

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN  
SUPERIOR DE ENSENADA, BAJA CALIFORNIA**



---

**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS  
EN ACUICULTURA**

---

**Efecto de la dieta y la temperatura en los parámetros  
poblacionales y en el valor nutricional del copépodo  
*Pseudodiaptomus euryhalinus* cultivado en laboratorio**

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
Doctor en Ciencias

Presenta:

**Marco Antonio Anzueto Sánchez**

Ensenada, Baja California, México  
2014

Tesis defendida por

**Marco Antonio Anzueto Sánchez**

y aprobada por el siguiente Comité

---

Dra. Beatriz Cordero Esquivel

Codirector del Comité

---

Dr. Benjamín Barón Sevilla

Codirector del Comité

---

Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega

Miembro del Comité

---

Dra. Ernestina Castro Longoria

Miembro del Comité

---

Dr. Eugenio Díaz Iglesias

Miembro del Comité

---

Dra. Beatriz Cordero Esquivel

Coordinador del Posgrado en  
Ciencias en Acuicultura

---

Dr. Jesús Favela Vara

Director de Estudios de Posgrado

Diciembre 2014

Resumen de la tesis que presenta Marco Antonio Anzueto Sánchez como requisito parcial para la obtención del grado de Doctor en Ciencias en Acuicultura.

## **Efecto de la dieta y la temperatura en los parámetros poblacionales y en el valor nutricional del copépodo *Pseudodiaptomus euryhalinus* cultivado en laboratorio**

Resumen elaborado por:

---

Marco Antonio Anzueto Sánchez

Se realizaron una serie de experimentos para evaluar el efecto de la temperatura y la dieta en algunos parámetros de cultivo (PC), como el crecimiento, la supervivencia, el porcentaje de hembras ovígeras, la fecundidad, la producción naupliar, la proporción de sexos y la composición de ácidos grasos (AG) del copépodo *Pseudodiaptomus euryhalinus*. Con el objetivo de encontrar la concentración óptima de alimento se evaluó, durante 24 h, la tasa de ingestión ( $I_R$ ) de *P. euryhalinus* con diferentes concentraciones de *Isochrysis* sp. (2.74, 5.47, 8.21, 10.94 y 16.41  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de peso seco orgánico, PSO), a una temperatura de 19.4°C. La  $I_R$  aumentó en forma directamente proporcional con la concentración microalgal hasta llegar a un punto asintótico en 16.41  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  PSO. Enseguida se cultivó a *P. euryhalinus* durante 11 días con las mismas concentraciones (excepto 2.74  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  PSO). Se observó que la concentración de alimento no tuvo un efecto significativo en los PC. Posteriormente se evaluó el efecto de diferentes temperaturas (19.4, 21.9, 24.2, 27.8 y 30.1°C) en los PC de *P. euryhalinus*. La temperatura tuvo un efecto inversamente proporcional en el tiempo de desarrollo de los organismos y la mayor supervivencia y crecimiento se observaron a 24.2°C. Estos resultados sugieren que la temperatura óptima de cultivo de *P. euryhalinus* bajo estas condiciones es de 24.2°C y que una concentración de *Isochrysis* sp. equivalente a 5.47  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  PSO es suficiente para su cultivo. Asimismo, se evaluaron 9 dietas microalgales, *Isochrysis* sp., *Tetraselmis suecica*, *Chaetoceros muelleri*, *Rhodomonas salina*, *Nannochloropsis oculata*, *Pavlova lutheri*, *Dunaliella salina*, *Dunaliella tertiolecta* y *Synechococcus* sp. en la supervivencia de *P. euryhalinus*. Con las últimas cuatro microalgas se obtuvieron bajas supervivencias, por lo cual fueron descartadas. De las cinco especies de microalgas seleccionadas se evaluaron todos los PC, así como la composición de AG de *P. euryhalinus* en su estadio naupliar, copepodito y adulto. La dieta tuvo un efecto significativo sobre todos los PC y en la composición de AG, las mejores dietas fueron *Isochrysis* sp. y *C. muelleri*. Además, se encontraron altas concentraciones de AG altamente insaturados en los tres estadios de *P. euryhalinus* al alimentarlos con cualquiera de las microalgas, lo que sugiere que además de acumular estos AG provenientes de las microalgas, de alguna manera lograron incorporarlos de alguna otra fuente.

Palabras Clave: **copéodos, *Pseudodiaptomus euryhalinus*, microalgas, ácidos grasos**

Abstract of the thesis presented by Marco Antonio Anzueto Sánchez as a partial requirement to obtain the Doctor in Science degree in Aquaculture.

**Effect of the diet and the temperature in the culture parameters on the nutritional value of copepod *Pseudodiaptomus euryhalinus* cultured in laboratory**

Abstract elaborated by:

---

Marco Antonio Anzueto Sánchez

A series of experiments were conducted to evaluate the effect of temperature and diet in some culture parameters (PC), such as growth, survival, percent ovigerous females, fecundity, nauplii production, sex ratio and fatty acids composition (FA) of copepod *Pseudodiaptomus euryhalinus*. The ingestion rate ( $I_R$ ) of *P. euryhalinus* was evaluated with different concentrations of *Isochrysis* sp. (2.74, 5.47, 8.21, 10.94 and 16.41  $\mu\text{g mL}^{-1}$  organic dry weight. ODW) during 24 h, at a temperature of 19.4°C in order to quantify the optimal food density. The  $I_R$  increased in direct proportion to microalgae concentration, reaching an asymptotic point at 16.41  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . *P. euryhalinus* was then cultured for 11 days at the same concentrations (except 2.74  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ODW). It was observed that food concentration did not have a significant effect on PC. After, the effect of different temperatures (19.4, 21.9, 24.2, 27.8 and 30.1°C) on the PC of *P. euryhalinus* was evaluated. The temperature had an inversely proportional effect on the time of copepods development, and highest survival and growth were observed at 24.2°C. These results suggest that the optimal temperature of cultivation of *P. euryhalinus* under these conditions is 24.2 °C and a concentration of *Isochrysis* sp. equivalent to 5.47  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  PSO is sufficient for cultivation. Also, nine microalgal diets, *Isochrysis* sp., *Tetraselmis suecica*, *Chaetoceros muelleri*, *Rhodomonas salina*, *Nannochloropsis oculata*, *Pavlova lutheri*, *Dunaliella salina*, *Dunaliella tertiolecta* and *Synechococcus* sp were evaluated in the survival of *P. euryhalinus*. With the last four microalgae, survivals was low and were discarded. Of the five species of microalgae selected all PC and FA composition of *P. euryhalinus* in naupliar, copepodite and adult stage were evaluated. The diet had a significant effect on all PC and FA composition, the best diets were *Isochrysis* sp. and *Chaetoceros muelleri*. Furthermore, high concentrations of highly unsaturated FA in the three stages of *P. euryhalinus* to feed with any microalgae, suggesting an accumulation of these FA from microalgae and too incorporation of some other source.

**Key Words: copepods, *Pseudodiaptomus euryhalinus*, microalgae, fatty acids**

## Dedicatoria

*A Dios, por darme salud y por permitirme seguir creciendo.*

*A mis padres Gilberto y Miriam, quienes me han dado total apoyo, haciendo grandes sacrificios, pero sobre todo por su amor, les estoy infinitamente agradecido.*

*A mis hermanos Gimi, Beto y Fabio, aunque estemos lejos siempre me han ayudado en todo.*

*A mi esposa Claudia, por su paciencia, apoyo y amor; por soportar los viajes y las ausencias y por darme el mayor tesoro de la vida, Elisa.*

*A mis abuelos, los que están aquí y los que están viendo desde arriba.*

*A mi familia entera.*

*Gracias, les estoy eternamente agradecido.*

## Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por otorgarme la beca para realizar mis estudios de doctorado.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), por haberme aceptado formar parte de esta gran institución en el Departamento de Acuicultura durante estos años y por todos sus apoyos económicos otorgados (Proyectos 623127 y 623149).

Un profundo agradecimiento, con mucha admiración y cariño a mis directores de tesis: Dra. Beatriz Cordero Esquivel y Dr. Benjamín Barón Sevilla por su apoyo total en la realización de este trabajo, por sus valiosos consejos académicos y extraacadémicos y sobre todo por su calidez humana.

A los integrantes del comité de tesis: Dra. Bertha Arredondo Vega, Dra. Ernestina Castro Longoria y Dr. Eugenio Días Iglesias, por sus observaciones y aportaciones en la realización de este trabajo.

A la Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega por su asesoría y colaboración en el análisis de ácidos grasos.

A la Dra. Bertha Lavaniegos Espejo de CICESE y Al Dr. Eduardo Valdéz Suárez de ECOSUR, por su asistencia en la identificación de la especie de copépodo utilizada en este trabajo.

A los técnicos: José Guadalupe Espinosa Ibarría, Luis Alberto Murillo Valenzuela, Norberto Flores Acevedo, José Carlos Carballo Bastidas, Francisco Valenzuela y en especial a Adrián Celaya, por su valiosa ayuda en la instalación de los experimentos de este trabajo.

A la M. en C. Lourdes Trujillo, por proporcionar las cepas de microalgas utilizadas en este trabajo.

A todos los profesores del Departamento de Acuicultura que tuve la fortuna de conocer y aprender algo de ellos.

Al personal administrativo del Departamento de Acuicultura: Cecilia Loera y Bibiana Medina, por todo su apoyo logístico.

A mis compañeros y amigos con los cuales tuve la oportunidad de convivir más tiempo y más de cerca en mi estancia en este lugar, ojalá hubiera sido más: Luis, Socorro, Diana, Marisol, Karina, Izbelt, Gloria, Luz María, Claudia, Ceres, Lilían, Ananda, Araceli, Raquel, Jesús, Josef, Fernando y Orlando

A Enrique Zepeda y Victor por su ayuda en el mantenimiento de los organismos.

A mis amigos Luis y Paola por su amistad incondicional, su apoyo y los grandes momentos que hemos pasado.

A mi amigo Orlando por su ayuda en los cultivos de microalgas, pero sobre todo por esos buenos momentos.

A todas aquellas personas que de una u otra forma participaron en el desarrollo de este trabajo, mis más sinceros agradecimientos.

# Tabla de contenido

	Página
<b>Resumen español</b> .....	ii
<b>Resumen inglés</b> .....	iii
<b>Dedicatorias</b> .....	iv
<b>Agradecimientos</b> .....	v
<b>Lista de Figuras</b> .....	vi
<b>Lista de Tablas</b> .....	xii
<b>1. Introducción</b> .....	1
1.1 Cultivo de copépodos.....	2
1.2 Generalidades de <i>Pseudodiaptomus euryhalinus</i> .....	5
1.3 La dieta en el cultivo de copépodos.....	6
1.4 Importancia de los lípidos y ácidos grasos poliinsaturados en el cultivo de copépodos.....	8
1.5 La temperatura en el cultivo de copépodos.....	12
1.6 Importancia del cultivo de <i>Pseudodiaptomus euryhalinus</i> .....	13
1.7 Hipótesis.....	15
1.8 Objetivos.....	16
1.8.1 Objetivo general.....	16
1.8.2 Objetivos particulares.....	16
<b>2. Material y Métodos</b> .....	17
2.1. Cultivo de copépodos.....	17
2.1.1 Aislamiento e identificación de <i>Pseudodiaptomus euryhalinus</i> .....	17
2.1.2 Mantenimiento y cultivo de <i>Pseudodiaptomus euryhalinus</i> .....	18

## Tabla de contenido (continuación)

2.1.3	Experimento 1. Tasa de ingestión de <i>Pseudodiaptomus euryhalinus</i> con diferentes concentraciones de alimento.	19
2.1.4	Experimento 2. Efecto de la concentración de alimento en el cultivo de <i>Pseudodiaptomus euryhalinus</i> .....	21
2.1.4.1	Crecimiento y supervivencia.....	21
2.1.4.2	Tiempo de maduración, porcentaje de hembras ovígeras y fecundidad.....	21
2.1.5	Experimento 3. Efecto de la temperatura en cultivo de <i>Pseudodiaptomus euryhalinus</i> .....	23
2.1.5.1	Crecimiento y supervivencia.....	24
2.1.5.2	Tiempo de maduración, porcentaje de hembras ovígeras y fecundidad.....	25
2.1.6	Experimento 4. Efecto de la temperatura en la producción naupliar de <i>Pseudodiaptomus euryhalinus</i> ...	25
2.1.7	Experimento 5. Selección de dietas microalgales para el cultivo de <i>Pseudodiaptomus euryhalinus</i> .....	25
2.1.8	Experimento 6. Efecto de cinco diferentes dietas microalgales en el cultivo de <i>Pseudodiaptomus euryhalinus</i> .....	26
2.1.8.1	Peso seco y composición bioquímica de <i>Pseudodiaptomus euryhalinus</i> y de dietas microalgales.....	27
2.1.8.2	Cuantificación del peso seco (total y orgánico)..	27
2.1.8.3	Análisis de proteínas, carbohidratos y lípidos totales.....	28
2.1.8.4	Análisis de ácidos grasos.....	28
2.1.9	Experimento 7. Efecto de la dieta en la producción naupliar total de <i>Pseudodiaptomus euryhalinus</i> .....	29

## Tabla de contenido (continuación)

2.2	Cultivo de microalgas.....	30
2.2.1	Mantenimiento de las cepas.....	30
2.2.2	Cultivo de inóculos.....	30
2.2.3	Cultivos experimentales.....	30
2.2.4	Tratamiento del agua de mar.....	31
2.3	Análisis estadísticos.....	31
<b>3.</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>32</b>
3.1	Experimento 1. Tasa de ingestión de <i>P.euryhalinus</i> con diferentes concentraciones de alimento.....	32
3.2	Experimento 2. Efecto de la concentración de alimento en el cultivo de <i>P. euryhalinus</i> .....	33
3.3	Experimento 3. Efecto de la temperatura en cultivo de <i>P. euryhalinus</i> .....	36
3.4	Experimento 4. Efecto de la temperatura en la producción naupliar total del cultivo de <i>P. euryhalinus</i> .....	39
3.5	Experimento 5. Selección de dietas microalgales para el cultivo de <i>P. euryhalinus</i> .....	40
3.6	Experimento 6. Efecto de cinco diferentes dietas microalgales en el cultivo de <i>P. euryhalinus</i> .....	41
3.7	Experimento 7. Efecto de la dieta en la producción naupliar total de <i>P. euryhalinus</i> .....	45
3.8	Cultivo de microalgas.....	45
3.8.1	Peso seco y composición bioquímica de <i>P. euryhalinus</i> y de dietas microalgales.....	52
<b>4.</b>	<b>Discusión.....</b>	<b>65</b>
<b>5.</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>75</b>
	<b>Referencias bibliográficas.....</b>	<b>76</b>

## Lista de figuras

Figura		Página
1	Zona de muestreo de <i>Pseudodiaptomus euryhalinus</i> en el Estero Punta Banda, Bahía de Todos los Santos, Ensenada, Baja California, México.....	17
2	Estanque de 450 L adaptados con un sistema de recirculación para el cultivo de <i>Pseudodiaptomus euryhalinus</i> .....	19
3	Tasa de Ingestión ( $I_R$ ) de <i>Pseudodiaptomus euryhalinus</i> con diferentes concentraciones de <i>Isochrysis</i> sp. (Datos ajustados a una función polinomial de segundo orden).....	32
4	Supervivencia (%) de <i>Pseudodiaptomus euryhalinus</i> por efecto de diferentes incrementos en la ración de <i>Isochrysis</i> sp. como alimento (0, 7.1, 14.3 y 28.6%). Valores promedio.....	33
5	Supervivencia de <i>Pseudodiaptomus euryhalinus</i> por efecto de diferentes incrementos en la ración de <i>Isochrysis</i> sp. como alimento (0, 7.1, 14.3 y 28.6%). Valores promedio.....	34
6	Crecimiento de hembras de <i>Pseudodiaptomus euryhalinus</i> cultivadas a 19.4±0.5, 21.9±1.0, 24.2±0.3, 27.8±0.5 y 30.1±0.8°C y alimentadas con <i>Isochrysis</i> sp. Las flechas indican el tiempo en que se alcanzó la población total madura. El asterisco indica la longitud del prosoma de los nauplios recién eclosionados con una edad máxima de 24 h. Valores promedio.....	34
7	Supervivencia (%) de <i>Pseudodiaptomus euryhalinus</i> por efecto de diferentes temperaturas. Valores promedio.....	38
8	Crecimiento de hembras de <i>Pseudodiaptomus euryhalinus</i> cultivadas a 19.4, 21.9, 24.2, 27.8 y 30.1°C y alimentadas con <i>Isochrysis</i> sp. Las flechas indican el tiempo en que se alcanzó la población total madura. El asterisco indica la longitud del prosoma de los nauplios recién eclosionados con una edad máxima de 24 h. Valores promedio.....	39

## Lista de figuras (continuación)

Figura		Página
9	Producción naupliar total y supervivencia de adultos de <i>Pseudodiaptomus euryhalinus</i> a cuatro diferentes temperaturas durante 10 días de cultivo. En negro se señala la producción total naupliar. En gris se señala la supervivencia de los adultos. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre los tratamientos. Valores promedio y desviación estándar.....	38
10	Producción naupliar total y supervivencia de adultos de <i>Pseudodiaptomus euryhalinus</i> a cuatro diferentes temperaturas durante 10 días de cultivo. En negro se señala la producción total naupliar. En gris se señala la supervivencia de los adultos. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre los tratamientos. Valores promedio y desviación estándar.....	40
11	Supervivencia de <i>Pseudodiaptomus euryhalinus</i> por efecto de diferentes dietas microalgales. ISX= <i>Isochrysis</i> sp, CHM= <i>Chaetoceros muelleri</i> , RHS= <i>Rhodomonas salina</i> , NNO= <i>Nannochloropsis oculata</i> , TES= <i>Tetraselmis suecica</i> , DUS= <i>Dunaliella salina</i> , DUT= <i>Dunaliella tertiolecta</i> y PLU= <i>Pavlova lutheri</i> .....	41
12	Supervivencia (%) de <i>Pseudodiaptomus euryhalinus</i> por efecto de diferentes dietas microalgales. ISX= <i>Isochrysis</i> sp., TES= <i>Tetraselmis suecica</i> , CHM= <i>Chaetoceros muelleri</i> , NNO= <i>Nannochloropsis oculata</i> y RHS= <i>Rhodomonas salina</i> .....	42
13	Crecimiento (longitud del prosoma en $\mu\text{m}$ ) de machos de <i>Pseudodiaptomus euryhalinus</i> cultivados con diferentes dietas monoalgales (ISX= <i>Isochrysis</i> sp., TES= <i>Tetraselmis suecica</i> , CHM= <i>Chaetoceros muelleri</i> , NNO= <i>Nannochloropsis oculata</i> y RHS= <i>Rhodomonas salina</i> ). El asterisco indica la longitud del prosoma de los nauplios recién eclosionados con una edad máxima de 24 h.....	43

## Lista de figuras (continuación)

Figura		Página
14	Crecimiento (longitud del prosoma en $\mu\text{m}$ ) de hembras de <i>Pseudodiaptomus euryhalinus</i> cultivados con diferentes dietas monoalgales. El asterisco indica la longitud del prosoma de los nauplios recién eclosionados con una edad máxima de 24 h. ISX= <i>Isochrysis</i> sp., TES= <i>Tetraselmis suecica</i> , CHM= <i>Chaetoceros muelleri</i> , NNO= <i>Nannochloropsis oculata</i> y RHS= <i>Rhodomonas salina</i> .....	43
15	Densidad celular ( $\text{cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) de <i>Isochrysis</i> sp. cultivada en un sistema semicontinuo. Valores promedio.....	46
16	Densidad celular ( $\text{cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) de <i>Chaetoceros muelleri</i> cultivada en un sistema semicontinuo. Valores promedio....	46
17	Densidad celular ( $\text{cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) de <i>Pavlova lutheri</i> cultivada en un sistema semicontinuo. Valores promedio.....	47
18	Densidad celular ( $\text{cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) de <i>Rhodomonas salina</i> cultivada en un sistema semicontinuo. Valores promedio.....	47
19	Densidad celular ( $\text{cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) de <i>Tetraselmis suecica</i> cultivada en un sistema semicontinuo. Valores promedio.....	48
20	Densidad celular ( $\text{cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) de <i>Dunaliella tertiolecta</i> sp. cultivada en un sistema semicontinuo. Valores promedio....	48
21	Densidad celular ( $\text{cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) de <i>Dunaliella salina</i> cultivada en un sistema semicontinuo. Valores promedio.....	49
22	Densidad celular ( $\text{cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) de <i>Nannochloropsis oculata</i> cultivada en un sistema semicontinuo. Valores promedio.....	49
23	Densidad celular ( $\text{cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) de <i>Synechococcus</i> sp. cultivada en un sistema semicontinuo. Valores promedio.....	

## Lista de tablas

Tabla		Página
1	Porcentaje de sedimentación de <i>Isochrysis</i> sp. con y sin aireación.....	33
2	Supervivencia (%) y longitud del prosoma ( $\mu\text{m}$ ) de <i>Pseudodiaptomus euryhalinus</i> en el día 11 de cultivo, alimentado con diferentes concentraciones de <i>Isochrysis</i> sp. y cultivados a 24.4°C. Media $\pm$ Desviación estándar....	35
3	Primera maduración (días), población total madura (días), hembras ovígeras (%) y fecundidad (huevos/hembra) de <i>Pseudodiaptomus euryhalinus</i> en el día 11 de cultivo, alimentado con diferentes concentraciones de <i>Isochrysis</i> sp. y cultivados a 24.4°C. Media $\pm$ Desviación estándar....	35
4	Supervivencia y longitud del prosoma de <i>Pseudodiaptomus euryhalinus</i> en el día 11 de cultivo con diferentes temperaturas y alimentado con <i>Isochrysis</i> sp. a una concentración de $380 \times 10^3$ cél mL <sup>-1</sup> . Media $\pm$ Desviación estándar.....	36
5	Primera maduración (días), población total madura (días), hembras ovígeras (%), fecundidad (huevos/hembra) y proporción de sexos de <i>Pseudodiaptomus euryhalinus</i> en el día 11 de cultivo con diferentes temperaturas y alimentado con <i>Isochrysis</i> sp. a una concentración de $380 \times 10^3$ cél mL <sup>-1</sup> . Media $\pm$ Desviación estándar.....	39
6	Supervivencia (%) y longitud del prosoma ( $\mu\text{m}$ ) de <i>Pseudodiaptomus euryhalinus</i> en el día 11 de cultivo con diferentes dietas monoalgales. (ISX= <i>Isochrysis</i> sp., TES= <i>Tetraselmis suecica</i> , CHM= <i>Chaetoceros muelleri</i> , RHS= <i>Rhodomonas salina</i> , NNO= <i>Nannochloropsis oculata</i> ), NO=no observado. Superíndices diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).....	42

## Lista de tablas (continuación)

Tabla	Página	
7	Primera maduración (días), población madura (días), hembras ovígeras (%) y fecundidad (huevos/hembra) de <i>Pseudodiaptomus euryhalinus</i> en el día 11 de cultivo con diferentes dietas monoalgales. (ISX= <i>Isochrysis</i> sp., TES= <i>Tetraselmis suecica</i> , CHM= <i>Chaetoceros muelleri</i> , RHS= <i>Rhodomonas salina</i> , NNO= <i>Nannochloropsis oculata</i> ), NO=no observado. Superíndices diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).....	45
8	Producción total naupliar (PNT, huevos) y supervivencia (%) de adultos reproductores de <i>Pseudodiaptomus euryhalinus</i> durante 10 días alimentados con 5 diferentes dietas de microalgas (ISX= <i>Isochrysis</i> sp., TES= <i>Tetraselmis suecica</i> , CHM= <i>Chaetoceros muelleri</i> , RHS= <i>Rhodomonas salina</i> , NNO= <i>Nannochloropsis oculata</i> ). Superíndices diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).....	47
9	Peso seco total y orgánico ( $\text{pg}\cdot\text{cél}^{-1}$ ), proteínas, lípidos y carbohidratos (% en base al PST) de las microalgas utilizadas como dietas para <i>Pseudodiaptomus euryhalinus</i> (ISX= <i>Isochrysis</i> sp., CHM= <i>Chaetoceros muelleri</i> , RHS= <i>Rhodomonas salina</i> , TES= <i>Tetraselmis suecica</i> y NNO= <i>Nannochloropsis oculata</i> ).....	51
10	Peso seco total y orgánico ( $\text{pg}\cdot\text{cél}^{-1}$ ) de <i>Pseudodiaptomus euryhalinus</i> en el estadio de nauplios, copepoditos y adultos, alimentados con diferentes dietas microalgales (ISX= <i>Isochrysis</i> sp., CHM= <i>Chaetoceros muelleri</i> , RHS= <i>Rhodomonas salina</i> , TES= <i>Tetraselmis suecica</i> y NNO= <i>Nannochloropsis oculata</i> ).....	53

## Lista de tablas (continuación)

Tabla	Página	
11	Composición de ácidos grasos de las dietas microalgales cultivadas en un sistema semicontinuo utilizadas para la alimentación de <i>P. euryhalinus</i> . (AG=Ácidos grasos, ISX= <i>Isochrysis</i> sp., TES= <i>Tetraselmis suecica</i> , CHM= <i>Chaetoceros muelleri</i> , RHS= <i>Rhodomonas salina</i> y NNO= <i>Nannochloropsis oculata</i> ). Superíndices diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Datos expresados como porcentaje del total de ácidos grasos.....	58
12	Composición de ácidos grasos de nauplios de <i>P. euryhalinus</i> alimentados con diferentes dietas microalgales. (AG=Ácidos grasos, ISX= <i>Isochrysis</i> sp., TES= <i>Tetraselmis suecica</i> , CHM= <i>Chaetoceros muelleri</i> , RHS= <i>Rhodomonas salina</i> y NNO= <i>Nannochloropsis oculata</i> ). Datos expresados como porcentaje del total de ácidos grasos.....	59
13	Composición de ácidos grasos de copepoditos de <i>P. euryhalinus</i> alimentados con diferentes dietas microalgales. (AG=Ácidos grasos, ISX= <i>Isochrysis</i> sp., TES= <i>Tetraselmis suecica</i> , CHM= <i>Chaetoceros muelleri</i> , RHS= <i>Rhodomonas salina</i> y NNO= <i>Nannochloropsis oculata</i> ). Datos expresados como porcentaje del total de ácidos grasos.....	60
14	Composición de ácidos grasos de adultos de <i>P. euryhalinus</i> alimentados con diferentes dietas microalgales. (AG=Ácidos grasos, ISX= <i>Isochrysis</i> sp., TES= <i>Tetraselmis suecica</i> , CHM= <i>Chaetoceros muelleri</i> , RHS= <i>Rhodomonas salina</i> y NNO= <i>Nannochloropsis oculata</i> ). Datos expresados como porcentaje del total de ácidos grasos.....	61

# 1. Introducción

---

Según datos del último informe sobre el Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura (FAO, 2014), un alto porcentaje de las pesquerías marinas se encuentran catalogadas como sobreexplotadas o en deterioro, es por esto que en los últimos años se ha venido planteando a la acuicultura como una solución a este problema. Sin embargo, actualmente la actividad acuicultura enfrenta algunas dificultades, el principal cuello de botella es la falta de alimento adecuado para el cultivo de los primeros estadios larvarios de peces, crustáceos y moluscos. Generalmente, en esta etapa del cultivo la dieta para las larvas se compone de alimento vivo, debido a sus características favorables, principalmente el de proporcionar mejor crecimiento y supervivencia (Lazo, 2000). A pesar de que en los últimos años se han venido investigando y desarrollando alimentos alternativos (dietas artificiales) para sustituir el alimento vivo, el cultivo larvario todavía depende en forma total o parcial del uso de ese tipo de alimentos (Gisbert *et al.*, 2012) por lo que durante los próximos años la producción de larvas marinas seguramente seguirá dependiendo del cultivo de alimento vivo.

