

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE  
EDUCACIÓN SUPERIOR DE ENSENADA

**CULTIVO DE *ARTEMIA FRANCISCANA* EN AGUA DE  
SALINIDAD REDUCIDA**

TESIS  
MAESTRÍA EN CIENCIAS

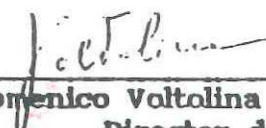
**SAUL GONZÁLEZ MEDINA**

Ensenada, Baja California, México, mayo de 1994.

RESUMEN de la Tesis del Ocean. Saúl González Medina presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS en OCEANOLOGIA con opción en ECOLOGIA MARINA. Ensenada, B.C. México, Abril de 1994.

## CULTIVO DE Artemia franciscana EN AGUA DE SALINIDAD REDUCIDA

Resumen Aprobado por:

  
Dr. Domenico Voltolina Lobina  
Director de Tesis

Se cultivó Artemia franciscana en agua de salinidad normal y reducida (12 ‰ ) utilizando alimentos inertes (salvado de trigo y salvado de arroz), vivos (las microalgas Chaetoceros sp. y Nannochloropsis sp.) y la mezcla de ambos, en condiciones de iluminación continua y de penumbra y en volúmenes de un litro y de 300 litros. Los resultados mostraron que Artemia franciscana cultivada en salinidad reducida es capaz de alcanzar longitudes similares a las obtenidas en agua de mar normal y de reproducirse, aunque con un menor número de parejas, cuando la dieta está constituida por alimento vivo. Su composición bioquímica presenta una alta concentración de lípidos (aprox. 25%) y es baja en carbohidratos (<10%). La condición de penumbra tiene como consecuencia la producción de quistes en vez que de nauplios y favorece un crecimiento más rápido, aunque el estado de madurez sexual se alcanza en el mismo tiempo (15 días). De las dietas probadas, Chaetoceros sp. resultó ser el mejor alimento. Los organismos que recibieron alimentos inertes presentaron una longitud menor a 3 mm, baja sobrevivencia (<20%) y no produjeron progenie. En el caso de las dietas mixtas, los mejores resultados fueron similares a éstos últimos. En cultivo semimasivo, Artemia, alimentada con salvado de arroz (0.2 mg org.<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>) más Chaetoceros sp. (30% de su cantidad original) alcanzó tallas de 7 mm en 19 días, pero no logró reproducirse.

TESIS DEFENDIDA POR: **SAUL GONZALEZ MEDINA**

Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITE:



**DR. DOMENICO VOLTOLINA LOBINA.-** Director del Comité



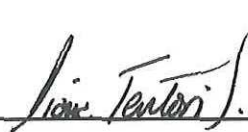
**DR. FRANCISCO CORREA SANDOVAL.-** Miembro del Comité



**M.C. ANA DENISSE RE ARAUJO.-** Miembro del Comité



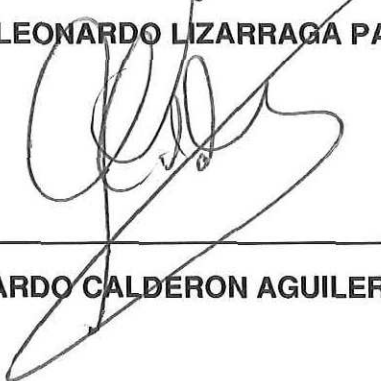
**DR. FERNANDO DIAZ HERRERA.-** Miembro del Comité



**DRA. DIANA TENTORI SANTA CRUZ.-** Miembro del Comité



**DR. MARCIAL LEONARDO LIZARRAGA PARTIDA.-** Jefe Depto. Ecología Marina



**DR. LUIS EDUARDO CALDERON AGUILERA.-** Director de Estudios de Posgrado

30 DE MAYO DE 1994



CENTRO DE INVESTIGACION CIENTIFICA Y DE  
EDUCACION SUPERIOR DE ENSENADA

DIVISION DE OCEANOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ACUICULTURA

**CULTIVO DE *Artemia franciscana* EN AGUA DE SALINIDAD REDUCIDA**

TESIS

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

Presenta:

**SAUL GONZALEZ MEDINA**

Ensenada, Baja California, Mayo de 1994.

## **DEDICATORIA**

A Robert y Nell Noble por su apoyo y  
carifio y por considerarme como su  
familia.

A mi madre Teresa y Adela por ser lo  
que soy.

A quien llegó y llenó de felicidad la  
última parte de esta tesis y que  
representa mi futuro      LAURA

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Domenico Voltolina por decidir ser mi director de tesis, por la confianza depositada en mí, por su constante apoyo y por aquello que da como ejemplo de investigador.

A los miembros de mi comité de tesis: Dr. Fernando Díaz Herrera, Dr. Francisco Correa Sandoval, Dra. Diana Tentori Santacruz y M. en C. Ana Denise Re Araujo por sus acertadas observaciones y críticas en la revisión del escrito.

Especiales a el Dr. Francisco Correa y a la Cand. Dr. Beatriz Cordero por su valiosa ayuda durante todo el trabajo de la tesis.

A mis compañeros del Laboratorio de Acuicultura en el CICESE.

Al personal que labora en el Departamento de Acuicultura.

Al Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la UABC por permitir realizar parte del trabajo de esta tesis en sus instalaciones.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada por el apoyo brindado para mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado a través del programa de becas.

Especiales a Mario Rebolledo, Ernesto García, Miguel Ángel Cervantes, Benjamín Barón, Pablo Piña y Arnulfo Hernández por ser amigos.

**CONTENIDO**

|                                             | <b><u>Página</u></b> |
|---------------------------------------------|----------------------|
| <b>I. INTRODUCCION</b>                      | <b>1</b>             |
| I.1. Objetivos                              | 8                    |
| <b>II. MATERIALES Y METODOS</b>             | <b>9</b>             |
| II.1. Selección de microalgas               | 9                    |
| II.2. Cultivo de microalgas                 | 11                   |
| II.2.1. Cultivo a pequeña escala            | 11                   |
| II.2.2. Cultivo semimasivo                  | 13                   |
| II.3. Cultivo de <u>Artemia franciscana</u> | 13                   |
| II.3.1. Tipos de agua                       | 14                   |
| II.3.2. Condiciones de iluminación          | 16                   |
| II.3.3. Dietas                              | 16                   |
| II.3.4. Cultivo semimasivo                  | 17                   |
| II.3.5. Producción de progenie              | 17                   |
| II.4. Biomasa y análisis bioquímicos        | 18                   |
| II.4.1. Biomasa                             | 18                   |
| II.4.2. Análisis bioquímicos                | 18                   |
| II.5. Dietas                                | 19                   |
| II.6. Tratamiento estadístico               | 20                   |
| <b>III. RESULTADOS</b>                      | <b>22</b>            |

|                                                      |    |
|------------------------------------------------------|----|
| III.1. Selección de microalgas                       | 22 |
| III.2. Cultivos semicontínuos de microalgas          | 27 |
| III.2.1. Composición de las microalgas               | 28 |
| III.3. Cultivo de <u>Artemia franciscana</u>         | 31 |
| III.3.1. Tipos de agua                               | 31 |
| III.3.1.1. Crecimiento y sobrevivencia               | 31 |
| III.3.1.2. Producción de parejas y progenie          | 31 |
| III.3.1.3. Composición proximal                      | 32 |
| III.3.2. Condiciones de iluminación                  | 35 |
| III.3.2.1. Crecimiento y sobrevivencia               | 35 |
| III.3.2.2. Producción de parejas y progenie          | 35 |
| III.3.2.3. Composición proximal                      | 36 |
| III.3.3. Dietas de microalgas y alimento inerte      | 39 |
| III.3.3.1. Crecimiento y sobrevivencia               | 39 |
| III.3.3.2. Producción de parejas y progenie          | 40 |
| III.3.3.3. Composición proximal                      | 40 |
| III.3.4. Dietas mixtas y ensayo con salvado de arroz | 44 |
| III.3.4.1. Crecimiento y sobrevivencia               | 44 |
| III.3.5. Cultivo semimasivo                          | 46 |
| III.3.5.1. Crecimiento y sobrevivencia               | 46 |

|                                                   |    |
|---------------------------------------------------|----|
| III.3.5.2. Producción de parejas                  | 47 |
| III.3.5.3. Composición proximal                   | 47 |
| IV. DISCUSION                                     | 50 |
| IV.1 Cultivo de microalgas                        | 50 |
| IV.2 Cultivo de <u>Artemia</u>                    | 52 |
| IV.2.1. Tipos de agua                             | 52 |
| IV.2.2. Condiciones de iluminación                | 56 |
| IV.2.3. Dietas de microalgas y alimento inerte    | 58 |
| IV.2.4. Dietas mixtas                             | 61 |
| IV.2.5. Cultivo semimasivo                        | 62 |
| IV.3 Recomendaciones para los análisis proximales | 64 |
| V. CONCLUSIONES                                   | 65 |
| LITERATURA CITADA                                 | 67 |

## LISTA DE FIGURAS

| <u>Figura</u> |                                                                                                                                              | <u>Página</u> |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| 1             | Crecimiento de <u>Chaetoceros</u> sp. cultivado en aguas de mar y de salinidad reducida (12 ‰), en medio 'f' y a nivel erlenmeyer.           | 24            |
| 2             | Crecimiento de <u>Phaeodactylum tricornutum</u> cultivado en aguas de mar y de salinidad reducida (12 ‰), en medio 'f' y a nivel erlenmeyer. | 25            |
| 3             | Crecimiento de <u>Nannochloropsis</u> sp. cultivado en aguas de mar y de salinidad reducida (12 ‰), en medio 'f' y a nivel erlenmeyer.       | 25            |
| 4             | Crecimiento de <u>Scenedesmus obliquus</u> cultivado en aguas dulce y de salinidad reducida (12 ‰), en medio 'f' y a nivel erlenmeyer.       | 26            |
| 5             | Crecimiento de <u>Chlorella</u> sp. cultivado en aguas dulce y de salinidad reducida (12 ‰), en medio 'f' y a nivel erlenmeyer.              | 26            |

## LISTA DE TABLAS

| <u>Tabla</u> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | <u>Página</u> |
|--------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| I            | Raciones diarias de los diferentes alimentos, vivos (Correa-Sandoval y Buckle-Ramírez, 1993) e inertes, utilizados como dieta de <u>Artemia franciscana</u> .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 21            |
| II           | Datos promedio de la tasa de crecimiento ( $\mu$ ) durante la fase exponencial y de la biomasa obtenida en la fase de crecimiento lento. También se da la decisión obtenida del análisis de varianza paramétrico de una vía, aplicada a los resultados provenientes de los cultivos de cinco especies de microalgas en dos medios de salinidad diferente: agua de mar (A.M.) o agua dulce (A.D.) y agua de salinidad reducida (A.S.). En paréntesis: desviación estándar. S y N.S.: diferencia significativa o no significativa ( $\alpha = 0.05$ ). | 23            |
| III          | Concentración promedio (en células $\text{ml}^{-1}$ o como densidad óptica) y peso seco en ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) en cultivos semicontínuos de <u>Chaetoceros</u> sp. y de <u>Nannochloropsis</u> sp. cultivados en 1.5 l de agua de salinidad reducida (AS) y de agua de mar (AM), con razones de dilución diaria de 0.5 y 0.4 respectivamente. En paréntesis: desviación estándar. N.S.: diferencia no significativa (análisis de varianza de una vía, $\alpha=0.05$ ).                                                                         | 29            |
| IV           | Composición proximal, en porcentaje del peso seco total, de <u>Chaetoceros</u> sp. y <u>Nannochloropsis</u> sp., cultivadas en 1.5 l de agua de salinidad reducida (AS) y de agua de mar (AM). A título comparativo, también se dan en esta tabla las composiciones proximales de los dos tipos de alimento inerte (salvado de trigo (ST) y salvado de arroz (SA)), usados en los otros ensayos. En paréntesis: desviación estándar.                                                                                                                 | 30            |
| V            | Datos de crecimiento y de sobrevivencia de <u>Artemia franciscana</u> cultivada en agua de salinidad reducida (AS) y en agua de mar (AM), en condiciones de penumbra, utilizando <u>Chaetoceros</u> sp. mantenido en los dos medios. En paréntesis: desviación estándar. Debido al traslape entre los límites de confianza ( $\alpha=0.05$ ) de los valores                                                                                                                                                                                          |               |

## LISTA DE TABLAS, (Continuación)

| <u>Tabla</u> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | <u>Página</u> |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
|              | promedio calculados para cada fecha de muestreo, no se procedió con otras pruebas estadísticas de comparación de medias.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 33            |
| VI           | Datos de producción de parejas y de progenie de <u>Artemia franciscana</u> , cultivada en agua de salinidad reducida (AS) y en agua de mar (AM), en condiciones de penumbra, utilizando <u>Chaetoceros</u> sp. mantenido en los dos medios. La producción de progenie se expresa en número total de quistes. En paréntesis: desviación estándar. En corchetes: número de parejas totales formadas. En llaves: mínimo y máximo. *: días de observación desde la formación de la primera pareja. +: mediana.     | 34            |
| VII          | Composición proximal, en porcentaje del peso seco total, de <u>Artemia franciscana</u> (después de la formación de la primera pareja), cultivada en agua de salinidad reducida (AS) y en agua de mar (AM), en condiciones de penumbra, utilizando <u>Chaetoceros</u> sp. mantenido en los dos medios. En paréntesis: desviación estándar.                                                                                                                                                                      | 34            |
| VIII         | Datos de crecimiento y de sobrevivencia de <u>Artemia franciscana</u> cultivada en agua de salinidad reducida, en penumbra (P) y con iluminación continua (IC), utilizando <u>Chaetoceros</u> sp. como alimento. En paréntesis: desviación estándar. S o N.S: diferencia significativa o no significativa (análisis de varianza de una vía, alfa = 0.05).                                                                                                                                                      | 37            |
| IX           | Datos de producción de parejas y de progenie de <u>Artemia franciscana</u> , cultivada en agua de salinidad reducida, en penumbra (P) y con luz continua (LC), utilizando <u>Chaetoceros</u> sp. como alimento. La producción se representa con el valor de la mediana. En paréntesis: desviación estándar. En corchetes: número total de parejas. En llaves: mínimo y máximo. *: número de días transcurridos desde la aparición de la primera pareja. +: mediana. Producción en: quistes (Q) o nauplios (N). | 38            |

## LISTA DE TABLAS (Continuación)

| <u>Tabla</u> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | <u>Página</u> |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| X            | Composición proximal, en porcentaje del peso seco total, de <u>Artemia franciscana</u> (después de la formación de la primera pareja) cultivada en agua de salinidad reducida en penumbra (P) y luz continua (LC), utilizando <u>Chaetoceros</u> sp. como alimento. En paréntesis: desviación estándar.                                                                                                                                                           | 38            |
| XI           | Datos de crecimiento y de sobrevivencia de <u>Artemia franciscana</u> cultivada en agua de salinidad reducida, con iluminación continua y utilizando <u>Chaetoceros</u> sp.(CH), <u>Nannochloropsis</u> sp.(NN) y salvado de trigo (ST), como alimento. En paréntesis: desviación estándar. a,b,c: diferencia significativa (análisis de varianza de una vía y prueba a posteriori de Tukey. alfa = 0.05).                                                        | 42            |
| XII          | Datos de producción de parejas y de progenie de <u>Artemia franciscana</u> , cultivada en agua de salinidad reducida, con luz continua y utilizando <u>Chaetoceros</u> sp.(CH) y <u>Nannochloropsis</u> sp.(NN), como alimento. En paréntesis: desviación estándar. En corchetes: número total de parejas. En llaves: mínimo y máximo. *: número de días transcurridos desde la formación de la primera pareja. +: mediana                                        | 43            |
| XIII         | Composición proximal, en porcentaje del peso seco total, de <u>Artemia franciscana</u> cultivada en agua de salinidad reducida, con luz continua y utilizando <u>Chaetoceros</u> sp.(CH) y <u>Nannochloropsis</u> sp.(NN) como alimento, después de la formación de la primera pareja. En paréntesis: desviación estándar.                                                                                                                                        | 43            |
| XIV          | Datos de crecimiento y de sobrevivencia de <u>Artemia franciscana</u> cultivada en agua de salinidad reducida, con iluminación continua y utilizando salvado de arroz (SA) y las dietas mixtas, salvado de trigo/ <u>Chaetoceros</u> sp.(ST/CH) y salvado de trigo/ <u>Nannochloropsis</u> sp.(ST/NN) en proporciones de 70 y 30% de peso orgánico. En paréntesis: desviación estándar. *: incremento de alimento a 0.2 mg org. <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> . | 45            |

## LISTA DE TABLAS (Continuación)

| <u>Tabla</u> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | <u>Página</u> |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| XV           | Datos de crecimiento y de sobrevivencia de <u>Artemia franciscana</u> cultivada a un nivel de 300 l, en agua de salinidad reducida, con iluminación continua, y utilizando salvado de arroz (0.2 mg org. <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> ) (SA) solo o complementado con <u>Chaetoceros</u> sp.(SA/CH), en un 20% de su peso orgánico. En paréntesis: desviación estándar. S: diferencia significativa (análisis de varianza de una vía, alfa = 0.05). | 48            |
| XVI          | Composición proximal, en porcentaje del peso seco, de <u>Artemia franciscana</u> , cultivada a un nivel de 300 l en agua de salinidad reducida, con luz continua y utilizando salvado de arroz (0.2 mg/org./día) (SA) solo o complementado con <u>Chaetoceros</u> sp.(SA/CH), en un 20% de su peso orgánico. En paréntesis: desviación estándar.                                                                                                       | 49            |

## CULTIVO DE Artemia franciscana EN AGUA DE SALINIDAD REDUCIDA

### I. INTRODUCCION

Artemia es un crustáceo anóstraco de la subclase Branchiopoda (Castro y Gallardo, 1985) que ha sido utilizado ampliamente en diferentes campos de la ciencia y de la producción (toxicología, medicina, biología y acuicultura entre otros) como organismo experimental o como fuente de alimento (Léger et al., 1987). Esto es debido a sus características que lo hacen fácil de cultivar, ya que tiene un ciclo biológico corto y además porque es de fácil preservación debido a que, en condiciones particulares, se reproduce formando cigotos resistentes (quistes), que pueden ser preservados por largos períodos y utilizados cuando se necesiten; además su composición es idónea para la alimentación de estadios larvales y adultos de organismos acuáticos de importancia comercial y experimental (Castro y Gallardo, 1985; Léger et al., 1986 y 1987).

