

Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada



EVALUACIÓN DEL EFECTO EN EL VALOR NUTRICIO DEL ROTIFERO
Brachionus plicatilis ALIMENTADO CON UNA MICROALGA Y UNA
CIANOBACTERIA

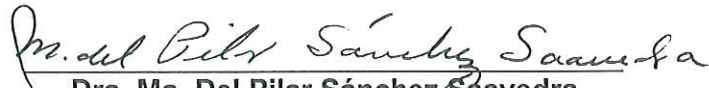
2

TESIS
MAESTRIA EN CIENCIAS

MANUEL ALEJANDRO CAMPA AVILA

ENSENADA BAJA CALIFORNIA OCTUBRE DE 2000

TESIS DEFENDIDA POR
Manuel Alejandro Campa Avila
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ


Dra. Ma. Del Pilar Sánchez Saavedra

Director del Comité


Dr. Benjamín Barón Sevilla

Miembro del Comité


M. en C. Conal David True

Miembro del Comité


Dr. Oscar Sosa Nishizaki

Miembro del Comité


Dr. Benjamín Barón Sevilla

*Jefe del Departamento de
Acuicultura, Biotecnología Marina*


Dr. Luis Alberto Delgado Argote

Director de Estudios de Posgrado

4 de octubre del 2000



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DE ENSENADA.**

DIVISIÓN DE OCEANOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE ACUICULTURA

**EVALUACIÓN DEL EFECTO EN EL VALOR NUTRICIO DEL ROTIFERO
Brachionus plicatilis ALIMENTADO CON UNA MICROALGA Y UNA
CIANOBACTERIA.**

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS

presenta:

MANUEL ALEJANDRO CAMPA AVILA

Ensenada, Baja California, México. Julio del 2002

RESUMEN de Tesis de **MANUEL ALEJANDRO CAMPA AVILA** presentada como requisito parcial para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS** con especialidad en **ACUICULTURA**. Ensenada, Baja California, México, julio del 2002.

“EVALUACION DEL EFECTO EN EL VALOR NUTRICIO DEL ROTIFERO *Brachionus plicatilis* ALIMENTADO CON UNA MICROALGA Y UNA CIANOBACTERIA”.

Resumen aprobado por:


Dra. María del Pilar Sánchez Saavedra
Director de Tesis

Utilizar microalgas con un adecuado valor nutritivo para alimentar organismos es una de las tareas importantes para la acuicultura. Por ello se requiere tener conocimiento de los componentes nutrimentales que aportan las diferentes especies de microalgas utilizadas como alimento. Lo anterior, nos indica lo fundamental que resulta investigar especies alternativas, que normalmente no son utilizadas en la acuicultura. En este estudio se comparó la calidad nutrimental de la cianobacteria *Synechococcus* sp. con aquella de la microalga *Nannochloropsis* sp., al alimentar al rotífero *Brachionus plicatilis*, estableciendo la composición bioquímica resultante del proceso de alimentación en forma individual y una mezcla de ambas especies.

Para calcular la tasa de crecimiento de la microalga y la cianobacteria se llevaron a cabo cultivos estáticos en matraces Erlenmeyer de 125 ml con medio “f/2” de Guillard y Ryther (1962). Para la utilización de las dos especies como alimento, se mantuvieron cultivos semicontinuos en botellones de 18 l con el medio nutritivo antes mencionado. Con base en la tasa de crecimiento evaluada para cada especie, se calculó el porcentaje de dilución. Diariamente se recolectó la biomasa producida para analizar su composición bioquímica en días alternos. Se mantuvieron cultivos del rotífero en bolsas de plástico de 10 l y se alimentaron con la cianobacteria, la microalga y la mezcla de ambas especies. La mayor tasa de crecimiento se registró para *Synechococcus* sp. La composición bioquímica de la microalga y la cianobacteria indicó que existen diferencias en el contenido de proteínas y lípidos. El mayor crecimiento de los rotíferos se presentó cuando se suministró como alimento la mezcla de las dos especies. *Nannochloropsis* sp. presentó un mayor porcentaje en casi todos los aminoácidos con respecto a la cianobacteria. La lisina fue el aminoácido más dominante en *Synechococcus* sp. Las diferencias observadas en la composición del alimento suministrado, probablemente se debió a que entre las especies existen diferencias importantes en la organización celular y en las respuestas fisiológicas. El perfil de aminoácidos analizados en el rotífero, muestra que con los tres tipos de alimentos hay un mayor contenido de glutamato, aspartato,

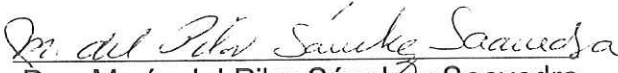
isoleucina y arginina. Mientras que los aminoácidos con porcentajes bajos fueron metionina e histidina. Cuando los rotíferos se alimentaron con *Nannochloropsis* sp., la alanina fue el aminoácido menos abundante. Cuando se alimentaron con la mezcla, la prolina fue el porcentaje mas bajo. Se evaluó una alta correspondencia en la cantidad de ácidos grasos saturados y monoinsaturados para los cultivos de rotíferos alimentados con los tres tipos de alimento. La mayor correlación de los ácidos grasos polinsaturados fue cuando los cultivos de rotíferos se alimentaron con *Synechococcus* sp. Los rotíferos alimentados con *Synechococcus* sp. mostraron la capacidad de elongar y desaturar ácidos grasos.

Palabras clave: *Nannochloropsis* sp., *Synechococcus* sp., *Brachionus plicatilis*, composición bioquímica, perfil de aminoácidos y ácidos grasos.

ABSTRACT of thesis of **MANUEL ALEJANDRO CAMPA AVILA**, presented as a partial requirement to obtain the **MASTER OF SCIENCE** degree with orientation in **AQUACULTURE**. Ensenada, Baja California, México. July del 2002.

"EVALUATION OF THE EFFECT ON THE NUTRITIONAL VALUE OF THE ROTIFER *Brachionus plicatilis* FED WITH A MICROALGA AND A CYANOBACTERIUM ".

Abstract approved by:


Dra. María del Pilar Sánchez Saavedra
Thesis Director

One of the most important tasks in aquaculture is to provide with microalgae of appropriate nutritional value to a great variety of organism in culture.

Thus, it is important to know the nutritional components of the different species of microalgae used as food. Also, it is important to investigate alternative cellular species, which are not used as food and could have nutritional characteristics to made them a new resource of food. In this study, it was compared the nutritional quality of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. and the microalga *Nannochloropsis* sp. on the rotifer *Brachionus plicatilis*. Also it was established the biochemical composition of the cyanobacterium and the microalga used as a monodiet or as a mixed diet.

Small volume cultures were carry out in 125-ml Erlenmeyer flasks containing "f/2" culture medium (Guillard y Ryther, 1962) to determine the growth rate of *Nannochloropsis* sp. and *Synechococcus* sp. The growth rates were used to determine the percentage of dilution. The biomass produced was collected daily to analyze their biochemical composition.

Semi-continuos cultures (18 l) were mantained with the culture medium described above to fed the rotifers. The rotifers were culture in piastic bags (10 l volume) and were fed with both cellular species separately and mixed. The highest growth rate was recorded for *Synechococcus* sp. Significant differences were found in the biochemical composition between *Synechococcus* sp. and *Nannochloropsis* sp., specifically, in proteins and lipids. *Nannochloropsis* sp. had the highest percentages in almost all the aminoacids analyzed. The highest content of aminoacid corresponded to lysine. Also, it was the dominant aminoacid in *Synechococcus* sp. The differencies found in the biochemical composition of the feed, could be due to the different cellular organization and physiological responses of each species.

The highest rotifer growth rate was found for the organisms fed with the mix of both species. The profile of aminoacid found for the rotifers, showed that the three types of feed provided them with a high content of the aminoacids glutamate, aspartate, isoleucine and arginine. The low content of aminoacids for these organisms were methionine and histidine. When the rotifers were fed with *Nannochloropsis* sp., the alanine was the aminoacid found in low concentration.

Also, a high correspondence was found between the quantity of saturated and monounsaturated fatty acids on the rotifers fed with the three types of feed. The highest correlation in the polyunsaturated fatty acids was found when the rotifers were fed with *Synechococcus* sp. The rotifer fed with this species showed to have the capacity to elongate and desaturate fatty acids.

Key Words: *Nannochloropsis* sp., *Synechococcus* sp., *Brachionus plicatilis*, biochemical composition, aminoacids and fatty acid profiles.

DEDICATORIAS :

A mi padres **Alejandro y Guadalupe** por el apoyo incondicional y enseñanzas a lo largo de mi vida

A mis hermanos **Alberto y Marcela** por crecer conmigo y darme momentos inolvidables

A mi novia **Lizza Maria** por ser una persona muy importante en mi vida, gracias por cruzarte en mi camino

A mi primer sobrino, **David**

A **Dios** por darme todo lo que tengo

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ma. Del Pilar Sánchez Saavedra por el gran apoyo que me brindo para la realización de mi tesis de maestría, a sus enseñanzas, consejos, paciencia y darme su amistad.

A los miembros del comité, Dr. Benjamín Barón, Sevilla, M. en C. Conal David True y Dr. Oscar Sosa Nishizaki por sus comentarios, contribuciones y revisiones del manuscrito.

Al Biol. Norberto Flores Acevedo, por su ayuda y aporte de ideas para realizar los experimentos de mi tesis.

Al Dr. Juan Gabriel Correa Reyes, por su participación en los análisis proximales y comentarios para este trabajo.

Al M. en C. Cecilia Flores Vergara, por su amistad y ayuda en los cálculos de ácidos grasos.

A la Dra. Carmen Paniagua Chávez, por su ayuda a la traducción y redacción del resumen.

Al Tec. Francisco Valenzuela, por su ayuda en la realización de los dibujos del sistema experimental utilizado en este estudio.

Al M. en C. Israel Gradilla, por su ayuda en la obtención de fotografías en el microscopio electrónico de barrido.

Al Ing. Roberto Soto, por su ayuda en la realización de un programa en excel para identificar ácidos grasos.

Al Tec. Diego Delgado Alvares, por su ayuda en los análisis proximales, conteos diarios de microalgas y rotíferos.

A mis compañeros de maestría (Lizza, Gisel, Bily, Leonel, Lorena, Gabriel, Raúl, Gustavo, Silvia, Nallely, Paty, Cecilia, Gisela, Ceci, Miriam y Jorge) por los momentos agradables que pasamos.

Al equipo de fútbol CICESE (Mario, Pollo, Jorge A., Roberto, Piky, Jorge N., Mayito, Memo, Omar, Gaynor, lalo, beto, meño, Escoto, chilaca) por todos los partidos que hemos jugado, compañerismos y amistad (hasta altas horas de la noche).

Al Personal administrativos, Julieta Castro, Ivonne Best, Cecilia Loera Quiñónez, por sus ayuda con los trámites de beca, y pagos por honorarios.

Al Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por apoyarme con una beca de maestría durante mis estudios.

Al Centro de Investigaciones Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), por los apoyos económicos en forma de beca recibidos en el proceso de este estudio.

CONTENIDO

Página

RESUMEN

I. INTRODUCCIÓN	1
I.1 Antecedentes	8
I.2 Objetivo	16
I.2.1 Objetivo general	16
I.2.2 Objetivos específicos	16
II. MATERIAL Y METODOS	17
II.1 Obtención de cepas celulares	17
II.2 Sistema de cultivo	17
II.2.1 Tratamiento de agua de mar	17
II.3 Cultivos celulares	19
II.3.1 Cultivos estáticos	19
II.3.2 Cultivos semicontinuos	21
II.4 Cultivo de rotíferos	22
II.5 Obtención de muestras	25
II.6 Medición de la composición bioquímica	26
II.6.1 Análisis de proteínas	26
II.6.2 Análisis de carbohidratos	26
II.6.3 Análisis de lípidos	26
II.6.4 Análisis de pigmentos	26
II.6.5 Medición de peso seco y contenido de cenizas	27
II.6.6 Determinación del perfil de aminoácidos	27
II.6.7 Determinación del perfil de ácidos grasos	27
II.7 Tratamiento estadístico de los resultados	28
III. RESULTADOS	31
III.1 Crecimiento de la microalga y la cianobacteria	31
III.1.1 Cultivo en matraz Erlenmeyer de 125 ml	31
III.1.2 Cultivos semicontinuo en botellón de 18 l	36
III.2 Crecimiento del rotífero <i>Brachionus plicatilis</i>	38
III.3 Composición bioquímica	39
III.3.1 Perfil de aminoácidos	46
III.3.2 Perfil de ácidos grasos	49
IV. DISCUSIÓN	59
V. CONCLUSIÓN	82
VI. RECOMENDACIONES	85

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Imágenes de Microscopia Electrónica de Barrido para <i>Nannochloropsis</i> sp. (A) y <i>Synechococcus</i> sp. (B), cultivada en sistemas semicontinuos con medio de cultivo "f/2" de Guillard y Ryther (1962).	18
2	Sistema experimental para el cultivo de alimentación para el rotífero (<i>Brachionus plicatilis</i>) para el ensayo de alimentación con <i>Nannochloropsis</i> sp. y <i>Synechococcus</i> sp.	24
3	Curva de crecimiento de <i>Nannochloropsis</i> sp. (Nanno) y <i>Synechococcus</i> sp. (Syne) mantenidas en sistemas estáticos en matraz Erlenmeyer de 125 ml con medio de cultivo "f/2" de Guillard y Ryther (1962).	32
4	Cultivos semicontinuos para <i>Nannochloropsis</i> sp. (a) y <i>Synechococcus</i> sp. (b), con una dilución de 30 % día ⁻¹ y 20 % día ⁻¹ respectivamente, cultivada en botellones de 18 l con medio de cultivo "f/2" de Guillard y Ryther (1962).	37
5	Curva de crecimiento promedio y valores de desviación estándar para el rotífero <i>Brachionus plicatilis</i> mantenido en bolsas plásticas de 10 l cosechados cada cinco días y alimentado con <i>Nannochloropsis</i> sp. (a) <i>Synechococcus</i> sp. (b) y una mezcla de las dos especies cultivadas (c).	40
6	Curva de crecimiento promedio y valores de desviación estándar para hembras ovígeras para el rotífero <i>Brachionus plicatilis</i> mantenidas en bolsas plásticas de 10 l cosechados cada cinco días y alimentado con <i>Nannochloropsis</i> sp. (a) <i>Synechococcus</i> sp. (b), y una mezcla de las dos especies (c).	41
7	Valores promedio y desviación estándar de la concentración de proteínas en <i>Nannochloropsis</i> sp. (a) y <i>Synechococcus</i> sp. (b), durante los ensayos de optimización de extracción de proteínas utilizando cinco diferentes concentraciones de NaOH (0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 N) y tres tipos de extracción (15, 30 y 45 min).	42

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
8	Valores promedio expresado en porcentaje de peso orgánico seco de proteínas (Prot), carbohidratos (Carb), lípidos (Lip), peso orgánico seco (POS) y cenizas (Cez) para cultivos semicontinuos de <i>Nannochloropsis</i> sp. (a), <i>Synechococcus</i> sp. (b) y una mezcla de las dos especies cultivadas (c).	43
9	Valores promedio expresado en porcentaje del peso orgánico seco de proteínas (Prot), carbohidratos (Carb), lípidos (Lip), peso orgánico seco (POS) y cenizas (Cez), para <i>Brachionus plicatilis</i> alimentado con <i>Nannochloropsis</i> sp. (a), <i>Synechococcus</i> sp. (b) y una mezcla de las dos especies cultivadas (c).	43
10	Contenido de pigmentos (Pg) clorofila <i>a</i> y carotenoides para <i>Nannochloropsis</i> sp. (a) y <i>Synechococcus</i> sp. (b), mantenidas en cultivos semicontinuos durante cinco diferentes fechas de muestreo (1-5) mantenidas en botellon de 18 l con medio de cultivo "f/2"Guillard y Ryther (1962).	44
11	Porcentaje total de ácidos grasos identificados para <i>Nannochloropsis</i> sp. (a), <i>Synechococcus</i> sp. (b) y una mezcla de ambas (c), mantenidas en cultivos semicontinuos en botellones de 18 l y utilizando medio de Guillard y Ryther (1962).	51
12	Porcentaje total de ácidos grasos para el rotífero <i>Brachionus plicatilis</i> mantenido en bolsas de plástico de 10 l y alimentados con <i>Nannochloropsis</i> sp. (a), <i>Synechococcus</i> sp. (b) y una mezcla de ambas (c).	51
13	Dendograma por agrupación obtenidos para los ácidos grasos saturados en <i>Nannochloropsis</i> sp. (NAN1), <i>Synechococcus</i> sp. (SYN1), la mezcla de ambas (MIX1) y los rotíferos alimentados con la microalga (ROTNAN1), la cianobacteria (ROTSYN1) y la mezcla de las dos especies (ROTMIX1).	56

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
14	Dendograma por agrupación obtenidos para los ácidos grasos monoinsaturados en <i>Nannochloropsis</i> sp. (NAN2), <i>Synechococcus</i> sp. (SYN2), la mezcla de ambas (MIX2) y los rotíferos alimentados con la microalga (ROTNAN2), la cianobacteria (ROTSYN2) y la mezcla de las dos especies (ROTMIX1).	56
15	Dendograma por agrupación obtenidos para los ácidos grasos polinsaturados en <i>Nannochloropsis</i> sp. (NAN3), <i>Synechococcus</i> sp. (SYN3), la mezcla de ambas (MIX3) y los rotíferos alimentados con la microalga (ROTNAN3), la cianobacteria (ROTSYN3) y la mezcla de las dos especies (ROTMIX3).	58

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Valores promedio de la cantidad de biomasa (células $\text{ml}^{-1} \times 10^6$) y parámetros poblacionales promedio para <i>Nannochloropsis</i> sp. cultivada en matraz Erlenmeyer de 125 ml con medio "f/2" de Guillard y Ryther (1962).	33
II	Valores promedio de la cantidad de biomasa (células $\text{ml}^{-1} \times 10^6$) y parámetros poblacionales promedio para <i>Synechococcus</i> sp. cultivada en matraz Erlenmeyer de 125 ml con medio "f/2" de Guillard y Ryther (1962).	35
III	Composición de aminoácidos con base al peso orgánico seco para <i>Nannochloropsis</i> sp. (a), <i>Synechococcus</i> sp. (b), mezcla de ambas especies (c) y el rotífero <i>Brachionus plicatilis</i> alimentado con la especies antes mencionadas.	48
IV	Valor promedio y desviación estandar del porcentaje total de ácidos grasos para el rotífero <i>Brachionus plicatilis</i> suministrando como alimento <i>Nannochloropsis</i> sp. (a), <i>Synechococcus</i> sp. (b), y una mezcla de ambas especies (c).	53

“ EVALUACION DEL EFECTO EN EL VALOR NUTRITIVO DEL ROTIFERO *Brachionus plicatilis* ALIMENTADO CON UNA MICROALGA Y UNA CIANOBACTERIA ”

I. INTRODUCCIÓN

La alimentación de organismos marinos criados en laboratorios se presenta como uno de los principales problemas en la acuicultura. Por lo anterior el desarrollo de cultivos de microalgas ha tenido un gran auge en las últimas décadas (Renaud *et al.*, 1999; Wikfors y Ohno, 2001). Estas células vegetales microscópicas son la base de la cadena trófica en la acuicultura, ya que satisfacen en gran parte los requerimientos alimenticios que necesitan la mayoría de los estadios larvales de algunos adultos de moluscos, crustáceos y peces de importancia económica (Coll-Morales, 1983; Brown *et al.*, 1997; Pedrazzoli *et al.*, 1998).

La utilización de las microalgas como alimento vivo, a pesar de los muchos esfuerzos realizados para obtener suministros alternativos de alimento vivos, aseguran una tasa de crecimiento y sobrevivencia elevadas en comparación a los alimentos balanceados alternos, ingredientes puros o refinados. Además las microalgas aseguran un suministro adecuado en cuanto al número de células, cantidad de proteínas, lípidos, carbohidratos, ácidos grasos, aminoácidos y pigmentos (Coll-Morales, 1983).

El método utilizado en la acuicultura para incrementar el valor nutritivo de varios grupos de zooplancton (rotíferos, copépodos y artemia) consiste en suministrar como alimento especies de microalgas que contienen una variada composición bioquímica (Van Den Hoek *et al.*, 1995; Stappen, 1996; Treece y Davis, 2000; Støttrup, 2000). Otra forma de incrementar el valor nutritivo del zooplancton, es la adición de componentes artificiales puros o refinados, en concentraciones

adecuadas (Rodríguez *et al.*, 1996; Fernández-Reiriz y Labarta, 1996; Brown *et al.*, 1998; Gallardo *et al.*, 2001).

Entre las diversas especies que componen el zooplancton, los rotíferos del género *Brachionus* se han utilizado regularmente como alimento vivo para otros organismos. *Brachionus plicatilis* se cultiva como primer alimento para larvas de peces marinos, ya que tiene un tamaño pequeño, natación lenta, capacidad de mantenerse suspendido en la columna de agua, puede ser cultivado en altas densidades, alto índice reproductivo y puede ser enriquecidos para mejorar su composición proximal. Por estas razones, el cultivo de *B. plicatilis* ha llegado a ser indispensable en la acuicultura (Fulks y Main, 1991). De acuerdo con Barnes (1985), si se acepta a filo Asquelmiatos entonces los rotíferos constituyen la clase rotífera, de otra forma el filo es rotífera. El Phylum Rotífera comprende un grupo de organismos filtro-alimentadores microscópicos (pluricelulares). La mayoría de las especies de este grupo pasan su vida adheridas a un substrato, sin embargo el rotífero marino *Brachionus plicatilis* es una especie planctónica que llega a medir de 125 a 300 μm de longitud cuando es adulto. Su forma de reproducción esta adaptada a las condiciones cambiantes de su habitat. Cuando las condiciones ambientales son óptimas, se reproducen asexualmente, las hembras amíticas producen huevos amíticos (diploide, cromosoma $2n$) los que desarrolla nuevamente en hembras amíticas. Cuando las condiciones son desfavorables se reproducen sexualmente, obteniendo con ello machos pequeños y huevos inactivos. Estos machos tienen aproximadamente un cuarto del tamaño de la hembra; ellos no poseen un tracto digestivo, pero tienen un testículo sobredimensionado que se llena de espermatozoides maduros. La cópula es por impregnación a través de la cloaca por la pared del gonoporo que actúa como pene adhiriéndose a la cutícula de la hembra, obteniendo al final huevos latentes que se convertirán en hembras (Sprent *et al.*, 1972; Coll-Morales, 1983; CENAIM, 2002).

Existen dos morfotipos diferentes del rotífero *Brachionus plicatilis* de acuerdo a la longitud su loriga: el tipo pequeño (S) mide entre 100-210 μm y el tipo grande (L) que mide entre 130-340 μm . Existen también diferencias en el peso, en la forma de las espinas occipitales y en las temperaturas óptimas de crecimiento (el tipo L tolera un intervalo de temperaturas más amplio, mientras el tipo S posee mayor resistencia a temperaturas más altas) (CENAIM, 2002).

Comúnmente el problema a resolver en el cultivo de larvas de peces marinos, es el suministro adecuado de los ácidos grasos polinsaturados (ácido decosahexanoico y eicosapentanoico) indispensable para el crecimiento, desarrollo, sobrevivencia y funcionamiento de muchos procesos fisiológicos. Las larvas de peces marinos no pueden sintetizar éstos ácidos grasos polinsaturados por lo tanto deben ser proveídos en la dieta. En condiciones naturales los rotíferos sintetizan pequeñas cantidades de ácidos grasos polinsaturados. Por lo tanto es necesario realizar un proceso de enriquecimiento de determinados constituyentes bioquímicos de forma natural o artificial para mejorar su valor nutricional (Watanabe *et al.*, 1983; Lubzens *et al.*, 1985; Frolov *et al.*, 1991; Watanabe, 1993).

La composición bioquímica de los rotíferos depende particularmente de su alimento, por lo que se utilizan diferentes técnicas de enriquecimiento para mejorar su composición nutricia (Frolov *et al.*, 1991). Además de utilizar alimento vivo (microalgas), se les puede alimentar, con levadura emulsificada con aceite de hígado de calamar o con compuestos purificados como triglicéridos, etil esterres, fosfolípidos y ceras entre otros (Watanabe, 1987; Rainnuzzo *et al.*, 1994).

Los lípidos del alimento tienen un importante papel en los procesos de producción de energía y como aporte de ácidos grasos. Estos últimos, contienen una larga cadena hidrocarbonada y un grupo terminal carboxilo y tienen cuatro

funciones fisiológicas principales: forman parte de la estructura de los fosfolípidos y los glicolípidos, estas moléculas anfipáticas son componentes importantes de las membranas biológicas; muchas proteínas se modifican por la unión covalente con ácidos grasos, lo que propicia su integración en las membranas celulares; los ácidos grasos son moléculas combustibles, que se almacenan como triacilgliceroles, los cuales son ésteres de glicerol sin carga eléctrica que actúan como depósito de energía metabólica muy concentrada. A los triacilgliceroles también se les llama grasas neutras o triglicéridos; hay derivados de ácidos grasos que actúan como hormonas o mensajeros intracelulares (Stryer, 1995). Además de esas importantes funciones fisiológicas, facilitan el transporte de ciertos nutrientes no grasos, principalmente las vitaminas liposolubles A, D, E y K (Bold y Wynne, 1985).

Otro compuesto sumamente importante en la nutrición de los organismos acuáticos son las proteínas, puesto que intervienen en procesos fisiológicos, como la catálisis enzimática, el transporte de los gases (como es el caso de la hemoglobina), en la contracción muscular (como la miosina y la actina), las funciones de protección o defensa (como es el caso de los anticuerpos), la acción hormonal (como la insulina) y por último como receptora en los mecanismos de virus y hormonas (Ondarza, 1996). Los aminoácidos contienen grupos funcionales amino y carboxilo, en un α -aminoácido, ambos grupos están unidos al mismo átomo α de carbono. Aunque existen aproximadamente 300 aminoácidos en la naturaleza, sólo 20 de ellos son constituyentes de las proteínas de todas las formas de vida, vegetal, animal o microbiana (Martin *et al.*, 1986).

Además del valor nutricional que suministran los lípidos, carbohidatos y proteínas, existen los pigmentos que son sintetizados por los organismos fotosintéticos como las microalgas y que bajo ciertas condiciones ambientales los producen en diferente cantidad y calidad de los pigmentos. Los pigmentos

más importantes en las microalgas son las ficobiliproteínas (ficocianina y ficoeritrina) y una gran variedad de carotenoides. El color de los carotenoides va desde el amarillo al rojo y en la actualidad tienen una amplia aplicación comercial (Brown *et al.*, 1989).

