

Efecto de la microalga *Chlorella vulgaris* en el manejo de larvas y alevinos de carachi amarillo *Orestias luteus* nativas del lago Titicaca, Perú

Effect the microalga *Chlorella vulgaris* in the management of larvae and fry of yellow carachi *Orestias Luteus* native from Titicaca Lake, Peru

Recibido: noviembre 10 de 2022 | Revisado: noviembre 15 de 2022 | Aceptado: noviembre 26 de 2022

GLICERIO REYES AMARU¹
ERNESTO YUJRA FLORES¹

RESUMEN

El ensayo se efectuó en el mes de marzo del 2021 en el Laboratorio Continental de Puno – IMARPE con la finalidad de determinar el efecto del uso de la microalga *Chlorella vulgaris* como alimento al inicio de la ontogenia de *Orestias luteus*. El trabajo se realizó con 1600 larvas mantenidas en dos acuarios de 45 L. Acuario con *Chlorella vulgaris* (agua verde), y sin la *Chlorella vulgaris* (agua clara). Se reflejan que durante los primeros siete días las larvas alimentadas y mantenidas con microalgas presentaron mayor supervivencia debido a que el alto nivel nutricional que presenta la microalga como el ácido docosahexaenoico (DHA) aparentemente influyó en el desarrollo de las larvas de *Orestias luteus*. Asimismo, al ser añadidas directamente a los acuarios, las microalgas ejercieron una influencia positiva en el estado fisiológico de larvas, así como de alevinos de *Orestias luteus* que se traduce en la obtención de peces de elevada calidad. Por tanto, el alimento vivo como organismos planctónicos constituyen la base de alimentación en el estadio larvario de Carachi amarillo y la obtención de alta supervivencia de semillas permitiendo mejor crecimiento y mayor supervivencia.

Palabras clave: Acuicultura, alimentación, microalga, Carachi amarillo

ABSTRACT

The test was carried out in March 2021 at the Continental Laboratory of Puno - IMARPE, in order to determine the effect of using the microalga *Chlorella vulgaris* as food at the beginning of the ontogeny of *Orestias luteus*. The work was carried out with 1600 larvae kept in two 45 L aquariums. Aquarium with *Chlorella vulgaris* (green water), and without *Chlorella vulgaris* (clear water). It is reflected that during the first seven days of the larvae fed and maintained with microalgae presented greater survival due to the high nutritional level that the microalgae presents such as; Docosahexaenoic acid (DHA) apparently influenced the development of *Orestias luteus* larvae. Likewise, when added directly to the aquariums, the microalgae exerted a positive influence on the physiological state of the larvae as well as the fry of *Orestias luteus*, which translates into the obtaining of high-quality fish. Therefore, the live food such as planktonic organisms constitute the feeding base in the larval stage of Carachi Amarillo and obtaining high survival of seeds allowing better growth and greater survival.

1 Instituto del Mar el Perú . IMARPE
Laboratorio Continental de Puno
Área de acuicultura. Puno, Perú

Autor de correspondencia:
gamaru@imarpe.gob.pe

Key words: Aquaculture, food, microalgae, Yellow Carachi

© Los autores. Este artículo es publicado por la Revista Campus de la Facultad de Ingeniería y Arquitectura de la Universidad de San Martín de Porres. Este artículo se distribuye en los términos de la Licencia Creative Commons Atribución No-comercial – Compartir-Igual 4.0 Internacional (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), que permite el uso no comercial, distribución y reproducción en cualquier medio siempre que la obra original sea debidamente citada. Para uso comercial contactar a: revistacampus@usmp.pe.

<https://doi.org/10.24265/campus.2022.v27n34.08>

Introducción

Las microalgas (fitoplancton) son el alimento más utilizado en la acuicultura ya que aproximadamente el 90% del total de la producción es usado como alimento para esta actividad al menos en una etapa de desarrollo de los organismos cultivados, por ejemplo, en moluscos, larvas de peces y crustáceos o bien en organismos intermedios, como rotíferos, cladóceros, copépodos (Duerr *et al.*, 1998), debido a que poseen cantidades apreciables de ácidos grasos poliinsaturados (Omega 3 y Omega 6), carbohidratos, lípidos, vitaminas, minerales y antioxidantes (Méndez, 2003; Abalde *et al.*, 1996).