Todos estos factores hacen que el cultivo de Artemia tenga enormes ventajas sobre otras especies. Además, este organismo no posee ninguna defensa anatómica contra posibles depredadores del medio marino, por lo cual representa una presa fácil para cualquiera de ellos (Persoone y Sorgeloos, 1980) y por lo tanto es una fuente segura de alimento. Conjuntando esto con su composición bioquímica: 10-20% de carbohidratos; 42-60% proteínas; 6-23% lípidos (Léger et al., 1986 y 1987) es evidente el motivo de su gran

aceptación como fuente de alimento para una gran diversidad de grupos de animales (Sorgeloos, 1980). Hay también que mencionar que la única defensa que Artemia ha desarrollado contra posibles depredadores ha sido la adecuación de sus mecanismos fisiológicos para soportar condiciones ambientales extremas y variantes, como son la salinidad (10-340 ‰), la temperatura (6-35 °C) y la concentración de oxígeno (de 2 ml l<sup>-1</sup> hasta 8 ml l<sup>-1</sup>) (Persoone y Sorgeloos, 1980; Lenz, 1987).

Actualmente Artemia guarda una posición clave dentro de la acuicultura como fuente de alimento, que es consecuencia de las características que ya se mencionaron. De hecho, su explotación y comercialización ha sido de tal magnitud que en el presente un gran número de compañías ofrece a este crustáceo en diferentes presentaciones como quistes o como nauplios y adultos, vivos, congelados y secos (Léger *et al.*, 1986). Sin embargo, conforme aumenta su uso, se han presentado algunos problemas que afectan su utilización y su calidad y efectividad nutricia (Sorgeloos, 1980; Amat, 1985; Léger *et al.*, 1986). Los más importantes entre éstos son la heterogeneidad en la calidad de los organismos y el alto costo, que puede ser prohibitivo para algunos productores (Amat, 1985). Esto es consecuencia de que la explotación se centra en poblaciones naturales, las cuales tienen fluctuaciones que hacen variar la producción comercial. Además se sabe que, aunque Artemia es un organismo cosmopolita, sus habitats son restringidos y aislados uno del otro, lo cual ha causado que cada uno de ellos sostenga una población única. Esto puede ocasionar variaciones en algunas características importantes como composición proximal, presencia de ciertos aminoácidos y ácidos grasos

esenciales y tasas de eclosión y de sobrevivencia (Sorgeloos, 1980; Amat, 1985; Léger *et al.*, 1986; Lenz, 1987), que pueden ser debidas a diferencias genéticas o ser consecuencia de diferencias en el tipo de habitat, como aguas de diferente composición y fuerza iónica o diferentes tipos de alimento (Correa-Sandoval, 1991).

El efecto de los elementos negativos mencionados en el párrafo anterior ha sido tal, que muchos consumidores buscan adquirir los productos de aquellas compañías que garanticen una mejor calidad nutricia, disponibilidad y mejor precio, sin olvidar, en el caso de los quistes, el porcentaje de eclosión (Amat, 1985). En respuesta a estas demandas del mercado, se realizan inoculaciones de una variedad determinada de Artemia en salinas naturales, donde el organismo no está presente y las condiciones ambientales parecen ser adecuadas. De esta manera se aprovechan zonas improductivas, y se pretende que su producción aumente y que la biomasa resultante tenga una calidad homogénea (Amat, 1985; Camara y De Medeiros-Rocha, 1987; Castro *et al.*, 1987; Naegel, 1987).

Sin embargo los resultados, aunque promisorios, no son del todo satisfactorios ya que la producción no ha sido tal que se haya logrado bajar los costos. Es por esto recomendable que, en función de los conocimientos ecofisiológicos que se tienen sobre Artemia, se estudien otras posibilidades de cultivarla tratando de utilizar las condiciones regionales para obtener un producto de bajo costo, de calidad confiable, de alta disponibilidad y adecuado a las necesidades particulares del consumidor.

Los factores más importantes que hay que considerar para el cultivo de organismos marinos son la salinidad, la temperatura, la concentración de oxígeno y la dieta; los cuales tienen un efecto directo sobre la calidad del producto. Entre éstos, en el caso de Artemia, la salinidad es uno de los más estudiados, pero la mayoría de los estudios están enfocados hacia los efectos de salinidades superiores a 30 ‰. Parecería por lo tanto deseable estudiar los efectos de salinidades inferiores, parecidas a las de los cuerpos de agua salobre donde solamente se sabe que el animal puede sobrevivir, sin que hayan sido evaluadas las repercusiones debidas a este factor ambiental sobre la producción y la calidad de la biomasa.

Si éstas no resultaran ser muy importantes, los cuerpos de agua salobre pudieran ser utilizados para cultivar Artemia, inclusive en cultivos intensivos en lugares donde las condiciones climáticas son variantes y ofrecen pocas expectativas de buenos resultados al aire libre. En estos sistemas la calidad del ambiente es esencial y debido a sus características la fuente y la calidad del alimento son factores críticos, dado que un cultivo intensivo no cuenta con fuentes naturales del mismo. Por este motivo se hace necesario seleccionar una dieta de bajo costo, que a la vez permita obtener un producto de calidad aceptable (Lavens *et al.*, 1987).

Relacionando los dos últimos puntos, es posible visualizar la factibilidad de cultivar Artemia en condiciones de baja salinidad y utilizando una dieta adecuada, que asegure una alta sobrevivencia y una calidad similar a los productos que ya existen en el mercado.

Por lo que se refiere a la salinidad, se desconoce el valor óptimo de esta variable ambiental, pero es razonable pensar que éste tendría que estar cercano al nivel mínimo aceptado por Artemia, dado que mientras más alta es la salinidad mayor tendría que ser el gasto energético necesario para la osmorregulación (Persoone y Sorgeloos, 1980). Por otro lado, su cultivo pudiera ser factible en aguas con niveles de salinidad menores del óptimo, dada la capacidad de efectuar ajustes osmorregulatorios que tiene este organismo.

Versichele y Sorgeloos (1980) reportaron una baja eclosión (50% de diferencia) en quistes producidos a baja salinidad (35 ‰) comparados con aquellos producidos a salinidades de 90 ‰, y Berthélémy-Okazaki y Hedgecock (1987) observaron un 44% de oviparidad a una salinidad de 15 ‰ y que este porcentaje disminuye conforme aumenta la salinidad.

En cuanto a dietas para Artemia, este tópico ha sido estudiado extensivamente con el fin de reducir el costo de producción, ya que el alimento vivo mayormente utilizado y que ha dado mejores resultados son las microalgas. Otros alimentos utilizados son los de tipo inerte, que en general se refieren a harinas (trigo y soya entre otras), salvados (trigo y arroz), levaduras y microalgas secas (Spirulina sp., Dunaliella sp., Chlorella sp., Saccharomyces sp., Candida sp. y Scenedesmus sp.). Otros alimentos que se han utilizado son bacterias y productos de desecho (Johnson, 1980; Douillet, 1987; Basil et al., 1987). Entre todos los mencionados, los que han dado mejores resultados después del alimento vivo son el salvado de arroz, las levaduras y las microalgas secas. Sin embargo, los resultados no son

comparables a los alcanzados con microalgas vivas. Se ha encontrado por ejemplo que Artemia requiere de microalgas frescas como alimento si la salinidad es inferior a 20 ‰, pero que con salinidades mayores de este valor es posible utilizar dietas inertes como único alimento (Johnson, 1980).

Son pocos los estudios realizados para definir los requerimientos reales alimenticios de Artemia (Benijts *et al.*, 1976) y es posible que en diferentes estadios tales requerimientos sean diferentes (Johnson, 1980), ya que es de esperar que las necesidades dietéticas puedan cambiar durante el desarrollo de un organismo (Douillet, 1987). De esto consigue que un tipo de dieta pueda ser o no ser efectivo, en dependencia del diseño experimental. Por ejemplo, es posible que las microalgas sean el mejor alimento si se lleva un organismo desde larva hasta el estado adulto, dado los altos requerimientos de proteínas durante el desarrollo y el crecimiento somático, mientras que en el estado adulto un alimento con una gran cantidad de carbohidratos, que serían mejor proporcionados por algún tipo de salvado (Johnson, 1980; Douillet, 1987), pudiera resultar más efectivo. Por lo tanto, una dieta mixta pudiera finalmente ofrecer mejores resultados (Lavens *et al.*, 1987).

Tomando en consideración todo lo anterior, este trabajo pretende establecer la potencialidad de cultivos de Artemia en un medio salobre, utilizando una dieta mixta de microalgas y de algún tipo de salvado de granos. Lo anterior responde a una necesidad específica, expresada por el Centro Acuícola del Instituto de Acuicultura del Estado de Sonora en Cd. Obregón. Esta institución, inicialmente diseñada para el cultivo del langostino Macrobrachium rosenbergii, ha empezado a desarrollar una línea alternativa

referente al cultivo de peces de ornato, para los cuales Artemia constituye una fuente de alimento de alta calidad. Dado lo costoso que puede resultar conseguir este organismo en las diferentes presentaciones requeridas y además, debido a que allí se cuenta con la infraestructura para producirlo, se ha decidido estudiar la posibilidad de cultivar Artemia en forma masiva. Un inconveniente para esta finalidad es que el Centro se encuentra muy alejado de fuentes de agua de mar. Por otro lado, cuenta con una abundante disponibilidad de agua salobre, la cual es obtenida de un pozo que, según los datos proporcionados por el Director del Centro, Ocean. Fernando Gómez C., tiene las siguientes características: composición iónica mayoritariamente cloruro sódica, pH cercano a la neutralidad, dureza ( $\text{CaCO}_3$ ) de aproximadamente 5 gramos por litro y salinidad (sodio y cloruros) cerca de 12 ‰.

## I.1. OBJETIVOS

Considerando la finalidad del trabajo, se plantearon los siguientes objetivos:

- Seleccionar una o más cepas de microalgas que tengan buenas características de crecimiento en agua de salinidad reducida, en comparación con la salinidad de su medio natural.
- Comparar la composición proximal de las microalgas seleccionadas con la de dos dietas de bajo costo, y comprobar su calidad dietética en bioensayos con Artemia franciscana.
- Averiguar la factibilidad de cultivo de Artemia en condiciones de penumbra, similares a las prevalecientes en el laboratorio de producción masiva del Centro Acuícola de Ciudad Obregón.
- Utilizar la dieta seleccionada en base a los resultados anteriores y llevar a cabo un cultivo de Artemia a escala piloto, en condiciones análogas a las de un laboratorio de producción a nivel comercial.

## II. MATERIALES Y METODOS

### II.1. Selección de microalgas

Se preseleccionaron las tres cepas de microalgas marinas y las dos de agua dulce que se enlistan a continuación, por su capacidad de aclimatarse en agua salobre. Todas proceden de la colección de microalgas del Departamento de Acuicultura del CICESE y una mayor información acerca de ellas puede obtenerse en Trujillo-Valle (1993).

#### Marinas

- Chaetoceros sp. (Clone: CH-X-1)
- Phaeodactylum tricornutum Bohlin (Clone: PH-T-1)
- Nannochloropsis sp. (Clone: NN-X-1)

#### Dulceacuícolas

- Chlorella sp. (CL-X-1)
- Scenedesmus obliquus (SC-O-1)

La aclimatación se llevó a cabo disminuyendo progresivamente, de 5 en 5 ‰, la salinidad del agua de mar del sistema del laboratorio (32 ‰), diluyendola con agua de la llave, hasta llegar a la salinidad deseada (12 ‰). La frecuencia de cambio estuvo dictada por el tiempo en que la microalga tardó en alcanzar una densidad adecuada, la cual fue determinada empíricamente en base a la coloración de los cultivos. En el caso de Chlorella

sp. y de Scenedesmus sp. el inóculo inicial fue en un medio de salinidad de 5 ‰, que posteriormente se incrementó hasta 12 ‰ con agua de mar. El agua dulce era agua de la ciudad filtrada a través de filtros de fibra de vidrio GF/C, aireada para eliminar el cloro libre residual que pudiera contener y posteriormente mezclada con agua de mar hasta alcanzar la salinidad deseada, la cual era medida con una precisión de  $\pm 0.5$  ‰ con un refractómetro de laboratorio. Algunas de las características químicas del agua dulce de dilución, proporcionadas por la Comisión Estatal de Servicios Públicos de Ensenada, son:

- pH 7.5, [ ] cloruros  $313 \text{ mg Kg}^{-1}$ , dureza cálcica  $200 \text{ mg Kg}^{-1}$
- Dureza magnésica  $113 \text{ mg Kg}^{-1}$ , [ ] carbonato-bicarbonato  $207 \text{ mg Kg}^{-1}$

El medio de cultivo se preparó con los enriquecimientos descritos por Guillard y Ryther (1962) y se esterilizó en autoclave a  $1.05 \text{ Kg cm}^{-2}$  de presión y  $121^\circ\text{C}$ , por un lapso de 30 minutos.

Los cultivos de cada especie de microalga se mantuvieron por triplicado en condiciones estándar de laboratorio, a  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  y con luz continua ( $0.12 \times 10^{17} \text{ q cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , proporcionada por 4 lámparas de luz blanca fría de 40 watts). El control del crecimiento de los cultivos, excepto en el caso de Nannochloropsis sp., se llevó a cabo por medio de recuentos diarios en un hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad con rejilla de Neubauer. Debido a sus dimensiones (1.5 a  $3 \mu\text{m}$ ), este método no se pudo utilizar para Nannochloropsis sp., para la cual el control fue a través de lecturas diarias de densidad óptica en un espectofotómetro Hach DR-EL 2000, a una longitud de onda de 550 nm, y por mediciones de peso seco y peso seco orgánico. Para esto se filtraron

entre 5 y 10 ml de cultivo, a través de filtros GF/C de fibra de vidrio de 2.5 cm de diámetro previamente calcinados en una mufla a 450 °C por 4 horas. La muestra filtrada se puso a secar en una estufa a 60 °C hasta peso constante. Una vez obtenido de esta forma el peso seco total, las muestras se calcinaron en una mufla a 450 °C para obtener el peso inorgánico y, por diferencia, la cantidad de sustancia orgánica de las muestras. Para seleccionar, entre las cinco cepas probadas, las dos a utilizarse para los bioensayos de alimentación con Artemia, se compararon las tasas de crecimiento (número de divisiones día<sup>-1</sup>:  $\mu = \log_2 (N_t/N_0)/t$  en donde,  $N_t$  es el número de células final,  $N_0$  es el número inicial de células y  $t$  es el tiempo transcurrido entre lecturas de densidad celular). También se compararon las biomásas máximas producidas por cada especie de microalga en condiciones de salinidad 12 ‰ y en las equivalentes a su medio natural.