Según Borowitzka (1988), existen alrededor de 400 carotenoides conocidos, muy pocos de los producidos por las microalgas son utilizados comercialmente. Entre éstos se incluyen los β -carotenos, zeaxantina, astaxantina y luteína. Se han encontrado varias aplicaciones industriales para los carotenoides, entre los que destaca dar color al alimento, agregarlos como aditivos para resaltar el color de la carne en los salmónidos y para intensificar el color del huevo (Richmond, 1990). Además los β -carotenos son esenciales para los crustáceos, ya que son utilizados como un precursor de vitamina A. También contribuyen en la nutrición de peces y bivalvos, aunque se han realizado pocas investigaciones al respecto. Las xantofilas que contiene una dieta puede ser incorporadas directamente al exoesqueleto de camarones y langostas, suministrando cambios en su coloración (Brown *et al.*, 1989). Otro pigmento con valor comercial son las clorofilas, todas las microalgas presentan una o más tipos. La clorofila *a* es el pigmento fotosintético primario y es la única clorofila presente en las microalgas verde-azules y rojas. La clorofila *c* puede encontrarse en varias microalgas marinas y diatomeas de agua dulce. La clorofila *d* se encuentra en algunas microalgas rojas. Las clorofilas pueden contribuir con el átomo de magnesio en la nutrición animal (Brown *et al.*, 1989; Richmond, 1990).

Las principales características que se deben tener en cuenta para emplear una microalga como alimento incluyen el tamaño, la movilidad, la tasa de reproducción, el grado de digestibilidad y la composición bioquímica. En años recientes, el contenido de ácidos grasos y aminoácidos esenciales a tomado un especial interés, específicamente en las dietas para alimentar larvas de peces

marinos y ciertos crustáceos (Koven et al., 2001; Ruyter et al., 2000; Floreto et al., 2001).

Entre las diferentes generos y especies de microalgas que se utilizan como alimento natural en la acuicultura, por su contenido bioquímico con alto valor nutricional, se encuentran principalmente: *Nannchloropsis* sp., *Nannochloris* sp., *Chaetoceros gracilis*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica*, *Rhodomonas* sp., *Heterosigma akashiwo*, *Pavlova lutheri*, *Schizochytrium* sp., *Chlorella stigmatophora*, *Isochrysis* sp. y *Spirulina* sp. (Lubzens et al., 1985; Ben-Amotz et al., 1987; Fernández-Reiriz et al., 1989; Ahmad et al., 1991; Rueda-Jasso, 1996; Sukenik et al., 1993a; Barclay y Zeller, 1996).

Las microalgas del género *Nannochloropsis* sp. pertenecen al grupo de las Eustigmatophyceae que se caracterizan por su tamaño muy pequeño (entre 2 a 4 µm), se encuentran en arreglos unicelulares coccoides y la mayoría presentan pirenoides y zoosporas, aunque existen algunas especies que carecen de estas últimas estructuras (Hibberd, 1980). Otros géneros representativos son: *Ellipsoidion acuminatum*, *Polyedriella helvetica*, *Eustigmatos magnus* (*Pleurochloris magna*) , *Pseudocharaciopsis* sp. *Eustigmatos vischeri* y *Nannochloropsis* sp. (Van Den Hoek et al., 1995; Graham, 2000).

Las especies del género *Nannochloropsis* sp. son microalgas marinas representativas del picoplancton, son unicelulares, sin flagelos y con un solo cloroplasto. Se utilizan con gran frecuencia en acuicultura, por que son un excelente alimento, ya que tienen un tamaño adecuado, una alta digestibilidad y un elevado porcentaje de ácidos grasos polinsaturados (Talib et al., 1991; Fulks y Main, 1991; Sukenik et al., 1993b).

Las cianobacterias forman un diverso grupo de procariontes fotosintéticos. El género *Synechococcus* sp. pertenece al grupo de las cyanophytas (algas verde-azul) conocidas también como cianobacterias, se caracterizan por su forma unicelular, colonial y filamentosa, no tiene mitocondrias, núcleo, aparato de golgi ni retículo endoplasmático; los pigmentos fotosintéticos se localizan en los tilacoides (tienen clorofila *a* y carecen de clorofila *b* y *c*). Se reproducen en forma asexual. Las cyanophyceas se encuentran en diversos hábitats, tanto en agua dulce como en el mar, sobre tierra húmeda y en lugares extremos e inhóspitos como glaciares y desiertos. Aunque la mayoría vive en agua dulce (Van Den Hoek *et al.*, 1995).

Las cianobacterias tienen un papel preponderante en aplicaciones biotecnológicas, por ejemplo en la producción de biofertilizantes, en el tratamiento de aguas contaminadas y como alimento en la producción acuícola. Uno de los géneros más representativos es *Spirulina* que además de su gran potencial en el tratamiento terciario de efluentes, posee un alto contenido de proteínas, vitaminas y ácidos grasos polinsaturados (Patternos, 1996).

A pesar de que existen amplios antecedentes del uso de distintas especies de microalgas como alimento de rotíferos, larvas de peces, crustáceos y moluscos (Hirayama *et al.*, 1979; Volkman *et al.*, 1989; Sukenik *et al.*, 1993b; Rueda-Jasso, 1996; Brown *et al.*, 1997), se ha encontrado que el valor nutricional depende de las condiciones particulares del cultivo para las microalgas.

Las modificaciones en el valor nutrimental de las microalgas cultivadas dependen de la técnica de cultivo, de las condiciones ambientales utilizadas para la producción (temperatura, salinidad) medio de cultivo utilizado y del tipo y de la cantidad de luz suministrada. Usualmente, los cultivos de microalgas se mantienen a temperaturas que fluctúan entre los 17 a 25 °C (Stein, 1973). Lo anterior es un factor que resulta determinante para la utilización y selección de

las especies de microalgas que puedan ser utilizadas como alimento para rotíferos, ya que estos últimos también deben de poder crecer y reproducirse a la temperatura en que se mantenga a las larvas del pez o bien del organismo por el cual serán consumidas.

Los antecedentes de la utilización de microalgas como alimento para diversas especies de zooplancton y moluscos, indican que al suministrar dietas monoespecíficas se obtienen menores tasas de crecimiento, en comparación con organismos que se alimentan en forma mixta, con dos o tres especies de microalgas (Richmond, 1986; Borowitzka, 1988). Lo anterior es debido a usualmente al tener una dieta de microalgas mixta, tendrá una composición bioquímica mas variada por lo que mejorará la tasa de crecimiento y sobrevivencia de quien la consuma como alimento.

I. 1 Antecedentes

En el área de la acuicultura al utilizar microalgas como alimento vivo, se debe considerar además de la cantidad de células suministradas, el valor nutricional que tendrán y el grado de digestibilidad. En las últimas cuatro décadas se ha tomado en consideración el estudio del valor bioquímico que suministra el alimento vivo y su relación con cambios en las variables ambientales relacionadas. Por ejemplo, los ácidos grasos como el ácido eicosapentanoico (EPA) y docosahexanoico (DHA), tienen un papel primordial en los primeros estadíos larvales de peces marinos, crustáceos y moluscos (Gardner y Riley, 1972; Watanabe, 1993; Pedrazzoli *et al.*, 1998). Ya que dan estabilidad a las células por la mejor conformación de la pared de la membrana, lo que le proporciona a la larva capacidad de adaptación a diferentes ambientes. Usualmente para transferir estos compuestos nutritivos esenciales a los organismos cultivados, se utilizan invertebrados pertenecientes al zooplancton como intermediario.

La composición bioquímica de varios grupos de microalgas como las Cryptophytceas, Prasinophyceas, Prymnesiophyceas, Chlorophyceas Eustigmatophyceas, Rhodophyceas y Diatomeas ha sido ampliamente estudiadas para su uso en acuicultura, ya que la mayoría contienen altos porcentajes de proteínas con excepción de las diatomeas. Sin embargo, los carbohidratos y lípidos en estos grupos se presentan en menor cantidad, aunque de forma variable dependiendo de cada especie y los parámetros ambientales utilizados (Renaud *et al.*, 1999). Además, según Brown *et al.*, (1997) algunos grupos como: Eustigmatophyceas, Prymnesiophyceas, Rhodophyceas y Bacillariophyceas contienen cantidades considerables de ácidos grasos esenciales como los polinsaturados (20:5n-3, 22:6n-3 y 20:4n-6).

Las Eustigmatophyceas *Nannochloropsis oculata*, *Nannochloropsis salina*, *Nannochloropsis gaditana* y *Nannochloropsis* sp. al ser cultivadas en medio "f/2" de Guillard y Ryther (1962), un pH de 7.5, salinidad de 35 ‰, una temperatura de 20 °C e iluminación continua (15 W m⁻²) con lámparas fluorescentes de luz de día. Presentaron valores de lípidos entre 10.3 a 16.1 %. El contenido de ácidos grasos totales fue expresado de la siguiente manera: El total de ácidos grasos saturados se encontró entre 25.84 a 40.8 % del total de los ácidos grasos con bajas cantidades en *Nannochloropsis gaditana*. El total de ácidos monoinsaturados fue variable entre las especies con valores de entre un 33 a 46 %. El contenido total de ácidos grasos polinsaturados fue en promedio en 17.9 para *Nannochloropsis* sp. y de 28.3 % para *Nannochloropsis oculata* (Mourente *et al.*, 1990). Otros autores como Sukenik *et al.*, (1993a) y Brown *et al.*, (1997) describen altos porcentajes del ácido docosahexanoico (20:5n-3) para la especie *Nannochloropsis* sp.

Para la cianobacteria *Synechococcus* sp. existen pocas investigaciones que describan el perfil bioquímico de esta especie. Aunque hay varios autores que

mencionan la importancia ecológica de esta cianobacteria, ya que representa uno de los principales productores primarios en los océanos del mundo (Waterbury *et al.*, 1986). Entre los estudios del perfil bioquímico en cianobacterias se encuentra la realizada por Kenyon (1972), donde describió la composición de ácidos grasos de treinta cuatro cepas de cianobacterias unicelulares del género *Synechococcus*, *Aphanocapsa*, *Gloeocapsa*, *Microcystis* y *Chlorogloea* (cada una de las cepas se dividieron por número de grupo con respecto al fenotipo y composición de ADN). En forma general se menciona para los géneros *Gloeocapsa*, *Chlorogloea*, un grupo de *Synechococcus* y *Aphanocapsa* mayores cantidades de ácidos grasos monoinsaturados y bajos contenidos de polinsaturados. Mientras que *Microcystis*, otro grupo de *Synechococcus* y *Aphanocapsa* contenían altos valores de ácidos grasos polinsaturados de la familia linoléico y linolénico.

Debido a que al utilizar como alimento al rotífero *Brachionus plicatilis* es necesario considerar el valor nutricional que tendrá y si en su caso resulta necesario realizar enriquecimiento de la composición bioquímica. En la literatura relacionada con este tema se menciona que el enriquecimiento de la calidad nutritiva, puede realizarse por medio de la utilización de diversas especies de microalgas y el uso de emulsiones con diferente calidad bioquímica. Lo anterior tiene gran importancia cuando se utilizan cultivos de zooplancton como alimento, principalmente para organismos que no pueden sintetizar cierto tipo de compuestos. e.g. larvas de peces marinos (Rueda-Jasso, 1996; Gallardo *et al.*, 2001; CENAIM, 2002).

Entre las microalgas utilizadas para mejorar la condición nutricional del rotífero *Brachionus plicatilis* se encuentran *Chaetoceros gracilis*, *Chlorella stigmatophora*, *Isochrysis galbana*, *Nannochloropsis salina*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Nannochloris* sp., *Nannochloropsis* sp. y *Chlorella* sp. Encontrando que *Chlorella* sp., y *Chaetoceros gracilis* resultan los mejores alimentos en base a su

composición proximal, principalmente de lípidos, proteínas y carbohidratos. Ya que se observó una alta transferencia de estos compuestos hacia el rotífero (Ben-Amotz *et al.*, 1987 y Rueda-Jasso, 1996). Otras microalgas como *Phaeodactylum tricornutum*, *Pavlova lutheri*, *Nephrochloris salina* también son utilizadas dado su buen aporte nutricional resultante en el rotífero. En éstos ensayos se registró una buena correlación en cuanto el contenido de proteína en las microalgas y la del rotífero alimentado con las mismas ($r = 0.78$). Sin embargo, los lípidos y carbohidratos en rotíferos fueron variables con respecto a las especies de microalgas utilizadas (Frolov *et al.*, 1991).

El perfil de ácidos grasos en los rotíferos (*Brachionus plicatilis*) enriquecidos con microalgas puede ser relativo, dependiendo de la composición misma de cada especie en ácidos grasos y la repuesta fisiológica, resultante de diversos parámetros ambientales donde se cultivan las células (Sukeník *et al.*, 1993a).

La composición de ácidos grasos en el rotífero (*Brachionus plicatilis*) alimentado con tres microalgas (*Nephrochloris salina*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Pavlova lutheri*). Presentó un alto grado de correlación ($r = 0.73$) entre el contenido total de ácidos grasos polinsaturados en el rotífero y su alimento. *Nephrochloris Salina* presentó alto contenido (50.21 %) de ácidos grasos polinsaturados, donde los ácidos grasos 20:5n-3 contenían 23.67 %, 22:5n-3 con 10.48 % y 22:6n-3 con 4.02 %, resultando bajas cantidades de ácidos grasos saturados. Las microalgas *M. lutheri* y *P. tricornutum* presentaron un contenido de ácidos grasos similar, mientras que las diferencias evaluadas fueron para los ácidos grasos polinsaturados eicosapentanoico (20:5n-3) y araquidónico (20:4n-6). En *P. tricornutum* las concentraciones fueron 17.59 % y 5.69 %, mientras que *M. lutheri* presentó 19.96 % y 4.46 %, respectivamente (Frolov *et al.*, 1991).

En otro estudio utilizando diferentes microalgas marinas (*Chaetoceros gracilis*, *Chlorella stigmatophora*, *Isochrysis galbana*, *Nannochloropsis salina*,

Phaeodactylum tricornutum), una levadura (*Saccharomyces cerevisiae*). Calcularon la composición proximal y el contenido de ácidos grasos en distintas especies de microalgas marinas y evaluaron su valor nutrimental para el rotífero (*B. plicatilis*). Observaron que la mayoría de las microalgas contenían aproximadamente 30% de proteínas, 25 % de carbohidratos, 21 % de lípidos y una elevada fracción desconocida. *Chaetoceros gracilis* fue la especie que presentó una alta transferencia de la composición proximal de la microalga hacia el rotífero *B. plicatilis*. En cuanto los ácidos grasos, *Nannochloropsis salina* y *Phaeodactylum tricornutum* presentaron elevadas cantidades de EPA (20:5n-3). Mientras los rotíferos alimentados con estas dos especies resultaron con alto porcentaje de ácidos grasos insaturados (Ben-Amotz *et al.*, 1987).

En un estudio en donde al rotífero *B. plicatilis* se le adicionó como alimento la microalga *Pavlova lutheri* en diferentes horas (3, 6, 12, 24 y 48 h) y levadura de cerveza durante 15 días previos al inicio del experimento. Los rotíferos alimentados con levadura de cerveza, presentaron pequeñas cantidades de ácidos grasos polinsaturados (20:5:n-3 y 18:3n-6). El ácido docosahexaenoico (DHA) no fue detectado. La composición de ácidos grasos en los rotíferos alimentados con *P. lutheri* incrementa con respecto al tiempo, registrando las máximas concentraciones de 20:5n-3 (ácidos eicosapentanoico) y 22:3n-3 (DHA) en 48 h (Nichol *et al.*, 1989).

En otro estudio se describe el contenido de aminoácidos totales y libres en el zooplankton de agua dulce, colectado de estanques durante periodos de mayor presencia. Entre las diferentes especies identificadas se encontraron rotíferos del género *Brachionus* sp., copépodos (*Eudiaptomus zachariasii*), grupos de *Daphnia pulex*, *Ceriodaphnia* sp. y copepoditos (*Cyclops strenuus*). También se determinó el contenido de aminoácidos en nauplios de *Artemia salina* durante la incubación y el periodo de inanición. Los resultados indicaron que los aminoácidos totales cuantificados con base al peso seco en el rotífero

Brachionus sp. fueron los porcentajes más altos con 66.0 %, seguido por *Cyclops strenuus* con 60.9 %, *Eudiaptomus zachariasii* con 60.3 %, *Ceriodaphnia* sp con 57.1 % y *Daphnia pulex* con 53.6 %. Mientras que los aminoácidos libres como arginina, histidina, alanina, glutamato y lisina fueron abundantes en todos los organismos analizados. Estableciendo que el mayor contenido de estos aminoácidos fue mayor en *Cyclops strenuus*, seguido por *Eudiaptomus zachariasii* y los bajos porcentajes en los rotíferos. La proporción de la mayoría de ácidos libres con respecto al total de aminoácidos disminuye al incrementar el tamaño de *Ceriodaphnia* sp. y *Daphnia pulex*. Los nauplios de *Artemia* en el periodo de inanición presentaron contenidos de aminoácidos libres más bajos con respecto al zooplancton de agua dulce. Los mayores cantidades de aminoácidos fueron prolina, alanina, glicina y serina (Dabrowski y Rusiecki, 1983).

Existen pocos estudios en donde se mencione el efecto del suministro de una dieta mixta para especies de zooplancton en cultivo. Snell *et al.* (1983) describen la tasa de reproducción del rotífero *Brachionus plicatilis* cuando fue alimentado con dos microalgas (*Chlorella* sp. y *Dunaliella tertiolecta*) y una cianobacteria verde-azul (*Schizothrix calcicola*) en forma individual y mixta. Encontraron que la mayor tasa de reproducción del rotífero se registró con la alimentación mixta *Schizothrix calcicola* y *Chlorella* sp, mejorando hasta un 156 % comparado con la obtenida para *Chlorella* sp. proporcionada en forma individual. Sin embargo, la mezcla de *Chlorella* sp. y *Dunaliella tertiolecta* no mejoró la tasa de reproducción comparativamente a la obtenida para *Chlorella* sp. en forma individual.

Entre los estudios de nutrición para especies de zooplancton se encuentra un trabajo que calcula el crecimiento de *Daphnia galeata* que es un crustáceo de agua dulce, al que se suministró como alimento dos especies de cianobacterias, *Synechococcus elongatus* y *Scenedesmus obliquus*. La primer cianobacteria fue suministrada de forma individual y mixta. La mezcla consistía en adicionar al

suplemento de *Synechococcus elongatus* pequeñas perlas o granos de albúmina de suero vacuno con o sin ácidos grasos polinsaturados, ya que esta especie carece de estos compuestos. Se menciona que los organismos alimentados con *Synechococcus elongatus* presentaban una tasa de crecimiento baja e inclusive con la cianobacteria adicionada con las perlas con ácidos grasos. Mientras los organismos alimentados con *Scenedesmus obliquus* en forma individual mejoraron el crecimiento de *Daphnia galeata*. Estos autores concluyen que el aporte de lípidos de *Scenedesmus obliquus* mejora el crecimiento de *Daphnia galeata*, entonces el bajo crecimiento en estos crustáceos no se debió a la baja calidad nutricional de *Synechococcus elongatus*, sino al suministro de otro tipo de lípidos de los cuales carece la cianobacteria (Von Elert y Wolffrom, 2001).

Otro estudio calcula el crecimiento y pastoreo de tres protozoarios bacteriófagos (*Scuticociliate*, *Hymenostome ciliate* y *Paraphysomonas* sp.) mantenidos bajo un proceso de alimentación con tres cepas de cianobacterias (*Synechococcus* WH8101, *Synechococcus* WH8012, *Synechococcus* WH7803, dos especies de bacterias heterotróficas (*Pseudomonas halodurans* y *Serratia marnorubra*) y una combinación de cianobacterias y bacterias. Como resultado de este trabajo se observó que las dos bacterias proveen rápidos crecimientos y máximas densidades a los tres tipos de protozoarios con respecto a las tres cepas de cianobacterias. Cuando se suministraron las mezclas de la bacteria *Pseudomonas halodurans* combinadas con las tres cianobacterias, no se presentaron diferencias en el crecimiento de los protozoarios alimentados únicamente con la bacteria. De acuerdo a los antecedentes de la tasa de ingestión de los protistas nanoplanctónicos y al contenido de carbono de las cianobacterias y bacterias heterotróficas; estos autores mencionan que las cianobacterias alcanzan el 30 % del total de los procariotes consumidos por nanoplancton en las costas donde se presentan estas cianobacterias. Por lo tanto la producción de biomasa de las cianobacterias utilizadas como alimento

proveen un importante aporte de carbono a los protozoarios planctónicos (Caron *et al.*, 1991)

Entre las investigaciones que mencionan el enriquecen del rotífero *B. plicatilis* con diferentes emulsiones se encuentra la realizada por Rainuzzo *et al.*, (1994), en el cual estudiaron el efecto de enriquecimiento de lípidos y ácidos grasos para el rotífero *Brachionus plicatilis* utilizando cuatro emulsiones lipídicas. Los tratamientos A y B consistían en una preparación formulada con diferentes raciones de los ácidos eicosapentanoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA), las otras emulsiones fueron extraídas de la huevo del lenguado del Atlántico (HR) (*Hippoglossus hippoglossus*) y copépodos en estadios adultos (CO) *Calanus finmarchicus*. Como resultados observaron que las emulsiones A, B y CO presentaron alto contenido de lípidos (>55%), mientras la emulsión HR presentó bajos niveles (<20 %). El contenido de ácidos grasos insaturados n-3 (HUFA) de todas las emulsiones fue diferente. Por ejemplo las emulsiones A y B presentaron altos niveles de HUFA (68.3 y 81.8% respectivamente) y bajas cantidades en los tratamientos HR y CO (48.4 y 34% respectivamente). Equivalentes porciones de DHA/EPA se encontraron para las emulsiones A y CO (1.3 y 1.4 respectivamente), aunque el contenido de ambos ácidos grasos fue diferente, mientras la emulsión HR se presentó con alta raciones de DHA/EPA (4.0).

Otro estudio relacionado con el enriquecimiento del valor nutricional de rotíferos, es realizado por Pousão-Ferreira *et al.*, (1997), en donde menciona el enriquecimiento al rotífero *B. plicatilis* y *Artemia* sp. suministrando como alimento cuatro emulsiones comerciales (Algal Rotífero®, Frippak®, Booster y Selco® y Artemia Systems®) y una microalga (*Chlorella* sp.). Encontraron que los rotíferos alimentados con las diferentes emulsiones y la microalga mostraron un incremento en el porcentaje de ácidos grasos de la serie linolénica, con respecto a los tratamientos mantenidos como controles no enriquecidos y alimentados

con levadura. El total de ácidos grasos polinsaturados para los rotíferos mantenidos como control fue de 3.3 % y varió entre 8.4 y 15.8 % con los diferentes enriquecimientos. Mientras que los cultivos de *Artemia* enriquecida con las diferentes emulsiones comerciales, presentaron altos niveles de EPA y DHA, con respecto a cuando se utilizó como alimento la microalga *Chlorella* sp.

I.2 Objetivos

I.2.1 Objetivo general

Evaluar la composición bioquímica, específicamente el perfil de ácidos grasos y aminoácidos en el rotífero *Brachionus plicatilis* alimentado con *Nannochloropsis* sp. y *Synechococcus* sp.

I.2.2 Objetivos específicos

Evaluar la tasa de crecimiento poblacional de *Nannochloropsis* sp. y *Synechococcus* sp. en cultivos estáticos.

Calcular la tasa de dilución adecuada para mantener cultivos semicontinuos de *Nannochloropsis* sp. y *Synechococcus* sp.

Conocer el valor alimenticio de *Nannochloropsis* sp. y *Synechococcus* sp. en forma individual y realizando una mezcla de las dos especies.

Describir la curva de crecimiento poblacional para cultivos del rotífero *Brachionus plicatilis*, alimentado con *Nannochloropsis* sp. y *Synechococcus* sp.

Conocer la composición bioquímica de *Brachionus plicatilis* alimentado con *Nannochloropsis* sp., *Synechococcus* sp. y una mezcla de ambas especies al ser utilizadas como alimento.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1 Obtención de las cepas celulares

La especie planctónica *Nannochloropsis* sp. con clave NN-X-1 se obtuvo de la colección de microalgas del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). Los cultivos de *Nannochloropsis* sp. se mantuvieron en diluciones seriadas en tubos de cultivo con 15 ml de medio "f" de Guillard y Ryther (1962), dentro de una cámara climática a 13 ± 2 °C y con iluminación continua proveída por lámparas fluorescentes de 40 W de luz blanca fría con una intensidad de $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Esta especie consiste de células esféricas aisladas con un diámetro de 1.5 a $2.7 \mu\text{m}$ (Trujillo-Valle, 1993) (Fig.1).

La cianobacteria *Synechococcus* sp. se obtuvo de una cepa aislada por la técnica de dilución seriada por Aguilar-May (2002) en el laboratorio de Biología y Cultivo de Microalgas del CICESE. Esta especie fue seleccionada por su abundancia, en muestreos realizados en efluentes de una granja de cultivo de camarón ubicado en "Lomas de Paz" en San Blas, Nayarit. Los cultivos se mantuvieron en similares condiciones a las descritas para *Nannochloropsis* sp. Esta especie se caracteriza por sus células aisladas o por formar estreptococos de hasta 8 células, dependiendo de la edad y condiciones de cultivo. Las células individuales son esféricas con un diámetro de $1 \mu\text{m}$ aproximadamente (Aguilar-May, 2002) (Fig. 1).

II.2. Sistemas de cultivo

II.2.1. Tratamiento del agua de mar

Para llevar acabo los cultivos se utilizó agua de mar filtrada con un filtro rápido de arena de $40 \mu\text{m}$ y cartuchos de 20, 10 y $5 \mu\text{m}$. Posteriormente se desinfectó p con luz ultravioleta (módulo de 6 lámparas de 40 W). Para los cultivos mantenidos en botellón de 18 l, el agua de mar fue desinfectada utilizando la técnica descrita por Hemerick (1973), la cual consiste en la adición de hipoclorito

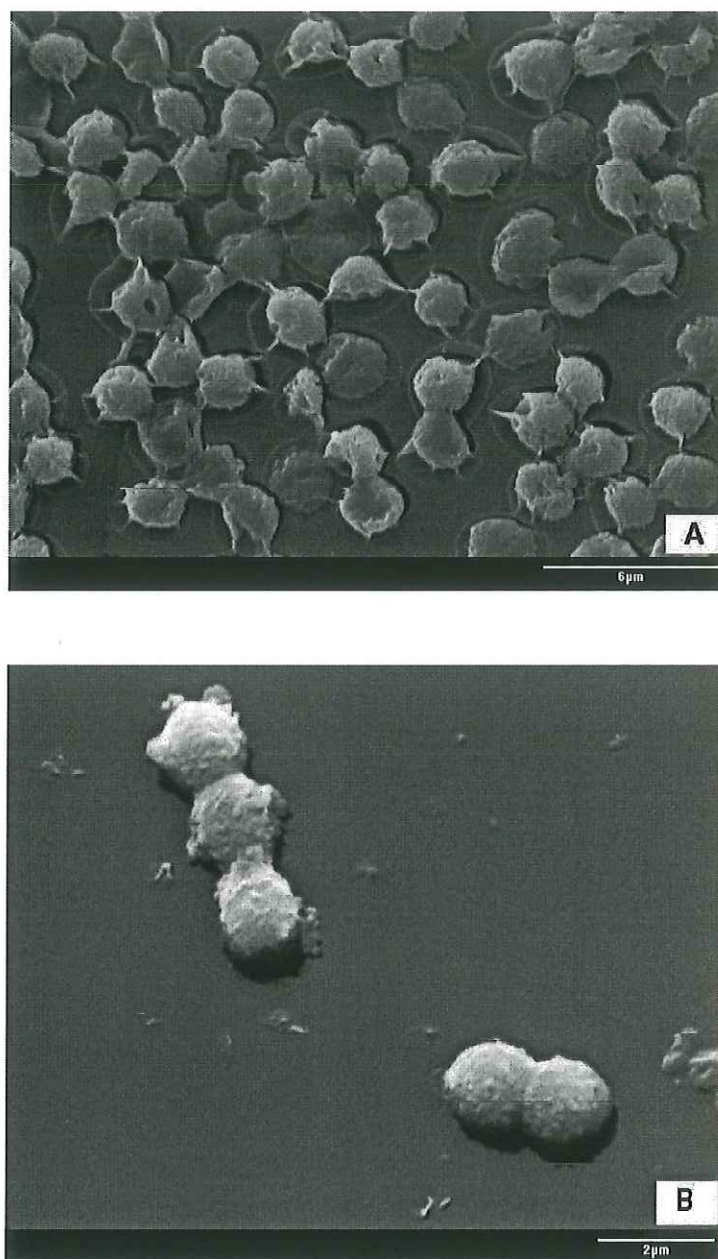


Figura 1. Imágenes de Microscopia Electrónica de Barrido para *Nannochloropsis* sp. (A) y *Synechococcus* sp. (B), cultivada en sistemas semicontinuos con medio de cultivo "f/2" de Guillard y Ryther (1962).

de sodio comercial al 6 % al agua de mar (3 ml l^{-1} de agua), dejando actuar el cloro por 24 horas y posteriormente neutralizándolo con tiosulfato de sodio (0.15 g l^{-1} de agua) y aireación profusa.