Los rotíferos y *Artemia* han sido, por muchos años, los organismos más empleados en el larvicultivo de peces marinos (Lavens y Sorgeloos, 2000), sin embargo, estas presas carecen de un valor nutricional adecuado y es necesario enriquecerlos antes de ser suministrados como alimento. Por otra parte, en su ambiente natural, los copépodos son las principales presas naturales de las larvas de peces y de otros organismos marinos, ya que constituyen entre el 50% y el 80% del total del zooplancton, tanto en aguas oceánicas como en zonas neríticas y costeras (Gasca-Serrano y Suárez-Morales, 1996). Es por esto que, cuando se cultivan organismos marinos, como peces y crustáceos, los copépodos se deberían suministrar en la dieta, ya que además tienen características favorables para las larvas, tales como un perfil adecuado de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA, por sus siglas en inglés), mayor cantidad de fosfolípidos que de triacilgliceroles, niveles adecuados de antioxidantes, tamaño y comportamiento natatorios adecuados para el tamaño de la boca y para las capacidades natatorias de las larvas. Además, son una buena fuente de proteínas, vitaminas y enzimas (McKinnon

*et al.*, 2003; Mitra, 2007) y nutrientes que mejoran la capacidad de las larvas para resistir el estrés asociado a los procesos de cultivo y, por consiguiente, las enfermedades.

Los copépodos son organismos pertenecientes al Subfilo Crustacea, con una variedad de más de 10,000 especies en muchos nichos distintos; generalmente son marinos, aunque también habitan aguas dulces y salobres (Rippingale y Payne, 2001). La importancia de los copépodos como formadores del zooplancton, radica en que transfieren la biomasa y la energía del fitoplancton hacia los niveles tróficos superiores. Los copépodos ocupan una posición central entre los organismos autótrofos y heterótrofos, manteniendo una conexión entre estos grupos de organismos.

### **1.1 Cultivo de Copépodos**

A pesar de las ventajas que ofrecen los copépodos como alimento vivo, su cultivo masivo no se ha desarrollado suficientemente para sustituir el uso de rotíferos y *Artemia*, pero actualmente es un área muy activa de investigación y desarrollo (Drillet *et al.*, 2011). Existen 10 órdenes de copépodos, que contienen un gran número de familias, géneros y especies. Sin embargo, en acuicultura, los órdenes de copépodos más estudiados para fines de cultivo han sido los harpacticoides, calanoides y en menor medida los ciclopoideos.

Los copépodos harpacticoides son más productivos, ya que tienen altas tasas de reproducción y tiempos generacionales cortos; son resistentes a amplios intervalos de condiciones ambientales y son flexibles en sus requerimientos dietéticos, sin embargo, los distintos estadios de su ciclo de vida tienden a ser bentónicos, lo cual los hace inapropiados para el cultivo de las larvas de peces marinos que en su etapa larvaria son planctónicas. Otra característica de estas especies es que al ser bentónicas necesitan un sustrato para su cultivo, lo que complica su cosecha, además, muchas de estas

especies están cubiertas por largas espinas, lo cual es un inconveniente para las larvas de peces o crustáceos, ya que se les dificulta la ingestión (Fleeger, 2005).

Los calanoides son copépodos planctónicos, generalmente constituyen el vínculo más importante entre el fitoplancton y las larvas de peces, son los copépodos más abundantes en el zooplancton y también tienen características potenciales que los hacen cultivables, como fácil manejo y resistencia pero, a diferencia de los harpacticoides, éstos se cultivan a bajas densidades porque el estrés causado por las altas densidades disminuye la fecundidad y en algunas especies aumenta el canibalismo (Marcus, 2005). Entre los copépodos ciclopoideos existen tanto especies planctónicas como bentónicas y al igual que los calanoides, tienen características favorables para ser cultivados, como resistencia, fácil manejo y altas fecundidades.

La selección de una especie de copépodo para su cultivo depende de varios factores, como el valor nutricional, la facilidad de cultivo, la productividad y su tamaño, ya que la capacidad de las larvas para capturar diferentes tipos de presas varía en función del tamaño de la larva, de su agudeza visual, patrones de nado, capacidad de forraje y otros atributos de las presas, como palatabilidad, tamaño, forma, pigmentación, distribución y comportamiento natatorio (escape) (Buskey, 2005). Las diferencias observadas en las frecuencias de captura con la que las larvas de peces capturan distintos tipos naupliares de copépodos, señalan su capacidad para capturar un tipo específico de copépodo, generalmente el factor más crítico es el tamaño de la presa, debido a que el tamaño de la boca de las larvas de peces limita la captura de la presa, el tamaño del esófago también limita la capacidad de las larvas de ingerir las presas vivas.

Respecto al valor nutricional de los copépodos, este varía dependiendo de la especie y de la cantidad de energía total almacenada, por ejemplo, los copépodos de aguas frías (de latitudes altas), como *Calanus* sp., tienden a reproducirse anualmente,

sincronizándose con la primavera, cuando el fitoplancton es abundante y estos organismos almacenan grandes reservas de lípidos, que usan más tarde para su reproducción. En cambio, algunas especies de hábitos costeros, como *Acartia*, convierten la energía consumida de la dieta en energía para la reproducción sin tener que almacenar una gran cantidad de lípidos.

Algunos copépodos calanoides, especialmente aquellos que se encuentran en los estuarios (*Diaptomus*, *Gladioferens*), pueden almacenar una gran cantidad de lípidos, debido a que producen un gran número de huevos que se desarrollan simultáneamente. En la naturaleza, especialmente en los estuarios, la dieta no siempre es la óptima para los copépodos y su abundancia está relacionada directamente con el alimento disponible en el ambiente, que depende en gran parte de la temporada (Shansudin *et al.*, 1997), pero en un laboratorio, la cantidad y calidad del alimento se pueden controlar y por lo tanto es posible manipular el valor nutricional de los copépodos cultivados. Por todas estas razones es difícil decir cuales especies son las mejores para la acuicultura y la selección dependerá de los objetivos de cultivo.

Entre las especies de calanoides más estudiadas para fines de cultivo están las de los géneros *Acartia* spp. (Schipp *et al.*, 1999; Chinnery y Williams, 2003; Peck y Holste, 2006; Sorensen *et al.*, 2007; Millione y Zheng, 2008; Zhang *et al.*, 20013), *Gladioferens* (Payne y Rippingale, 2001) *Centropages* (Calbet *et al.*, 2007; Olivotto *et al.*, 2008) y *Calanus* (Bonnet *et al.*, 2009); de las especies harpacticoides han sido los géneros *Tigriopus* spp. (Carli *et al.*, 1995) y *Tisbe* spp. (Størrup y Norsker, 1997; Nanton y Castell, 1999) y de los ciclopoideos se encuentran las especies *Paracyclopina nana* (Lee *et al.*, 2006) y *Apocyclops dengizicus* (Farhadian *et al.*, 2009). Entre los copépodos calanoides pocos estudiados y con un alto potencial de cultivo se encuentra *Pseudodiaptomus euryhalinus*.

## 1.2 Generalidades de *Pseudodiaptomus euryhalinus*

El copépodo *P. euryhalinus* habita en los estuarios y en aguas costeras protegidas (Fleminger y Hendrix, 1988) y se distribuye desde la bahía de San Francisco hasta el norte de Baja California (Johnson, 1939), aunque se ha reportado hasta Mazatlán, Sinaloa, México (Puello-Cruz, comunicación personal). *P. euryhalinus* pasa por distintos estadios de vida a partir de los huevos que producen las hembras, las cuales muchas veces sólo llevan un saco ovígero, debido a que el segundo saco se pierde en el proceso de copulación y, a diferencia de otros copépodos, el macho de *P. euryhalinus* tiene una tendencia a continuar acoplado a la hembra, incluso cuando los espermátóforos se han transferido y los sacos ovígeros están totalmente desarrollados. Los nauplios eclosionan de los huevos, dos o tres días después de la aparición de los sacos ovígeros en la hembra y miden alrededor de 16 mm de longitud (Johnson, 1939).

Las especies de calanoides, harpacticoides y ciclopoideas tienen estadios de vida similares, después de 6 estadios naupliares entran a la fase de copepoditos, de igual forma ésta fase se suele dividir en 6 estadios y comúnmente la última fase de copepodito es la llamada fase adulta, en donde se puede identificar el sexo. Sin embargo *P. euryhalinus* eclosiona directamente como nauplio II, por lo que sólo tiene cinco etapas naupliares y para llegar a la fase adulta, madurar sexualmente y producir nauplios, el proceso toma alrededor de 11 días, pudiendo ser menos, según las condiciones ambientales. En general, el ciclo de vida de *P. euryhalinus* tiene una duración de 10 días bajo condiciones adecuadas y puede extenderse cuando las condiciones no son adecuadas (Puello-Cruz *et al.*, 2004). Los principales factores que regulan la duración del ciclo de vida, el crecimiento, la supervivencia y la reproducción son la temperatura y la dieta (Krebs, 1978).

*P. euryhalinus* se ha cultivado con éxito, logrando densidades de hasta 463 copépodos·L<sup>-1</sup> empleando como dieta la microalga *Chaetoceros muelleri*. De esta forma se ha utilizado exitosamente en la alimentación del pez globo *Sphoeroides annulatus* y del pargo rojo *Lutjanus guttatus* (García-Ortega, 2009; Puello-Cruz *et al.*, 2009).

### 1.3 La dieta en el cultivo de copépodos

Los copépodos tienen una gran variedad de hábitos alimenticios, los calanoides son filtradores selectivos y pueden alimentarse en forma preferente de una o varias especies de microalgas (Ohs *et al.*, 2010), aunque también hay especies que consumen una variedad de organismos zooplanctónicos incluyendo huevos de copépodos (McKinnon *et al.*, 2003). Los copépodos harpacticoides son principalmente detritívoros y ramoneadores, y se alimentan de bacterias, macroalgas, biofilm, microalgas y dietas artificiales (Guidi, 1984), pero aunque estos organismos tengan una amplia variedad de fuentes alimenticias no quiere decir que no sean selectivos. Los ciclopoideos se consideran omnívoros y se alimentan de organismos planctónicos y bentónicos e incluso presentan canibalismo, ya que se comen a sus nauplios y copepoditos.

Una vez que las microalgas son ingeridas, la digestibilidad y la composición bioquímica son los principales factores que determinan su valor nutricional para los copépodos y para cualquier otro organismo, por esta razón, la identificación de dietas microalgales que promuevan buenas supervivencias y crecimientos poblacionales es primordial para el cultivo de copépodos. La tasa de ingestión, el crecimiento y la reproducción de los copépodos depende de la calidad y cantidad de las microalgas disponibles en el medio, cuando éstas son óptimas, la tasa de crecimiento poblacional aumenta y por lo tanto el cultivo se maximiza. La tasa de ingestión ayuda a conocer los requerimientos dietéticos de los copépodos y se puede cuantificar en laboratorio como el número de células removidas por los copépodos por unidad de tiempo y se puede expresar en diferentes unidades, e.g.,  $\text{cél}\cdot\text{copépo}\text{do}^{-1}$  ó  $\text{g}\cdot\text{copépo}\text{do}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ . Las tasas de ingestión también se expresan en términos de carbono ( $\text{g C}\cdot\text{cop}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ), nitrógeno o proteínas ingeridas (Band-Schmidt *et al.*, 2008).

Otra herramienta utilizada en los estudios sobre alimentación es la tasa de filtración, y se refiere al volumen de agua filtrada por los copépodos por unidad de tiempo, expresada comúnmente en  $\text{mL}\cdot\text{copépo}\text{do}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ . La tasa de filtración e ingestión de los copépodos depende de factores como la temperatura, la concentración y el tipo y

tamaño de alimento, entre otros, así como el estadio de vida de los copépodos, de manera que las tasas de ingestión de los nauplios y copepoditos son menores que las de los adultos, simplemente porque estos tienen un tamaño menor y sus requerimientos de alimento son menores (Irigoien *et al.*, 1996).

Respecto a la concentración de alimento, generalmente la tasa de ingestión de los copépodos sigue una función sigmoide, aumenta en forma acelerada en cierto intervalo de concentraciones y posteriormente decrece hasta llegar a un punto asintótico. Cuando las microalgas disponibles en el medio son abundantes, la tasa de ingestión aumenta, pero de igual forma, la cantidad de heces producidas es directamente proporcional al consumo de alimento. Sin embargo, el crecimiento de los copépodos puede mantenerse a una determinada concentración de alimento menor a las concentraciones donde la tasa de ingestión es mayor, mejorando así la eficiencia de alimentación, con menor excedente de alimentos y menor producción de heces, logrando así, optimizar el cultivo (Rippingale y Payne, 2001). Debido a esto, es importante conocer las tasas de ingestión de cada especie y por consiguiente, conocer las concentraciones óptimas de microalgas que deben suministrarse al cultivo de esos organismos.

Una vez que se conoce la cantidad de alimento que los copépodos pueden ingerir en un determinado tiempo, el siguiente paso es evaluar la digestión y asimilación de los tipos y cantidades de alimento, para así lograr una alimentación eficiente. Generalmente, para el cultivo de las fases larvarias de organismos marinos, incluyendo los copépodos, se usan microalgas con altos contenidos en HUFA.

Entre las especies de microalgas que se usan comúnmente en la alimentación de copépodos marinos se encuentran *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica*, *Nannochloropsis oculata*, *Chaetoceros muelleri*, *Rhodomonas* sp. y *Pavlova lutheri*, debido a su aceptable composición, con altos contenidos de HUFA y altas tasas de

crecimiento (Knuckey *et al.*, 2005; Puello-Cruz *et al.*, 2009; Ohs *et al.*, 2010); además de proteínas (aminoácidos esenciales) y otros nutrientes como vitaminas como el ácido ascórbico, pigmentos y esteroides (Brown, 2002).

#### **1.4 Importancia de los lípidos y ácidos grasos poliinsaturados en el cultivo de copépodos**

Los lípidos son moléculas orgánicas compuestas principalmente por carbono e hidrógeno, aunque también pueden tener fósforo, azufre y nitrógeno. Los lípidos más sencillos son los ácidos grasos, que son también componentes de muchos lípidos más complejos. Su estructura básica consiste de cadenas hidrocarbonadas con un grupo carboxilo (-COOH) en un extremo (Mathews *et al.*, 2002), su fórmula es CX:Y, donde CX es el número de átomos de carbono y Y es el número de dobles enlaces.

Los ácidos grasos según sus enlaces pueden ser saturados (sin dobles enlaces) o insaturados (con dobles enlaces). Los ácidos grasos insaturados se denominan monoinsaturados si sólo tienen un doble enlace en su estructura o poliinsaturados (PUFA) si tienen dos o más dobles enlaces. Dentro de los PUFA se encuentran los ácidos grasos altamente insaturados (HUFA, por sus siglas en inglés). Los HUFA de la serie  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6 son ácidos grasos esenciales, ya que son necesarios en la formación de membranas celulares y son precursores de compuestos de 20 carbonos que actúan como hormonas, llamados eicosanoides, que actúan como reguladores de procesos como la inflamación, vasodilatación, vasoconstricción y coagulación, entre otros (Arredondo-Vega *et al.*, 2000) y debido a que el organismo es incapaz de sintetizarlos, deben ser suministrados en la dieta. La notación  $\omega$  se refiere al último carbono de la cadena y el número tres y seis se refieren al carbono donde se localiza el último doble enlace, contado desde el último carbono ( $\omega$ ) hacia el -COOH terminal (Muller-Feuga, *et al.*, 2003).

Los ácidos grasos más importantes para los organismos, tomando como base los estudios que evalúan su valor nutricional son los HUFA como el ácido eicosapentaenóico (EPA, C20:5  $\omega$ 3), el ácido docosahexaenóico (DHA, C22:6  $\omega$ 3) y el ácido araquidónico (ARA, C20:4  $\omega$ 6) (Patil *et al.*, 2007). El EPA y DHA son ácidos grasos importantes en el tratamiento de la arteriosclerosis, cáncer, artritis reumatoide, psoriasis y enfermedades degenerativas como el Alzheimer (Simopoulos, 1999). El ARA es precursor de eicosanoides como las prostaglandinas que son importantes en procesos como el movimiento vasculatorio y la cicatrización de heridas (Simopoulos, 1999).

Los ácidos grasos insaturados son sintetizados a partir de los saturados introduciendo cadenas de dobles enlaces por enzimas desaturasas. La posición de los dobles enlaces es determinada por el tipo de desaturasas, que se encuentran de forma distinta en los animales y en plantas. Por ejemplo, la  $\Delta$ -9 desaturasa sólo se encuentra en los animales, la  $\Delta$ -6 desaturasa se encuentra en animales y plantas inferiores, mientras que la  $\Delta$ -15 desaturasa sólo se encuentra en algas y plantas con clorofila (Brett y Müller-Navarra, 1997). La biosíntesis de PUFA también involucra la extensión (elongación) de átomos de carbono. Por consiguiente, la síntesis de PUFA en los organismos involucran rutas con acción alternada de estos dos tipos de enzimas (Uttaro, 2006).

Los lípidos llevan a cabo múltiples funciones. Algunas de ellas, las grasas, se utilizan para el almacenamiento de energía y el aislamiento térmico. Sin embargo, la porción más grande de los lípidos, en la mayor parte de las células, se emplea para formar las membranas. Los lípidos también actúan como vitaminas (e.g., la vitamina E) mientras que otros forman las grandes clases de hormonas esteroideas y de prostaglandinas. En los mamíferos, estos compuestos están involucrados en el control y regulación de la presión sanguínea, control en las respuestas inflamatorias y en las funciones reproductivas.

La acumulación de lípidos en los organismos zooplancónicos (i.e. copépodos) juega un papel muy importante en la ontogenia, en procesos como la reproducción y la diapausa (Lee *et al.*, 2006). Se han descrito cuatro diferentes formas de almacenamiento de los lípidos en estos organismos, como triacilgliceroles, esterres, fosfolípidos y éter diacilgliceroles. Los triacilgliceroles están presentes en casi todas las especies del zooplancton, sin embargo los fosfolípidos son los más importantes debido a que son el principal componente de las membranas celulares. Estos lípidos polares están conformados principalmente de 3 ácidos grasos: el ácido docosahexaenóico (DHA; 22:6  $\omega$ 3), el ácido eicosapentaenóico (EPA; 20:5  $\omega$ 3) y el ácido palmítico, 16:0 (Lee *et al.*, 2006) y su contenido es independiente de los cambios en la dieta.

La principal ventaja de utilizar copépodos como alimento vivo es que tienen un mayor valor nutricional, particularmente por sus altos niveles de HUFA esenciales (McKinnon *et al.*, 2003), como el DHA, el EPA y el ácido araquidónico (ARA; 20:4  $\omega$ 6), sin embargo, los copépodos calanoides, a diferencia de los harpacticoides, requieren esos ácidos grasos esenciales  $\omega$ -3 porque son incapaces de sintetizarlos a partir del ácido linolénico (LNA; 18:3  $\omega$ 3) al no tener las enzimas  $\Delta$ -5 y  $\Delta$ -6 desaturasa y elongasa, que son necesarias para la conversión de cadenas cortas de HUFA  $\omega$ 3 (18 carbonos) a cadenas largas de DHA (22 carbonos) y EPA (20 carbonos) (Fleeger, 2005), por lo que deben ser incorporados directamente de las dietas de microalgas (Nanton, 1998). Es por eso que, cuando los copépodos son alimentados con microalgas que contienen HUFA se incrementan algunos de sus parámetros poblacionales como la supervivencia la fecundidad, el tiempo de desarrollo y el crecimiento poblacional (Knuckey *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006). La síntesis de HUFA en los copépodos varía dependiendo de la especie y del estadio de desarrollo y debido a los diferentes hábitats que colonizan.

La composición lipídica (e.g. PUFA) de las microalgas determina la composición de ácidos grasos de los copépodos e influye en diferentes aspectos de su biología y cuando se cultivan en condiciones controladas determinan su productividad. En este sentido, la definición de una dieta adecuada es fundamental para el cultivo de los

copépodos que se utilizarán para el cultivo de organismos marinos como las larvas de peces.

Muchos de los PUFA son derivados de ácidos grasos esenciales como los ácidos linoleico (18:2  $\omega$ 6) y linolénico (18:3  $\omega$ 3), por una serie de reacciones alternantes de desaturación y elongación. El principal metabolito de la vía  $\omega$ -6 en mamíferos es el ácido araquidónico (20:4  $\omega$ -6) y de la vía  $\omega$ -3 son el EPA y DHA.

Por otra parte, una dieta debe tener las concentraciones y proporciones adecuadas de HUFA, especialmente de DHA, EPA y ARA (Reitan *et al.*, 1997). El suministro de dietas con proporciones inadecuadas de ácidos grasos esenciales es un error común que se comete en el cultivo larval de especies marinas. Típicamente la proporción de DHA:EPA para larvas de peces marinos sugerida es de 2, las proporciones  $\leq$  a 1 son subóptimas (Sargent *et al.*, 1997), sin embargo otros estudios han demostrado que una proporción de 8 mejora el crecimiento y la supervivencia de los organismos cultivados (Copeman *et al.*, 2002). Tanto el DHA como el EPA usan las mismas enzimas para esterificar ácidos grasos a estructuras de fosfolípidos y, dado que el papel específico del DHA se centra en el desarrollo de tejido nervioso, así como de la retina, es necesario un alto contenido de DHA durante el desarrollo larvario, tomando en cuenta que el cerebro y el tejido nervioso en general constituyen una fracción significativa de la masa corporal y tienen una función preponderante. Mientras que el EPA tiene un papel importante como precursor de eicosanoides, que son cruciales en la regulación de procesos metabólicos. Un exceso de EPA comparado con DHA puede ser nocivo para las larvas de peces, ya que el primero puede inhibir la actividad de los eicosanoides sintetizados a partir del ARA además, puede afectar la pigmentación de los peces marinos, atrofiando la membrana fosfolipídica y obteniendo larvas poco viables (Rainuzzo *et al.*, 1997), es por esto que la proporción EPA:ARA también es importante.

Una proporción recomendada de EPA:ARA es de alrededor de 5:1, sin embargo, las proporciones óptimas de DHA:EPA:ARA para el cultivo larvario son discrepantes y aún siguen en investigación.

## 1.5 La temperatura en el cultivo de copépodos

La temperatura es uno de los factores abióticos más importantes que regula el ciclo de vida de todos los organismos. En la biología de los copépodos este factor ha sido ampliamente estudiado (Miller y Marcus, 1994; Chinnery y Williams, 2003; Matias-Peralta *et al.*, 2005; Cook *et al.*, 2007; Rhyne *et al.*, 2009). Cuando se cultiva una especie, es importante conocer su temperatura óptima, ya que la mayor parte de la energía del metabolismo se dirigirá a procesos como crecimiento, tiempo de desarrollo y reproducción y por lo tanto aumentará el rendimiento de su cultivo. Está bien documentado que la duración del desarrollo de los copépodos disminuye conforme se incrementa la temperatura, hasta llegar a un punto máximo (Lee *et al.*, 2003; Chinnery y Williams, 2003; Rhyne *et al.*, 2009), en este sentido es importante que los organismos cultivados maduren más rápido pero sin afectar otros procesos biológicos, como la supervivencia, así como buscar especies que resistan amplios intervalos de temperatura. Generalmente las especies de zonas costeras, especialmente en los estuarios son más resistentes que las que habitan en los océanos.

La temperatura también afecta otros aspectos de la biología de los copépodos, como el porcentaje de hembras ovígeras de una población, el tiempo de puestas, la fecundidad, el éxito de la eclosión de los huevos (Bonnet *et al.*, 2009; Rhyne *et al.*, 2009) y la proporción de sexos (Lee *et al.*, 2003).

Rhyne *et al.* (2009) señala la importancia de evaluar el impacto de cualquier factor biótico o abiótico como la temperatura, como un paso previo a la evaluación de las dietas microalgales para la alimentación de copépodos y así establecer las condiciones de cultivo más adecuadas. Ya que se corre el riesgo de que, en el caso de la temperatura, las microalgas sean sensibles a este factor y cuando se agreguen a los cultivos donde la temperatura es diferente, experimenten un choque térmico y no estén disponibles para los copépodos. Para ilustrar este efecto, Rhyne *et al.* (2009) menciona que la microalga *Rhodomonas lens*, comúnmente usada para alimentar a los copépodos, es sensible a la temperatura y sus cultivos se colapsan a temperaturas

superiores a los 26°C, en las que los copépodos se cultivan en forma común, por consiguiente, aunque las microalgas tengan un buen perfil nutricional, la temperatura limita su uso para la alimentación de esos copépodos.

La temperatura también tiene efectos sobre la composición de ácidos grasos de los copépodos. En especies como *Amonardia*, sp. cuando se mantienen en temperaturas bajas (6°C) la cantidad de PUFA es mayor que a temperaturas más altas (20°C). Esta respuesta está asociada a la necesidad de mantener una fluidez adecuada de las membranas celulares y de organelos (Cossins y Proser, 1978). Otras investigaciones señalan que la cantidad de lípidos es más alta a temperaturas bajas que a temperaturas altas, debido a que estos compuestos son empleados como reservas de energía para la supervivencia en periodos fríos, cuando no hay nutrientes disponibles y para la reproducción (Giese, 1966).

### **1.6 Importancia del cultivo de *Pseudodiaptomus euryhalinus***

Debido a la importancia que tienen los copépodos como alimento vivo para las larvas de peces y crustáceos marinos y dado el auge que el cultivo de peces marinos está tomando en Baja California, México y el resto del país y del mundo, es fundamental el desarrollo de los estudios que evalúen el potencial acuícola de las especies de esta región del Pacífico. Para esto, se han tomado como indicadores sus parámetros poblacionales y la calidad nutrimental derivada del uso de diferentes especies de microalgas comúnmente utilizadas en la acuicultura. En este sentido, es necesario evaluar los parámetros poblacionales y relacionarlos con las fuentes de alimentación y los factores abióticos como la temperatura, ya que la composición bioquímica del zooplancton está influenciada directamente por la dieta y por factores externos como la temperatura. Los lípidos y en particular los PUFA son esenciales para lograr las mayores supervivencias de las larvas de peces y crustáceos marinos, ya que no los pueden sintetizar *de novo*.

Los estudios que señalan que los copépodos pueden sintetizar PUFA son especie-específicos e investigaciones diversas, señalan que la fuente de alimentación es el principal factor que determina su composición bioquímica, por esto, es importante conocer el efecto del consumo de microalgas sobre la composición de ácidos grasos de *P. euryhalinus*. También es importante evaluar la composición bioquímica de los copépodos en sus diferentes estadios de vida, ya que los copépodos tienen una estructura poblacional bien diferenciada, estos dos puntos señalados, servirán para mejorar las estrategias de alimentación de peces y crustáceos marinos de importancia acuícola.

## 1.7 Hipótesis

---

1. Las dietas microalgales ricas en ácidos grasos altamente insaturados (HUFA) y la concentración de alimento óptima mejoran los parámetros de cultivo y el valor nutricional de los copépodos cultivados.
2. El incremento de la temperatura afecta en forma inversamente proporcional el tiempo de desarrollo de los copépodos cultivados, sin embargo, otros parámetros de cultivo como la supervivencia y el crecimiento son óptimos a temperaturas intermedias.
3. El valor nutricional de *P. euryhalinus* difiere entre sus estadios de vida, siendo en la etapa adulta donde tienen una mayor proporción de HUFA.

## 1.8 Objetivos

---

### 1.8.1 Objetivo general

Evaluar el potencial de cultivo y valor nutricional de *Pseudodiaptomus euryhalinus* cultivado en diferentes temperaturas y alimentado con diferentes dietas microalgales.

### 1.8.2...Objetivos particulares

1. Aislar una especie de copépodo de la localidad con potencial acuícola.
2. Seleccionar las dietas adecuadas para el cultivo de *P. euryhalinus* evaluando las microalgas *Isochrysis* sp., *Nannochloropsis oculata*, *Chaetoceros muelleri*, *Dunaliella tertiolecta*, *Dunaliella salina*, *Rhodomonas salina*, *Synechococcus* sp., *Pavlova lutheri* y *Tetraselmis suecica*.
3. Evaluar las tasas de ingestión y algunos parámetros de cultivo de *P. euryhalinus* con diferentes concentraciones de alimento.
4. Evaluar el efecto de la temperatura en los parámetros de cultivo de *P. euryhalinus*.
5. Determinar la composición bioquímica (proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos grasos) en las dietas microalgales y en tres estadios de desarrollo de *Pseudodiaptomus* sp. cultivados con diferentes dietas y diferentes temperaturas.