Las microalgas son organismos unicelulares fotosintéticos que se desarrollan en medios acuáticos de agua dulce o agua de mar, carecen de raíces, tallos y hojas (Falkowski, 1997). Además, tienen una mejor disponibilidad para asimilar Carbono y otros nutrientes del medio acuoso. En ese contexto, la utilización de microalgas en acuicultura, permite obtener mejores resultados de crecimiento y supervivencia en relación a dietas inertes (Ponis *et al.*, 2003). Por ello, el cultivo de las especies de género *Chlorella* tienen gran importancia por su facilidad de cultivo (Yamamoto *et al.*, 2004) y su alto valor nutricional (Moronta *et al.*, 2006)

Una de las etapas más críticas en el ciclo de vida de los peces, es la etapa larval. Al poseer ovas pequeñas tienen limitada cantidad de material vitelino, en este caso, el desarrollo embrionario es rápido y la alimentación exógena iniciaría cuando aún hay una capacidad digestiva mínima (Dabrowski, 1984). Motivo por el cual, las microalgas, principalmente la

Chlorella vulgaris, incidirían en el manejo óptimo de larvas de peces provenientes de óvulos menores a 7,0 mm existentes en el lago Titicaca como *Orestias* (carachis e Ispi), *Trichomycterus* (mauri y suche) y *Odontesthes bonariensis* (pejerrey). Estos peces presentan problemas de nutrición y mayor mortandad. Actualmente, los peces antes mencionados se encuentran sobreexplotadas por lo que debe darse prioridad a su conservación y al estudio de su biología y ciclo de vida.

Lavens y Sorgeloos, (1996) indican que las etapas más críticas del cultivo de peces con óvulos pequeños es la etapa larval. Por ello, es importante iniciar con un régimen de alimento vivo compuesto por fito y zooplancton (Galessoupe, 1990; Reintan *et al.*, 1993). Por lo tanto, al mejorar la supervivencia de peces en etapa larval conllevaría al incremento de la biomasa de carachi amarillo. De esa manera, se contribuiría a la recuperación y a la seguridad alimentaria de los pobladores alto andinos de la región Puno.

Además de la optimización en la nutrición de peces, las microalgas son añadidas directamente a tanques de cultivo lo que ejerce una influencia positiva en el estado fisiológico de larvas de peces que se traduce en la obtención de alevines de elevada calidad (Olsen *et al.*, 2000), como también mejora las condiciones higiénicas de estos, mediante la reducción de compuestos que polucionan (Makridis *et al.*, 2006)

El presente estudio tuvo como objetivo identificar el efecto del uso de la microalga *Chlorella vulgaris* como alimento vivo en la producción de larvas de *Orestias luteus* en términos de supervivencia y crecimiento.

Método

La investigación se llevó a cabo en el área de cultivos auxiliares del Laboratorio Continental de Puno, perteneciente al Instituto del Mar del Perú – IMARPE, el cual se encuentra localizado en la ciudad de Puno. Para el desarrollo de estudio, se utilizaron 1600 larvas de carachi amarillo *Orestias luteus* de dos días de edad con talla promedio de $7,41 \pm 0,38$ mm y un peso $0,0046 \pm 0,0012$ g provenientes de desove artificial, los cuales fueron mantenidas durante 30 días en dos acuarios rectangulares de vidrio de 40 litros con respectivos aireadores a una densidad de 20 larvas por litro. El estudio consistió en determinar la supervivencia de larvas de *O. luteus* los primeros siete días utilizando dos técnicas de alimentación: (A) larvas alimentadas con *Chlorella vulgaris* y (B) larvas alimentadas directamente con nauplios de *Artemia salina*. A los ocho días, las larvas que estuvieron alimentadas con microalgas, pasaron a ser alimentados con neonatos de *Artemia salina*.