II.3 Cultivos celulares

Los cultivos celulares se mantuvieron a una temperatura promedio de 25°C , una intensidad de luz continua de $116 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ suministrada con lámparas de 40 W de luz blanca fría, midiendo diariamente el pH para cada caso, con un potenciómetro marca Corning Scientific Instruments®.

Para todos los experimentos realizados, se utilizó el medio "f/2" de Guillard y Ryther (1962). El medio de cultivo utilizado en matraz Erlenmeyer y Fernbach fue esterilizado en una autoclave, a 121°C de temperatura y 1.05 kg cm^{-2} de presión por un periodo de quince minutos.

Se evaluó el incremento de la cantidad de biomasa producida, registrando para cada situación experimental la densidad óptica (D.O.), por medio de un espectrofotómetro marca Hach DR/2000®, a una longitud de onda de 550 nm para evitar los picos de absorción de las clorofilas.

II. 3.1 Cultivos estáticos

Para evaluar el crecimiento de cada una de las dos especies, se mantuvieron cultivos monoespecíficos y no axénicos, cada uno por triplicado en matraces Erlenmeyer de 250 ml, con 150 ml de medio.

Diariamente se evaluó el incremento del número de células por cuantificación directa al microscopio con una cámara de Neubauer o hematocitómetro (0.1 mm de profundidad) marca Marienfeld®. Para cada especie se determinaron los parámetros poblacionales utilizando las siguientes ecuaciones:

$$a) \mu = \frac{\text{Log}_2(N_2) - \text{Log}_2(N_1)}{t_2 - t_1} \text{ (Sorokin, 1973)}$$

donde:

μ = Tasa de crecimiento específico

N_2 = Número de células en el tiempo t_2

N_1 = Número de células al tiempo t_1

$$b) D = \frac{\mu}{\text{Ln}2} = \frac{\mu}{0.693}$$

Donde:

D = Número de divisiones por día

μ = Tasa de crecimiento específico

$$c) TD = \frac{1}{D}$$

Donde:

TD = Tiempo de duplicación

D = Número de divisiones por día

$$d) PD = N_1 - N_2$$

PD = Diferencia del número de células producidas entre el tiempo 1 y el tiempo 2 (días).

Para el cálculo de la tasa de crecimiento se utilizó la transformación del número de células a Log con base dos, debido a que la forma dominante de reproducción de las células en cultivo es por división binaria (Fogg y Thake, 1987).

Con registros diarios de la densidad óptica y los valores de los conteos celulares obtenidos en un hematocitómetro se realizó una curva de calibración entre los dos métodos de evaluación de la cantidad de biomasa producida en los cultivos estáticos. Para obtener la ecuación que permitiera comparar los valores de biomasa producida y evaluada por ambos métodos, para cada especie se realizó un análisis de regresión lineal simple (Zar, 1984)

II.3.2 Cultivos semicontinuos

Para reunir la biomasa necesaria de las dos especies para realizar los análisis proximales y bioquímicos y para cultivar a los rotíferos se realizaron cultivos semicontinuos no axénicos.

Se siguió la secuencia clásica de transferir los cultivos a volúmenes progresivamente mayores, desde matraz Erlenmeyer de 250 ml, a matraz Fernbach de 2.8 l y botellón de 18 l de capacidad. Los cultivos se realizaron por triplicado para cada cepa, en garrafones de vidrio azul utilizados para el agua potable, con 15 l de medio de cultivo. Para cada especie se calculó la tasa de dilución teórica (Droop, 1975 y Řičica, 1966), tomando en consideración la tasa de crecimiento específica (μ) obtenida para cada especie en los cultivos estáticos, de acuerdo con la siguiente expresión:

$$a) \text{ FD} = \left[\mu - \frac{1}{t} \left(\ln \frac{N_2}{N_1} \right) \right]$$

FD = Factor de dilución

μ = Tasa de crecimiento

N_2 = Número de células al tiempo 2

N_1 = Número de células al tiempo 1

t = Intervalo de tiempo (días, horas)

Diariamente se evaluó la cantidad de células producidas mediante la cuantificación directa al microscopio. Cuando se alcanzó la fase exponencial de crecimiento en cada situación experimental, se inicio la dilución diaria de acuerdo al porcentaje de dilución teórico calculado para cada caso.

La constancia de la concentración de células fue controlada diariamente durante todo el experimento, midiendo la D.O. antes y después de realizar la dilución de los cultivos. En días alternos se evaluó la cantidad de biomasa por conteos directos.

II.4 Cultivo de rotíferos

El rotífero *Brachionus plicatilis* tipo L fue obtenido de una cepa donada por el Laboratorio de Acuicultura de la Universidad Autónoma Baja California (UABC).

Con el objeto de acondicionar a los rotíferos a las condiciones experimentales dentro del Laboratorio Húmedo del Departamento de Acuicultura, durante dos semanas. Los cultivos se mantuvieron en bolsas de plástico con capacidad de 10 l (65 cm de largo x 35 cm de ancho) y fueron suspendidas por medio de un sistema de abrazaderas planas y tornillos ajustables (Fig. 2). Los organismos fueron mantenidos a una densidad promedio de 150 rotíferos ml^{-1} , con aireación continua, salinidad de $35 \pm 0.5 \text{ ‰}$, una intensidad de luz de $166 \mu\text{E m}^{-2}\text{sec}^{-1}$, pH de 7.5 a 8.0 ajustado diariamente con la adición de NaOH al 0.1 N y HCl concentrado, según fuese el caso. Para mantener la temperatura a $25 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$, la estructura de hierro se cubrió con plástico negro.

Con el propósito de evitar cualquier interferencia debida al alimento previamente suministrado. Los cultivos de rotíferos fueron acondicionados al tipo de alimentación "*al libitum*" que recibirían en forma individual o mixta durante dos

semanas. El alimento se suministró adicionando las bolsa de cultivo la microalga *Nannochloropsis* sp., la cianobacteria *Synechococcus* sp. y la mezcla de estas especies en raciones de 1.75 mg de peso seco orgánico rot^{-1} .

La ración de alimento se suministró una vez por día, normalizada de acuerdo al peso seco de la microalga y la cianobacteria, debido a la diferencia en el tamaño de las dos especies. La mezcla de las dos especies de microalgas se realizó considerando una proporción de 50 % por cada tipo de alimento, tomando en consideración el peso seco promedio obtenido para los cultivos semicontinuos.

Cada tratamiento, se realizó por triplicado en bolsas de plástico. La densidad inicial de rotíferos para cada tratamiento fue de 100 rotíferos ml^{-1} (Fig. 2), en un volumen de dos litros de agua de mar.

El experimento duró 20 días. Cada 5 días se recolecto una muestra de la cosecha de los rotíferos, según lo recomiendan algunos autores para sistemas semicontinuos (Lubzens, 1987; Murayama y Hirayama, 1993). Debido a que el periodo de vida que presentan estos organismos es muy corto, entre 3 a 5 días (según Barnes, 1985; CENAIM, 2002).

Para evaluar el crecimiento poblacional de los rotíferos en cada condición experimental, diariamente se realizaron conteos del número de individuos por mililitro en un microscopio estereoscópico marca Estereo Zoo 4, colocando los rotíferos en portaobjetos excavados de vidrio de 8.5 x 10 cm, con nueve perforaciones con capacidad de un mililitro cada una.

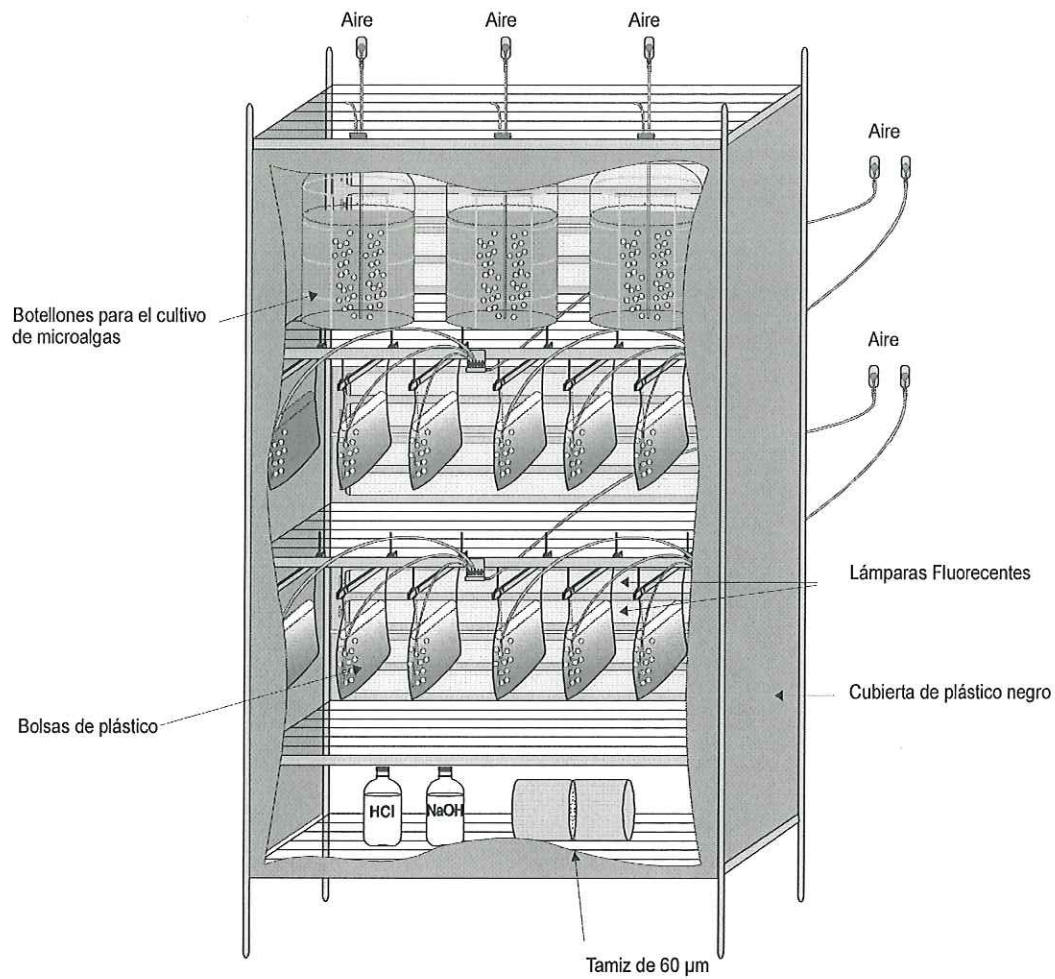


Figura 2. Sistema experimental para el cultivo de alimentación para el rotífero (*Brachionus plicatilis*) con *Nannochloropsis* sp. y *Synechococcus* sp.

II.5 Obtención de muestras

Cuando los cultivos semicontinuos para *Nannochloropsis* sp. y *Synechococcus* sp. se encontraron en la fase de estabilidad (botellón de 18 l), se colectaron 2 l de cultivo en días alternos para cada caso. Del volumen colectado, se tomaron submuestras de 15 ml, que fueron concentradas en filtros de fibra de vidrio Whatman "GF/C" de 2.5 cm de diámetro. Los filtros fueron previamente lavados con agua destilada e incinerados a 470° C por 8 horas, en una mufla marca Lindberger-Blue M, modelo 828. De la misma manera se procedió para el bioensayo en donde se suministró una mezcla de las dos especies. Después del filtrado, las muestras se congelaron a -20° C (Cordero-Esquivel *et al.*, 1993), y se almacenaron hasta obtener el total de las muestras en los experimentos para realizar los análisis bioquímicos respectivos.

La cosecha de rotíferos se llevó acabo cada 5 días con una red con luz de malla de 60 µm. El número de bolsas cosechadas fue de 5 para cada repetición experimental y tipo de alimentación suministrada. La biomasa total de rotíferos colectados fue mantenida en un congelador marca Kenmore a -20°C y deshidratada en un liofilizador marca Labconco Lyph-Lock 6 Liter Freeze Dry System®, para posteriormente analizar el perfil bioquímico.

Previo a realizar el análisis de la composición bioquímica, se realizaron para cada caso curvas de calibración, siguiendo las especificaciones definidas para las técnicas colorimétricas y utilizando un espectrofotómetro marca Shimadzu (modelo UV-1201).

II.6 Medición de la composición bioquímica

Se evaluó el contenido de proteínas, carbohidratos, lípidos, pigmentos, ácidos grasos y aminoácidos. Para las distintas condiciones experimentales de los cultivos de la microalga, cianobacteria y rotífero.

II.6.1 Análisis de proteínas

Para la cuantificación de las proteínas de las dos especies, se realizó un análisis preliminar para conocer las condiciones adecuadas para una mejor extracción, se consideró la concentración NaOH a utilizar y el tiempo de extracción. Se utilizaron cinco concentraciones de NaOH (0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 N) y tres tiempos de extracción (15, 30 y 45 min). En los rotíferos se utilizó NaOH al 1N con 30 min a baño maria (100 °C). Se utilizó el reactivo Folin-Ciocalteu para extraer las proteínas y se cuantificaron por el método de Lowry *et al.* (1951).

II.6.2 Análisis de carbohidratos

Los carbohidratos fueron extraídos con ácido sulfúrico según el método de Whyte (1987) y cuantificados de acuerdo con la metodología de Dubois *et al.* (1956).

II.6.3 Análisis de lípidos

Los lípidos fueron extraídos utilizando una mezcla de metanol-cloroformo-agua, según Bligh y Dyer (1959) y se medieron utilizando el método de Pande *et al.* (1963).

II.6.4 Análisis de pigmentos

La extracción de las clorofilas y pigmentos accesorios de la microalga y la cianobacteria se realizó con acetona y se midieron siguiendo la técnica descrita por Parsons *et al.*, (1984).

II.6.5 Medición de Peso seco y contenido de cenizas

El peso seco y el contenido de cenizas, fueron medidos según la metodología desarrollada por Sorokin (1973), en este caso, las microalgas y los rotíferos se concentraron en filtros de fibra de vidrio Whatman "GF/C" de 4.7 cm diámetro, eliminando los residuos de sal lavando las muestra con formato de amonio al 3 %. Los filtros se secaron en una estufa Blue M, modelo SW-17TA ®, a 60° C, hasta obtener el peso seco constante evaluando con una balanza marca Mettler modelo AE 240. Para conocer el contenido de cenizas, las muestras se incineraron en una mufla a 470 °C por 8 horas, para posteriormente pesarlos y obtener el contenido de cenizas por la diferencia entre el peso de la muestra seca e incinerada.

II.6.6 Determinación del perfil de aminoácidos

Las muestras (25 mg para cada una) se hidrolizaron con HCL 6 N y fenol al 0.06 % por 24 h a 110 °C (atmósfera de nitrógeno). Después se evaporó el HCL con nitrógeno, para aforarlas a diferentes volúmenes, se incluye el estandar interno (el ácidos α -Amino-n-butirico). Después se filtró 3 ml y se preparó la inyección, 70 μ l buffer de boratos, 20 μ l de derivatizador y 10 μ l de muestra se calienta por 10 min a 55 °C. Por último es inyectado 5 μ l en el aparato. dejando la muestra por 50 min en un HPLC (High Performance Liquid Chromatography) marca Waters AccQ•Tag Chemistry Package ®.

II.6.7 Determinación del perfil de ácidos grasos

Para el análisis de ácidos grasos se utilizaron alícuotas de la extracción de lípidos (Bligh y Dyer, 1959) para *Nannochloropsis* sp., *Synechococcus* sp., la mezcla y el rotífero alimentado con los tres tratamientos. Como estándar interno se agregó el ácido henecosanoico (21:0). Estas alícuotas inicialmente fueron resuspendidas por 3 min en una solución de KOH al 0.5M con metanol. La metilación se realizó por un resuspendidas (3 min) en metanol borotrifluor (BF₃-

MeOH) al 14 % (Metcalf *et al.*, 1966). Los ácidos grasos metil ester (AGMEs) fueron analizados en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890II con un detector de iones de flama (260 °C). Los ácidos grasos fueron separados con una columna capilar AGMEs de 30 m de longitud por 0.32 mm de diámetro, utilizando como gas transportador el hidrogeno. La temperatura inicial fue de 140 °C. La temperatura fue incrementando de 4 °C por min, hasta alcanzar los 240 °C. Esta temperatura se mantuvo por 10 min. Los ácidos grasos fueron identificados realizando una comparación con el tiempo de retención de estándares conocidos (la mezcla de AGME con 37 componentes, Supelco Inc.; GLC 87, Un-Chek Prep). La concentración de ácidos grasos fue calculada de las áreas correspondientes de cada cromatograma, utilizando un paquete de software HP ChemStation versión 6 para Windows.

Los perfiles de ácidos grasos y aminoácidos se determinaron en el Laboratorio de Nutrición en el Área de Acuicultura del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California.

II.7 Tratamiento estadístico de los resultados

Con el propósito de mantener una constancia en la calidad de *Nannochloropsis* sp. y *Synechococcus* sp. producidas en los cultivos semicontinuos y que posteriormente serían utilizados como alimento para rotíferos. Se verificó la estabilidad de los cultivos semicontinuos, por medio de una prueba de significancia de la pendiente de la regresión (prueba del coeficiente de Beta $\beta = 0$), entre el $\log_2$ de los valores de la D.O. para cada día antes de realizar la dilución y el tiempo en días (Sokal y Rohlf, 1979; Zar, 1984).

Por medio de un análisis de varianza de una vía, se evaluaron las posibles diferencias en la cantidad de biomasa producida, para cada una de las dos especies cultivadas. De forma análoga y para cada caso se midieron las

diferencias en la composición bioquímica (proteínas, lípidos, carbohidratos, pigmentos, peso seco, cenizas, el porcentaje de los ácidos grasos y aminoácidos), de la biomasa microalgal producida en los cultivos semicontinuos de *Nannochloropsis* sp. y *Synechococcus* sp. En el caso en donde se detectaron diferencias significativas en el análisis de varianza de una vía, se utilizó una prueba a posteriori de Tukey. Para el análisis estadístico, se probaron la normalidad y la homogeneidad de varianzas (Sokal y Rohlf, 1979).

Se utilizó un análisis de covarianza para comparar las pendientes de las curvas de crecimiento de *Brachionus plicatilis*. Para este análisis se consideraron los fundamentos de dicha prueba (linealidad de los residuos, normalidad y homogeneidad de varianzas). Las posibles diferencias en la composición proximal se evaluaron por medio de un análisis de varianza de una vía.

Para verificar la correspondencia (transferencia) entre la composición bioquímica de *Nannochloropsis* sp., *Synechococcus* sp. y la mezcla de ambas con respecto a la de los rotíferos, se utilizó una prueba de correlación para el contenido total de ácidos grasos (Sokal y Rohlf, 1979) y entre las distintas fracciones de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y polinsaturados.

Se utilizó un análisis de similitud por agrupación (Análisis de Cluster) utilizando como criterio de clasificación distancias Euclidianas (Ludwing y Reynold, 1988) del contenido total de ácidos grasos de los tipos de alimentos; saturados (NAN1, SYN1 y MIX1), monoinsaturados (NAN2, SYN2 y MIX2) y polinsaturados (NAN3, SYN3 y MIX3) y los evaluados para los rotíferos; saturados (ROTNAN1, ROTSYN1 y ROTMIX1), monoinsaturados (ROTNAN2, ROTSYN2 y ROTMIX2) y polinsaturados (ROTNAN3, ROTSYN3 y ROTMIX3).

Para todos los análisis estadísticos se utilizó un valor de $\alpha = 0.05$. Estos análisis se realizaron con el paquete estadístico Statistica® versión 5 para Windows (StatSoft, Inc., 1996).

III. RESULTADOS

III.1. Crecimiento de la microalga y la cianobacteria

En todas las etapas del cultivo, la temperatura ambiental promedio fue de $25^{\circ}\text{C} \pm 1$, salinidad de $35 \pm 0.5 \text{ ‰}$, pH de 9.02 ± 0.61 . El pH solamente se registró en los cultivos semicontinuos.

III.1.1. Cultivos en matraz Erlenmeyer de 125 ml

Nannochloropsis sp.

El crecimiento de *Nannochloropsis* sp. cultivada en matraz Erlenmeyer durante dieciséis días, presentó una fase de acondicionamiento de cuatro días, seguido de un periodo de crecimiento exponencial de siete días (Fig.3), una fase estacionaria de dos días y por último el decaimiento del cultivo. La densidad máxima fue de $22.80 \pm 1.83 \times 10^6$ al onceavo día de cultivo.

Los parámetros poblacionales resultantes para esta especie se muestran en la Tabla I, se observó una relación inversa entre los valores obtenidos de la tasa de crecimiento (μ) y el tiempo de duplicación (TD). Con valores máximos de $\mu = 1.47 \pm 0.094$ y $T_g = 0.47$, y una producción diaria mayor al octavo día de cultivo. Presentando durante la fase exponencial valores superiores promedio de $\mu = 0.766 \pm 0.190$ y $TD = 2.20$.

Se calculó la ecuación de la regresión lineal que realaciona el número de células con las medidas de la densidad óptica para cultivos estáticos. El coeficiente de regresión dio valores de $r^2 = 0.98$ (11 días de cultivo). Lo anterior permite tener una extrapolación de los valores de densidad óptica y el número de células para esta especie.

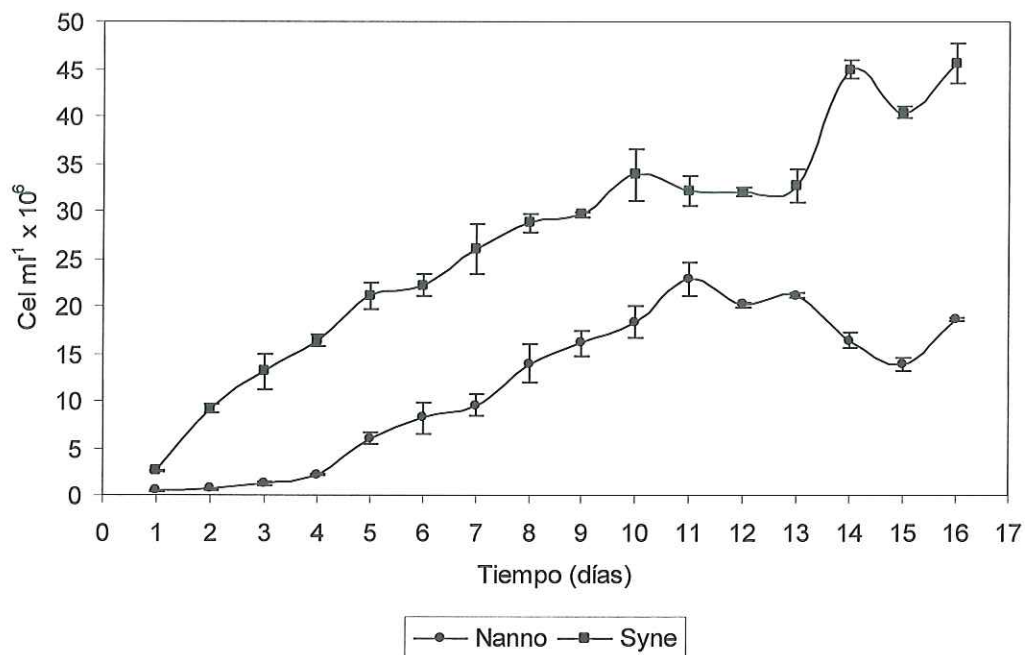


Figura 3. Curva de crecimiento de *Nannochloropsis* sp. (Nanno) y *Synechococcus* sp. (Syne), mantenidas en sistemas estáticos en matraz Erlenmeyer de 125 ml con medio "f/2" de Guillard y Ryther (1962).

Tabla I. Valores promedio de la cantidad de biomasa (células $\text{ml}^{-1} \times 10^6$) y parámetros poblacionales promedio para *Nannochloropsis* sp. cultivada en matraz Erlenmeyer de 125 ml con medio "f/2" de Guillard y Ryther (1962).

Tiempo (días)	Concentración (células ml^{-1})	Tasa de crecimiento (μ)	Divisiones por día (D)	Tiempo de duplicación (TD)	Producción diaria (PD) (células ml^{-1})
1	0.49 (0.11)				
2	0.63 (0.14)	0.36 (0.16)	0.53	1.90	0.14
3	1.28 (0.18)	1.02 (0.42)	1.48	0.67	0.64
4	2.16 (0.08)	0.76 (0.14)	1.11	0.90	0.88
5	6.02 (0.60)	1.47 (0.09)	2.13	0.47	3.86
6	8.17 (1.63)	0.42 (0.23)	0.62	1.63	2.15
7	9.56 (1.13)	0.24 (0.24)	0.35	2.89	1.39
8	13.89 (1.99)	0.53 (0.06)	0.77	1.29	4.33
9	16.13 (1.30)	0.22 (0.13)	0.32	3.12	2.23
10	18.30 (1.72)	0.18 (0.13)	0.26	3.82	2.18
11	22.80 (1.83)	0.31 (0.06)	0.46	2.18	4.50
12	20.15 (0.25)	-0.17 (0.10)	-0.25	-3.96	-2.65
13	21.13 (0.28)	0.06 (0.04)	0.10	10.10	0.98
14	16.38 (0.85)	-0.36 (0.05)	-0.53	-1.88	-4.75
15	13.85 (0.69)	-0.24 (0.11)	-0.35	-2.86	-2.53
16	18.57 (0.23)	0.42 (0.09)	0.61	1.63	4.72

Ecuación de regresión : $y = a + b (x)$

Ecuación obtenida : $\text{cel ml}^{-1} = -1.5386 + 101.266 (DO)$ donde,

y = células por mililitro

a = ordenada en el origen

b = pendiente

x = densidad óptica

Synechococcus sp.

El crecimiento de *Synechococcus sp.* cultivada en matraz Erlenmeyer fue exponencial los primeros diez días, seguido de una fase semi estacionaria de tres días, continuando su crecimiento hasta obtener una densidad máxima de $18.5 \pm 0.2 \times 10^6$, al decimosexto día de cultivo (Fig.3).