## 2. Material y Métodos

### 2.1 Cultivo de Copépodos

#### 2.1.1 Aislamiento e identificación de *Pseudodiaptomus euryhalinus*

El copépodo *P. euryhalinus* fue aislado en el estero de Punta Banda ( $31^{\circ} 42'$  y  $31^{\circ} 47'$  de latitud norte y  $116^{\circ} 37'$  y  $116^{\circ} 39'$  de longitud oeste), en la Bahía de Todos Santos (Figura 1), Municipio de Ensenada, Baja California. Se hizo un arrastre superficial con una red de zooplancton de  $243 \mu\text{m}$  y un copo de  $202 \mu\text{m}$  para colectar las especies planctónicas presentes. Los organismos colectados se transportaron en bolsas de plástico al laboratorio del Departamento de Acuicultura del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE).

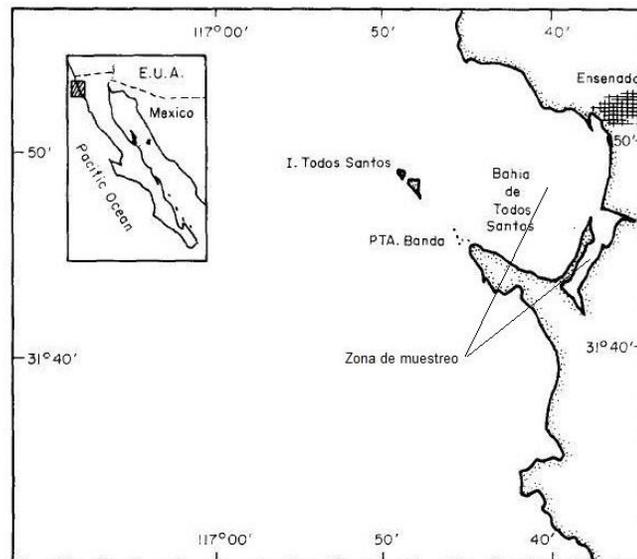


Figura 1. Zona de muestreo de *Pseudodiaptomus euryhalinus* en el Estero Punta Banda, Bahía de Todos Santos, Ensenada, Baja California, México.

Una vez en el laboratorio los organismos fueron aclimatados en acuarios de 20 L a una temperatura de  $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , salinidad de  $35 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  y luz continua y fueron alimentados *ad libitum* con la microalga *Isochrysis* sp. Para mantener en suspensión las microalgas y para mantener la concentración de oxígeno cercana a la saturación, los organismos se

mantuvieron con aireación suave y continua, suministrada con piedras aireadoras, el flujo de aire se controló con llaves de aguja.

Los copépodos que presentaron comportamiento planctónico se aislaron con la ayuda de un microscopio estereoscópico y pipetas Pasteur. Los organismos aislados de la misma especie o con características similares, fueron colocados en cajas Petri, para observar su morfología, a continuación, se pusieron en matraces Erlenmeyer de 1 L y se alimentaron con la misma microalga. Finalmente, los copépodos se identificaron utilizando las claves taxonómicas de Palomares *et al.* (1998) y Wilson (1932).

### **2.1.2 Mantenimiento y cultivo de *Pseudodiaptomus euryhalinus***

La identificación taxonómica del copépodo aislado y seleccionado para este estudio (por sus características biológicas) fue corroborada por el Dr. Eduardo Valdez-Suárez (Ecosur, Quintana Roo) como *Pseudodiaptomus euryhalinus*. La cepa se mantuvo en matraces Fernbach de 2 L, con aireación suave y constante, con luz continua a una intensidad de  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , a una temperatura de  $19.4\pm 0.5^\circ\text{C}$  y alimentada *ad libitum* con la microalga *Isochrysis* sp.

Para obtener la cantidad de nauplios necesarios para realizar los experimentos, la cepa de *P. euryhalinus* fue cultivada progresivamente en volúmenes mayores, con cinco recipientes de 20 L, y tres de 50 y 450 L, en cada etapa del escalamiento, los nauplios se recolectaron y resembraron el estanque del volumen correspondiente. A los estanques de 450 L, se les adaptó un sistema de recirculación (Figura 2).

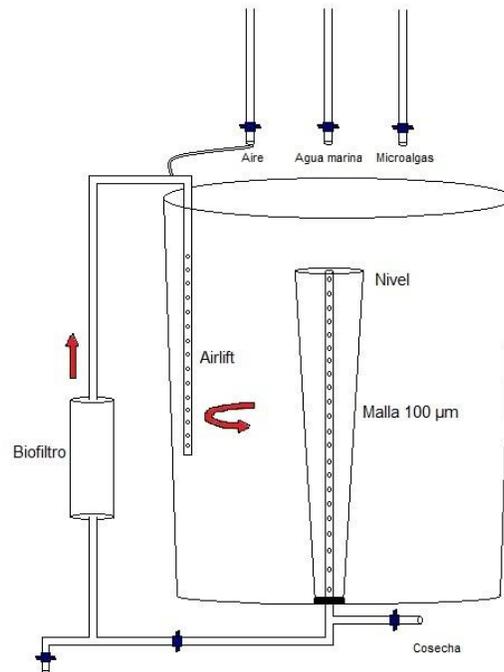


Figura 2. Estanques de 450 L adaptados para el cultivo de *Pseudodiaptomus euryhalinus*, provistos de un sistema de recirculación

### 2.1.3 Experimento 1. Tasa de Ingestión de *Pseudodiaptomus euryhalinus* con diferentes concentraciones de alimento

Para evaluar la tasa de ingestión en el estadio adulto de *P. euryhalinus*, se usó como dieta base la microalga *Isochrysis* sp., tomando como referencia la concentración utilizada por Puello-Cruz *et al.* (2009) de  $5.47 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  PSO para esta especie. Se evaluaron cinco concentraciones de *Isochrysis* sp., 2.74, 5.47, 8.21, 10.94 y  $16.41 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de PSO, equivalente a 190, 380, 570, 760 y  $1140 \times 10^3 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

Se sembraron copépodos adultos a una densidad de  $1 \text{ copépodo}\cdot\text{mL}^{-1}$  en tubos de 50 mL con un volumen útil de 40 mL de agua marina, una temperatura de  $19.4 \pm 0.5^\circ\text{C}$  y aireación constante y suave por medio de una pipeta Pasteur. Cada tratamiento tuvo tres repeticiones, además de un control, que consistió de las mismas cinco

concentraciones de microalgas, pero sin copéodos. La densidad inicial y final de las microalgas en las unidades experimentales se cuantificó usando una cámara de Neubauer con la ayuda de un microscopio compuesto (Zeiss Primo Star). Este experimento tuvo una duración de 24 h.

Para evaluar el efecto de la sedimentación de las microalgas sobre su distribución en la columna de agua y sobre la ingestión de *P. euryhalinus*, se prepararon las cinco concentraciones de *Isochrysis* sp., cada una por triplicado y se mantuvieron en las mismas condiciones que en el ensayo de ingestión durante 24 h. Posteriormente, se tomaron alícuotas de las microalgas que se mantuvieron en suspensión y se cuantificaron, los resultados se compararon con el número total de microalgas después de resuspender con un agitador las microalgas sedimentadas. Además, para evaluar la eficiencia de la aireación para mantener en suspensión las células algales, se prepararon las mismas concentraciones y se mantuvieron en las mismas condiciones pero sin aireación.

La tasa de ingestión se calculó de acuerdo con la ecuación utilizada por Abu-Rezq *et al.*, (1997):

$$I_R = \{(C_0 - C_t) - [((C_1 - C_2)/C_1) * C_0]\} * (V/nt), \quad (1)$$

Donde:

$I_R$  = Tasa de ingestión (número de células ingeridas · copepodo<sup>-1</sup> · h<sup>-1</sup>)

$C_0$  = Concentración inicial de microalgas en tratamiento

$C_t$  = Concentración final de microalgas en tratamiento

$C_1$  = Concentración inicial de microalgas en cada control

$C_2$  = Concentración final de microalgas en cada control

V= Volumen de las unidades experimentales

n= Número de copépodos

t= Tiempo en horas

#### **2.1.4 Experimento 2. Efecto de la concentración de alimento en el cultivo de *Pseudodiaptomus euryhalinus***

Para evaluar el efecto de la concentración de alimento en el crecimiento, supervivencia, porcentaje de hembras ovígeras, fecundidad y tiempo de maduración de *P. euryhalinus*, se cultivaron nauplios empleando cuatro raciones de *Isochrysis* sp., 5.47, 8.21, 10.94 y 16.41  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  PSO. Todos los tratamientos iniciaron con una concentración de 5.47  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  PSO y se incrementaron diariamente hasta el día ocho (cuando *P. euryhalinus* alcanzó el estadio adulto), cuando se asignó el 100% de las raciones previamente definidas (el incremento diario del alimento correspondió al 0, 7.1, 14.3 y 28.6%, respectivamente). La intención de incrementar la concentración de alimento en forma gradual se hizo tomando en cuenta que los copépodos aumentan gradualmente su ingesta. Cada tratamiento se realizó por triplicado. Los copépodos fueron sembrados a una densidad de 1 nauplio $\cdot\text{mL}^{-1}$  en recipientes de 500 mL con un volumen útil de 400 mL, salinidad de 35 g $\cdot\text{L}^{-1}$ , temperatura de  $24.4\pm 0.3^\circ\text{C}$ , luz continua y con aireación suave. El agua de mar fue filtrada a través de cartuchos de 5 y 1  $\mu\text{m}$  e irradiada con luz ultravioleta. El experimento tuvo una duración de 11 días y diariamente se realizó un cambio del 100% del agua de mar, filtrando los copépodos en una malla de 75  $\mu\text{m}$  y resembrándolo en el mismo recipiente con agua de mar filtrada y una nueva ración de alimento correspondiente.

##### **2.1.4.1 Crecimiento y supervivencia**

Para cuantificar el crecimiento y la supervivencia de los copépodos, durante los primeros cinco días se tomaron muestras de 15 mL de cada unidad experimental y los organismos presentes se concentraron con una malla de 75  $\mu\text{m}$ , se colocaron en una

caja Petri con agua de mar filtrada y se contaron y midieron cuidadosamente para no dañarlos. Después, los copépodos se regresaron a sus unidades experimentales, ajustando el volumen a 400 mL de medio. Para reducir el error de muestreo asociado con el rápido movimiento de los copépodos, en los siguientes 5 días de cultivo, todos los organismos, en cada una de las repeticiones, se concentraron con una malla de 75  $\mu\text{m}$  y se resuspendieron en un volumen de 30 mL, fueron contados en su totalidad y se tomó una muestra aleatoria de 10 copépodos, los cuales fueron fijados con una solución de formalina al 5% para su posterior medición. Los copépodos restantes fueron regresados a sus unidades experimentales ajustando el volumen nuevamente a 400 mL. Finalmente, al día 11, el total de los organismos fueron fijados y almacenados a 4°C para su posterior recuento y medición de la longitud del prosoma en un microscopio invertido (Olympus CKX41) con un aumento de 200x y 400x.

Para describir el crecimiento se consideró la longitud del prosoma, ya que es la característica descriptiva más adecuada (Rippingale y Payne 2001). El análisis de crecimiento fue hecho considerando los machos y hembras por separado, debido a que presentan un marcado dimorfismo sexual. La supervivencia fue calculada como la diferencia entre la cantidad inicial de nauplios y el número total de copépodos al final del cultivo y considerando los organismos que fueron fijados diariamente durante el experimento.

#### **2.1.4.2 Tiempo de maduración, porcentaje de hembras ovígeras y fecundidad**

Para evaluar el tiempo de maduración, los copépodos provenientes de las muestras tomadas para el crecimiento y supervivencia se observaron diariamente y se registró la proporción de nauplios, copepoditos y adultos. La edad de la primera maduración sexual se definió como el momento en el que se observó la primera hembra con sacos ovígeros y la edad de la población total madura se definió como el momento en que todos los copépodos alcanzaron el estadio adulto (Rhyne *et al.*, 2009). Los copépodos se pueden identificar como machos y hembras a partir del estadio copepodito IV,

cuando el desarrollo de segmentos torácicos es evidente, debido a que en muchas especies de copépodos, incluyendo *P. euryhalinus*, el sexo no es fácilmente distinguible antes de este estadio (Johnson, 1948).

Para evaluar el porcentaje de hembras ovígeras al final del experimento (día 11), de los copépodos preservados se tomó una muestra aleatoria de 100 hembras y se registró el número de hembras ovígeras. Igualmente, para cuantificar la fecundidad, se tomaron 30 hembras ovígeras de las muestras preservadas previamente y se colocaron en forma individual en una solución de hipoclorito de sodio al 5%, se agitaron suavemente para disolver las membranas de los sacos ovígeros y se contó el número total de huevos.

### **2.1.5 Experimento 3. Efecto de la temperatura en cultivo de *Pseudodiaptomus euryhalinus***

De los estanques de cultivo de 450 L mantenidos a  $19.4 \pm 0.5^\circ\text{C}$ , se colectaron  $100 \pm 16.12 \times 10^3$  nauplios y se sembraron en cinco contenedores de 20 L cada uno. La temperatura se incrementó  $1^\circ\text{C} \cdot \text{día}^{-1}$  usando calentadores de vidrio de 250 W (visi-THERM) para aclimatar gradualmente a los copépodos hasta que se alcanzaron las temperaturas de  $19.4 \pm 0.5$ ,  $21.9 \pm 1.0$ ,  $24.2 \pm 0.3$ ,  $27.8 \pm 0.5$  y  $30.1 \pm 0.8^\circ\text{C}$ , utilizadas en los diferentes tratamientos. En estas condiciones, los copépodos se reprodujeron y los nauplios recién eclosionados, con un máximo de 24 h de edad, fueron colectados y sembrados a una densidad de  $500 \text{ nauplios} \cdot \text{L}^{-1}$  en 15 estanques de 46 cm de diámetro y 61 cm de profundidad, con un volumen de 60 L, cada estanque se confeccionó con bolsas de polietileno colocadas dentro de un cilindro de malla de acero. Cada tratamiento tuvo tres repeticiones. El agua de mar usada se filtró a través de cartuchos de 10, 5 y  $1 \mu\text{m}$  y se irradió con luz ultravioleta. Los cultivos fueron provistos de aireación suave y continua. La temperatura de cada una de las unidades experimentales fue controlada por calentadores sumergibles de titanio de 250 vatios. El experimento duró 11 días y los copépodos fueron alimentados con la microalga *Isochrysis* sp. a una concentración constante de  $5.47 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  PSO (equivalente a  $380 \times 10^3 \text{ cél} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). La concentración remanente de alimento se midió diariamente y se

ajustó a la concentración inicial. Diariamente se realizó un recambio del 25% del medio de cultivo (agua de mar y microalgas remanentes), de modo que cada cuatro días se hiciera un recambio del 100% del medio de cultivo, como lo recomiendan Rhyne *et al.* (2009) y Ohs *et al.* (2010).

### 2.1.5.1 Crecimiento y supervivencia

Para cuantificar el crecimiento y la supervivencia de los copépodos, diariamente se tomaron tres muestras de 100 mL de cada estanque, los copépodos se concentraron en tamices de 75  $\mu\text{m}$  y se fijaron en una solución de formalina al 5% en agua de mar, para su posterior recuento y medición. Para cuantificar el crecimiento se realizó el mismo procedimiento utilizado en el experimento 2. La supervivencia se evaluó diariamente y fue corregida tomando en cuenta la mortalidad de los copépodos retirados por la toma diaria de muestras, multiplicando el número de copépodos observados en el tiempo t de acuerdo a Klein-Breteler *et al.* (2004):

$$S = (N_t) * V_{(n-1)} / [(V-v_1) * (V-v_2) * \dots * (V-v_{(n-1)})], \quad (2)$$

Donde,

S= Supervivencia

$N_t$ =Número de copépodos en un instante

V= Volumen de la unidad experimental

v= Volumen de la muestra

n= número de muestreo

### **2.1.5.2 Tiempo de maduración, porcentaje de hembras ovígeras, fecundidad y proporción de sexos**

Para cuantificar el tiempo de maduración, porcentaje de hembras ovígeras y fecundidad, se utilizó el mismo procedimiento empleado en el experimento 2. Para cuantificar la proporción de sexos, se seleccionaron al azar 30 copépodos de las muestras preservadas en el día 11, se identificaron como machos o hembras y se registraron.

### **2.1.6 Experimento 4. Efecto de la temperatura en la producción naupliar total del cultivo de *Pseudodiaptomus euryhalinus***

Para evaluar el efecto de la temperatura en la producción naupliar total, se recolectaron 10 parejas de copépodos maduros (machos y hembras) de los cultivos stock de cada temperatura experimental y se cultivaron a  $21.7 \pm 0.5$ ,  $24.2 \pm 0.3$ ,  $27.2 \pm 0.3$  y  $30.7 \pm 0.6$  °C en tubos de 50 mL, con un volumen útil de cultivo de 40 mL, provistos de aireación suave y alimentados con una ración de *Isochrysis* sp. equivalente a  $5.47 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  PSO. Cada tratamiento tuvo tres repeticiones. Diariamente, los copépodos adultos fueron filtrados a través de una malla de apertura de 125  $\mu\text{m}$  para separarlos de los nauplios producidos, los cuales fueron preservados con una solución de formalina al 5% para su posterior recuento. A continuación, los adultos se resembraron en sus respectivos tubos y sus correspondientes temperaturas con medio de cultivo nuevo. La producción naupliar total se cuantificó por el recuento del número total de nauplios producidos cada 24 h, sumados en un periodo total de 10 días. Al final del experimento (día 10) los copépodos adultos fueron contados para cuantificar la supervivencia.

### **2.1.7 Experimento 5. Selección de dietas microalgales para el cultivo de *Pseudodiaptomus euryhalinus***

Para llevar a cabo una primera selección de las mejores dietas microalgales para el cultivo de *P. euryhalinus*, se evaluó únicamente la supervivencia de los copépodos

cultivados con 9 diferentes dietas microalgales: *Isochrysis* sp. (ISX), *Tetraselmis suecica* (TES), *Chaetoceros muelleri* (CHM), *Rhodomonas salina* (RHS), *Nannochloropsis oculata* (NNO), *Pavlova lutheri* (PLU), *Dunaliella salina* (DUS), *Dunaliella tertiolecta* (DUT) y *Synechococcus* sp. (SYX), a una concentración de  $10.94 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  PSO, tomando como referencia el doble de la biomasa de *Isochrysis* sp. utilizada por Puello-Cruz *et al.* (2009), para evitar una sub alimentación con las demás especies de microalgas (debido a las diferencias en tamaño y peso). Para este experimento se cultivaron nauplios recién eclosionados (con un máximo de 24 horas de edad) y se alimentaron con cada una de las dietas de microalgas durante 11 días. Cada tratamiento se realizó por triplicado. Los copépodos se cultivaron empleando el mismo protocolo y en las mismas condiciones que en el experimento 2, pero con una temperatura de  $24.3\pm 1.2^\circ\text{C}$ . Para evaluar la supervivencia se siguió el mismo procedimiento descrito en el experimento 2.

#### **2.1.8 Experimento 6. Efecto de cinco diferentes dietas microalgales en el cultivo de *Pseudodiaptomus euryhalinus***

Con una selección de cinco dietas microalgales utilizadas en el experimento 5, se evaluó su efecto sobre el crecimiento, supervivencia, porcentaje de hembras ovígeras, fecundidad, composición bioquímica (proteínas, carbohidratos, lípidos totales y ácidos grasos) de *P. euryhalinus*. Para este experimento, se cultivaron nauplios recién eclosionados (con un máximo de 24 horas de edad) con cada una de las dietas monoalgales.

Los copépodos se sembraron a una densidad de  $500 \text{ nauplios}\cdot\text{L}^{-1}$  a  $24\pm 1^\circ\text{C}$  y se empleó el mismo protocolo que en el experimento 3. Durante los 11 días que duró el cultivo, los nauplios se alimentaron con la microalga correspondiente a cada tratamiento, con una ración inicial de  $5.47 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  PSO, que se incrementó diariamente en forma proporcional hasta  $10.94 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  PSO al día 8, a partir de este día se mantuvo esa concentración hasta que finalizó el experimento y *P. euryhalinus* alcanzó el estadio adulto. La concentración de alimento fue incrementada gradualmente debido a que los

copépodos aumentan su tasa de ingestión diariamente. La ración de alimento se definió a partir de los resultados de Puello-Cruz *et al.* (2009) para *P. euryhalinus*. Para evaluar el crecimiento, la supervivencia, el porcentaje de hembras ovígeras y la fecundidad se utilizó el mismo procedimiento que en el experimento 3.

#### **2.1.8.1 Peso seco y composición bioquímica de *Pseudodiaptomus euryhalinus* y de dietas microalgales**

Durante el experimento anterior (6), se realizaron tres muestreos para cuantificar el peso seco total y orgánico (PST y PSO), proteínas, carbohidratos, lípidos totales y ácidos grasos, en tres momentos del ciclo de vida de *P. euryhalinus*: en el estadio naupliar, copepodito y adulto. Al mismo tiempo se cuantificaron estas variables en las dietas microalgales con el objetivo de compararlas con el perfil bioquímico de los copépodos. Para cada uno de los análisis se tomaron nauplios (10,000±575 organismos) en el día 1, copepoditos (1500±148 organismos) en el día 6 y adultos (250 parejas de organismos, machos y hembras, extraídos individualmente) al final del cultivo, en el día 11. Cada análisis se hizo por triplicado.

#### **2.1.8.2 Cuantificación del peso seco (total y orgánico)**

Para cuantificar el peso seco de las microalgas se filtraron 50 mL de cada especie y para cuantificar el de los copépodos se utilizó la misma cantidad empleada para los análisis bioquímicos, ambos se filtraron a través de filtros Whatman de fibra de vidrio (GF/C de 4.7 cm de diámetro) previamente incinerados (para eliminar la posible materia orgánica presente). Tanto las microalgas como los copépodos, una vez filtrados fueron lavados con formiato de amonio al 3% para eliminar las sales, posteriormente se colocaron en una estufa a 70°C hasta obtener el peso seco constante, enseguida se colocaron en un desecador por 20 minutos y se pesaron en una balanza analítica para obtener el PST. Posteriormente, los filtros con las muestras se incineraron en una mufla a 490°C, por 12 horas y luego se pesaron para obtener el peso de cenizas y por diferencia entre el PST y el peso de cenizas, se obtuvo el PSO (Sorokin, 1973).

### 2.1.8.3 Análisis de proteínas, carbohidratos y lípidos totales

Para el análisis de proteínas, las muestras de microalgas (10-20 mL) y de copépodos se lavaron con formiato de amonio y se almacenaron a -20°C hasta su análisis. Para este análisis se siguió el protocolo descrito por Lowry *et al.* (1951). La curva estándar de concentración-absorbancia se preparó con sero-albúmina (BSA), finalmente se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 750 nm.

Para el análisis de los carbohidratos, se hizo la extracción mediante el método de Whyte (1987), usando como agente extractor H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M, y la cuantificación se realizó por el método de Dubois *et al.* (1956), se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a 485 nm. La curva estándar se preparó con glucosa anhidra.

Para la extracción de lípidos totales de las muestras de copépodos y microalgas, se utilizó el método de Bligh y Dyer (1959), con una mezcla de cloroformo-metanol 1:2 (v/v). La cuantificación se realizó según el método de Pande *et al.* (1963). La curva estándar se preparó con tripalmitina.

### 2.1.8.4 Análisis de ácidos grasos

Para el análisis de los ácidos grasos de las dietas de microalgas y de los copépodos, las muestras obtenidas se almacenaron a -70°C hasta que se realizó su análisis. La extracción de los lípidos se realizó como se describió anteriormente. La fase lipídica se secó con nitrógeno gaseoso, posteriormente se sometió a metanólisis con 5% de HCl en metanol durante 2.5 horas en un termo baño a 85°C (Sato y Murata, 1988). La extracción de los ácidos grasos se realizó con hexano grado HPLC y la determinación por medio de cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) Agilent. La columna utilizada en el análisis fue de tipo capilar, de sílice fundido, de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro y 0.25 µm de espesor de película (Omegawax TM 250, SUPELCO 2-4136). El método del cromatógrafo fue: 1 µL de volumen de inyección, He

como gas transportador, pureza del 99.997 %; flujo de He en la columna: 0.9 mL·min<sup>-1</sup>); inyección: sin división (splitless); temperatura del inyector: 250°C; temperatura del detector; 260°C. El programa del cromatógrafo fue: temperatura inicial del horno: 110°C 3 min; incremento de 30°C/min hasta 165°C. Se mantuvo a esa temperatura 2 min y posteriormente se incrementó a razón de 2.2°C hasta 209°C. Se mantuvo a esa temperatura 35 min. El método de adquisición de espectros fue: retardo del solvente: 4.5 min; rango de masas: 45 a 450 uma; tiempo entre barridos 0.5 min.

Previamente se realizó la curva de calibración utilizando una mezcla comercial de 37 ácidos grasos metil esterificados (Sigma 47885-U) en un rango de concentración de 20 a 100 µg·mL<sup>-1</sup>. Los ácidos grasos se identificaron al comparar los tiempos de retención de los picos de las muestras, con los obtenidos por la mezcla de la curva de calibración. Dicha identificación se confirmó al identificar los espectros de masas de los ácidos grasos de las muestras con respecto a los espectros de masas contenidos en la biblioteca de espectros de masas 75NBSK y NIST98.

### **2.1.9 Experimento 7. Efecto de la dieta en la producción naupliar total de *Pseudodiaptomus euryhalinus***

Para evaluar el efecto de las cinco diferentes dietas monoalgales en la producción naupliar total, se utilizó el mismo procedimiento que en el experimento 4, con una ración de 10.94 µg·mL<sup>-1</sup> PSO de la dieta microalgal correspondiente y una temperatura de 24°C. La duración del experimento fue de 10 días.

## 2.2 Cultivo de microalgas

### 2.2.1 Mantenimiento de las cepas

Las especies de microalgas que se utilizaron en este trabajo *Isochrysis* sp., *Tetraselmis suecica*, *Chaetoceros muelleri*, *Rhodomonas salina*, *Nannochloropsis oculata*, *Pavlova lutheri*, *Dunaliella salina*, *Dunaliella tertiolecta* y *Synechococcus* sp. se obtuvieron de la colección de microalgas del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). Las cepas se mantuvieron en matraces Erlenmeyer con medio de cultivo “f/2” de Guillard y Ryther (1962) y en condiciones controladas de temperatura ( $20\pm 1^\circ\text{C}$ ), salinidad ( $35\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y luz continua.

### 2.2.2 Cultivo de inóculos

La microalga *Isochrysis* sp. que se usó para mantener la cepa y el cultivo madre de *P. euryhalinus* se cultivó en un sistema continuo (con una tasa de dilución del 20%), en bolsas de polietileno de 288 L, con medio f/2 (Guillard y Rhyter, 1962), provistos de luz continua ( $150\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), temperatura de  $19.4^\circ\text{C}$ , aireación constante e inyección de  $\text{CO}_2$  para mantener el pH entre 8.0 y 8.5.

### 2.2.3 Cultivos experimentales

Las 9 especies de microalgas que se usaron como alimento para los cultivos experimentales de *P. euryhalinus* se cultivaron en un sistema semicontinuo en botellones de 19 L, con 15 L de medio “f/2” (Guillard y Rhyter, 1962), luz continua ( $350\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-2}$ ), temperatura de  $22\pm 1^\circ\text{C}$ , el pH entre 8 y 8.5 con inyección de  $\text{CO}_2$ . La tasa de dilución diaria fue de 20% para *Isochrysis* sp., *T. suecica*, *D. salina*, *D. tertiolecta*, *R. salina*, *P. lutheri* y *C. muelleri*; de 25% para *N. oculata* y del 30% para *Synechococcus* sp. y se cosecharon en su fase de máximo crecimiento exponencial. Para evaluar la cinética de crecimiento de las microalgas, se hicieron conteos cada 24 h, usando una cámara de Neubauer con la ayuda de un microscopio compuesto (Zeiss Primo Star).