Las cepas de *Chlorella vulgaris* se obtuvieron del lago Titicaca y separadas mediante el rayado en agar, método utilizado para algas menores a 10 micras, posteriormente estas fueron acondicionadas en tubos de ensayo, a

las cuales se consideró como cepas. Para el enriquecimiento de estas, se utilizó el medio no convencional abono foliar (fertilizante agrícola) los cultivos fueron siempre cosechados en su fase estacionaria, el agua utilizada para volúmenes de 10, 25, 100, y 500 ml fue destilada, mientras para un litro hasta 20 litros se utilizó agua potable filtrada y desclorada.

Este cultivo de microalgas se registró en el Laboratorio Continental de Puno, IMARPE en condiciones controladas. La instalación del área de cultivos auxiliares utilizada fue de 67,5 m² acondicionados a una temperatura ambiental de 20 a 25 °C, con fotoperiodo de 12 horas luz con una aireación continua. Cada tres días, se realizó el conteo del número de células por 0,1 mL, además se registró la temperatura, salinidad y pH del medio de cultivo con multiparámetro marca WTW multi 3620 IDS. De esta manera, la concentración celular se calculó mediante la siguiente fórmula; considerando que las células son menores a 6 μ:

$$Na = \frac{\sum \text{Cel. Ca}}{5} \times 250000$$

Donde: Na = Número de células por mL (cel/mL), $\sum \text{Cel. Ca}$ = Suma de células en la diagonal central de la cámara Neubauer.

Figura 1

Cultivo de *Chlorella vulgaris* en Laboratorio de Puno



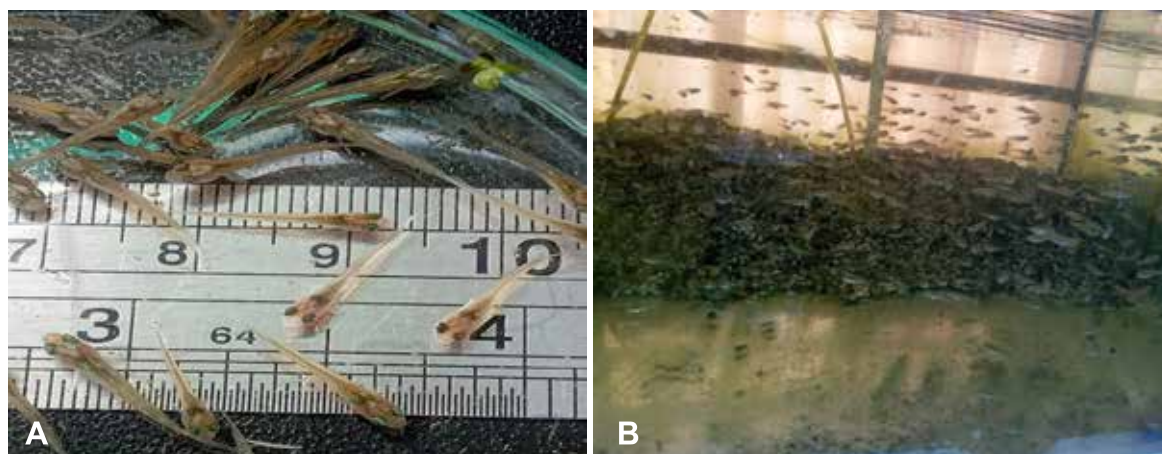
El procedimiento fue mediante la obtención de muestras diarias de cada uno de los recipientes de tres litros que sirvieron como unidades experimentales, las que se fijaron la muestra en láminas portaobjetos con lugol. Posteriormente, se procedió a contarlas en un microscopio compuesto y con un hematocímetro equipada con cuadrículado de Neubauer.