La tasa de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (TD) muestran una relación inversa, con valores máximos de 1.828 ± 0.15 . y 0.38 respectivamente y una producción diaria mayor al octavo día de cultivo. Durante los primeros cinco días de la fase exponencial de crecimiento se registraron valores superiores promedio de $\mu = 0.757 \pm 0.169$ y $TD = 2.97$ durante los primeros cinco días (Tabla II).

Los registros de densidad óptica que se obtuvieron en forma paralela a los conteos celulares permitieron obtener la ecuación de regresión con un valor de $r^2 = 0.95$. Lo anterior permite tener una extrapolación de los valores de densidad óptica y el número de células para esta especie.

Ecuación de regresión obtenida: $\text{cel ml}^{-1} = 1.53788 + 106.485 (DO)$

Tabla II. Valores promedio de la cantidad de biomasa (células $\text{ml}^{-1} \times 10^6$) y parámetros poblacionales promedio para *Synechococcus* sp. cultivada en matraz Erlenmeyer de 125 ml con medio "f/2" de Guillard y Ryther (1962).

Tiempo (días)	Concentración (células ml^{-1})	Tasa de crecimiento μ	Divisiones por día (D)	Tiempo de duplicación (TD)	Producción diaria (PD) (células ml^{-1})
1	2.58 (0.13)				
2	9.15 (0.46)	1.82 (0.15)	2.64	0.38	6.67
3	13.08 (1.85)	0.50 (0.21)	0.73	1.36	3.94
4	16.38 (0.66)	0.33 (0.24)	0.48	2.08	3.29
5	21.02 (1.38)	0.35 (0.08)	0.52	1.93	4.65
6	22.15 (1.13)	0.07 (0.02)	0.11	9.11	1.13
7	25.98 (2.56)	0.22 (0.12)	0.33	3.05	3.83
8	28.73 (0.99)	0.14 (0.11)	0.22	4.64	2.75
9	29.60 (0.30)	0.04 (0.06)	0.06	15.82	0.88
10	33.81 (2.72)	0.18 (0.13)	0.27	3.67	4.21
11	32.08 (1.59)	-0.07 (0.08)	-0.11	-9.40	-1.73
12	31.95 (0.45)	-0.01 (0.09)	-0.01	-140.97	-0.13
13	32.60 (1.73)	0.02 (0.10)	0.04	24.92	0.65
14	44.93 (0.98)	0.46 (0.07)	0.67	1.49	12.33
15	40.38 (0.60)	-0.15 (0.03)	-0.22	-4.50	-4.55
16	45.68 (2.11)	0.17 (0.05)	0.26	3.92	5.30

III.1.2 Cultivos semicontinuos en botellón de 18 l.

***Nannochloropsis* sp.**

Los cultivos semicontinuos de *Nannochloropsis* sp. se mantuvieron durante veinte días y se inició la cosecha y dilución a partir del día nueve, aproximadamente a la mitad de la fase exponencial de crecimiento. Diariamente se utilizó la dilución teórica de 30 % (Fig. 4).

Cuando iniciaron las diluciones, la recuperación se alcanzó a los tres días, a partir de entonces los cultivos se mantuvieron en una fase estable durante 20 días. Al verificar la estabilidad de los cultivos se encontró que la producción de biomasa fue constante y sin cambios significativos ($P = 0.7719$).

***Synechococcus* sp.**

Los cultivos de *Synechococcus* sp. se comenzaron a cosechar a partir del día nueve, cuando se encontraban en fase exponencial de crecimiento. Se utilizó el porcentaje de dilución teórico de 20 % (Fig. 4).

Después de cada dilución la recuperación de biomasa ocurrió a las 24 h, presentándose una fase de estabilidad a partir del primer día de cosecha y manteniéndose así durante 20 días. Al verificar la estabilidad de los cultivos semicontinuos, se encontró que la producción de biomasa para *Synechococcus* sp. fue constante y sin cambios significativos durante esta fase ($P = 0.8630$).

Cuando los cultivos de ambas especies tenían aproximadamente cerca de treinta días se remplazaban por un nuevo cultivo estable para evitar la adhesión de células muertas a las paredes de los botellones.

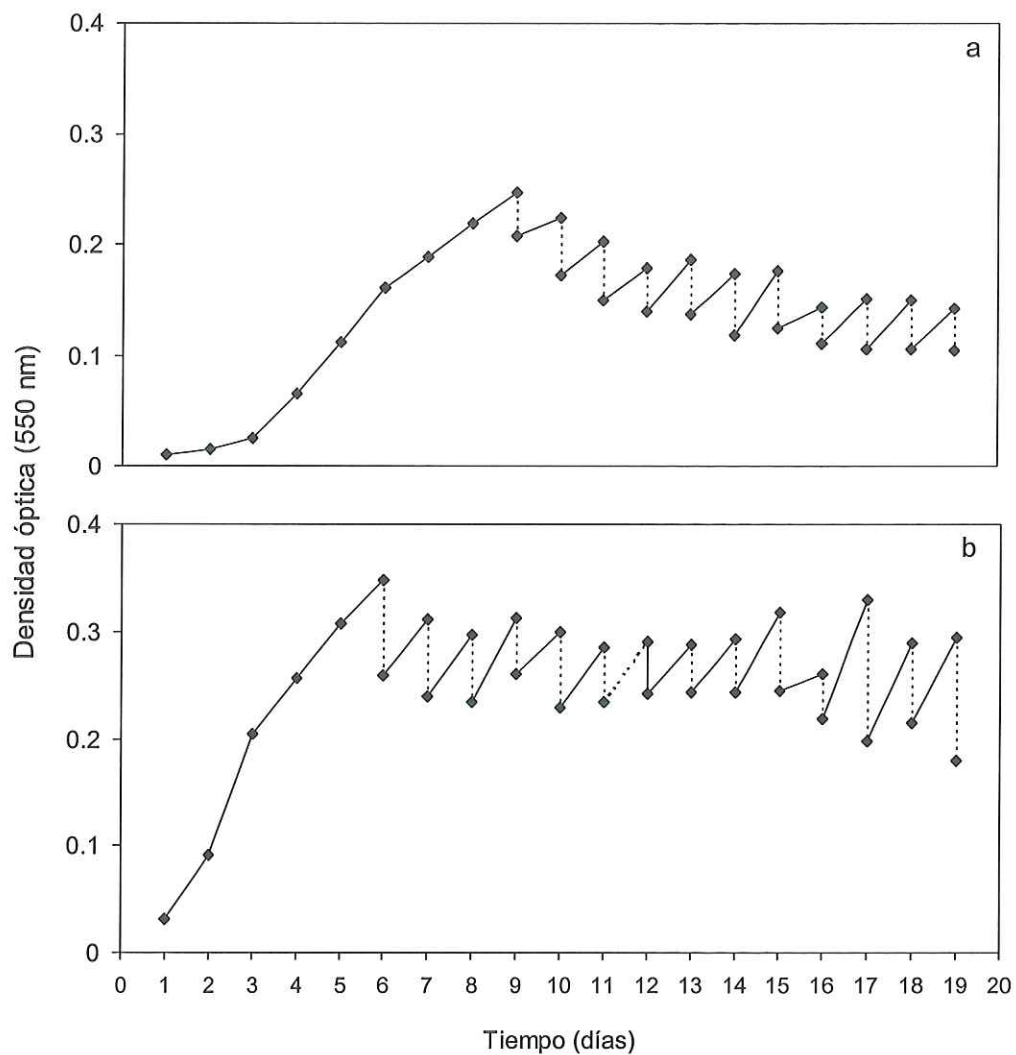


Figura 4. Curva de crecimiento para el cultivo semicontinuo de *Nannochloropsis* sp. (a) y *Synechococcus* sp. (b) con una dilución de 30 % día⁻¹ y 20 % día⁻¹ respectivamente, cultivada en botellones de 18 l con medio "f/2" de Guillard y Ryther (1962).

III.2 Crecimiento del rotífero *Brachionus plicatilis*

Los rotíferos alimentados con *Nannochloropsis* sp., presentaron una concentración promedio máxima de 143 ± 9 rot ml^{-1} (Fig. 5) durante los veinte días de cultivo, en tanto que los organismos alimentado con *Synechococcus* sp. tuvieron una concentración máxima promedio de 180 ± 35 rot ml^{-1} durante el tiempo de cultivo (Fig. 5). Los rotíferos alimentados con una mezcla de las dos especies cultivadas, registraron una concentración promedio máximo de 214 ± 9 rot ml^{-1} durante los veinte días de cultivo (Fig. 5).

Es importante resaltar que al utilizar la mezcla de las dos especies, los cultivos de rotíferos mostraron una marcada periodicidad, a diferencia de cuando se suministró el alimento monoespecífico durante el bioensayo. El análisis estadístico no detectó diferencias significativas ($P = 0.0817$), en las densidades de rotíferos obtenidas en los bioensayos al utilizar los tres tipos de alimento. Al verificar la estabilidad de los cultivos de rotíferos durante los bioensayos de alimentación, se encontró que la producción de rotíferos fue constante y sin cambios significativos cuando estos fueron alimentados con la mezcla de ambas especies ($P = 0.5888$) y con *Nannochloropsis* sp. ($P = 0.3080$). Para el caso en donde se utilizó como alimento *Synechococcus* sp. se obtuvo una producción irregular de rotíferos con respecto al tiempo ($P = 0.0128$).

La densidad de hembras ovígeras tuvo una tendencia similar al suministrar los tres tipos de alimento y no se detectaron diferencias significativas ($P = 0.9519$) (Fig. 6). Al verificar la estabilidad de los cultivos durante el bioensayo al utilizar los tres tipos de alimento, se encontró que la densidad de hembras ovígeras fue constante y sin cambios significativos con respecto al tiempo para los tres tratamientos de alimentación. Sin embargo, las gráficas muestran una mejor constancia en la densidad de hembras ovígeras alimentadas con *Synechococcus* sp. ($P = 0.8805$), seguida de la obtenida con la mezcla de las

dos especies ($P= 0.6890$) y menor constancia cuando los organismos fueron alimentados con *Nannochloropsis* sp. ($P= 0.1014$).

III.3 Composición bioquímica

Nannochloropsis sp. y *Synechococcus* sp.

Para optimizar la extracción de proteínas para *Synechococcus* sp. se utilizó NaOH al 0.2 y 0.3 N para *Nannochloropsis* sp. y para la mezcla de ambas especies respectivamente, con 15 min en baño maría en todos los casos (Fig. 7). La composición proximal de las especies cultivadas y la mezcla de ambas especies indica que el porcentaje de proteínas y lípidos fue significativamente diferente $P= 0.0274$ y $P< 0.0001$ respectivamente. *Synechococcus* sp. resultó con mayor porcentaje de proteínas (44.44 %), seguido de la mezcla (35.71 %) y por último *Nannochloropsis* sp. con (27.66 %) (Fig. 8), mientras que la mayor fracción lipídica se registró para la microalga *Nannochloropsis* sp. (11.94 %), seguido de la mezcla con (9.25 %) y la cianobacteria S. sp. (6.22 %). Los valores de los distintos porcentajes de carbohidratos obtenidos para cada caso, no muestran diferencias significativas ($P= 0.0752$). Sin embargo, el mayor porcentaje se registró en la mezcla (16.97 %) y *Synechococcus* sp. (16.68 %), resultó para *Nannochloropsis* sp. la menor fracción (11.15 %). En cuanto a los porcentajes de peso orgánico seco y contenido de cenizas no se encontraron diferencias significativas ($P= 0.1100$) entre los diferentes tipos de alimentos.

Por último el contenido de pigmentos para *Nannochloropsis* sp. y *Synechococcus* sp. se encontraron diferencias significativas en el contenido de clorofila a ($P< 0.0001$), con valores entre 0.12 a 0.21 y 0.03 a 0.06 de clorofila a por millón de células para la microalga y la cianobacteria respectivamente. Asimismo, el contenido de carotenoides en las dos especies no fue significativamente diferente ($P= 0.312$) (Fig. 10), con valores entre 0.009 a 0.025 de carotenoides por millón de células para la microalga y la cianobacteria.

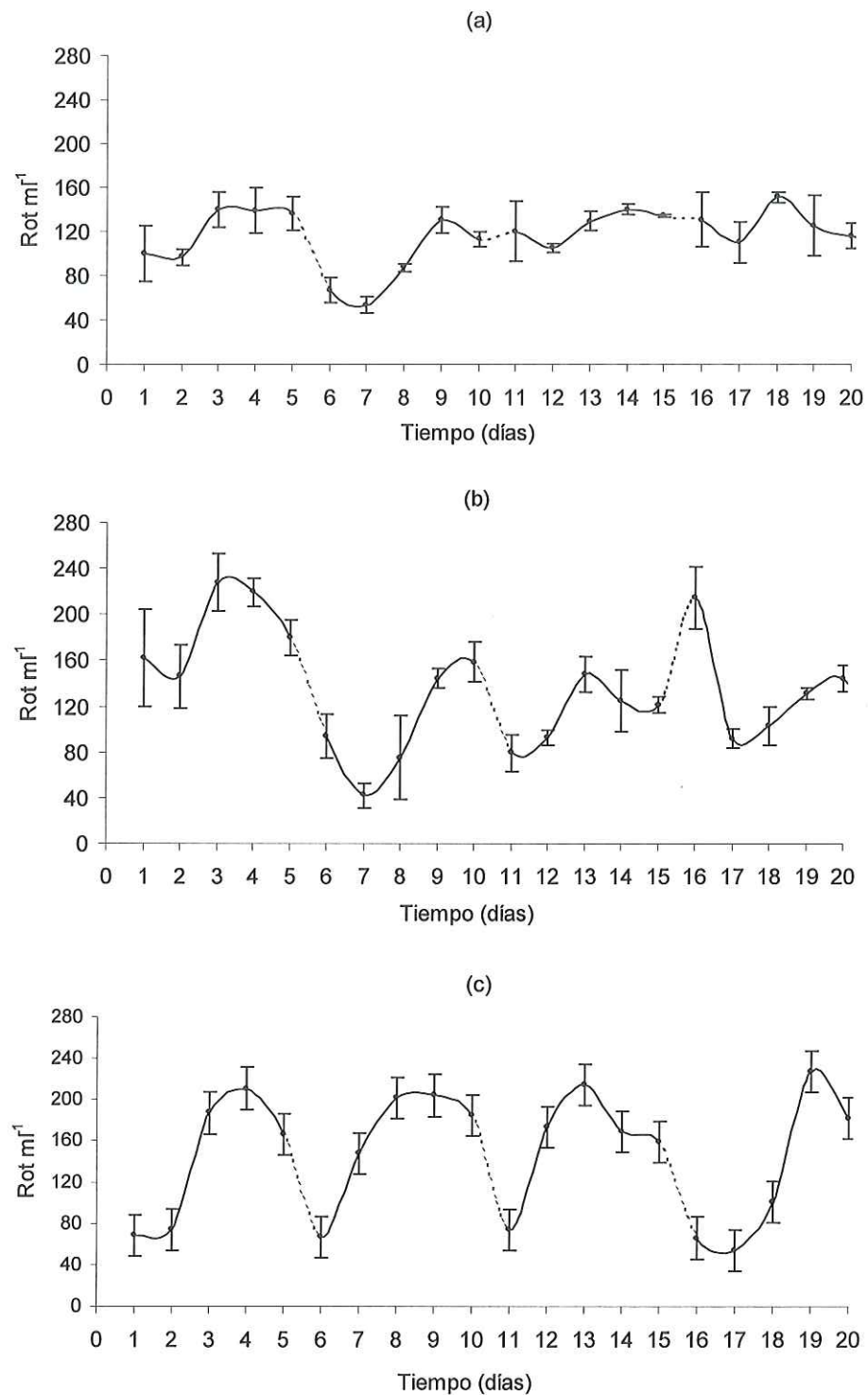


Figura 5. Curva de crecimiento promedio y valores de desviación estándar para el rotífero *Brachionus plicatilis* mantenidas en bolsas plásticas de 10 l cosechados cada cinco días y alimentado con *Nannochloropsis* sp. (a) *Synechococcus* sp. (b) y una mezcla de las dos especies cultivadas (c).

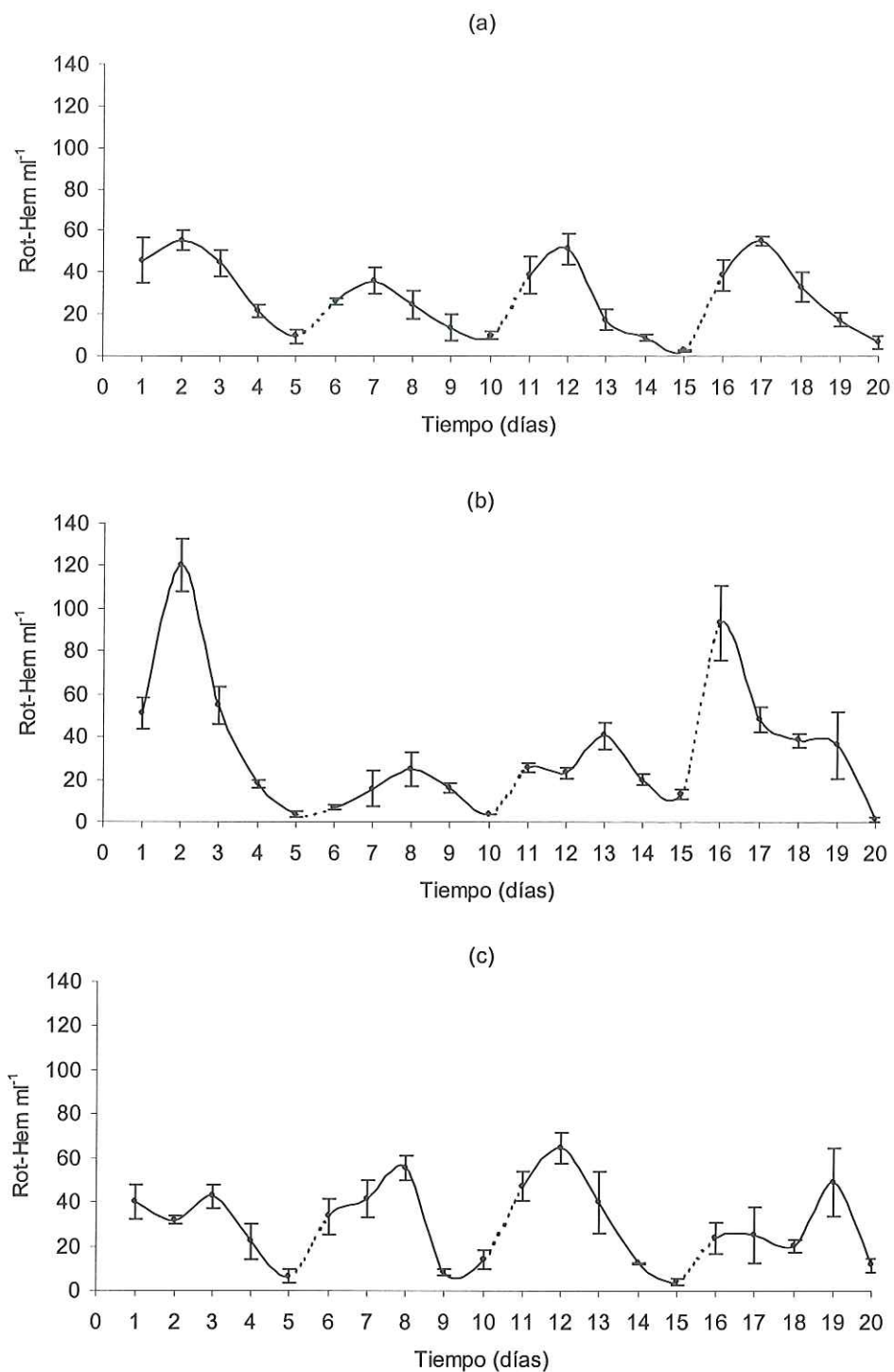


Figura 6. Curva de crecimiento promedio y valores de desviación estándar para hembras ovígeras para el rotífero *Brachionus plicatilis* mantenidas en bolsas plásticas de 10 l cosechados cada cinco días y alimentado con *Nannochloropsis* sp. (a) *Synechococcus* sp. (b) y una mezcla de las dos especies cultivadas (c).

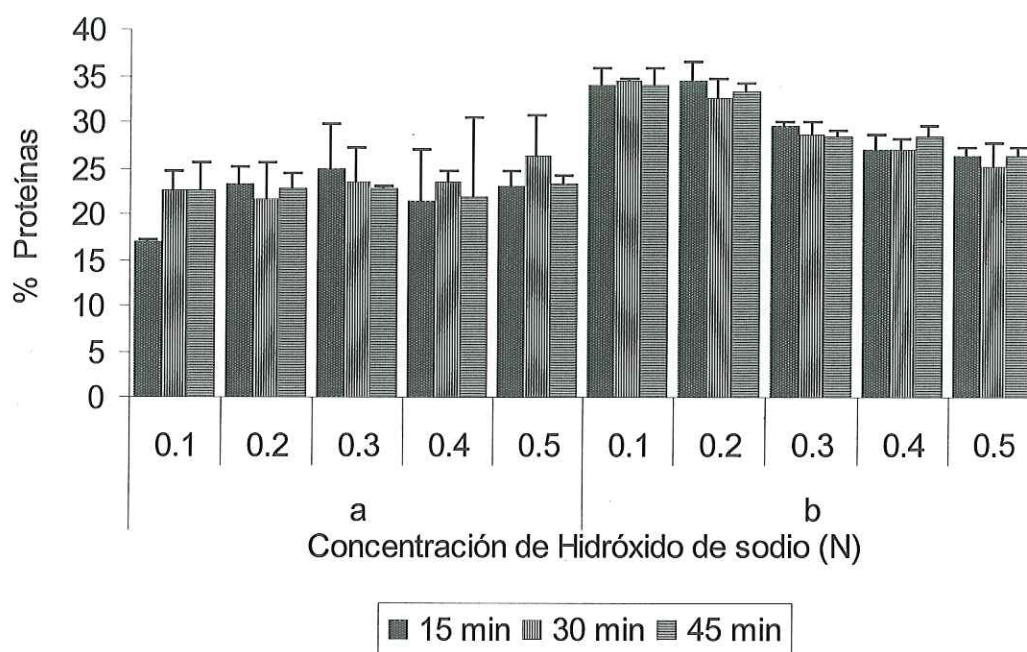


Figura 7. Valores promedio y desviación estándar de la concentración de proteínas en *Nannochloropsis* sp. (a) y *Synechococcus* sp. (b), durante los ensayos de optimización de extracción de proteínas utilizando cinco diferentes concentraciones de NaOH (0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 N) y tres tiempos de extracción (15, 30 y 45 min).

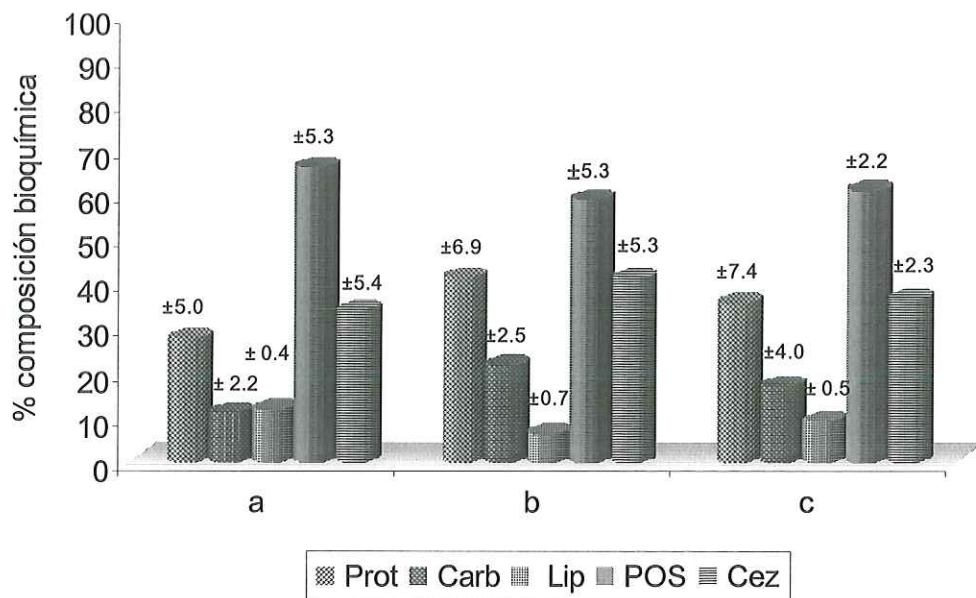


Figura 8. Valores promedio expresados en porcentaje del peso orgánico seco de proteínas (Prot), carbohidratos (Carb), lípidos (Lip), peso orgánico seco (POS) y cenizas (Cez) para los cultivos semicontinuos de *Nannochloropsis* sp. (a), *Synechococcus* sp. (b) y una mezcla de las dos especies cultivadas (c).

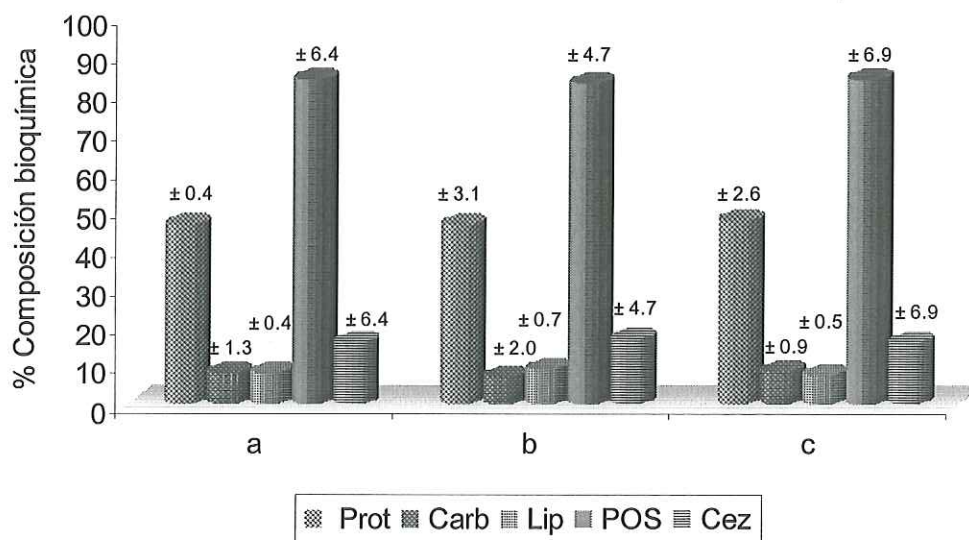


Figura 9. Valores promedio expresado en porcentaje del peso orgánico seco de proteínas (Prot), carbohidratos (Carb), lípidos (Lip), peso orgánico seco (POS) y cenizas (Cez), para *Brachionus plicatilis* alimentado con *Nannochloropsis* sp. (a), *Synechococcus* sp. (b) y una mezcla de las dos especies cultivadas (c).