## II.2. Cultivo de microalgas

### II.2.1. Cultivo a pequeña escala.

Las dos especies de microalgas seleccionadas en base a su mejor crecimiento en agua de salinidad reducida se cultivaron posteriormente en recipientes de 2 l, con 1.5 l de medio, suficiente para servir como fuente de alimento para el número de Artemia utilizado en los bioensayos. El medio de cultivo fue el mismo que para los Erlenmeyer, variando sólo el tratamiento de esterilización, ya que en este caso el agua fue tratada con hipoclorito de sodio a razón de 3 ml l<sup>-1</sup> por 24 horas, eliminando posteriormente el cloro residual con tiosulfato de sodio (150 mg l<sup>-1</sup>) y proporcionando aireación.

Los cultivos se mantuvieron a las condiciones estándar de laboratorio, con burbujeo constante de aire enriquecido con una cantidad de CO<sub>2</sub> suficiente para mantener el pH entre 7.5 y 8.5. La técnica de mantenimiento fue la semicontinua con razones de dilución diaria de 0.5 (Chaetoceros sp.) y 0.4 (Nannochloropsis sp.) con el fin de obtener alimento de calidad constante.

La calidad del alimento fue comprobada obteniendo 3 muestras, durante el lapso que duró el bioensayo, para la determinación de peso seco total y orgánico, que se obtuvieron con los métodos ya descritos para Nannochloropsis sp. y para la realización de análisis proximales. Para realizar los análisis proximales se filtraron, por triplicado para cada tipo de análisis, 5-10 ml de cultivo a través de filtros de fibra de vidrio GF/C de 2.5 cm de diámetro, los cuales fueron almacenados en un congelador a -20 °C para su posterior análisis con los métodos que se detallan en el apartado correspondiente.

En el caso de Nannochloropsis sp. se realizó un análisis de regresión simple para determinar la correspondencia entre los valores de densidad óptica y el peso seco. Para tal efecto se tomaron cinco muestras durante la fase de crecimiento exponencial y hasta el inicio de la fase estacionaria. A partir de estos datos se obtuvo la ecuación:

$$(1) \quad Y = 576.21 + 189.82 (X) \quad (\text{agua salobre})$$

$$(2) \quad Y = 661.11 + 212.50 (X) \quad (\text{agua de mar})$$

donde "Y" es el peso seco por unidad de volumen de cultivo, dado que se estaba tomando este factor como equivalente a la concentración celular y

"X" el logaritmo en base dos de la densidad óptica. Los valores de  $r^2$  fueron de 0.94 y 0.98. Con esta ecuación fue posible determinar directamente, en base a las lecturas de densidad óptica, el volumen de cultivo equivalente a la ración diaria, que tenía que ser proporcionado como alimento para Artemia.

### II.2.2. Cultivo semimasivo.

La microalga Chaetoceros sp. fue cultivada en agua de salinidad reducida, en un tanque circular de fibra de vidrio con 400 litros de medio "f", con iluminación artificial con 4 lámparas iguales a las utilizadas en laboratorio, que complementaban la iluminación natural. El pH fue de 7.7-8.9, la aireación fue continua y la temperatura fluctuó entre 22 °C y 25 °C. Este cultivo se mantuvo en un sistema semicontínuo, a una razón de dilución diaria de 0.25.

### II.3. Cultivo de Artemia franciscana

Los quistes de Artemia empleados para este trabajo fueron del tipo comercial (San Francisco Bay Brand, Inc. Lote No. 3457). El tratamiento para la eclosión fue el mencionado por Correa-Sandoval (1991). Los nauplios producidos en las ocho horas posteriores a la primera eclosión fueron los escogidos para realizar los bioensayos. El conteo de organismos para su posterior división en los acuarios experimentales se realizó mediante la toma de 30 muestras al azar, midiendo la densidad de organismos y extrapolando al volumen total.

Se llevaron a cabo cuatro tipos de ensayo con Artemia, con diferentes finalidades en cada uno de ellos.

### II.3.1. Tipos de agua.

En esta fase se cultivó Artemia en agua de mar y en agua de mar diluida hasta 12 ‰ como se mencionó anteriormente, para comparar su crecimiento en los dos tipos de agua. Para evitar la posibilidad de que el tipo de alimento pudiera modificar los resultados, los organismos fueron alimentados con la misma dieta la cual, a raíz de los resultados positivos que obtuvieron con esta microalga Correa-Sandoval (1991), Arriaga-Haro (1993), fue la diatomea Chaetoceros sp. El tratamiento se hizo por triplicado utilizando recipientes de 2 l, con un litro de agua de mar o de salinidad reducida, con una densidad inicial de un organismo por mililitro. Los nauplios se colocaron directamente, después de eclosionar, en los dos tipos de agua de prueba y fueron contados de la forma anteriormente referida y distribuidos en los acuarios correspondientes. Durante el bioensayo se realizaron muestreos los días 5, 9, 12 y el día de inicio de formación de parejas, para evaluar el crecimiento y el estadio de desarrollo. Estos intervalos fueron escogidos porque, según resultados de otros experimentos llevados a cabo con este organismo y con la misma dieta, en esos días es generalmente posible notar el cambio desde un estadio de desarrollo al sucesivo (Correa-Sandoval, 1991; Arriaga-Haro, 1993; Paniagua-Chávez, 1993). El alimento fue suministrado 48 horas después del inicio del ensayo y los organismos fueron mantenidos hasta el estadio adulto y la primera formación de parejas. Posteriormente a esta fecha, el 50% de los organismos sobrevivientes fueron separados y mantenidos en cultivo, separando diariamente las parejas y cultivándolas por separado (por día y por acuario) para evaluar la producción de progenie.

El experimento se dió por terminado un día después de cuando se alcanzó el máximo número de parejas por día. El 50% restante fue tamizado, lavado con agua destilada y congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$ , para posteriormente medir su peso seco total y orgánico, el contenido de cenizas y para realizar los análisis proximales que se hicieron por triplicado con la metodología que se describe más adelante.

El alimento fue administrado diariamente en raciones previamente determinadas (Paniagua-Chávez, 1993), que están en función de la densidad y de la edad de los animales. La limpieza de los acuarios y el cambio de agua se realizaron diariamente. Las condiciones generales de cultivo fueron  $6.0\text{--}7.5\text{ mg l}^{-1}$  de  $\text{O}_2$ , pH 8-9, temperatura de  $21\pm 1^{\circ}\text{C}$  y semioscuridad (penumbra). Esta última condición, que coincide con la del laboratorio de Ciudad Obregón, tiene supuestamente el efecto de acelerar el crecimiento, ya que en la oscuridad se reduce la actividad natatoria pero no la de alimentación de Artemia, con la consecuencia que una mayor cantidad de energía sería canalizada al crecimiento (Castro y Gallardo, 1985). Por este motivo, alimentos de bajo rendimiento como los salvados de trigo o de arroz, que son abundantes y de bajo valor comercial, pudieran tener resultados positivos en el mantenimiento del organismo. Los datos que se obtuvieron y evaluaron con este ensayo fueron la sobrevivencia, el crecimiento, la biomasa producida como progeñe y la composición bioquímica de los adultos.

### II.3.2. Condiciones de iluminación.

Esta segunda fase se realizó bajo las mismas condiciones de cultivo y de alimentación y con los mismos criterios de evaluación del ensayo anterior, pero en condiciones de iluminación continua. Esta variante fue sugerida por los resultados del primer ensayo con el cual se obtuvieron quistes como progenie en ambos tipos de agua, en vista de que en nuestro caso el mayor interés era en la producción de nauplios, con la cual sería posible mantener una línea de producción continua de biomasa de tamaños diferentes, sin siembras periódicas con nauplios obtenidos de quistes comerciales.

### II.3.3. Dietas.

Se probaron por separado como dietas inertes salvados de trigo y de arroz, el primero porque es abundante en la región aledaña a Ciudad Obregón y el segundo por indicaciones de literatura, que lo señalan como alimento adecuado para Artemia (Castro et al., 1987; Douillet, 1987). Ambas dietas se utilizaron para cultivos de Artemia en agua salobre en condiciones de iluminación continua, como alimento único o enriquecidas con las microalgas Chaetoceros sp. o Nannochloropsis sp.; esta última solamente se probó con el salvado de trigo.

Los parámetros utilizados para la evaluación de todas las dietas y condiciones de cultivo fueron los mismos que en la primera fase. Con base en los resultados obtenidos se procedió con el cultivo semimasivo.

#### II.3.4. Cultivo semimasivo.

Los resultados de los bioensayos anteriores indicaron las condiciones necesarias para producir Artemia franciscana en agua salobre. En base a éstos, se realizó un escalamiento a nivel semimasivo en las instalaciones del Laboratorio de Acuicultura del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California. Para este efecto se hizo uso de estanques de fibra de vidrio de 400 litros, en los cuales se cultivó Artemia manteniendo las condiciones de pH entre 8 y 9, las de oxígeno de 6 a 8 mg l<sup>-1</sup>, con luz continua (2 lámparas de luz de día de 40 watts) y temperatura ambiente, que fluctuó entre 22 y 25 °C. El volumen del cultivo fue de 300 l, con una densidad de un organismo por mililitro. Para esta prueba se mantuvieron dos tanques, en uno de los cuales se probó salvado de arroz como alimento único. En el otro se usó la dieta mixta de salvado de arroz enriquecido con Chaetoceros sp..

El alimento fue administrado cada 24 horas; el cambio de agua fue parcial y se hizo en días alternos, extrayendo 2/3 del total del volumen (200 litros). Los parámetros de evaluación fueron los mencionados en la primera fase y las muestras se tomaron con la misma regularidad que en los ensayos anteriores.

#### II.3.5. Producción de progenie.

Para la evaluación de la producción de progenie, en todos los casos se realizaron conteos al microscopio de quistes y nauplios, tomando en consideración solamente las muestras de los dos días contiguos a aquel que

presentó la máxima formación de parejas, que se mantuvieron por un lapso de tres días posteriores a la primera producción. Dada su variabilidad, estos datos se representaron como la producción total de los nueve acuarios finales por tratamiento y con la mediana de los datos de cada acuario. Además, se representaron también como producción promedio por pareja, durante esos tres días.

#### **II.4. Biomasa y análisis bioquímicos**

##### **II.4.1. Biomasa.**

La cantidad de biomasa de Artemia y de microalgas se expresa como peso seco, que se evaluó por triplicado en muestras de cada cultivo filtradas a través de filtros de fibra de vidrio previamente calcinados y pesados. Las muestras se colocaron en una estufa a 60 °C hasta alcanzar peso constante, después de lo cual se determinó el contenido de cenizas calcinando la muestra seca en una mufla a 450 °C por 12 horas. La cantidad de sustancia orgánica se encontró por diferencia entre los dos pesos.

##### **II.4.2. Análisis bioquímicos.**

En las cuatro fases del trabajo se utilizaron muestras por triplicado de cada réplica del cultivo (excepto el cultivo masivo) para realizar los análisis bioquímicos.

El análisis de contenido de proteínas de las diferentes dietas y de Artemia se realizó con el método de Lowry et al. (1951) con las modificaciones

realizadas por López-Elías y Voltolina (1993), Cordero-Esquivel *et al.* (1993) y Paniagua-Chávez (1993), utilizando para la extracción la metodología descrita por Mayzaud *et al.* (1985) y por Farber-Lorda (1986).

Los carbohidratos totales se evaluaron con el método de Dubois *et al.* (1956) como descrito en Malara y Charra (1972); la extracción se hizo según Whyte (1987).

En el caso de los lípidos se utilizaron los métodos de extracción de Bligh y Dyer (1959) y la técnica de determinación de Pande *et al.* (1963).

## II.5. Dietas

Los salvados de trigo y de arroz se molieron aproximadamente por 3 minutos con agua de mar o salobre (100 g de salvado/litro de agua) en una licuadora. La suspensión resultante se filtró a través de diferentes tamices hasta una luz de malla de 60  $\mu\text{m}$  y se almacenó en refrigeración a 4 °C durante un máximo de tres días. Para evaluar la cantidad de sólidos se colocaron alícuotas del líquido filtrado en navecillas previamente calcinadas y pesadas y se secaron a 60 °C hasta peso constante. Posteriormente, las muestras se calcinaron en una mufla a 450 °C por 12 horas. De esta manera se obtuvo el rendimiento del material original como razón entre los pesos secos total y orgánico iniciales y finales del material usado como dieta, y se pudo calcular el volumen de la suspensión que tenía que ser agregado como alimento.

Las raciones diarias, en número de células de *Chaetoceros* sp. por organismo, fueron las establecidas por Correa-Sandoval y Buckle-Ramírez (1993) (tabla I). Las cantidades de *Nannochloropsis* sp. y de salvado de

trigo se determinaron en base al peso seco orgánico de las raciones de Chaetoceros sp., que funcionó como alimento control (tabla I). El salvado de arroz se proporcionó inicialmente en la misma cantidad que el salvado de trigo y posteriormente, en el caso de los experimentos a pequeña escala, se aumentó hasta  $0.2 \text{ mg org}^{-1} \text{ día}^{-1}$  a partir del día 12.

Las raciones para los cultivos masivos fueron de  $0.2 \text{ mg org}^{-1} \text{ día}^{-1}$  de salvado de arroz, cuando éste fue suministrado como alimento único. Para la dieta mixta, la ración diaria fue de  $0.2 \text{ mg org}^{-1} \text{ día}^{-1}$  de salvado, más un número de células frescas de Chaetoceros sp. equivalente al 20% del número idóneo cuando se utiliza como alimento único.

#### II.6. Tratamiento estadístico.

Con el fin de establecer diferencias o similitudes entre los diferentes tratamientos, se realizaron primeramente pruebas de normalidad (Kolmogorov-Smirnov) para determinar el tipo de pruebas estadísticas a utilizar. En todos los casos los resultados de las pruebas mencionadas fueron positivos, por lo cual los datos se contrastaron a través de análisis de varianza paramétrica de una vía y, cuando esto fue necesario, con una prueba a posteriori de comparación múltiple (prueba de Tukey). El valor de alfa fue de 0.05 para todas las pruebas.

**TABLA I.** Raciones diarias de los diferentes alimentos, vivos (Correa-Sandoval y Buckle-Ramírez, 1993) e inertes, utilizados como dieta de Artemia franciscana.

| DIA | ALIMENTO Y RACION POR ORGANISMO          |                                                   |
|-----|------------------------------------------|---------------------------------------------------|
|     | Chaetoceros sp.<br>(Cel. $\times 10^3$ ) | OTROS ALIMENTOS ( $\mu\text{g}$ de peso orgánico) |
| 1   | 150                                      | 07.75                                             |
| 2   | 300                                      | 15.51                                             |
| 5-6 | 450                                      | 23.26                                             |
| 7   | 600                                      | 31.02                                             |
| 8   | 750                                      | 38.77                                             |
| 9   | 1120                                     | 57.90                                             |
| 10  | 1140                                     | 58.93                                             |
| 12  | 1800                                     | 93.06                                             |
| 14  | 2160                                     | 111.67                                            |
| 16  | 2520                                     | 130.29                                            |
| 18+ | 2750                                     | 142.18                                            |

### III. RESULTADOS

#### III.1. Selección de microalgas

En general, todas las especies de microalgas probadas tuvieron un comportamiento similar, con valores de  $\mu$  en la fase exponencial que no mostraron diferencias significativas para los dos valores de salinidad. La única excepción fue Phaeodactylum tricornutum, el cual mostró una tasa de crecimiento significativamente menor en agua de salinidad reducida. Sin embargo, todas presentaron diferencias significativas en la biomasa final producida, que resultó siempre mayor en la salinidad de su ambiente natural (tabla II y figuras 1 a 5). Además, los cultivos en agua de salinidad reducida mostraron en general aglutinación de células y adhesión a las paredes de los recipientes, que son fenómenos que en general fomentan la pronta contaminación por bacterias del cultivo y que además causarían problemas de cosecha y de ingestión por Artemia.