Diariamente, se realizó el registro de temperatura, oxígeno y pH en los

acuarios con multiparámetro marca WTW multi 3620 IDS de fabricación alemana 2017. Asimismo, la separación de larvas muertas se realizó cada dos días mediante el método de sifoneo. Al final del estudio, se realizó el conteo y procedió a muestrear de forma aleatoria el 5 % de las larvas supervivientes a las cuales se les midió la longitud total en mm y el peso en g.

Figura 2

Larvas (A) y alevinos (B) de *Carachi amarillo*



Para la comparación de los resultados obtenidos por cada tratamiento, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una

vía, utilizando un nivel de confianza de 95%.

Tabla 1

Biométrico de talla y peso de *Carachi amarillo* al inicio y final del ensayo (30 días)

Parámetro/promedio	Ensayo A		Ensayo B	
	A	DS	B	DS
Longitud total inicial (LT) (mm)	7.41	1.34	7.41	1.34
Peso inicial (g)	0.0046	0.0016	0.0046	0.0016
Longitud final (LT) (mm)	10.98	1.97	10.88	1.9
peso final (g)	0.014	0.024	0.011	0.024

Resultados

La Tabla 2 muestra los resultados de dos ensayos. En el ensayo A, la alimentación se inició con *Chlorella vulgaris* por un

periodo de siete días y el porcentaje de supervivencia de larvas de *O. Luteus* fue superior en comparación con el ensayo B donde la alimentación se inició con neonatos de *Artemia salina*.

Tabla 2

Supervivencia de larvas de Carachi amarillo mediante el perfil de alimentación

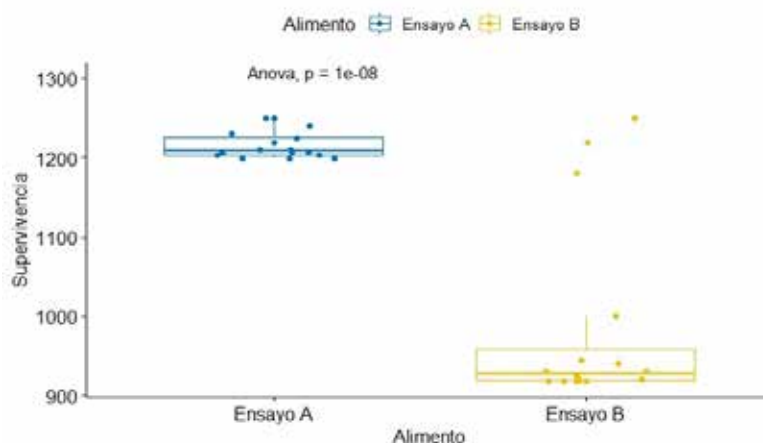
Tipo de alimento	Ensayo A		Ensayo B	
	Chlorella vulgaris		Artemia salina	
Conteo/días	Cantidad vivos	Cantidad muertos	Cantidad vivos	Cantidad muertos
1	1250	0	1250	0
3	1250	0	1218	32
5	1240	10	1150	68
7	1231	9	910	180
9	1224	7	945	25
11	1220	4	940	5
13	1211	9	930	10
15	1211	0	930	0
17	1207	4	924	6
19	1207	0	920	4
21	1207	0	920	0
23	1203	4	920	0
25	1203	0	918	2
27	1199	4	918	0
29	1199	0	918	0
Total	1199	51	918	332
% vivos y muertos	95.9	4.1	73.4	26.6

En la Figura 3, el diagrama de cajas relacionado al tipo de alimento en el ensayo A; el valor máximo de supervivencia fue de 1199 unidades mostrando valores de cuartiles 1,2 y 3 con 1225, 1250 y 1350 individuos respectivamente. Asimismo, en el ensayo B, el valor máximo fue de 918

unidades de supervivencia para los datos de cuartiles 1,2 y 3 con 950, 975 y 950 respectivamente. Además, los cuartiles y medianas de ambos ensayos están dispersos y contienen diferentes valores. Finalmente, se obtuvo mayor supervivencia con el ensayo.

Figura 3

Comparación de dos maneras de suministro de alimento vivo a larvas de Carachi amarillo.