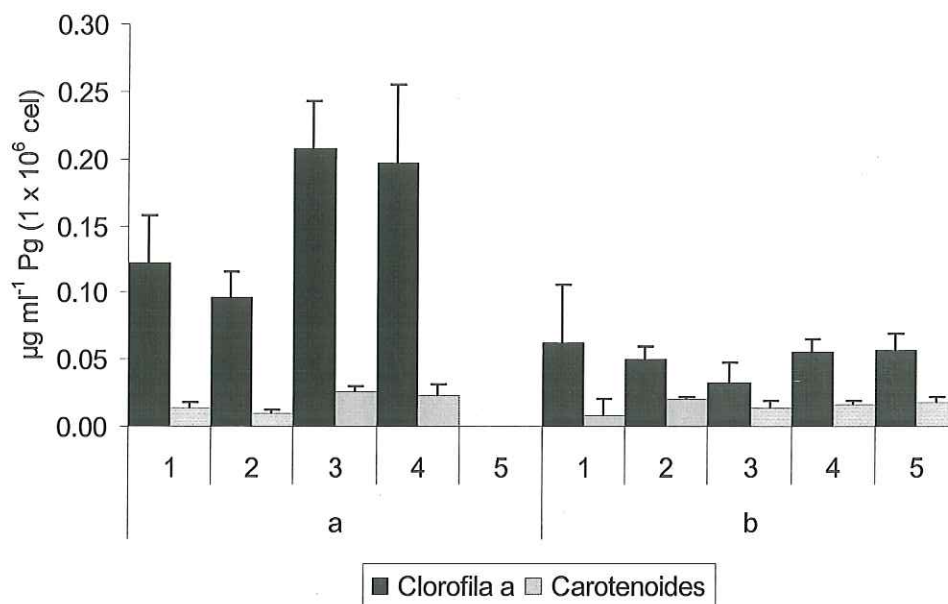


Figura 10. Contenido de pigmentos (Pg), clorofila *a* y carotenoides para *Nannochloropsis* sp. (a) y *Synechococcus* sp. (b), mantenidas en cultivos semicontinuos durante cinco diferentes fechas de muestreo (1 - 5) mantenidas en botellones de 18 l con medio de cultivo descrito por Guillard y Ryther (1962).

Brachionus plicatilis

En los bioensayos realizados con los rotíferos, se observó que para el porcentaje de proteínas no hubo diferencias significativas entre los diferentes tratamientos ($P= 0.8724$). El intervalo de porcentaje se encontró entre 47.3 a 46.6 % (Fig. 9).

Los valores de carbohidratos y lípidos evaluados para cada experimento no fueron significativamente diferentes para los distintos tipos de alimento suministrado ($P= 0.35$ y $P= 0.31$ respectivamente). Los rotíferos alimentados con la mezcla de las dos especies, presentaron el mayor porcentaje de carbohidratos (8.4 %), seguido de *Nannochloropsis* sp. (8.26 %) y por último *Synechococcus* sp. (7.08 %). Mientras en los rotíferos alimentados con *Synechococcus* sp. registraron los mayores porcentajes de lípidos (9.2 %), seguido del tratamiento con *Nannochloropsis* sp. (8.1%) y por último el tratamiento con la mezcla (7.6 %) (Fig. 10). En cuanto al contenido de peso orgánico seco y cenizas para los tres tratamientos no se encontraron diferencias significativas ($P= 0.9400$).

Al verificar la correlación entre la composición de proximal del alimento y la resultante en el rotífero, esta fue mayor al utilizar *Nannochloropsis* sp. y *Synechococcus* sp. con valores cercanos a 0.80 para proteínas, 0.70 para carbohidratos y 0.75 para lípidos respectivamente. Mientras que al utilizar la mezcla de ambas especies los valores de correlación fueron bajos con 0.50 para proteínas, 0.23 para carbohidratos y 0.21 para lípidos.

III.3.1 Perfil de aminoácidos

***Nannochloropsis* sp. y *Synechococcus* sp.**

En la Tabla III, se muestran los valores del peso orgánico seco de los aminoácidos presentes en las especies utilizadas para alimentar al rotífero *Brachionus plicatilis*. En la microalga *Nannochloropsis* sp. se encontró un alto porcentaje de lisina (7.5 %), glutamato (5.4 %), prolina (4.1 %), aspartato (3.89 %), alanina (3.2 %) y isoleucina (3.3 %). Mientras que el resto de los aminoácidos se mantuvieron con porcentajes menores entre 2.5 a 1.0 %. Para la cianobacteria *Synechococcus* sp., el aminoácido con mayor porcentaje fue la lisina con 25.9 %. El resto de los aminoácidos se presentó entre 3.0 a 0.2 %, no se detectaron histidina y metionina. En la mezcla de ambas especies se evaluaron altos contenidos de glutamato (4.1 %) y lisina (3.5 %) y el resto de los aminoácidos tuvieron concentraciones entre 2.8 a 1.0 %

Brachionus plicatilis

El perfil bioquímico de los aminoácidos cuantificados para el rotífero *Brachionus plicatilis* alimentado con *Nannochloropsis* sp. presentó un alto contenido de aspartato (14.7 %), glutamato (11.3 %), isoleucina (10.4 %) y arginina (7.0 %). La alanina se presentó como el aminoácido menos abundante (0.47 %). Mientras que los rotíferos alimentados con *Synechococcus* sp. registraron altos porcentajes de glutamato (14.8 %), aspartato (11.5 %), isoleucina (10.8 %), leucina (7.2 %), arginina (7.0 %), valina (6.9 %) y porcentajes menores de metionina (3.0 %) e histidina (3.2 %). Cuandol los rotíferos se alimentaron con la mezcla se encontró que los aminoácidos más abundantes fueron glutamato (14.2 %), aspartato (11.4 %), isoleucina (11.1 %), lisina (10.7 %), arginina (7.8 %), fenilalanina (7.5 %), leucina (7.5 %), valina (7.2 %), en tanto que la prolina se encontró en menor cantidad (2.2 %) (Tabla III).

Al verificar la correspondencia entre los porcentajes de la composición total de aminoácidos obtenidos para el alimento y el resultante en los rotíferos, se encontró que al suministrar como alimento *Nannochloropsis* sp. o *Synechococcus* sp. se obtiene una correlación de 0.19 y 0.27 respectivamente. Sin embargo al utilizar como alimento la mezcla de las dos especies, se evaluaron altos valores de correlación con 0.79.

Tabla III. Composición de aminoácidos con base al peso orgánico seco para *Nannochloropsis* sp. (a), *Synechococcus* sp. (b), la mezcla de ambas especies (c) y para el rotífero *Brachionus plicatilis* alimentado con las especies antes mencionadas.

Aminoácidos	Tipo de alimento			Rotífero <i>Brachionus plicatilis</i>		
	a	b	c	a	b	c
Aspartato	3.89	2.47	2.84	11.35	11.59	11.42
Serina	2.08	1.42	1.17	5.67	5.92	5.36
Glutamato	5.42	2.75	4.12	14.79	14.83	14.27
Glicina	2.12	1.27	1.51	4.48	4.58	4.62
Histidina	1.63	--	0.63	3.20	3.21	3.33
Arginina	3.02	2.29	1.80	7.06	7.06	7.81
Treonina	2.17	1.37	1.52	5.00	5.28	5.22
Alanina	3.25	2.39	2.06	0.47	5.42	5.11
Prolina	4.18	1.92	2.17	5.94	6.42	2.21
Tirosina	2.25	1.28	1.32	4.53	4.35	4.84
Valina	2.30	0.78	1.78	6.61	6.91	7.20
Metionina	1.27	--	0.75	3.00	3.03	3.10
Lisina	7.56	25.96	3.53	3.48	4.84	10.76
Leucina	1.28	0.27	2.25	6.57	7.25	7.50
Isoleucina	3.36	0.68	1.75	10.49	10.88	11.12
Fenilalanina	0.05	2.59	2.05	6.21	6.71	7.56

III.3.2 Perfil de ácidos grasos

Nannochloropsis sp. y *Synechococcus* sp.

Al comparar el contenido del total de ácidos grasos evaluados para *Nannochloropsis* sp., *Synechococcus* sp. y la mezcla de ambas especies, se encontraron diferencias significativas para *Nannochloropsis* sp. y *Synechococcus* sp ($P= 0.0305$).

El perfil de ácidos grasos analizado de *Nannochloropsis* sp. indica la presencia de ácidos saturados principalmente el 14:0 y 16:0 (36.4 y 8.0 % respectivamente). Valores menores al 1 % fueron evaluados para 15:0, 18:0, 20:0 y 22:0 (Tabla IV). Mientras que los ácidos monoinsaturados que se registraron con mayor abundancia fueron el 16:1n-7 (34.6 %) y el 18:1n-9 (3.1 %), el resto se encontraron en cantidades que no superaron el 1 %. Los ácidos grasos polinsaturados más importantes por su concentración fueron 20:5n-3 (4.9 %), 20:4n-6 (1.7 %) y 18:2n-6t (1.8 %). Los demás ácidos grasos se presentaron en cantidades relativamente pequeñas, inferiores al 0.5 % (Fig. 11).

En cuanto al contenido de ácidos grasos, para la cianobacteria *Synechococcus* sp., los saturados con mayor porcentaje fueron 16:0 contribuyó (47.29 %) y 18:0 (2.76 %), mientras que los ácidos 14:0, 15:0, 20:0 y 22:0 no fueron detectados. Los ácidos grasos monoinsaturados con mayor porcentaje fueron el 16:1n-7 (10.9 %), 18:1n-9 (24.3 %) y 20:1n-11 (5.1 %). Los valores con menor porcentaje al 0.5 % fueron el 22:1n-11 y 22:1n-9. En cuanto a los ácidos grasos polinsaturados sólo se detectaron el 18:2n-6t (1.8 %) y el 20:5n-3 (0.3 %).

En la mezcla de ambas especies, los ácidos saturados más abundantes correspondieron al 14:0 (5.5 %), 16:0 (39.3 %) y 18:0 (1.62 %), Los ácidos 15:0, 20:0 y 22:0. resultaron con valores menores al 0.5 % Los ácidos grasos monoinsaturados más abundantes fueron el 16:1n-7 (27.2 %) y 18:1n-9 (9.0 %).

Mientras que el resto de los ácidos grasos monoinsaturados se encontraron en cantidades menores al 1%. Los ácidos grasos polinsaturados identificados fueron cinco, resultando con mayor porcentaje el 18:2n-6t (4.6 %), seguido del 20:4n-6 (1.3 %) y 20:5n-3 (4.0 %), mientras que los valores menores al 1 % correspondieron al 16:2n-4 y 16:3n-3 (Fig. 11).

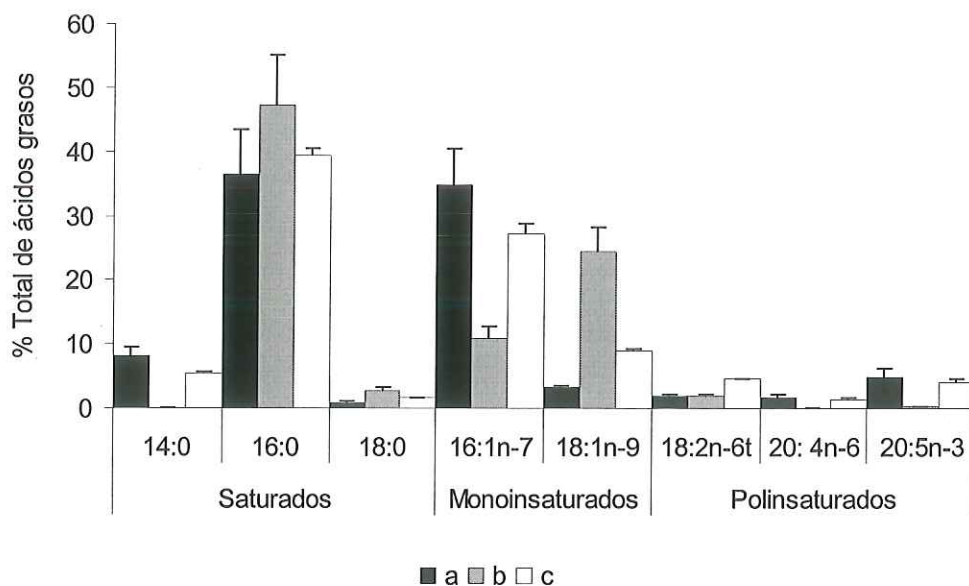


Figura 11. Porcentaje total de ácidos grasos identificados para *Nannochloropsis* sp. (a), *Synechococcus* sp. (b) y una mezcla de ambas (c), mantenidas en cultivos semicontinuos en botellones de 18 l y utilizando medio de Guillard y Ryther (1962).

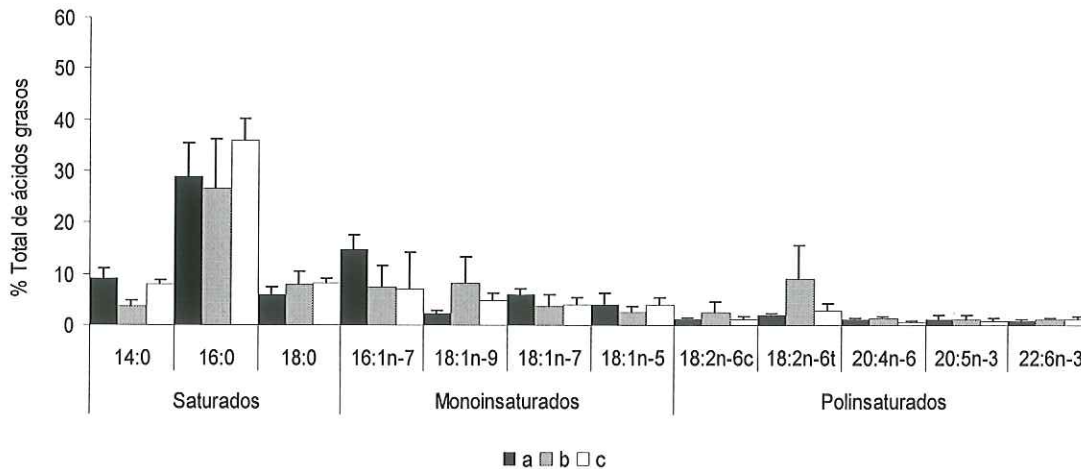


Figura 12. Porcentaje total de ácidos grasos para el rotífero *Brachionus plicatilis* mantenido en bolsas de plástico de 10 l y alimentados con *Nannochloropsis* sp. (a), *Synechococcus* sp. (b) y una mezcla de ambas (c).

Brachionus plicatilis

El contenido de ácidos grasos para el rotífero *Brachionus plicatilis* alimentado durante veinte días con la microalga *Nannochloropsis* sp. (Tabla IV) nos indica la presencia de un alto porcentaje de ácidos grasos saturados 16:0 (28.8 %), 14:0 (8.9 %), 18:0 (5.9 %) y el 22:0 (1.6 %), correspondiendo a 15:0 y 20:0 los valores menores al 1 %. En cuanto a los ácidos grasos monoinsaturados los más abundantes fueron el 16:1n-7 (14.5 %), 18:1n-7 (5.8 %) y 18:1n-5 (4.1 %). El resto de los ácidos monoinsaturados se encontraron en cantidades menores, entre 2.5 a 0.5 %. Los ácidos grasos polinsaturados con mayor abundancia fueron el 18:2n-6t (2.0 %), 18:2n-6c (1.2 %), 20:4n-6 (1.1 %), 20:5n-3 (1.1 %), 22:4n-3 (3.6 %) y 22:5n-3 (1.1%); el resto se encontró con valores menores al 1 %.

En el ensayo donde se utilizó *Synechococcus* sp. como alimento para el rotífero, se encontraron altos valores de 16:0 (26.5 %), 18:0 (7.9 %) y 14:0 (3.6 %). Mientras los ácidos grasos 15:0, 20:0 y 22:0 fueron los que presentaron valores menores al 1%. Los ácidos grasos monoinsaturados con la mayor abundancia fueron el 18:1n-9 (8.2 %), 16:1n-7 (7.2 %), 18:1n-7 (3.7 %), 20:1n-9 (2.5 %) y 18:1n-5 (2.4 %), los demás ácidos se encontraron por debajo del 2 %. Los ácidos grasos polinsaturados con altos porcentajes fueron el 18:2n-6t (8.9 %) y 18:2n-6c (2.6 %). El resto de los ácidos grasos se mantuvo con valores entre 1.5 a 0.2 %. No se detectaron los ácidos grasos 16:2n-4 y 16:4n-1. Para el ensayo donde se utilizó como alimento una mezcla de ambas especies en porciones similares, se encontró un gran porcentaje de ácidos saturados principalmente el 16:0 (35.87 %), 18:0 (8.19 %) y 14:0 (7.81 %). Resultó que el 15:0, 20:0 y 22:0 se registraron con valores menores 1.5 %. Los ácidos grasos monoinsaturados con mayor porcentaje fueron el 16:1n-7 (7.15 %), 18:1n-9 (4.82 %), 18:1n-5 (4.0 %) y 18:1n-7 (4.0 %), mientras el resto de éstos ácidos grasos se presentaron con porcentajes entre 2.5 a 0.5 %. Los ácidos grasos

Tabla IV. Valores promedios y desviación estandar del porcentaje total de ácidos grasos para el rotífero *Brachionus plicatilis* suministrando como alimento *Nannochloropsis* sp. (a), *Synechococcus* sp. (b), y una mezcla de ambas especies (c).

Ácidos grasos	Tipo de alimento			Rotífero <i>Brachionus plicatilis</i>		
	a	b	c	a	b	c
Saturados						
14:0	8.01 (1.41)	----	5.52 (0.31)	8.93 (2.14)	3.67 (1.27)	7.81 (0.86)
15:0	0.45 (0.08)	----	0.31 (0.03)	0.93 (0.28)	0.62 (0.20)	1.08 (0.12)
16:0	36.49 (6.82)	47.29 (7.83)	39.34 (1.22)	28.80 (6.48)	26.53 (9.56)	35.87 (4.18)
17:0	0.50 (0.07)	0.51 (0.12)	0.51 (0.01)	0.74 (0.19)	----	1.37 (0.00)*
18:0	0.92 (0.19)	2.76 (0.40)	1.62 (0.03)	5.95 (1.29)	7.90 (2.70)	8.19 (0.86)
19:0	----	----	----	0.12 (0.03)	0.29 (0.02)	0.22 (0.02)
20:0	0.35 (0.09)	----	0.34 (0.01)	0.48 (0.06)	0.74 (0.38)	0.50 (0.10)
21:0	1.77 (0.57)	2.79 (4.11)	2.53 (0.04)	0.97 (0.70)	2.33 (0.03)	1.74 (0.10)
22:0	0.26 (0.09)	----	0.23 (0.00)*	1.68 (1.63)	0.69 (0.16)	0.86 (0.24)
24:0	----	----	----	----	0.18 (0.01)	0.32 (0.08)
Monoinsaturados						
15:1n-5	----	----	----	----	----	0.14 (0.01)
16:1n-7	34.69 (5.82)	10.95 (1.70)	27.23 (1.58)	14.59 (2.90)	7.26 (4.46)	7.15 (6.91)
17:1n-7	0.72 (0.11)	1.61 (0.27)	----	----	----	----
18:1n-9	3.15 (0.50)	24.38 (3.85)	9.05 (0.16)	2.29 (0.44)	8.23 (4.94)	4.82 (1.54)
18:1n-7	0.65 (0.06)	1.51 (0.25)	0.84 (0.02)	5.89 (1.18)	3.74 (2.12)	4.00 (1.29)
18:1n-5	0.33 (0.14)	----	0.51 (0.02)	4.10 (2.00)	2.41 (1.18)	4.05 (1.19)
20:1n-11	----	5.17 (4.22)	----	1.10 (0.21)	1.68 (0.63)	1.20 (0.25)
20:1n-9	----	----	----	1.22 (0.22)	2.52 (1.38)	2.01 (0.65)
20:1n-7	----	----	----	1.42 (0.30)	1.55 (0.62)	1.77 (0.12)
22:1n-11	0.31 (0.04)	0.41 (0.07)	0.26 (0.04)	0.74 (0.25)	0.82 (0.17)	1.08 (0.17)
22:1n-9	0.30 (0.14)	0.37 (0.09)	0.37 (0.22)	1.22 (0.33)	1.90 (0.41)	2.14 (0.41)
22:1n-7	0.11 (0.00)*	----	----	0.77 (0.47)	0.68 (0.05)	0.53 (0.07)
24:1n-9	----	----	----	1.80 (2.30)	0.51 (0.05)	0.63 (0.11)
Polinsaturados						
16:2n-6	0.13 (0.04)	----	----	0.33 (0.10)	0.92 (0.31)	0.49 (0.08)
16:3n-6	0.19 (0.01)	----	----	0.15 (0.01)	0.30 (0.11)	0.22 (0.03)
16:2n-4	----	----	0.17 (0.00)*	0.22 (0.17)	----	0.67 (0.08)
16:3n-3	0.07 (0.00)*	----	0.98 (0.02)	0.53 (0.12)	0.91 (0.31)	----

(Continuación)

Ácidos grasos	Tipo de Alimentos			Rotífero <i>Brachionus plicatilis</i>		
	a	b	c	a	b	c
Polinsaturados						
16:4n-3	0.07 (0.00)*	----	----	----	----	----
16:4n-1	0.10 (0.00)*	----	----	0.13 (0.01)	----	----
18:2n-6c	0.08 (0.00)*	----	----	1.24 (0.21)	2.64 (1.86)	1.14 (0.57)
18:2n-6t	1.89 (0.20)	1.86 (0.29)	4.64 (0.11)	2.00 (0.37)	8.98 (6.54)	2.80 (1.47)
18:3n-6	0.17 (0.03)	----	----	0.17 (0.02)	0.29 (0.08)	0.17 (0.03)
18:3n-4	----	----	----	----	0.22 (0.00)*	0.14 (0.00)
18:3n-3	----	----	----	0.31 (0.05)	0.47 (0.05)	0.49 (0.10)
18:3n-1	----	----	----	0.10 (0.01)	0.54 (0.32)	0.34 (0.02)
18:3	----	----	----	----	0.15 (0.00)	----
18:4n-3	0.16 (0.05)	----	----	0.19 (0.04)	0.86 (0.58)	0.56 (0.34)
18:4n-1	----	----	----	----	0.70 (0.34)	0.26 (0.04)
20:2n-6	0.42 (0.10)	----	----	0.77 (0.04)	0.93 (0.56)	0.61 (0.41)
20:3n-6	0.16 (0.04)	----	----	0.13 (0.02)	0.43 (0.23)	0.22 (0.07)
20:4n-6	1.70 (0.38)	----	1.38 (0.14)	1.11 (0.29)	1.38 (0.25)	0.43 (0.44)
20:3n-4	----	----	----	0.65 (0.97)	0.39 (0.02)	0.20 (0.06)
20:3n-3	----	----	----	0.11 (0.00)*	----	0.23 (0.02)
20:4n-3	0.08 (1.79)	----	----	0.39 (0.21)	2.07 (0.38)	0.24 (0.06)
20:5n-3	4.91 (1.42)	0.33 (0.04)	4.08 (0.45)	1.16 (0.81)	1.05 (0.82)	0.71 (0.65)
21:5n-3	----	----	----	----	----	----
22:2n-6	0.22 (0.07)	----	----	0.26 (0.14)	0.15 (0.01)	0.12 (0.00)
22:4n-6	0.18 (0.00)*	----	----	0.40 (0.08)	0.26 (0.03)	0.38 (0.04)
22:4n-3	0.14 (0.06)	----	----	3.63 (0.00)*	0.18 (0.00)*	0.16 (0.00)
22:5n-3	0.14 (0.05)	----	----	1.12 (0.45)	0.54 (0.10)	0.54 (0.33)
22:6n-3	0.08 (0.00)*	----	----	0.93 (0.08)	1.18 (0.18)	1.22 (0.40)
Saturados**	48.77	53.36	50.45	48.69	42.98	57.99
Monoinsaturados**	40.30	44.43	38.29	35.20	31.35	29.57
Polinsaturados**	10.91	2.20	11.25	16.10	25.65	12.43

* Valor unico; ** Suma total; ---- No detectado

polinsaturados como el 18:2n-6t (2.8 %), 18:2n-6c (1.1 %) y 22:6n-3 (1.2 %) se registraron con las mayores fracciones. El resto de los ácidos grasos se mantuvieron con valores menores al 1%. No se detectaron en las muestras el 16:3n3 y 16:4n-1 (Fig. 12).

Al verificar la correspondencia entre los porcentajes de la composición de ácidos grasos totales obtenidos para *Nannochloropsis* sp., *Synechococcus* sp., la mezcla de ambas especies y el resultante en los rotíferos, se encontró una correlación del 0.90, 0.87 y 0.83 respectivamente. Al realizar esta comparación por separado para los saturados, monoinsaturados y polinsaturados, se encontró para *Nannochloropsis* sp. una correlación de 0.97, 0.91 y 0.54 respectivamente. Al utilizar *Synechococcus* sp. se encontró una correlación similar a la anterior especie con de 0.95, 0.80 y 0.76 respectivamente. Mientras que utilizar la mezcla de ambas especies, se evaluó una correlación de 0.97 en saturados y 0.50 a 0.55 para los monoinsaturados y polinsaturados respectivamente.

El análisis de similitud por agrupación utilizando como criterio de clasificación la composición de ácidos grasos para los distintos alimentos y los calculados para los rotíferos, mostró la formación de tres grupos (Fig. 13): *Synechococcus* sp. forma un grupo separado y con menor similitud del resto; el segundo grupo, esta conformado por rotíferos alimentados con *Synechococcus* sp. y rotíferos alimentados con *Nannochloropsis* sp. y en el tercer grupo se asociaron con una alta similitud *Nannochloropsis* sp. y la mezcla de las dos especies con los rotíferos alimentados con la mezcla de ambas especies.

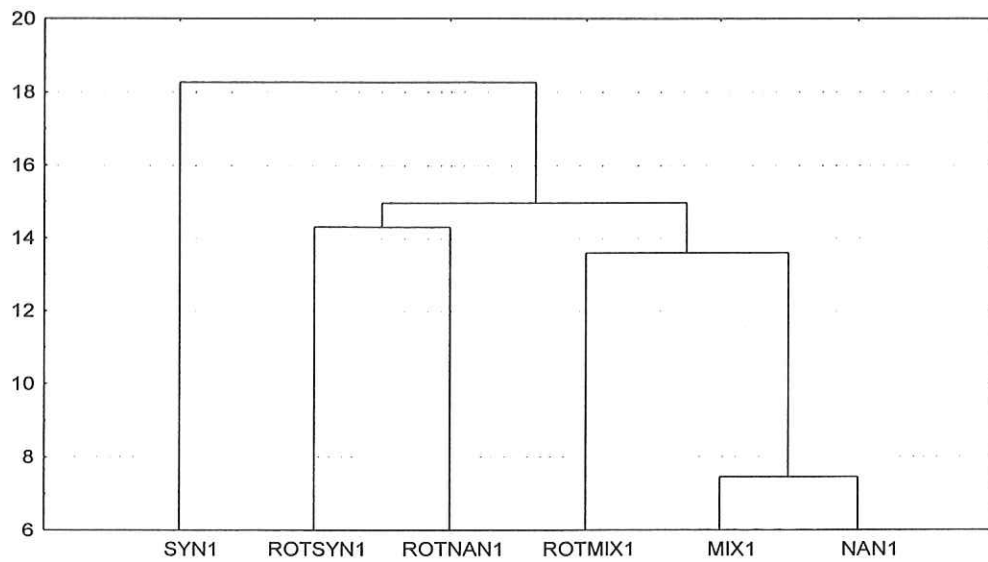


Figura 13. Dendrograma por agrupación obtenidos para los ácidos grasos saturados en *Nannochloropsis* sp. (NAN1), *Synechococcus* sp. (SYN1), la mezcla de ambas (MIX1) y los rotíferos alimentados con la microalga (ROTNAN1), la cianobacteria (ROTSYN1) y la mezcla de las dos especies (ROTMIX1).

