

**Centro de Investigación Científica y de Educación  
Superior de Ensenada, Baja California**



---

**Maestría en Ciencias  
en Acuicultura**

---

**Desarrollo larval y composición de ácidos grasos de la langosta  
roja *Panulirus interruptus* alimentada con nauplios de *Artemia  
franciscana* enriquecidos con diferentes dietas**

Tesis

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

Presenta:

**Jonathan Pinto Jiménez**

Ensenada, Baja California, México  
2016

Tesis defendida por  
**Jonathan Pinto Jiménez**

y aprobada por el siguiente Comité

---

Dr. Eugenio Díaz Iglesias  
Codirector de tesis

---

Dra. Beatriz Cordero Esquivel  
Codirector de tesis

**Dra. Mónica Hernández Rodríguez**  
**Dra. Bertha Eugenia Lavaniegos Espejo**  
**Dra. Diana Tentori Santa Cruz**



---

Dr. Benjamín Barón Sevilla  
Coordinador del Posgrado en Ciencias en Acuicultura

---

Dra. Rufina Hernández Martínez  
Directora de Estudios de Posgrado

*Jonathan Pinto Jiménez © 2016*

*Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis*

Resumen de la tesis que presenta **Jonathan Pinto Jiménez** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura

**Desarrollo larval y composición de ácidos grasos de la langosta roja *Panulirus interruptus* alimentada con nauplios de *Artemia franciscana* enriquecidos con diferentes dietas**

Resumen aprobado por:

---

Dr. Eugenio Díaz Iglesias  
Codirector de tesis

---

Dra. Beatriz Cordero Esquivel  
Codirector de tesis

La langosta roja *Panulirus interruptus*, representa un ingreso económico sustancial para México. Sin embargo, aunque la pesca de esta especie se considera estable, las poblaciones se encuentran en su máximo sostenible. La langosticultura es una opción sustentable para satisfacer la demanda en el mercado. No obstante, existen diferentes factores que han impedido su desarrollo a escala industrial, principalmente debido a cuestiones tecnológicas y nutricionales durante el desarrollo larval. En esta investigación, se evaluó el efecto de dos dietas en el desarrollo de larvas filosoma tempranas, a base de *Artemia franciscana* enriquecida con dos fuentes de ácidos grasos altamente insaturados. El enriquecimiento se aplicó por tres horas con dos tratamientos, uno con una mezcla de las microalgas marinas *Isochrysis* sp. y *Phaeodactylum tricornutum* en combinación con aceite comercial Omegamex® en relación 1:1 (MA+A), y otro con uso exclusivo de aceite Omegamex® (A). No se encontraron diferencias significativas en la supervivencia y el crecimiento entre los tratamientos en los estadios II al IV. La duración del periodo de intermuda fue menor en las larvas estadio III (18 días) alimentadas con la dieta A. Sin embargo, en los estadios III y IV las larvas alimentadas con la dieta MA+A presentaron un mayor peso seco y peso orgánico. El análisis de ácidos grasos de las dietas dio como resultado una baja concentración de ácidos grasos polinsaturados (AGPI) en la dieta MA+A, siendo más alta en la dieta A (4.75 %, 1.66  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ). La concentración de DHA, fue mayor en la dieta A (0.73 %, 0.15  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ), y no se encontraron diferencias significativas en EPA y ARA. En las filosomata, la mayor concentración de AGPI y AGAI fue en el estadio II alimentadas con la dieta MA+A, mientras que el DHA, fue mayor en las larvas alimentadas con la dieta A en los estadios III y IV, lo cual refleja la mayor concentración de este ácido graso en la dieta A. A pesar de tener bajas concentraciones de ARA (0.01- 0.02  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) en las dietas, las filosomata presentaron altas concentraciones de éste ácido graso en ambos tratamientos (3.94-7.23  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ), lo que podría sugerir que las larvas tempranas de *P. interruptus* tienen la capacidad de secuestrar de manera preferencial ciertos ácidos grasos debido a su alto requerimiento.

Palabras clave: **Filosoma, *Panulirus interruptus*, microalgas, dietas mixtas, *Artemia* enriquecida, ácidos grasos.**

Abstract of the thesis presented by **Jonathan Pinto Jiménez** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Aquaculture.

**Larval development and fatty acid composition of the red lobster *Panulirus interruptus* feed with *Artemia franciscana* nauplii enriched with different diets.**

Abstract approved by:

---

Dr. Eugenio Díaz Iglesias  
Thesis codirector

---

Dra. Beatriz Cordero Esquivel  
Thesis codirector

The fishery of red lobster *Panulirus interruptus* represents a substantial economic income for México. However, although the fishery is considered stable, the populations are in the maximum sustainable yield. The lobster aquaculture could be a suitable option to satisfy the market demand. However, there are different factors affecting its development to industrial scale, mainly due to technological and nutritional issues during the larval development. In this research the effect of two types of diet on the development of early phyllosoma stages were tested using *Artemia franciscana* nauplii enriched with two sources of highly unsaturated fatty acids. Two treatments were used: a mixture of the microalgae *Isochrysis* sp. and *Phaeodactylum tricornutum* in combination with the commercial oil Omegamex® with 1:1 ratio (MA+A), and the other with Omegamex® oil only (A). There were no significant differences in survival and growth (total length) between treatments at phyllosoma stages II, III and IV. The intermoult period was significantly shorter at stage III (18 days) in feed with diet A. Larval stages III and IV feed with MA+A had higher dry and organic weight. The fatty acid analysis in diets showed low polyunsaturated fatty acids (PUFA) concentrations, being higher in diet A (4.75 %, 1.66  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ). The DHA concentration was also higher in the diet A (0.73 %, 0.15  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) and no significant differences were found in EPA and ARA concentrations between diets. In phyllosomata stage II PUFA and highly unsaturated fatty acids were significantly higher in the phyllosoma feed with treatment MA+A. However, DHA concentration was significantly higher in phyllosoma feed with treatment A in stages III and IV, and reflected the higher concentration of DHA present in diet. Despite low concentration of ARA in diets, the phyllosomata presented high concentrations from both treatments, suggesting that early larvae of *P. interruptus* can preferentially sequester certain kind of high output fatty acids.

**Keywords:** Phyllosoma, *Panulirus interruptus*, microalgae, mixed diets, enriched *Artemia*, fatty acids

## Dedicatoria

---

**A mis padres: Alicia Jiménez Medrano y Luis Ramón Pinto Ávila quienes siempre me han apoyado incondicionalmente, quienes me han dado todo. Me han encaminado a superarme y principalmente a continuar realizándome. Gracias por creer en mí, los amo.**

**A mis abuelos: Julián Jiménez Morales Q.E.D. la persona más noble que he conocido en mi vida, abuelo siempre estás conmigo. Y a mi abuela Leonor Medrano Ortega, abuela gracias por enseñarme y compartir conmigo ese amor, respeto y admiración por la naturaleza.**

## Agradecimientos

---

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) y al Departamento de Acuicultura por la oportunidad de realizar mi maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada para realizar la tesis de maestría.

A mi director de tesis, el Dr. Eugenio Díaz Iglesias por darme la oportunidad de explorar en el maravilloso y complejo mundo de la larvicultura de langostas espinosas. Por compartir todo su conocimiento sobre este tema de manera incondicional y por transmitirme confianza durante todo el desarrollo de la tesis.

A mi directora de tesis la Dra. Beatriz Cordero Esquivel, por compartir su conocimiento sobre el cultivo de microalgas, permitirme y facilitar el uso del equipo e instalaciones para poder realizar los cultivos de microalgas, pero sobre todo por las observaciones y consejos para la elaboración de la tesis, por creer en mí y alentarme a seguirme realizando profesionalmente.

A los miembros de mi comité: Dra. Mónica Hernández Rodríguez, Dra. Bertha Eugenia Lavaniegos Espejo, Dra. Diana Tentori Santa Cruz por sus observaciones y sugerencias para el desarrollo de la tesis.

Agradezco especialmente a la Dra. Mónica Hernández Rodríguez por permitirme utilizar su sistema de recirculación para el cultivo de filosomata y facilitarme las herramientas para su correcto funcionamiento.

A la cooperativa pesquera, Regasa No. 2 y el CRIP de Ensenada, por el apoyo en la obtención de los progenitores de Langosta roja y su transporte al posgrado.

A la Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega y a la técnico Laura Carreón Palau del CIBNOR por permitir el uso del cromatógrafo de gases masas, por la inyección de las muestras obtenidas durante este experimento y la ayuda con las dudas sobre la identificación.

Agradezco enormemente a la Biol. Uvinai Salgado, por todo su apoyo con la parte del cultivo de alimento vivo y los enriquecimientos del mismo.

Al técnico M. en C. Adrián Celaya Ortega por el apoyo en el sistema de filtración de agua para el cultivo de microalgas y la preparación y esterilización de material de laboratorio.

A la M. en C. Ingrid Miriam Bautista Soto, por toda la ayuda y asesoría en tantas dudas que surgieron antes y a lo largo y después del desarrollo experimental y el análisis de ácidos grasos.

A la Dra. María Isabel Báez Hidalgo por su apoyo en temas estadísticos en el análisis de resultados.

A Gesem Cervantes Vázquez por su ayuda con los cultivos de microalgas durante los experimentos preliminares.

A Noriko Caballero, por el apoyo con todo el trabajo diario durante la fase experimental de la tesis.

A mis amigos del posgrado, Noemí Cota Mamani y Omar García Concha por todos los momentos que pasamos juntos y que hicieron muy amena la estancia en el posgrado.

Agradezco enormemente a Laura Karina Rangel Mendoza. Lau, gracias por todo el apoyo incondicional en todos los aspectos y etapas en la realización de la tesis, gracias por acompañarme en los desvelos para la obtención de las larvas y en las jornadas de mantenimiento de los cultivos, sobre todo entender lo crítico que era el sifoneado!.

A Hipatia del Mar, el reflejo de la nobleza pura, felicidad e inocencia misma, hipo, te convertiste en parte esencial para la culminación de este trabajo.

A mi hermano: Paul Pinto Jimenez. Carnal, como te quiero!, gracias por escucharme siempre y estar ahí aunque sea de manera electrónica (GOW3).

## Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas.....	xi
<b>Capítulo 1. Introducción</b>	
1.1 Producción mundial de langostas.....	1
1.1.1 Producción en México.....	1
1.2 Biología de <i>Panulirus interruptus</i> .....	2
1.2.1 Distribución.....	2
1.2.2 Ciclo de Vida.....	3
1.2.3 Estudio del desarrollo larval.....	4
1.3 Antecedentes.....	6
1.3.1 Larvicultura del género <i>Panulirus</i> .....	6
1.3.2 Alimentación durante el desarrollo larval.....	7
1.3.3 Uso de microalgas en larvicultura de langostas.....	8
1.3.4 Contenido de ácidos grasos en filosomata.....	9
1.4 Justificación.....	13
1.5 Hipótesis.....	14
1.6 Objetivos.....	14
1.6.1 Objetivo general.....	14
1.6.2 Objetivos particulares.....	14
<b>Capítulo 2. Metodología</b>	
2. 1 Cultivo de microalgas marinas.....	15
2.2 Sistema de cultivo larval.....	15
2.3 Cultivo de <i>A. franciscana</i> .....	17
2.3.1 Enriquecimiento de <i>A. franciscana</i> .....	17
2.4 Obtención de progenitores.....	18
2.5 Obtención de larvas.....	19
2.6 Bioensayo con filosomata de <i>P. interruptus</i> .....	19
2.6.1 Evaluación del crecimiento y supervivencia.....	20
2.7 Evaluación de dietas.....	21
2.7.1 Mezcla de microalgas.....	21
2.7.2 Nauplios de <i>A. franciscana</i> enriquecidos.....	22

2.8 Análisis de ácidos grasos.....	22
2.9 Diseño experimental y análisis estadístico.....	24
<b>Capítulo 3. Resultados</b>	
3.1 Cultivo de microalgas marinas.....	25
3.2 Calidad de las dietas.....	27
3.2.1 Peso seco y análisis de ácidos grasos en de la mezcla de las microalgas marinas <i>Isochrysis</i> sp. y <i>P. tricornutum</i> .....	27
3.2.2 Peso seco y análisis de ácidos grasos en <i>A. franciscana</i> enriquecida.....	29
3.3 Porcentaje de supervivencia de larvas filosoma de <i>P. interruptus</i> .....	31
3.4 Descripción de los estadios cultivados de larvas filosoma de <i>P. interruptus</i> .....	32
3.5 Crecimiento de larvas filosoma de <i>P. interruptus</i> .....	37
3.5.1 Duración del periodo de intermuda .....	38
3.6 Ácidos grasos en filosomata de <i>P. interruptus</i> .....	42
3.7 Factores abióticos del agua en el sistema de cultivo de <i>P. interruptus</i> .....	48
<b>Capítulo 4. Discusión</b>	
4.1 Crecimiento de filosomata de <i>P. interruptus</i> .....	52
4.2 Supervivencia en filosomata de <i>P. interruptus</i> .....	56
4.3 Ácidos grasos en filosomata de <i>P. interruptus</i> .....	59
<b>Capítulo 5. Conclusiones.....</b>	<b>63</b>
<b>Capítulo 6. Recomendaciones.....</b>	<b>64</b>
<b>Literatura citada.....</b>	<b>65</b>