En la Tabla 3, puede mostrarse el análisis de la varianza con relación a la supervivencia según la forma del suministro de alimento. La tabla ANOVA muestra que el coeficiente F, que en este

caso es igual a 61,0847, es el cociente indicado entre grupos y el estimado dentro de grupos. Puesto que el valor P de la prueba F es menor 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa.

Tabla 3

Análisis de la varianza (ANOVA) de supervivencia en función al alimento

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Coefficiente F	Valor P
Entre grupos	430592	1	430592	61,0847136	1,0121E-08
Dentro de grupos	211472,875	30	7049,095833		
Total	642064,875	31			

Discusión

El crecimiento es una variable biológica que puede afectar cuando las condiciones del medio y la alimentación resultan limitantes. Para asegurar la supervivencia, los peces presentan diversas estrategias, principalmente, en la etapa larval. En este estudio, las condiciones del medio y la forma de alimentación fueron favorables, asimismo el manejo higiénico – sanitario fueron controlados.

En el ensayo A pudo observarse a los siete días mayor supervivencia de larvas de *Orestias luteus* al 78 % permitido por el suministro de *Chlorella vulgaris* y posteriormente con neonatos *Artemia salina*. Una de las etapas más críticas en el ciclo de vida de los peces con ovas pequeñas es la etapa larval. En este caso, la especie *O. luteus* posee ovas pequeñas en donde la reabsorción de saco vitelo ocurrió entre tres a cuatro días, en el cual la capacidad digestiva aún fue mínima.

Al respecto Dabrowski (1984) menciona que las ovas pequeñas tienen limitada cantidad de material vitelino.

En este caso, el desarrollo embrionario es rápido y la alimentación exógena iniciaría cuando aún hay una capacidad digestiva mínima, asimismo Devillers, (1961) indica que, desde el punto de vista de la alimentación, las larvas de peces se enfrentan a la necesidad de aprender a cazar con rapidez y que además se complica aún más ya que no tienen un sistema digestivo completamente formado. Durante este periodo, el desarrollo del tubo digestivo abarca cambios morfológicos, fisiológicos que están sincronizados por procesos genéticos y ambientales. Motivo por el cual, las microalgas principalmente la *Chlorella vulgaris* incidió de manera eficiente en el manejo de larvas de peces de *O. luteus* que provienen de óvulos menores a 7,0 mm.

La *Chlorella vulgaris* resultó tener características atractivas como alimento para la especie *Orestias luteus*, principalmente en la etapa de larvas ya que presenta tamaño adecuado para ser consumidas y una pared celular digerible. Así mismo, Abalde *et al.*, (1995) indican que las microalgas deben tener una composición bioquímica

adecuada, especialmente de los ácidos grasos poliinsaturados, debido a que estos son esenciales para el desarrollo larval de los organismos acuáticos. Al ser suministrados como alimento, también se evidenció que la microalga ejerció directamente en el ambiente acuático (acuario), interviniendo en el estado fisiológico de larvas de *Orestias luteus*.

Al respecto, Olsen *et al.*, (2000) indican que una de las aplicaciones más importantes de las microalgas durante la etapa de cultivo larvario es añadir directamente, al ambiente acuático influyendo sobre el estado fisiológico de las larvas. Además el fitoplancton resulta esencial para alimentar muchos organismos acuáticos, como larvas de peces, moluscos y crustáceos (Spolaore *et al.*, 2006).

Del mismo modo, Milhazes-Cunha y Otero, (2017) señalan que otra de las ventajas básicas de cultivo de microalgas es mediante el uso de nutrientes provenientes de la acuicultura. También las microalgas son usadas en acuicultura multitrófica para peces herbívoros y moluscos. Otro de los casos es que el cultivo de microalgas se aplica para tratamiento de aguas residuales para acuicultura debido que esta actividad presenta problemas con el medio ambiente mediante el uso de alimento no digerido y la expulsión de heces de parte de los peces en cautiverio. El principal nutriente disuelto es el amonio que se convierte en nitrato. Dichos compuestos orgánicos se pueden cosechar y reciclar de manera eficiente lo que serviría como nutriente para microalgas.