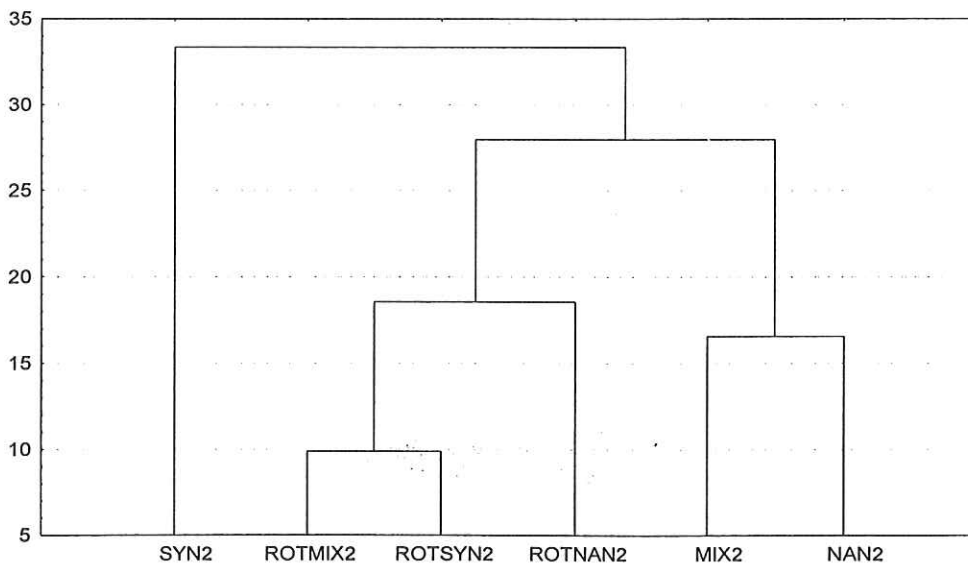


Figura 14. Dendrograma por agrupación obtenidos para los ácidos grasos monoinsaturados en *Nannochloropsis* sp. (NAN2), *Synechococcus* sp. (SYN2), la mezcla de ambas (MIX2) y los rotíferos alimentados con la microalga (ROTNAN2), la cianobacteria (ROTSYN2) y la mezcla de las dos especies (ROTMIX1).

El análisis de similitud por agrupación para los ácidos grasos monoinsaturados (Fig. 14), mostró la formación de tres grupos: *Synechococcus* sp. forma un grupo separado con menor similitud del resto; el segundo grupo, esta conformado por rotíferos alimentados con *Synechococcus* sp. y rotíferos alimentados con la mezcla de las dos especies y con los rotíferos alimentados con *Nannochloropsis* sp. y en el tercer grupo se asociaron con una mayor similitud, *Nannochloropsis* sp. y la mezcla de las dos especies.

En el caso de los ácidos grasos polinsaturados se formaron tres grupos (Fig. 15): los rotíferos alimentados con *Synechococcus* sp. forma un grupo separado y con muy baja similitud del resto; el segundo grupo, se asociaron las mayores similitudes conformado por rotíferos alimentados con la mezcla de las dos especies y *Synechococcus* sp. y con rotíferos alimentados con *Nannochloropsis* sp. y en el tercer grupo *Nannochloropsis* sp. y la mezcla de las dos especies mostraron asociaciones similares a la del segundo grupo.

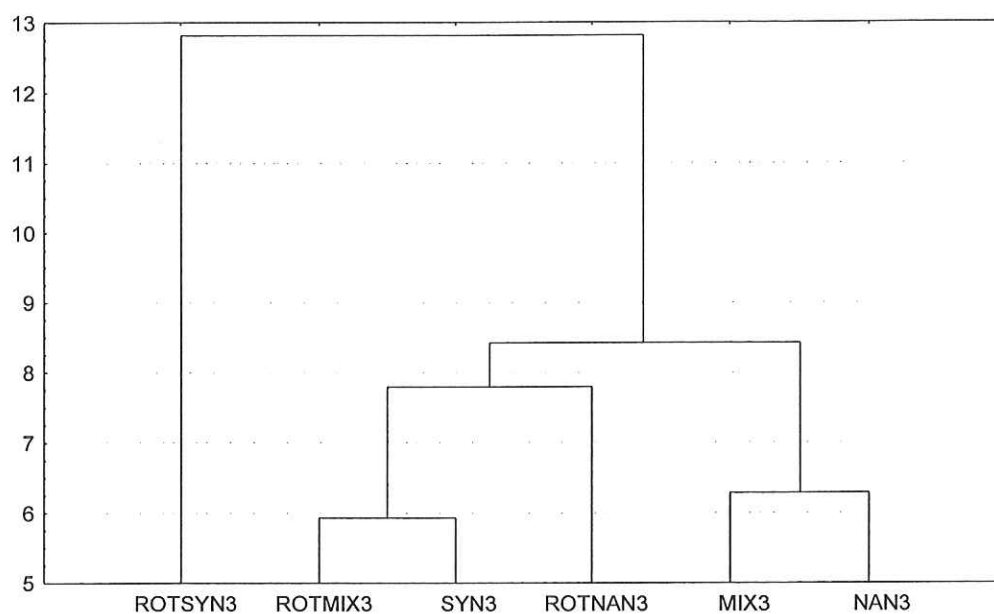


Figura 15. Dendrograma por agrupación obtenidos para los ácidos grasos polinsaturados en *Nannochloropsis* sp. (NAN3), *Synechococcus* sp. (SYN3), la mezcla de ambas (MIX3) y los rotíferos alimentados con la microalga (ROTNAN3), la cianobacteria (ROTSYN3) y la mezcla de las dos especies (ROTMIX3).

IV. DISCUSION

Producción de biomasa de *Nannochloropsis* sp. y *Synechococcus* sp.

Las diferencias en la cantidad de la biomasa producida y en los parámetros poblacionales obtenidos en los cultivos estáticos (matraz Erlenmeyer) para *Nannochloropsis* sp. y *Synechococcus* sp., probablemente se debieron a las diferentes características biológicas y fisiológicas de cada especie cultivada. Debido a que *Nannochloropsis* sp. es una célula eucarionte y *Synechococcus* sp. es una procarionte. Entre ambos grupos existen diferencias importantes en la organización celular y en las respuestas fisiológicas. Las células procariontes se caracterizan por tener una organización celular más simple, realizan la fotosíntesis y la respiración por medio de membranas, el ADN se encuentra distribuido en toda la célula y tienen altas tasas de crecimiento, además de una gran capacidad de tolerar condiciones ambientales extremas como altas temperaturas y bajas concentraciones de oxígeno (Morris, 1981; Lips y Avisar, 1986; Van Den Hoek *et al.*, 1995; Graham *et al.*, 2000).

Existieron diferencias en las tendencias y magnitud de las tasas de crecimiento de las dos especies estudiadas, *Synechococcus* sp. presentó una tasa de crecimiento cerca de un 20 % mayor a la determinada para *Nannochloropsis* sp. Lo anterior probablemente se debió al pequeño tamaño que tiene la cianobacteria (1 μm). Existen antecedentes que mencionan que usualmente existe una relación inversa entre la tasa de crecimiento de diversas especies de microalgas y el tamaño celular (Fogg y Thake, 1987).

Existen pocos antecedentes que mencionen la tasa de crecimiento para las dos especies estudiadas en este trabajo. Brown *et al.* (1993) al mantener cultivos estáticos de *Nannochloropsis oculata* (Droop), con medio de cultivo "f/2", una temperatura promedio de 22 ± 2 °C, un ciclo de luz oscuridad de 12:12 horas y una intensidad de luz de $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Estos autores obtuvieron tasas de crecimiento (0.39 divisiones por día) y concentraciones celulares (22.5×10^6 cel

ml⁻¹) similares a las obtenidas en este trabajo cuando los cultivos alcanzaron la fase exponencial.

James *et al.* (1989) reportaron una tasa de crecimiento promedio de 0.18 divisiones por día para *Nannochloropsis* cepa MFD-2 con una densidad máxima de 28×10^6 cel ml⁻¹ al octavo día durante la fase exponencial. Los cultivos estáticos de esa especie alcanzaron una densidad celular mayor a la reportada por otros autores, la tasa de crecimiento fue inferior probablemente debido a que los cultivos se iniciaron con un inóculo cinco veces mayor. Estos resultados no concuerdan a lo obtenido en este trabajo, ya que se obtuvo una mayor tasa de crecimiento aunque la densidad celular fue menor. Lo anterior puede deberse a que son distintas especies, diferentes cantidades de inóculo y a que estos autores utilizaron otro medio de cultivo (MFD) y una intensidad de luz superior ($140 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$).

Otras investigaciones realizadas para *Nannochloropsis* sp., evalúan tasas de crecimiento similares a las obtenidas en el presente estudio, con un promedio de 0.49 divisiones por día en la fase exponencial, bajo condiciones ambientales de 22 °C, un régimen de luz oscuridad 12:12 h, salinidad de 37.7 ‰ y pH de 8.0 (Carić *et al.* ,1993). La tasa de crecimiento máxima reportada para *Nannochloropsis salina* (1.3 divisiones por día) tiene una tendencia similar con respecto a la obtenida en este trabajo, no obstante las distintas condiciones de temperatura ($20 \pm 1^\circ \text{C}$) e intensidad de luz ($50 \pm 6 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) utilizadas para mantener los cultivos estáticos (Emdadi y Berland, 1989).

Al cultivar *Synechococcus* sp. en sistemas estáticos en matraz Erlenmeyer y con condiciones similares de cultivo (Aguilar-May, 2002), a las utilizadas en este trabajo, se obtuvieron valores practicamente iguales para los parámetros poblacionales y la cantidad de biomasa producida durante el mismo periodo de cultivo. Sin embargo, una diferencia importante entre ambos estudios fue que en

este estudio se utilizó el medio de cultivo "f/2" descrito por Guillard y Ryther (1962) y en el otro trabajo utilizaron medio "f".

Asimismo Christaki *et al.* (1999) describen para la misma especie de cianobacteria, una tasa de crecimiento promedio similar con 0.48 divisiones por día aunque utilizando distinto medio de cultivo (K/10-Cu), una temperatura de $20 \pm 0.5^\circ \text{C}$ e intensidad de luz más baja ($15 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Otros autores han estudiado las tasas de crecimiento para el género *Synechococcus* pero enfocados en la productividad primaria de las zonas costeras y oceánicas. Iturriaga y Marra (1988) mencionan para *Synechococcus* spp. tasas de crecimiento promedio de 0.7 a 1.5 divisiones por día calculadas por medio de dos métodos, autoradiografía (basado en la epifluorescencia) y filtración diferencial respectivamente, en muestreos realizados en el Mar de los Sargazos, al noroeste del Atlántico. Lio *et al.* (1995) encontraron para el mismo género tasas de crecimiento de entre 0.58 a 0.70 divisiones por día, calculadas por medio de un citómetro de flujo, en muestreos realizados en Oahu, Hawaii. Así mismo, Iturriaga y Mitchell (1986), reportan para la Chroococcacea, *Synechococcus* sp. una tasa de crecimiento específico máximo de 1.6 divisiones por día al norte del océano Pacífico. Lo anterior indica que para este género se pueden obtener cantidades de biomasa similares a los reportados en esta investigación, con una menor disponibilidad de nutrientes, diferentes medios de cultivo y bajo condiciones ambientales alternas, ya que esta cianobacteria presenta características cosmopolitas.

Con relación al cálculo teórico del porcentaje de dilución apropiado para mantener estables los cultivos semicontinuos durante la fase experimental, se encontró que para *Synechococcus* sp. se obtuvo un valor de dilución menor que al obtenido para *Nannochloropsis* sp. Debido a las características de crecimiento antes mencionadas para ambas especies, en cultivos en Erlenmeyer, se había

considerado que inicialmente podría obtenerse un mayor porcentaje de dilución para *Synechococcus* sp., ya que tiene elevadas tasas de crecimiento y un pequeño tamaño celular. Se sabe que al mantener diversas especies de microalgas cultivadas en forma semi masiva (20 a 100 litros), se producen altas concentraciones de células que causan un efecto de autosombreado y en consecuencia se produce un efecto de autolimitación por la cantidad de luz disponible (Richmond, 1986). A pesar de que en este trabajo se evaluaron altas tasas de crecimiento de microalgas al pasar de la escala de cultivo en Erlenmeyer, a otras progresivamente mayores estas pueden ser modificadas debido a que distintos factores actúan se tornan limitantes.

Algunos autores realizan el cálculo teórico del porcentaje de la dilución para cultivos semicontinuos de acuerdo a la ecuación descrita por Řičica, 1966 y Droop, 1975. Brown *et al.* (1993) encontraron para *Nannochloropsis oculata* una tasa de dilución más baja a la descrita en este trabajo, aunque bajo distintas condiciones ambientales y realizando dilución cada dos días. Estas diferencias son debidas a la menor tasa de crecimiento que tiene *N. oculata* con respecto a la evaluada en este estudio para *Nannochloropsis* sp.

López-Elías y Voltolina (1993) realizaron cultivos semicontinuos para otras cuatro especies de microalgas (*Pavlova lutheri*, *Phaeodactylum tricomutum*, *Tetraselmis* sp. y *Chaetoceros* sp.) y calcularon los porcentajes de dilución de cada género, que mantuvieron los cultivos en una fase estable (fase exponencial). Asimismo Laing y Helm (1981) mencionan la factibilidad de realizar cultivos semicontinuos para *Tetraselmis suecica*, aunque con un sistema no convencional de iluminación interna. De igual manera Correa-Reyes (1993) menciona la utilización del mismo sistema semi continuo para *Chaetoceros* sp. con diluciones del 50 % por día.

Von Elert y Wolffrom (2001) mencionan para *Synechococcus elongatus* un factor de dilución del 0.25 d^{-1} , pero mantenida a una temperatura promedio de

20 °C, iluminación de $40 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y utilizando medio WC (modificado de Guillard, 1975). En este estudio se determinó un porcentaje de dilución similar, aunque las condiciones ambientales fueron diferentes.

Los trabajos que mencionan cultivos semicontínuos de alguna especie de microalga, regularmente realizan un cálculo previo con base a la tasa de crecimiento para determinar la tasa de dilución teórica y probar en la práctica si realmente el cultivo se mantiene estable. Resulta sorprendente encontrar que casi se nunca lleva a cabo un análisis estadístico, en donde se establezca la significancia de la variación de la concentración de células con respecto al tiempo con respecto al tiempo y la tasa de dilución utilizada para mantener cultivos semicontínuos. La importancia de este control estriba en que no solo basta con mantener estable la cantidad de la biomasa producida, sino también en mantener constante de los diferentes constituyentes celulares (López-Elías, 1990). Por lo tanto, resulta necesario verificar estadísticamente la estabilidad de los cultivos, para producir altas concentraciones celulares, con bajos contenidos de bacterias y con una constancia en la calidad bioquímica de los constituyentes celulares. Lo que finalmente se traduce en una alimentación adecuada de los organismos que consumen estas microalgas.

Crecimiento del rotífero *Brachionus plicatilis*

El crecimiento poblacional del rotífero *Brachionus plicatilis* sustentado con diferentes alimentos se ha estudiado ampliamente (Hirayama *et al.*, 1979; Frolov *et al.*, 1991; Murayama, 1993; Fernández-Reiriz y Labarta, 1996; Rueda-Jasso, 1996). En esos estudios se ha dado un mayor énfasis a la evaluación de la composición bioquímica del rotífero, específicamente al perfil de ácidos grasos, ya que algunos son esenciales para el crecimiento de varias de las especies que los consumen, principalmente durante las primeras etapas de la vida de los peces, moluscos y crustáceos (Ben-Amotz, 1987; Rainuzzo *et al.*, 1989; Nichols

et al., 1989; Whyte y Nagata, 1990; Kissil y Koven, 1990; Brown *et al.*, 1998). Por la importancia del valor nutricional de los rotíferos es necesario considerar no sólo la densidad de alimento suministrado, sino también la calidad obtenida. En este sentido es importante evaluar mediante bioensayos de alimentación con rotíferos la relación que existe entre la calidad y cantidad de alimento adicionado. Además, es importante analizar si los rotíferos fueron cultivados con alimentos vivos (microalgas), o con alimentos artificiales elaborados con ingredientes puros y refinados.

Durante el bioensayo de alimentación realizado en el presente trabajo, donde se alimento al rotífero *Brachionus plicatilis* con *Nannochloropsis* sp., *Synechococcus* sp. y una mezcla de ambas especies en porciones iguales. Se determinó que no existieron diferencias significativas en el crecimiento poblacional. Sin embargo, se encontró un crecimiento aparente mayor en el ensayo en donde se utilizó el alimento mixto, además se presentó una marcada sincronía o periodicidad en el crecimiento de los rotíferos a lo largo del tiempo y esa sincronía fue menos evidente cuando se suministraron por separado *Synechococcus* sp. y *Nannochloropsis* sp.

Rueda-Jasso (1996), describió el crecimiento poblacional de *Brachionus plicatilis*, alimentado en forma individual con *Nannochloris* sp. y *Nannochloropsis* sp. en concentraciones de 25×10^6 cel ml^{-1} por día. Este autor obtuvo densidades de 233 a 193 rot ml^{-1} respectivamente para ambas especies de microalgas. Aunque las condiciones ambientales de cultivo se asemejan a las utilizadas en este trabajo, la densidad resultó menor. Esto quizás se debió a que la concentración del alimento suministrado fue menor, la densidad inicial de rotíferos y el tipo de sistema de cultivo fue diferente.

Para cultivos del rotíferos *Brachionus plicatilis* alimentados con *Phaeodactylum tricornutum* y *Nannochloropsis* sp. y en condiciones ambientales muy similares a

la de este trabajo (con un ciclo luz-oscuridad 12:12 h e intensidad de luz más baja), las tasas de crecimiento máximas fueron de 0.51 y 0.49 divisiones por día respectivamente (Carič *et al.*, 1993). Para los rotíferos alimentados con *Nannochloropsis* se registró una tasa de crecimiento mayor a la encontrada en este trabajo, aunque con la mezcla de ambas especies, la tasa de crecimiento fue muy similar a la descrita al utilizar como alimento *Phaeodactylum tricornutum*. Estas diferencias en las tasas de crecimiento probablemente se debieron a las técnicas de cultivo, la concentración celular del alimento, así como a la fase de crecimiento en que se realizó la cosecha, a la densidad inicial de rotíferos, a la frecuencia de cosecha de los rotíferos y a la duración del cultivo.

En el caso de los rotíferos alimentados con cianobacterias hay pocos antecedentes que mencionen su tasa de crecimiento. En un estudio que utilizaron como alimento *Spirulina* sp. liofilizada (Rueda-Jasso, 1996) la densidad de rotíferos fue menor con respecto a la obtenida suministrando como alimento a *Nannochloris* sp. y *Nannochloropsis* sp. Sin embargo, el uso de *Spirulina* sp. con esta presentación limita el uso de microalgas vivas, es un alimento barato, fácilmente accesible en el mercado y su manejo no requiere de mano de obra especializada, pero el inconveniente es que se precipitan y no contienen los componentes nutrimentales necesarios para enriquecer al rotífero y permitir su buen crecimiento y adecuado valor nutricional.

Hirayama *et al.* (1979) reportan que la tasa de crecimiento intrínseca para una cepa de *Brachionus plicatilis* con reproducción por partenogénesis y alimentada con ocho especies de microalgas: *Chlamydomonas* sp. ($190 \mu\text{m}^3$), *Mochrysis lutheri* ($85 \mu\text{m}^3$), *Dunaliella tertiolecta* ($170 \mu\text{m}^3$), *Cyclotella cryptica* ($400 \mu\text{m}^3$), *Nitzschia closterium* ($140 \mu\text{m}^3$) y dos especies de *Eutreptiella* sp. ($1300 \mu\text{m}^3$). Se encontró un mayor crecimiento y sobrevivencia al utilizar como alimento *Chlorella* sp. marina y *Synechococcus elongatus*. En este trabajo no se

menciona la composición de las microalgas, el sistema de cultivo utilizado, y no utilizó un método comparativo para normalizar la ración del volumen del cultivo de las ocho especies utilizadas como alimento. A pesar de lo anterior, sus resultados concuerdan con lo obtenido en este trabajo con respecto a la mejor eficiencia en crecimiento al utilizar como alimento especies de tamaño pequeño.

Se ha reportado que *B. plicatilis* selecciona el tamaño de las partículas alimenticias que consume (Chiotiyaputta y Hirayama, 1978; Rothhaupt, 1990). Por lo tanto, ambos géneros pueden ser suministrados preferentemente en mezcla (proporciones iguales) o en forma individual, obteniendo con ello un crecimiento adecuado en el rotífero estudiado en este trabajo.

Composición bioquímica del alimento

Existen diversas investigaciones que describen la composición proximal para una especie del género *Nannochloropsis* sp. e.g. Ben-Amotz *et al.* (1987), al mantener cultivos de *Nannochloropsis salina* cultivada a 22 °C, con iluminación continua e intensidad de 10 W m⁻², reportan porcentajes de proteínas de 23.3, carbohidratos de 24 y lípidos 14.5. Los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerda con lo mencionado por estos autores para proteínas y lípidos, excepto para los carbohidratos ya se obtuvo cerca de un 50 % menos.

Brown *et al.* (1997) describen la composición química del género *Nannochloropsis*, al mantener varias especies en cultivo estáticos con una temperatura de 25 °C, con una intensidad de 70-80 µE m⁻² s⁻¹ y un ciclo luz oscuridad de 12:12 h. Se evaluó la composición química de las células durante la fase exponencial y se determinó 35 % para proteínas, 10 % de lípidos y 8 % de carbohidratos. Los resultados obtenidos en la composición química obtenida en los cultivos semicontinuos de *Nannochloropsis* sp. son similares a la descrita por estos autores, debido a que a pesar de las diferencias en las condiciones ambientales se evaluó la composición en la fase de crecimiento

exponencial y los cultivos semicontinuos se mantienen en fase de crecimiento exponencial por efecto de la tasa de dilución utilizada.

Renaud *et al.* (1991) mencionan que al mantener cultivos de *Nannochloropsis oculata* en forma semicontinua, con una temperatura de 25 ± 1 °C, una salinidad de 25 ‰, un ciclo luz oscuridad 12:12 h, diferentes intensidad de luz y utilizando un medio enriquecido con fertilizantes agrícolas. Estos autores encontraron que la composición química de las células fue 37 % para proteínas, 35 % de lípidos y 10 % de carbohidratos. Los resultados obtenidos en los cultivos semicontinuos de *Nannochloropsis* sp. son similares únicamente en los valores de carbohidratos, ya que los porcentajes de proteínas obtenidos en ese estudio resultaron cerca de un 30 % mas y los lípidos cerca de un 70 % mayor. Estas marcadas diferencias pueden ser debidas que estos autores utilizaron sulfato de amonio como aporte químico de nutrientes y a que los cultivos fueron mantenidos al exterior.

Con respecto al género *Synechococcus* sp. existen pocos trabajos que mencionen su composición bioquímica. e.g. Becker (1986) describió para el mismo género un porcentaje de proteínas más alto al reportado en esta investigación (63 %). Mientras que el contenido de lípidos y carbohidratos se encontraron en proporciones similares (11 y 15 % respectivamente). Ward *et al.* (2000) mencionan que en poblaciones naturales de tapetes microbianos, *Synechococcus* sp. presenta un contenido de proteínas y carbohidratos semejante a los evaluados en este trabajo con valores de entre 45 y 15 % respectivamente, aunque los lípidos se registraron en mayores porcentajes. Estas diferencias pueden deberse a que los autores evalúan una población natural, sin control de factores ambientales ni de la población de la cianobacteria.

Con respecto a la composición de pigmentos en microalgas mantenidas en cultivos para uso en la acuicultura, existen muy pocos antecedentes comparativamente a lo mencionado en estudios de productividad primaria. Se conoce que la clorofila *a* puede contribuir con una mayor proporción de magnesio debido a la composición de la estructura de la molécula, ya que este elemento es utilizado como cofactor enzimático (South y Whittick, 1987). Estos pigmentos son catabolizados en condiciones ácidas, e.g. en sistemas digestivos, y por reacciones enzimáticas se pueden remover los esteres de fitol. Por lo anterior las clorofilas y sus productos de degradación tienen un papel muy importante en la nutrición animal. Los carotenoides son considerados esenciales en la nutrición de crustáceos, ya que son precursores de vitamina A y presumiblemente pueden contribuir en la nutrición de peces y moluscos (Brown *et al.*, 1989).

La microalga *Nannochloropsis* sp. y cianobacteria *Synechococcus* sp, únicamente presentan clorofila *a* y carotenoides, carecen de clorofila *b* y *c* (Cox, 1980; Van Den Hoek *et al.*, 1995; Graham *et al.*, 2000). Los carotenoides se presentaron en ambos organismos pero en menores cantidades a la clorofila *a*. En *Nannochloropsis* sp. el contenido de clorofila *a* fue mayor que en *Synechococcus* sp. pero los porcentajes de carotenoides no son diferentes entre ambos grupos.

Renaud *et al.*, (1991) menciona para *Nannochloropsis oculata* cultivada en medio Walne, un ciclo luz-oscuridad de 12:12 h, y bajo una intensidad de luz entre 100 a 107 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, una concentración promedio de clorofila *a* de 0.2 μg (1×10^6 cel), muy similar al calculado para *Nannochloropsis* sp. de este trabajo, aunque a una intensidad luminosa un poco mayor. Lubian y Establier (1983), reportan para *Nannochloropsis gaditana* al mantenerla en cultivo con medio MSN con un aporte de nitrógeno, fósforo y iones, suministraron una intensidad lumínica de entre 40 a 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, una temperatura de 20 a 21 °C. En ese

estudiose evaluaron similares concentraciones de clorofila *a* y carotenoides totales, con respecto a las determinadas en el presente trabajo, aunque las condiciones ambientales de cultivo se mantuvieron diferentes. Mientras que Sukenik y Carmeli (1990) al mantener cultivos estáticos de *Nannochloropsis* sp. a una temperatura de 25 °C, utilizando como medio de cultivo el "f/2", una intensidad de 288 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y ciclo luz-oscuridad de 12:12 h. En ese trabajo determinan una concentraciones de clorofila *a* entre 0.8 y 1.2 mole cel⁻¹ y carotenoides entre 0.4 a 0.7 mole cel⁻¹ respectivamente.

Existen otros trabajos en su mayoría relacionados a productividad primaria, donde *Synechococcus* sp. es una especie representativa del ultraplankton, por consiguiente se han realizado análisis de pigmentos con respecto a la abundancia de esta cianobacteria (Iturriaga y Marra, 1988; Glover *et al.*, 1988; Olson *et al.*, 1988; Prézelin *et al.*, 1989).