Estos problemas fueron más evidentes en el caso de las cepas de origen dulceacuícola y para Phaeodactylum tricornutum, que fueron eliminadas en favor de Chaetoceros sp. y Nannochloropsis sp., cuyos cultivos en agua de salinidad reducida presentaron mejores características de crecimiento y menor adhesión y aglutinación.

**TABLA II.** Datos promedio de la tasa de crecimiento ( $\mu$ ) durante la fase exponencial y de la biomasa obtenida en la fase de crecimiento lento. También se da la decisión obtenida del análisis de varianza paramétrico de una vía, aplicada a los resultados provenientes de los cultivos de cinco especies de microalgas en dos medios de salinidad diferente: agua de mar (A.M.) o agua dulce (A.D.) y agua de salinidad reducida (A.S.). En paréntesis: desviación estándar. S y N.S.: diferencia significativa o no significativa ( $\alpha = 0.05$ ).

| ESPECIE                                    | MEDIO | $\mu$       |      | BIOMASA<br>(Cel. $\times 10^6$ ) |   |
|--------------------------------------------|-------|-------------|------|----------------------------------|---|
| <u>Chaetoceros</u> sp.                     | A.S.  | 1.30 (0.34) |      | 2.12 (0.43)                      |   |
|                                            | A.M.  | 1.45 (0.40) | N.S. | 2.65 (0.08)                      | S |
| <u>Phaeodactylum</u><br><u>tricornutum</u> | A.S.  | 0.64 (0.25) |      | 2.54 (0.55)                      |   |
|                                            | A.M.  | 1.04 (0.30) | S    | 3.42 (0.47)                      | S |
| <u>Chlorella</u> sp.                       | A.S.  | *           |      | 0.96 (0.17)                      |   |
|                                            | A.D.  | *           |      | 1.42 (0.19)                      | S |
| <u>Scenedesmus</u><br><u>obliquus</u>      | A.S.  | 0.87 (0.38) |      | 1.66 (0.17)                      |   |
|                                            | A.D.  | 1.23 (0.39) | N.S. | 2.82 (0.46)                      | S |
| <b>DENSIDAD<br/>OPTICA</b>                 |       |             |      |                                  |   |
| <u>Nannochloropsis</u> sp.                 | A.S.  | 0.96 (0.27) |      | 0.29 (0.02)                      |   |
|                                            | A.M.  | 0.77 (0.23) | N.S. | 0.40 (0.03)                      | S |

\*: la adhesión de las células a las paredes de los recipientes, hizo difícil su conteo. Como consecuencia, se decidió no reportar los datos de  $\mu$ , que se consideraron poco confiables.

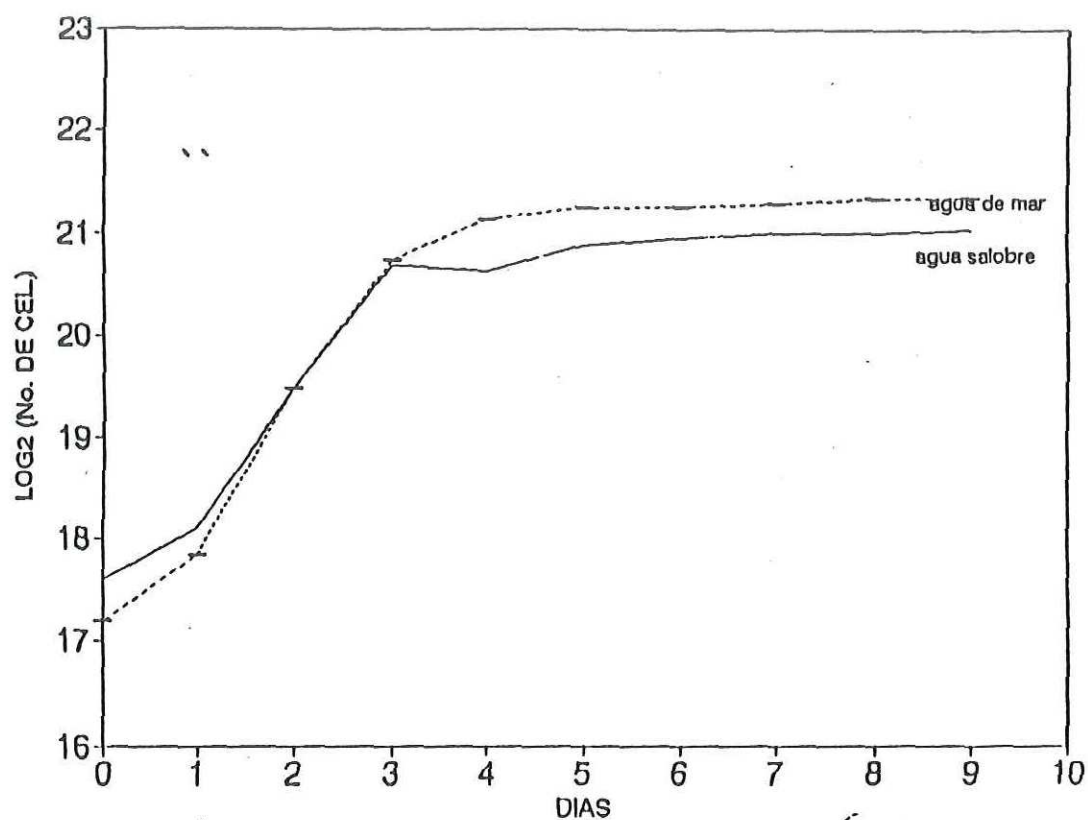


Figura 1.-Crecimiento de *Chaetoceros* sp. cultivado en aguas de mar y de salinidad reducida (12 ‰), en medio 'f' y a nivel erlenmeyer.

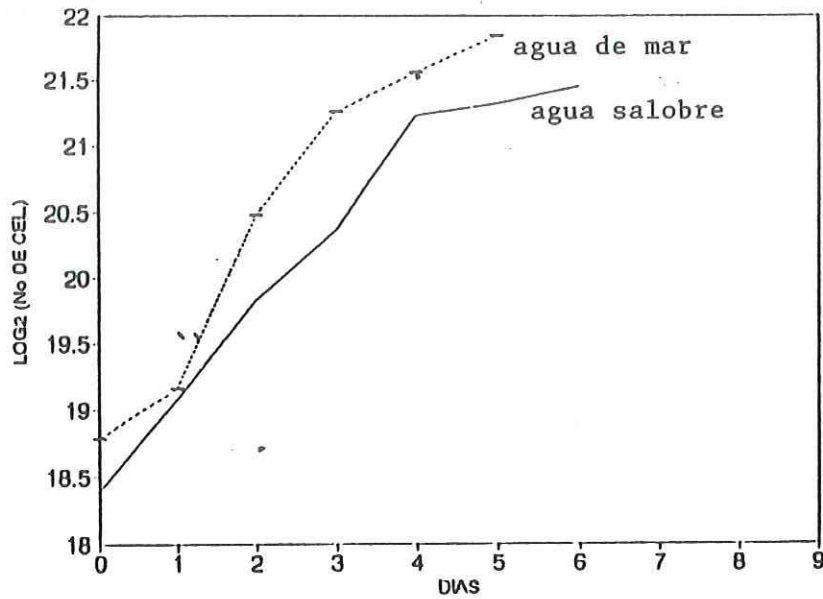


Figura 2. Crecimiento de *Phaeodactylum tricornutum* cultivado en aguas de mar y de salinidad reducida (12 ‰), en medio 'f' y a nivel erlenmeyer.

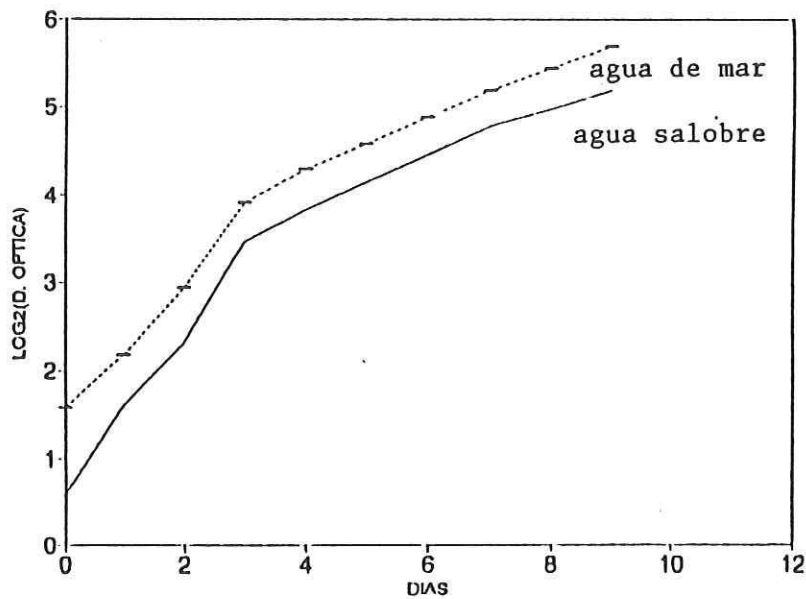


Figura 3. Crecimiento de *Nannochloropsis* sp. cultivado en aguas de mar y de salinidad reducida (12 ‰), en medio 'f' y a nivel erlenmeyer.

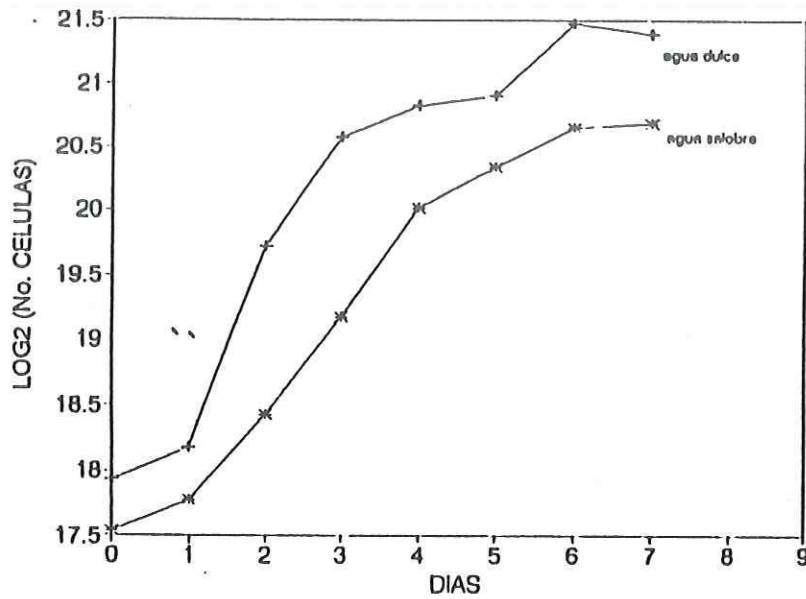


Figura 4. Crecimiento de *Scenedesmus obliquus* cultivado en aguas dulce y de salinidad reducida (12‰), en medio 'f' y a nivel erlenmeyer.

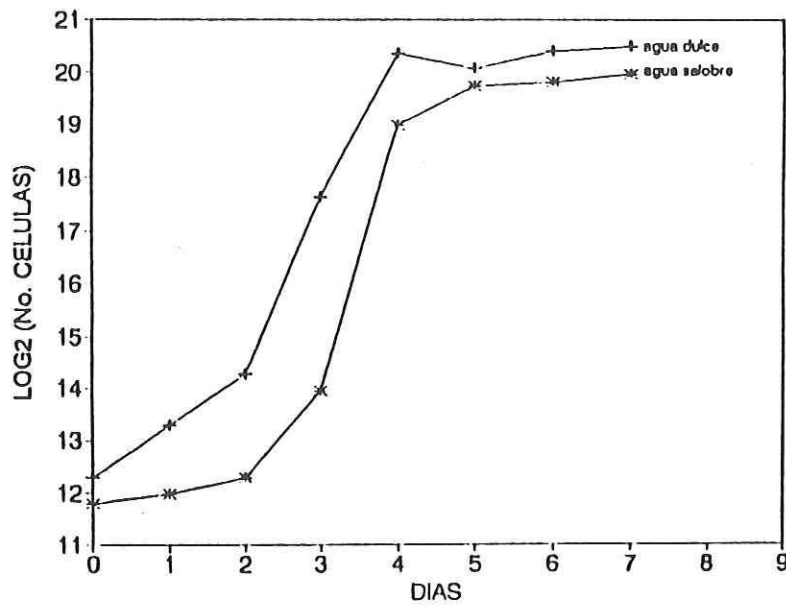


Figura 5. Crecimiento de *Chlorella* sp. cultivado en aguas dulce y de salinidad reducida (12‰), en medio 'f' y a nivel erlenmeyer.

### III.2 Cultivos semicontínuos de microalgas

Las dos cepas de microalgas seleccionadas, Chaetoceros sp. y Nannochloropsis sp., fueron mantenidas en cultivos semicontínuos en recipientes de 1.5 litros, con razones de dilución diaria de 0.5 y 0.4 respectivamente, la primera por indicaciones bibliográficas (López-Elías y Voltolina, 1993) que indican esta razón como la más adecuada para mantener los cultivos en estado estable, cerca de las condiciones de producción máxima. La razón de dilución seleccionada para Nannochloropsis sp. fue determinada experimentalmente, ya que diluciones mayores a ésta no permitieron mantener los cultivos en estado estable, porque resultaron en el lavado de los cultivos, y las inferiores porque resultaron primeramente en un aumento paulatino de las concentraciones celulares, seguido por un decaimiento rápido.

Los resultados mostraron que para ambas microalgas no existen diferencias significativas debidas a las diferencias de salinidad del medio de cultivo, por lo menos por lo que se refiere a la producción de células, evaluada por conteo directo, para Chaetoceros sp. y como densidad óptica para Nannochloropsis sp. (tabla III).

En el caso de la primera especie de microalga es necesario mencionar que el alto valor de las desviaciones estándar se debe a fluctuaciones de la densidad celular, en coincidencia con variaciones del pH, que fluctuó entre 6.5 y 9.3, y de la temperatura (máximo de 25 °C). De todas formas, tales variaciones se presentaron en ambos medios y no invalidan los resultados de los bioensayos. El número promedio de células por mililitro logrado

durante la fase estable fue de  $4.3$  y  $5.5 \times 10^6$  para agua diluida y agua de mar respectivamente, sin que hubieran diferencias significativas. Para Nannochloropsis sp. tampoco se observaron diferencias significativas aunque, como en el caso anterior, se obtuvieron valores menores en agua de salinidad reducida (tabla III).

Los cultivos de ambas microalgas en los diferentes medios presentaron células aisladas, una aparente baja contaminación por bacterias y no se observaron agregados celulares o células deformes.

### III.2.1 Composición de las microalgas

El análisis proximal realizado a las dos especies de microalgas mostró tendencias aproximadamente similares. Primeramente, los contenidos de cenizas y proteínas no presentaron grandes diferencias para las dos condiciones: las cenizas fueron alrededor del 23% y las proteínas cerca del 35% del peso seco total en el caso de Chaetoceros sp. mientras que para Nannochloropsis sp. estos valores fueron cerca de 12 y 31%, respectivamente. La concentración de los carbohidratos resultó mayor en las microalgas cultivadas en agua salobre, en casi un 150% para Chaetoceros sp. y un 75% para Nannochloropsis sp.. En cambio, los lípidos tendieron a disminuir (en aproximadamente un 50%) en el caso de Chaetoceros sp. y a aumentar en la otra microalga (tabla IV).