No solo se pueden utilizar las microalgas como alimento vivo. También

puede reemplazar a la harina de pescado. Según estudios realizados por (Raji *et al.*, 2018) las microalgas como la *Spirulina platensis* y *Chlorella vulgaris* fueron utilizadas en la dieta del Bagre Africano con el propósito de reemplazar a la harina de pescado. Los resultados de este trabajo de investigación indican que aumentó el rendimiento del crecimiento en función a la tasa de crecimiento específico; así mismo, la relación de conversión alimenticia y la relación de eficiencia proteica se vieron significativamente influenciadas por las suplementaciones.

Se ha contrastado el efecto del uso microalgas en mantenimiento de larvas de *O. luteus* como el efecto estimulador sobre el sistema inmune, Además de obtener mejor crecimiento y supervivencia, se ha visto que la capacidad de larvas de *O. luteus* es mayor la percepción de alimento en el que adiciona microalgas Rocha *et al.*, (2008) indican, que la capacidad de larvas de peces marinos para percibir es mayor en un medio de cultivo en el que se adiciona microalgas, gracias al mayor contraste que producen estas microalgas.

Conclusiones

Al suministrar como alimento vivo la microalga *Chlorella vulgaris* a larvas de *Orestias Luteus* durante los primeros siete días, produjo mejores resultados esto se evidenció en el ensayo "A" donde el crecimiento y supervivencia fueron mejores en comparación con el ensayo "B". Cabe mencionar que es necesario abordar más intensamente en la alimentación y nutrición de larvas de peces por ser complejo.

El cultivo de microalgas en laboratorio representa una alternativa como alimento

para larvas de peces por su alto contenido de cantidades apreciables de ácidos grasos poliinsaturados (Omega 3 y Omega 6), carbohidratos, lípidos, vitaminas, minerales y antioxidantes.

En el lago Titicaca, los peces como los del género *Orestias* (carachis e Ispi), *Trichomycterus* (mauri y suche) y *Odontesthes bonariensis* (pejerrey) son recursos hidrobiológicos de importancia

comercial. Son considerados como alimento principal para el poblador del anillo circunlacustre. Producen óvulos pequeños y por consiguiente, presentan problemas de nutrición y mortandad, principalmente, en la etapa de larvas y posible extinción de las mismas, debido a que actualmente se encuentran sobreexplotadas por lo que debe darse prioridad a su conservación y al estudio de su biología y ciclo de vida.

Referencias

- Abalde, J., Cid, A., Fidalgo, J., Torres, E. y Herrero, C. (1996). Microalgas: cultivo y aplicaciones. Universidade da Coruña. <https://doi.org/10.17979/spudc.9788497497695>
- Anthony, J., Sivashankarasubbiah, K.T., Thonthula, S., Rangamaran, V.R., Gopal, G. & Ramalingam, K. (2018). An efficient method for the sequential production of lipid and carotenoids from the Chlorella growth Factor-extracted biomass of Chlorella vulgaris. *J Appl Phycol.*, 30, 2325-2335. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1430-5>
- Dabrowski, K. (1984). The feeding of fish larvae: present «state of the art» and perspectives. *Reproduction Nutrition Développement*, 24(6), 807-833.
- Devillers, C. (1961). Structural and dynamic aspects of the development of the teleostean egg. *Adv. Morphol.*, 1, 379-428.
- Duerr, E., Molnar, A. y Sato, V. (1998). Culture microalgae as aquaculture feeds. *Journal Marine Biotechnology*, 7, 65-70
- Emparan, Q., Harun, R. & Danquah, M.K. (2019). Role of phycoremediation for nutrient removal from wastewaters: a review. *Appl Ecol Environ Res.*, 17, 889-915. https://doi.org/10.15666/año/1701_889915
- Emparan, Q., Harun, R. & Danquah, M.K. (2019). Role of phycoremediation for nutrient removal from wastewaters: a review. *Appl Ecol Environ Res.*, 17, 889-915. https://doi.org/10.15666/año/1701_889915
- Falkowski, P. y Raven, J.A. (1997). *Aquatic photosynthesis*. ED. Blackwell Science.
- Kent, M., Welladsen, H.M., Mangott, A. & Li, Y. (2015). Nutritional Evaluation of Australian Microalgae