### **2.2.3 Tratamiento del agua de mar**

Para el mantenimiento de las cepas y para los cultivos en matraces Fernbach, se utilizó agua de mar proveniente del sistema cerrado del laboratorio húmedo del Departamento de Acuicultura del CICESE, se filtró a través de una serie de cartuchos de 10, 5 y 1  $\mu\text{m}$ , se irradió con luz ultravioleta y se esterilizó en una autoclave a 121°C y a una presión de 1.05 kg  $\text{cm}^{-2}$  durante 15 minutos. Para los cultivos en garrafones de 20 L, el agua fue desinfectada empleando la técnica recomendada por Hemerick (1973), que consiste en añadir hipoclorito de sodio al 5% al agua de mar (3  $\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$ ), dejando actuar al cloro durante 24 horas, para posteriormente neutralizarlo con 150 mg de tiosulfato de sodio por litro de agua y con aireación profusa. El agua de mar utilizada en las columnas de 288 L se pasó por filtros de cartucho de 10, 5 y 1  $\mu\text{m}$ , posteriormente se irradió con luz ultravioleta y finalmente se adicionó ozono.

### **2.3 Análisis estadístico**

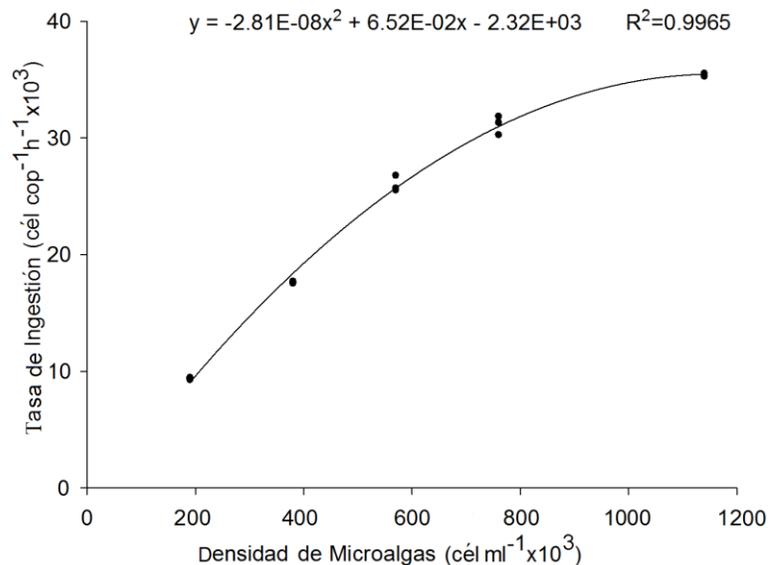
El diseño experimental utilizado en los diferentes experimentos fue completamente aleatorizado, empleando un diseño de  $X \times 3$  (Donde X se refiere a los tratamientos y 3 se refiere al número de repeticiones).

Los datos obtenidos fueron sometidos a pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, para contrastar las diferencias del crecimiento, supervivencia, fecundidad, porcentaje de hembras ovígeras, maduración y composición de HUFA, entre los copépodos alimentados con las diferentes dietas monoalgales. Los valores porcentuales de supervivencia se transformaron con la función arcoseno (Zar, 1984). En los casos en los que se encontraron diferencias significativas se realizó una prueba de comparaciones múltiples de Duncan. Todos los análisis estadísticos se hicieron con un nivel de significancia de 0.05, mediante el programa de cómputo Statistica, versión 7 para Windows.

### 3. Resultados

#### 3.1 Experimento 1. Tasa de Ingestión de *Pseudodiaptomus euryhalinus* con diferentes concentraciones de alimento

La tasa de ingestión ( $I_R$ ) de *P. euryhalinus* aumentó en forma directamente proporcional a la concentración de *Isochrysis* sp., hasta llegar a un punto asintótico en la concentración de  $16.41 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  PSO ( $1140 \times 10^3 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). En el intervalo de concentraciones de  $2.74$  a  $10.94 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  PSO ( $190$  a  $760 \times 10^3 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) hubo un fuerte incremento en la  $I_R$ , de  $0.13$  a  $0.45 \mu\text{g PSO copépedo}^{-1}\cdot\text{hora}^{-1}$  ( $9.01$  a  $31.20 \times 10^3 \text{ cél}\cdot\text{copépedo}^{-1}\cdot\text{hora}^{-1}$ ). Con concentraciones de  $10.94$  a  $16.41 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  PSO ( $760$  a  $1140 \times 10^3 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), la  $I_R$  sólo incrementó de  $0.45$  a  $0.51 \mu\text{g PSO copépedo}^{-1}\cdot\text{hora}^{-1}$  ( $31.20$  a  $35.35 \times 10^3 \text{ cél}\cdot\text{copépedo}^{-1}\cdot\text{hora}^{-1}$ ) (Figura 3).



**Figura 3. Tasa de Ingestión ( $I_R$ ) de *Pseudodiaptomus euryhalinus* con diferentes concentraciones de *Isochrysis* sp. (Datos ajustados a una función polinomial de segundo orden).**

El porcentaje de sedimentación de *Isochrysis* sp. en las unidades experimentales, con las mismas condiciones que en los cultivos de copéodos, fue de 3.4 a 6.1%. En los cultivos sin aireación, la sedimentación de las microalgas fue de 26.6 a 30.9% (Tabla 1).

Tabla 1. Porcentaje de sedimentación de *Isochrysis* sp. con y sin aireación

Concentración de <i>Isochrysis</i> sp. (cél·mL <sup>-1</sup> )	Sedimentación de la microalga (%)	
	Con aireación	Sin aireación
190x10 <sup>3</sup>	3.4	26.6
380x10 <sup>3</sup>	3.7	27.2
570x10 <sup>3</sup>	4.5	25.1
760x10 <sup>3</sup>	4.1	28.3
1140x10 <sup>3</sup>	6.1	30.9

### 3.2 Experimento 2. Efecto de la concentración de alimento en el cultivo de *Pseudodiaptomus euryhalinus*

Ninguno de los parámetros de cultivo fue afectado significativamente por la concentración de alimento en el día 11 de cultivo ( $p>0.05$ ) (Tabla 2 y 3). La supervivencia final varió entre 76.2 y 82%, las mortalidades más altas (del 7 al 9%) ocurrieron en el segundo día de cultivo en todos los tratamientos (Figura 4).

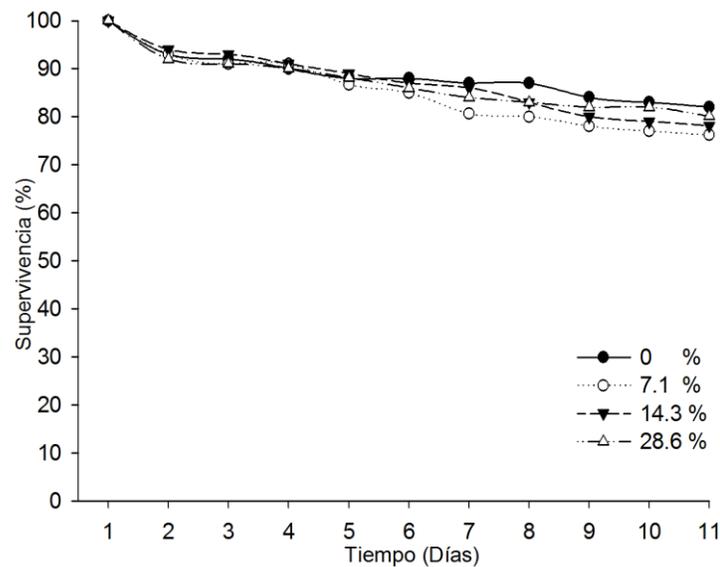


Figura 4. Supervivencia (%) de *Pseudodiaptomus euryhalinus* por efecto de diferentes incrementos en la ración de *Isochrysis* sp. como alimento (0, 7.1, 14.3 y 28.6%). Valores promedio.

Con respecto al crecimiento de los copépodos, en el día 11 de cultivo la longitud del prosoma de las hembras midió entre 857 y 891  $\mu\text{m}$ , (Figura 5) y el de los machos entre 510 y 514  $\mu\text{m}$  (Figura 6).

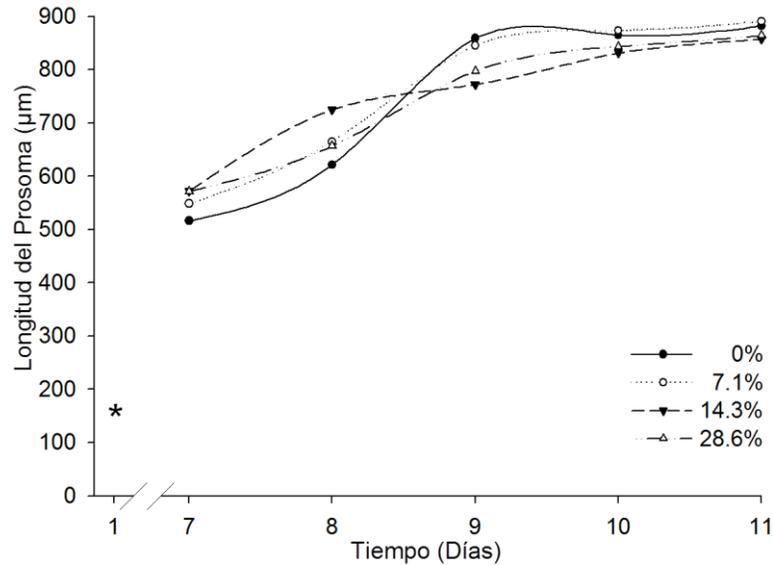


Figura 5. Crecimiento de hembras de *Pseudodiaptomus euryhalinus*, cultivados a 24.4°C con diferentes incrementos en la ración de *Isochrysis* sp. como alimento (0, 7.1, 14.3 y 28.6%). El asterisco indica la longitud del prosoma de los nauplios recién eclosionados con un máximo de 24 h de edad. Valores promedio.

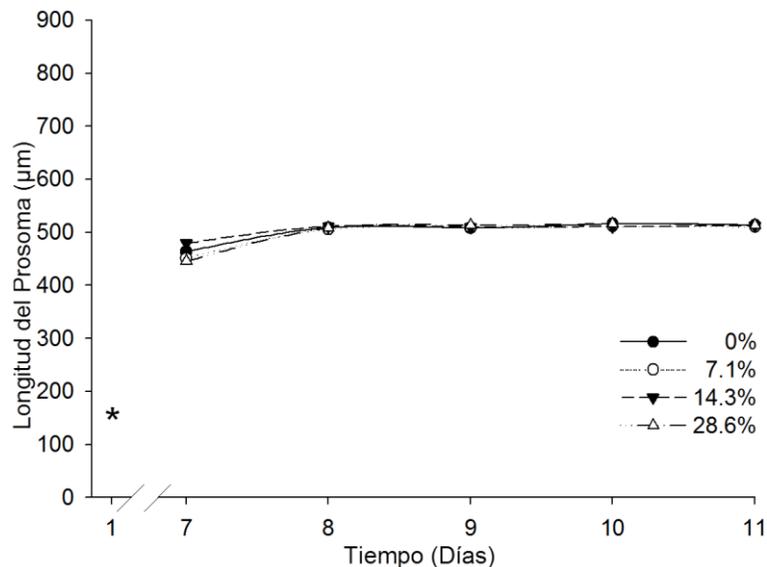


Figura 6. Crecimiento de machos de *Pseudodiaptomus euryhalinus*, cultivados a 24.4°C con diferentes incrementos en la ración de *Isochrysis* sp. como alimento (0, 7.1, 14.3 y 28.6%). El asterisco indica la longitud del prosoma de los nauplios recién eclosionados con un máximo de 24 h de edad. Valores promedio.

La primera maduración de los copépodos ocurrió alrededor del día 8 (Tabla 3), mientras que la población total madura, cuando todos los copépodos fueron identificados como machos y hembras, se registró alrededor del día 10 de cultivo. La fecundidad varió entre 37.1 a 40.5 huevos por hembra, mientras que el porcentaje de hembras ovígeras varió entre 59.7 y 69.0%.

**Tabla 2. Supervivencia (%) y longitud del prosoma ( $\mu\text{m}$ ) de *Pseudodiaptomus euryhalinus* en el día 11 de cultivo, alimentado con diferentes concentraciones de *Isochrysis* sp. y cultivados a 24.4°C. Media  $\pm$  Desviación estándar.**

Concentración celular final de <i>Isochrysis</i> sp. (cel·ml <sup>-1</sup> )	Supervivencia (%)	Longitud del Prosoma ( $\mu\text{m}$ )	
		Machos	Hembras
380x10 <sup>3</sup>	82.0 $\pm$ 6.9	514 $\pm$ 8.1	882 $\pm$ 56.0
570 x10 <sup>3</sup>	76.2 $\pm$ 7.2	510 $\pm$ 14.4	891 $\pm$ 37.6
760 x10 <sup>3</sup>	78.1 $\pm$ 6.7	512 $\pm$ 11.9	857 $\pm$ 75.7
1140 x10 <sup>3</sup>	80.1 $\pm$ 6.2	513 $\pm$ 15.5	863 $\pm$ 56.0

**Tabla 3. Primera maduración (días), población total madura (días), hembras ovígeras (%) y fecundidad (huevos/hembra) de *Pseudodiaptomus euryhalinus* en el día 11 de cultivo, alimentado con diferentes concentraciones de *Isochrysis* sp. y cultivados a 24.4°C. Media  $\pm$  Desviación estándar.**

Concentración celular final de <i>Isochrysis</i> sp. (cél·ml <sup>-1</sup> )	Primera maduración (Días)	Población total madura (Días)	Hembras ovígeras (%)	Fecundidad (Huevos/hembra)
380x10 <sup>3</sup>	8.3 $\pm$ 0.6	10.7 $\pm$ 0.6	63.3 $\pm$ 7.6	39.8 $\pm$ 9.41
570 x10 <sup>3</sup>	8.3 $\pm$ 0.6	10.3 $\pm$ 0.6	69.0 $\pm$ 6.1	39.4 $\pm$ 10.8
760 x10 <sup>3</sup>	8.0 $\pm$ 0.0	10.0 $\pm$ 0.0	62.0 $\pm$ 6.0	40.5 $\pm$ 10.9
1140 x10 <sup>3</sup>	8.7 $\pm$ 0.6	10.3 $\pm$ 0.6	59.7 $\pm$ 7.8	37.1 $\pm$ 10.4

### 3.3 Experimento 3. Efecto de la temperatura en cultivo de *Pseudodiaptomus euryhalinus*

La temperatura tuvo un efecto significativo en todos los parámetros de cultivo evaluados ( $p < 0.05$ ), excepto en la proporción de sexos (Tabla 4).

**Tabla 4. Supervivencia y longitud del prosoma de *Pseudodiaptomus euryhalinus* en el día 11 de cultivo con diferentes temperaturas y alimentado con *Isochrysis* sp. a una concentración de  $380 \times 10^3$  cél mL<sup>-1</sup>. Media  $\pm$  Desviación estándar.**

Temperatura (°C)	Supervivencia (%)	Longitud del prosoma ( $\mu\text{m}$ )	
		Machos	Hembras
19.4 $\pm$ 0.5	67.0 $\pm$ 13.9 <sup>a</sup>	520 $\pm$ 15.4 <sup>a</sup>	751 $\pm$ 63.5 <sup>b</sup>
21.9 $\pm$ 1.0	71.3 $\pm$ 11.6 <sup>ac</sup>	513 $\pm$ 10.5 <sup>ab</sup>	710 $\pm$ 79.1 <sup>cb</sup>
24.2 $\pm$ 0.3	80.2 $\pm$ 11.4 <sup>bc</sup>	504 $\pm$ 8.5 <sup>b</sup>	815 $\pm$ 77.8 <sup>a</sup>
27.8 $\pm$ 0.5	64.0 $\pm$ 11.0 <sup>a</sup>	506 $\pm$ 16.1 <sup>b</sup>	682 $\pm$ 101.2 <sup>c</sup>
30.1 $\pm$ 0.8	58.4 $\pm$ 14.3 <sup>a</sup>	486 $\pm$ 18.2 <sup>c</sup>	684 $\pm$ 79.3 <sup>c</sup>

La supervivencia fue afectada significativamente por la temperatura ( $p < 0.01$ ). La mayor supervivencia se registró a 24.2°C, con 80.2% y a 21.9°C con 71.3% (Figura 7).

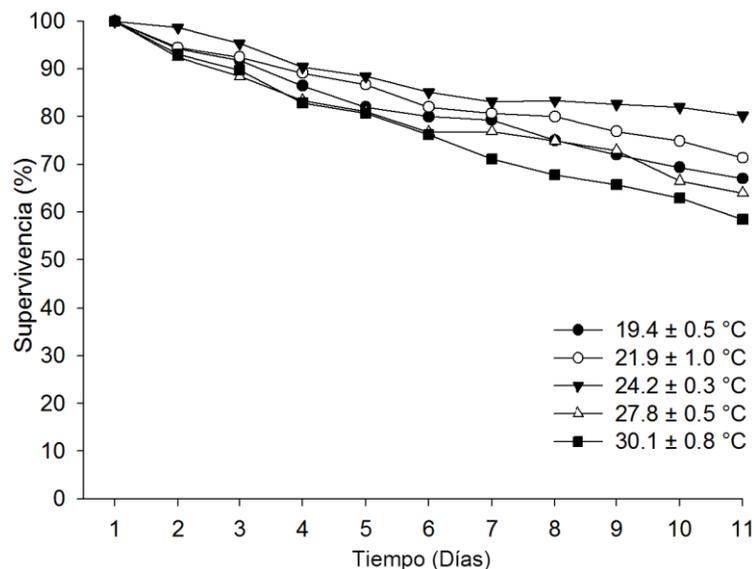


Figura 7. Supervivencia (%) de *Pseudodiaptomus euryhalinus* por efecto de diferentes temperaturas. Valores promedio.

La longitud del prosoma de los copépodos machos y hembras fue afectado significativamente por la temperatura ( $p < 0.0001$ ). El crecimiento de las hembras fue mayor a  $24.2^{\circ}\text{C}$  ( $815\ \mu\text{m}$  de la longitud del prosoma), en comparación con las temperaturas extremas superiores e inferiores (Tabla 4, Figura 8). El crecimiento de los machos fue menor que las hembras, en una relación inversa con respecto a la temperatura. Al día 11, a  $19.4$  y  $21.9^{\circ}\text{C}$  alcanzaron la mayor longitud del prosoma con  $520$  y  $513\ \mu\text{m}$  respectivamente (Figura 9), aunque las diferencias fueron menores del 7% entre las temperaturas extremas ( $19.4$  y  $30.1^{\circ}\text{C}$ ).

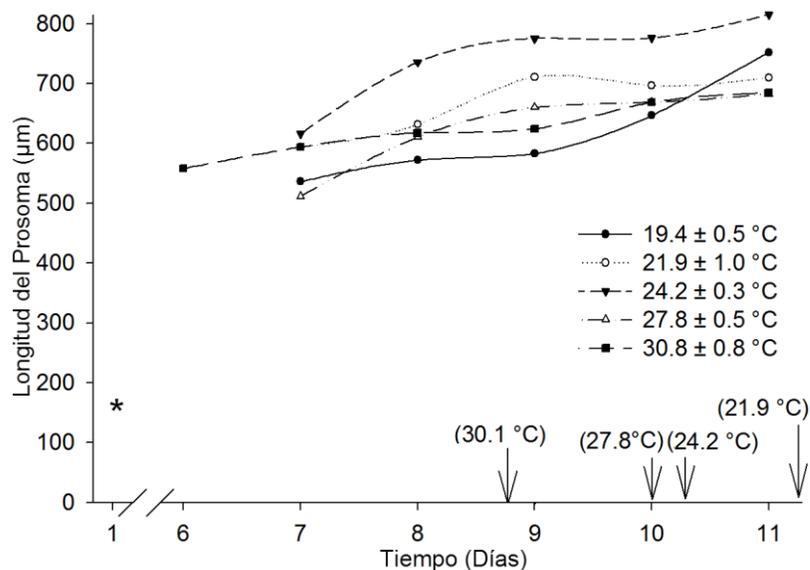
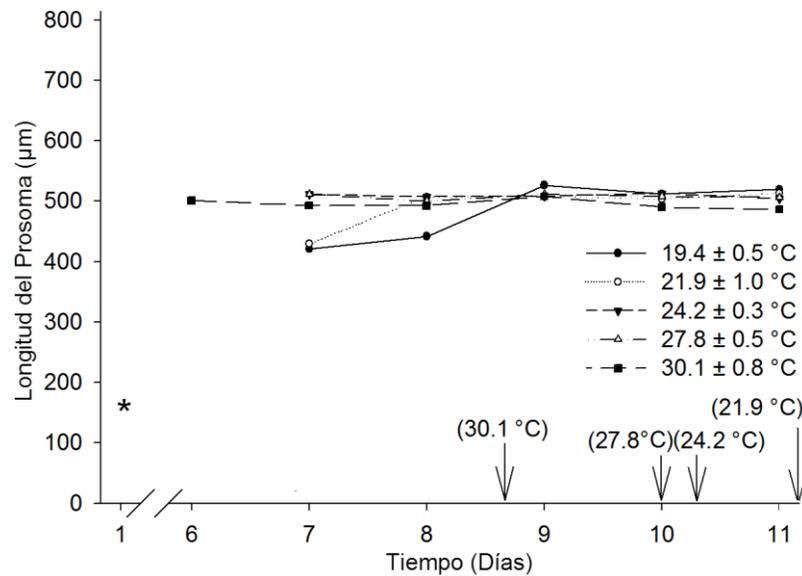


Figura 8. Crecimiento de hembras de *Pseudodiaptomus euryhalinus* cultivadas a  $19.4$ ,  $21.9$ ,  $24.2$ ,  $27.8$  y  $30.1^{\circ}\text{C}$  y alimentadas con *Isochrysis* sp. Las flechas indican el tiempo en que se alcanzó la población total madura. El asterisco indica la longitud del prosoma de los nauplios recién eclosionados con una edad máxima de 24 h. Valores promedio.



**Figura 9.** Crecimiento de machos de *Pseudodiaptomus euryhalinus* cultivados a 19.4, 21.9, 24.2, 27.8 y 30.1°C y alimentadas con *Isochrysis* sp. Las flechas indican el tiempo en que se alcanzó la población total madura. El asterisco indica la longitud del prosoma de los nauplios recién eclosionados con una edad máxima de 24 h. Valores promedio.

El desarrollo sexual de los copépodos fue afectado por la temperatura en una relación inversa (Tabla 5). La primera maduración ocurrió a los días 7 (a 30.1°C), 8 (a 27.8 y 24.2°C), 9 (a 21.9°C) y 10 (a 19.4°C). La población madura fue identificada en los días 8 (30.1°C), 10 (a 27.8 y 24.2°C) y 11 (a 21.9°C) (Figuras 8 y 9), mientras que en los copépodos cultivados a 19.4°C, sólo el 83% de los copépodos fueron diferenciados como machos o hembras en el día 11 de cultivo.

En cuanto a la proporción sexual, no se observó un efecto significativo de la temperatura ( $p > 0.05$ ). La proporción fue cercana a 1:1 en todas las temperaturas.

De igual forma, la fecundidad fue afectada significativamente por la temperatura ( $p < 0.0001$ ) y estuvo en un intervalo de 19.7 a 38.9 huevos por hembra, con las mayores fecundidades a 27.8 y 24.2°C con 38.9 y 36.7 huevos por hembra, respectivamente. También el porcentaje de hembras ovígeras fue afectado por la temperatura

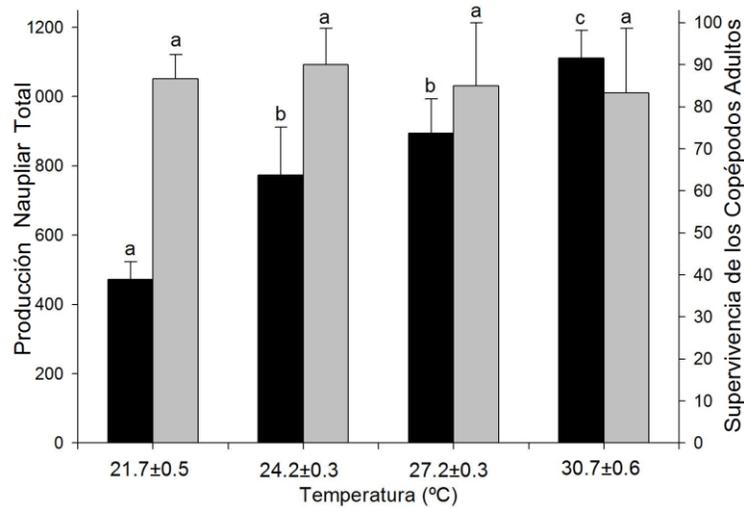
( $p < 0.0001$ ) estando en un intervalo de 25.3 a 68.7%, con el mayor porcentaje de hembras ovígeras a 27.8, 24.2 y 30.1°C, con 68.7, 65.0 y 61.3%, respectivamente.

**Tabla 5. Primera maduración (días), población total madura (días), hembras ovígeras (%), fecundidad (huevos/hembra) y proporción de sexos de *Pseudodiaptomus euryhalinus* en el día 11 de cultivo con diferentes temperaturas y alimentado con *Isochrysis* sp. a una concentración de  $380 \times 10^3$  cél mL<sup>-1</sup>. Media  $\pm$  Desviación estándar.**

Temperatura (°C)	Primera maduración (Días)	Población total madura (Días)	Hembras ovígeras (%)	Fecundidad (huevos/hembra)	Proporción de sexos M:F
19.4 $\pm$ 0.5	10.3 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	NO	25.3 $\pm$ 7.8 <sup>a</sup>	19.7 $\pm$ 8.0 <sup>a</sup>	0.92 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>
21.9 $\pm$ 1.0	9.0 $\pm$ 0.0 <sup>b</sup>	11.3 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	48.3 $\pm$ 7.4 <sup>b</sup>	29.7 $\pm$ 10.6 <sup>b</sup>	1.06 $\pm$ 0.42 <sup>a</sup>
24.2 $\pm$ 0.3	8.3 $\pm$ 0.6 <sup>c</sup>	10.3 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup>	65.0 $\pm$ 5.3 <sup>c</sup>	36.7 $\pm$ 12.4 <sup>c</sup>	0,89 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>
27.8 $\pm$ 0.5	8.0 $\pm$ 0.0 <sup>c</sup>	10.0 $\pm$ 0.0 <sup>b</sup>	68.7 $\pm$ 6.0 <sup>c</sup>	38.9 $\pm$ 11.7 <sup>c</sup>	0,78 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>
30.1 $\pm$ 0.8	7.3 $\pm$ 0.6 <sup>d</sup>	8.7 $\pm$ 0.6 <sup>c</sup>	61.3 $\pm$ 6.1 <sup>c</sup>	30.9 $\pm$ 10.9 <sup>b</sup>	0,89 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>

### 3.4 Experimento 4. Efecto de la temperatura en la producción naupliar total del cultivo de *Pseudodiaptomus euryhalinus*

El número total de nauplios producidos durante 10 días de cultivo fue afectado por la temperatura con una relación directamente proporcional. ( $p < 0.0001$ ). La mayor cantidad de nauplios se produjeron a 30.7°C (1111 nauplios), seguido por 27.2°C (895 nauplios) y 24.2°C (774 nauplios), la menor cantidad de nauplios se produjeron a 21.7°C (473 nauplios)). La supervivencia de los adultos no fue afectada por la temperatura ( $p > 0.05$ ), los valores obtenidos estuvieron entre 83.3 a 90.0% (Figura 10).



