



Universidad del Mar
Campus Puerto Ángel

“Cultivo del rotífero *Brachionus plicatilis* (Müller 1786) y su transferencia de ácidos grasos a partir de una dieta viva e inerte. ”

Tesis

Que para obtener el Título Profesional de Ingeniero en Acuicultura

Presenta

Omar Gracia Concha

Director

M. en C. Alejandra Torres Ariño

Puerto Ángel Oaxaca 2014

Resumen

Se realizó el cultivo y enriquecimiento del rotífero *Brachionus plicatilis* alimentado con alimentos vivos e inertes así como su determinación de ácidos grasos con la finalidad de saber que tan viable es la sustitución del alimento vivo por el inerte. Como alimento vivo se utilizó las microalgas *Nanochloropsis oculata* e *Isochrysis galbana* var. Tahitiana y como inerte la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, vitamina B₁₂ y aceite de orbital de atún Omagemex®. La primera etapa consistió en la producción en masa de rotíferos y se inició con un cultivo estático alimentando rotíferos con diferentes concentraciones de levadura, los parámetros que se evaluaron fue la Tasa específica de crecimiento (TEC), máxima densidad alcanzada y producción, de las cuales la concentración de 0.7 g10⁻⁶ fue con la que se obtuvo los mejores parámetros de evaluación con 75 rot mL⁻¹. El segundo experimento consistió en las mismas características del anterior solo que de manera semicontinua con un factor de dilución del 15% diario, resultando la concentración de 1 g10⁻⁶ con los mejores parámetros de evaluación y una máxima densidad de 52.7 rot mL⁻¹. Finalmente se hizo el cultivo semicontinuo de rotíferos alimentados con una ración de 1 g/10⁶ probando diferentes cantidades de vitamina B₁₂ con lo cual se incrementó la densidad poblacional hasta 115±10 rot mL⁻¹ al emplear una cantidad de vitamina B₁₂ de 1.0 µg mL⁻¹. La producción en biomasa con alimento vivo consistió en alimentar rotíferos con *N. oculata* a densidad de 10x 10⁶ cel mL⁻¹ y de manera estática se alcanzaron 178.33±7.63 rot mL⁻¹ en cultivo estático, en cultivo semicontinuo se produjeron hasta 179 rot mL⁻¹. La etapa de enriquecimiento se lograron producir rotíferos con el porcentaje de DHA y EPA (1%,1%) necesarios para la producción de peces marinos con alimento vivo e inerte, sólo los rotíferos producidos con *S. cerevisiae* y *N. oculata* sin enriquecimiento no cumplen con esto. El empleo del aceite Omagemex® produjo rotíferos con la mayor concentración de ácidos grasos (10.56 µg mg⁻¹ de DHA-, 2.73 µg mg⁻¹ de EPA-y 0.96 µg mg⁻¹ de ácido linolénico.). El tiempo ideal donde se alcanza la mejor transferencia de ácidos grasos con aceite Omagemex® es de 6 horas y en el caso de las microalgas es de 12 horas.

Dedicatoria

Con todo mi cariño y agradecimiento a Guille mi madre y mi hermana Elisa por el apoyo incondicional y ser parte fundamental en mi vida.

Agradecimientos

A la Universidad del Mar campus Puerto Ángel por ser el lugar donde me formé como profesionista y ser segundo hogar durante mis estudios universitarios.

A M. en C. Alejandra Torres Ariño por creer en mí y apoyarme en toda la realización de este trabajo.

A la Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega por apoyarme en los análisis de ácidos grasos y compartir su tiempo y conocimiento en la realización de esta tesis durante mi estancia en el CIBNOR.

A mi madre y hermana, tía Gloria, tío Joaquín, mis primos Moy y Lore por su todo su apoyo.

A la empresa Omegamex® por su aportación del aceite de orbital de atún y conocimientos sobre el mismo.

Al Acuario de Veracruz por la donación de la cepa de *Brachionus plicatilis* utilizada para el experimento.

Al los revisores M. en C. Eloísa Matus Nivon y Ocean. Ángel Cuevas Aguirre por su tiempo e importante contribución de conocimiento en el tema.

A compañeros amigos y técnicos del laboratorio del CIBNOR Aldo, Fredy, Hamid, Amelia, Gaby, Araceli por su amistad y siempre apoyarme cuando lo necesite durante mi estancia en La Paz.

A los técnicos del laboratorio LBM y Acuicultura de la UMAR, Celso, Blanquita, Marisol, Lalo, Monse por poner siempre de su parte y facilitarme lo necesario durante el desarrollo del experimento.

A mis compañeros de generación: Juan Carlos, Gaby, Sandra, Erick, Marisol, Denisse, Azucena.

Por compartir muchos momentos de alegría y apoyo cuando era necesario.

A mis amigos y compañeros de waterpolo y natación con quienes viví muchos buenos momentos durante la universidad y agradezco mucho su presencia, apoyo y amistad. Cinthia, Gaby, Cesar, Betho, Carlos (jimmy), Jose Manuel (Borre), Joshua, Bety. alberca, Dahir, Virgilio, Pantin, Lalo, Jorge, Nacho, Cesar.