## Lista de figuras

Figura		Página
1	Mapa de distribución de <i>P. interruptus</i> . Zonas donde se realiza su captura comercial y áreas establecidas como reservas para esta especie (Phillips 2013).....	2
2	Ciclo de vida de <i>Panulirus interruptus</i> . (Kailola <i>et al.</i> , 1993) modificado por Robles-Murillo (2005). Recuperado de: Bautista-Soto (2016).....	4
3	Sistema de cultivo para larvas filosoma de <i>Panulirus interruptus</i> . (a) tanque de compensación, (b) biofiltro de cuentas plásticas, (c) fraccionador de espuma, (d) lámpara de radiación ultravioleta, (e) columna y (f) tanques de cultivo (Diseñado por: Hernández-Rodríguez <i>et al.</i> , 2013).....	16
4	Abundancia (cél·ml <sup>-1</sup> ) de <i>Isochrysis</i> sp. mantenida en cultivo semicontinuo. Se muestran datos promedio y las barras indican el error estándar. (n=3).....	25
5	Abundancia (cél·ml <sup>-1</sup> ) de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> mantenida en sistema semicontinuo. Se muestran datos promedio y las barras indican el error estándar. (n=3).....	25
6	Abundancia (cél·ml <sup>-1</sup> ) de <i>Isochrysis</i> sp. mantenida en sistema semicontinuo para el análisis de las dietas. Se muestran datos promedio y las barras indican el error estándar. (n=3).....	26
7	Abundancia (cél·ml <sup>-1</sup> ) de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> mantenida en sistema semicontinuo para el análisis de las dietas. Se muestran datos promedio y las barras indican el error estándar. (n=3).....	26
8	Desarrollo de huevos y primeros estadios de langosta roja <i>P. interruptus</i> . Coloración inicial de los huevos (a), estado de los huevos a días previos a la eclosión (b); Naupliosoma recién eclosionada (c); filosoma I (d); filosoma estadio III (e) .....	33
9	Filosoma I de <i>Panulirus interruptus</i> . po: pedúnculos oculares sin segmentación; p1 y p2: los dos primeros pares de pereiópodos desarrollados; p3: tercer par de pereiópodos; a1: antena; mx: maxilípedos; ex: exopoditos.....	34
10	Filosoma II de <i>Panulirus interruptus</i> (a); pedúnculos oculares segmentados (b); incremento en el tamaño del exopodito del tercer par de pereiópodos (c).....	35
11	Filosoma III (a) de <i>Panulirus interruptus</i> , se observa primordio que dará lugar al 4to par de pereiopodos (b), los exopoditos (c) del tercer par de pereiópodos están bien desarrollados y funcionales.....	35
12	Instar de la filosoma III (d), en donde se observó un aumento en el tamaño corporal, además de un aumento en el tamaño del primordio que dará lugar al 4to par de pereiópodos (e).....	36
13	Filosoma IV de <i>Panulirus interruptus</i> (a). En el 4to par de pereiópodos (b) aún en desarrollo se observan de 1 a 2 segmentaciones.....	37
14	Porcentaje de larvas filosoma que mudaron del estadio I al II en función del tiempo, alimentadas con dos dietas. Círculos color blanco: alimentadas con <i>Artemia franciscana</i> enriquecida solo con aceite Omegamex® (A), círculos color negro: alimentadas con <i>Artemia franciscana</i> enriquecida con microalgas y aceite Omegamex® en relación 1:1 (MA+A). Se muestran datos promedio y las barras	39

- indican el error estándar. n=6.....
- 15 Porcentaje de larvas filosoma que mudaron del estadio II al III en función del tiempo, alimentadas con dos dietas. Círculos color blanco: alimentadas con *Artemia franciscana* enriquecida solo con aceite Omegamex® (A), círculos color negro: alimentadas con *Artemia franciscana* enriquecida con microalgas y aceite en relación 1:1 (MA+A). Se muestran datos promedio y las barras indican el error estándar. n=6..... 40
- 16 Porcentaje de larvas filosoma que mudaron del estadio III al IV en función del tiempo, alimentadas con dos dietas. Círculos color blanco: alimentadas con *A. franciscana* enriquecida solo con aceite Omegamex® (A), círculos color negro: alimentadas con la dieta compuesta por MA+A (*Artemia franciscana* enriquecida con microalgas y aceite Omegamex®, en relación 1:1). Se muestran datos promedio y las barras indican el error estándar. n=6..... 40
- 17 Peso orgánico (PO,  $\mu\text{g}\cdot\text{larva}^{-1}$ ) en función de la longitud total (LT, mm) de larvas filosoma tempranas de *P. interruptus* de los estadios I al IV. Los puntos negros indican la dieta MA+A (microalgas+aceite Omegamex®), los puntos blancos indican la dieta A (solo aceite Omegamex®). Los números sobre los puntos (I, II, III y IV) indican el estadio larval. Se muestran datos promedio y las barras indican el error estándar. n=6..... 42

## Lista de Tablas

Tabla		Página
1	Intervalos de concentración de los principales ácidos grasos (% del total de ácidos grasos) encontrados en estadios intermedios y tardíos de filosomata de diferentes especies de langostas espinosas. Datos tomados de Francis <i>et al.</i> (2014).....	11
2	Peso seco total (PST) y peso seco orgánico (PO) ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) de la mezcla de las microalgas <i>Isochrysis</i> sp. y <i>Phaeodactylum tricornutum</i> durante la fase de máximo crecimiento exponencial. Se muestran datos promedios y entre paréntesis el error estándar. n=3.....	27
3	Peso seco total (PST) y peso seco orgánico (PO) ( $\text{pg}\cdot\text{cél}^{-1}$ ) de la mezcla de las microalgas <i>Isochrysis</i> sp. y <i>Phaeodactylum tricornutum</i> durante la fase de máximo crecimiento exponencial. Se muestran datos promedios y entre paréntesis el error estándar. n=18.....	27
4	Composición de ácidos grasos (% y $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) de la mezcla de microalgas <i>Isochrysis</i> sp. y <i>Phaeodactylum tricornutum</i> cultivadas en sistema semicontinuo. Se muestran datos promedio y entre paréntesis se presenta el error estándar. n=12.....	28
5	Peso seco total (PST) y peso seco orgánico (PO) ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) de <i>Artemia franciscana</i> enriquecida con los dos tratamientos y utilizadas durante el bioensayo. MA+A (Nauplios enriquecidos con la mezcla de microalgas+aceite Omegamex®), A: (nauplios enriquecidos solo con aceite Omegamex®). Se muestran datos promedios y entre paréntesis se presenta el error estándar. Letras iguales indican no diferencia significativas (a>b, x>y). n=12.....	29
6	Composición de ácidos grasos (% y $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) en nauplios de <i>A. franciscana</i> utilizados como alimento para larvas filosoma de <i>P. interruptus</i> . MA+A (Nauplios enriquecidos con la mezcla de microalgas+aceite Omegamex®), A: (nauplios enriquecidos solo con aceite Omegamex®). Se muestran datos promedio y entre paréntesis se presenta el error estándar. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre las dietas. (a>b, x>y). n=12.....	31
7	Supervivencia total (%) en los estadios III y IV de larvas filosoma de <i>P. interruptus</i> alimentadas con dos dietas. MA+A: <i>A. franciscana</i> enriquecida con microalgas+aceite Omegamex®, A: <i>A. franciscana</i> enriquecida solo con aceite Omegamex®. Se muestran datos promedio y entre paréntesis se presenta el error estándar. n=6.....	32
8	Longitud total (LT, mm) de larvas filosoma en estadios tempranos de desarrollo, alimentadas con dos dietas: MA+A (Mezcla de microalgas y aceite) y A (Aceite). También se muestra la tasa de crecimiento (TC: $\text{mm}\cdot\text{día}^{-1}$ ) y el porcentaje de incremento en longitud total (IC) en cada cambio de estadio. Se muestran datos promedio y entre paréntesis se presenta el error estándar. Letras iguales indican diferencias no significativas entre los tratamientos. n=6.....	38
9	Duración del periodo de intermuda de larvas filosoma tempranas de <i>P. interruptus</i> alimentadas con dos dietas: MA+A ( <i>A. franciscana</i> enriquecida con la mezcla de microalgas y aceite Omegamex®) y A (solo aceite Omegamex®). Se muestran datos promedio y entre paréntesis se presenta el error estándar. n=6.....	38

10	Peso seco total y peso seco orgánico ( $\mu\text{g}\cdot\text{larva}^{-1}$ ) de larvas filosoma de los estadios I, II, III y IV, alimentadas con las dietas MA+A y A. Se muestran datos promedio y entre paréntesis se presenta el error estándar. Letras iguales indican no diferencia entre los tratamientos ( $a>b$ ). $n=6$ .....	41
11	Porcentaje de ácidos grasos (respecto al total de los ácidos grasos) de las larvas filosoma de <i>Panulirus interruptus</i> (estadio II-IV) alimentadas con nauplios de <i>A. franciscana</i> enriquecidos con dos dietas: microalgas+aceite (MA+A) y solo con aceite Omegamex® (A). Se muestran datos promedio y entre paréntesis el error estándar. Letras minúsculas iguales indican que no hay diferencias significativas entre las dietas en cada estadio (Estadio II: $a>b$ , Estadio III $m>n$ , Estadio IV $x>y$ ). Letras mayúsculas iguales indican que no hay diferencias significativas entre los estadios ( $A>B>\dots E$ ). $n=6$ .....	45
12	Composición de ácidos grasos ( $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de peso orgánico) de las larvas filosoma de <i>Panulirus interruptus</i> alimentadas con nauplios de <i>A. franciscana</i> enriquecidos con dos dietas: microalgas+aceite (MA+A) y solo con aceite (A). Se muestran datos promedio y entre paréntesis el error estándar. Letras minúsculas iguales indican que no hay diferencias significativas entre las dietas en cada estadio (Estadio II: $a > b$ , Estadio III $m > n$ , Estadio IV $x > y$ ) Letras mayúsculas iguales indican que no hay diferencias significativas entre los estadios ( $A>B>\dots E$ ). $n=6$ .....	47
13	Longitud total (mm) de estadios tempranos de larvas filosoma de <i>Panulirus interruptus</i> obtenidas en este trabajo y por otros autores. A: Aceite Omegamex®, MA+A: microalgas+aceite Omegamex®. Los datos se muestran en promedio y entre paréntesis la desviación estándar.....	54
14	Comparación de tasa de crecimiento ( $T_c$ , $\text{mm}\cdot\text{día}^{-1}$ ) de larvas filosoma de <i>Panulirus interruptus</i> con trabajos de otros autores.....	54
15	Comparación del índice de crecimiento de larvas filosoma de <i>Panulirus interruptus</i> con trabajos de otros autores.....	55
16	Supervivencia (%) de larvas filosoma obtenidas en este trabajo y por otros autores con <i>Panulirus interruptus</i> .....	58

# Capítulo 1. Introducción

---

## 1.1 Producción mundial de langostas

La producción mundial de crustáceos mediante las actividades acuícolas y pesquera registrada hasta el año 2014, suma un total de  $13.8 \times 10^6$  t, de las cuales el 50.0% corresponden a actividades acuícolas ( $6.9 \times 10^6$  t, con un valor de  $36.2 \times 10^6$  millones de dólares), y de éstas, la producción de langosta fueron 948 t con un valor de 10.4 millones de dólares. Estas cifras que disminuyeron un 54 % con respecto a la producción del 2013 (FAO, 2014). Los tipos de langosta que más se capturan son los bogavantes *Homarus* spp., *Nephrops* spp. y *Metanephrops* spp. (con un 70 % de la producción total), seguidos de las langostas espinosas *Panulirus* spp. y *Jasus* spp. (con 28 %) y, por último, las langostas de la familia Scylaridae (2.0 %).

América del norte produjo en 2014 el 64.7 % de langostas y bogavantes a nivel mundial, siendo Canadá y Estados Unidos los que presentaron mayores porcentajes (30 % y 22 %, respectivamente), mientras que México, aportó 1.4 % (CONAPESCA, 2013; FAO 2016).

### 1.1.1 Producción en México

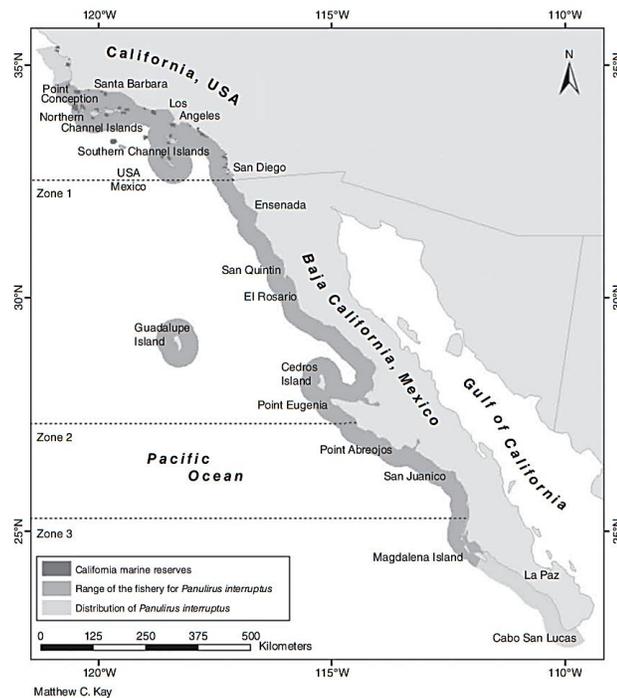
En México, la langosta es un producto bien cotizado a nivel nacional e internacional, siendo la langosta como la tercera especie de productos pesqueros más exportados (CONAPESCA, 2013). El volumen de producción de langosta mediante pesquerías se encontraba en el lugar 35 para el año 2013 con un total de 3,535 t. Por su valor, la producción de langosta ocupó el lugar número seis y, hasta el 2013, ha tenido una media de crecimiento anual de 3.36 % (CONAPESCA, 2013).

Los tres estados con mayor relevancia en la producción de langosta han sido: Baja California Sur (1,461 t), Baja California (721 t) y Quintana Roo (467 t), siendo el estado de Baja California Sur el más productivo desde 2004.