**Figura 10.** Producción naupliar total y supervivencia de adultos de *Pseudodiaptomus euryhalinus* a cuatro diferentes temperaturas durante 10 días de cultivo. En negro se señala la producción total naupliar. En gris se señala la supervivencia de los adultos. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre los tratamientos. Valores promedio y desviación estándar.

### 3.5 Experimento 5. Selección de dietas microalgales para el cultivo de *Pseudodiaptomus euryhalinus*

La supervivencia de *P. euryhalinus* fue afectada significativamente por las dietas de microalgas en el día 11 de cultivo ( $p < 0.0001$ ). Las mayores supervivencias se observaron en los copépodos alimentados con las microalgas CHM, ISX, TES y RHS, con 83.3, 81.5, 78.3 y 78.1%, respectivamente, seguida por NNO y PLU, con 45.1 y 35.2%, respectivamente. Las supervivencias más bajas se obtuvieron con las microalgas DUS, DUT y SYX, con 3.3, 6.0 y 8.6%, en las cuales, desde el día 2 se observaron decrementos muy pronunciados (Figura 11).

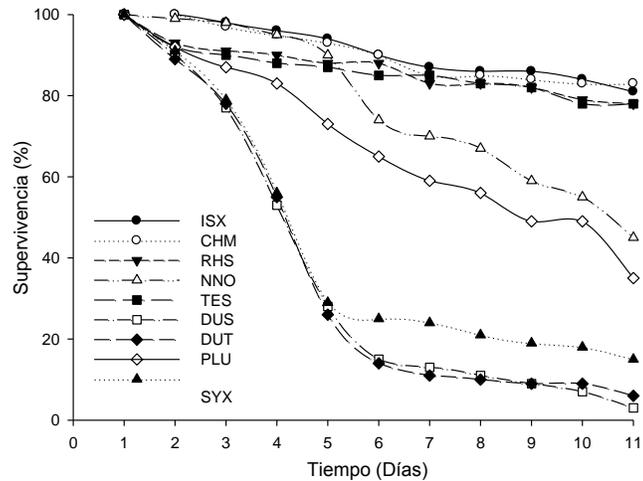


Figura 11. Supervivencia de *Pseudodiaptomus euryhalinus* por efecto de diferentes dietas microalgales. ISX= *Isochrysis* sp, CHM= *Chaetoceros muelleri*, RHS= *Rhodomonas salina*, NNO= *Nannochloropsis oculata*, TES= *Tetraselmis suecica*, DUS= *Dunaliella salina*, DUT= *Dunaliella tertiolecta* y PLU= *Pavlova lutheri*.

### 3.6 Experimento 6. Efecto de cinco diferentes dietas microalgales en el cultivo de *Pseudodiaptomus euryhalinus*.

Las dietas monoalgales tuvieron un efecto significativo en todos los parámetros de cultivo evaluados ( $p < 0.05$ ) (Tabla 6). La supervivencia de los copépodos fue afectada significativamente por las dietas de microalgas ( $p < 0.0001$ ). La mayor supervivencia se observó en los copépodos alimentados con las microalgas ISX y CHM, con 73.7 y 63.0%, respectivamente. Le siguieron TES y RHS, sin diferencias significativas entre ellas, con  $63.0 \pm 8.3$  y 60.2%, respectivamente. La menor supervivencia se observó en los copépodos alimentados con NNO, con 19.3% (Figura 12).

Tabla 6. Supervivencia (%) y longitud del prosoma ( $\mu\text{m}$ ) de *Pseudodiaptomus euryhalinus* en el día 11 de cultivo con diferentes dietas monoalgales. (ISX= *Isochrysis* sp., TES= *Tetraselmis suecica*, CHM= *Chaetoceros muelleri*, RHS= *Rhodomonas salina*, NNO= *Nannochloropsis oculata*), NO=no observado. Superíndices diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Dieta	Supervivencia (%)	Longitud del prosoma ( $\mu\text{m}$ )	
		Machos	Hembras
ISX	73.7 $\pm$ 10.6 <sup>a</sup>	519 $\pm$ 17.9 <sup>a</sup>	929 $\pm$ 52 <sup>a</sup>
TES	63.0 $\pm$ 8.3 <sup>b</sup>	507 $\pm$ 13.2 <sup>b</sup>	864 $\pm$ 51 <sup>b</sup>
CHM	75.8 $\pm$ 11.9 <sup>a</sup>	502 $\pm$ 5.9 <sup>b</sup>	836 $\pm$ 33 <sup>b</sup>
RHS	60.2 $\pm$ 9.17 <sup>b</sup>	502 $\pm$ 10.1 <sup>b</sup>	824 $\pm$ 37 <sup>b</sup>
NNO	19.3 $\pm$ 6.1 <sup>c</sup>	483 $\pm$ 8.9 <sup>c</sup>	688 $\pm$ 77 <sup>c</sup>

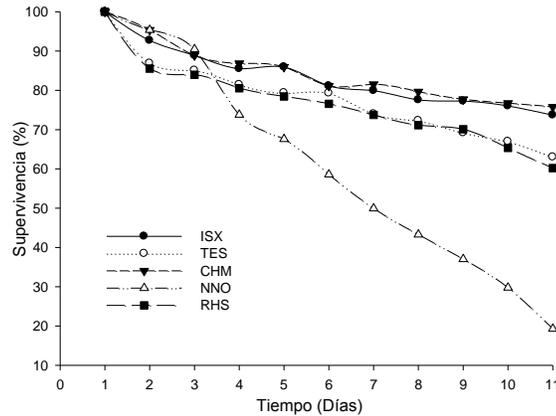


Figura 12. Supervivencia (%) de *Pseudodiaptomus euryhalinus* por efecto de diferentes dietas microalgales. ISX= *Isochrysis* sp., TES= *Tetraselmis suecica*, CHM= *Chaetoceros muelleri*, NNO= *Nannochloropsis oculata* y RHS= *Rhodomonas salina*.

El crecimiento (longitud del prosoma) de los copépodos fue más alto con la dieta ISX ( $p < 0.0001$ ), los machos alcanzaron una longitud de 519  $\mu\text{m}$  y las hembras 929  $\mu\text{m}$ . Las dietas TES, CHM y RHS no tuvieron un efecto significativo en la longitud de los copépodos, los machos alcanzaron de 502 a 507  $\mu\text{m}$  y las hembras de 824 a 864  $\mu\text{m}$ . El menor crecimiento se observó en los copépodos alimentados con NNO, con 483 y 631  $\mu\text{m}$  para machos y hembras respectivamente (Figuras 13 y 14).

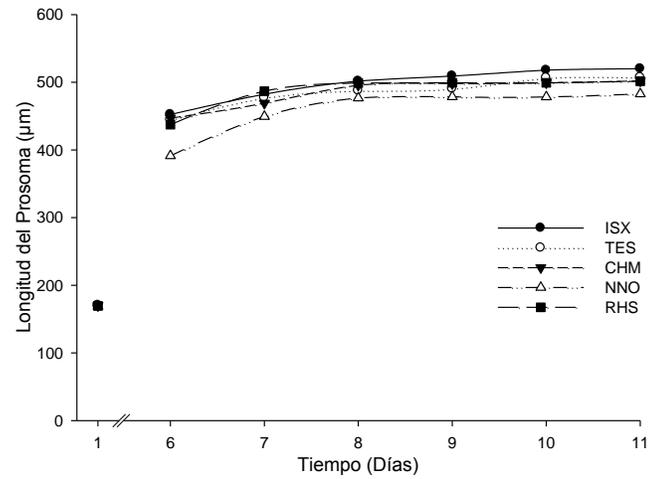


Figura 13. Crecimiento (longitud del prosoma en  $\mu\text{m}$ ) de machos de *Pseudodiptomus euryhalinus* cultivados con diferentes dietas monoalgales (ISX= *Isochrysis* sp., TES= *Tetraselmis suecica*, CHM= *Chaetoceros muelleri*, NNO= *Nannochloropsis oculata* y RHS= *Rhodomonas salina*). El asterisco indica la longitud del prosoma de los nauplios recién eclosionados con una edad máxima de 24 h.

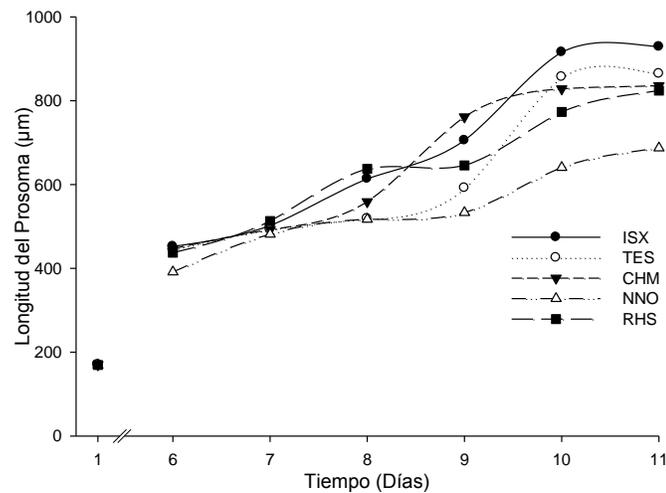


Figura 14. Crecimiento (longitud del prosoma en  $\mu\text{m}$ ) de hembras de *Pseudodiptomus euryhalinus* cultivados con diferentes dietas monoalgales. El asterisco indica la longitud del prosoma de los nauplios recién eclosionados con una edad máxima de 24 h. ISX= *Isochrysis* sp., TES= *Tetraselmis suecica*, CHM= *Chaetoceros muelleri*, NNO= *Nannochloropsis oculata* y RHS= *Rhodomonas salina*.

En el desarrollo sexual (primera maduración) de los copépodos alimentados con las microalgas ISX, TES, CHM y RHS no se observaron diferencias significativas (Tabla 7). La primera maduración ocurrió entre 8.3 y 9.0 días, mientras que con NNO, la primera maduración fue más tardía, con 10.3 días. Con relación al tiempo de la edad de la población madura, no hubieron diferencias significativas en los organismos alimentados con las dietas ISX, TES, CHM y RHS, que se registró entre los 10.3 y 11.0 días. Con NNO no se observó la población madura en el periodo de 11 días.

El porcentaje de hembras ovígeras fue afectado significativamente por la dieta ( $p < 0.0001$ ), los mayores porcentajes se observaron con las dietas ISX, TES y CHM, con 66.7, 61.3 y 63.7%, respectivamente. El menor porcentaje de hembras ovígeras (19.0%) se observó al alimentar a los copépodos con NNO. De igual forma, la fecundidad fue afectada significativamente por la dieta ( $p < 0.0001$ ), observándose la mayor cantidad de huevos producidos en las hembras alimentadas con ISX, TES y CHM, contándose 42.3, 40.8 y 39.4 huevos por hembra, respectivamente. Las más bajas fecundidades se observaron con la dieta RHS, con 32.3 huevos, mientras que con NNO se produjeron 16.2 huevos por hembra.

**Tabla 7. Primera maduración (días), población madura (días), hembras ovígeras (%) y fecundidad (huevos/hembra) de *Pseudodiaptomus euryhalinus* en el día 11 de cultivo con diferentes dietas monoalgales. (ISX= *Isochrysis* sp., TES= *Tetraselmis suecica*, CHM= *Chaetoceros muelleri*, RHS= *Rhodomonas salina*, NNO= *Nannochloropsis oculata*), NO=no observado. Superíndices diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).**

<b>Dieta</b>	<b>Primera Maduración (Días)</b>	<b>Población madura (Días)</b>	<b>Hembras ovígeras (%)</b>	<b>Fecundidad (huevos/hembra)</b>
<b>ISX</b>	8.3±0.6 <sup>a</sup>	10.7±0.6 <sup>a</sup>	66.7±5.7 <sup>a</sup>	42.3±8.1 <sup>a</sup>
<b>TES</b>	8.7±0.6 <sup>a</sup>	11.0±0.0 <sup>a</sup>	61.3±5.5 <sup>a</sup>	40.8±9.8 <sup>a</sup>
<b>CHM</b>	8.3±0.6 <sup>a</sup>	10.7±0.6 <sup>a</sup>	63.7±4.1 <sup>a</sup>	39.4±8.1 <sup>a</sup>
<b>RHS</b>	9.0±0.0 <sup>a</sup>	11.0±0.0 <sup>a</sup>	53.3±4.9 <sup>b</sup>	32.3±9.1 <sup>b</sup>
<b>NNO</b>	10.3±0.6 <sup>b</sup>	NO	19.0±3.6 <sup>c</sup>	16.2±5.4 <sup>c</sup>

### 3.7 Experimento 7. Efecto de la dieta en la producción naupliar total de *Pseudodiaptomus euryhalinus*

Las dietas ISX, TES, CHM, RHS y NNO tuvieron un efecto significativo en el número total de nauplios producidos por *P. euryhalinus* durante 10 días ( $p < 0.0001$ ) (Tabla VIII). La mayor producción naupliar total se observó con las dietas ISX y TES, con 1121 y 1090 nauplios respectivamente, seguida por CHM, con 848 nauplios y RHS, con 618 nauplios y la menor producción naupliar total se observó con la dieta NNO, con 118 nauplios. No se observaron diferencias significativas en la supervivencia final de los reproductores de *P. euryhalinus* utilizados en la producción naupliar de *P. euryhalinus* alimentados con ISX, TES, CHM y RHS, a excepción de los copépodos alimentados con NNO, los cuales tuvieron la menor supervivencia de 53.3. %.

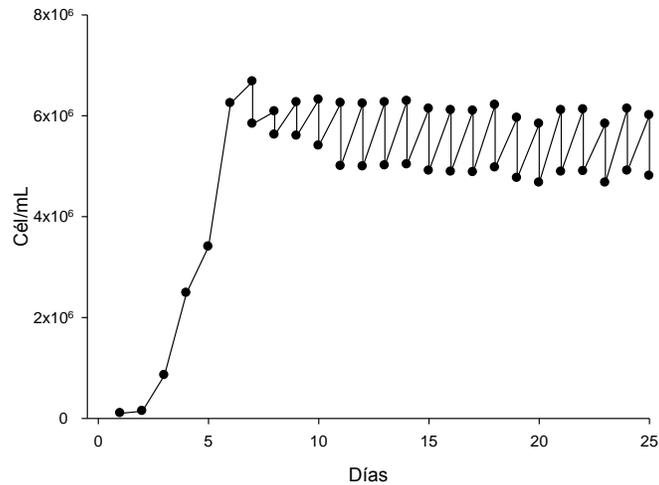
**Tabla 8. Producción naupliar total (PNT, huevos) y supervivencia (%) de adultos reproductores de *Pseudodiaptomus euryhalinus* durante 10 días alimentados con 5 diferentes dietas de microalgas (ISX= *Isochrysis* sp., TES= *Tetraselmis suecica*, CHM= *Chaetoceros muelleri*, RHS= *Rhodomonas salina*, NNO= *Nannochloropsis oculata*). Superíndices diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).**

Dieta	PNT (huevos)	Supervivencia de adultos (%)
ISX	1121±116 <sup>a</sup>	83.3±5.7 <sup>a</sup>
TES	1090±216 <sup>a</sup>	90.0±8.7 <sup>a</sup>
CHM	848±41 <sup>b</sup>	85.0±15.0 <sup>b</sup>
RHS	618±26 <sup>c</sup>	83.3±15.3 <sup>c</sup>
NNO	188±40 <sup>d</sup>	53.3±11.6 <sup>d</sup>

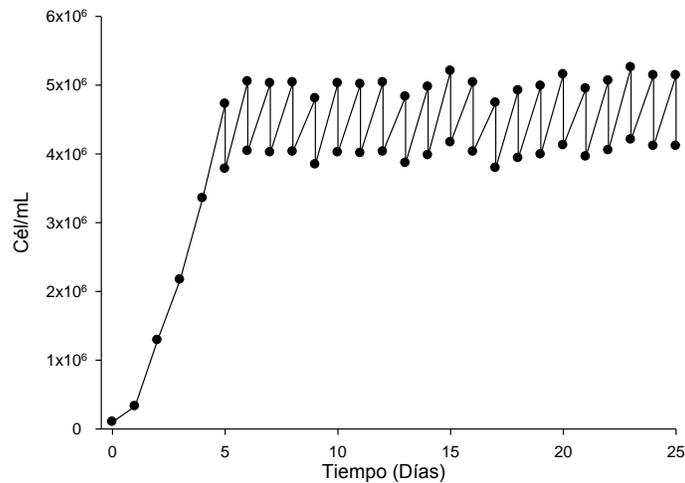
### 3.8 Cultivo de microalgas

Las 9 especies de microalgas que se mantuvieron en cultivos semicontinuos se mantuvieron estables y sin diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) durante el tiempo en que sirvieron como alimento para *P. euryhalinus*. La microalga *Isochrysis* sp. mantuvo su densidad celular cerca de los  $6 \times 10^6$  cél·mL<sup>-1</sup> (Figura 15). *Chaetoceros muelleri* y

*Pavlova lutheri*, alrededor de  $5 \times 10^6$  cél·mL<sup>-1</sup> (Figuras 16 y 17), *Rhodomonas salina* y *Tetraselmis suecica* alrededor de  $1 \times 10^3$  cél·mL<sup>-1</sup> (Figuras 18 y 19). *Dunaliella tertiolecta* y *D. salina* alrededor de  $2 \times 10^6$  y  $1.5 \times 10^6$  cél·mL<sup>-1</sup>, respectivamente (Figuras 20 y 21). Finalmente las microalgas *N. oculata* y *Synechococcus* sp. alrededor de  $30$  y  $100 \times 10^6$  cél·mL<sup>-1</sup>, respectivamente (Figuras 22 y 23).



**Figura 15. Densidad celular (cél·mL<sup>-1</sup>) de *Isochrysis* sp. cultivada en un sistema semicontinuo. Valores promedio**



**Figura 16. Densidad celular (cél·mL<sup>-1</sup>) de *Chaetoceros muelleri* cultivada en un sistema semicontinuo. Valores promedio.**

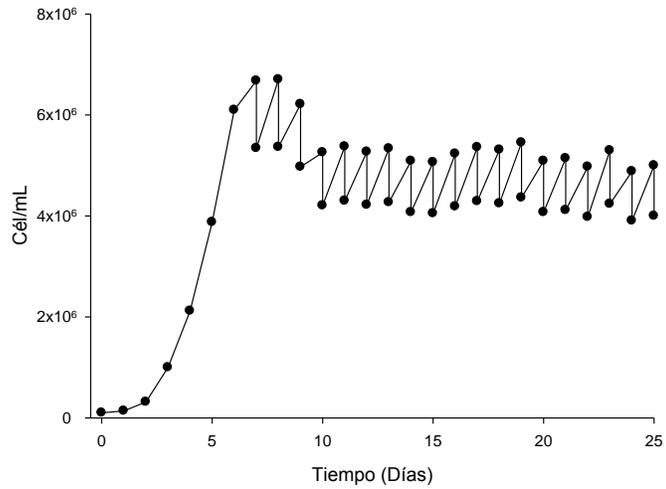


Figura 17. Densidad celular (cél·mL<sup>-1</sup>) de *Pavlova lutheri* cultivada en un sistema semicontinuo. Valores promedio.

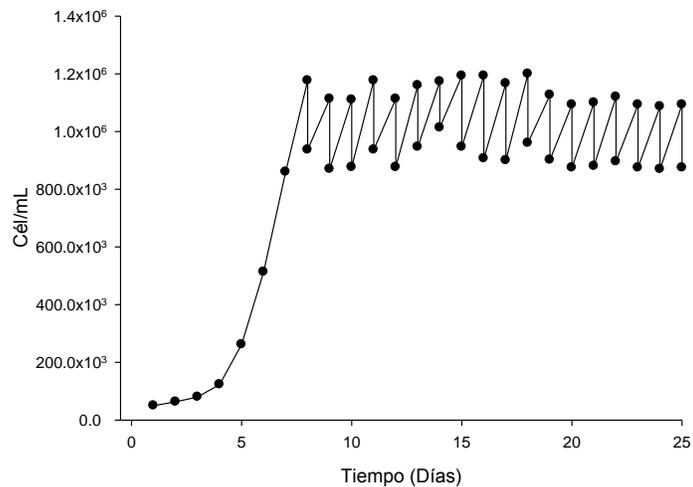


Figura 18. Densidad celular (cél·mL<sup>-1</sup>) de *Rhodomonas salina* cultivada en un sistema semicontinuo. Valores promedio.

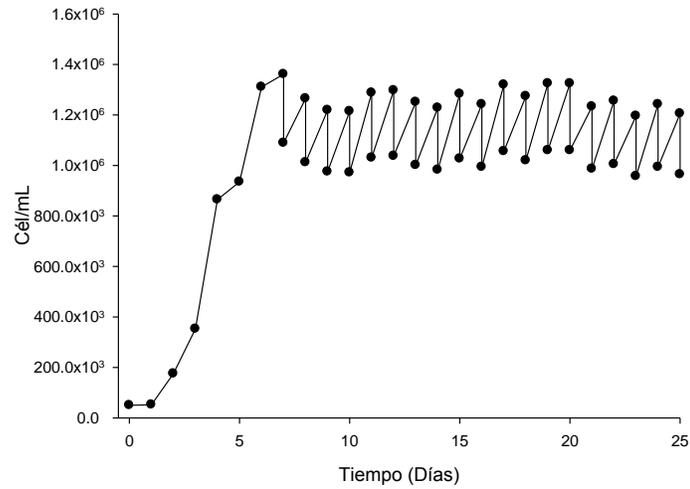


Figura 19. Densidad celular (cél·mL<sup>-1</sup>) de *Tetraselmis suecica* cultivada en un sistema semicontinuo. Valores promedio.

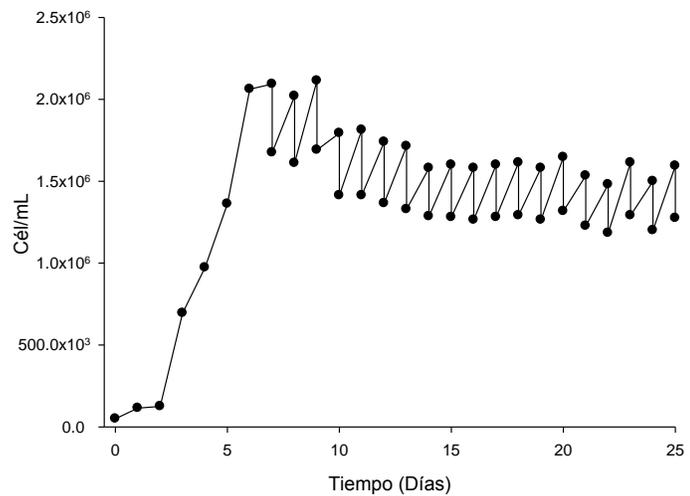


Figura 20. Densidad celular (cél·mL<sup>-1</sup>) de *Dunaliella tertiolecta* cultivada en un sistema semicontinuo. Valores promedio.

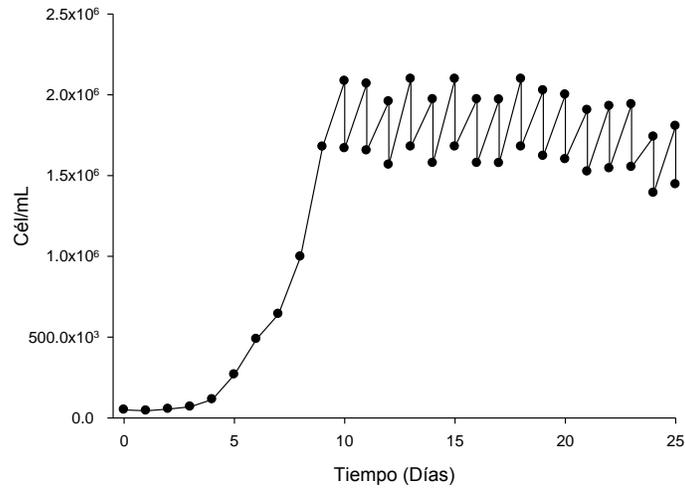


Figura 21. Densidad celular (cél·mL<sup>-1</sup>) de *Dunaliella salina* cultivada en un sistema semicontinuo. Valores promedio.

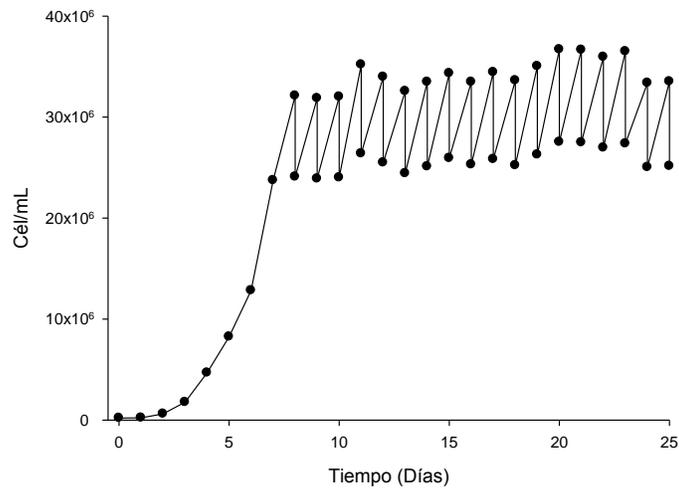
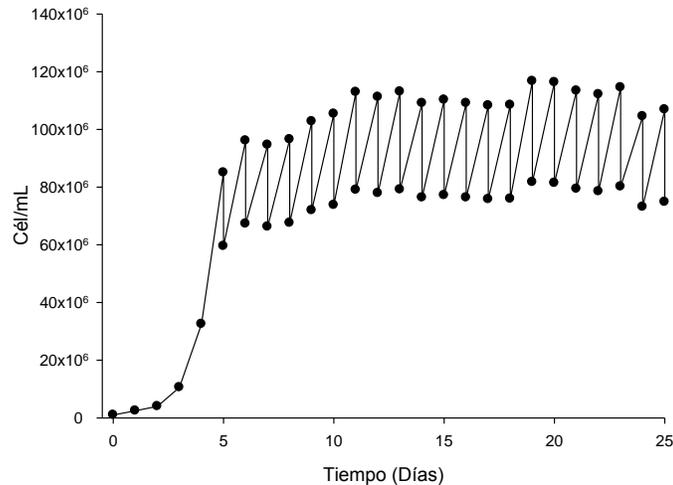


Figura 22. Densidad celular (cél·mL<sup>-1</sup>) de *Nannochloropsis oculata* cultivada en un sistema semicontinuo. Valores promedio.



**Figura 23.** Densidad celular (cél·mL<sup>-1</sup>) de *Synechococcus* sp. cultivada en un sistema semicontinuo. Valores promedio.

### 3.8.1 Peso seco y composición bioquímica de *Pseudodiaptomus euryhalinus* y de las dietas microalgales

El PST y PSO de las microalgas, al tratarse de diferentes especies, varió de 21.7 a 181.5 y de 14.4 a 106.0 pg·cel<sup>-1</sup>, respectivamente. El porcentaje de proteínas, lípidos y carbohidratos fue diferente en las dietas microalgales ( $p < 0.01$ ). El contenido de proteínas fue mayor en las microalgas ISX y NNO (27.2% y 26.1%, respectivamente), seguido por las dietas TES, RHS y CHM (24.4, 20.9, y 20.6%). El porcentaje de lípidos fue mayor en la microalga ISX (22.9%), seguido de RHS (15.9%), TES y CHM (13.1 y 11.5%), el porcentaje más bajo se encontró en NNO (7.2%). El contenido de carbohidratos fue mayor en la especie ISX (6.2%), seguido por RHS, CHM y NNO (2.9, 2.5 y 2.4%), mientras que el porcentaje más bajo se encontró en TES, con únicamente 1.5% (Tabla 9).