En diversas microalgas la composición bioquímica puede ser modificada mediante la variación de los distintos factores ambientales, principalmente: cambios en la concentración del nitrógeno y del fósforo en el medio, por cambios físicos tales como la presión osmótica, la intensidad de la radiación, la temperatura y los parámetros fisiológicos como la edad del cultivo, la densidad celular, el crecimiento durante ciclos de luz-oscuridad o con iluminación continua (Becker, 1986). Es importante mencionar que en los estudios que mencionan la composición proximal de distintas especies de microalgas, también se utilizan distintas técnicas para la evaluación proximal, por lo tanto es muy importante considerar las técnicas de análisis para poder realizar comparaciones entre distintos trabajos. Lo anterior puede resultar en variación de los resultados entre las investigaciones antes mencionadas.

Por lo anterior, otro aspecto importante a considerar al comparar los constituyentes celulares en microalgas, es tener en consideración el método

utilizado para realizar la determinación y en su caso optimizar las condiciones de extracción. Debido a que pueden obtenerse variaciones significativas en el porcentaje de proteínas, según las condiciones de extracción (Correa-Reyes, 2001).

Aminoácidos

En cuanto al perfil de aminoácidos la microalga presenta un mayor porcentaje en casi todos los aminoácidos con respecto a los evaluados en la cianobacteria, puesto que lisina se presentó como la mayor fracción en *Synechococcus* sp. e inclusive fue el aminoácido con porcentaje más alto en el bioensayo. En la cianobacteria no se detectaron dos aminoácidos, histidina y metionina. En la mezcla de ambas especie, se determinó que los resultados obtenidos no reflejan la combinación de aminoácidos presentes en forma individual en *Nannochloropsis* sp. y *Synechococcus* sp., ya que los valores que se registraron en la mezcla de especies fueron similares a los encontrados para la cianobacteria y en algunos casos con menores valores.

Algunos autores como Sukenik *et al.* (1993a) describen el contenido de aminoácidos para *Nannochloropsis* sp. en cultivos al exterior durante las cuatro estaciones del año. Los aminoácidos prolina y lisina, se presentaron con mayores proporciones, seguido de glutamato, leucina y aspartato. Los resultados obtenidos en este estudio muestran resultados similares en cuanto a los aminoácidos presentes en mayor abundancia prolina y glutamato.

James *et al.* (1989) analizaron la composición de aminoácidos para una cepa de *Nannochloropsis*, en cultivos mantenidos a diferentes temperaturas. Al comparar los resultados obtenidos por estos autores (James *et al.* 1989; Sukenik *et al.*, 1993a), se encontró que el perfil de aminoácidos evaluados a 25 °C, presentan similar composición a los analizados en el presente estudio. Brown *et al.* (1993) menciona para *Nannochloropsis oculata* durante la fase logarítmica, porcentajes

elevados de lisina, aspartato, glutamato, prolina, alanina, arginina, glicina, isoleucina, leucina, fenilalanina, serina, treonina, tirosina y valina. En este estudio encontramos similares porcentajes para los cuatro primeros aminoácidos mencionados por Brown *et al.* (1993).

Para la cianobacteria *Synechococcus* sp. no se encontraron referencias en cuanto a estudios que hayan determinado la composición de aminoácidos de esta especie, sólo se reportan análisis para otras cianobacterias, particularmente *Spirulina* sp.

Ácidos grasos

La composición de ácidos grasos presentes en las células muestran que los ácidos grasos saturados, especialmente el 16:0 tiene altos porcentajes. Resultando mayor en *Synechococcus* sp., aunque en la microalga *Nannochloropsis* sp. se identificaron un mayor número de saturados. La combinación de las dos especies muestra una tendencia similar a lo reportado para la microalga *Nannochloropsis* sp. El ácido graso monoinsaturados como el 16:1n-7 apareció en gran porcentaje, correspondiendo a la microalga el valor mas grande, seguido de la mezcla y por último la cianobacteria. El 18:1n-9 y 20:1n-11 reportado para *Synechococcus* sp. presentó cantidades altas con respecto a los demás tratamientos, siendo este último no identificado en la microalga, ni en la mezcla, aunque en esta cianobacteria no presentó el 18:1n-5 y 22:1n-7. Los ácidos grasos polinsaturados como el 18:2n-6t se presentaron con valores altos en los tres tratamientos, siendo la mezcla de las dos especies de microalgas la que registró el porcentaje más alto seguido de la microalga y por último la cianobacteria. El ácido graso 20:5n-3 se presentó en mayores porcentajes para *Nannochloropsis* sp. y la mezcla de las especies utilizadas como alimento.

Entre los estudios del perfil de ácidos grasos en *Nannochloropsis* sp. se encuentran los realizados por James *et al.* 1989; Mourente *et al.* 1990; Hodgson *et al.* 1991; Dunstan *et al.* 1993; Sukenik *et al.* 1993; Renaud *et al.* 1993. Mencionan similares cantidades de los ácidos grasos 14:0, 15:0, 16:0, 18:0, 20:0, 16:1, 16:1n-7, 16:1n-9, 18:1n-7, 18:1n-9, 18:4n-3, 22:1n-9 y 22:5n-6. Con excepción de los ácidos grasos 18:1n-9, 18:2n-6, 20:4n-6 y 20:5n-3 que se presentaron en mayor proporción con respecto a los registrados en este trabajo. Estas diferencias se debieron principalmente a la utilización de diferentes medios de cultivo y al tiempo de duración del experimento que manejaron los diferentes autores.

Para la cianobacteria *Synechococcus* se encontró un sólo trabajo realizado por Kenyon en 1972. En ese estudio se hace mención de treintacuatro cepas del género *Synechococcus*, que fueron mantenidas en diferentes intensidades de luz, temperaturas y utilizando tres medios de cultivo (BG11, Van Baalen y Kratz y Meyers). El contenido de los ácidos grasos saturados entre las distintas cepas, fue diferente a lo evaluado en esta investigación. Por ejemplo, en este estudio no se detectó la presencia del 14:0 y 16:0. Sin embargo el 18:0 se muestra con un valor similar al que reporta Kenyon (1972). Los ácidos grasos monoinsaturados como el 16:1 presentó un porcentaje mayor y el 18:1 registró un similar porcentaje al descrito en este trabajo. Los polinsaturados como el 18:2 presentaron valores demasiado bajos al igual que en este trabajo. Algunas de las cepas presentan altos contenidos de ácidos grasos polinsaturados de la familia linoléico y linolénico con respecto a lo reportado en este estudio para *Synechococcus* sp.

La composición bioquímica obtenida para la mezcla de la microalga y la cianobacteria en porciones similares nos dice lo importante que resulta realizar esta combinación, ya que en la mayoría de los casos se mejora la calidad nutricional del tipo de alimento como fue observado en este estudio en cuanto la

composición de los macronutrientes y micronutrientes. Tobias-Quinto y Villegas (1982) y D'Sauza y Loneragan (1999) mencionan la utilización de mezclas de microalgas para alimentar a larvas de camarones del género *Penaeus* sp. mejorando considerablemente el crecimiento y la sobrevivencia de este organismo. Rodhouse *et al.*, (1983), Epifanio (1979) y Fidalgo *et al.*, (1994) mencionan esta mejora en moluscos bivalvos como mejillones *Mytilus galloprovincialis*, ostiones *Ostrea edulis* y *Crassostrea virginica* y almejas *Mercenaria mercenaria*.

Composición bioquímica de *Brachionus plicatilis*

La composición proximal del rotífero *Brachionus plicatilis* alimentado con microalgas y compuestos preparados artificialmente con elementos refinados por su aporte nutricional, ha sido ampliamente estudiado a lo largo de tres décadas (Ben-Amotz *et al.*, 1987; Whyte y Nagata, 1990; Murayama y Hirayama, 1993; Lubzens *et al.*, 1995; Nichols *et al.*, 1996; Rodríguez *et al.*, 1996; Fernández y Labarta, 1996; Harzevilil *et al.*, 1998; Gallardo *et al.*, 2001). Sin embargo a pesar de que existe una gran cantidad de literatura relacionada con este tema, todavía existen muchas preguntas a cerca de cuales son las características del alimento adecuado para rotíferos. Además hace falta información relacionada con el uso de métodos alternativos para enriquecer la calidad nutritiva de los rotíferos y evaluar la eficiencia de transferencia de la composición química de la microalga suministrada como alimento y la resultante en el rotífero.

En este estudio se pudo evaluar que los rotíferos asimilaron de forma poco variable los diferentes componentes bioquímicos presentes en los tres tipos de alimento suministrado, ya que fueron transferidos en gran parte a la fracción proximal del rotífero, siendo más evidente en los cultivos de rotíferos alimentados con *Nannochloropsis* sp. y *Synechococcus* sp. Las mayores diferencias se presentaron en la fracción de carbohidratos al utilizar como alimento *Synechococcus* sp. y la mezcla de ambas especies, ya que los rotíferos

contenían casi la mitad de la fracción con respecto al alimento vivo, esto probablemente se presentó porque el rotífero utilizó los carbohidratos como principal aporte de energía. En cuanto al porcentaje de proteínas se observó que *Nannochloropsis* sp. y la mezcla de ambas especies utilizadas como alimento, presentaron porcentajes de proteína más bajos a los calculados en los rotíferos que recibieron este tipo de alimento. Lo anterior se debió posiblemente a una respuesta fisiológica del rotífero y/o a la capacidad de sintetizar proteínas a partir de los componentes presentes en el alimento consumido.

Los principales trabajos que describen el aporte nutricional de *Nannochloropsis* sp. hacia *Brachionus plicatilis*, son los mencionados a continuación, Ben-Amotz *et al.*, (1987) al utilizar *N. salina* como alimento de los rotíferos evaluaron un menor porcentaje proteínas, mayores porciones de carbohidratos y lípidos comparandolo con lo obtenido en este trabajo para el mismo género de microalga.

Carić *et al.* (1993), describen que al utilizar *Nannochloropsis* sp. cosechada en la fase exponencial y utilizada como alimento para el rotífero *Brachionus plicatilis*, la composición química resultante fue que el porcentaje de proteínas fue el principal componente en el rotífero, seguido de los lípidos. En este estudio se registró una similar concentración para proteínas y lípidos, mientras que los carbohidratos se presentaron en mayor proporción comparativamente a los resultados obtenidos por estos autores.

Con respecto a antecedentes de trabajos que realicen bioensayos en donde se alimenten rotíferos con *Synechococcus* sp. sólo se encontró en la literatura a cerca de este tema, el estudio realizado por Hirayama *et al.* (1979). Este autor menciona que la especie *Synechococcus elongatus* puede ser utilizada para obtener mayor crecimiento en *Brachionus plicatilis*. Al utilizar la cianobacteria *Synechococcus* sp., se puede mencionar que además del pequeño tamaño que

tiene ésta especie, reúne los requerimientos nutritivos para poder ser utilizada como alimento para este rotífero y por consiguiente se pudiera suministrar también para algún otro tipo de cultivo de zooplancton, por ejemplo: Artemia y copépodos ya que son grupos de organismos que tienen una gran demanda de utilización como alimento en la acuicultura.

Mientras que la composición proximal de rotíferos obtenida en el tratamiento en donde se suministró como alimento una mezcla de *Nannochloropsis* sp. y *Synechococcus* sp., se obtuvieron altas correlaciones de las distintas fracciones proximales analizadas. Se encontró, que las proteínas fueron el mayor componente obtenido, seguido de carbohidratos y por último los lípidos. Aunque no se encontró algún antecedente que mencionara la utilización de estas dos especies, se sabe que utilizar dos o más especies de microalgas como alimento, proporcionan mejoría no sólo en la composición bioquímica, sino también en la tasa de crecimiento del organismo que las consume (Richmond, 1990). Lo anterior, correspondió a los resultados de crecimiento obtenidos para el rotífero alimentado con la mezcla de especies utilizadas como alimento en el bioensayo.

Por lo anterior, se puede mencionar que este tipo de rotífero puede ser alimentado con microalgas suministradas de forma individual o en mezcla, según lo requerido, en cuanto a la composición bioquímica o densidad celular. Ya que el utilizar estas especies como alimento, transfieren al rotífero de manera importante los compuestos nutritivos que componen el alimento.

Áminoácidos

Para los cultivos de rotíferos *Brachionus plicatilis* utilizando como alimento las dos especies de microalgas en forma individual y mezclada, presentaron un mayor contenido de glutamato, aspartato, isoleucina y arginina. Mientras que alanina fue el aminoácido en menor cantidad registrado en el tratamiento en donde los rotíferos fue alimentado con *Nannochloropsis* sp., seguido de prolina,

registrado en los organismos alimentados con la mezcla, por último metionina e histidina contenidos en los tres tratamientos de alimentación.

Tamaru *et al.* (1993), mencionan que para el rotífero *Brachionus plicatilis* (tipo s) alimentado con *Nannochloropsis oculata*, presenta bajas proporciones de aminoácidos, con respecto a las calculadas en este trabajo. De igual manera Dendrino y Thorpe (1987), mencionan el perfil de aminoácidos para el mismo tipo de rotífero utilizado en este trabajo pero alimentado con *Nannochloropsis oculata* e *Isochrysis tahitiana*, evaluando que los rotíferos presentaron un mayor contenido de alanina y valores similares de glutamato, aspartato, arginina e histidina. En ese estudio resultó que la prolina, metionina e isoleucina fueron los aminoácidos con menor porcentaje, comparativamente a los resultados con los registrados en este estudio. Watanabe *et al.* (1983), describen para *Brachionus plicatilis* el contenido de aminoácidos después de un proceso de alimentación con *Chlorella minutissima*, en donde se encontró que los aminoácidos aspartato y glutamato fueron más representativos, aunque en menor cantidad a los reportados en este trabajo. Mientras que Frolov *et al.* (1991), describen para el rotífero *Brachionus plicatilis* mantenidos en bioensayos de alimentación con diferentes especies de microalgas. Evalúan una mayor fracción de alanina y prolina, con similar porcentaje de glutamato en los rotíferos. Sin embargo, el contenido de aspartato, isoleucina, arginina, metionina e histidina fue en menores proporciones a las determinadas en el presente estudio.

En cuanto a los rotíferos que fueron mantenidos con una alimentación con base al suministro de la cianobacteria *Synechococcus* sp., se observaron similares contenidos entre los tres tipos de alimento suministrados. Resultó únicamente la alanina con un mayor contenido en los rotíferos alimentados con la cianobacteria. Para los cultivos de rotíferos que se les suministró la mezcla de ambas especies, presentaron una similar porción de aminoácidos al que fue determinado para *Nannochloropsis* sp. y *Synechococcus* sp., siendo únicamente

la prolina la que se presentó en menores porcentajes. Sin embargo, los porcentajes de prolina en la microalga y la cianobacteria suministrada en forma individual a los cultivos de rotíferos fueron más altos. Para este estudio podemos mencionar que en algunos casos e.g. aspartato, glutamato, arginina, isoleucina y fenilalanina que presentaron bajas proporciones en el alimento y los resultantes en los cultivos de rotíferos fueron evaluados en mayores concentraciones. Aparentemente los rotíferos pudieron sintetizar mayor proporción de algunos aminoácidos que no fueron abundantes en el alimento suministrado.

Existen pocas investigaciones que describan del aporte de aminoácidos de esta cianobacteria *Synechococcus* sp. específicamente hacia el rotífero *Brachionus plicatilis* y menos aún al utilizarla como alimento en forma mixta como fue en este estudio. Si bien existe otro estudio (Rueda-Jasso, 1996), que menciona la composición proximal de cultivos de rotíferos utilizando como alimento otra cianobacteria (*Spirulina*), en ese trabajo sólo se analizaron los macro componentes bioquímicos y no los compuestos finos, en su caso los perfiles de aminoácidos y ácidos grasos.

El perfil de aminoácidos en el rotífero *Brachionus plicatilis* registrado en el bioensayo, nos sugiere que este organismo puede ser utilizado para alimentar algunas larvas de peces como el lenguado *Solea solea*, la carpa *Catla catla* y el camarón "Kuruma" *Penaeus japonicus* (Dendrinós y Torpe, 1987; Brown *et al.*, 1989; Ravi y Devaraj, 1991), ya que algunos aminoácidos como la arginina, metionina, treonina, valina, fenilalanina isoleucina e histidina satisfacen adecuadamente en porcentaje los requerimientos de este nutriente esencial para los anteriores organismos.

Ácidos grasos

En cuanto al perfil de ácidos grasos para el rotífero *Brachionus plicatilis*, mantenido a tres tratamientos de alimentación con una microalga, una

cianobacteria y la combinación de las dos. Se puede mencionar que se presentaron altas cantidades de ácidos grasos saturados en los tres ensayos, como el 14:0, 16:0 y 18:0, aunque para el 16:0 se reportó como el ácido graso que presentaba los mayores porcentajes. Los resultados obtenidos para los rotíferos alimentado con la mezcla de ambas especies de microalgas, se encontró bajos porcentajes de 15:0, 20:0 y 22:0. Los monoinsaturados que presentaron valores altos en los tres ensayos fueron el 16:1n-7, 18:1n-9, 18:1n-7 y 18:1n-5, aunque el que presentó los más altos porcentajes fue 16:1n-7 presente en los rotíferos alimentados con la microalga. Los ácidos con valores menores presentes en los tres ensayos fueron el 22:1n-11 y 22:1n-7. Los ácidos grasos polinsaturados con mayor porcentaje en los tres ensayos fueron el 18:2n-6c y 18:2n-6t, aunque el 20:4n-6 y 20:4n-3 presentaron valores de consideración en el ensayo donde al rotífero se mantuvo alimentando con la cianobacteria con respecto a los sometidos con la microalga y mezcla. Mientras que el 20:5n-3 y 22:4n-3 fueron altos en el ensayo utilizando la microalga con respecto a los demás ensayos. El resto de los ácidos grasos polinsaturados en los tres ensayos no superaban el 1 %.

Ben-Amotz *et al.* (1993), menciona la composición bioquímica del rotífero *B. plicatilis* mantenido bajo un proceso de alimentación con la microalga *Nannochloropsis salina*. En la cual describen una alta transferencia de ácidos grasos que contiene la microalga hacia el rotífero. Esta misma tendencia se obtuvo en este estudio utilizando *Nannochloropsis* sp., aunque existieron algunas diferencias en los ácidos grasos saturados 14:0 y 16:0 con menores valores, aunque el ácidos monoinsaturados 16:1n-7 y el polinsaturado 20:5n-3 se encontraron en fracciones mayores con respecto a lo evaluado en este trabajo. Por otra parte Lubzens *et al.* (1995) describen el perfil de ácidos grasos en el rotífero *Brachionus plicatilis* alimentado con *Nannochloropsis* sp. Donde se observa una tendencia muy similar en cuanto a los valores reportado para los ácidos 14:0, 16:0, 16:1, 18:0, 18:1n-7, aunque otros ácidos de importancia como

18:1n-9, 18:2, 20:4n-6, 20:5n-3 y 22:5n-3 se presentaron con valores mayores con respecto a los valores reportados en este estudio.

Por otra parte en el ensayo en donde a los cultivos de rotíferos se suministró como alimento *Nannochloropsis* sp., *Synechococcus* sp., y la mezcla de ambas especies, existen muy pocos antecedentes que describan el aporte nutritivo de esta cianobacteria.

Durante los bioensayos de alimentación del rotífero *Brachionus plicatilis* se presentó un efecto de síntesis de ácidos grasos a partir de otros compuestos químicos, ya que la composición de ácidos grasos para el rotífero resultó mayor en cuanto al número de ácidos grasos identificados con respecto a los identificados para las dos especies en forma individual y mixta. Lo descrito con anterioridad, se observa en el bioensayo en donde se suministró a *Brachionus plicatilis* como alimento *Synechococcus* sp., ya que aumento significativamente la proporción de ácidos grasos. Lo anterior se ve reflejado en los distintos valores de correlación obtenidos, considerando la forma de los ácidos grasos en el alimento y los rotíferos. Se encontró que a pesar de existir altos valores de correlación para *Synechococcus* sp. y los rotíferos alimentados con esta especie, existió una marcada diferencia en el contenido total de ácidos grasos principalmente del tipo polinsaturados (18:2n-6t y 20:5n-3). Estas diferencias se vieron reflejadas principalmente en el contenido de ácidos grasos polinsaturados.

Durante los bioensayos de alimentación del rotífero *Brachionus plicatilis* aparentemente se presentó un efecto de síntesis de ácidos grasos, según lo menciona Lubzens *et al.*, (1985), ya que la composición de ácidos grasos para el rotífero resultó mayor en cuanto al número de ácidos grasos identificados con respecto a los identificados en el alimento suministrado en forma individual y mixta. Lo anterior resulta más evidente en el caso en donde se suministró a los

rotíferos como alimento *Synechococcus* sp., ya que aumento significativamente la proporción de ácidos grasos.

Se encontró que a pesar de existir altos valores de correlación entre la cantidad y tipo de ácidos grasos evaluados para *Synechococcus* sp. y los resultantes en los rotíferos alimentados con esta especie, existió una marcada diferencia en el contenido total de ácidos grasos principalmente del tipo polinsaturados (18:2n-6t y 20:5n-3). Estas diferencias se vieron reflejadas principalmente en el contenido de ácidos grasos polinsaturados.

Con el análisis por agrupación realizado para ver la correspondencia en la composición del tipo de ácidos grasos suministrados como alimento y el resultante en el rotífero, resulta evidente que al utilizar *Synechococcus* sp. como alimento conforma un grupo separado. El análisis de agrupación permite tener de forma gráfica y clara los resultados obtenidos con los valores de correlación para cada situación experimental. Posiblemente los ácidos grasos del tipo de los saturados y los monoinsaturados fueron elongados y desaturados por parte del rotífero, para formar los ácidos de cadena larga.

Los ácidos grasos polinsaturados como el 20:5 (n-3) y sus productos de elongaciones y desaturaciones como el 22:6 (n-3), son el principal componente de membranas de organismos marinos y son considerados elementos esenciales en la dieta suministrada (Dunstan *et al.*, 1994). En estudios relacionados con la calidad de los cultivos de microalgas mantenidos con distintas condiciones experimentales, muestra que en dependencia de éstas se pueden obtener cambios importantes en la cantidad y tipo de lípidos producidos. Además de que en dependencia de las enzimas de descarboxilación se puede reducir la cantidad de ácidos grasos considerados como esenciales (Zhukova y Aizdaicher, 1995).

Se menciona en la literatura que una alta proporción de ácidos grasos polinsaturados (n-3) y (n-6) son considerados un buen indicador del valor nutrimental para otros organismos (Watanabe *et al.*, 1983). Lo anterior debe ser tomado como un indicador aproximado, ya que también se tiene que considerar la proporción de todos los ácidos grasos, ya que algunos de ellos pueden resultar esenciales y estar presentes en muy bajas proporciones (Volkman *et al.*, 1989). Este último autor menciona que se requieren mas estudios para identificar ácidos grasos polinsaturados obtenidos en cultivos de diversas especies de microalgas y evaluar su papel en la fisiología nutricional del organismo que las consume.

En el presente estudio donde se analizó el perfil de ácidos grasos para *Brachionus plicatilis* obtenido en el bioensayo nos permite determinar la utilidad del rotífero como alimento para distintas larvas de peces marinos. Dada la composición del rotífero de los ácidos saturados, monoinsaturados y especialmente los polinsaturados (n-3 y n-6). Entre los organismos que se pudieran alimentar con los rotíferos se encuentran el pargo japonés *Pagrus major*, la dorada *Sparus aurata*, el róbalo *Lates calcarifer* (Koven *et al.*, 2001; Watanabe, 1993; Sargent *et al.*, 1997)

V. CONCLUSIONES

La cianobacteria *Synechococcus* sp. presentó la mayor tasa de crecimiento (1.82 ± 0.15 divisiones por día) con respecto a la obtenida para la microalga *Nannochloropsis* sp. al ser mantenidas en cultivos a escala de matraz Erlenmyer.

Se encontró el porcentaje de dilución para *Nannochloropsis* sp. (30 %) y *Synechococcus* sp. (20 %) que permitió obtener una constancia en la cantidad de células cosechadas por día en los cultivos semicontinuos.

La mayor densidad y constancia de la cosecha de cultivos de *Brachionus plicatilis* (214 ± 9.64 rot ml^{-1}) se presentó cuando estos organismos fueron alimentados con una mezcla de dos especies en proporciones iguales (*Synechococcus* sp. y *Nannochloropsis* sp.).

Se evaluaron las condiciones óptimas para la extracción de las proteínas celulares. Para las especies de *Synechococcus* sp. y *Nannochloropsis* sp. se determinó NaOH al 0.2 N. Para el caso de la mezcla de las dos especies se determinó valores de 0.3 N. Para los tres casos se recomienda utilizar una temperatura de 100 °C por 15 minutos.

Las células de *Synechococcus* sp. producidas en cultivos semicontinuos presentaron los mayores porcentajes de proteínas (44.44 %). Se evaluó un alto porcentaje de lípidos en *Nannochloropsis* sp. (11.94 %).

El mayor contenido de clorofila *a* se encontró para *Nannochloropsis* sp. con $0.16 (1 \times 10^6 \text{ células } \text{ml}^{-1})$ y los carotenoides se evaluaron en concentraciones similares en ambas especies con $0.02 (1 \times 10^6 \text{ células } \text{ml}^{-1})$.

Se evaluaron valores similares del contenido de aminoácidos en los cultivos semicontinuos de *Nannochloropsis* sp., *Synechococcus* sp. y la mezcla de ambas especies. Excepto para la lisina en donde se evaluó hasta un 50 % más en *Synechococcus* sp.

El mayor contenido de ácidos grasos totales fue para *Nannochloropsis* sp. mantenida en cultivos semicontinuos. De los cuales las fracciones de ácidos grasos saturados y moninsaturados fueron altas para los tres tipos de alimentos.

Los cultivos de rotíferos *Brachionus plicatilis* alimentados con *Nannochloropsis* sp., *Synechococcus* sp. y la mezcla de ambas especies presentan una composición proximal muy similar. Se encontró una alta correspondencia en la transferencia de la composición proximal de *Nannochloropsis* sp. y *Synechococcus* sp. con la resultante en los rotíferos alimentados con estas especies; excepto en el caso en donde se utilizó como alimento la mezcla de ambas especies.

Los perfiles de aminoácidos evaluados en los cultivos de rotíferos *Brachionus plicatilis* alimentados con *Nannochloropsis* sp., *Synechococcus* sp. y la mezcla de ambas especies, fueron similares. Se encontró una alta transferencia de la composición de aminoácidos, entre la mezcla de las dos especies suministradas como alimento en forma individual y la resultante en los rotíferos. Por lo anterior, se puede mencionar que los rotíferos pueden sintetizar un mayor porcentaje de aminoácidos que la disponible en el alimento.

Se encontró una alta correspondencia en la cantidad de ácidos grasos saturados y monoinsaturados para los cultivos de rotíferos *Brachionus plicatilis* alimentados con *Nannochloropsis* sp., *Synechococcus* sp. y la mezcla de ambas especies.

La mayor correspondencia del porcentaje de ácidos grasos polinsaturados fue cuando los cultivos de rotíferos *Brachionus plicatilis* se alimentaron con *Synechococcus* sp.

El rotífero *Brachionus plicatilis* alimentados con *Synechococcus* sp. mostró la capacidad de elongar y desaturar ácidos grasos.

Se encontró que *Synechococcus* sp. resultó ser una especie con alto potencial de ser utilizada para enriquecimiento de la composición química del rotífero *Branchionus plicatilis*.