## 1.2 Biología de *Panulirus interruptus*

### 1.2.1 Distribución

A lo largo del Pacífico mexicano existen cuatro especies pertenecientes a la familia Palinuridae, conocidas como “langostas espinosas”. Estas especies son: *Panulirus gracilis*, *P. inflatus*, *P. penicillatus* y *P. interruptus*, siendo ésta última la de mayor importancia económica, pues representa entre el 95 y 97 % de la producción por pesquería en la Península de Baja California (Chavarría-Ruiz, 2013). La langosta roja *P. interruptus*, presenta una amplia distribución sobre la costa occidental de la Península de Baja California, abarcando desde San Luis Obispo, E.U.A. (35 °N), hasta Cabo San Lucas, Baja California Sur (23.5 °N). Sin embargo, los ejemplares más sureños capturados de esta especie corresponden a Manzanillo Colima, México. Johnson (1960), menciona dos principales puntos de concentración de *P. interruptus*, uno de ellos se encuentra en las costas de Baja California, cerca de Isla de Cedros y la otra en El parque del Canal Islas de la cuenca sur de California, E.U.A. (Figura 1). Vega-Velázquez (2006), determinó que la principal porción de la población se encuentra en Baja California Sur, entre Isla de Cedros y Punta Abreojos.



**Figura 1.** Mapa de distribución de *P. interruptus*. Zonas donde se realiza su captura comercial y áreas establecidas como reservas para esta especie (Phillips 2013).

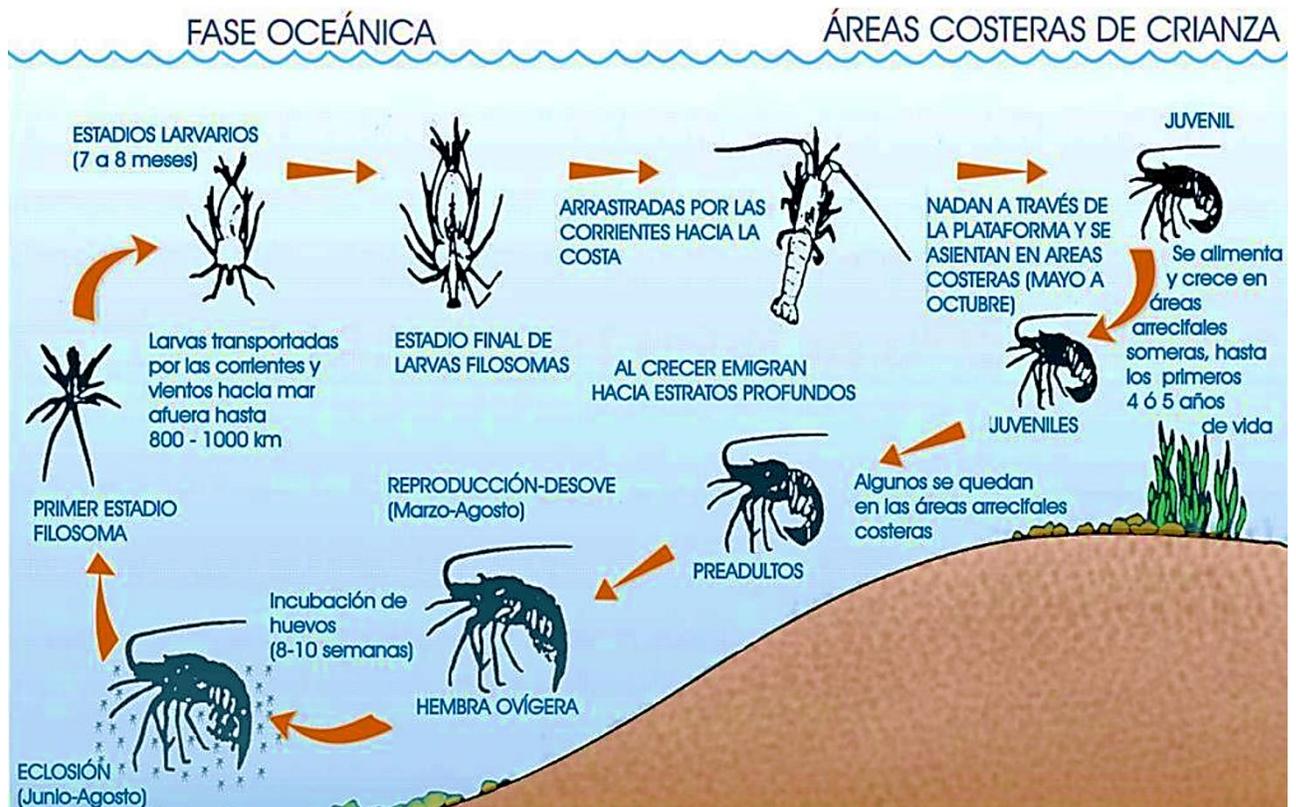
### 1.2.2 Ciclo de Vida

El desarrollo larval de la familia Palinuridae se presenta en dos fases, la primera es la fase planctónica, que consiste en una serie de estadios larvales conocidos como filosoma (figura 2). El desarrollo larval de la fase filosoma se lleva a cabo en aguas oceánicas y la duración, el número de estadios y el tamaño de la larva, son específicos de cada especie (Phillips, 2013). La segunda fase, conocida como puerulo, es bentónica y durante ésta, la larva regresa a la costa para su asentamiento. Una vez que el puerulo se transforma en juvenil, completa su desarrollo en costas poco profundas y, conforme madura, migra hacia aguas más profundas donde se reproduce completando su ciclo de vida (Figura 2) (Kittaka, 1997a; Goldstein *et al.*, 2008; Phillips, 2013).

El desove de *P. interruptus* y sus primeras fases larvares fueron descritas por Johnson (1956), a partir de muestras de zooplancton recolectadas por el programa CalCOFI. Determinó que el desarrollo larval de esta especie consiste en XI estadios filosoma, con una duración aproximada de 7.5 meses. Se describe a la filosoma de *P. interruptus*, como una larva plana y delgada como una hoja de papel, transparente, con cromatóforos color rojo en los pereiópodos, que en el primer estadio alcanza aproximadamente 1.5 mm de longitud y en el último estadio llega hasta los 30 a 32 mm (Johnson, 1956, 1960). Posteriormente se han descrito "instar" (estadios adicionales no descritos en los estadios originales) en estudios experimentales, los cuales dependen de diferentes factores, entre los principales se consideran la temperatura y la disponibilidad y calidad de alimento (Dexter, 1972; Bautista-Soto, 2016; Niebla-López, 2016).

Cuando el último estadio larval metamorfiza en puerulo, éste continúa siendo translucido, presenta una morfología similar a la de un adulto y comienza la búsqueda de asentamiento (Johnson, 1960). Una vez que el puerulo se establece adquiere pigmentación y metamorfiza en juvenil (Peñaloza-Mayorazgo, 2008).

Los primeros estadios filosoma ocurren principalmente entre junio y noviembre en el medio natural (Johnson, 1960). Sin embargo, esto puede variar durante periodos de "El Niño" o "La Niña" pues dichos eventos aceleran o aletargan, respectivamente, los procesos de incubación debido al incremento o descenso de la temperatura del agua (Ortuño-Manzanares, 2000; Vega-Velázquez 2003; Peñaloza-Mayorazgo, 2008).



**Figura 2.** Ciclo de vida de *Panulirus interruptus*. (Kailola et al., 1993) modificado por Robles-Murillo (2005). Recuperado de: Bautista-Soto (2016).

### 1.2.3 Estudio del desarrollo larval

En México son limitados los estudios sobre el desarrollo larval de la langosta, la mayoría de las investigaciones están enfocadas a los estadios adultos y a la pesca comercial. Los primeros estudios de larvas de la langosta roja en México fueron los realizados por Chapa (1964) (citado en Ayala y Chávez, 1985). Posteriormente se describieron los aspectos morfológicos de larvas filósoma y juveniles recolectados frente a la costa centro occidental de Baja California (Ayala y Chávez, 1985). Así mismo, se han realizado investigaciones sobre la dinámica, distribución y abundancia de filósomata de *P. interruptus* en la parte sur de la corriente de California, las cuales han permitido generar relaciones entre los parámetros ambientales y la presencia de diferentes estadios de filósomata (Peñaloza-Mayorazgo, 2008; García-Kauffman, 2009; Ortuño-Manzanares, 2010). Con base en relaciones entre la abundancia de la filósoma I y la temperatura del océano, se ha sugerido que un intervalo entre 16 y 23 °C puede ser apropiado para el desove en laboratorio. En cuanto a la salinidad estaría entre 33.1 a 34.59 ups, parámetro que se considera crítico para las larvas debido al rango tan estrecho (Vega-Velázquez, 2003).

Son escasos los reportes sobre la larvicultura y los intentos para completar el desarrollo larval de *P. interruptus* en laboratorio. Entre los primeros estudios destaca el desarrollado por Dexter (1972), en un cultivo experimental, donde logró el desarrollo hasta la filosoma VI, usando un sistema de recirculación, a una temperatura de 25°C y una alimentación con base en nauplios de *Artemia franciscana* y larvas de peces. En México los intentos para cerrar el ciclo de vida de la langosta roja en cautiverio comenzaron con López-Zenteno (2004), quien comparó dos sistemas de cultivo, obteniendo mejores resultados en crecimiento y supervivencia con un sistema oligotrófico, con el que logró alcanzar hasta el estadio VI en un tiempo menor al reportado por Dexter (1972) (94 días y 114 días respectivamente). Posteriormente, Galicia (2006) realizó experimentos sobre respirometría en filosomata I y II, y menciona que la larva utiliza carbohidratos y lípidos para el catabolismo. Este autor discute que el tamaño y la condición de la hembra tienen una influencia directa en la calidad de las larvas. Por otro lado, Silva (2013), evaluó la respuesta de la filosoma a variaciones de temperatura, salinidad e iluminación y encontró que a 22 °C y 33.5 ups se obtiene una mejor eclosión. Bautista-Soto (2016) experimentó con diferentes fuentes de lípidos y tiempos de enriquecimiento de *A. franciscana* utilizada como dieta en estadios tempranos de filosomata y registró un mejor crecimiento y supervivencia con el aceite comercial de orbita de atún Omegamex® después de un lapso de 12 horas de enriquecimiento. Posteriormente Niebla-López (2016) cultivó larvas filosoma en dos temperaturas (18 y 24 °C) y obtuvo un mejor crecimiento a 24 °C, alcanzando el estadio filosoma VI+++ en días. Sin embargo, la problemática con espibiones en el exoesqueleto de las larvas no permitió continuar con el cultivo a dicha temperatura.

Los requerimientos nutricionales de las larvas filosoma de *P. interruptus* son poco conocidos. El enriquecimiento de *A. franciscana* con fuentes ricas en ácidos grasos poliinsaturados, han dado como resultado una buena supervivencia y crecimiento durante los estadios tempranos (Bautista-Soto 2016; Niebla-López 2016) Los lípidos de peces, además de ser una fuente de energía, son fuente imprescindible de ácidos grasos esenciales en estadios larvales de crustáceos, debido a la habilidad limitada que tienen de sintetizar ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (n3), a partir de precursores de cadena corta (Sargent *et al.*, 1997). Los ácidos grasos esenciales como el DHA (22:6n3) EPA (20:5n3) y ARA (20:4n6) son importantes para la formación de membranas celulares, en el metabolismo celular, la respuesta inflamatoria e inmune (Tocher, 2003), por lo que conocer los requerimientos de estos ácidos grasos esenciales en larvas filosoma de *P. interruptus* ayudaría a mejorar su nutrición. Ello se considerada un factor clave para controlar el crecimiento y supervivencia de las larvas de crustáceos.

## 1.3 Antecedentes

### 1.3.1 Larvicultura del género *Panulirus*

Debido a la falta de información sobre la biología y ciclo de desarrollo de la familia Palinuridae, y por la importancia económica que representa, las filosomata pertenecientes a esta familia han sido de amplio interés biológico durante décadas. Kittaka (1997a), menciona que los primeros intentos de cultivo de langosta realizados en Japón fueron en el año 1899 con *P. japonicus*. Sin embargo, el primer éxito fue logrado casi 80 años después, obteniendo el estadio final (XI) en una sola larva (Inoue, 1978, citado por Kittaka, 1997b).

En los bioensayos de laboratorio para cerrar el ciclo larval de diferentes especies de palinúridos resalta la utilización de dos tipos de sistemas de cultivo, con los que se han obtenido los mejores resultados. El primero es conocido como sistema de cultivo ecosistémico (Kittaka, 1997b), el cual fue utilizado con anterioridad para el cultivo de peneidos. La principal característica de este sistema consiste en el uso de cultivos de la microalga *Nannochloropsis* sp. en un tanque de compensación conectado al sistema de cultivo, circulando así las microalgas por todos los tanques donde se encuentran las filosomata. El cultivo de microalgas ayuda a disminuir la proliferación de bacterias originadas por desechos orgánicos y mejorar las condiciones abióticas del agua. Otra de las características de este sistema es el uso de tanques con flujo ascendente, esto con la intención de mantener en suspensión a las larvas, aspecto importante para que su desarrollo sea exitoso (Kittaka, 1997b). Este sistema permitió completar el desarrollo larval de las especies *Jasus lalandi*, *J. edwardsii*, *J. verreauxi*, *Panulirus japonicus* y *P. elephas* (Kittaka, 1988; Kittaka y Ikegami, 1988; Kittaka y Kimura, 1989; Kittaka, 1997a; Kittaka 1997b).

El segundo es el sistema desarrollado por Ritar (2001) conocido como oligotrófico, también denominado “sistema azul”, fue utilizado para cultivar a la especie *J. edwardsii*. El sistema consiste en mantener la calidad del agua en condiciones óptimas, libre de cualquier otro agente u organismo fuera del sistema mediante el uso de luz ultravioleta. Inicialmente se usaron filtros de 1  $\mu\text{m}$  y posteriormente se añadió generador de ozono, además de que los tanques de cultivo circulares utilizados poseen una serie de tubos en su interior que permiten generar una corriente de agua para mantener a las larvas en la columna de agua (Ritar *et al.*, 2006).