**Tabla 9. Peso seco total y orgánico ( $\mu\text{g}\cdot\text{cél}^{-1}$ ), proteínas, lípidos y carbohidratos (% en base al PST) de las microalgas utilizadas como dietas para *Pseudodiaptomus euryhalinus* (ISX=*Isochrysis* sp., CHM=*Chaetoceros muelleri*, RHS= *Rhodomonas salina*, TES= *Tetraselmis suecica* y NNO= *Nannochloropsis oculata*).**

Especie	PST ( $\mu\text{g}\cdot\text{cél}^{-1}$ )	PSO ( $\mu\text{g}\cdot\text{cél}^{-1}$ )	Proteínas (%)	Lípidos (%)	Carbohidratos (%)
ISX	21.7 (4.1)	14.4 (1.4)	27.2 (4.4) <sup>a</sup>	22.9 (3.7) <sup>a</sup>	6.2 (2.5) <sup>a</sup>
TES	181.5 (13.3)	139.3 (4.5)	24.4 (2.9) <sup>ab</sup>	13.1 (1.3) <sup>b</sup>	1.5 (0.4) <sup>c</sup>
CHM	47.5 (7.4)	40.9 (1.6)	20.6 (3.1) <sup>b</sup>	11.5 (2.7) <sup>b</sup>	2.5 (1.0) <sup>b</sup>
RHS	154.8 (17.0)	106.0 (3.1)	20.9 (2.1) <sup>b</sup>	15.9 (1.7) <sup>c</sup>	2.9 (0.9) <sup>b</sup>
NNO	14.1 (3.4)	10.0 (1.1)	26.1 (3.3) <sup>a</sup>	7.2 (1.4) <sup>d</sup>	2.4 (0.3) <sup>b</sup>

El PST y PSO de los nauplios alimentados con cualquier dieta no tuvo diferencias significativas y varió de 0.38 a 0.40  $\mu\text{g}\cdot\text{cop}^{-1}$  y de 0.27 a 0.29  $\mu\text{g}\cdot\text{cop}^{-1}$ , respectivamente, mientras que en el PST y PSO de los copepoditos y adultos si se encontraron diferencias significativas al alimentarlos con las diferentes microalgas ( $p < 0.05$ ), sin embargo únicamente con los copépodos alimentados con la microalga NNO se observó esta diferencia. El PST y PSO de los copepoditos alimentados con las microalgas ISX, CHM, RHS y TES fue de 4.62, 4.58, 4.51 y 4.33  $\mu\text{g}\cdot\text{cop}^{-1}$ , y de 3.30, 3.29, 3.10 y 3.19  $\mu\text{g}\cdot\text{cop}^{-1}$  respectivamente, mientras que el PST y PSO de los copepoditos alimentados con NNO fue más baja, siendo 3.63 y 2.36  $\mu\text{g}\cdot\text{cop}^{-1}$ , respectivamente.

El PST y PSO de los adultos alimentados con las microalgas ISX, CHM, RHS y TES fue de 13.59, 13.07, 13.73 y 11.68 y 9.77, 9.14, 9.58 y 8.19  $\mu\text{g}\cdot\text{cop}^{-1}$  mientras que el de los alimentados con NNO, fue más baja, siendo 8.01 y 5.96  $\mu\text{g}\cdot\text{cop}^{-1}$ , respectivamente (Tabla 10).

Respecto a la composición bioquímica de los copépodos, no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de proteínas por efecto de la dieta, pero si por efecto de los diferentes estadios ( $p < 0.01$ ). Tampoco se encontraron diferencias significativas por efecto de la interacción de ambos factores. El mayor contenido de proteínas se encontró en los nauplios alimentados con TES (37.0%) y el menor contenido en los adultos alimentados con NNO (24.1%). El porcentaje de proteínas en los nauplios varió

de 30.6 a 37.0%, en los copepoditos varió de 26.1 a 33.1%, mientras que en los adultos varió de 24.1 a 30.1% (Tabla 10).

En cuanto al porcentaje de lípidos en los copépodos, se encontraron diferencias significativas por efecto de la dieta ( $p < 0.001$ ) y por efecto del estadio ( $p < 0.001$ ). No se encontraron diferencias significativas por efecto de la interacción de ambos factores. La mayor cantidad de lípidos se encontró en los adultos alimentados con ISX (18.9%), y en general en el estadio adulto se encontraron los mayores porcentajes de lípidos. La menor cantidad de lípidos se encontró en los copepoditos alimentados con NNO (8.9%). El porcentaje de lípidos en los nauplios varió 10.0 a 12.4%, en los copepoditos varió de 8.9 a 12.8% y en los adultos varió de 11.7 a 18.9%.

Finalmente, respecto al contenido de carbohidratos en los copépodos, se encontraron diferencias significativas por efecto de la dieta ( $p < 0.05$ ) y por efecto del estadio ( $p < 0.01$ ). No se encontraron diferencias significativas por efecto de la interacción de ambos factores. El mayor contenido de carbohidratos se encontró en los adultos alimentados con TES (8.7%), y la menor cantidad en los copepoditos alimentados con CHM y RHS (3.8 y 3.9%). El porcentaje de carbohidratos varió de 4.9 a 6.5% en nauplios, de 3.8 a 5.9% en copepoditos y de 4.9 a 8.7% en adultos.

Tabla 10. Peso seco total, proteínas (%), lípidos (%) y carbohidratos (%) de *Pseudodiaptomus euryhalinus* en el estadio de nauplios, copepoditos y adultos, alimentados con diferentes dietas microalgales (ISX=*Isochrysis* sp., CHM=*Chaetoceros muelleri*, RHS= *Rhodomonas salina*, TES= *Tetraselmis suecica* y NNO= *Nannochloropsis oculata*).

Estadio	Dieta	PST ( $\mu\text{g}\cdot\text{cop}^{-1}$ )	Proteínas (%)	Lípidos (%)	Carbohidratos (%)
Nauplios	ISX	0.40 (0.02) <sup>a</sup>	30.6 (2.3) <sup>abcd</sup>	11.2 (0.4) <sup>abf</sup>	6.2 (0.8) <sup>ac</sup>
	TES	0.39 (0.03) <sup>a</sup>	37.0 (1.3) <sup>b</sup>	11.9 (1.6) <sup>ab</sup>	6.2 (1.3) <sup>a</sup>
	CHM	0.40 (0.03) <sup>a</sup>	32.2 (4.0) <sup>abcd</sup>	12.4 (1.1) <sup>abe</sup>	6.5 (1.9) <sup>ac</sup>
	RHS	0.38 (0.05) <sup>a</sup>	31.0 (4.2) <sup>abcd</sup>	11.1 (0.5) <sup>abf</sup>	5.6 (1.4) <sup>ab</sup>
	NNO	0.39 (0.03) <sup>a</sup>	34.9 (4.8) <sup>bc</sup>	10.0 (1.3) <sup>abf</sup>	4.9 (0.7) <sup>ab</sup>
Copepoditos	ISX	4.62 (0.35) <sup>a</sup>	31.8 (2.7) <sup>abcd</sup>	12.8(1.3) <sup>be</sup>	4.3 (0.2) <sup>ab</sup>
	TES	4.33 (0.20) <sup>a</sup>	30.6 (2.4) <sup>abd</sup>	12.0 (0.8) <sup>ab</sup>	5.9 (0.6) <sup>ab</sup>
	CHM	4.58 (0.49) <sup>a</sup>	33.1 (4.9) <sup>abc</sup>	10.9 (0.6) <sup>abf</sup>	3.8 (0.5) <sup>b</sup>
	RHS	4.51 (0.42) <sup>a</sup>	32.8 (7.1) <sup>abc</sup>	12.1 (1.9) <sup>ab</sup>	3.9 (0.3) <sup>b</sup>
	NNO	3.63 (0.15) <sup>b</sup>	26.1 (5.8) <sup>ad</sup>	8.9 (0.7) <sup>f</sup>	4.8 (0.9) <sup>ab</sup>
Adultos	ISX	13.59 (2.40) <sup>a</sup>	27.6 (3.0) <sup>acd</sup>	18.9 (1.4) <sup>cd</sup>	6.1 (0.5) <sup>a</sup>
	TES	11.68 (1.52) <sup>a</sup>	27.9 (2.4) <sup>acd</sup>	17.3 (3.4) <sup>de</sup>	8.7 (0.5) <sup>c</sup>
	CHM	13.07 (1.42) <sup>a</sup>	30.1 (3.4) <sup>abcd</sup>	17.1 (2.7) <sup>cde</sup>	4.9 (1.0) <sup>ab</sup>
	RHS	13.73 (2.34) <sup>a</sup>	29.3 (6.3) <sup>abcd</sup>	15.3 (2.3) <sup>c</sup>	5.7 (1.4) <sup>ab</sup>
	NNO	8.01 (0.33) <sup>b</sup>	24.1 (5.9) <sup>d</sup>	11.7 (0.3) <sup>ab</sup>	6.5 (3.0) <sup>a</sup>

### III.9 Ácidos grasos

Los resultados de la composición de ácidos grasos de las dietas microalgales cultivadas en un sistema semicontinuo utilizadas para la alimentación de *P. euryhalinus* se muestran en la Tabla 11.

La mayor cantidad de HUFA se encontró en la dieta NNO, con 8.1%, seguida de RHS, con 5.0%, las cantidades más bajas se encontraron en CHM, ISX y TES, con 3.5, 3.1 y 2.5%, respectivamente. La mayor cantidad de PUFA se encontraron en las dietas RHS y TES, con 40.6 y 39.6%, seguida por ISX, con 33.6%, y las más bajas en CHM y NNO, con 23.2 y 20%, respectivamente. Respecto a los ácidos grasos monoinsaturados (MONO), la mayor cantidad se encontró en las dietas NNO y CHM, con 35.4 y 34.7%, respectivamente, seguido por TES e ISX, con 23.2 y 20.3%, respectivamente, la cantidad más baja se encontró en RHS. Finalmente, en la cantidad de ácidos grasos saturados (SAT) no se observaron diferencias significativas entre las dietas ISX, CHM,

RHS y NNO, con cantidades que variaron entre 41.8 y 46.1%, la menor cantidad se observó en TES (37.3%)

Se encontraron diferencias significativas en la concentración de HUFA, DHA, EPA y ARA de las dietas microalgales. La mayor cantidad de DHA se encontró en ISX, con 3.7%, seguida por RHS (1.6%) y CHM (0.3%), en TES y NNO no se encontró este ácido graso (AG). La mayor concentración de EPA fue encontrado en NNO, con 8.1%, seguida por CHM, RHS y TES (3.4, 3.4 y 2.5%, respectivamente), sin diferencias significativas entre estas, en ISX no se encontró este AG. La mayor cantidad de ARA se encontró en la dieta CHM (4.4%), seguida por TES y NNO (3.3 y 2.8%, respectivamente), la cantidad más baja se encontró en RHS (2.1%), en ISX no se encontró este AG. El ácido linolénico (LNA; 18:3  $\omega$ 3) se encontró en mayor cantidad en TES (9.5%), seguido por RHS e ISX (7.9 y 7.2%, respectivamente) y la menor cantidad se encontró en CHM (1.3%), en NNO no se encontró este AG. La mayor concentración de ácido linoleico (LOA; 18:2  $\omega$ 6), se encontró en RHS con 16.3%, seguida por TES (13.6%), y NNO e ISX (4.3 y 4.3%), la menor cantidad se encontró en CHM (1.3%).

La proporción DHA/EPA y EPA/ARA también fue diferente en las microalgas, sólo en RHS se encontró la proporción DHA/EPA de 0.5 debido a la ausencia de uno u otro AG. La mayor proporción EPA/ARA se encontró en NNO, con 2.9, seguida por RHS (1.7), CHM y TES (0.8 y 0.7, respectivamente).

La concentración de ácidos grasos en los estadios naupliar, copepodito y adulto de *P. euryhalinus* se presentan en las Tablas 12, 13 y 14.

La cantidad de HUFA en el estadio naupliar de los copépodos fue similar y sin diferencias significativas al alimentarlos con las dietas CHM, TES, NNO e ISX, con concentraciones que variaron entre 18.1 y 22.1%, la menor cantidad se encontró en los

nauplios alimentados con RHS, con 13.8%. La mayor cantidad de PUFA se encontró en los nauplios alimentados con TES (48.6%), seguido por los alimentados con CHM (42.1%), la menor cantidad fue encontrada en los alimentados con ISX (37.0%) y NNO (36.7%). La mayor cantidad de MONO fue encontrada en los organismos alimentados con NNO (25.3%) y la menor cantidad fue observada en los alimentados con TES (13.6%). La cantidad de SAT fue similar en los nauplios alimentados con ISX, TES, RHS y NNO, con una variación de 37.1 a 40.5%, la cantidad más baja fue encontrada en los nauplios alimentados con CHM (35.7%).

Respecto a los HUFA, la mayor cantidad de DHA se encontró en los organismos alimentados con ISX y TES (13.2 y 11.2%, respectivamente), seguido por los alimentados con RHS (8.7%) y NNO (6.4%), la menor cantidad fue encontrada en los que fueron alimentados con CHM (5.3%). La mayor cantidad de EPA se encontró en los copépodos alimentados con CHM y NNO (16.8 y 15.5%, respectivamente), seguido por los alimentados con TES (9.3%), mientras que las menores cantidades se encontraron en los alimentados con RHS e ISX (5.1 y 4.9%, respectivamente). La mayor cantidad de ARA en el estadio naupliar se encontró en los copépodos alimentados con TES (5.1%), seguido por los alimentados con CHM, RHS y NNO (4.0, 3.6 y 3.1%, respectivamente), la menor cantidad se encontró con ISX (1.6).

La proporción DHA/EPA en el estadio naupliar fue más alta en los alimentados con ISX (2.7), seguido por los alimentados con RHS y TES (1.7 y 1.2, respectivamente), las más bajas se encontraron con los alimentados con CHM y NNO (0.3, 0.4 y respectivamente).

La proporción EPA/ARA fue más alta en los nauplios alimentados con NNO (5.0), seguido por los alimentados con CHM (4.2), ISX (3.1), TES (1.8) y RHS (1.4).

En el estadio copepodito, la mayor cantidad de HUFA se encontró en los organismos alimentados con CHM e ISX (25.3 y 25.1%, respectivamente), seguido y sin diferencias

significativas entre las dietas TES (19.4%), RHS (17.8%) y NNO (16.6%). La cantidad de PUFA encontradas en los organismos no fue diferente entre las dietas RHS (52.2%), CHM (45%), ISX (44%) y TES (42.5%), la menor cantidad se encontró en los organismos alimentados con NNO (31.9%). Entre los MONOs, la mayor cantidad se encontró en los copepoditos alimentados con NNO (29.5%), seguido y sin diferencias significativas por los alimentados con las dietas TES (21.9%) y CHM (20.6%), las menores concentraciones se encontraron en los alimentados con ISX (18.4%) y RHS (16.1%). Respecto a los SAT, no se encontraron diferencias entre las cantidades observadas en los organismos alimentados con las dietas NNO (38.6%), TES (35.8%), CHM (34.3%) y RHS (31.7%), la menor cantidad se encontró en los alimentados con ISX (29.7%).

En el estadio copepodito, la mayor cantidad de DHA se encontró en los copépodos alimentados con ISX (17.2%), seguido por los alimentados con CHM (9.9%) y RHS (8.1%), las menores cantidades se encontraron en copepoditos alimentados con TES (6.7%) y NNO (4.2%). La mayor cantidad de EPA se encontró en los alimentados con CHM (15.4%), seguido por los alimentados con NNO (12.4%) y TES (11.6%), las menores cantidades se encontraron en los alimentados con RHS (9.7%) e ISX (7.9%). La mayor cantidad de ARA se encontró en los alimentados con CHM (8.2%), seguido por TES (6.7%), las menores cantidades se encontraron en los alimentados con NNO (5.8%), RHS (5.4%) e ISX (2.7%).

En el estadio copepodito, la proporción DHA/EPA fue más alta en los alimentados con ISX (2.2), seguido por los alimentados con RHS (0.8), TES (0.7), CHM (0.6) y los alimentados con NNO (0.3). La proporción EPA/ARA más alta se encontró en los alimentados con ISX (2.9), seguido por los alimentados con NNO (2.1), CHM (1.9), RHS (1.8) y TES (1.7).

La concentración de HUFA en el estadio adulto de los copépodos fue similar y sin diferencias significativas al alimentarlos con las dietas ISX, TES, CHM y NNO, variando

entre 21.2 y 24.9%, con la dieta RHS la concentración fue menor (12.9%). La concentración de PUFA varió sin diferencias significativas entre 42.4 y 51.3% al alimentarlos con las dietas ISX, TES, CHM y RHS, la menor cantidad se encontró en los alimentados con NNO (31.6%). La concentración de MONOs fue mayor en los organismos alimentados con NNO (31.0%), seguido por los alimentados con CHM y TES (22.9 y 21.8%, respectivamente), las menores concentraciones se encontraron en los alimentados con ISX (18.8%) y RHS (17.8%). Finalmente, no se encontraron diferencias significativas en la concentración de SAT en los organismos alimentados con las dietas NNO (37.4%), RHS (37.0%), TES (35.0%) y CHM (34.7%), la concentración más baja se encontró en los alimentados con SX (29.9%).

En la etapa adulta la mayor concentración de DHA se encontró en los copépodos alimentados con ISX (19.2%), seguido por los alimentados con NNO y TES (9.3 y 8.5%), el menor contenido se encontró en los alimentados con RHS y CHM (6.8% en ambos). La mayor cantidad de EPA se encontró en los alimentados con TES y CHM (14.7 y 14.4%), seguido por NNO (12.3%), las menores cantidades se encontraron en los alimentados con RHS e ISX (6.1 y 5.7%, respectivamente). La mayor cantidad de ARA se encontró en los alimentados con TES y CHM (8.0 y 7.4%, respectivamente), seguido por los alimentados con NNO (4.9%), las más bajas cantidades se encontraron en los alimentados con RHS e ISX (3.0 y 2.7%, respectivamente).

En el estadio adulto, la proporción DHA/EPA más alta fue la de los copépodos alimentados con ISX (3.4), seguido por los alimentados con RHS y NNO (1.1 y 0.8, respectivamente), las proporciones más bajas se encontraron en los que fueron alimentados con TES y CHM (0.6 y 0.5, respectivamente).

La proporción EPA/ARA más alta se encontró en los alimentados con NNO (2.5), seguido por los alimentados con ISX, RHS, CHM y TES (2.1, 2.0, 2.0 y 1.8, respectivamente).

Tabla 11. Composición de ácidos grasos de las dietas microalgales cultivadas en un sistema semicontinuo utilizadas para la alimentación de *P. eurysalinus*. (AG=Ácidos grasos, ISX= *Isochrysis* sp., TES= *Tetraselmis suecica*, CHM= *Chaetoceros muelleri*, RHS= *Rhodomonas salina* y NNO= *Nannochloropsis oculata*). Superíndices diferentes indican diferencias significativas ( $p<0.05$ ). Datos expresados como porcentaje del total de ácidos grasos.

AG	ISX	TES	CHM	RHS	NNO
C14:0	17.4±5.6	1.9±0.7	13.2±4.2	12.3±2.8	8.0±1.9
C14:1ω5	0.8±0.3	-	-	0.2±0.2	0.6±0.3
C15:0	1.2±0.4	0.3±0.2	1.1±0.1	0.7±0.2	1.1±0.4
C15:1ω5	-	-	-	0.4±0.2	0.6±0.3
C16:0	18.8±1.2	29.1±2.5	18.7±3.6	19.8±3.1	26.8±11.1
C16:1ω11	-	-	0.6±0.3	-	-
C16:1ω9	0.3±0.3	1.6±0.2	22.4±6.9	1.4±0.7	0.7±0.4
C16:1ω7	0.7±0.6	0.9±0.3	0.6±0.2	2.1±0.3	22.1±7.2
C16:1ω5	-	-	1.1±0.1	-	-
C16:2ω6c	-	0.7±0.2	2.7±0.6	0.7±1.1	0.5±0.3
C16:2ω3	-	-	4.3±3.2	-	-
C16:2ω6t	7.3±5.1	3.5±0.5	-	-	-
C16:3ω3	0.8±0.4	-	2.5±0.4	-	1.1±0.4
C16:4ω3	-	-	-	-	1.3±1.8
C17:0	1.3±0.8	0.3±0.4	0.8±0.6	0.9±0.5	1.3±0.5
C17:1ω7	-	0.4±0.1	3.6±4.1	-	-
C18:0	7.4±4.1	3.5±3.0	6.5±3.7	6.3±5.7	7.0±5.4
C18:1ω9c+t	15.2±1.1	14.8±0.9	3.3±2.1	9.0±2.4	9.5±3.5
C18:1ω9c	3.3±0.4	3.9±0.5	-	3.7±0.3	1.9±0.6
C18:1ω7	-	-	2.6±0.5	-	-
C18:2ω6	4.3±1.1 <sup>a</sup>	13.6±1.6 <sup>b</sup>	1.3±0.5 <sup>c</sup>	16.3±4.3 <sup>d</sup>	4.3±1.3 <sup>a</sup>
C18:3ω6c	0.7±0.4	1.4±0.3	1.3±0.5	2.4±0.7	0.5±0.4
C18:3ω6	-	0.3±0.7	0.8±0.1	-	-
C18:3ω3	7.2±0.4 <sup>a</sup>	9.5±1.7 <sup>b</sup>	1.3±1.2 <sup>c</sup>	7.9±2.1 <sup>a</sup>	-
C18:4ω6	-	0.1±0.2	-	-	0.5±0.4
C18:4ω3	9.6±4.2	4.3±1.2	-	6.1±1.7	-
C20:0	-	-	0.6±0.4	2.3±1.5	-
C20:1ω9	-	1.6±0.2	0.4±0.3	-	-
C20:2ω6	-	-	2.5±2.1	-	-
C20:3ω6	0.5±0.3	0.4±0.7	-	-	0.5±0.3
C20:4ω6	-	3.3±0.3 <sup>a</sup>	4.4±1.6 <sup>c</sup>	2.1±0.7 <sup>c</sup>	2.8±1.0 <sup>ac</sup>
C20:5ω3	-	2.5±1.8 <sup>a</sup>	3.4±0.9 <sup>a</sup>	3.4±2.2 <sup>a</sup>	8.1±2.6 <sup>b</sup>
C22:0	-	2.1±3.2	0.9±0.1	0.1±0.2	0.3±0.3
C22:1ω9	-	-	-	0.1±0.2	-
C22:6ω3	3.7±2.0 <sup>a</sup>	-	0.3±0.1 <sup>b</sup>	1.6±0.4 <sup>c</sup>	-
C24:0	-	-	0.3±0.2	-	-
<b>Total de ácidos grasos por grupo</b>					
SAT	46.1±2.0 <sup>a</sup>	37.3±3.4 <sup>b</sup>	41.8±0.6 <sup>a</sup>	42.5±8.4 <sup>a</sup>	44.5±10.7 <sup>a</sup>
MONO	20.3±1.8 <sup>a</sup>	23.2±1.2 <sup>a</sup>	34.7±2.9 <sup>b</sup>	16.9±1.9 <sup>c</sup>	35.4±7.5 <sup>b</sup>
PUFA	33.6±3.0 <sup>a</sup>	39.6±3.4 <sup>b</sup>	23.2±4.3 <sup>c</sup>	40.6±10.0 <sup>b</sup>	20.0±3.9 <sup>c</sup>
HUFA (EPA+DHA)	3.1±2.0 <sup>a</sup>	2.5±1.8 <sup>a</sup>	3.5±0.9 <sup>a</sup>	5.0±2.4 <sup>b</sup>	8.1±2.6 <sup>c</sup>
<b>Proporción</b>					
DHA/EPA	-	-	0.0±0.0 <sup>a</sup>	0.5±0.1 <sup>b</sup>	-
EPA/ARA	-	0.7±0.5 <sup>a</sup>	0.8±0.2 <sup>a</sup>	1.7±0.6 <sup>b</sup>	2.9±0.5 <sup>c</sup>

Tabla 12. Composición de ácidos grasos de nauplios de *P. euryhalinus* alimentados con diferentes dietas microalgales. (AG=Ácidos grasos, ISX= *Isochrysis* sp., TES= *Tetraselmis suecica*, CHM= *Chaetoceros muelleri*, RHS= *Rhodomonas salina* y NNO= *Nannochloropsis oculata*). Datos expresados como porcentaje del total de ácidos grasos.

AG	ISX	TES	CHM	RHS	NNO
C14:0	9.0±2.9	2.6±0.3	9.4±0.8	6.7±4.4	10.7±7.2
C14:1ω5	-	-	0.2±0.1	-	0.2±0.1
C15:0	0.6±0.1	1.3±0.1	0.6±0.1	0.7±0.3	0.3±0.2
C15:1ω5	-	-	0.1±0.2	0.3±0.1	-
C16:0	21.7±0.7	25.1±1.5	18.9±1.2	19.6±12.3	20.7±14.1
C16:1ω9	6.1±0.0	1.2±0.2	16.1±1.3	1.3±0.7	17.8±12.1
C16:1ω7	-	-	0.4±0.2	1.9±1.1	0.5±0.3
C16:2ω6c	0.3±0.0	0.3±0.1	1.7±0.1	0.3±0.1	-
C16:2ω6t	0.5±0.0	-	1.2±0.9	-	1.6±1.0
C16:3ω3	0.2±0.1	-	3.7±0.2	0.3±0.1	1.8±1.2
C16:4ω3	-	-	0.1±0.2	-	-
C17:0	0.5±0.2	0.8±0.1	0.3±0.1	3.0±1.6	-
C18:0	6.7±1.2	6.7±1.2	4.1±0.3	-	4.5±3.3
C18:1ω9c+t	11.1±0.8	7.7±1.1	1.5±0.6	9.0±4.5	1.8±1.5
C18:1ω9c	4.7±0.2	3.8±0.5	2.8±0.1	7.5±5.0	3.3±2.4
C18:2ω6c	0.2±0.1a	0.2±0.1a	0.2±0.1a	6.4±4.0b	0.3±0.2 <sup>a</sup>
C18:2ω6t	4.1±0.1	6.6±0.4	0.8±0.5	1.8±1.0	1.3±0.9
C18:3ω6t	0.6±0.4	-	1.3±1.7	10.1±6.5	0.2±0.0
C18:3ω6c	0.7±0.3	1.0±0.1	2.2±0.1	-	2.5±1.6
C18:3ω3	3.0±0.2 <sup>a</sup>	9.0±0.8 <sup>b</sup>	1.7±0.9 <sup>c</sup>	4.5±2.4a	0.5±0.6 <sup>b</sup>
C18:4ω6	-	-	0.4±0.1	-	0.3±0.3
C18:4ω3	6.4±0.5	3.4±0.1	1.6±0.0	2.7±1.6	1.8±1.1
C20:0	0.4±0.0	0.2±0.2	0.9±1.1	0.6±0.2	0.5±0.3
C20:1ω9	0.2±0.0	0.2±0.1	0.5±0.0	0.5±0.3	0.7±0.5
C20:2ω6	0.5±0.1	1.0±0.1	0.2±0.0	1.7±0.9	0.2±0.1
C20:3ω6	0.2±0.1	0.2±0.1	0.4±0.0	0.3±0.1	0.8±0.3
C21:0	0.9±0.1	-	-	-	-
C20:4ω6	1.6±0.4 <sup>a</sup>	5.1±0.7 <sup>b</sup>	4.0±0.3 <sup>c</sup>	3.6±1.5 <sup>c</sup>	3.1±2.0 <sup>c</sup>
C20:5ω3	4.9±2.4	9.3±1.7	16.8±1.3	5.1±2.0	15.5±10.2
C22:0	0.7±0.1	0.5±0.1	0.9±0.0	1.0±0.5	1.3±0.9
C22:1ω9	0.3±0.1	0.3±0.1	0.5±0.4	0.7±0.3	1.0±0.7
C22:5ω3	0.7±0.5	0.9±0.0	0.5±0.0	-	0.5±0.3
C22:6ω3	13.2±1.8 <sup>a</sup>	11.2±3.2 <sup>a</sup>	5.3±0.5 <sup>b</sup>	8.7±2.6 <sup>c</sup>	6.4±4.2 <sup>c</sup>
C24:0	-	1.0±0.1	0.5±0.1	-	-
C24:1ω9	-	0.3±0.5	-	1.6±1.0	-
<b>Total de ácidos grasos por grupo</b>					
SAT	40.5±4.8 <sup>a</sup>	37.1±2.8 <sup>ab</sup>	35.7±0.7 <sup>b</sup>	40.5±1.9 <sup>a</sup>	38.0±0.1 <sup>a</sup>
MONO	22.5±0.8 <sup>a</sup>	13.6±1.8 <sup>b</sup>	22.2±2.3 <sup>a</sup>	20.3±3.9 <sup>a</sup>	25.3±1.0 <sup>c</sup>
PUFA	37.0±5.7 <sup>a</sup>	48.6±4.6 <sup>b</sup>	42.1±0.5 <sup>c</sup>	39.1±5.2 <sup>ac</sup>	36.7±1.0 <sup>a</sup>
HUFA (EPA+DHA)	18.1±4.1 <sup>a</sup>	20.6±4.9 <sup>a</sup>	22.1±1.7 <sup>a</sup>	13.8±8.0 <sup>b</sup>	21.9±1.1 <sup>a</sup>
<b>Proporción</b>					
DHA/EPA	2.7±1.1 <sup>a</sup>	1.2±0.1 <sup>b</sup>	0.3±0.0 <sup>c</sup>	1.7±0.5 <sup>b</sup>	0.4±0.1
EPA/ARA	3.0±0.7 <sup>a</sup>	1.8±0.1 <sup>b</sup>	4.2±0.1 <sup>c</sup>	1.4±0.1 <sup>d</sup>	5.1±0.2 <sup>e</sup>

Tabla 13. Composición de ácidos grasos de copepoditos de *P. euryhalinus* alimentados con diferentes dietas microalgales. (AG=Ácidos grasos, ISX= *Isochrysis* sp., TES= *Tetraselmis suecica*, CHM= *Chaetoceros muelleri*, RHS= *Rhodomonas salina* y NNO= *Nannochloropsis oculata*). Datos expresados como porcentaje del total de ácidos grasos.