La especie *Synechococcus* sp. puede ser una nueva alternativa de uso como alimento en la acuicultura debido a la composición química obtenida en cultivos semicontínuos.

VI. RECOMENDACIONES

Para realizar los cultivos de la cianobacteria *Synechococcus* sp. es recomendable agregar el doble de la cantidad de vitaminas que la descrita en medio de cultivo "f/2" de Guillard y Ryther (1962), ya que probablemente esta especie requiere de una mayor concentración de estos compuestos traza.

Se recomienda determinar la concentración óptima en células por unidad de volumen de *Synechococcus* sp. que requiere el rotífero *Brachionus plicatilis*.

Se requiere estudiar los cambios en la composición bioquímica en cultivos estáticos durante las distintas fases de la curva de crecimiento para la cianobacteria *Synechococcus* sp.

Realizar más estudios que evalúen el contenido de pigmentos, de *Synechococcus* sp. al ser mantenidas en distintas condiciones de cultivo y evaluar el valor nutritivo de distintas proporciones de pigmentos obtenidas en las dos especies estudiadas.

Conocer el valor nutritivo de *Synechococcus* sp. al ser suministrada como alimento a otros organismos del zooplancton (e.g. Artemia, Copépodos , Daphnia).

Realizar más estudios acerca de la biología de la transferencia de los compuestos presentes en las microalgas y cianobacterias utilizadas como alimentos y al rotífero.

LITERATURA CITADA

- Aguilar-May, B. 2002. Remoción de nutrientes con microalgas marinas en agua sintética simulando un efluente de cultivo de camarón. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias con orientación en Acuicultura. Departamento de Acuicultura. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, México. 114 pp.
- Ahmad, A.T., S. Yamasaki y H. Hirata. 1991. Optimum feeding rate of the rotifer *Brachionus plicatilis* on the marine alga *Nannochloropsis* sp. *Journal of the World Aquaculture Society*, 22 (4):230-234.
- Barclay, W. Y S. Zeller. 1996. Nutrition enhancement of n-3 and n-6 fatty acids in rotifers and artemia nauplii by feeding spray-dried *Schizochytrium* sp. *Journal of the World Aquaculture Society*, 27 (3): 314-322.
- Barnes, R. D. 1985. Zoología de los invertebrados. Cuarta edición. Nueva Editorial Interamericana S. A. de C. V. México, D. F. 1157 pp.
- Becker, E.W. 1986. Nutritional properties of microalgae: potentials and constraints, 339-419. En: *CRC Handbook of Microalgal Mass Culture* (Richmond, A. Ed.), CRC Press, Inc. United States, 528 pp.
- Ben-Amotz, A., R. Fisher y A. Schneller. 1987. Chemical composition of dietary species of marine unicellular algae and rotifers with emphasis on fatty acids. *Marine Biology*, 96: 31-36.
- Bligh, E. G y W.J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal Biochemistry Physiology*, 37: 911-917.
- Bold, H. C. y M. J. Wynne. 1985. *Introduction to the algae*. Segunda Edición. Prentice-Hall, Inc. United States of America. 720 pp.
- Borowitzka, M. A. 1988. Vitamins and fine chemical from microalgae. En: *Micro-Algal Biotechnology* (Borowitzka, M. A. y Borowitzka, L. J., Eds.), Cambridge University Press, Cambridge, 153-196.
- Brown, M. R., C. D. Garland, S. W. Jeffrey, I. D. Jameson y J. M. Leroi. 1993. The gross and amino acid composition of batch and semi-continuous cultures of *Isochrysis* sp. (clone T. ISO), *Pavlova lutheri* and *Nannochloropsis oculata*. *Journal of Applied Phycology*, 5: 285-296.

- Brown, M. R., S. Skabo y B. Wilkinson. 1998. The enrichment and retention of ascorbic acid in rotifers fed microalgal diets. *Aquaculture Nutrition*, 4: 151-156.
- Brown, M.R., S. W. Jeffrey, y C. D. Garland 1989. Nutritional Aspects of Microalgae used in Mariculture; a Literature Review. CSIRO Marine Laboratories Report 205. 44 pp.
- Brown, M.R., S.W. Jeffrey, J.K. Volman y G.A. Dunstan. 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, 151: 315-331.
- Carić, M., J. Sanko-Njire y B. Skaramuca. 1993. Dietary effects of different feeds on the biochemical composition of the rotifer (*Brachionus plicatilis* Müller). *Aquaculture*, 110: 141-150.
- Caron, D. A., E. L. Lim, G. Miceli, J. B. Waterbury y F. W. Valois. 1991. Grazing and utilization of chroococcoid cyanobacteria and heterotrophic bacteria by protozoa in laboratory cultures and a coastal plankton community. *Marine Ecology Progress series*, 76: 205-217.
- CENAIM. 2002. Manual para la producción y uso de organismos zooplanctónicos. Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM).Guayaquil,Ecuador.<http://www.cenaim.espol.edu.ec/publicaciones/artemia/index.html>.
- Coll-Morales, J. 1983. *Acuicultura Marina Animal*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. 275 pp.
- Cordero-Esquivel,B., D. Voltolina L. y F. Correa-Sandoval. 1993. The biochemical composition of two diatoms after different preservation techniques. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 105B (2): 369-373.
- Correa-Reyes, J. G. 1993. Alimentación de *Artemia* franciscana con microalgas cultivadas bajo diferentes tipos de luz. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Marinas. Universidad Autónoma de Baja California, 56 pp.
- Correa-Reyes. 2001. Selección de especies de diatomeas bentónicas para el cultivo de abulón. Tesis de doctorado. Posgrado en Ciencias con orientación en Acuicultura. Departamento de Acuicultura. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, México. 132 pp.
- Cox, E. R. 1980. *Phytoflagellates*. Elsevier North Holland, Inc. United States of America, 2: 319-334.

- Chiotiyaputta, C. y K. Hirayama. 1978. Food selectivity of the rotifer *Brachionus plicatilis* feeding on phytoplankton. *Marine Biology*, 45: 105-111.
- Christaki, U., S. Jacquet, J. R. Dolan, D. Vaultot y F. Rassoulzadegan. 1999. Growth and grazing on *Prochlorococcus* and *Synechococcus* by two marine ciliates. *Limnology and Oceanography*, 44 (1): 52-61.
- Dabrowski, K. y M. Rusiecki. 1983. Content of total and free amino acids in zooplanktonic food of fish larvae. *Aquaculture*, 30: 31-42.
- Dendrinis, P. y J. P. Thorpe. 1987. Experiments on the artificial regulation of the amino acid and fatty acid contents of food organisms to meet the Assessed nutritional requirements of larval, post-larval and juvenile Dover Sole [*Solea solea* (L.)]. *Aquaculture*, 61: 121-154.
- Droop, M.R. 1975. The chemostat in mariculture. 10 th European Symposium on Marine Biology. Ostend, Belgium. September 17-23. Vol. 1:71-93.
- D'Sauza, F. M. L. y N. R. Loneragan. 1999. Effects of monospecific and diets on survival, development and fatty acid composition of penaeid prawn (*Penaeus* spp.) larvae. *Marine Biology*, 133:621-633.
- Dubois, M., K. A. Gilies, J. D. Halmiton, P. A. Rebers y F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry*, 28: 350-356.]
- Dunstan, G. A., J. K. Volkman, S. M. Barret y C. D. Garland. 1993. Changes in the lipid composition and maximisation of the polyunsaturated fatty acid content of three micro algae grown in mass culture. *Journal of Applied Phycology*, 5: 71-83.
- Dunstan, G.A., J.K Volkman, S.M. Barret, J.M. Leroi y S.W. Jeffrey. 1994. Essential polyunsaturated fatty acids from 14 species of diatom (Bacillariophyceae). *Phytochemistry* 35:155-161.
- Emdadi, D. y B. Berland. 1989. Variation in lipid class composition during batch growth of *Nannochloropsis salina* and *Pavlova lutheri*. *Marine Chemistry*, 26: 215-225.
- Epifanio, C. E. 1979. Growth in bivalve molluscs: nutritional effects of two or more species of algae in diets fed to the american oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin) and the hard clam *Mercenaria mercenaria* (L.). *Aquaculture*, 18:1- 12.

- Fernández-Reiriz, M.J. y U. Labarta. 1996. Lipid classes and fatty acid composition of rotifers (*Brachionus plicatilis*) fed two algal diets, *Hydrobiologia*, 330: 73-79.
- Fernández-Reiriz, M.J., A. Pérez-Camacho, M.J. Ferreiro, J. Blanco, M. Plantas, M.J. Campos y U. Labarta. 1989. Biomass production and variation in the biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. *Aquaculture*, 83: 17-37.
- Fidalgo, J. P., A. Cid, I. López-Muñoz, J. Abalde y C. Herrero. 1994. Growth and biochemical profile of juvenile mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk) fed on different algal diets. 1994. *Journal of Shellfish Research*, 13 (1): 67-75.
- Floreto, E. A. T., P. B. Brown y R. C. Bayer. 2001. The effects of krill hydrolysate-supplemented soya-bean based diets on the growth, colouration, amino and fatty acid profiles of juvenile American lobster, *Homarus americanus*. *Aquaculture Nutrition*, 7: 33-43.
- Fogg, C.E. y B. Thake. 1987. *Algal Cultures and Phytoplankton Ecology*. The University of Wisconsin Press, Wisconsin. 269 pp.
- Frovol, A.V., S.L. Pankov, K.N. Geradze, S.A. Pankova y L.V. Spektorova. 1991. Influence of the biochemical composition of food on the biochemical composition of the rotifer *Brachionus plicatilis*, *Aquaculture*, 97:181-202.
- Fulks, W. y K. Main. 1991. Rotifer and Microalgae Culture Systems. Proceedings of U.S.-Asia Workshop. The Oceanic Institute. Honolulu. 347 pp.
- Gallardo, W. G., A. Hagiwara y T. W. Snell. 2001. Use of GABA to enhance rotifer reproduction in enrichment culture. *Aquaculture Research*, 32: 243-246.
- Gardner, D. y J. P. Ripley. 1972. The Component Fatty Acids of the Lipids of Some Species of Marine and Freshwater Molluscs. *Journal Marine Biology. Ass. U. K.*, 52:827-838.
- Glover, H. E., B. B. Prézelin, L. Campbell y M. Wyman. 1988. Pico- and ultraplankton Sargasso Sea communities: variability and comparative distributions of *Synechococcus* spp. and algae. *Marine Ecology Progress Series*, 49: 127-139.
- Graham, L. E. y L. W. Wilcox. 2000. *Algae*. Editorial Prentice-Hall, Inc. United States of America, 291-293.

- Guillard, R. L.L y J. H. Rhyter. 1962. Studies on marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. Canadian. Journal Microbiol, 8: 229-239.
- Harzevillil, A. R. S., V. Duffell, Ph. Dhert, J. Swings y P. Sorgeloos. 1998. Use of a potential probiotic *Lactococcus lactis* AR21 strain for the enhancement of growth in the rotifer *Brachionus plicatilis* (Müller). Aquaculture Research, 29 (6): 411-417.
- Hemerick, G. 1973. Mass culture. En: Handbook of Phycological Methods. 255-273 Culture Methods and Growth Measurement. (Stein, J.R. Ed.). Cambridge University Press, New York. 448 pp.
- Hibberd, D. J. 1980. Eustigmatophytes. En: Phytoflagellates. (Cox, E.R., Ed.). Editorial Elsevier North Holland, Inc. Texas, 2: 319-334.
- Hirayama, K., Takagi, K. y Kimura, H. 1979. Nutritional effect of eight species of marine phytoplankton on population growth of the rotifer, *Brachionus plicatilis*. Bulletin Japan Society Science Fisheries, 45:11-16.
- Iturriaga, R. y B. G. Mitchell. 1986. Chroococoid cyanobacteria: a significant component in the food web dynamics of the open ocean. Marine Ecology Progress Series, 28: 291-297.
- Iturriaga, R. y J. Marra. 1988. Temporal and spatial variability of chroococoid cyanobacteria *Synechococcus* spp. specific growth rates and their contribution to primary production in the Sargasso Sea. Marine Ecology Progress Series, 44: 175-181.
- James, C.M. Al-Hinty, S. y Salman, A. E. 1989. Growth and ω 3 fatty acid and amino acid composition of microalgae under different temperature regimes. Aquaculture, 77:337-357.
- Kenyon, C. N. 1972. Fatty acid composition of unicellular strains of blue-green algae. Journal of Bacteriology, 109 (2): 827-834.
- Kissil, G. Wm. y W. M. Koven. 1990. Preparation of oils, enhanced in highly unsaturated fatty acid (HUFA) content, by low temperature crystallization separation, for rotifer (*Brachionus plicatilis*) enrichment. Aquaculture, 88: 69-74.
- Koven, W., Y. Barr, S. Iutzky, I. Ben-Atia, R. Weiss, M. Harel, P. Behrens y A. Tandler. 2001. The effect of dietary arachidonic acid (20:4n-6) on growth, survival and resistance to handling stress in gilthead seabream (*Sparus aurata*). Aquaculture, 193: 107-122.

- Laing, I. y M. M. Helm. 1981. Factors affecting the semi-continuos production of *Tetraselmis suecica* (Kylin) butch in 200-l vessels. *Aquaculture*, 22: 137-148.
- Lips, S. H. y Y. J. Avisar. 1986. Photosynthesis and ultraestructure in microalgae. En: *Handbook of Microalgae Mass Culture*. (Richmond, A. Ed.). CRC Press, Inc. Boca Ratón Florida. 528 pp.
- Lio, H., L. Cambell y M. R. Landry. 1995. Growth and mortality rates of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* measured with a selective inhibitor technique. *Marine Ecology Progress series*, 116: 277-287.
- López-Elías, J. A. 1990. Cultivos semicontinuos de cuatro especies de microalgas con medios simplificados: Evaluación de técnicas analíticas y de producción. Tesis de Maestría. Departamento de Ecología Marina. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, México. 144 pp.
- López-Elías, J. A. y D. Voltolina. 1993. Cultivo semicontinuos de cuatro especies de microalgas con medio no convencional. *Ciencias Marinas*, 19: 169-180.
- Lowry, O. H., H. J. Roserough, A. L. Farr, A. L. y R. J. Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *Journal Biological Chemistry* 193: 265-275.
- Lubián, L. M. y R. Establier. 1983. Variaciones cuantitativas de los pigmentos de *Nannochloropsis gaditana* Lubián, 1983 (Eustigmatophyceae) durante su crecimiento. *Investigaciones Pesqueras*, 47 (1): 29-37.
- Lubzens, E. 1987. Raising rotifers for use in aquaculture. *Hydrobiologia*, 147: 245-255.
- Lubzens, E., A. Marko y A. Tietz. 1985. De novo synthesis of acids in the rotifers, *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture*, 47: 27-37.
- Lubzens, E., O. Gibson, O. Zmora y A. Sukenik. 1995. Potential advantages of frozen algae (*Nannochloropsis* sp.) for rotifer (*Brachionus plicatilis*). *Aquaculture*, 133: 295-309.
- Ludwing, J. A. y J. F. Reynolds. 1988. *Statistical Ecology*. John Wiley y Sons. New York. 337 pp.
- Martin, Jr., D. W., P.A. Mayes, V. W. Rodwell, D. K. Granner .1986. *Bioquímica de Harper*. Vigésima edición. Editorial El Manual Moderno, S.A. de C.V. México, 14-16.

- Murayama, I. y K. Hirayama. 1993. The culture of the rotifer *Brachionus plicatilis* with *Chlorella vulgaris* containing vitamin B12 in its cells. Journal of the world Aquaculture Society, 24 (2): 194-198.
- Matas-Ruiz, Y. A. 1999. Análisis bioquímico y caracterización parcial taxonómica de la cianobacteria *Anacystis nidulatus* R2. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Baja California, 84 pp.
- Metcalfe, L.D., A.A., Schmitz y J.R. Pelka. 1966. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. Analytical Chemistry 38:514-515.
- Mourente, G., L. M. Lubian y J. M. Odriozola. 1990. Total fatty acid composition as a taxonomic index of some marine microalgae used as food in marine aquaculture. Hydrobiologia, 203: 147-154.
- Nichols, P.D., D.G. Holdsworth, J.K. Volkman, M. Daintith y S. Allanson. 1989. High Incorporation of Essential Fatty Acids by the Rotifer *Brachionus plicatilis* Fed on the Prymnesiophyte Alga *Pavlova lutheri*. Aust. J. Mar. Freshwater Research, 40: 645-655.
- Olson, R. J., S. W. Chisholm, E. R. Zettler y E. V. Armbrust. 1988. Analysis of *Synechococcus* pigments types in the sea using singles and beam flow cytometry. Deep-Sea Research, 35(3): 425-440.
- Ondarza, R. N. 1996. Biología Moderna. Décima edición. Editorial Trillas, S.A. de C.V. México, 80-81.
- Pande, S. V., R. K. Parvin y T. A. Venkatasubramanian. 1963. Microdetermination of lipid and serum total fatty acids. Analytical Biochemistry, 6: 415-423.
- Parsons, T. R., Y. Maita y C. M. Lalli. 1984. A manual of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis. Editorial Pergamon Press. England, 101-112 pp.
- Patterson, G.M. 1996. Biotechnological application of cyanobacteria. Journal of Scientific y Industrial Research, 55: 669-684.
- Pedrazzoli, A., C. Molina, N. Montoya, S. Townsend, A. León-Hing, Y. Parades y J. Calderón. 1998. Recent advances on nutrition research of *Penaeus Vannamei* in Ecuador. Reviews in Fisheries Science, 6:143-151.
- Pousão-Ferreira, P., F. Cairrão, F. Nery y L. Narciso. 1997. El perfil de los ácidos grasos de larvas de *Sparus aurata* se correlaciona con la composición de

dieta de enriquecimiento de *Brachionus plicatilis* y *Artemia* sp. Ciencias Marinas, 23: 83-92.

Prézelin, B. B., H. E. Glover, B. Ver Hoven, D. Steinberg, H. A. Matlick, O. Schofield, N. Nelson, M. Wyman y L. Campbell. 1989. Blue-green light effects on light-limited rates of photosynthesis: relationships to pigmentation and productivity estimates for *Synechococcus* population from the Sargasso Sea. Marine Ecology Progress Series, 54: 121-136.

Rainuzzo, J., K. I. Reitan y Y. Olsen. 1994. Effect of short and long-term lipid enrichment on total lipids, lipid class and fatty acid composition in rotifers. Aquaculture, 2: 19-32.

Rainuzzo, J., Y. Olsen y G. Rosenlund. 1989. The Effect of enrichment diets on the fatty acid composition of the rotifer *Brachionus plicatilis*. Aquaculture, 79: 157-161.

Ravi, J. y K. V. Devaraj. 1991. Quantitative essential amino acid requirements for growth of catla, *Catla catla* (Hamilton). Aquaculture, 96:281-291.

Renaud, S. M., D. L. Parry, L. Thing, C. Kuo, A. Padovan y N. Sammy. 1991. Effects of light intensity on the proximate biochemical and fatty acid composition of *Isochrysis* sp. and *Nannochloropsis oculata* for use in tropical aquaculture. Journal of Applied Phycology, 3: 43-53.

Renaud, S. M., L. Thinh y D. L. Parry. 1999. The gross chemical composition and fatty acid composition of 18 species of tropical Australian microalgae for possible use in mariculture. Aquaculture, 170: 147-159.

Řičica, J. 1966. Continuous system. 31-153. En: Theoretical and Methodological Basis of Continuous Culture of Microorganisms (Málek, I. y Z. Fenel. Eds.). Academic Press, New York. 655 pp.

Richmond, A. 1986. Handbook of Microalgae Mass Culture. CRC Press, Inc. Boca Ratón Florida. 528 pp.

Richmond, A. 1990. Large scale microalgae culture and applications. Progress in Phycological Research, 7: 62 pp.

Rodhouse, P. G., C. Roden y M. E. Somerville-Jacklin. 1983. Nutritional value of micro-algal mass cultures to the oyster *Ostrea edulis* L. Aquaculture, 32:11-18.

- Rodríguez, C., J. A. Pérez, M. S. Izquierdo, J. R. Cejas, A. Bolaños y A. Lorenzo. 1996. Improvement the type and concentration of oil and the enrichment period. *Aquaculture*, 147: 93-105.
- Rothaupt, K. O. 1990. Differences in particle size-dependent feeding efficiencies of closely related rotifer. *Limnology and Oceanography*, 35 (1): 16-23.
- Rueda-Jasso, R.A. 1996. Efecto nutricional de tres microalgas y una cianobacteria en el cultivo del rotífero *Brachionus plicatilis* Müller 1786. *Ciencias Marinas*, 22(3):313-328.
- Ruyter, B., C. Røsjø, O. Einen y M. S. Tomasen. 2000. Essential fatty acids in Atlantic salmon: effects of increasing dietary doses of n-6 and n-3 fatty acids on growth, survival and fatty acids composition of liver, blood and carcass. *Aquaculture Nutrition*, 6: 199-127.
- Sargent, J. R., L. A. McEvoy, J. G. Bell. 1997. Requeriments, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. *Aquaculture*, 155:117-127.
- Snell, T. W., C. J. Bieberich y R. Fuerst. 1983. The effects of green and blue-green algal diets on the reproductive rate of the rotifers *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture*, 31: 21-30.
- Sokal, R. y F.J. Rohlf. 1979. *Biometría: Principios y Métodos Estadísticos en la Investigación Biológica*. H. Blume Ediciones, Barcelona. 845 pp.
- Sorokin, C. 1973. Dry weight, packed cell volume and optical density. 321-343. En: *Handbook of Phycology Methods. Culture Methods and Growth Measurement*. (Stein, J.R. Ed.). Cambridge University Press, New York. 448. pp.
- South, G. R. y A. Whittick. 1987. *Introduction to Phycology*. Blackwel Scientific Publications. Boston. 341 pp.
- Sprent, J. F. A., J. C. Paerson, D. L. Pawson y J. S. Ryland. 1972. Pseudocoelmate. En: *Textbook of Zoology Invertebrates*. (Parker, T. J. y W. A. Haswell Eds.). Séptima Edición. American Elsevier Publishing Company, Inc. New York. 234-275.
- Stappen, G. V. 1996. Intruduction, biology and ecology of artemia. En: *Manual on the production and use live food for aquaculture*. (Lavens P. y P. Sorgeloos Eds). FAO Fisheries technical paper, 361 pp.

- Stein, J.R. 1973. Handbook of Phycology Methods. Culture Methods and Growth Measurement. Cambridge University Press, New York. 448. pp.
- Støttrup, J. G. 2000. The elusive copepods: their production and suitability in marine aquaculture. *Aquaculture Research*, 31: 703-711.
- Stryer, L. 1995. Bioquímica. Cuarta edición, Tomo II. Editorial Reverté, S. A., Barcelona. 603-628.
- Sukenik, A, O. Zmora y Y. Carmeli. 1993a. Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. II. *Nannochloropsis* sp. *Aquaculture*, 117: 313-326.
- Sukenik, A. y Y. Carmeli. 1990. Lipid synthesis and fatty acid composition in *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae) grown in a light-dark cycle. *Journal Phycology*, 26: 463-469.
- Sukenik, A., Y. Yamaguchi y A. Livne, 1993b. Alterations in lipid molecular species of the marine eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. *Journal Phycology* . 29: 620-626.
- StatSoft, Inc. 1996. Statistica for Windows (Computer Program Manual). Tulsa. StatSoft, Inc. 2300 East 14 th Street, Tulsa. Email:info@statsoft.com, WEB:http://www/statsoft.com.
- Talib, A., S. Yamasaki y H. Hirata. 1991. Optimum feeding rate of the rotifer *Brachionus plicatilis* on the marine alga *Nannochloropsis* sp. *Journal of the World Aquaculture Society*, 22(4):230-234.
- Tamaru, C. S., R. Murashige, C. Lee, H. Ako y V. Sato. 1993. Rotifers fed various diets of baker's yeast and/ or *Nannochloropsis oculata* and their effect on the growth and survival of striped mullet (*Mugil cephalus*) and milkfish (*Chanos chanos*) larvae. *Aquaculture*, 110: 361-372.
- Taylor, F. J. R. 1980. Basic biological features of phytoplankton cells. En: The Physiological Ecological of Phytoplankton (Morris. I. Ed.). University of California Press. Blackwell Scientific Publications. Los Angeles California, 3-55 pp.
- Tobias-Quinto, E. y C. T. Villegas. 1982. Growth, survival and macronutrient composition of *Penaeus monodon* fabricius larvae fed with *Chaetoceros calcitrans* and *Tetraselmis chuii*. *Aquaculture*, 29:253-259.

- Treece, G. D. y D. A. Davis. 2000. Culture of small zooplankters for the feeding of larval fish. Southern Regional Aquaculture Center. United States of America, Publication No. 701.
- Trujillo-Valle, M. 1993. La Colección de Microalgas del CICESE. Informe técnico. Comunicaciones Académicas, Serie Acuicultura, CICESE. 103 pp., CIACT9301.
- Van Den Hoek, C., D. G. Mann y H. M. Jahns .1995. Algae an Introduction to Phycology. Cambridge University Press. United States of America, 130-133.
- Volkman, J.K., S.W. Jeffrey, P.D. Nichols, G.I. Rogers y C.D. Garland. 1989. Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 128:219-240.
- Von Elert, E. y T. Wolffrom. 2001. Supplementation of cyanobacteria food with polyunsaturated fatty acids does not improve growth of Daphnia. Limnology Oceanography, 46 (6): 1552-1558.
- Ward, D. M. y R. W. Castenholz. 2000. Cianobacteria in geothermal habitats. En: The Ecology of Cyanobacterias (Whitton, B. A. y M. Potts. Eds.). Kluwer Academic Publishers. Holanda, 53-54.
- Watanabe, T. 1987. Requerimientos de ácidos grasos y nutrición lipídica en los peces. En: Nutrición en Acuicultura II (Espinosa-Monteros, J. y U. Labarta. Eds.). Industrias Gráficas España, S. L. Madrid, España. 99-165
- Watanabe, T. 1993. Importance of docosahexaenoic acid in marine larval fish. Journal of the World Aquaculture Society, 24:152-161.
- Watanabe, T., C. Kitajima y S. Fujita. 1983. Nutritional values of live organisms used in Japan for the mass propagation of fish: a review. Aquaculture 34:115-143.
- Waterbury J, Watson S, Valois F, Franks D. 1986. Biological and ecological characterization of the marine unicellular cyanobacterium *Synechococcus*. En: Photosynthetic Picoplankton. (Platt, T. Ed.). Pergamon Press. 71-120 pp.
- Whyte, J. N. C. 1987. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. Aquaculture, 60: 231-241.
- Whyte, J. N. C. y W. D. Nagata. 1990. Carbohydrate and fatty acids composition of the rotifer, *Brachionus plicatilis*, fed monospecific diets of yeast or phytoplankton. Aquaculture, 89: 263-272.

Wikfors, G. H. y M. Ohno. 2001. Impact of algal research in aquaculture. *Journal Phycology*, 37: 968-974.

Zar, J.H. 1984. *Bioestatistical Analysis*. Prentice Hall International Inc., London. 718 pp.

Zhukova, N. y N.A. Aizdaicher. 1995. Fatty acid composition of 15 species of marine microalgae. *Phytochemistry* 39:351-356.