En Australia ya se han comenzado proyectos a escala piloto para el cultivo comercial de la langosta *Panulirus ornatus* (Phillips, 2013; Francis, 2014). Sin embargo, aún no se han completado los desarrollos

larvales de diferentes especies de los géneros *Panulirus* y *Jasus*, ya que aún existen varios problemas técnicos y biológicos por resolver para que su cultivo a escala comercial sea redituable (Kittaka 1997b). Uno de los aspectos donde se está poniendo especial énfasis es el relativo a la alimentación.

### 1.3.2 Alimentación durante el desarrollo larval

Estudios recientes en filosomata de la especie *P. japonicus* y *P. longipes* colectadas del medio natural, han demostrado que las filosomata tienen hábitos carnívoros oportunistas. Recientemente, con la aplicación de técnicas moleculares para identificar el contenido del hepatopáncreas, se han descrito principalmente algunos taxones de teleósteos, cnidarios, crustáceos y moluscos (Jeffs *et al.*, 2004; Suzuki *et al.*, 2008; Chow *et al.*, 2011). Sin embargo, no se ha encontrado una relación concreta en la preferencia de ciertas presas y diferentes estadios de desarrollo. Esta variación en preferencias nutricionales podría atribuirse a la capacidad de las filosomas para migrar de vertical y horizontal en la columna de agua, por lo que parece ser que la selección de presas y los requerimientos de las larvas está más relacionada al movimiento de las corrientes en las que se transportan (Moe, 1991).

La determinación de las preferencias alimenticias en larvas filosoma se ha limitado al uso de técnicas de observación y experimentación en laboratorio, en donde han probado distintas fuentes de alimento, sin embargo, solo algunas han sido realmente exitosas (Kittaka, 1997a) y no han contribuido a esclarecer completamente los requerimientos nutricionales (Smith *et al.*, 2003). Entre estas fuentes de alimento están, la *Artemia* spp. (en diferentes estadios de desarrollo), tejido gonadal de mejillón y larvas de peces de distintas especies. Las dos primeras fuentes han sido de los alimentos más exitosos en laboratorio (Dexter, 1972; Kittaka 1997a; Tong *et al.*, 2000; Ritar, 2002). Sin embargo, se han encontrado algunas desventajas en el uso de estos alimentos, por ejemplo, los nauplios de *Artemia* no satisfacen los requerimientos de las larvas a lo largo de todos los estadios larvales, debido a su baja calidad nutricional, principalmente en ácidos grasos poliinsaturados (Matsuda *et al.*, 2006). Por ello es necesario su enriquecimiento previo al uso como alimento, con alimento que proporcione los nutrientes requeridos, como los ácidos grasos esenciales (Navarro *et al.*, 1999; Liddy *et al.*, 2005; Matsuda *et al.*, 2009; Bautista-Soto, 2016).

Las desventajas observadas en el uso de la gónada de mejillón han sido: perfil nutricional variable, rápido deterioro de la calidad del agua y que el tejido puede quedar atrapado entre los pereiópodos de las larvas, propiciando el crecimiento de patógenos, además de que es complicado obtener pedazos de tejido gonadal

de tamaño adecuado para ser manipulados por las larvas filosoma (Kittaka, 1997a; Matsuda y Takenouchi, 2007).

Mediante la determinación de los requerimientos nutricionales de los organismos es posible diseñar dietas formuladas que cubran sus necesidades. En el caso particular de larvas filosoma, la determinación de requerimientos y formulación de dietas ha sido muy difícil debido a la incertidumbre en sus preferencias alimenticias. Algunos trabajos con *P. cygnus* y *J. edwardsii* han abordado el uso de dietas artificiales para filosomata de estadios tempranos, sin obtener una buena aceptación de estas dietas por parte de las larvas, sugiriendo que prefieren presas blandas (Nelson *et al.*, 2003; Johnston y Johnston, 2007; Cox *et al.*, 2011).

### **1.3.3 Uso de microalgas en larvicultura de langostas**

Las microalgas son una importante fuente nutricional para el óptimo desarrollo de diferentes especies animales en cultivo. Las especies de microalgas que han sido ampliamente utilizadas en el cultivo de crustáceos, principalmente en su etapa larvaria son *Chaetoceros* spp., *Isochrysis* sp., *Pavlova lutheri* y *Tetraselmis suecica* (Brown, 2002). El éxito en el uso de estas especies se debe principalmente a su composición bioquímica, específicamente a su composición de los ácidos grasos poliinsaturados de la serie n3 como el EPA y DHA, los cuales pueden llegar a concentraciones de hasta 25 % y 10% respectivamente. Esta característica ha llevado a utilizar dietas mixtas con dos o más especies de microalgas, con la intención de mejorar la calidad de la dieta y de los organismos cultivados (Anzueto-Sanchez, 2014; Cazares-Salazar 2014; Bautista-Soto, 2016).

Las microalgas *Chaetoceros* sp., *Phaeodactylum tricornutum*, *Isochrysis* spp. y *Nannochloropsis oculata* se han utilizado tanto de manera mixta como monoespecífica en el enriquecimiento de *Artemia*, y han demostrado ser eficientes en el cultivo de larvas de langosta (Ritar 2002, Kittaka 1997b, Tong *et al.*, 2000, Phleger *et al.*, 2001 Wu *et al.*, 2012, Bautista-Soto, 2016). Además de proporcionar altos porcentajes de ácidos grasos poliinsaturados, pueden aportar otros metabolitos secundarios para el desarrollo de la larva, como vitaminas (Brown *et al.*, 1997), precursores de enzimas y algunos compuestos que tienen actividad antimicrobiana (Molina-Cárdenas, 2011).

### 1.3.4 Contenido de ácidos grasos en filosomata

En la larvicultura de las langostas espinosas, la deficiencia en la alimentación durante el desarrollo larvario se ve reflejada en una alta mortalidad y pobre crecimiento (Galicia, 2006) y, aunado a esto, en una mala calidad de las postlarvas obtenidas. Estos problemas han sido atribuidos a una deficiencia de lípidos en las dietas utilizadas para la alimentación de los estadios tempranos (Ritar *et al.*, 2003; Nelson *et al.*, 2004; Liddy *et al.*, 2004, 2005; Matsuda *et al.*, 2009) y, específicamente, de ácidos grasos esenciales, como el ácido eicosapentanoico (EPA, 20:5n-3), el ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3) y el ácido araquidónico (ARA, 20:4n-6). Éstos tienen importancia específica en la nutrición de peces y crustáceos (Navarro *et al.*, 1999), debido a que estos organismos tienen capacidad limitada o nula de sintetizar ácidos grasos de cadena larga de la serie omega 3 (n-3), derivado de la falta de enzimas  $\Delta 6$  y  $\Delta 5$  (desaturasa y elongasa), que cumplen la función de biosíntesis de ácidos grasos esenciales de cadena larga como EPA y DHA, a partir de precursores de cadena corta como el ácido linolénico (LNA, 18:3n3) (Sargent *et al.*, 1997; Fleeger, 2005).

La importancia de los ácidos grasos esenciales en organismos zooplanctónicos radica en la función fisiológica que éstos cumplen. Están involucrados en procesos de reproducción y ontogenia, son una fuente importante de almacenamiento de energía, formación de membranas celulares. Además, funcionan como precursores de eicosanoides, que regulan procesos de inflamación y de respuesta inmune (Anger, 1998; Tocher, 2003; Limbourn y Nichols, 2009), y están estrechamente relacionados en procesos de diapausa y en el metabolismo de los carbohidratos en la glándula digestiva (Lee *et al.*, 2006).

La información sobre los requerimientos de lípidos y ácidos grasos en larvas de langostas espinosas es escasa. Dado que se ha observado que los crustáceos y los peces pueden reflejar el perfil nutricional de las presas que consumen, por lo cual se ha utilizado el perfil de lípidos y ácidos grasos de sus estadios larvarios y de sus posibles presas del medio natural para establecer sus requerimientos. Sin embargo, en el caso de las larvas de langosta, estos análisis se limitan a estadios intermedios, tardíos (V-XI) y pueruli y se refieren a un número limitado de muestras. Estos estudios de campo se han realizado con *J. edwardsii* (Phleger *et al.*, 2001; Jeffs *et al.*, 2004) y *P. cygnus* (Phillips *et al.*, 2006; Limbourn y Nichols, 2009). No obstante, para estadios tempranos se ha utilizado el perfil de ácidos grasos de larvas recién eclosionadas (Phleger *et al.*, 2001).

Phleger *et al.* (2001) y Jeffs *et al.* (2004), trabajaron con larvas de *J. edwardsii* colectadas del medio natural y encontraron que el contenido de lípidos totales en estadios intermedios y avanzados fue mayor al encontrado en sus presas potenciales (ascidias, pirosonomas, copépodos y ostrácodos), por lo que sugieren

que las larvas no necesariamente reflejan el perfil nutricional de la dieta, sino que, además, las larvas tendrían la capacidad de acumular lípidos (hasta el 30%), los cuales utilizarán como fuente de energía para desplazarse hacia la costa durante el estadio de puerulo, Esto es importante porque en este estadio no presentan estructuras bucales, lo que limita la ingestión de alimento durante este proceso. Una vez que ocurre la metamorfosis, el contenido de lípidos disminuye al 15%, lo que representa un gasto en las reservas energéticas hasta del 50% (Limbourn y Nichols 2009), por lo que Phillips *et al.* (2006) mencionan que existe una relación directa entre la disminución del contenido de lípidos y la distancia a la costa e indican que el puerulo requiere un contenido de lípidos mínimo de  $181 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  de peso seco, para que el asentamiento sea exitoso.

Por otro lado, se encontró que el perfil de ácidos grasos de filosomata de las especies mencionadas anteriormente, se encontraba dominado por los ácidos grasos 22:6n3 (DHA), 20:5n3 (EPA), 18:1n9, 18:1n7, 16:1n7, 16:0 y 18:0 que en conjunto suman hasta un 70% del total (Phillips *et al.*, 2006; Limbourn y Nichols 2009). La concentración de los ácidos grasos asociados a las reservas energéticas de filosomas (16:0, 18:0, 18:1n9 y 16:1n7) fue mayor a la encontrada en presas potenciales; mientras que el ácido graso esencial 22:6n3 (DHA), fue hasta 10% menor que el de las presas (Jefferies *et al.*, 2004). Estos estudios revelan que el perfil de ácidos grasos de larvas filosoma es único con respecto al de las posibles presas, y que las filosomata podrían tener la habilidad de adaptar su tipo de dieta a la disponibilidad de las presas presentes (Jefferies *et al.*, 2004), acumulando de manera preferencial ácidos grasos para su metabolismo.

Debido a la similitud entre las concentraciones de lípidos y de ácidos grasos entre estas especies de langostas espinosas, se ha sugerido que las larvas podrían tener un metabolismo de lípidos similar, a pesar de las diferencias en su distribución geográfica (templada y tropical). Hay una similitud entre los porcentajes de los principales ácidos grasos (DHA, EPA, ARA, 18:1n9, 16:1n7, 16:0 y 18:0) determinados en larvas tardías de *J. edwardsii* y *P. cygnus* fue también observada en estadios tardíos (IX-XI) de otras especies (Tabla 1), a pesar de la diferencia en su distribución (Francis *et al.*, 2014). Estas similitudes podrían estar relacionadas a las preferencias alimenticias durante la etapa larvaria (principalmente presas blandas). Además de que los ácidos grasos descritos están directamente relacionados a la reserva energética de las larvas. Esto implicaría que las larvas filosoma de *P. interruptus* podrían tener concentraciones similares de ácidos grasos a los ya descritos para otras especies por otros autores, sin embargo, no existen estudios de este tipo para la langosta roja durante el desarrollo larval.

**Tabla 1.** Intervalos de concentración de los principales ácidos grasos (% del total de ácidos grasos) encontrados en estadios intermedios y tardíos de filosomata de diferentes especies de langostas espinosas. Datos tomados de Francis *et al.* (2014).

Ácido graso	<i>J. edwardsii</i> (V-XI)	<i>P. cygnus</i> (V-XI)*	<i>P. ornatus</i> (VII-XI)	<i>P. longipes</i> (IX)	<i>P. homarus</i> (IX)	<i>P. penicillatus</i> (IX)
<b>16:0</b>	14.1– 21.7	21	23.8 – 25.8	22.4 – 29.6	23.3 –25.1	21.3 – 30.7
<b>18:0</b>	6.2 – 10.5	9	11.0 – 12.6	8.6 – 12.9	8.8 – 9.3	8.0 – 14.1
<b>16:1n7</b>	2.6 – 6.9	9	7.2 – 9.7	7.5 – 8.0	7.5 – 10.6	7.4 – 10.4
<b>18:1n9</b>	16.1 – 30.6	14	10.1 – 15.0	13.0 – 15.3	12.6 – 14.8	16.0 – 20.1
<b>20:4n6</b>	1.1 – 3.0	1.4	2.1 – 3.3	2.4 – 2.5	1.5 – 1.8	2.0 – 2.6
<b>20:5n3</b>	5.9 – 9.4	10	7.7 – 9.5	6.9 – 9.3	8.5 – 11.0	5.3 – 8.2
<b>22:6n3</b>	10.2 – 16.6	16	14.8 – 17.3	9.7–16.4	13.4 – 19.5	5.9 – 13.5

\*Valores únicos

Para el estudio del perfil de ácidos grasos en filosomata tempranas, se han utilizado larvas recién eclosionadas, provenientes de progenitoras extraídas del medio natural (Phleger *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2003; Liddy *et al.*, 2004). En larvas recién eclosionadas de *J. edwardsii*, se observó que el contenido de lípidos totales, era equivalente a un 10% del peso seco de la larva, y la clase de lípidos dominante fueron los fosfolípidos (92% del total de lípidos); esto es, proporciones similares a las obtenidas en estadios tardíos. Por otro lado, se encontró que las larvas recién eclosionadas presentan altas concentraciones de los ácidos grasos ARA (11.6 %) y EPA (15.1 %) con respecto al DHA (8.1 %). Dicha concentración de ácidos grasos ha sido asociada a la condición nutricional de la hembra progenitora, la cual se ha demostrado tiene una influencia directa en la calidad de la larva y su perfil de ácidos grasos (Smith *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2012). La diferencia en las concentraciones de estos ácidos grasos esenciales radica principalmente en el cambio en los hábitos alimenticios, los cuales pasan de ser pelágicos durante el desarrollo larval a completamente bentónicos en la etapa juvenil a adulto (Limbourn y Nichols, 2009).