Profesores que me dieron buenos consejos e hice buenas amistades como Ivonne Santiago, Leticia Sánchez, Pablo Pintos, (Antonio López S.).

A Dios quien en quien me apoyé también en momentos difíciles.

CONTENIDO

I	Introducción	1
II	Antecedentes	4
III	Planteamiento del problema	11
IV	Justificación	11
V	Hipótesis	12
VI	Objetivos	13
VI.1	General	13
VI.2	Particulares	13
VII	Material y métodos	14
VII.1	Obtención de alimento vivo e inerte	14
VII.2	Mantenimiento del alimento vivo e inerte	14
VII.3	Cultivo de microalgas	14
VII.3.1	Cinética	14
VII.3.2	Análisis de ácidos grasos en microalga	15
VII.4	Obtención del inóculo de rotíferos	16
VII.5	Cultivo de rotíferos con levadura	17
VII.5.1	Estático (LE)	17
VII.5.2	Cultivo semicontinuo (LS)	19
VII.5.3	Cultivo de rotíferos con levadura y vitaminas (LSV)	20
VII.6	Cultivo de rotíferos con microalgas	20
VII.7	Enriquecimiento	21
VII.8	Determinación de ácidos grasos en microalgas y rotíferos	22
VII.9	Análisis estadísticos	24
VIII	Resultados	24
VIII.1	Cultivo y cinética de microalgas	24
VIII.1.1	Espectro de absorción	31
VIII.2	Contenido bioquímico en microalgas	34
VIII.2.1	Ácidos grasos	34
VIII.3	Cultivo de rotíferos	39
VIII.3.1	Experimento LE	39
VIII.3.1.1	Tasa específica de crecimiento (TEC) del experimento LE:	41
VIII.3.2.	Experimento LS y LSV	43
VIII.3.3	Producción de rotíferos en los experimentos LE, LS y LSV.	49
VIII.5	Contenido y transferencia de ácidos grasos en rotíferos	51
IX	Discusiones	61
IX.1	Microalgas	61
IX.1.1	Cinética de crecimiento	61
IX.1.2	Espectro de absorción	63

IX.1.3	Contenido bioquímico	64
IX.1.3.1	Ácidos grasos en microalgas	64
IX.2	Rotíferos	65
IX.2.1	Cultivo	65
IX.2.1.1	Experimento LE	65
IX.2.1.2	Experimento LS	68
IX.2.1.3	Experimento LSV	69
IX.2.2	Ácidos grasos en rotíferos	70
X	Conclusiones	75
XI	Recomendaciones	77
XII.-	Literatura citada	78
	Abreviaturas	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Núm.	Nombre	Pág.
1	<i>Brachionus plicatilis</i> a) Espinas, b) Corona ciliar, c) Lorica d) Huevo.	1
2	Instalaciones donde se llevó a cabo el cultivo de <i>B. plicatilis</i> a) Tanque cilindro cónico de fibra de vidrio, b) Línea de aireación, c) Línea de desagüe.	18
3	Fases para la extracción y cuantificación de ácidos grasos de muestras de microalgas (b-f) y rotíferos (a-f). a) Equipo donde se liofilizaron las muestras de rotíferos, b) Adición de la mezcla de ácido clorhídrico: metanol (5:95) a cada muestra, c) Separación de fase polar y no polar al añadir el hexano, d) Extracto de ácidos grasos, e) Carrusel del cromatógrafo de gases espectrómetro de masas (GCMS) con las muestras en viales de 2 mL antes de la inyección, f) Perfil cromatográfico de los ácidos grasos de una muestra obtenida en el GCMS y abierta en el programa WSearch32.	23
4	Curva de crecimiento de las microalgas <i>Nanochloropsis oculata</i> (NNO-1) e <i>Isochrysis galbana</i> var. Tahitiana (ISGT-4) en reactores de cristal de 20 L y con el medio QFF. a) Producción en cel mL ⁻¹ , b) Valores transformados con base en el logaritmo natural (Ln). Fases de crecimiento: Fase exponencial (ex), Fase de desaceleración (de),-Fase estacionaria (es).	26
5	Espectros de absorción de los pigmentos en las microalgas a) ISGT-4 y b) NNO-1 durante su cultivo	32
6	Crecimiento poblacional del experimento LE, a) Curva de crecimiento poblacional del experimento LE, b) Porcentaje de hembras ovígeras durante el experimento LE.	40
7	TEC parcial de cada tratamiento durante experimento LE a lo largo de todo el cultivo de rotíferos.	42
8	Materia orgánica en los tanques del experimento LE. a) Materia orgánica adherida a las paredes del tanque, b) materia orgánica en suspensión.	43
9	Respuesta en el crecimiento poblacional de rotíferos en diferente medio de cultivo (con y sin vitaminas) a) Crecimiento poblacional del experimento LS b) Porcentajes de hembras ovígeras (% Rot-H) del experimento LS c) Crecimiento poblacional de experimento LSV d) Porcentaje de hembras ovígeras del experimento LSV.	44
10	TEC parcial de cada tratamiento durante el cultivo de rotíferos con levadura (LS).	47