**TABLA III.** Concentración promedio (en células  $\text{ml}^{-1}$  o como densidad óptica) y peso seco (en  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) en cultivos semicontínuos de Chaetoceros sp. y de Nannochloropsis sp. cultivados en 1.5 l de agua de salinidad reducida (A.S) y de agua de mar (A.M), con razones de dilución diaria de 0.5 y 0.4 respectivamente. En paréntesis: desviación estándar. N.S.: diferencia no significativa (análisis de varianza de una vía,  $\alpha=0.05$ ).

| AGUA                   | ESPECIE                    | CELULAS $\times 10^6$ | PESO SECO                           |
|------------------------|----------------------------|-----------------------|-------------------------------------|
| A.S.                   | <u>Chaetoceros</u> sp.     | 4.28(0.9)             | 182                                 |
|                        |                            |                       | 42.5 $\mu\text{g } 10^6\text{cel.}$ |
| A.M.                   | <u>Chaetoceros</u> sp.     | 5.55(1.1)N.S          | 328                                 |
|                        |                            |                       | 59.0 $\mu\text{g } 10^6\text{cél.}$ |
| <b>DENSIDAD OPTICA</b> |                            |                       |                                     |
| A.S.                   | <u>Nannochloropsis</u> sp. | 0.67(.001)            | 343                                 |
| A.M.                   | <u>Nannochloropsis</u> sp. | 0.71(.001)N.S         | 398                                 |

**TABLA IV.** Composición proximal, en porcentaje del peso seco total, de Chaetoceros sp. y Nannochloropsis sp., cultivadas en 1.5 l de agua de salinidad reducida (AS) y de agua de mar (AM). A título comparativo, también se dan en esta tabla las composiciones proximales de los dos tipos de alimento inerte (salvado de trigo (ST) y salvado de arroz (SA)), usados en los otros ensayos. En paréntesis: desviación estándar.

| AGUA                   | ESPECIE                    | Proteínas | Carbohidratos | Lípidos   | Cenizas    |
|------------------------|----------------------------|-----------|---------------|-----------|------------|
| AS                     | <u>Chaetoceros</u> sp.     | 35.1(3.4) | 19.0(3.7)     | 9.5(3.4)  | 23.0 (1.7) |
| AM                     | <u>Chaetoceros</u> sp.     | 35.9(4.3) | 5.4(0.6)      | 22.5(2.5) | 23.1 (2.0) |
| AS                     | <u>Nannochloropsis</u> sp. | 30.3(4.1) | 24.4(3.3)     | 18.7(5.7) | 12.4 (0.3) |
| AM                     | <u>Nannochloropsis</u> sp. | 31.3(4.5) | 14.0(3.4)     | 22.5(1.3) | 12.3 (0.3) |
| <b>Alimento inerte</b> |                            |           |               |           |            |
|                        | Salvado de trigo           | 11.4(0.8) | 57.4(1.2)     | 6.4(0.4)  | 6.8 (1.4)  |
|                        | Salvado de arroz           | 14.2(1.1) | 58.2(2.1)     | 7.6(0.7)  | 6.4 (0.7)  |

### **III.3 Cultivo de Artemia franciscana**

#### **III.3.1 Tipos de agua**

##### **III.3.1.1. Crecimiento y sobrevivencia**

Los cultivos de Artemia en los dos tipos de agua, en condiciones de penumbra y usando como alimento Chaetoceros sp., cultivada en los tipos de agua respectivos, dieron resultados similares en lo que se refiere a crecimiento y sobrevivencia, ya que en ambas condiciones las tallas y los estadios de madurez no fueron diferentes en ninguno de los días muestreados. De la misma manera, los datos de sobrevivencia no muestran diferencias importantes (tabla V).

##### **III.3.1.2. Producción de parejas y progenie**

Las primeras parejas se notaron durante el día 14 para la condición normal y el día 15 para Artemia cultivada en agua de salinidad reducida. También se observó que en la condición normal se formó un mayor número promedio de parejas (122 vs 80) en un lapso menor de tiempo, siete y diez días respectivamente. El pico máximo (30 parejas) se alcanzó más rápidamente en agua de mar, en la cual esto se notó después de sólo 6 días, mientras que en el segundo tratamiento esta condición se alcanzó en el noveno día (17 parejas) (tabla VI).

Por otra parte, es importante mencionar que en ambos tratamientos la progenie estuvo representada por quistes en su totalidad. El conteo de los quistes producidos durante tres días por las parejas formadas en los tres días contiguos al pico de formación de parejas, mostró que los 135 organismos

mantenidos en un medio de salinidad reducida produjeron un mayor número total de quistes (1166 vs 1096) y, como consecuencia del menor número de parejas, la producción de cada hembra fue mayor en esta condición (8.6 vs 5.5) (tabla VI).

Es importante hacer notar que, en casi todos los aspectos de producción mencionados, existe una gran variabilidad entre días y entre repeticiones, principalmente en el caso de los cultivos en salinidad reducida, lo que se constata por los valores de la mediana y de los intervalos de valores de producción.

#### **III.3.1.3 Composición proximal**

El análisis proximal de los organismos adultos (15-17 días) cultivados en las dos diferentes condiciones, muestra valores similares en peso seco (0.15 mg en agua de mar y 0.14 mg en agua de salinidad reducida) y aproximadamente igual contenido de cenizas. En lo que se refiere a las fracciones orgánicas, éstas resultaron todas más altas en agua de mar que en agua de salinidad reducida (tabla VII), por lo cual el porcentaje de sustancia orgánica explicado con las metodologías utilizadas resultó notablemente inferior para los organismos cultivados en agua de salinidad reducida. Aunque esto no permite una comparación entre los datos, es importante hacer notar que la fracción mayor de sustancia orgánica es, en ambos casos, la de los lípidos, lo cual puede ser importante para comparaciones con otros tipos de dieta y de condiciones de cultivo.

**TABLA V.** Datos de crecimiento y de sobrevivencia de *Artemia franciscana* cultivada en agua de salinidad reducida (AS) y en agua de mar (AM), en condiciones de penumbra, utilizando *Chaetoceros* sp. mantenido en los dos medios. En paréntesis: desviación estándar. Debido al traslape entre los límites de confianza ( $\alpha=0.05$ ) de los valores promedio calculados para cada fecha de muestreo, no se procedió con otras pruebas estadísticas de comparación de medias.

| EDAD<br>(Días) | AGUA | ESTADIO     | LONGITUD<br>TOTAL(mm) | % SOBREVIVENCIA |
|----------------|------|-------------|-----------------------|-----------------|
| 5              | AS   | metanauplio | 2.3 (0.1)             | 80.5 (4.9)      |
|                | AM   | metanauplio | 2.3 (0.1)             | 80.7 (2.7)      |
| 9              | AS   | adulto      | 4.7 (0.5)             | 56.5 (8.4)      |
|                | AM   | adulto      | 4.6 (0.4)             | 64.4 (5.2)      |
| 12             | AS   | adulto      | 6.0 (0.5)             | 43.6 (2.1)      |
|                | AM   | adulto      | 6.2 (0.4)             | 43.6 (2.5)      |
| 14             | AM   | adulto      | 6.4 (0.7)             | 42.7 (2.5)      |
| 15             | AS   | adulto      | 6.6 (0.3)             | 42.5 (1.8)      |

**TABLA VI.** Datos de producción de parejas y de progenie de *Artemia franciscana*, cultivada en agua de salinidad reducida (AS) y en agua de mar (AM), en condiciones de penumbra y utilizando *Chaetoceros* sp. como alimento. En paréntesis: desviación estándar. En corchetes: número total de parejas. En llaves: mínimo y máximo. \*: número de días transcurridos desde la formación de la primera pareja. +: mediana.

| AGUA | PAREJAS<br>TOTALES<br>PROMEDIO | MAXIMO<br>PAREJAS | PRODUCCION<br>TOTAL      | PRODUCCION<br>/PAREJA |
|------|--------------------------------|-------------------|--------------------------|-----------------------|
| AS   | 80(23) *10                     | 17(3.0) día 9     | 1166[135]<br>+78{13-387} | 8.6                   |
| AM   | 122(17) *7                     | 30(2.6) día 6     | 1096[196]<br>+87{18-371} | 5.5                   |

**TABLA VII.** Composición proximal, en porcentaje del peso seco total, de *Artemia franciscana* (después de la formación de la primera pareja), cultivada en agua de salinidad reducida (AS) y en agua de mar (AM), en condiciones de penumbra, utilizando *Chaetoceros* sp. mantenido en los dos medios. En paréntesis: desviación estándar.

| AGUA | PESO SECO<br>UNITARIO (mg) | CENIZAS   | PROTEINAS | CHO'S     | LIPIDOS   |
|------|----------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| AS   | 0.14 (0.04)                | 7.8 (2.0) | 11.7(3.4) | 7.6(0.9)  | 26.7(0.3) |
| AM   | 0.15 (0.01)                | 7.0 (1.1) | 18.9(4.5) | 11.6(1.0) | 44.8(2.8) |

### III.3.2 Condiciones de iluminación

#### III.3.2.1 Crecimiento y sobrevivencia

Al comparar los resultados de los cultivos de Artemia en condiciones de luz continua, en un medio de salinidad reducida (12 ‰) y con una dieta de Chaetoceros sp., con los obtenidos bajo condiciones de penumbra, se observó que las tallas de los organismos en oscuridad son constantemente mayores que las de aquellos cultivados con luz, y que en general todas estas diferencias son significativas (tabla VIII). La máxima talla medida es de 6.6 mm para el primero y de 6.3 para el segundo, esta última lograda en el día quince. Como consecuencia, el estado adulto se presentó más rápidamente en la oscuridad (día 9), mientras que con luz continua esto solamente se alcanzó en el día 15, en coincidencia con la primera aparición del estadio adulto.

Por lo que se refiere a porcentajes de sobrevivencia, éstos casi siempre fueron mayores, durante los días muestreados, en los cultivos mantenidos bajo luz continua, hasta el final del experimento (tabla VIII).

#### III.3.2.2 Producción de parejas y progenie

A pesar del desfase en el tiempo necesario para alcanzar el estadio adulto con los dos tratamientos, el día de la aparición de la primera pareja es el mismo (día 15). En este caso se observan resultados favorables a la condición de luz continua, dado que se lograron 93 parejas promedio contra las 80 de penumbra, pero en la mitad de tiempo (5 días); además, el pico máximo de formación de parejas (28) se observó en el segundo día (tabla IX).

Los datos de producción de progenie son difíciles de comparar, ya que en oscuridad los organismos producen solamente quistes, mientras que con la otra condición se obtienen únicamente nauplios. Sin embargo, se observa que en un lapso de tres días (72 horas) las 190 parejas tuvieron una producción total de 5732 nauplios y de 30.1 por pareja, en comparación con los 8.6 quistes por pareja obtenidos en la oscuridad (tabla IX).

#### **III.3.2.3 Composición proximal**

El análisis proximal de los adultos mostró que su composición es aproximadamente la misma para ambos tratamientos: en general, el contenido de lípidos representó la mayor proporción de la materia explicada, aproximadamente un 27%, y los carbohidratos la menor con un 6%. Comparando los datos obtenidos en las dos condiciones experimentales, los lípidos resultaron ser el 26.7 y el 29.3%, los carbohidratos el 7.6 y el 4.1% y las proteínas el 11.7 y de 15.1%, para la oscuridad y luz continua, respectivamente. El peso seco unitario y el contenido de cenizas presentaron valores muy similares (Tabla X).

**TABLA VIII.** Datos de crecimiento y de sobrevivencia de Artemia franciscana cultivada en agua de salinidad reducida, en penumbra (P) y con luz continua (LC), utilizando Chaetoceros sp. como alimento. En paréntesis: desviación estándar. S o N.S: diferencia significativa o no significativa (análisis de varianza de una vía, alfa = 0.05).

| EDAD<br>(Días) | LUZ | ESTADIO     | LONGITUD<br>TOTAL(mm) | % SOBREVIVENCIA |
|----------------|-----|-------------|-----------------------|-----------------|
| 5              | P   | metanauplio | 2.3 (0.1)             | 80.5 (4.9)      |
|                | LC  | metanauplio | 1.4 (0.1)S            | 80.3 (6.2)      |
| 9              | P   | adulto      | 4.7 (0.5)             | 56.5 (8.4)      |
|                | LC  | metanauplio | 3.0 (0.3)S            | 70.5 (6.4)      |
| 12             | P   | adulto      | 6.0 (0.5)             | 43.6 (2.1)      |
|                | LC  | juvenil     | 4.7 (0.3)S            | 66.0 (6.8)      |
| 15             | P   | adulto      | 6.6 (0.3)             | 42.5 (1.8)      |
|                | LC  | adulto      | 6.3 (0.6)N.S          | 56.4 (2.9)      |

**TABLA IX.** Datos de producción de parejas y de progenie de Artemia franciscana, cultivada en agua de salinidad reducida, en penumbra (P) y con luz continua (LC), utilizando Chaetoceros sp. como alimento. La producción se representa con el valor de la mediana. En paréntesis: desviación estándar. En corchetes: número total de parejas. En llaves: mínimo y máximo. \*: número de días transcurridos desde la aparición de la primera pareja. +: mediana. Producción en: quistes (Q) o nauplios (N).

| AGUA | PAREJAS<br>TOTALES<br>PROMEDIO | MAXIMO<br>PAREJAS | PRODUCCION<br>TOTAL        | PRODUCCION<br>/PAREJA |
|------|--------------------------------|-------------------|----------------------------|-----------------------|
| P    | 80(23) *10                     | 17(3.0) día 9     | 1166[135]Q<br>+78{13-387}  | 8.6                   |
| LC   | 93(13) * 5                     | 28(4.1) día 2     | 5732[190]N<br>+72{199-887} | 30.1                  |

**TABLA X.** Composición proximal, en porcentaje del peso seco total, de Artemia franciscana (después de la formación de la primera pareja) cultivada en agua de salinidad reducida en penumbra (P) y luz continua (LC), utilizando Chaetoceros sp. como alimento. En paréntesis: desviación estándar.

| LUZ | PESO SECO<br>UNITARIO (mg) | CENIZAS   | PROTEINAS | CHO'S    | LIPIDOS   |
|-----|----------------------------|-----------|-----------|----------|-----------|
| P   | 0.14 (0.04)                | 7.8 (2.0) | 11.7(3.4) | 7.6(0.9) | 26.7(0.3) |
| LC  | 0.17 (0.05)                | 8.5 (1.7) | 15.1(2.8) | 4.1(1.3) | 29.3(2.1) |

### III.3.3 Dietas de microalgas y alimento inerte

Los resultados descritos comprobaron la factibilidad de cultivar Artemia en un medio de salinidad reducida y demostraron que un régimen de luz continua es preferible para obtener una alta producción de nauplios. Seguidamente, se procedió a ensayar la utilización de la segunda especie de microalga que puede ser cultivada en un medio de salinidad reducida (Nannochloropsis sp.) así como el uso del salvado de trigo, que inicialmente se había contemplado como dieta única o como base para la formulación de dietas mixtas.

#### III.3.3.1. Crecimiento y sobrevivencia

Los resultados obtenidos utilizando Nannochloropsis sp. como fuente de alimento mostraron que con esta microalga el crecimiento tiende a ser más lento que con Chaetoceros sp.. En todos los días muestreados las tallas resultaron significativamente inferiores (tabla XI). Además, se pudo observar que el tiempo en que se alcanzan los diferentes estadios de desarrollo es diferente, ya que con esta dieta los organismos aún se encontraban en las fases de metanauplio y juvenil para los días 12 y 15, cuando los cultivados con Chaetoceros sp. eran juveniles y adultos, respectivamente.

Sin embargo, aunque con un crecimiento más lento, estos organismos lograron alcanzar el estado adulto, en dos días más que el control. Además, con esta dieta el porcentaje de sobrevivencia fue mayor, de 68.5 contra 56.4%.

En el caso del salvado de trigo, los resultados fueron negativos: el crecimiento y el desarrollo fueron lentos con tallas que no sobrepasaron dos milímetros de longitud en 9 días y con organismos todavía en el estadio de metanauplio. Además, el porcentaje de sobrevivencia entre los días de muestreo 9 y 12 resultó menor del 10%, por lo que se decidió discontinuar el experimento con esta dieta.

#### III.3.3.2. Producción de parejas y progenie

Como se mencionó, con Nannochloropsis sp. el tiempo de formación de la primera pareja es de dos días más largo que con la dieta de comparación (17 días). Además, con esta dieta se produjeron en promedio sólo 14 parejas en un lapso de 7 días, alcanzándose el número máximo el último día, con 7 parejas. También hay que mencionar que en algunos días no se notaron nuevos organismos en apareamiento y que hubo un grado elevado de discontinuidad y de variabilidad entre las repeticiones (tabla XII).

En un lapso de tres días las 34 parejas produjeron una cantidad total de 757 nauplios, que representa una producción de 22 nauplios por pareja, la cual está sólo un poco alejada de los valores obtenidos con la dieta control (tabla XII).