Con base en el perfil de lípidos y ácidos grasos obtenido en larvas recién eclosionadas de *J. edwardsii*, Phleger *et al.* (2001) y Nelson *et al.* (2002), probaron distintas fuentes de alimento para *Artemia* sp. tratando de obtener un perfil similar al de las larvas recién eclosionadas: la primera, la microalga *Tetraselmis suecica*, la segunda una combinación de salvado de avena, salvado de trigo y lecitina (50:6:4), más los aceites enriquecedores plus MaxEPA y A1 ARASCO (40% en relación 4.5:1) y la tercera dieta solo el enriquecedor A1 DHA-Selco. Con dichas dietas se lograron, al día 5 se obtenían altas supervivencias (85-95 %), además de una mayor cantidad de ácidos grasos poliinsaturados. La mayor concentración de fosfolípidos se consiguió con la microalga *T. suecica* (92 % contra 22-66% en las otras dos dietas). Sin embargo, la cantidad de lípidos totales (98-109 mg·g<sup>-1</sup>) fue la menor con respecto a las demás dietas (270-404 mg·g<sup>-1</sup>).

Estas y otras dietas para *Artemia* enriquecida con distintas fuentes de lípidos y ácidos grasos fueron probadas en filosomata tempranas de *J. edwardsii* (Nelson *et al.*, 2003, 2004), obteniendo los mejores resultados de crecimiento y supervivencia con *Artemia* enriquecida con *C. muelleri* + DHA-Selco (2:1). En cuanto a la composición de ácidos grasos en las larvas, se encontró que los que estaban presentes en mayor cantidad (18:1n9, 18:1n7, 18:2n6, 16:0, 18:0, EPA, ARA y DHA) coincidían con las concentraciones de la dieta, y no variaba de manera significativa entre los estadios de desarrollo de la larva.

Uno de los métodos utilizados en laboratorio, para observar que nutrientes son esenciales para las larvas, ha sido la exposición de éstas a periodos de ayuno; ya que, durante estos periodos, los organismos suelen retener los nutrientes que son más importantes (Smith *et al.*, 2003; Liddy *et al.*, 2004). Al someter a larvas estadio I y II de *J. edwardsii* y *P. cygnus* a estos experimentos se observó un decremento en la cantidad de lípidos polares con respecto a la concentración en larvas alimentadas y recién eclosionadas. No obstante, al alimentar a las larvas después del periodo de ayuno, la cantidad de lípidos aumentó hasta en un 50%, sugiriendo que los lípidos polares en filosomata expuestas a estas condiciones, son catabolizados para mantener su metabolismo. Los ácidos grasos presentes en mayor cantidad en estas larvas fueron los ya reportados anteriormente en larvas recién eclosionadas: 18:1n9, 18:1n7, 18:2n6, 16:0, 18:0, EPA, ARA y DHA. Con ambas especies se observó que, durante la inanición, la concentración de los ácidos grasos EPA, DHA, 18:1n9 y 16:1n7 no disminuían de manera significativa, mientras que la concentración de ARA aumentaba, probablemente debido a su papel como promotor de señales y estructura de membranas celulares (Smith *et al.*, 2003).

El uso de lípidos polares como almacenamiento de energía en larvas filosomata y puerulo está bien documentada (Phleger *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2003; Jeffs *et al.*, 2004; Liddy *et al.*, 2004; Limbourn y Nichols *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2012) y esta estrategia no es considerada una forma de almacenamiento común en otros taxa marinos (incluyendo crustáceos), quienes usualmente acumulan lípidos de reserva en forma de triglicéridos y ésteres de ceras para cubrir las necesidades energéticas del metabolismo. Los lípidos polares están más asociados a la estructura de membranas y lipoproteínas y al transporte de lípidos y su digestión. Otro motivo de la acumulación de lípidos polares en filosomata y pueruli se ha asociado a una estrategia de protección, pues les confiere su característica transparente, lo cual les sirve de protección ante depredadores visuales durante su largo desarrollo larval y asentamiento (Liddy *et al.*, 2004).

Bautista-Soto (2016) evaluó en larvas filosomata de *P. interruptus*, diferentes fuentes de ácidos grasos mediante el enriquecimiento de *A. franciscana*, determinando que las mejores fuentes que mejoraron su perfil fueron el uso del aceite Omegamex® y la mezcla con las microalgas *Isochrysis* sp. y *P. tricornutum* (en

relación 1:1), lo que se vio reflejado en una adecuada supervivencia (66% al estadio III). Por otra parte, no se han realizado estudios específicos del perfil de ácidos grasos de filosomata de *P. interruptus* en sus diferentes estadios, lo cual resultaría conveniente para esta especie, pues estos estudios permitirían detallar de manera más precisa el efecto que tienen este tipo de dietas en los requerimientos nutricionales de las larvas, específicamente en el contenido de ácidos grasos.

#### 1.4 Justificación

La langosta tiene una gran importancia comercial a nivel mundial, pues su pesquería representa un ingreso económico significativo. En México, las langostas espinosas se encuentran entre los productos con mayor demanda en exportación y con un alto valor económico. La captura de *P. interruptus* representa el producto de mayor porcentaje económico a nivel nacional. A pesar de que la pesquería está certificada, su captura se encuentra en su máximo sostenible. Las cuotas de captura se mantienen estables gracias a la regulación del esfuerzo pesquero, al establecimiento de vedas, a las concesiones pesqueras y al monitoreo constante de la dinámica poblacional y ciclo reproductivo en el medio natural.

La langosticultura podría ser una opción viable para satisfacer la demanda en el mercado de la langosta roja. Mediante investigaciones sobre el cultivo de langostas espinosas, entre las que se incluye a *P. interruptus*, se ha concluido que la fase del desarrollo larval es una etapa muy importante para completar el ciclo de vida y generar un cultivo redituable. Sin embargo, tiene un alto grado de complejidad debido al número y duración de estadios y al medio en el que se desarrollan. Su cultivo ha representado un reto para su mantenimiento, ya que en estudios en laboratorio se han obtenido altas mortalidades durante los primeros estadios de desarrollo, lo cual está relacionado en gran parte, al poco desarrollo en tecnologías de cultivo y al desconocimiento de los requerimientos nutricionales específicos de la filosoma.

Para un adecuado desarrollo larval es importante conocer los requerimientos de la larva, sobre todo en lo referente a nutrientes esenciales como los lípidos, con énfasis en los ácidos grasos, ya que son una fuente importante de almacenamiento de energía, formación de membranas celulares y procesos ontogénicos. Las larvas se desarrollan mediante un número considerable de estadios los cuales implican un alto consumo de energía durante el proceso de muda. Por estos motivos, en este trabajo se abordó el estudio del perfil de ácidos grasos y su cuantificación con especial interés en ácidos grasos altamente insaturados en larvas filosoma de *P. interruptus* alimentadas con *Artemia* enriquecida.

## 1.5 Hipótesis

El enriquecimiento de nauplios de *Artemia franciscana* con dietas mixtas de microalgas y aceite comercial, que contienen ácidos grasos altamente insaturados, mejorará el crecimiento y la supervivencia de larvas filosoma de *Panulirus interruptus*.

## 1.6 Objetivos

### 1.6.1 Objetivo general

Evaluar el desarrollo de larvas de *Panulirus interruptus* alimentadas con nauplios de *Artemia franciscana* enriquecidos con diferentes fuentes de ácidos grasos.

### 1.6.2 Objetivos particulares

- 1.- Determinar la concentración de ácidos grasos en nauplios de *A. franciscana* enriquecidos con dos dietas:  
a) aceite comercial Omegamex® y b) Omegamex® más una mezcla de microalgas (*Isochrysis* sp. + *Phaeodactylum tricornutum*) en relación 1:1.
- 2.- Evaluar el crecimiento y la supervivencia de larvas filosoma de *P. interruptus* alimentadas con nauplios de *A. franciscana* enriquecidos.
- 3.- Determinar la concentración de ácidos grasos de los diferentes estadios de desarrollo de larvas filosoma de *P. interruptus*.

## Capítulo 2. Metodología

---

### 2.1 Cultivo de microalgas marinas

Se cultivaron dos microalgas marinas: *Isochrysis* sp. y *P. tricornutum*, obtenidas del cepario de microalgas del Departamento de Acuicultura del CICESE. Su cultivo se inició en matraces de 150 ml (con tres repeticiones para cada cepa), con medio Guillard “f/2” (Guillard y Rhyter, 1962) (adicionado con silicatos para *P. tricornutum*), mantenidos a una intensidad de luz de  $280 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ . Se realizó un escalamiento sucesivo a matraces Fernbach de 2.8 L y posteriormente a botellones con un volumen útil de 15 L, utilizando un inóculo de  $2 \times 10^5 \text{ cél}\cdot\text{ml}^{-1}$  en el nivel superior. Los cultivos en botellón fueron mantenidos en su etapa de máximo crecimiento exponencial, en sistema semicontínuo, con una tasa de dilución diaria del 20%.

El agua de mar utilizada para las diluciones, se filtró previamente por filtros de poros de  $1 \mu\text{m}$ , se pasó por luz ultra violeta y se esterilizó con cloro comercial ( $3 \text{ ml}\cdot\text{L}^{-1}$ ), por 24 h, y después se neutralizó con tiosulfato de sodio ( $150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). El pH de los cultivos fue mantenido en promedio en 8.5, con la inyección de  $\text{CO}_2$ .

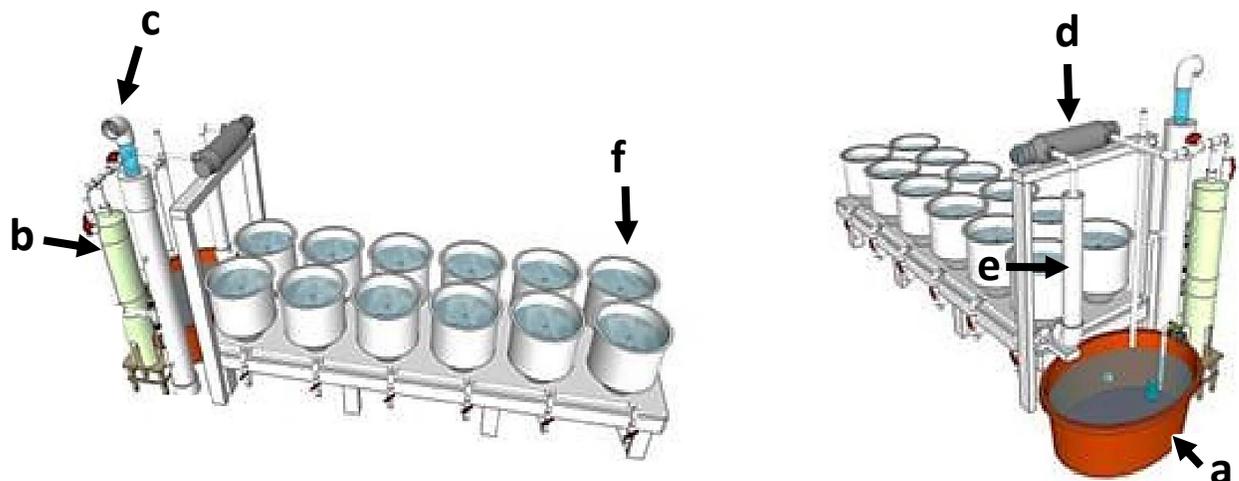
Para la evaluación de la biomasa microalgal, diariamente se realizaron conteos del número de células antes y después de realizar la dilución, con la finalidad de monitorear la estabilidad del cultivo a través del tiempo. El conteo fue realizado en una cámara de Neubauer, con un microscopio óptico modelo PrimoStar, marca CarlZeiss.

### 2.2 Sistema de cultivo larval

Previo a la eclosión de las larvas filosoma, se acondicionó un sistema de recirculación acuícola con 12 tanques cónicos, con capacidad de 40 L (Figura 3) ubicados en el laboratorio de Ecofisiología del Departamento de Acuicultura del CICESE, diseñado por Hernández-Rodríguez *et al.* (2013). El sistema de filtración de agua estaba compuesto por un tanque de compensación al cual se dirigía el agua proveniente de cada tanque de cultivo y una entrada de agua de mar filtrada a  $1 \mu\text{m}$ . Dentro del tanque de compensación se tenían tres bombas de agua, de las cuales, la primera recirculaba el agua entre el tanque de compensación y una bomba de calor de  $\frac{1}{2}$  hp de capacidad para mantener una temperatura constante de  $19^\circ\text{C}$ . Las otras dos bombas dirigían el agua hacia un biofiltro con 14 L de sustrato (cuentas plásticas). El

biofiltro tenía dos salidas, una dirigida a un fraccionador de espuma, el cual regresaba el agua directo al tanque de compensación, mientras que la otra salida era dirigida a un sistema de irradiación con luz ultravioleta (UV) (Emperor aquatics Inc., modelo 025020), y posteriormente se le inyectaba ozono mediante un generador de tipo corona con ayuda de un tubo venturi para lograr una mejor difusión del ozono en el agua. Después de su ozonificación, el agua pasaba por un tubo de 4 pulgadas encargado de repartirla a cada uno de los tanques de cultivo.