AG	ISX	TES	CHM	RHS	NNO
C14:0	8.5±2.8	3.5±0.5	11.0±0.1	7.8±0.0	7.1±0.3
C15:0	0.6±0.0	0.9±0.1	0.6±0.0	0.5±0.0	0.6±0.0
C16:0	13.2±11.3	22.8±2.2	15.4±0.1	18.1±0.1	24.3±0.4
C16:1ω9	9.0±1.5	3.0±0.6	14.5±0.2	0.3±0.0	22.9±0.6
C16:1ω7	-	-	0.4±0.0	8.3±0.1	0.5±0.0
C16:2ω6c	0.5±0.1	0.6±0.6	1.1±0.0	0.6±0.0	0.9±0.0
C16:2ω6t	1.0±0.3	0.1±0.1	1.1±0.0	0.7±0.0	1.3±0.5
C17:0	0.5±0.2	0.7±.3	0.5±0.0	1.1±0.0	0.5±0.0
C16:3ω3	0.8±0.2	-	2.0±0.0	1.3±0.0	2.0±0.2
C16:4ω3	0.2±0.3	-	-	-	-
C18:0	4.9±3.2	6.0±4.9	4.8±0.1	3.5±0.0	4.5±0.2
C18:1ω9c+t	6.3±0.9	8.9±0.8	1.2±0.1	3.6±0.1	3.3±0.2
C18:1ω9c	2.5±1.4	6.6±4.9	3.2±0.0	2.7±0.0	2.2±0.0
C18:2ω6c	0.2±0.1	±	0.2±0.0	4.7±0.3	0.1±0.0
C18:2ω6t	3.3±0.7	7.1±0.8	1.3±0.0	9.4±0.1	1.1±0.0
C18:3ω6t	0.3±0.3	-	-	-	-
C18:3ω6c	2.3±0.1	1.3±0.2	3.1±0.0		2.3±0.0
C18:3ω3	3.3±0.4 <sup>a</sup>	3.0±0.5	0.2±0.0 <sup>b</sup>	4.7±0.1 <sup>c</sup>	0.1±0.0 <sup>d</sup>
C18:4ω3	9.6±0.4	2.2±0.4	1.1±0.0	6.3±0.2	1.0±0.0
C20:0	0.6±0.3	0.8±.3	0.5±0.0	0.2±0.0	0.6±0.1
C20:1ω9	0.3±0.2	1.5±0.3	0.3±0.0	0.2±0.0	0.2±0.0
C20:2ω6	0.6±0.2	1.0±0.5	0.2±0.0	1.0±0.1	0.1±0.0
C20:3ω6	0.3±0.1	0.6±0.5	0.5±0.0	0.3±0.0	0.4±0.0
C21:0	0.7±0.4	-	-	-	-
C20:4ω6	2.7±0.8 <sup>a</sup>	6.7±0.8 <sup>b</sup>	8.2±0.0 <sup>c</sup>	5.4±0.5 <sup>d</sup>	5.8±0.8 <sup>d</sup>
C20:5ω3	7.9±3.5 <sup>a</sup>	11.6±2.0 <sup>b</sup>	15.4±0.1 <sup>c</sup>	9.7±0.1 <sup>d</sup>	12.4±0.5 <sup>b</sup>
C22:0	0.6±0.20.2	0.6±0.4	1.0±0.0	0.5±0.1	0.7±0.0
C22:1ω9	0.3±0.2	0.3±0.1	1.0±0.0	0.3±0.0	0.3±0.0
C22:5ω3	1.6±1.3	0.4±0.3	0.60.0	-	-
C22:6ω3	17.2±6.5 <sup>a</sup>	7.8±4.7 <sup>d</sup>	9.9±0.1 <sup>c</sup>	8.1±0.1 <sup>d</sup>	4.2±0.0 <sup>b</sup>
C24:0	-	-	0.6±0.2	-	0.3±0.1
C24:1ω9	-	1.6±1.5	-	0.6±0.0	-
<b>Total de ácidos grasos por grupo</b>					
SAT	29.7±9.8 <sup>a</sup>	35.8±4.1 <sup>b</sup>	34.3±0.1 <sup>c</sup>	31.7±24.7 <sup>b</sup>	38.6±0.5 <sup>b</sup>
MONO	18.4±3.4 <sup>a</sup>	21.9±4.3 <sup>a</sup>	20.6±0.1 <sup>a</sup>	16.1±12.5 <sup>b</sup>	29.5±0.3 <sup>c</sup>
PUFA	51.8±9.6 <sup>a</sup>	42.5±8.4 <sup>a</sup>	45.0±0.2 <sup>a</sup>	52.2±39.6 <sup>a</sup>	31.9±0.3 <sup>b</sup>
HUFA (EPA+DHA)	25.1±1.0 <sup>b</sup>	19.4±6.8 <sup>a</sup>	25.3±0.2 <sup>b</sup>	17.8±13.7 <sup>a</sup>	16.6±0.5 <sup>c</sup>
<b>Proporción</b>					
DHA/EPA	2.2±0.1 <sup>a</sup>	0.7±0.3 <sup>b</sup>	0.6±0.1 <sup>b</sup>	0.8±0.0 <sup>c</sup>	0.3±0.0 <sup>d</sup>
EPA/ARA	2.9±0.4 <sup>a</sup>	1.7±0.1 <sup>b</sup>	1.9±0.0 <sup>c</sup>	1.8±0.1 <sup>c</sup>	2.1±0.0 <sup>d</sup>

Tabla 14. Composición de ácidos grasos de adultos de *P. euryhalinus* alimentados con diferentes dietas microalgales. (AG=Ácidos grasos, ISX= *Isochrysis* sp., TES= *Tetraselmis suecica*, CHM= *Chaetoceros muelleri*, RHS= *Rhodomonas salina* y NNO= *Nannochloropsis oculata*). Datos expresados como porcentaje del total de ácidos grasos.

AG	ISX	TES	CHM	RHS	NNO
C14:0	9.7±0.5	13.7±0.2	12.3±1.6	8.4±2.0	6.9±0.5
C14:1ω5	-	0.2±0.0	-	-	-
C15:0	0.4±0.0	0.6±0.0	0.7±0.1	0.4±0.2	0.8±0.4
C15:1ω5	-	-	0.0±0.1	0.2±0.3	-
C16:0	14.3±0.0	14.8±0.0	15.9±2.5	19.4±4.6	21.7±4.4
C16:1ω9	5.5±0.4	16.1±0.3	17.0±1.2	0.7±0.4	12.1±0.0
C16:1ω7	0.2±0.0	0.5±0.0	0.5±0.0	2.3±0.0	0.4±0.0
C16:2ω6c	0.4±0.0	1.3±0.0	1.4±0.1	0.2±0.1	0.8±0.1
C16:2ω6t	0.7±0.0	1.5±0.0	1.6±0.1	-	0.6±0.4
C17:0	0.6±0.0	0.3±0.0	0.3±0.0	2.4±1.0	0.9±0.7
C16:3ω3	0.4±0.0	2.9±0.2	3.0±0.0	0.2±0.1	1.4±0.7
C16:4ω3	0.1±0.0	-	0.1±0.1	-	-
C18:0	3.4±0.4	3.7±0.2	3.5±0.2	5.4±2.3	5.6±2.0
C18:1ω9c+t	7.9±0.6	1.2±0.1	1.6±0.7	7.5±2.4	5.4±3.5
C18:1ω9c	2.7±0.2	3.0±0.1	2.7±0.5	4.5±1.7	3.0±1.5
C18:2ω6c	0.1±0.0	0.2±0.1	0.1±0.1	-	0.3±0.2
C18:2ω6t	4.6±0.5	1.2±0.1	1.4±0.4	10.7±0.1	2.8±2.6
C18:3ω6t	0.1±0.0	0.2±0.0	0.6±0.7	-	-
C18:3ω6c	0.9±1.0	2.3±0.0	2.7±0.6	2.0±0.0	1.6±1.1
C18:3ω3	5.1±0.5	0.2±0.1	0.5±0.4	8.4±3.4	2.0±2.8
C18:4ω6	-	0.2±0.0	0.2±0.0	-	0.0±0.0
C18:4ω3	9.2±1.0	1.1±0.0	1.3±0.3	6.1±3.1	2.8±2.7
C20:0	0.3±0.0	0.6±0.0	0.5±0.1	0.4±0.2	0.8±0.4
C20:1ω9	0.2±0.0	0.3±0.0	0.3±0.0	0.6±0.2	0.3±0.3
C20:2ω6	0.9±0.0	0.2±0.0	0.3±0.0	1.5±0.0	0.5±0.5
C20:3ω6	0.2±0.0	0.3±0.0	0.4±0.1	0.2±0.0	0.4±0.1
C21:0	0.7±0.0	-	-	-	-
C20:4ω6	2.7±0.3 <sup>a</sup>	8.0±0.1 <sup>b</sup>	7.4±1.0 <sup>b</sup>	3.0±1.0 <sup>a</sup>	4.9±1.5 <sup>c</sup>
C20:5ω3	5.7±0.4 <sup>a</sup>	14.7±0.2 <sup>b</sup>	14.4±0.6 <sup>b</sup>	6.1±3.7 <sup>a</sup>	12.3±0.2 <sup>c</sup>
C22:0	0.4±0.1	1.0±0.0	1.0±0.2	0.6±0.1	0.6±0.1
C22:1ω9	0.3±0.0	0.7±0.0	0.6±0.2	0.4±0.1	0.4±0.1
C22:5ω3	1.0±0.0	0.4±0.0	0.5±0.0	-	0.2±0.0
C22:6ω3	19.2±1.1 <sup>a</sup>	8.5±0.2 <sup>b</sup>	6.8±2.9 <sup>c</sup>	6.8±5.0 <sup>c</sup>	9.3±7.2 <sup>b</sup>
C24:0	-	0.4±0.2	0.5±0.1	-	0.2±0.2
C24:1n9	2.0±0.1	-	-	1.7±0.5	1.0±1.0
<b>Total de ácidos grasos por grupo</b>					
SAT	29.9±12.6 <sup>a</sup>	35.0±6.7 <sup>b</sup>	34.7±0.4 <sup>b</sup>	37.0±10.5 <sup>b</sup>	37.4±2.0 <sup>b</sup>
MONO	18.8±7.8 <sup>a</sup>	21.8±10.6 <sup>b</sup>	22.9±1.2 <sup>b</sup>	17.8±5.5 <sup>a</sup>	31.0±3.7 <sup>c</sup>
PUFA	51.3±21.1 <sup>a</sup>	43.1±9.6 <sup>a</sup>	42.4±1.6 <sup>a</sup>	45.2±16.0 <sup>a</sup>	31.6±5.7 <sup>b</sup>
HUFA (EPA+DHA)	24.9±11.4 <sup>a</sup>	23.2±0.3 <sup>a</sup>	21.2±3.4 <sup>a</sup>	12.9±8.7 <sup>b</sup>	21.7±7.0 <sup>a</sup>
<b>Proporción</b>					
DHA/EPA	3.4±0.1 <sup>a</sup>	0.6±0.6 <sup>b</sup>	0.5±0.2 <sup>b</sup>	1.1±0.2 <sup>c</sup>	0.8±0.8 <sup>a</sup>
EPA/ARA	2.1±0.1 <sup>a</sup>	1.9±0.1 <sup>a</sup>	2.0±0.2 <sup>a</sup>	2.0±0.6 <sup>a</sup>	2.7±0.6 <sup>b</sup>

## 4. Discusión

---

La temperatura y la dieta (en calidad y cantidad) son dos de los factores más importantes que regulan el desarrollo de los organismos. La temperatura es el principal factor que afecta los parámetros de cultivo de los copépodos en un ambiente donde el alimento no es un factor limitante (Uye, 1988; Klein Breteler y González, 1988; Takahashi y Ohno *et al.*, 1996; Bonnet *et al.*, 2009; y Rhyne *et al.*, 2009).

Los resultados de este trabajo indican que la duración del desarrollo de *P. euryhalinus* disminuyó inversamente con la temperatura. Similarmente, en *P. newmani*, *Acartia* sp. y *P. pelagicus* el tiempo de desarrollo del estadio naupliar al estadio adulto disminuyó exponencialmente cuando aumentó la temperatura (Lee *et al.*, 2003; Chinnery y Williams, 2003; Rhyne *et al.*, 2009). Sin embargo, el crecimiento (longitud del prosoma) y supervivencia de *P. euryhalinus* fue más alto a temperaturas intermedias (21.9 y 24.2°C), por lo que los resultados de este trabajo sugieren que temperaturas fuera de estos valores causen estrés fisiológico.

El tiempo de maduración de *P. euryhalinus* disminuyó cuando se cultivaron a altas temperaturas, este efecto también ha sido observado en otras especies de copépodos calanoides como *P. pelagicus*, donde la primera maduración ocurrió alrededor del día 7 y 11 a 34°C y 24°C, respectivamente y la edad de la población total madura a los 8 y 13 días, a 34 y 24°C, respectivamente (Rhyne *et al.*, 2009).

La temperatura superficial del mar (15°C), del lugar donde se colectaron los copépodos usados en este estudio es similar a las zonas templadas donde se distribuye *P. euryhalinus*, sin embargo, esta especie también ha sido colectada en el Estero del Yugo, Mazatlan, Sinaloa, México, un área cálida de la costa noroeste de México (Puello-Cruz, comunicación personal) y ha sido exitosamente cultivada a 27±1°C (Puello-Cruz *et al.*, 2009). Los resultados de este estudio muestran que *P. euryhalinus*

pueden tolerar un amplio intervalo de temperaturas, aunque a 30.1 °C la supervivencia fue baja (58.4%), probablemente porque la especie de Ensenada, B.C. está adaptada a temperaturas más bajas, comparada con la especie de Mazatlán.

La temperatura también afectó también la maduración (porcentaje de hembras ovígeras) y la fecundidad, ya que ambos parámetros se incrementaron con las temperaturas intermedias (24.2-27.8°C) y disminuyeron en las temperaturas extremas (19.4 y 30.1°C), tal y como Rhyne *et al.* (2009), lo reportaron para el copépodo *P. pelagicus*. Similarmente, la supervivencia baja de los copépodos que fueron cultivados a temperaturas extremas (19.4 y 30.1°C) confirma los efectos negativos de las temperaturas extremas en los estadios tempranos de *P. euryhalinus*.

En el experimento de producción naupliar, los copépodos adultos que fueron expuestos a altas temperaturas, tuvieron una supervivencia de 83.3 a 90%, comparativamente, los copépodos que desde nauplios fueron cultivados a altas temperaturas, tuvieron una supervivencia de 67 y 58.4%, esto puede ser debido a que los adultos son más resistentes al estrés térmico y a la manipulación que los estadios naupliares. Similares tendencias fueron observadas en *P. pelagicus*, con supervivencias de 81.3 y 62.5% en las temperaturas extremas de 24 y 34°C respectivamente y un 100% en la temperatura intermedia de 28 °C (Rhyne *et al.*, 2009).

En *P. euryhalinus*, la producción total naupliar se incrementó en relación directa con la temperatura, la más alta se obtuvo a 30.7°C, sin embargo, las fecundidades y el porcentaje de hembras ovígeras mayores se obtuvieron a 24.2 y 27.8°C, esto puede ser resultado de un corto periodo de interpuestas, como lo define Rhyne *et al.* (2009), brevemente, “*el periodo de interpuestas es el tiempo entre puestas, medido desde el primer día en que un nauplio está presente en dos puestas sucesivas*”, es decir, el tiempo en que se observan nauplios recién eclosionados entre las puestas. Es posible

que cuando *P. euryhalinus* se cultivó a 30.7°C una mayor cantidad de nauplios hayan eclosionado por unidad de tiempo.

Debido a que el número total de huevos en un medio de cultivo está una función directa de la abundancia de hembras, una manera de mejorar la productividad en los cultivos de copépodos es incrementar la proporción de éstas (Drillet *et al.* 2011). Aunque en *P. euryhalinus* en este trabajo y en *P. pelagicus* (Rhyne *et al.*, 2009) la proporción de sexos fue de 1:1 a diferentes temperaturas, en otros copépodos calanoides la temperatura puede afectar la proporción sexual través de dos procesos: a) un mayor número de hembras son producidos por progenie o b) hay reversión sexual dependiente de la temperatura (Lee *et al.*, 2003). En un sentido similar, la limitación de alimento también puede afectar la proporción sexual de los copépodos (Gũsmao y McKinnon, 2009). Es posible que sea necesario que las condiciones ambientales sean extremas para inducir la proporción sexual en *P. euryhalinus*, como ocurre en *P. newmani* (Lee *et al.*, 2003) y otras especies (Gũsmao y McKinnon, 2009).

En conexión con la dieta, Puello-Cruz *et al.* (2009) sugieren el uso de *Chaetoceros muelleri* para el cultivo de *P. euryhalinus* debido a su excelente valor nutricional, sin embargo, en este trabajo se usó *Isochrysis* sp como dieta base porque es una especie fácil de cultivar y tiene un buen perfil de ácidos grasos altamente insaturados, como el ácido docosahexaenoico (22:6  $\omega$ -3) (Pernet *et al.*, 2003) esencial para algunos copépodos marinos (Lee *et al.*, 2006).

La tasa de ingestión de *P. euryhalinus* se incrementó en proporción directa con la concentración de microalgas hasta un punto asintótico. Las poblaciones cultivadas de *Temora*, *Acartia* y *Calanus* han tenido respuestas similares en las tasas de ingestión cuando se incrementan las raciones de alimento (Frost, 1972; Yule y Crisp, 1983; Kiørboe *et al.*, 1985). Sin embargo, en este estudio, la concentración de alimento no tuvo efectos en el crecimiento, desarrollo, porcentaje de hembras ovígeras, fecundidad

y supervivencia. Esto sugiere que, aunque los copépodos consumen más alimento conforme se incrementa la concentración en el medio, sus requerimientos nutricionales son satisfechos incluso con una ración relativamente menor ( $5.47 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  PSO). Es posible que a las altas raciones el exceso de alimento consumido sea excretado sin digerir, sin embargo en este trabajo no se midió la producción de heces, pero Ayukai (1987) ha señalado que en *Acartia omorii* la cantidad de heces producidas por unidad de tiempo se incrementa en una relación lineal conforme se aumenta la tasa de ingestión, esta relación puede ser resultado de una baja eficiencia de asimilación, por lo que probablemente las heces estén compuestas por alimento indigerido y que tengan un alto valor calórico.

La relación entre la tasa de ingestión y el rendimiento de los copépodos (crecimiento, supervivencia y fecundidad) está más relacionado a la calidad de alimento que a la cantidad de alimento ingerida (Band-Schmidt *et al.*, 2008), por lo que el uso de altas densidades de microalgas en el cultivo de copépodos puede ser contraproducente, porque la cantidad de materia orgánica residual (materia excretada y microalgas sedimentadas) puede afectar negativamente la calidad de los factores ambientales, lo que repercutiría y tendría un impacto negativo en el cultivo.

Con estos resultados y considerando que *Isochrysis* sp. es una especie con alto valor nutricional (Brown *et al.*, 1997), la concentración de  $5.47 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  PSO (equivalente a  $380 \times 10^6 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), recomendada por Puello-Cruz *et al.* (2009), es suficiente para satisfacer los requerimientos nutricionales de *P. euryhalinus* durante sus diferentes estadios bajo las condiciones experimentales descritas aquí. De hecho, hay estudios que reportan una ración menor que la usada en este trabajo para otras especies de *Pseudodiaptomus*. Ohs *et al.* (2010) sugiere, para el cultivo de *P. pelagicus* una concentración de  $160 \times 10^3 \text{ células mL}^{-1}$  de *Isochrysis* sp., mientras que Rhyne *et al.* (2009) recomienda una ración diaria de 200 y  $300 \times 10^3 \text{ células mL}^{-1}$  de *Isochrysis galbana* var. Tahitian.

En muchos estudios se han evaluado los efectos de la dieta sobre la biología de copépodos cultivados, los parámetros de cultivo más comunes son el crecimiento individual, crecimiento poblacional, supervivencia, fecundidad, maduración, producción naupliar, tiempo de puestas, así como la composición de ácidos grasos (Nanton, 1998; Payne y Rippingale, 2000,2001; Millione, 2007; Van der Meeren *et al.*, 2008; Rhyne *et al.*, 2009; Ohs *et al.*, 2010; Jeyarag y Santhanam, 2013). Sin embargo, en la especie *P. euryhalinus*, únicamente se ha evaluado el crecimiento poblacional cuando se cultivan con las microalgas *Isochrysis galbana.*, *Chaetoceros muelleri*, *Nannochloropsis oculata* y *Tetraselmis suecica*, los mejores resultados se han obtenido con *C. muelleri* (Puello-Cruz *et al.*, 2009).

En este trabajo se incluyó la microalga *Rhodomonas salina*, por sus altos contenidos en HUFA, especialmente de DHA y EPA y porque se ha usado exitosamente en cultivos de otras especies de copépodos calanoides (Knuckey *et al.*, 2005; Ohs *et al.*, 2010). Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la calidad de la dieta afecta todos los parámetros de cultivo de *P. euryhalinus* y para identificar cuales dietas son las mejores se deben evaluar el mayor número de variables biológicas, todos los parámetros observados y elegir aquellas con base a nuestros objetivos de cultivo.

Tomando en cuenta los parámetros de cultivo, ISX resultó ser la mejor dieta, ya que con esta microalga se observó el mayor crecimiento, supervivencia, fecundidad, porcentaje de hembras ovígeras, producción naupliar total y el menor tiempo de maduración de los copépodos. CHM y TES también resultaron buenas dietas ya que algunos parámetros fueron comparables a ISX, sin diferencias significativas en varios de los parámetros evaluados comparadas con la dieta ISX. Sin embargo con la dieta CHM se observó menor crecimiento de los copépodos y menor producción naupliar total y con TES se observó menor crecimiento y menor supervivencia, comparados con la dieta ISX. Por otra parte, la dieta RHS podría considerarse la cuarta mejor dieta y NNO la peor dieta.

Las características que hacen una dieta microalgal exitosa son varias, las principales son, el valor nutricional, la digestibilidad, el tamaño, la disponibilidad de ser consumida

y su facilidad de cultivo. Con las dietas ISX y TES se obtuvieron las mayores producciones naupliares y sin diferencias entre la supervivencia de sus reproductores, lo que sugiere que la diferencia del tamaño, la distribución homogénea en la columna de agua y el valor nutricional de las microalgas no afectaron este parámetro de cultivo y estas microalgas resultan buenas dietas para los adultos de *P. euryhalinus*. Sin embargo en cuanto a la supervivencia de los copépodos considerando desde el estadio de nauplios, con las dietas como TES, RHS y NNO no tuvieron los mismos resultados que con ISX y CHM. Las microalgas TES y RHS son especies más grandes (hasta 25  $\mu\text{m}$ ), lo que probablemente limitó su ingestión por su tamaño en el estadio naupliar además, estas microalgas por su peso y características tienden a precipitarse, por lo que no estarían disponibles en toda la columna de agua para los nauplios de *P. euryhalinus* que tienen comportamiento planctónico y la ingestión sería más limitada, caso contrario a los adultos que son semibentónicos y pudieran estar más en contacto con las microalgas y filtrarlas. En el caso de NNO siendo una especie muy pequeña (1.5 a 2  $\mu\text{m}$ ), su ingestión pudo ser limitada en el estadio adulto de *P. euryhalinus*, como lo sugiere Puello-Cruz *et al.* (2009) para esta misma especie, además, su pared celular es muy rígida, por lo que tal vez los copépodos no la pudieron digerir.

En lo que respecta al valor nutricional de las dietas microalgales, la composición y el contenido de AG fue diferente entre las diferentes especies. En la cantidad de HUFA, la dieta ISX se caracterizó por su mayor proporción de DHA, mientras que la dieta NNO por sus altos contenidos en EPA. En las dietas TES, RHS y CHM el HUFA más abundante fue el ARA. Estos resultados fueron acordes a lo reportado en diversos trabajos (Zittelli *et al.*, 1999; Pernet *et al.*, 2003; Tzovenis *et al.*, 2003; Anzueto-Sánchez, 2008). El ácido linoleico (LOA; 18:2  $\omega$ 6) estuvo presente en todas las dietas, así como el ácido linolénico (LNA; 18:3  $\omega$ 3), excepto en la dieta NNO.

La relación DHA/EPA no fue determinada en las dietas ISX, TES y NNO, debido a que no se encontró uno u otro AG, la relación EPA/ARA se encontró en todas las dietas, excepto en ISX, observándose la más alta en NNO.

Respecto a los copépodos, la composición de ácidos grasos de *P. euryhalinus* alimentados con cualquier dieta y en cualquiera de sus tres estadios fue caracterizada por sus altos niveles de HUFA, particularmente de DHA y EPA, también se encontraron el ARA, el LOA y el LNA en menores proporciones.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que, en vista de que en los copépodos se encontraron todos los HUFA al alimentarlos con cualquier microalga y no en todas las dietas estaban presentes todos los HUFA, los copépodos pudieron incorporar los ácidos grasos DHA, EPA o ARA de alguna fuente diferente a la dieta microalgal suministrada (e.g. por acumulación de bacterias en el tracto), sumado a una capacidad limitada de síntesis, ya que es conocido que algunas especies de calanoides como *Paracalanus parvus* si pueden sintetizar HUFA a partir de LNA (Moreno *et al.*, 1979), de igual forma en el calanoide *Gladioferens imparipes* pudiera existir esta síntesis, ya que en un experimento realizado al alimentarlos con la microalga *D. tertiolecta* se encontraron DHA y EPA, aunque en menores proporciones que al alimentarlos con *Isochrysis* sp. que es rica en DHA, por lo que pudieran sintetizar esos ácidos grasos de manera limitada a partir de LNA proveniente de la dieta. Aunque en general los copépodos calanoides son incapaces de sintetizar HUFA a partir de ácidos grasos precursores esto sí se ha observado ampliamente en especies de copépodos harpacticoides, como *Tisbe* sp. y *Tigriopus* sp. que pueden producir cantidades significativas de EPA y DHA cuando son alimentados con dietas microalgales como *D. tertiolecta* o incluso con levaduras, carentes de estos ácidos grasos, por lo que no es indispensable que estén en la dieta (Nanton y Castell, 1999). Los copépodos harpacticoides como *Tisbe* sp. y *Tigriopus* sp. son capaces de sintetizar cantidades significativas de EPA y DHA a partir de precursores como el LNA porque tienen las enzimas  $\Delta$ -5 desaturasa y  $\Delta$ -6 elongasa necesarias para la conversión (Nanton, 1998), ya que como se mencionó anteriormente, en ausencia de estas enzimas, los organismos requieren dietas ricas en DHA y EPA.