#### III.3.3.3. Composición proximal

El análisis proximal de estos organismos mostró que la dieta de Nannochloropsis sp. da como resultado una composición similar a los anteriores ensayos con Chaetoceros sp. Los lípidos, la fracción de mayor importancia,

representan el 22.5% de la materia total explicada, y los carbohidratos sólo el 8.1%. Los valores de peso seco, de contenido de cenizas y de proteínas son similares a los obtenidos con la dieta control (tabla XIII).

**TABLA XI.** Datos de crecimiento y de sobrevivencia de Artemia franciscana cultivada en agua de salinidad reducida, iluminación continua y utilizando Chaetoceros sp.(CH), Nannochloropsis sp.(NN) y salvado de trigo (ST), como alimento. En paréntesis: desviación estándar. a,b,c: diferencia significativa (análisis de varianza de una vía y prueba a posteriori de Tukey. alfa = 0.05)

| EDAD<br>(Días) | DIETA | ESTADIO     | LONGITUD<br>TOTAL(mm) | % SOBREVIVENCIA |
|----------------|-------|-------------|-----------------------|-----------------|
| 5              | CH    | metanauplio | 1.4 (0.1)a            | 80.3 (6.2)      |
|                | NN    | metanauplio | 1.1 (0.8)b            | 94.7 (0.5)      |
|                | ST    | metanauplio | 1.1 (0.1)b            | 68.3 (10.5)     |
| 9              | CH    | metanauplio | 3.0 (0.3)a            | 70.5 (6.4)      |
|                | NN    | metanauplio | 2.4 (0.1)b            | 88.1 (0.5)      |
|                | ST    | metanauplio | 1.2 (0.1)c            | 34.2 (7.4)      |
| 12             | CH    | juvenil     | 4.7 (0.3)a            | 66.0 (6.8)      |
|                | NN    | metanauplio | 4.2 (0.3)b            | 70.8 (0.2)      |
| 15             | CH    | adulto      | 6.3 (0.6)a            | 56.4 (2.9)      |
|                | NN    | juvenil     | 5.1 (0.9)b            | 68.5 (0.8)      |
| 17             | NN    | adulto      | 5.7 (1.3)             | 68.2 (1.2)      |

**TABLA XII.** Datos de producción de parejas y de progenie de Artemia franciscana, cultivada en agua de salinidad reducida, con luz continua y utilizando Chaetoceros sp.(CH) y Nannochloropsis sp.(NN), como alimento. En paréntesis: desviación estándar. En corchetes: número total de parejas. En llaves: mínimo y máximo. \*: número de días transcurridos desde la formación de la primera pareja. +: mediana.

| DIETA | PAREJAS<br>TOTALES<br>PROMEDIO | MAXIMA<br>FORMACION | PRODUCCION<br>TOTAL       | PRODUCCION<br>/PAREJA |
|-------|--------------------------------|---------------------|---------------------------|-----------------------|
| NN    | 14(02) *7                      | 7(1.0) día 7        | 757[034]<br>+54{0-200}    | 22.0                  |
| CH    | 93(13) *5                      | 28(4.1) día 2       | 5732[190]<br>+72{199-887} | 30.1                  |

**TABLA XIII.** Composición proximal, en porcentaje del peso seco total, de Artemia franciscana cultivada en agua de salinidad reducida, con luz continua y utilizando Chaetoceros sp.(CH) y Nannochloropsis sp.(NN) como alimento, después de la formación de la primera pareja. En paréntesis: desviación estándar.

| DIETA | PESO SECO<br>UNITARIO (mg) | CENIZAS   | PROTEINAS | CHO'S    | LIPIDOS   |
|-------|----------------------------|-----------|-----------|----------|-----------|
| NN    | 0.11 (0.07)                | 9.7 (1.1) | 14.2(2.1) | 8.1(2.2) | 22.5(1.3) |
| CH    | 0.17 (0.05)                | 8.5 (1.7) | 15.1(2.8) | 4.1(1.3) | 29.3(2.1) |

### III.3.4. Dietas mixtas y ensayo con salvado de arroz

#### III.3.4.1 Crecimiento y sobrevivencia

Los resultados obtenidos utilizando como alimento mezclas del 70% de salvado de trigo enriquecido con el 30% en peso de Chaetoceros sp. o de Nannochloropsis sp. mostraron que el crecimiento de Artemia con estas dietas es muy inferior al obtenido con las mismas microalgas usadas como alimento único. El desarrollo de Artemia alimentada con las dietas mixtas fue muy lento y en ambos casos, a los doce días, los organismos no superaron el estadio de metanauplio, ni los dos milímetros de longitud total. Además, para esa fecha la sobrevivencia con la primera dieta fue de 35.5% y de 26.2% con la segunda. Debido a estos resultados, se detuvo la alimentación con dietas mixtas. En esta fecha, los datos de crecimiento de los organismos alimentados con salvado de arroz resultaron ligeramente superiores, aunque con una sobrevivencia inferior (tabla XIV). Por este motivo, se decidió aumentar la ración de alimento hasta 0.2 gramos org.<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>, lo cual resultó en un buen incremento en tamaño en solo dos días. La longitud total alcanzada en 17 días fue de más de 3 milímetros (tabla XIV), aunque no se observaron organismos juveniles. A pesar de ésto y del porcentaje de sobrevivencia, que resultó inferior al 20% de la población original, se decidió utilizar este alimento, solo o enriquecido con Chaetoceros sp. fresco en un porcentaje equivalente (en peso orgánico) al 20% de la dieta, para el siguiente ensayo a mayor escala.

**TABLA XIV.** Datos de crecimiento y de sobrevivencia de Artemia franciscana cultivada en agua de salinidad reducida, con iluminación continua y utilizando salvado de arroz (SA) y las dietas mixtas, salvado de trigo/Chaetoceros sp.(ST/CH) y salvado de trigo/Nannochloropsis sp.(ST/NN) en proporciones de 70 y 30% de peso orgánico. En paréntesis: desviación estándar. \*: incremento de alimento a 0.2 mg org.<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>.

| EDAD<br>(Días) | DIETA | ESTADIO     | LONGITUD<br>TOTAL(mm) | % SOBREVIVENCIA |
|----------------|-------|-------------|-----------------------|-----------------|
| 5              | SA    | metanauplio | 1.0 (0.1)             | 53.4 (3.3)      |
|                | ST/CH | metanauplio | 1.1 (0.1)             | 84.7 (6.2)      |
|                | ST/NN | metanauplio | 1.3 (0.1)             | 63.1 (16.8)     |
| 9              | SA    | metanauplio | 1.4 (0.2)             | 35.5 (4.5)      |
|                | ST/CH | metanauplio | 1.7 (0.08)            | 53.1 (3.1)      |
|                | ST/NN | metanauplio | 1.2 (0.1)             | 43.4 (7.0)      |
| 12             | *SA   | metanauplio | 2.3 (0.4)             | 19.4 (0.5)      |
|                | ST/CH | metanauplio | 1.8 (0.2)             | 35.5 (3.7)      |
|                | ST/NN | metanauplio | 1.3 (0.1)             | 26.2 (5.3)      |
| 15             | *SA   | metanauplio | 2.9 (0.4)             | 19.0 (1.2)      |
| 17             | *SA   | metanauplio | 3.1 (0.3)             | 18.8 (1.0)      |

### III.3.5. Cultivo Semimasivo

#### III.3.5.1 Crecimiento y sobrevivencia

Este experimento duró un total de 21 días y se dió por terminado después de este período, durante el cual no se notaron importantes fenómenos de mortandad que pudieran de alguna forma estar relacionados con la menor frecuencia de cambios de agua, aunque al final del experimento se notó que el fondo de los dos estanques tenía una gran cantidad de sustancia orgánica (resíduos de salvado y heces) y abundante crecimiento bacteriano. Como se relata a continuación, los resultados de este ensayo fueron sólo parcialmente satisfactorios ya que no se obtuvo apareamiento, ni producción de progenie. Por lo que se refiere a crecimiento, los organismos alimentados con la dieta mixta lograron longitudes significativamente mayores en cada uno de los días muestreados. Esta diferencia fue muy notoria a partir del día 12 y hasta el final del experimento, cuando las longitudes totales fueron de 7.03 mm vs 3.87 mm (tabla XV). Además, con la dieta mixta se logró alcanzar los estadios juvenil y adulto en los días 15 y 19 respectivamente, mientras que en esas fechas los organismos alimentados con la dieta única sólo se encontraban en las etapas de metanauplio y de juvenil. Comparando estos resultados con los obtenidos en cultivos de menor volumen (1 litro) y utilizando Chaetoceros sp. como alimento único, se observa que el estadio adulto aparece cuatro días más tarde con la dieta mixta y que los tamaños logrados en el quinceavo día, son significativamente menores (5.5 mm vs 6.3 mm).

### III.3.5.2. Producción de parejas

Como se mencionó, aunque los organismos que recibieron la dieta mixta alcanzaron la madurez (estadio adulto), hasta el día 21, cuando se dió por terminado el experimento, no se observó la formación de parejas aunque algunos de los machos mostraban indicios de estar en el proceso de acoplarse.

### III.3.5.3. Composición proximal

El análisis bioquímico de los organismos de los dos tratamientos indicó que los organismos alimentados con la dieta mixta tienen un peso unitario superior al que se obtiene con sólo salvado de arroz. El componente de mayor proporción, en ambos casos, son los carbohidratos, los cuales explican el 48.1 y 37.1% de la materia seca de Artemia alimentada con salvado de arroz y con la dieta mixta, respectivamente. Los lípidos representan el 25.2 y el 16.45%, siendo el mayor porcentaje el que se obtuvo con la dieta única, mientras que en caso de contenido de cenizas (16.3 vs 17.3) y de proteínas (17.3 vs 17.4) los valores son similares para ambas dietas (tabla XVI).

**TABLA XV.** Datos de crecimiento y de sobrevivencia de Artemia franciscana cultivada a un nivel de 300 l, en agua de salinidad reducida, con iluminación continua, y utilizando salvado de arroz (0.2 mg org.<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>) (SA) solo o complementado con Chaetoceros sp.(SA/CH), en un 20% de su peso orgánico. En paréntesis: desviación estándar. S: diferencia significativa (análisis de varianza de una vía, alfa = 0.05).

| EDAD<br>(Días) | DIETA | ESTADIO     | LONGITUD<br>TOTAL(mm) | % SOBREVIVENCIA |
|----------------|-------|-------------|-----------------------|-----------------|
| 5              | SA    | metanauplio | 1.3 (0.07)            | 80              |
|                | SA/CH | metanauplio | 1.7 (0.08)S           | 100             |
| 9              | SA    | metanauplio | 2.2 (0.30)            | 60              |
|                | SA/CH | metanauplio | 2.8 (0.40)S           | 80              |
| 12             | SA    | metanauplio | 2.6 (0.50)            | 39              |
|                | SA/CH | metanauplio | 3.5 (0.50)S           | 63              |
| 15             | SA    | metanauplio | 3.4 (0.50)            | 28              |
|                | SA/CH | juvenil     | 5.5 (0.50)            | 50              |
| 19             | SA    | juvenil     | 3.8 (0.80)            | 26              |
|                | SA/CH | adulto      | 7.0 (0.60)            | 47              |

**TABLA XVI.** Composición proximal, en porcentaje del peso seco, de Artemia franciscana, cultivada a un nivel de 300 l en agua de salinidad reducida, con luz continua y utilizando salvado de arroz (0.2 mg/org./día) (SA) solo o complementado con Chaetoceros sp.(SA/CH), en un 20% de su peso orgánico. En paréntesis: desviación estándar.

| DIETA | PESO SECO<br>UNITARIO (mg) | CENIZAS   | PROTEINAS | CHO'S     | LIPIDOS   |
|-------|----------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| SA    | 0.2 (0.0)                  | 16.3(1.0) | 17.3(0.9) | 48.1(6.6) | 25.2(2.8) |
| SA/CH | 0.4 (0.1)                  | 17.3(1.2) | 17.4(2.9) | 37.1(3.6) | 16.4(1.3) |

## IV. DISCUSION

### IV.1 Cultivo de microalgas

Muchas especies de microalgas tienen una gran capacidad de adaptarse a diferentes condiciones ambientales, modificando algunos de sus procesos fisiológicos (Jorgensen y Nielsen, 1965). Tales modificaciones pueden, en algunos casos, influir en el crecimiento y/o en la composición de la microalga.

Las dos especies de agua dulce y dos de las de agua de mar cultivadas en salinidad de 12 ‰ mostraron una tasa de crecimiento exponencial similar a la de aquellas mantenidas en condiciones normales de salinidad. Sin embargo, existen diferencias significativas en la producción de biomasa para todas ellas. Esto sugiere que las microalgas se adaptaron al estrés osmótico, ya que mantuvieron un mismo tiempo de duplicación inicial, pero que por su efecto, algunos factores se volvieron limitantes más rápidamente. Richmond (1986) menciona que las microalgas presentan una amplia tolerancia a las variaciones en salinidad, algunas especies dentro de un intervalo limitado de valores, como parece ser el caso de Phaeodactylum tricornutum, y otras con un espectro más amplio. Además, sus respuestas son variadas, ya que la microalga puede producir varios compuestos para contrarrestar el estrés osmótico, como glicerol y carotenos (Dunaliella sp.), prolina y sacarosa (Chlorella sp.) o aumentar la concentración de algunos iones como por ejemplo el potasio, para evitar la pérdida de agua en condiciones de alta salinidad (Dunaliella sp.). Este no es el único efecto de una condición de salinidad

anómala sobre la célula, sino que pueden existir efectos indirectos sobre el proceso de la división celular, que se vería afectada debido a una disminución en la síntesis de ácidos nucleicos (Richmond, 1986), en la fotosíntesis y en la fijación de nitrógeno (Guillard, 1972; Soeder y Stengel, 1974; Richmond, 1986). En caso de un estrés osmótico producido por el decremento de la salinidad, las células tendrían que activar mecanismos que le permitan eliminar agua, que también implican un gasto de energía. Esto significa producir o movilizar rápidamente compuestos que la provean, que son en general las sustancias de reserva.

Bajo estrés osmótico, algunas microalgas reducen inicialmente su actividad fotosintética, que posteriormente se incrementa al igual que la respiración para proporcionar la energía necesaria para el movimiento activo de iones y la producción de los compuestos equilibrantes (Richmond, 1986). Por lo tanto, es posible que con el aumento de la biomasa los efectos de sombreado y de disminución de nutrientes se hagan más evidentes, afectando la producción de energía y por consiguiente el crecimiento de la microalga.

Esta pudiera ser la explicación de la menor densidad de los cultivos en agua salobre que se observó con los cultivos terminales. A un volumen de un litro y bajo un sistema semicontínuo de cultivo estas diferencias no fueron significativas, lo que significaría que al existir renovación de medio y disminución periódica de la biomasa las dos algas seleccionadas mantuvieron su crecimiento casi exponencial. Además, los análisis bioquímicos de Chaetoceros sp. y Nannochloropsis sp., revelaron que existen diferencias en la concentración de carbohidratos, que fue mayor en las microalgas mantenidas

en salinidad reducida. Por lo tanto, es posible que la manera de enfrentar el estrés osmótico sea a través de la producción de azúcares para generar la energía necesaria para mantener el equilibrio y propiciar la retención de iones y el flujo de agua hacia el exterior, como se mencionó anteriormente, para mantener un medio celular interno hiperosmótico. La menor cantidad de los lípidos, que son los mayores compuestos de reserva para la mayoría de las microalgas, indicaría una desviación de las rutas metabólicas hacia la formación de compuestos que proporcionen energía más rápidamente, mientras que la concentración de proteínas no se ve afectada.

Por lo tanto, aunque estas microalgas pueden ser cultivadas en salinidades de 12 ‰, se obtiene una menor producción de biomasa y además esta tiene una composición bioquímica diferente, principalmente alta en carbohidratos. Esta diferencia puede tener un efecto importante, en dependencia de las necesidades alimenticias del organismo que se pretende alimentar.