El flujo de agua ascendente en los tanques fue modificado mediante la adaptación de un tapón de PVC de 2" con huecos de 3/16 de pulgada en la parte lateral. La característica de este tipo de flujo es que el agua sale desde el fondo de manera vertical para crear una corriente ascendente dirigida a las paredes de los tanques con el objetivo de que las larvas se mantuvieran a flote en la columna de agua sin invertir demasiada energía y evitar su asentamiento. El flujo de agua de los tanques de cultivo se mantuvo de 0.8 a 1.0 L·min<sup>-1</sup> de acuerdo a lo recomendado por Hughes (1974).



**Figura 3.** Sistema de cultivo para larvas filosoma de *Panulirus interruptus*. (a) tanque de compensación, (b) biofiltro de cuentas plásticas, (c) fraccionador de espuma, (d) lámpara de radiación ultravioleta, (e) columna y (f) tanques de cultivo (Diseñado por: Hernández-Rodríguez *et al.*, 2013).

Los parámetros del agua se mantuvieron constantes: temperatura a 19 °C, salinidad en 33 ups, oxígeno disuelto mayor a 7 mg·L<sup>-1</sup>, pH entre 7.8 y 8.2; cuando fue necesario se agregó bicarbonato de sodio para compensar la baja en el pH por efecto del biofiltro. El nitrógeno amoniacal total (NAT) se mantuvo <0.03 mg·L<sup>-1</sup> y se midió con un kit colorimétrico, marca Instant Ocean. Los tanques de cultivo se limpiaron dos veces al día con ayuda de un sifón para eliminar desechos orgánicos; además se realizó un recambio diario de agua del 20% del volumen total del sistema de cultivo.

### **2.3 Cultivo de *A. franciscana***

Durante los bioensayos con filosomata de *P. Interruptus*, se decapsularon diariamente quistes de *A. franciscana* (AF) de la marca "Biogrow", con un porcentaje de eclosión del 80 %. Para la producción de nauplios se siguieron las recomendaciones de Soorgelos (1997) y el protocolo utilizado en el laboratorio de peces marinos del CICESE. Los quistes eran hidratados en agua dulce con aireación constante durante 1 h, posteriormente la aireación se retiraba y se dejaban reposar durante 3 a 5 min., tiempo que permitía separar los quistes no viables, los cuales quedaban flotando en la superficie. Los quistes hidratados eran desenquistados con cloro comercial en relación 1:1 v/v cloro/agua. Esta mezcla se agitaba constantemente hasta que los quistes cambiaban a un color naranja. Posterior al tratamiento con cloro, los quistes eran enjuagados con abundante agua dulce, y dispuestos en un tanque para decapsulación, con agua a 28 °C, salinidad de 22 a 24 ups, abundante aireación y luz constante (350 lux).

La cosecha de nauplios se realizó 24 horas después de su decapsulado, los nauplios eran recolectados con una malla de 200 µm, se realizaron lavados con agua de mar filtrada y posteriormente se aforó a un volumen conocido para su conteo. Una vez determinado el número de nauplios, estos se colocaban en un tanque con agua de mar filtrada y luz constante para su posterior enriquecimiento.

#### **2.3.1 Enriquecimiento de *A. franciscana***

Para el enriquecimiento de *A. franciscana* se utilizaron los nauplios que se dejaron en el tanque 48 horas, estos eran concentrados en un volumen conocido y se contaban nuevamente, se usó el volumen necesario para obtener  $7.2 \times 10^5$  nauplios por tanque de enriquecimiento.

El enriquecimiento de *A. franciscana* fue realizado en dos tanques, uno para cada dieta. Los tratamientos (dietas) consistieron en:

- Dieta A: emulsión de aceite de orbita de atún de la marca comercial Omegamex® (A), a concentración del 0.3 % y un lapso de 3 horas (Bautista-Soto com. per. 2015).  
La preparación de la emulsión del aceite Omegamex® se realizó con 3 mL de aceite aforado a 100 mL con agua de mar (filtrada a 1 µm y pasada por luz UV). Posteriormente se homogenizó la mezcla con ayuda de una licuadora de la marca MagicBullet hasta obtener micelas menores a 30 µm de diámetro. Para el enriquecimiento fueron usados 3 mL de la emulsión por cada  $1 \times 10^5$  nauplios en 1 L de agua de mar y 3 horas de enriquecimiento.
- Dieta MA+A: mezcla de dos especies de microalgas marinas: *Isochrysis* sp. y *P. tricornutum* en relación 1:1 y una ración de  $150 \times 10^3$  cél·nauplio<sup>-1</sup> (Correa *et al.*, 1994) añadiendo además la emulsión del aceite Omegamex®; de igual manera en relación 1:1 con respecto al volumen de las microalgas (v/v) enriqueciendo durante un lapso de 3 horas.

## 2.4 Obtención de progenitores

Las hembras ovígeras de langosta roja *P. interruptus*, fueron proporcionadas por la cooperativa pesquera "Regasa No. 2", las cuales fueron capturadas en la costa de El Rosario B.C. y transportadas al CICESE por el Centro Regional de Investigación Pesquera (CRIP), de Ensenada, B.C. Las hembras fueron transportadas en una hielera acondicionada con aireación; éstas fueron acondicionadas en un tanque de cultivo de 400 L. El sistema de recirculación de agua para los reproductores consistió en un biofiltro de cuentas plásticas de un volumen de 1 pie<sup>3</sup> (BBF2P, Aquatic Eco-Systems™), en donde se llevó a cabo el proceso de nitrificación de los desechos amoniacales, además de un filtro de cartucho de 5 µm y dos de 1 µm para la retención de sólidos, un fraccionador de espuma y una lámpara de irradiación ultra violeta (QL-25, Lifegard Ultraviolet Sterilizer). La circulación y aireación del agua dentro del tanque se realizó mediante un sistema de "airlift". Se utilizaron dos enfriadores de agua en línea con 1/5 hp de capacidad (TLD-2, Delta Star Aqua Logic, Inc.), para mantener el agua a una temperatura constante de  $18 \pm 1$  °C, la cual fue seleccionada con base en el promedio de temperaturas registradas durante la presencia de hembras ovígeras en el medio natural de *P. interruptus* (Vega-Velázquez, 2003). Este sistema permitió mantener una calidad de agua constante para la eclosión de las larvas.

La alimentación diaria de las hembras, *ad libitum*, fue con mejillón fresco (*Mytilus galloprovincialis*). Las frezas fueron monitoreadas periódicamente para darle seguimiento al desarrollo de los huevos y, una vez que las larvas estuvieran a punto de eclosionar, el tubo de nivel de agua en el tanque fue cubierto con una malla de 200  $\mu\text{m}$  para evitar la salida de las larvas.

## 2.5 Obtención de larvas

El monitoreo constante de las frezas permitió, mediante su coloración, observar la aparición de los pedúnculos oculares, la desaparición del vitelo y estimar el día de eclosión de los huevos. Debido a que, como estrategia reproductiva la hembra libera a las larvas durante la noche, en el día de eclosión estimado se disminuyó la aireación y flujo de agua en el tanque de las hembras frezadas. Además, se suspendió su alimentación días antes para minimizar residuos de materia orgánica en los tanques de mantenimiento.

Una vez que las larvas eclosionaron, se colocó una lámpara de luz blanca sobre el tanque y mediante fototropismo positivo, solo se seleccionaron las larvas que se encontraban en la superficie, atraídas por la luz, y que fueron consideradas como las más fuertes. Las larvas fueron colectadas con tamices de luz de malla de 200  $\mu\text{m}$ . La colecta fue realizada de manera manual y lenta, para no generar turbulencia y burbujas que lastimaran a las larvas (Bautista-Soto com. per. 2015).

Las larvas recolectadas fueron colocadas en un contenedor de 10 L y se realizó el recuento en relación al volumen total. Posteriormente se desinfectaron con formaldehído a 25 ppm durante un lapso de 20 min. (Ritar, 2002) y finalmente se colocaron en los doce tanques de cultivo (1900 larvas por tanque).

## 2.6 Bioensayo con filosomata de *P. interruptus*

El bioensayo se inició con las dos dietas (tratamientos), con un total de 6 réplicas por tratamiento, las larvas se alimentaron dos veces al día con las dietas correspondientes (MA+A y A). La ración de alimento utilizada fue de 3 nauplios·larva<sup>-1</sup> (Liddy *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2003; Galicia, 2006) y éstos se retuvieron en los tanques mediante filtros de malla de 200  $\mu\text{m}$ , colocados en los tubos de nivel. Para eliminar la *Artemia* remanente en los tanques de cultivo, se cambiaban los filtros por otros de 400  $\mu\text{m}$  mientras se realizaba la limpieza de cada tanque.

### 2.6.1 Evaluación del crecimiento y supervivencia

Durante los bioensayos las larvas fueron monitoreadas diariamente para detectar los cambios de estadio. Los rasgos morfológicos de los estadios fueron identificados de acuerdo a los descritos por Johnson (1956). Se recolectaron muestras aleatorias de las larvas que se encontraban en la superficie, para calcular el porcentaje de larvas que habían mudado al siguiente estadio. Este porcentaje fue calculado diariamente hasta llegar al 70 % (Wu *et al.* 2012). Una vez que en cada tanque se alcanzó este porcentaje, se recolectaron 30 larvas por unidad experimental, para su medición en los estadios I, II y III, y 10 larvas por tratamiento para el estadio IV (debido a la disminución en el número de organismos). Se tomaron fotografías de cada una de las larvas recolectadas, por medio de un estereoscopio Olympus y una cámara INFINITY3. Posteriormente fueron analizadas mediante el software *ImageJ*, por medio del cual se les midió la longitud total (LT), esto es, desde el extremo anterior del cefalotorax, al extremo posterior del pleón. Con estos datos se calculó la tasa de crecimiento (TC) y el índice de crecimiento (IC) con las formulas descritas a continuación:

$$TC = \frac{(Lt_f - Lt_i)}{t} \quad (1)$$

$$IC = \frac{(Lt_f - Lt_i)}{Lt_i} 100 \quad (2)$$

Donde:

TC = tasa de crecimiento (mm·día<sup>-1</sup>)

IC = índice de crecimiento (%)

Lt<sub>f</sub> = longitud total final (mm)

Lt<sub>i</sub> = longitud total inicial (mm)

t = tiempo (días)

La supervivencia se calculó también cuando se había obtenido el 70 % de larvas que habían mudado a los estadios III y IV, para lo cual se recolectaron tres muestras aleatorias de 250 mL por tanque de cultivo y se realizó el recuento total de los organismos de cada muestra. La supervivencia se calculó por diferencia entre la cantidad inicial de larvas y el total estimado por cada estadio mencionado.

Una vez obtenido el 70 % de larvas que alcanzaron el estadio subsecuente, se recolectaron larvas para el análisis de ácidos grasos (AG). Se tomaron seis muestras (con 300 organismos cada una) de larvas recién eclosionadas, éstas fueron utilizadas para determinar el peso seco total (PST), el peso orgánico (PO) y el perfil y concentración de ácidos grasos al inicio del experimento. Para los estadios II y III fueron recolectadas 12 muestras (80 larvas por muestra) por cada tratamiento, seis muestras fueron utilizadas para determinar el PST y el PO, y las seis restantes de cada dieta para el análisis de ácidos grasos (AG). Para evitar la degradación de ácidos grasos en las muestras, previo a su almacenamiento (a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), se agregó a las muestras el antioxidante butilhidroxitolueno (BHT) al 1%.

## **2.7 Evaluación de dietas**

### **2.7.1 Mezcla de microalgas**

Con el fin de evaluar la composición bioquímica de las dietas, se llevó a cabo un cultivo semicontinuo de microalgas, adicional al llevado a cabo durante el bioensayo. En este cultivo se reprodujo el mismo protocolo descrito anteriormente, con igual número de réplicas para cada microalga. Se realizaron conteos diarios y se tomaron muestras de biomasa cada tercer día para realizar una mezcla en relación 1:1 ( $\text{cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) de cada especie. Para obtener el PST y el PO, de la mezcla de microalgas, se filtraron volúmenes conocidos en filtros de fibra de vidrio Watman GF/C de 4.7 cm de diámetro, previamente calcinados y pesados. Los filtrados se lavaron con una solución de formiato de amonio al 3 % para eliminar las sales, se colocaron en una estufa a  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta obtener el peso constante. Posteriormente se quemaron en una mufla a  $490\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 12 horas, para obtener el peso de cenizas (PC) y, por diferencia entre el PST y el PC, se obtuvo el PO. Además, para el análisis de ácidos grasos se centrifugaron 200 mL de la mezcla a 4900 rpm y  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 15 min. Las muestras centrifugadas se almacenaron, para su posterior análisis, en un ultra congelador a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , añadiendo previamente el antioxidante BHT.

### 2.7.2 Nauplios de *A. franciscana* enriquecidos

Se cultivaron nauplios de *A. franciscana* de manera independiente a los utilizados en los bioensayos de alimentación de filosomata. Estos nauplios fueron enriquecidos con el mismo método descrito previamente. El enriquecimiento y la toma de muestra se realizó cada tercer día.

Los nauplios enriquecidos fueron desinfectados con formaldehído a 200 ppm durante 20 min y enjuagados sobre una malla de 200  $\mu\text{m}$  con una solución de formiato de amonio al 3 % para eliminar las sales. Se concentraron  $1 \times 10^5$  nauplios en viales de cristal, con dos réplicas por dieta. Se agregó BHT a las muestras para evitar su oxidación y se mantuvieron en un ultracongelador a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  para su posterior análisis de ácidos grasos. Muestras adicionales fueron utilizadas para calcular el PST, PO y PC, con la metodología descrita anteriormente.