- 11 TEC de cada tratamiento del experimento LSV a lo largo de todo el cultivo de rotíferos con levadura y vitaminas. 49
- 12 Producción de rotíferos en los diferentes experimentos: cultivo estático (LE), cultivo semicontinuo (LS) y cultivo semicontinuo con vitamina (LSV). A, B, C y D son las concentraciones de cada experimento. 50
- 13 Transferencia de ácidos grasos DHA, EPA y ácido linolénico (18:3 ω 3) durante el enriquecimiento con aceite Omegamex®. Cosecha: rotíferos alimentados con levadura y vitaminas recién cosechados. BT=0 y BT=4 – rotíferos tomados como blanco, sin enriquecer, al principio y final del proceso de enriquecimiento. T=0 rotíferos destinados al enriquecimiento, antes de añadir el aceite 59
- 14 Transferencia de ácidos grasos de la microalga ISGT-4 al rotífero *B. plicatilis*. 60

ÍNDICE DE TABLAS

Núm.	Nombre	Pág.
I	Condiciones de cultivo y rendimiento de <i>B. plicatilis</i> en diferentes centros de producción de peces marinos, modificado de Fulks & Main (1991).	7
II	Porcentajes de ácidos grasos palmítico (16:0), palmitoleico (16:1 ω 7), oleico (18:1 ω 9), linoleico (18:2 ω 6), linolénico (18:3 ω 3), araquidónico (20:4 ω 6), ácido eicosapentacoico (20:5 ω 3), y ácido docosahexaenoico (22:6 ω 3), proporción DHA/EPA, total ω 3HUFA, lípidos totales (peso seco) para rotíferos cultivados con diferentes alimentos (Modificado de Tucker 1998).	9
III	Contenido de ácidos grasos (μ g/mg) en rotíferos (<i>B. plicatilis</i>) alimentados con tres diferentes dietas y de huevos fecundados del pez <i>Mugil cephalus</i> (Tamaru <i>et al.</i> 1993).	10
V	Diseño experimental para determinar la concentración de levadura que promueva la mayor densidad poblacional de rotíferos en un cultivo estático. Concentración a (LE-A), concentración b (LE-B), concentración c (LE-C) y concentración d (LE-D).	18
VI	Diseño experimental para el cultivo de <i>B. plicatilis</i> con levadura y diferentes concentraciones de vitamina B ₁₂ . (Levadura semicontinuo Vitamina (LSV) – Tratamiento).	20
VII	Diseño experimental de la fase de enriquecimiento de rotíferos cultivados con alimento vivo e inerte.	22
VIII	Parámetros poblacionales para NNO-1 cultivada en reactores de cristal de 20 L con el medio QFF.	27
IX	Parámetros poblacionales para ISGT-4 cultivada en reactores de cristal de 20 L con el medio QFF.	28
X	Matriz de correlación entre los parámetros poblacionales obtenidos del cultivo estático de ISGT-4.	30
XI	Matriz de correlación entre los parámetros poblacionales obtenidos del cultivo estático de NNO-1.	30

XII	Contenido de ácidos grasos ($\mu\text{g mg}^{-1}$) en las microalgas NNO-1 e ISGT-4 durante el cultivo estático en reactores de 20 L, la concentración en porcentaje se muestra entre paréntesis.	36-38
XIII	Parámetros fisicoquímicos registrados durante el cultivo LE, el valor de nitratos es para los días tres, seis, y 10.	41
XIV	Parámetros fisicoquímicos registrados durante el cultivo LS.	46
XV	Parámetros fisicoquímicos registrados durante del experimento LSV.	47
XVI	Producción total de rotíferos en los experimentos LE (levadura cultivo estático) LS (levadura cultivo semicontinuo) y LSV (levadura con vitaminas).	50
XVII	Contenido de ácidos grasos ($\mu\text{g mg}^{-1}$) en rotíferos liofilizados durante el enriquecimiento con la microalga ISGT-4 (Mi) y Emulsión de aceite de ojos de atún Omegamex® (In). S=ácido graso saturado, MI=ácido graso monoinsaturado, BI=ácido graso biinsaturado, PI=ácido graso poliinsaturado.	52-58
XVIII	Comparación del contenido de ácidos grasos en rotíferos alimentados con diferentes alimentos. Los valores de <i>N. oculata</i> y Levadura+ <i>N. oculata</i> son los obtenidos por Tamaru <i>et al.</i> (1993). Mi-12-enriquecimiento con <i>I. galbana</i> var. Tahitiana a las 12 hora, In-6 –enriquecimiento con aceite a las 6 horas; ² EPA ³ DHA, *concentración de ácidos grasos totales, ⁴ suma de ácidos grasos considerados solo por Tamaru <i>et al.</i> (1993)	71

I.-INTRODUCCIÓN