#### **IV.2 Cultivo de Artemia**

##### **IV.2.1 Tipos de agua**

Los trabajos realizados sobre la fisiología y el cultivo de Artemia y sus relaciones con los factores ambientales salinidad, temperatura y dieta, han dado como resultado un gran número de respuestas, en algunos casos contradictorias (Clegg y Conte, 1980; Dobbeleir *et al.*, 1980; Tackaert, 1987). Tales variaciones se han explicado en base a diferencias genéticas que permiten la sobrevivencia de la especie en ambientes diferentes y cambiantes (Tackaert, 1987). Este fenómeno también habría sido influido por el aislamiento

geográfico de las poblaciones de Artemia y el escaso cruzamiento entre ellas, que tendría como resultado un pool genético más limitado. Los factores ecológicos para los cuales se ha resaltado la falta de uniformidad de respuesta son, entre otros, la salinidad, la composición iónica del medio, la temperatura y el tipo de dieta (Gilchrist, 1954; Dutrieu, 1960; Takano, 1967; Dobbeleir et al., 1980; Royan, 1980; Tackaert, 1987; Correa-Sandoval, 1991).

Los resultados de este trabajo muestran un efecto de la luz y de la dieta, pero no de la salinidad, ya que el crecimiento, el desarrollo y la sobrevivencia del organismo no se vieron afectados por este factor.

Algunos autores reportan que, a pesar de que existe un transporte activo de iones, el consumo de oxígeno y el gasto de energía dedicado a mantener el equilibrio iónico entre el medio externo e interno no son muy diferentes (Gilchrist, 1954; Croghan, 1958; Clegg y Conte, 1980). Por lo tanto, se puede suponer que el incremento del costo energético de manutención sea poco importante, ya que permite un crecimiento normal, lo cual fue corroborado por los resultados obtenidos en este trabajo.

Sin embargo, la actividad reproductiva se vió afectada. Aunque dentro de los intervalos reportados para estas mismas especie y dietas (Arriaga-Haro, 1993; Correa-Reyes, 1993; Paniagua-Chávez, 1993), la formación de la primera pareja tuvo lugar con un día de diferencia. Además, la producción de parejas y de progenie presenta algunas disimilitudes. En el caso de salinidad reducida, el número total de parejas representa sólo el 60% del total de la condición testigo; además, el número máximo de parejas formadas en un día

se alcanzó tres días más tarde que en la condición de salinidad normal y nuevamente fue aproximadamente un 40% menor. Por otro lado, en ambos casos la progenie fue representada por quistes, probablemente como resultado del estrés debido a las condiciones de iluminación (>12 horas de oscuridad: Berthélémy-Okazaki y Hedgecock, 1987). En este caso la producción individual fue mayor en el medio de salinidad reducida, que pudiera ser explicado por la condición de estrés osmótico adicional, ya que hay que recordar que este organismo utiliza este sistema de reproducción en condiciones adversas, con el fin de preservar la especie (Royan, 1980; Balasundaram y Kumaraguru, 1987; Tackaert, 1987).

También se encontraron diferencias en la composición bioquímica del organismo. Las concentraciones de las tres fracciones orgánicas resultaron menores en Artemia mantenida en un medio de salinidad reducida, aunque en ambos casos las proporciones de proteínas (11.7 vs 18.9), de carbohidratos (7.6 vs 11.6%) y de lípidos (26.7 vs 44.8%) presentan valores que están dentro de los intervalos obtenidos en otros trabajos realizados en este laboratorio en salinidades de 35 ‰ (Arriaga-Haro, 1993; Paniagua-Chávez 1993). Es probable que las diferencias entre las dos diferentes salinidades no sean explicadas sólo en función de un efecto de salinidad y se deban también a la calidad del alimento ingerido (Johnson, 1980; Correa-Reyes, 1993; Paniagua-Chávez, 1993), ya que la composición de Chaetoceros sp. cultivado en las dos condiciones respectivas refleja, en parte por lo menos, la del organismo. Los valores de proteínas están muy por debajo de lo que se reporta generalmente en la literatura, que es >40% (Leger *et al.*, 1986 y 1987;

Suresh *et al.*, 1987; Yashiro, 1987). Por otro lado, trabajos realizados más recientemente en este laboratorio utilizando Chaetoceros sp. como alimento vivo han obtenido para Artemia valores >40% de concentración de proteínas (Cordero-Esquivel, com. pers.), en comparación con los inferiores al 20% ya mencionados. Pensamos que esta diferencia se deba sobre todo al hecho que en el trabajo más reciente los análisis se llevaron a cabo con muestras frescas, mientras que anteriormente éstas se preservaban por congelación (como en el caso del presente trabajo). Esto pudo haber causado la ruptura de células y la pérdida de parte de las fracciones hidrosolubles. Esto sería el motivo de que el total de la materia orgánica explicado no corresponda al 100%, siendo en el caso de la condición de salinidad reducida sólo el 53% y el 83% para la condición control.

Una consideración importante es la diferencia del contenido de lípidos, que por su falta de solubilidad en agua puede considerarse invariado con respecto al valor original. Los lípidos constituyen la reserva principal de los crustáceos planctónicos, y sirven como fuente de energía, como portadores de ácidos grasos esenciales y como elemento de ayuda que proporciona flotabilidad al organismo (Teramoto y Kinoshita, 1961; Dobbeleir *et al.*, 1980; Johnson, 1980; Douillet, 1987). Por ésto, su menor concentración relativa pudiera servir como una prueba más que la salinidad reducida constituye un factor de estrés y explicaría las diferencias ya mencionadas acerca de los parámetros de evaluación de la actividad reproductiva de Artemia.

En general, podemos decir que el único aspecto sobre el cual podría tener efecto la salinidad es la producción de progenie, pero que a pesar de ésto es factible llevar a cabo el cultivo de Artemia en condiciones de salinidad reducida.

#### IV.2.2 Condiciones de iluminación

En condiciones de penumbra la salinidad no tuvo efectos drásticos sobre el desarrollo de Artemia. Castro y Gallardo (1985) sugieren que este organismo mantenido en condiciones de oscuridad total presenta un tiempo de crecimiento y de maduración menor que bajo luz continua. Tal aseveración surge de la observación de que este crustáceo, por tener un fototactismo positivo, disminuye su actividad de movimiento, decreciendo de esta manera el gasto energético dedicado a esta función. Por consiguiente, una mayor cantidad de energía queda disponible para el crecimiento.

Nuestros resultados mostraron que efectivamente existe una diferencia significativa. Al término de 15 días los valores promedio de longitud total fueron de 6.6 y 6.3 mm para la condición en penumbra y en luz continua respectivamente, y para cada día muestreado la longitud fue superior en la primera condición. Además, el estado adulto también se presentó en un tiempo más corto (9 vs 15 días).

Sin embargo, la sobrevivencia fue mayor en el cultivo bajo luz continua y la formación de la primera pareja se presentó en ambos casos después del mismo número de días (15), demostrando que aunque el estado adulto se alcanza más rápidamente en la penumbra, los organismos no alcanzan con

igual rapidez la madurez sexual, posiblemente como resultado de un metabolismo menos equilibrado, debido al cual se retrasarían la madurez y la época de reproducción (Tackaert, 1987).

A pesar de que la formación de la primera pareja se logró el mismo día, el pico máximo de formación de parejas se alcanzó más rápidamente bajo condiciones de luz continua. Además el número total de parejas fue mayor en la primera condición, que indica que el proporcionar luz continua crea una condición más propicia para la maduración sexual y para que el organismo se reproduzca ovovivíparamente, mientras que las condiciones de oscuridad son aparentemente estresantes, ya que causan la producción de quistes. Esto coincide con los resultados de Berthélémy-Okazaki y Hedgecock (1987) quienes investigaron sobre el efecto unitario y mezclado de factores estresantes como salinidad, temperatura y fotoperiodo en la producción de quistes por Artemia y encontraron que cada uno de ellos actúa independientemente, que no hay un efecto sinérgico y que el fotoperiodo (más de 12 horas de oscuridad) es uno de los más importantes.

En cuanto al efecto de la presencia o ausencia de luz por lo que refiere a la producción de progenie, no parece correcto comparar quistes con nauplios, por lo que nos limitamos a constatar que la producción de nauplios por pareja está en el intervalo de valores obtenidos en este laboratorio en condiciones similares de iluminación, pero en agua de mar completa (30-35 ‰) y con diferentes dietas vivas (Arriaga-Haro, 1993; Correa-Reyes, 1993), lo que indicaría que el organismo encuentra las condiciones necesarias para su desarrollo.

Los resultados de los análisis bioquímicos indican que las composiciones son similares en ambas condiciones: los lípidos presentan la mayor concentración (26.7 y 29.3%), ligeramente superior para luz continua y se encuentran, al igual que los carbohidratos, dentro de los intervalos de valores reportados en la literatura (Léger *et al.*, 1986, 1987). Nuevamente la concentración de proteínas es baja (11.7%, penumbra y 15.1%, luz continua). Dada la similitud de valores se puede decir que la condición de presencia o ausencia de luz no tiene un efecto sobre la composición bioquímica del organismo.

#### IV.2.3. Dietas de microalgas y alimento inerte

A partir de los resultados de crecimiento y de sobrevivencia se puede determinar el efecto de las dietas sobre el cultivo de Artemia. De los alimentos vivos e inertes y de sus mezclas, los únicos que funcionaron eficazmente fueron los dos tipos de microalgas vivas, lo cual apoya la conclusión de varios autores de que el alimento vivo sigue siendo el que ofrece resultados mejores y más confiables (Takano, 1967; D'Agostino, 1980; Johnson, 1980).

Los organismos alimentados con microalgas frescas fueron los únicos que alcanzaron el estado adulto (15 y 17 días para Chaetoceros sp. y para Nannochloropsis sp., respectivamente), formaron parejas y produjeron progenie. Estos simples resultados son suficientes para decir que la mejor dieta para Artemia franciscana cultivada en condiciones de salinidad reducida son las microalgas. Sin embargo, estas dos dietas presentaron diferencias significativas en la longitud total lograda hasta el día 15, que fue mayor

con Chaetoceros sp.. Además, cuando los organismos alimentados con la primera microalga habían alcanzado el estadio adulto, con la segunda aún eran juveniles. El importante efecto del tipo de alimento sobre las velocidades de desarrollo y de crecimiento, resultó en un retraso del tiempo de maduración en coincidencia con varios datos de la literatura (D'Agostino, 1980; Balasandaram y Kumaraguru, 1987). Además, se menciona que dado que Artemia es un filtrador continuo y no selectivo, una gran cantidad de partículas en el medio causan que su tracto digestivo se llene rápidamente y que el alimento tenga que ser desechado con igual rapidez. El menor tiempo de retención afecta la eficiencia de la asimilación, que resulta menor en estas condiciones. Nannochloropsis sp. es una microalga muy pequeña, por lo cual tuvo que ser proporcionada en concentraciones muy altas. Esto pudiera haber originado una menor asimilación del alimento y, como consecuencia, un lento crecimiento. Aunado a esto, no se puede descartar que la pared celular de esta microalga sea difícil de digerir, disminuyendo de esta forma la posibilidad de su completa utilización.

Otra de las diferencias entre los dos alimentos vivos, es el momento de la formación de la primera pareja que se dió dos días más tarde con Nannochloropsis sp., lo cual es nuevamente un reflejo de un crecimiento y desarrollo más lentos, explicado por las razones anteriormente mencionadas. De la misma forma el día de máxima formación de parejas se alcanzó cinco días más tarde y el número de parejas fue de sólo 7 contra 28 de la otra microalga. Este evento es probablemente el reflejo de una heterogeneidad de tallas y de estadios en los cultivos alimentados con Nannochloropsis sp.,

que provocaría la repentina aparición de parejas y en otros casos la falta de ellas. Esta heterogeneidad puede deberse a que cada organismo reaccionó en forma diferente al alimento, ya que los quistes comerciales pueden proceder, aún en el mismo lote, de poblaciones con orígenes geográficos y por consecuencia con características biológicas diferentes. Además, aunque la composición de esta microalga presenta concentraciones de las tres clases principales de componentes bioquímicos similares a las del alimento testigo, las dietas pudieran tener aminoácidos o ácidos grasos diferentes, lo cual podría influir sobre la calidad de la dieta, en dependencia de las exigencias alimenticias individuales. Como consecuencia de las diferencias en maduración y apareamiento, la producción total conseguida con el alimento de control fue casi seis veces mayor y fue lograda en casi la mitad del tiempo.

Los organismos alimentados con salvado de trigo presentaron una mortandad casi total después del día nueve de cultivo, hasta el cual sólo lograron alcanzar una talla de 1.2 mm. Algunos autores (D'Agostino, 1980; Dobbeleir *et al.*, 1980; Douillet, 1987) reportan pobres resultados en crecimiento con esta dieta, que atribuyen a un exceso de carbohidratos y a la falta de ácidos grasos y aminoácidos esenciales.

En el caso del salvado de arroz nuestros resultados no parecen concordar con la literatura, dado que éste es usado en varias partes del mundo y se reporta que los organismos alimentados con él se reproducen y presentan una alta sobrevivencia (Jahnig, 1977; Douillet, 1987; Vieira, 1987; Yashiro, 1987). La máxima talla alcanzada con esta dieta en este trabajo fue de 3.1 mm en 17 días de cultivo y el porcentaje de sobrevivencia fue de solo 18%.

Es necesario de todas formas mencionar que los autores mencionados reportan tallas mayores y logro de actividad reproductiva, pero en tiempos de cultivo que llegan a sobrepasar los 20 días (Johnson, 1980; Balasandaram y Kumaraguru, 1987). Para nuestro caso, se decidió que 20 días era el límite máximo, después del cual los costos de producción podrían volverse demasiado altos, por lo que nos pareció preferible trabajar con los alimentos que produjeran mayor biomasa y lograran obtener progenie en un tiempo menor. Por otro lado, la discrepancia sobre el valor de esta dieta reportado en literatura y los obtenidos en nuestro trabajo pueden ser debidos al origen del salvado de trigo, que en general se utiliza como producto secundario de la actividad agrícola, mientras que en nuestro caso éste se obtuvo de un fuente que comercializa alimentos naturistas. Su análisis bioquímico marca, como en el caso del salvado de arroz, bajas concentraciones de proteínas y de lípidos, que probablemente fueron limitantes en el desarrollo de Artemia.

#### **IV.2.4 Dietas mixtas**

El uso de la mezcla de alimento vivo rico en proteínas y, en vista de los resultados positivos sobre el crecimiento y la reproducción de Artemia, probablemente con suficientes cantidades de aminoácidos y ácidos grasos esenciales, con el alimento inerte rico en carbohidratos, no fue suficiente para satisfacer las necesidades nutritivas de este crustáceo. Los organismos alimentados con la combinación de salvado de trigo adicionado con las dos microalgas no lograron tallas mayores de 2 mm en un tiempo de 12 días y tuvieron una mortandad de más del 80% en menos de 15 días de cultivo.

Esto demuestra que el porcentaje de alimento vivo del 30% no es suficiente para proporcionar, en cantidad y/o en calidad, algunos de los factores dietéticos importantes para el organismo. El uso de dietas mixtas compuestas por productos de desecho, enriquecidos con microalgas o con bacterias o levaduras ha dado generalmente buenos resultados (Teramoto y Kinoshita, 1961; D'Agostino, 1980; Basil *et al.*, 1987; Lavens *et al.*, 1987). Se menciona que no todas las microalgas funcionan de igual manera como complemento, probablemente en dependencia de sus características químicas, estructurales y morfológicas (Takano, 1967; D'Agostino, 1980), lo cual quedó comprobado con este estudio.

#### IV.2.5 Cultivo semimasivo

Inicialmente el salvado de trigo era la dieta inerte de elección por su bajo costo y su accesibilidad en la región pero, a raíz de los resultados negativos obtenidos, se decidió sustituirlo con salvado de arroz, que, como se mencionó, se considera un buen alimento para *Artemia*. Por lo anterior se decidió utilizarlo para los cultivos semimasivos pero aumentando el tamaño de la ración, en vista de los resultados de nuestros experimentos a pequeña escala, y enriqueciéndolo por el mismo motivo con un pequeño porcentaje de alimento vivo.