## 2.8 Análisis de ácidos grasos

Para la extracción de ácidos grasos de las muestras se siguió el método descrito por Sato y Murata (1988). Las muestras con un peso seco conocido fueron colocadas en tubos de cristal con rosca y teflón previamente lavados, se agregaron 3 mL de una solución de metanol-HCl al 5 %, y se pusieron a baño maría a  $85\text{ }^\circ\text{C}$  durante 2.5 horas para su derivatización. Una vez transcurrido este tiempo, las muestras se enfriaron y los ácidos grasos metil esterificados se extrajeron agregando 2 mL de hexano grado HPLC. Las muestras se homogenizaron con un vortex, se dejaron reposar hasta formar una bifase, y se recuperó el hexano en la fase superior, en un tubo limpio con tapa y teflón en la rosca.

Las muestras con hexano, que contenían los ácidos grasos, fueron evaporadas con nitrógeno gaseoso ( $\text{N}_2$ ). Después se re-suspendieron en 200  $\mu\text{L}$  de hexano y se transfirieron a viales color ámbar de 1.5 mL. Las muestras ya en los viales se evaporaron nuevamente con  $\text{N}_2$ , fueron selladas y guardadas en un congelador a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  hasta su análisis cromatográfico.

El análisis de ácidos grasos se realizó en el laboratorio de biotecnología de microalgas, del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR). Se utilizó un equipo de cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC/MS) (GCD 1800B). Debido a que las muestras de ácidos grasos de *Artemia* enriquecida y la mezcla de las microalgas representaban una biomasa en peso seco mayor a la estandarizada para la curva de calibración del cromatógrafo de gases, fue necesaria una dilución con

hexano de 1:5-1:6 (dependiendo de la muestra). Se inyectó 1  $\mu\text{L}$  de muestra para el análisis, como gas transportador se utilizó helio de alta pureza. La columna Omegawax 250, utilizada para el análisis fue de tipo capilar de sílice de 30 m de largo, 0.25  $\mu\text{m}$  de diámetro y 0.25  $\mu\text{m}$  de espesor.

La identificación de ácidos grasos en el cromatógrafo se realizó con el software WSearch 2005, comparando el tiempo de retención de los picos de las muestras con respecto a los obtenidos en una curva de calibración de un estándar comercial que contiene 37 ácidos grasos metil esterificados (Sigma, 47885-U). Además, mediante la espectrometría de masas se identificaron los iones característicos de cada ácido graso presente en la muestra, para corroborar con mayor exactitud la presencia de cada ácido graso identificado.

La cuantificación de los ácidos grasos se realizó mediante la integración del área bajo la curva de cada pico detectado y con la siguiente fórmula:

$$C = \frac{\left(\frac{A}{FC}\right) (V_r)}{\text{PSM}} \quad (3)$$

Donde:

C = concentración del ácido graso en  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$

A = área del pico del ácido graso

FC= factor de corrección (pendiente de la curva de calibración)

V<sub>r</sub> = volumen de hexano en que se resuspendió la muestra de ácidos grasos

PSM = peso seco de la muestra en mg

## 2.9 Diseño experimental y análisis estadístico

El experimento consistió en un diseño experimental completamente aleatorizado (DCA). La selección de los tratamientos para cada tanque fue asignada de manera aleatoria para eliminar el sesgo, teniendo un total de 6 réplicas por tratamiento.

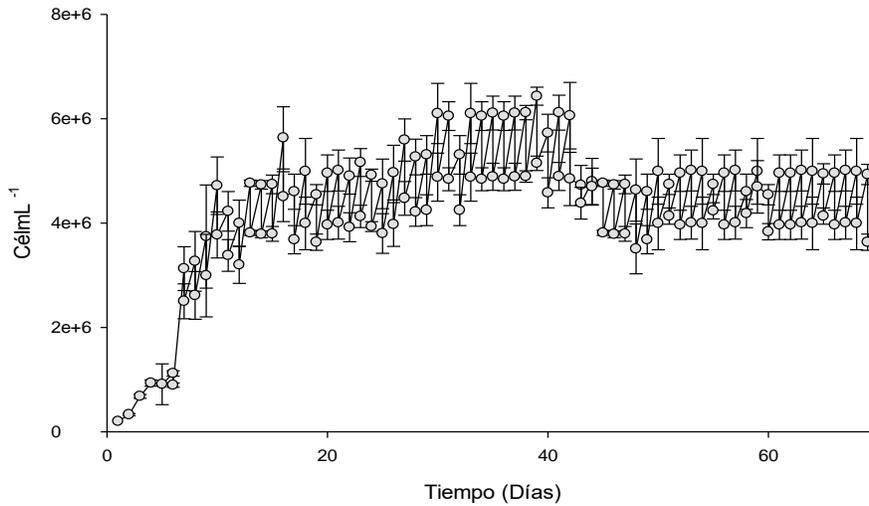
Los datos obtenidos en porcentaje fueron transformados mediante la función arcoseno, previo al análisis estadístico, recomendada para normalizar los datos (Fowler *et al.*, 2013).

Para detectar las diferencias entre las concentraciones de ácidos grasos presentes en las dietas utilizadas y las diferencias en supervivencia entre los dos tratamientos (A y MA+A) se realizó una prueba de t-Student. Y para detectar diferencias entre las concentraciones de ácidos grasos en las larvas de ambos tratamientos y entre los estadios alcanzados se realizó un ANOVA de dos vías.

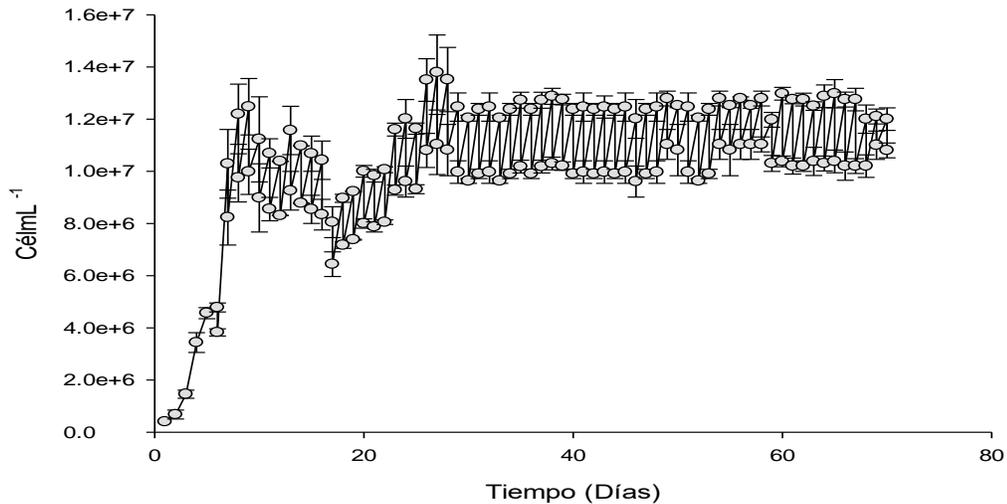
## Capítulo 3. Resultados

### 3.1 Cultivo de microalgas marinas

La densidad celular de las microalgas en cultivo semicontinuo, se mantuvo en un promedio de  $5.42 \times 10^6$  cél·mL<sup>-1</sup> para *Isochrysis* sp. (Figura 4) y de  $11.40 \times 10^6$  cél·mL<sup>-1</sup> para *P. tricornutum* (Figura 5).

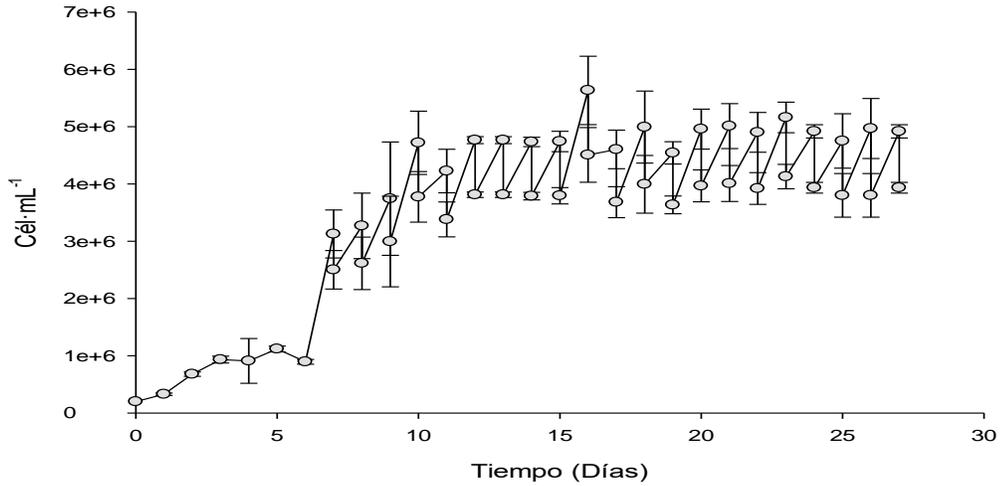


**Figura 4.** Abundancia (cél·mL<sup>-1</sup>) de *Isochrysis* sp. mantenida en cultivo semicontinuo. Se muestran datos promedio y las barras indican el error estándar. (n=3).

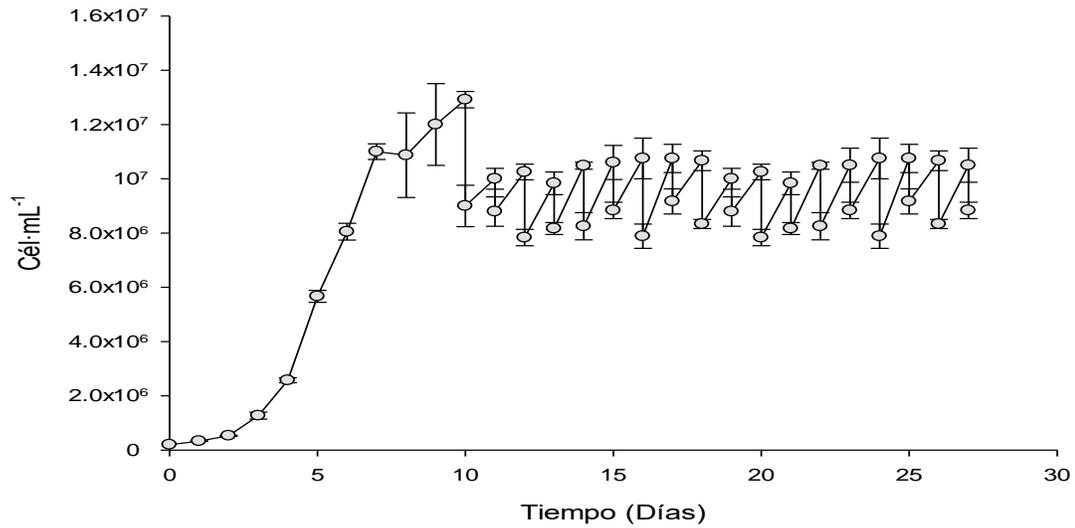


**Figura 5.** Abundancia (cél·mL<sup>-1</sup>) de *Phaeodactylum tricornutum* mantenida en sistema semicontinuo. Se muestran datos promedio y las barras indican el error estándar. (n=3).

De igual manera los cultivos independientes utilizados para el análisis de dietas mantuvieron una tendencia estable durante el cultivo semicontinuo, con un promedio de  $4.62 \times 10^6$  cél·mL<sup>-1</sup> para *Isochrysis* sp. y  $10.55 \times 10^6$  cél·mL<sup>-1</sup> para *P. tricornutum* (Figuras 6 y 7), densidades similares a los cultivos utilizados para el enriquecimiento de *A. franciscana* durante el cultivo larval.



**Figura 6.** Abundancia (cél·mL<sup>-1</sup>) de *Isochrysis* sp. mantenida en sistema semicontinuo para el análisis de las dietas. Se muestran datos promedio y las barras indican el error estándar. (n=3).



**Figura 7.** Abundancia (cél·mL<sup>-1</sup>) de *Phaeodactylum tricornutum* mantenida en sistema semicontinuo para el análisis de las dietas. (n=3). Se muestran datos promedio y las barras indican el error estándar. (n=3).

## 3.2 Calidad de las dietas

### 3.2.1 Peso seco y análisis de ácidos grasos en la mezcla de microalgas marinas *Isochrysis* sp. y *P. tricornutum*

El PST promedio por mL de la mezcla de microalgas se mantuvo entre 30.72 y 44.73  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  mientras que los valores promedio por muestreo del PO variaron de 20.54 a 26.17  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Tabla 2). Los promedios por célula variaron de 62.07 a 73.80  $\text{pg}\cdot\text{cél}^{-1}$  para el PST y entre 41.50 y 51.56  $\text{pg}\cdot\text{cél}^{-1}$  para el PO (Tabla 3).

**Tabla 2.** Peso seco total (PST) y peso seco orgánico (PO) ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) de la mezcla de las microalgas *Isochrysis* sp. y *Phaeodactylum tricornutum* durante la fase de máximo crecimiento exponencial. Se muestran datos promedios y entre paréntesis el error estándar. n=3.

Número de muestreo	PST ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	PO ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}$ )
1	41.20 (2.88)	23.56 (5.71)
2	44.73 (4.41)	26.17 (1.50)
3	31.57 (1.07)	21.74 (2.13)
4	31.12 (0.53)	20.54 (3.05)
5	30.72 (0.44)	21.20 (2.86)
6	36.53 (2.10)	25.52 (5.96)
<b>Promedio</b>	<b>35.98 (2.41)</b>	<b>23.12 (0.95)</b>

**Tabla 3.** Peso seco total (PST) y peso seco orgánico (PO) ( $\text{pg}\cdot\text{cél}^{-1}$ ) de la mezcla de las microalgas *Isochrysis* sp. y *Phaeodactylum tricornutum* durante la fase de máximo crecimiento exponencial. Se muestran datos promedios y entre paréntesis el error estándar. n=18.

