de microalga liofilizada y 200 mg de alúmina (ayuda en el rompimiento de la pared).
2. Luego la muestra se macera en un mortero, hasta que esta quede homogénea.
3. Colocar 100 mg de esta mezcla en un tubo por triplicado.
4. Agregar 2 ml de solución de cloroformo:metanol (2:1) (600 ml de cloroformo/300 ml de metanol), agitar en vortex.
5. Una vez agitada en el vortex, se centrifuga a 2800 rpm por 3 min.
6. Pasado el período de centrifugación se vierte el sobrenadante en un tubo de vidrio nuevo.
7. Al precipitado que queda se vuelve a agregar cloroformo:metanol (2:1) 1 mL. Esto se realiza varias veces o hasta que el sobrenadante comience a perder su coloración verde a uno muy claro.
8. Una vez obtenido todos los sobrenadantes (6-8ml), se agrega 3 ml de ácido clorhídrico 0,1 N y 0,3 ml de cloruro de magnesio 0,5 % p/v (0,5 gramos de cloruro de magnesio en 100 ml de agua destilada en matraz de aforo). Se agita invirtiendo el tubo tres veces (usar tapa con goma ya que el liquido puede escurrir por las paredes hacia fuera del tubo).
9. Luego se agita en vortex, centrifugar a 2800 rpm por 3 min.
10. En el tubo quedan dos fases, arriba una clara y abajo una oscura entre ellas dos queda un precipitado blancuzco que son las proteínas. Con una pipeta Pasteur y un bulbo de goma se toma la fase oscura, la cual corresponde a lípidos más cloroformo. Esta se deposita en un tubo de vidrio previamente secado en la estufa y pesado.
11. Una vez extraída la muestra de lípidos más cloroformo, dejar en la estufa a 40°C por 24-48 horas, para evaporar el cloroformo.
12. Finalmente pesar el tubo con la muestra de lípidos, para determinar mediante la siguiente formula el porcentaje de lípidos en la muestra.

Gramos de Lípidos: (peso final tubo – peso inicial tubo)

% Lípidos: (gramos de lípidos/peso de biomasa mg)*100.

Metilación

- 1.- Agregar 300 µL de hidróxido de potasio en metanol, 2 M a cada tubo.
- 2.- Agregar 3 mL n-hexano, a cada tubo.
- 3.- Agitar 2 minutos en vortex, dejar reposar 1 hora en oscuridad.
- 4.- Trasvasijar 1,5 ml de fracción superficial (transparente) a los viales.

Para preparar hidróxido de potasio 2M se debe pesar 11,2 g de Hidróxido de Potasio y llevar a 100 ml con metanol.