En efecto los organismos sometidos a la dieta mixta de salvado de arroz y *Chaetoceros* sp. presentaron una talla notablemente mayor que la lograda con salvado solamente. Además, se obtuvo un porcentaje del 47% de sobrevivencia, casi dos veces más que el obtenido con la dieta inerte. Esto

indica que el complemento de microalgas fue suficiente para satisfacer los requerimientos nutricionales de Artemia, por lo menos hasta lograr el estado adulto. Es posible que la presencia de bacterias dentro del cultivo semimasivo de microalgas y de otras generadas en el mismo cultivo de Artemia hayan también servido como complemento del alimento (Teramoto y Kinoshita, 1961; Seki, 1964; D'Agostino y Provasoli, 1968; D'Agostino, 1980), ya que dada la discontinuidad en el cambio de agua, fue posible notar en ambos tanques manchas de coloración rosada que indicaban la presencia de bacterias. Por otro lado, la talla de Artemia alimentada únicamente con salvado de arroz a este nivel fue mayor (3.8 vs 3.1 mm) que en el experimento realizado a escala pequeña, y además el número de días de cultivo fue inferior y el porcentaje de sobrevivencia más alto. Aparte de la presencia de bacterias, esto puede deberse a que a pequeña escala el recambio de agua era diario lo cual pudiera resultar en un exceso de manipuleo.

Sin embargo, y a pesar de haber alcanzado el estadio adulto, en el cultivo con la dieta mixta no se presentó la formación de parejas, nuevamente indicando un desequilibrio entre crecimiento y desarrollo sexual.

Al revisar los resultados de los análisis bioquímicos de ambos cultivos, que en ambos casos explican aproximadamente un 80% del total de la biomasa, se observa que las proporciones de los componentes medidos es muy similar y reflejan claramente la composición del alimento ingerido. El alto porcentaje de carbohidratos y la baja concentración de proteínas parecen ser indicativos de este desequilibrio.

#### IV.3 Recomendaciones para los análisis proximales

Los análisis proximales realizados en las muestras de Artemia congeladas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  y almacenadas, por un período mayor de un mes, dieron como resultado una concentración de proteínas notoriamente menor a la reportada por la literatura. A raíz de esto, se llevaron a cabo estos mismos análisis en muestras frescas y congeladas (más de dos meses) de Artemia franciscana cultivada en condiciones normales, encontrándose que las muestras congeladas mostraron entre un 25 y un 30% menos proteínas que las frescas, mientras que las concentraciones de carbohidratos y lípidos no variaron o cambiaron en pocas unidades porcentuales. En consecuencia, se recomienda analizar las muestras en fresco o, si fuera necesario preservarlas, utilizar temperaturas de  $-60$  a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , que normalmente se recomiendan para esta finalidad. Sería en todo caso preferible almacenar y analizar a diferentes intervalos de tiempo varias submuestras de una serie de muestras para evaluar la posibilidad de que, aún con estas temperaturas, se puedan producir diferencias importantes debidas al tiempo de almacenamiento.

## V. CONCLUSIONES

- Es posible cultivar Chaetoceros sp. y Nannochloropsis sp. a salinidades reducidas y utilizarlas como alimento para Artemia. La concentración de proteínas es similar a la que se obtiene en condiciones normales de salinidad, pero las proporciones de carbohidratos y lípidos resultan invertidas.

- El cultivo de Artemia franciscana en agua de salinidad reducida (12 g Kg<sup>-1</sup>) puede llevarse con éxito a nivel de laboratorio, sin afectar significativamente su crecimiento, su reproducción ni su composición bioquímica, cuando la dieta consiste de microalgas vivas.

- Los alimentos inertes, como salvado de trigo y salvado de arroz, no son recomendables como únicos componentes de la dieta de Artemia cultivada en condiciones de salinidad reducida.

- En salinidades reducidas, con alimento vivo y en condiciones de penumbra, se favorece la velocidad de crecimiento, aunque no la de reproducción. Además, en este caso la reproducción es a través de quistes.

- En cultivos semimasivos de Artemia franciscana se puede utilizar una dieta mixta de salvado de arroz y Chaetoceros sp., pero es necesario investigar acerca de los factores que influyen acerca de la actividad reproductiva de este organismo.

- Según los resultados obtenidos hasta la fecha, el cultivo integral de Artemia franciscana en el Centro Acuícola del Estado de Sonora es factible, usando Chaetoceros sp. como alimento único o posiblemente, según lo indiquen otros ensayos a nivel piloto, con una dieta mixta con un porcentaje de microalga superior a lo que se usó en este estudio. Por otro lado, estos cultivos piloto son recomendables, debido a las diferencias climáticas y de la fuente de agua salobre que existan entre los laboratorios del CICESE, del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la UABC y del Centro Acuícola del Estado de Sonora.

- El almacenamiento de muestras de Artemia franciscana a  $-20^{\circ}\text{C}$  puede afectar los resultados de su análisis proximal, principalmente causando un decremento de la concentración de proteínas y, aunque en menor manera, de los carbohidratos. Por este motivo, es recomendable utilizar muestras frescas, o preservadas a temperaturas inferiores.

**LITERATURA CITADA**

- Amat, F. 1985. Utilización de Artemia en acuicultura. Inf. Tec. Inst. Inv. Pesq. (Madrid). 128-129:3-7.
- Arriaga-Haro, V. 1993. Evaluación de dos dietas frescas y una preservada para Artemia franciscana Kellog, 1906. Tesis de Maestría en Ciencias, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). Ensenada, México.
- Balasundaram C. y A.K. Kumaraguru. 1987. Laboratory studies on growth and reproduction of Artemia (Tuticorin strain). En: Artemia Research and Its Applications. P. Sorgeloos, D.A. Bengston, W. Decleir y E. Jaspers. (Eds). vol. 3:321-328.
- Basil, J.A., D.R.D. Premkumer, A. P. Lipton y M.P. Marian. 1987. Preliminary studies on the cultures of Artemia using renewable organic wastes. En: Artemia Research and Its Applications. P. Sorgeloos, D.A. Bengston, W. Decleir y E. Jaspers (Eds). vol. 3:274-282.
- Benijts, R., E. Vanworden y P. Sorgeloos. 1976. Changes in the biochemical composition of the early larval stages of the brine shrimp Artemia salina En: Proc. 10th European Symp. Marine Biology. G. Persoone y E. Jaspers (Eds). vol. 1:1-19.

- Berthélémy-Okazaki, N.J. y D. Hedgecock. 1987. Effect of environmental factors on cyst formation in the brine shrimp Artemia. En: Artemia Research and Its Applications. P. Sorgeloos, D.A. Bengston, W. Decleir y E. Jaspers (Eds). vol. 3:167-182.
- Bligh, E.G. y W.J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37:911-917.
- Camara, M.R. y R. de Medeiros Rocha. 1987. Artemia culture in Brazil: an overview. En: Artemia Research and Its Applications. P. Sorgeloos, D.A. Bengston, W. Decleir y E. Jaspers (Eds). vol. 3:314-326.
- Castro, T., G. Castro y G. De Lara. 1987. Experimental production of an introduced Artemia strain in alkaline waters in the State of Mexico. En: Artemia Research and Its Applications. P. Sorgeloos, D.A. Bengston, W. Decleir y E. Jaspers (Eds). vol. 3:319-326.
- Castro, T. y C. Gallardo. 1985. Artemia sp. en investigación y docencia. Cuadernos CBS. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. 2:44 pp.
- Clegg, J. y F. Conte. 1980. A review of the cellular and developmental biology of Artemia. En: International Symposium on the Brine Shrimp Artemia. G. Persoone, P. Sorgeloos, O. Roels y E. Jaspers (Eds). vol. 2:11-54.
- Cordero-Esquivel, B., D. Voltolina y F. Correa-Sandoval. 1993. The biochemical composition of two diatoms after different preservation techniques. *Comp. Biochem. Physiol.* 105 B:369-373.

- Correa-Reyes, G. 1993. Alimentación de Artemia franciscana con microalgas cultivadas bajo diferentes tipos de luz. Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, México. 44 pp.
- Correa-Sandoval, F. 1991. Caracterización biológica y bioquímica de algunas poblaciones de Artemia franciscana Kellog, 1906. Tesis de Doctorado en Ciencias, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), Ensenada, México. 126 pp.
- Correa-Sandoval, F. y L.F. Buckle-Ramírez, 1993. Morfología y biometría de cinco poblaciones de Artemia franciscana (Anostraca: Artemiidae). Revista de Biología Tropical. 41(1):103-110.
- Croghan, P.C. 1958. The osmotic and ionic regulation of Artemia salina (L.). J. exp. Biol. 35:219-233.
- D'Agostino, J. 1980. The vital requirements of Artemia: physiology and nutrition. En: International Symposium on the Brine Shrimp Artemia. G. Persoone, P. Sorgeloos, O. Roels y E. Jaspers (Eds). vol. 2:55-82.
- D'Agostino, J. y L. Provasoli. 1968. Effects of salinity and nutrients on mono-and dixenic cultures of two strains of Artemia salina. Biol. Bull. 134:1-14.
- Dobbeleir, J., N. Adam y E. Bossuyt. 1980. New aspects of the use of inert diets for high density culturing of brine shrimp. En: International Symposium on the Brine Shrimp Artemia. G. Persoone, P. Sorgeloos, O. Roels y E. Jaspers (Eds). vol. 3:165-174.

- Douillet, P. 1987. Effect of bacteria on the nutrition of the brine shrimp Artemia fed on dried diets. En: Artemia Research and Its Applications. P. Sorgeloos, D.A. Bengston, W. Decleir y E. Jaspers (Eds). vol. 3:309-318.
- Dubois, M.; K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers y F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28:350-356.
- Dutrieu, J. 1960. Observations biochimiques et physiologiques sur le développement d'Artemia salina Leach. Arch. Zool. Exp. Gen. 99:1-134
- Farber-Lorda, J. 1986. Etudes biologiques, energetiques e biochimiques du krill antarctique Euphausia superba et Thysanoessa macrura recolte au cours de la campagne Fibex. These de Doctorat, Université de Aix-Marseille. 214 pp.
- Gilchrist, B.M. 1954. Haemoglobin in Artemia. Proc. Roy. Soc. Lond. B143:136-146.
- Guillard, R.R.L. y J.H. Ryther, 1962. Studies on marine planktonic diatoms. I. Cyclotella nana Hustedt and Detonula confervacea (Cleve) Gran. Can. J. Microbiol. 8:229-239.
- Jahnig, C.E. 1977. Artemia culture on a commercial pilot scale. En: Proc. 8th Ann. Meet. World Maricult. Soc. Avault J. W., Jr (Ed). Lousiana State Univ. Baton Rouge, LA, USA. 169-172.

- Johnson, D.A. 1980. Evaluation of various diets for optimal growth and survival of selected life stages of Artemia. En: International Symposium on the Brine Shrimp Artemia. G. Persoone, P. Sorgeloos, O. Roels y E. Jaspers (Eds). vol. 3:185-192.
- Jorgensen, E. y E.S. Nielsen. 1965. Adaptation in plankton algae. En: Primary Productivity in Aquatic Environments. C.R. Goldman (Ed). University of California Press, Berkeley. 38-46.
- Lavens, P., A. De Meulemeester y P. Sorgeloos. 1987. Evaluation of mono and mixed diets as food for intensive Artemia culture. En: Artemia Research and Its Applications. P. Sorgeloos, D.A. Bengtson, W. Decleir y E. Jaspers (Eds). vol. 3:309-318
- Léger, P., D.A. Bengtson, K.L. Simpson y P. Sorgeloos. 1986. The use and nutritional value of Artemia as a food source. En: Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev. 24:521-623.
- Léger, P., D.A. Bengtson, P. Sorgeloos, K.L. Simpson y A. Deck. 1987. The nutritional value of Artemia: a review. En: Artemia Research and Its Applications. P. Sorgeloos, D.A. Bengtson, W. Decleir y E. Jaspers (Eds). vol. 3:357-372.
- Lenz, P.H. 1987. Ecological studies on Artemia: a review. En: Artemia Research and Its Applications. P. Sorgeloos, D.A. Bengtson, W. Decleir y E. Jaspers (Eds). vol. 3:5-18.

- López-Elías, J.A. y D. Voltolina. 1993. Cultivos semicontinuos de cuatro especies de microalgas con un medio no convencional. *Ciencias Marinas*. 19(2):169-180.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr y R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275.
- Malara, G. y R. Charra. 1972. Dosage des glucides particuliers de phytoplankton selon la méthode de Dubois. Université de Paris. Station Zoologique. Villefranche-Sur-Mer. Notes de Travail. No. 6. 12 pp.
- Mayzaud, P., J. Farber-Lorda y M.C. Corre. 1985. Aspects of the nutritional metabolism of two antarctic euphasiids: Euphasia superba and Thysanoessa macrura. En: *Antarctic Nutrient Cycles and Food Webs*. W.R. Siegfried, R.R. Condy y R.M. Laws (Eds). Proc. 4th SCAR. Symp. Antarctic Biol., Springer Verlag, Berlin.
- Naegel, L.C.A. 1987. Production of Artemia in Costa Rica: a pilot project. En: Artemia Research and Its Applications. P. Sorgeloos, D.A. Bengston, W. Decleir y E. Jaspers (Eds). vol. 3:279-282.
- Pande, S.V., R.P. Khan y T.A. Venkitasubramanian. 1963. Microdetermination of lipids and serum total fatty acid. *Analyt. Biochem.*, 6:415-423.
- Paniagua-Chávez, C.G. 1993. Viabilidad, composición proximal y valor alimenticio de Dunaliella sp. preservada por congelamiento. Tesis de Maestría en Ciencias, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), Ensenada, México. 67 pp.

- Persoone, G. y P. Sorgeloos. 1980. General aspects of the ecology and biogeography of Artemia. En: International Symposium on the Brine Shrimp Artemia. G.Persoone, P. Sorgeloos, O. Roels y E.Jaspers (Eds). vol. 3:2-24.
- Richmond, A. 1986. Microalgaculture. En: CRC Critical Reviews in Biotechnology. C. Soeder (Ed). vol. 4(4):369-438.
- Royan, J. 1980. Laboratory and field studies on an Indian strain of the brine shrimp Artemia. En: International Symposium on the Brine Shrimp Artemia. G.Persoone, P. Sorgeloos, O. Roels y E.Jaspers (Eds). vol. 3:223-230.
- Soeder, C.J. y E. Stengel. 1974. Physico-chemical factors affecting metabolism and growth rate. En: Algal Physiology and Biochemistry. W.D.P. Stewart (Ed). vol. 10:714-739.
- Sorgeloos, P. 1980. The use of brine shrimp Artemia in aquaculture. En: International Symposium on the Brine Shrimp Artemia. G.Persoone, P. Sorgeloos, O. Roels y E.Jaspers (Eds). vol. 3:25-50
- Suresh C., G. Jakher, M. Saxena y R. Sinha. 1987. Laboratory culture and nutritional assessment of Artemia from Didwana Salt Lake (India). En: Artemia Research and Its Applications. P. Sorgeloos, D.A. Bengston, W. Decler y E. Jaspers (Eds). vol. 1:193-198.
- Tackaert, T., P. Vanhaecke y P. Sorgeloos. 1987. Preliminary data on the heritability of some quantitative characteristics in Artemia. En: Artemia Research and Its Applications. P. Sorgeloos, D.A. Bengston, W. Decler y E. Jaspers (Eds). vol. 1:241-248.

- Takano, H. 1967. Rearing experiments of brine shrimp on a diatom diet. Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab. 52:1-11.
- Teramoto, K. y S. Kinoshita. 1961. Some information on the culture of Artemia. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 27:801-804.
- Trujillo-Valle, M.L. 1993. La colección de microalgas del CICESE. Informe Técnico. Comunicaciones Académicas. Serie Acuicultura CIACT9301. CICESE. 103 pp.
- Versichele, D. y P. Sorgeloos. 1980. Controlled production of Artemia cysts in batch cultures. En: International Symposium on the Brine Shrimp Artemia. G.Persoone, P. Sorgeloos, O. Roels y E. Jaspers (Eds). vol. 3:231-246.
- Vieira, N. 1987. Culture of Artemia from Aveiro (Portugal) fed with wheat bran and sea weed. En: Artemia Research and Its Applications. P. Sorgeloos, D.A. Bengston, W. Decleir y E. Jaspers (Eds). vol. 3:327-329.
- Whyte, J. 1987. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture. Aquaculture. 60:231-241.
- Yashiro, R. 1987. The effect of Artemia fed with different diets on the growth and survival of Penaeus monodon Fabricius postlarvae. En: Artemia Research and Its Applications. P. Sorgeloos, D.A. Bengston, W. Decleir y E. Jaspers (Eds). vol. 3:447-448.