En lo que respecta a la calidad de *P. euryhalinus* como presa, los copépodos alimentados con ISX tuvieron los mayores contenidos de DHA en todos los estadios y, de la misma manera el contenido más alto en la proporción DHA/EPA (de 2.2 a 3.4). En este aspecto, ISX resultó ser la mejor dieta ya que produce la mejor proporción DHA/EPA. El balance óptimo entre los ácidos grasos  $\omega_3$  y  $\omega_6$  varía entre especies (Glencross, 2009), sin embargo para la proporción DHA/EPA se busca que el DHA esté en mayores cantidades que el EPA, ya que una proporción baja puede afectar el crecimiento y la calidad de las larvas de peces marinos, como ha sido observado en el lenguado *Scophthalmus maximus* (Rainuzzo *et al.*, 1997).

Respecto a la proporción EPA/ARA también se busca que el EPA esté en mayor proporción, ya que afecta también procesos como la pigmentación de las larvas, como se ha observado en *Hippoglossus hippoglossus* (Hamre *et al.*, 2007). En este sentido, si se toma en cuenta la proporción de EPA/ARA, la dieta NNO podría ser considerada como la mejor, ya que se obtuvieron buenas proporciones en todos los estadios de *P. euryhalinus*, sin embargo no podemos considerar esta dieta para el cultivo de *P. euryhalinus* debido al pobre desempeño de esta dieta en los parámetros de cultivo obtenidos. Tomando en cuenta estos resultados, creemos que una dieta mixta adecuada, empleando la combinación de las mejores dietas utilizadas en este trabajo, pueden influir de manera positiva en todos los parámetros de cultivo y la composición de AG de *P. euryhalinus*, ya que la falta de un nutriente en una de las dietas de una se puede complementar con la otra, como lo demuestran trabajos anteriores (Lee *et al.*, 2006; Ohs *et al.*, 2010). Cázares-Salazar (2014), evaluó algunos de los parámetros de cultivo (crecimiento, supervivencia, porcentaje de hembras ovígeras) y composición de ácidos grasos en el estadio adulto de *P. euryhalinus* mezclando las microalgas *Isochrysis galbana*, *Rhodomonas salina* y *Chaetoceros muelleri* a una proporción de 1:1 en base al peso seco orgánico. Los mejores resultados en los parámetros de cultivo se obtuvieron con la mezcla *I.galbana*: *C. muelleri*, con una supervivencia del 90.3%, un porcentaje de hembras ovígeras del 48% y una longitud del prosoma de las hembras de 928  $\mu\text{m}$ . En cuanto a la composición de ácidos grasos de los copépodos en su estadio adulto, la cantidad más alta de DHA se obtuvo con la mezcla *I.galbana*: *R. salina* (9.5%)

y la de EPA con la mezcla *C. muelleri*: *R. salina* (11%). Respecto a las proporciones DHA/EPA y EPA/ARA, las más altas fueron con la mezcla *I. galbana* y *R. salina* (3.3 y 3.5, respectivamente). Los parámetros de cultivo observados por Cázares-Salazar (2014) no fueron superiores a los obtenidos en este trabajo en donde se usaron dietas monoalgales, excepto en la supervivencia, donde la más alta se obtuvo con la dieta ISX (80.2 %). El porcentaje de hembras ovígeras observadas en este trabajo fue mayor (68.7%) y la talla máxima de las hembras fue casi la misma (929  $\mu\text{m}$ ).

Respecto a los HUFA, en este trabajo se observó 19.2% de DHA en los copépodos alimentados con ISX y 12.3% de EPA en los alimentados con NNO. Y 3.4 y 2.7 en las proporciones DHA/EPA y EPA/ARA, respectivamente, que son similares a las obtenidas por Cázares-Salazar (2014). Las dietas mixtas han demostrado en muchos casos ser mejores que las dietas monoalgales, sin embargo una buena dieta monoalgal puede ser tan efectiva o mejor que una dieta mixta. Incluso en algunos parámetros de cultivo como la fecundidad y viabilidad de los huevos, una dieta mixta ha resultado ser menos beneficiosa en cultivos del copépodo *Temora stylifera*, ya que la cantidad y calidad de la dieta es especie-específica y lo que es una buena dieta para una especie puede no ser para otra, debido a las características de los copépodos, como hábitos alimenticios, adaptación a ciertos tipos de alimento, demandas nutricionales y hasta la tolerancia de algunas sustancias tóxicas de las microalgas (Buttino *et al.*, 2009). Los resultados de Cázares-Salazar (2014) son buenos en cuanto a la supervivencia, sin embargo faltarían por evaluar otros atributos de *P. euryhalinus*, como la fecundidad y la producción naupliar al alimentarlos con estas mezclas para conocer otros beneficios de las mezclas de microalgas en esta especie de copépodo.

Por otra parte, evaluando las proporciones de HUFA en las dietas microalgales para el cultivo de *P. euryhalinus*, Payne y Rippingale (2000) sugieren que la proporción DHA/EPA en una dieta microalgal es más importante incluso que el contenido de HUFA para maximizar la producción de huevos en copépodos calanoides como *Gladioferens imparipes*. En este trabajo la proporción DHA/EPA no está relacionada con la fecundidad, ya que dietas como ISX, TES y CHM con diferentes proporciones no

tuvieron un efecto significativo en la producción de huevos, como se observa también en el copépodo *Paracyclops nana* (Lee *et al.*, 2006).

Finalmente, *P. euryhalinus* es una especie con alto potencial acuícola como lo son otros copépodos pertenecientes a este género, los que comúnmente son organismos muy resistentes, pudiendo tolerar condiciones adversas en su cultivo como una aireación fuerte y la presencia de sedimentos y sólidos en suspensión en el agua (Rhyne *et al.*, 2009), el ciclo de vida es relativamente corto y se pueden cultivar muchas generaciones simultáneamente y obtener una cantidad significativa de nauplios por hembra, que es una de las características que se buscan ampliamente en acuicultura (Carli *et al.*, 1995). En este trabajo, la producción máxima de nauplios en un periodo de 10 días fue de 1121 nauplios utilizando la dieta *Isochrysis* sp, lo que equivale a una producción aproximada de  $11.2 \text{ nauplios} \cdot \text{hembra}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ , estos valores son muy similares a los reportados por Rhyne *et al.* (2009) para la especie *P. pelagicus*, con una producción máxima de  $9.8 \text{ nauplios} \cdot \text{hembra}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$  en un periodo de 25 días. Por otra parte, Ohs *et al.* (2010) reporta para *P. pelagicus* una producción máxima de  $4.8 \text{ nauplios} \cdot \text{hembra}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$  en un periodo de 25 días.

## 5. Conclusiones

---

La temperatura afectó significativamente el tiempo de desarrollo, el porcentaje de hembras ovígeras, la fecundidad, el crecimiento y la supervivencia de *P. euryhalinus*, pero no la proporción sexual, observándose que la temperatura óptima para su cultivo fue de 24.2°C y en esta condición tienen altas supervivencias y mayores crecimientos y en general, las hembras tienen buen desempeño, medido a través de los parámetros de cultivo (porcentaje de hembras ovígeras, fecundidad y producción naupliar).

Respecto al alimento, la concentración de *Isochrysis* sp. superior a 5.47 mg·L<sup>-1</sup> de PSO no mejora los parámetros de cultivo de los copépodos, por lo que se recomienda mantener esta ración para el cultivo de *P. euryhalinus*. Por otro lado, los resultados indican que *Isochrysis* sp. fue la mejor dieta para el cultivo de *P. euryhalinus*, tomando en cuenta los parámetros de cultivo y la composición de HUFA, esta composición no refleja la de aquellas especies donde no se detectaron estos AG, por lo que es posible que *P. euryhalinus* los incorpore de alguna fuente adicional presente en el medio de cultivo y/o como producto de una capacidad de síntesis, por lo que se sugiere el desarrollo de experimentos para explicar la presencia de estos AG.

## Referencias bibliográficas

- Arredondo-Vega, B .O., Rebollar, R., Hernández-Espinosa, L. D., Heredia Tapia, A. y Ceseña, C. (2000). Eicosenoides: precursores de las prostaglandinas. *Revista de Divulgación Científica del Noroeste, ANUIES*, 2: 6-9.
- Anzueto-Sánchez, M.A. (2008). Evaluación del cultivo continuo de tres especies microalgales. (Tesis de maestría). Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). México. 60 pp.
- Abu-Rezq, T.S., Yule, A.B. y Teng. S.K. (1997). Ingestion, fecundity, growth rates and culture of the harpacticoid copepod *Tisbe furcata*, in the laboratory. *Hydrobiologia*, 347(1-3):109-118.
- Ayukai, T. (1987). Rate of filtering of fecal pellets by *Acartia omorii* (Copepoda: Calanoida). *Journal of the Oceanographical Society of Japan*, 42(6):487-489.
- Band-Schmitd, C.J., Pacheco-Chávez, R. y Hernández-Trujillo S. (2008). Influence of phytoplankton diets on the ingestion rate and egg production of *Acartia clausi* and *A. Lilljeborgii* (Copepoda: Calanoida) from Bahía de La Paz, Gulf of California. *Hidrobiológica*, 18(1):133-140.
- Bligh, G.E., y Dyer, J.W. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 37(3):911-917.
- Bonnet D, Harris R.P., Yebra, L., Guilhaumon, F., Conway, D.V., Hirst, A.G. (2009). Temperature effects on *Calanus helgolandicus* (Copepoda: Calanoida) development time and egg production. *Journal of Plankton Research*, 31(1):31-34.
- Brett, M. T. y Müller-Navarra, D. (1997). The role of highly unsaturated fatty acids in aquatic foodweb processes. *Freshwater Biology*, 38(3):483-499.
- Buskey, E.J. (2005). Behavioral Characteristics of Copepods That Affect Their Suitability as Food for Larval Fishes. En: Cheng-Sheng L., O'Bryen P., y Marcus N.H., 2005. *Copepods in Aquaculture*. Blackwell. 269 pp.

- Buttino, I., Ianora, A., Buono, S. Vitello, V. Sansone, G. y Miralto A. (2009). Are monoalgal diets inferior to pluri-algal diets to maximize cultivation of the calanoid copepod *Temora stylifera*?. *Marine Biology*, 156(6):1171-1182.
- Calbet, A., Carlotti, F. y Gaudy, R. (2007). The feeding ecology of the copepod *Centropages typicus* (Kröyer). *Progress in Oceanography*, 72(2):137-150.
- Carreón-Palau, L., Rodríguez, J.A. y Arjona-López, M.A. (2007). Determinación de ácidos grasos por cromatografía de gases-espectrometría de masas. En: Arredondo-Vega B.O y Voltolina, D. (2007). *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, Baja California Sur, México. 97 pp.
- Carli, A., Mariottini, G.L. y Pane, L. (1995). Influence of nutrition on fecundity and survival in *Tigriopus fulvus* Fischer (Copepoda: Harpacticoida). *Aquaculture*, 134(1):113-119.
- Cazares- Salazar, A. (2014). Efecto de dietas mixtas de microalgas marinas en el cultivo y composición de ácidos grasos esenciales del copépodo *Pseudodiaptomus euryhalinus*. (Tesis de maestría). Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). 55 pp.
- Chinnery, F.E y Williams, J.A. (2003). Photoperiod and temperature regulation of diapause egg production in *Acartia bifilosa* from Southampton Water. *Marine Ecology Progress Series*, 263:149-157.
- Cook, K.B., Bunker, A., Hay, S., Hirst, Speirs, D.C. (2007) Naupliar development times and survival of the copepod *Calanus helgolandicus* and *Calanus finmarchicus* in relation to food and temperature. *Journal of Plankton Research*, 29(9):757-767.
- Copeman, L.A., Parrish, C.C., Brown, J.A. y Harel, M. (2002). Effects of docosahexaenoic, eicosapentaenoic, and arachidonic acids on the early growth, survival, lipid composition and pigmentation of yellowtail flounder (*Limanda ferruginea*): a live food enrichment experiment. *Aquaculture*, 210(1):285-303.

- Cossins, A.R. y Proser. C.L. (1978). Evolutionary adaptation of membranes to temperature. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 4(75):2040-2043.
- De Lima C.M. y Souza-Santos, L.P. (2007). The ingestion rate of *Litopenaeus vannamei* larvae as a function of *Tisbe biminiensis* copepod concentration. *Aquaculture*, 271(1):411-419.
- Drillet, G., Frouel, S., Sichlau, M.H., Jepsen, P.M., Hojgaard, J.K., Joarder, A.K. y Hansen, B.W. (2011). Status and recommendations on marine copepods cultivation for use as live feed. *Aquaculture*, 315(3):155-166.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K. Rebers P.A. y Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3):350-356.
- Evjemo, J.O., Reitan, K.I. y Olsen. Y. (2003). Copepods as live food organisms in the larval rearing of halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.) with special emphasis on the nutritional value. *Aquaculture*, 227(1): 191-210.
- FAO (2014). El estado mundial de la pesca y acuicultura. Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura. Roma, 2014. 253 pp.
- Farhadian, O., Yusoff, F. y Mohamed, S. (2009). Nutritional values of *Apocyclops dengizicus* (Copepoda: Cyclopoida) fed *Chaetoceros calcitrans* and *Tetraselmis tetrahele*. *Aquaculture Research*, 40(1): 74-82.
- Fleeger, J.W. (2005). The potential to mass-culture harpacticoid copepods for use as food for larval fish. En: Cheng-Sheng L., O'Bryen P., y Marcus N.H., 2005. *Copepods in Aquaculture*. Blackwell Publishing.
- Frost, B.W. (1972). Effects of size and concentration of food particles on the feeding behavior of the marine planktonic copepod *Calanus pacificus*. *Limnology and Oceanography*, 17(6):805-815.
- García-Ortega, A. (2009). Nutrition and feeding research in the spotted rose snapper (*Lutjanus guttatus*) and bulleye puffer (*Sphoeroides annulatus*), new species for marine aquaculture. *Fish Physiology and Biochemistry*, 35(1), 69–80.

- Gasca-Serrano, R. y Suárez-Morales, E. (1996). Introducción al estudio del zooplancton marino. El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR). Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Editorial y Litografía Regina de los Ángeles. 711 pp.
- Gisbert E., Skalli, A., Fernández, I., Kotzamanis Y., Zambonino-Infante, J.L. y Fabregat R. (2012). Protein hydrolysates from yeast and pig blood as alternative raw materials in microdiets for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture*, 338/341(1):96-104.
- Glencross, B. D. (2009). Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture species. *Reviews in Aquaculture*, 1(2)71-124.
- Graeve, M., Albers, C. y Kattner, G. (2005). Assimilation and biosynthesis of lipids in Arctic *Calanus* species based on feeding experiments with a C-13 labelled diatom. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 317(1):109-125.
- Guillard, R.R.L. y Ryther, J.W. (1962). Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detanula confervacea* Cleve. *Canadian Journal of Microbiology*, 8(2):229-239.
- Gusmão, L.F.M y McKinnon, A.D. (2009). Sex ratios, intersexuality and sex change in copepods. *Journal of Plankton Research*, 31(9):1101-1117.
- Hamre, K., y Harboe, T. (2008). Artemia enriched with high n-3 HUFA may give a large improvement in performance of Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* larvae. *Aquaculture*, 277(3), 239-243.
- Jeyaraj, N. y Santhanam, P. (2013). Influence of algal diet on population density, egg production and hatching succession of the calanoid copepod, *Paracalanus parvus* (Claus, 1863). *Journal of Algal Biomass Utilization*, 4(1):1-8.
- Johnson, M.W. (1939). *Pseudodiaptomus (Pseudodiaptallous) euryhalinus* a new subgenus and species of copepoda with preliminary notes on its ecology. *Transactions of the American Microscopical Society*, 58(3):349-355.

- Johnson, M.W. (1948). The postembryonic development of the copepod *Pseudodiaptomus euryalinus* Johnson, and its phylogenetic significance. *Transactions of the American Microscopical Society*, 67:319-330.
- Kjørboe, T., Mohlenberg, F. y Hamburger, K. (1985) Bioenergetics of the planktonic copepod *Acartia tonsa*: relation between feeding, egg production and respiration, and composition of specific dynamic action. *Marine Ecology Progress Series*, 26(1-2):85-97.
- Klein Breteler, W.C.M. y González, S.R. (1988) Influence of temperature and food concentration on body size, weight and lipid content of two calanoid copepod species. *Hydrobiologia*, 167(1):201-210.
- Klein Breteler, W.C.M, Koskin, M. y Rampen, S. (2004). Role of essential lipids in copepod nutrition: no evidence for trophic upgrading of food quality by a marine ciliate. *Marine Ecology Progress Series*, 274(1):199-208.
- Knuckey, R.M., Semmens, G.L., Mayer, R.J. y Rimmer, M.A. (2005). Development of an optimal microalgal diet for the culture of the calanoid copepod *Acartia sinjiensis*: Effect of algal species and feed concentration on copepod development. *Aquaculture*, 249(1):339-351.
- Lee, H.W., Ban, S., Ikeda, T. y Matsuishi, T. (2003). Effect of temperature on development growth and reproduction in the marine copepod *Pseudocalanus newmani* at satiating food condition. *Journal of Plankton Research*, 25(3):261-271.
- Lee, R.F., Hagen, W. y Kattner, G. (2006). Lipid storage in marine zooplankton. *Marine Ecology Progress Series*, 307(1):273-306.
- Lacoste, A., Poulet, S.E., Cueff, A., Kattner, G., Lanora, A. y Laabir, M. (2001) New evidence of the copepod maternal food effects on reproduction. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 259(1):85-107.
- Lavens, P. y Sorgeloos, P. (2000). The history, present status and prospects of the availability of *Artemia* cysts for aquaculture. *Aquaculture*, 181(3):397-403.

- Lazo, J.P., (2000). Conocimiento actual y nuevas perspectivas en el desarrollo de dietas para larvas de peces marinos. En: Cruz -Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R., (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán, Mexico.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J. Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biotechnology Chemistry*, 193(1):265-272.
- Marcus, H.N. (2005). Calanoid Copepods, Resting Eggs and Aquaculture. En: Cheng-Sheng L., O'Bryen P., y Marcus N.H. (eds.), 2005. *Copepods in Aquaculture*. Blackwell Publishing.
- Matias-Peralta H, Yusoff, F.M., Shariff, M. y Arshad, A. (2005). Effects of some environmental parameters on the reproduction and development of a tropical marine harpacticoid copepod *Nitocra affinis* f. *californica* Lang. *Marine Pollution Bulletin*, 51(8):722-728.
- McKinnon, A.D., Duggan, S., Nichols, P.D., Rimmer, M.A., Semmens, G. y Robino, B. (2003). The potential of tropical paracalanoid copepods as live feed in aquaculture. *Aquaculture*, 223(1-4): 89-106.
- Miller, D.D. y Marcus, N.H. (1994). The effects of salinity and temperature on the density and sinking velocity of eggs of the calanoid copepod *Acartia tonsa* Dana. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 179(2): 235-252.
- Milione, M, y Zeng, C. (2007). The effects of algal diets on population growth and egg hatching success of the tropical calanoid copepod, *Acartia sinjiensis*. *Aquaculture*, 273(4):656-664.
- Milione, M. y Zeng. C. (2008). The effects of temperature and salinity on population growth and egg hatching success of the tropical calanoid copepod, *Acartia sinjiensis*. *Aquaculture*, 275(1):116-123.
- Mitra, G., Mukhopadhyay, P.K. y Ayyappan, S. (2007). Biochemical composition of zooplankton community grown in freshwater earthen ponds: Nutritional

implications in nursery rearing of fish larvae and early juveniles. *Aquaculture*, 272(1):346-360.

Moreno, V.J., De Moreno, J.E.A. y Brenner, R.R. (1979). Fatty acid metabolism in the calanoid copepod *Paracalanus parvus*: 1. Polyunsaturated fatty acids. *Lipids*, 14(4):313-317.

Muller-Feuga A, Moal, J., y Kaas, R. (2003). The Microalgae of Aquaculture. En: Live Feeds in Marine Aquaculture. Josianne G. Stottrup y Lesley A. McEvoy. Blackwell Science Ltd. 2003 USA. 518 pp.

Nanton, D.A. y Castell, J.D. (1999). The effects of temperature and dietary fatty acids on the fatty acid composition of harpacticoid copepods, for use as a live food for marine fish larvae. *Aquaculture*, 175(1):167-181.

Ohs, C.L., Chang K.L, Grabe S.W., DiMaggio, M.A., Stenn, E. (2010). Evaluation of dietary microalgae for culture of the calanoid copepod *Pseudodiaptomus pelagicus*. *Aquaculture*, 307:225-232.

Olivotto, I., Holt, S.A., Carnevali, O. y Holt, G.J. (2006). Spawning, early development, and first feeding in the lemon peel angelfish *Centropyge flavissimus*. *Aquaculture*, 253(1): 270-278.

Olivotto, I., Buttino, I., Borroni, M. Piccinetti, C.C., Malzone, M.G. y Carnevali, O. (2008). The use of the Mediterranean calanoid copepod *Centropages typicus* in yellowtail clownfish (*Amphiprion clarkii*) larviculture. *Aquaculture*, 284(1):211-216.

Payne, M.F., Rippingale, R.J. y Longmore, R.B. (1998). Growth and survival of juvenile pipefish *Stigmatopora argus* fed live copepods with high and low HUFA content. *Aquaculture*, 167(3):237-245.

Payne, M.F. y Rippingale, R.J. (2000). Evaluation of diets for culture of the calanoid copepod *Gladiferens imparipes*. *Aquaculture*, 187(1):85-96.

Payne, M.F. y Rippingale, R.J. (2001). Intensive cultivation of the calanoid copepod *Gladiferens imparipes*. *Aquaculture*, 201(3):329-342

Palomares R., Suárez-Morales, E. y Hernández-Trujillo. S. (1998). Catálogo de los Copépodos (Crustacea) Pelágicos del Pacífico Mexicano. Centro

Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR-IPN) y El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR). Editorial y Litografía Regina de los Ángeles. 352 pp.

- Pande, S.V, Parvin Khan, R. y Venkitasubramanian, T.A. (1963). Microdetermination of lipids and serum total fatty acids. *Analytical Biochemistry*, 6(5):415-423.
- Patil, V., Kallqvist, T., Olsen, E., Vogt, G. y Gislerod, H.R. (2007). Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed. *Aquaculture International*, 15(1):1-9.
- Peck, M.A. y Holste, L. (2006). Effects of salinity, photoperiod and adult stocking density on egg production and egg hatching success en *Acartia tonsa* (Calanoida: Copepoda): Optimizing intensive cultures. *Aquaculture*, 255(1): 341-350.
- Pernet, F., Tremblay, R., Demers, E. y Roussy, M. (2003). Variation of lipid class and fatty acid composition of *Chaetoceros muelleri* and *Isochrysis* sp. Grown in a semicontinuous system. *Aquaculture*, 221(1):393:406.
- Puello-Cruz, A.C., González-Rodríguez, B. y García, A. (2008). Investigación en producción y uso de copépodos en larvicultura. En: Cruz -Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villareal-Cavazos, D.A, Lazo,J.P. y Viana, M.T. (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola IX. Memorias del IX Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 24-27 Noviembre, 2000. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Mexico.*
- Puello-Cruz, A.C., Mezo-Villalobos, S., González-Rodríguez, B. y Voltolina. D. (2009). Culture of the calanoid copepod *Pseudodiaptomus euryhalinus* (Johnson 1939) with different microalgal diets. *Aquaculture*, 290 (3/4):317-319.
- Rainuzzo, J.R., Reitan, K.I. y Olsen, Y. (1997). The significance of lipids at early stages of marine fish: a review. *Aquaculture*, 155(1):103-115.
- Reitan, K., Rainuzzo, J.R., Oie, G. y Olsen, Y. (1993). Nutritional effects of algal addition in first-feedind of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae. *Aquaculture*, 118(1):257-275.

- Reitan, K.I., Rainuzzo, J.R., Oie, G. y Olsen, Y. (1997). A review of the nutritional effects of algae in marine fish larvae. *Aquaculture*, 155(1):207-221.
- Renaud, S.M., Thinh, L.V., Lambrinidis, G. y Parry, D.L. (2002). Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture*, 211(1):195-214.
- Rhyne, L.A., Ohs, C.L. y Stenn, E. (2009). Effects of temperature on reproduction and survival of the calanoid copepod *Pseudodiaptomus pelagicus*. *Aquaculture*, 292(1):53-59.
- Rippingale R.J. y Payne, M.F. (2001). Intensive cultivation of a calanoid copepod *Gladiferens imparipes*. A guide to procedures. Department of Environmental Biology Curtin University of Technology. 60 pp.
- Sargent, J.R. y Gatten, R.R. (1976). The distribution and metabolism of wax esters in marine vertebrates. *Biochemical Society Transactions*. 4(1):431-433.
- Sargent, J., McEvoy, L., Estevez, A., Bell, G., Bell, M., Henderson, J., y Tocher, D. (1999). Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. *Aquaculture*, 179(1):217-229.
- Shansudin, L., Yusof, M., Asis, A. y Shukri, Y. (1997). The potential of certain indigenous copepod species as live food for commercial fish larval rearing. *Aquaculture*, 151(1):351-356.
- Schipp, G.R., Bosmans, J.M.P y Marshall, A.J. (1999). A method for hatchery culture of tropical calanoid copepods, *Acartia* spp. *Aquaculture*, 174(1):81-88.
- Sørensen, T.F., Drillet, G., Engell-Sorensen, K. Hansen, B.W. y Ramlov, H. (2007). Production and biochemical composition of eggs from neritic calanoid copepods reared in large outdoor tanks (Limfjord, Denmark). *Aquaculture*, 263:84-96.
- Sorokin, C. (1973). Dry weight, packed cell volume and optical density. En: AUTORES. (eds.). *Handbook of Phycological Methods. Culture methods and growth measurement*. Cambridge University Press. 448 pp.

- Stottrup, J.G y Norsker, N.H. (1997). Production and use of copepods in marine fish larviculture. *Aquaculture*, 155(1):231-247.
- Sukenik, A., Zmora, O. y Carmeli, Y. (1993). Biochemical quality of marine unicellularunicellular algae with special emphasis on lipid composition. II. *Nannochloropsis*. *Aquaculture*, 117(1):313-326.
- Takahashi, T. y Ohno, A. (1996). The temperature effect on the development of calanoid copepod, *Acartia tsuensis*, with some comments to morphogenesis. *Journal of Oceanography*, 52(1):125-137.
- Uttaro, A. (2006). Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in lower eukaryotes. *Life*, 58(10):563-571.
- Uye, S.I. (1988). Temperature-dependent development and growth of *Calanus sinicus* (Copepoda: Calanoida) in the laboratory. *Hydrobiologia*, 167(1):285-293.
- Van der Meeren, T., Olsen, R.E., Hamre, K., y Fyhn, H.J. (2008). Biochemical composition of copepods for evaluation of feed quality in production of juvenile marine fish. *Aquaculture*, 274(2):375-397.
- Wilson, C.B. (1932). The copepods of the woods hole region Massachusetts. Department of Science, State Normal School Westfield, Mass. Smithsonian Institution United States National Museum. Bulletin 158. 635 pp.
- Woo Lee, K, Gi Park, H., Sang-Min, L. y Hyung-Ku, K. (2006). Effects of diets on the growth of the brackish water cyclopoid copepod *Paracyclops nana* Smirnov. *Aquaculture*, 256(1):346-353.
- Zhang, J., Wu, C., Pellegrini, D., Romano, G., Esposito, F., LAnora, A. y Buttino, I. (2013). Effects of different monoalgal diets on egg production, hatching success and apoptosis induction in a Mediterranean population of the calanoid copepod *Acartia tonsa* (Dana). *Aquaculture*, 400(1):65-72.