- as Potential Human Health Supplements. *PLoS One*, 10(2), e0118985.
- Makridis P., Alves Costa R. y Dinis M.T. (2006) Microbial conditions and antimicrobial activity in cultures of two microalgae species. *Tetraselmis chuii* and *Chlorella minutissima*, and effect on bacterial load of enriched *Artemia metanauplii*. *Aquaculture*, 255, 76-81. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.12.010>
- Méndez M. (2003). Evaluación de la remoción de fósforo y nitrógeno de aguas residuales por el alga *Chlorella* sp. *Revista Clon*, 2, 42-46.
- Milhazes-Cunha, H. & Otero, A. (2017). Valorisation of aquaculture effluents with microalgae: The Integrated Multi-Trophic Aquaculture concept. *Algal Research*, 24, 416-424. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.12.011>
- Mohd Yunos, F. H., Nasir, N. M., Wan Jusoh, H. H., Khatoon, H., Lam, S.S., & Jusoh, A. (2017). Harvesting of microalgae (*Chlorella* sp.) from aquaculture bioflocs using an environmental-friendly chitosan-based bio-coagulant. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 124, 243-249. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.07.016>
- Moronta, R., Mora, R., y Morales, E. (2006) Respuesta de la microalga *Chlorella sorokiniana* al pH, salinidad y temperatura en condiciones axénicas y no axénicas. *Rev. Fac. Agron.*, 2006(23), 27-41.
- Muller-Feuga, A. (2004) Microalgae for aquaculture: the current global situation and future trends. En: A. Richmond (ed). *Handbook of microalgal culture* (pp. 352-364). Blackwell Science
- Olsen, A.I., Olsen, Y., Attramadal, Y., Christie, K., Birkbeck, T.H., Skjermo J. y Vadstein O. (2000) Effect of short term feeding of microalgae on the bacterial flora associated with juvenile *Artemia franciscana*. *Aquaculture*, 190, 11-25.
- Ponis, E., Robert, R. y Parisi, G. (2003). Nutritional value of fresh and concentrated algal diets for larval and juvenile Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*, 221, 491-505.
- Raji, A. A., Alaba, P. A., Yusuf, H., Abu Bakar, N. H., Mohd Taufek, N., Muin, H. & Abdul Razak, S. (2018). Fishmeal replacement with *Spirulina Platensis* and *Chlorella vulgaris* in African catfish (*Clarias gariepinus*) diet: Effect on antioxidant enzyme activities and haematological parameters. *Research in Veterinary Science*, 119, 67-75. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.05.013>
- Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E. & Isambert A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Biosciences and Bioengineering*, 101, 87-96. <https://doi.org/10.1263/jbb.101.87>
- Velazquez, L.J., Rodríguez, J.R.M., Colla, L.M., Saenz, G.A., Cervantes, C.E.,

- Aguilar, C.N. & Ruiz, H.A. (2018). Microalgal biomass pretreatment for bioethanol Production: a review. *Biofuel Res J.*, 17, 780–791. <https://doi.org/10.18331/BRJ2018.5.1.5>
- Wang, J., Jin, W., Hou, Y., Niu, X., Zhang, H. & Zhang, Q. (2013). Chemical composition and moisture-absorption/retention ability of polysaccharides extracted from five algae. *Int J Biol Macromol.*, 57, 26-29. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2018.06.083>
- Yamamoto M, Fujishita M, Hirata A, Kawano S. (2004) Regeneration and maturation of daughter cell walls in the autospore-forming green alga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *J Plant Res.*, 117, 257-264