Número de muestreo	PST ( $\text{pg}\cdot\text{cél}^{-1}$ )	PO ( $\text{pg}\cdot\text{cél}^{-1}$ )
1	62.95 (1.61)	42.13 (9.36)
2	73.33 (7.05)	42.90 (2.45)
3	64.42 (2.17)	44.38 (4.34)
4	62.87 (1.07)	41.50 (6.17)
5	62.07 (0.89)	42.83 (5.77)
6	73.80 (4.24)	51.56 (2.03)
<b>Promedio</b>	<b>69.00 (3.60)</b>	<b>44.63 (1.45)</b>

La composición de ácidos grasos que se obtuvo de la mezcla de microalgas (Tabla 4), agrupándolos de acuerdo a su grado de saturación indico que el grupo de ácidos grasos que se encontró en mayor concentración fue el de los poliinsaturados (AGPI) con 43.14% ( $4.75 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ), seguido de los ácidos graso

saturados (AGS) con 31.74% (3.51  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) y monoinsaturados (AGMI) con una concentración de 25.12% (2.77  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ).

Individualmente, de los AG saturados los de mayor concentración fueron: el 14:0 con 16.13 % (1.67  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) y el 16:0 con 15.33 % (1.59  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ). Los AGPI más abundantes fueron: el 18:4n3 con 11.03 % (1.15  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) seguido del 20:5n3 (EPA) y 22:6n3 (DHA), con concentraciones promedio de 9.96 % y 8.64 % (1.03 y 0.89  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) respectivamente. El ácido 20:4n6 se encontró en concentraciones bajas (0.06 %, 0.01  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ).

La relación n3/n6 fue de 5.83:1, mientras que la razón DHA/EPA se mantuvo con un promedio de 0.90:1.

**Tabla 4.** Composición de ácidos grasos (% y  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) de la mezcla de microalgas *Isochrysis* sp. y *Phaeodactylum tricornutum* cultivadas en sistema semicontinuo. Se muestran datos promedio y entre paréntesis se presenta el error estándar. n=12.

Ácido graso	%	$\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$
<b>14:0</b>	16.13 (0.88)	1.67 (0.10)
<b>16:0</b>	15.33 (0.85)	1.59 (0.12)
<b>18:0</b>	0.28 (0.03)	0.03 (0.00)
<b><math>\Sigma</math>AGS</b>	31.74 (1.63)	3.51 (0.69)
<b>16:1n9</b>	14.94 (0.58)	1.55 (0.34)
<b>18:1n9</b>	8.37 (0.42)	0.87 (0.17)
<b>18:1n7</b>	1.81 (0.19)	0.19 (0.07)
<b><math>\Sigma</math>AGMI</b>	25.12 (1.03)	2.77 (0.57)
<b>16:2n4</b>	2.54 (0.22)	0.26 (0.09)
<b>16:3n6</b>	4.05 (0.50)	0.42 (0.19)
<b>16:4n3</b>	1.12 (0.13)	0.12 (0.05)
<b>18:2n6</b>	2.35 (0.15)	0.24 (0.05)
<b>18:3n3</b>	3.38 (0.51)	0.35 (0.18)
<b>18:4n3</b>	11.03 (1.24)	1.15 (0.45)
<b>20:4n6</b>	0.06 (0.01)	0.01 (0.00)
<b>20:5n3</b>	9.96 (0.63)	1.03 (0.22)
<b>22:6n3</b>	8.64 (0.34)	0.89 (0.11)
<b><math>\Sigma</math>AGPI</b>	43.14 (2.58)	4.75 (1.11)
<b><math>\Sigma</math>AGAI</b>	18.66 (0.71)	2.08 (0.28)
<b>n-3</b>	34.13 (1.85)	3.60 (0.78)
<b>n-6</b>	6.47 (0.63)	0.88 (0.28)
<b>n-3/n-6</b>	5.83 (0.67)	5.83 (0.67)
<b>DHA/EPA</b>	0.90 (0.07)	0.90 (0.07)

AGS: ácidos grasos saturados, AGMI: ácidos grasos monoinsaturados, AGPI: ácidos grasos poliinsaturados, AGAI: ácidos grasos altamente insaturados.

### 3.2.2 Peso seco y análisis de ácidos grasos en *A. franciscana* enriquecida

El peso seco total y orgánico de *A. franciscana* (AF) enriquecida con las dos dietas fueron, en general, muy similares entre los diferentes muestreos, solo se obtuvieron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el muestreo 3, siendo mayor el PST y PO del tratamiento A (Tabla 5). Mientras que, en los promedios de los diferentes muestreos obtenidos en ambos pesos, no se observaron diferencias significativas entre dietas, el PST fue de  $34.03 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (dieta MA+A) y de  $35.88 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (dieta A). El promedio del PO de AF enriquecida fue de  $32.05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  y  $30.89 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  para el tratamiento A y MA+A respectivamente.

**Tabla 5.** Peso seco total (PST) y peso seco orgánico (PO) ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) de *Artemia franciscana* enriquecida con los dos tratamientos y utilizadas durante el bioensayo. MA+A (Nauplios enriquecidos con la mezcla de microalgas+aceite Omegamex®), A: (nauplios enriquecidos solo con aceite Omegamex®). Se muestran datos promedios y entre paréntesis se presenta el error estándar. Letras iguales indican no diferencia significativas ( $a > b$ ,  $x > y$ ).  $n=12$ .

Número de muestreo	PST ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )		PO ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	
	MA+A	A	MA+A	A
1	37.76 (1.11) <sup>a</sup>	39.72 (1.39) <sup>a</sup>	33.93 (0.71) <sup>x</sup>	34.96 (1.91) <sup>x</sup>
2	33.28 (0.73) <sup>a</sup>	34.86 (0.66) <sup>a</sup>	30.22 (0.74) <sup>x</sup>	31.19 (1.04) <sup>x</sup>
3	33.70 (0.12) <sup>b</sup>	37.18 (0.69) <sup>a</sup>	30.72 (0.37) <sup>y</sup>	33.38 (0.96) <sup>x</sup>
4	36.17 (2.96) <sup>a</sup>	37.89 (0.42) <sup>a</sup>	32.85 (2.62) <sup>x</sup>	33.53 (0.24) <sup>x</sup>
5	32.37 (1.28) <sup>a</sup>	34.45 (0.78) <sup>a</sup>	29.44 (0.99) <sup>x</sup>	30.87 (0.60) <sup>x</sup>
6	30.90 (1.01) <sup>a</sup>	31.18 (0.60) <sup>a</sup>	28.19 (0.77) <sup>x</sup>	28.10 (0.36) <sup>x</sup>
<b>Promedio</b>	<b>34.03 (0.54)<sup>a</sup></b>	<b>35.88 (0.47)<sup>a</sup></b>	<b>30.89 (0.46)<sup>x</sup></b>	<b>32.05 (0.35)<sup>x</sup></b>

En la tabla 6 se muestran los resultados de la composición de ácidos grasos de los nauplios de *A. franciscana* alimentadas con las dos dietas experimentales. En las sumatorias de los porcentajes de ácidos grasos, agrupados por su grado de saturación, no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos. En forma individual, en el AGAI 22:6n3 (DHA), se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.001$ ), siendo la dieta A (*A. franciscana* enriquecida solo con aceite Omegamex®), la que presentó el mayor valor (0.73 %,  $0.15 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ), mientras que en la dieta MA+A (compuesta por *A. franciscana* enriquecida con la mezcla de microalgas+aceite Omegamex®) se obtuvo solo un 0.41 % ( $0.07 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ). La relación DHA/EPA fue significativamente mayor en la dieta A (0.47:1).

La sumatoria de la concentración ( $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) de los AGS, no presentó diferencias significativas ( $p = 0.17$ ) entre ambas dietas (Tabla 6). Sin embargo, en los AGMI se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), y en los

AGPI y AGAI las diferencias fueron altamente significativas ( $p < 0.001$ ). En estos tres grupos de ácidos grasos, la dieta A fue la que obtuvo las mayores concentraciones tanto de AGMI ( $11.31 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) como en los AGPI y AGAI ( $1.66$  y  $1.20 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ , respectivamente).

También el contenido de DHA fue mayor ( $p < 0.001$ ) en los nauplios alimentados con la dieta A ( $0.15 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ), mientras que en los ácidos grasos EPA y ARA no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos.

**Tabla 6.** Composición de ácidos grasos (% y  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) en nauplios de *A. franciscana* utilizados como alimento para larvas filosoma de *P. interruptus*. MA+A (Nauplios enriquecidos con la mezcla de microalgas+aceite Omegamex®), A: (nauplios enriquecidos solo con aceite Omegamex®). Se muestran datos promedio y entre paréntesis se presenta el error estándar. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre las dietas. (a>b, x>y). n=12.

Ácido graso	%		$\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$	
	MA+A	A	MA+A	A
<b>14:0</b>	4.65 (0.35)	4.11 (0.14)	0.78 (0.03)	0.85 (0.09)
<b>15:0</b>	1.68 (0.07)	1.76 (0.04)	0.29 (0.02)	0.37 (0.03)
<b>16:0</b>	26.28 (0.48)	25.87 (0.36)	4.48 (0.24)	5.33 (0.42)
<b>18:0</b>	11.50 (0.25)	12.00 (0.16)	1.96 (0.11)	2.47 (0.17)
<b>ΣAGS</b>	44.11 (1.40) <sup>a</sup>	43.74 (0.55) <sup>a</sup>	7.97 (0.39) <sup>x</sup>	9.66 (0.75) <sup>x</sup>
<b>16:1n7</b>	5.19 (0.38)	4.50 (0.05)	0.87 (0.04)	0.93 (0.0.8)
<b>18:1n9</b>	30.99 (0.41)	32.94 (0.60)	5.27 (0.22)	6.54 (0.47)
<b>18:1n7</b>	12.99 (0.36)	13.02 (0.25)	2.22 (0.13)	2.69 (0.23)
<b>20:1n9</b>	1.19 (0.04)	1.46 (0.02)	0.20 (0.01)	0.30 (0.03)
<b>22:1n9</b>	0.52 (0.06)	0.74 (0.03)	0.09 (0.01)	0.15 (0.01)
<b>ΣAGMI</b>	50.88 (0.17) <sup>a</sup>	51.52 (0.65) <sup>a</sup>	9.13 (0.37) <sup>y</sup>	11.31 (0.86) <sup>x</sup>
<b>18:2n6</b>	1.12 (0.14) <sup>a</sup>	0.99 (0.06) <sup>a</sup>	0.19 (0.02) <sup>x</sup>	0.20 (0.03) <sup>x</sup>
<b>18:3n3</b>	0.82 (0.19) <sup>a</sup>	0.53 (0.02) <sup>b</sup>	0.13 (0.03) <sup>x</sup>	0.11 (0.01) <sup>x</sup>
<b>18:4n3</b>	0.45 (0.06)	0.53 (0.03)	0.08 (0.01)	0.11 (0.01)
<b>20:3n3</b>	0.18 (0.00)	0.28 (0.01)	0.03 (0.00)	0.06 (0.01)
<b>20:4n6</b>	0.06 (0.01) <sup>a</sup>	0.08 (0.01) <sup>a</sup>	0.01 (0.00) <sup>x</sup>	0.02 (0.01) <sup>x</sup>
<b>20:5n3</b>	1.97 (0.12) <sup>a</sup>	1.60 (0.11) <sup>a</sup>	0.33 (0.02) <sup>x</sup>	0.33 (0.02) <sup>x</sup>
<b>22:6n3</b>	0.41 (0.01) <sup>b</sup>	0.73 (0.03) <sup>a</sup>	0.07 (0.01) <sup>y</sup>	0.15 (0.01) <sup>x</sup>
<b>ΣAGPI</b>	5.01 (0.36) <sup>a</sup>	4.75 (0.11) <sup>a</sup>	0.84 (0.04) <sup>y</sup>	1.66 (0.15) <sup>x</sup>
<b>ΣAGAI</b>	2.62 (0.13) <sup>a</sup>	2.70 (0.12) <sup>a</sup>	0.44 (0.02) <sup>y</sup>	1.20 (0.12) <sup>x</sup>
<b>n-3</b>	3.82 (0.22)	3.68 (0.13)	0.65 (0.03)	1.27 (0.10)
<b>n-6</b>	1.19 (0.15)	1.07 (0.05)	0.20 (0.02)	0.39 (0.05)
<b>n-3/n-6</b>	3.35 (0.24) <sup>a</sup>	3.38 (0.28) <sup>a</sup>	3.35 (0.24) <sup>a</sup>	3.38 (0.28) <sup>a</sup>
<b>DHA/EPA</b>	0.21 (0.03) <sup>b</sup>	0.47 (0.03) <sup>a</sup>	0.21 (0.03) <sup>b</sup>	0.47 (0.03) <sup>a</sup>

AGS: ácidos grasos saturados, AGMI: ácidos grasos monoinsaturados, AGPI: ácidos grasos poliinsaturados, AGAI: ácidos grasos altamente insaturados.

### 3.3 Porcentaje de Supervivencia de larvas filósoma de *P. interruptus*

La supervivencia promedio de las filósomata solo fue posible calcularla en los estadios III y IV. Debido al estrés que ocasionaban este tipo de mediciones en los organismos, la supervivencia fue calculada previa a la extracción de muestras para el análisis de AG.

En la tabla 7 se muestra el porcentaje de supervivencia total de larvas filósoma. Al 70 % de haber mudado al estadio III el porcentaje de supervivencia no presentó diferencias significativas entre los tratamientos ( $p=0.07$ ), a pesar de un valor aparentemente mayor con la dieta MA+A (13.34 %) que con el tratamiento A (10.60 %). Al 70 % de haber mudado al estadio IV, tampoco se observaron diferencias significativas ( $p=0.11$ ) entre los tratamientos.

**Tabla 7.** Supervivencia total (%) en los estadios III y IV de larvas filósoma de *P. interruptus* alimentadas con dos dietas. MA+A: *A. franciscana* enriquecida con microalgas+aceite Omegamex®, A: *A. franciscana* enriquecida solo con aceite Omegamex®. Se muestran datos promedio y entre paréntesis se presenta el error estándar. n=6.

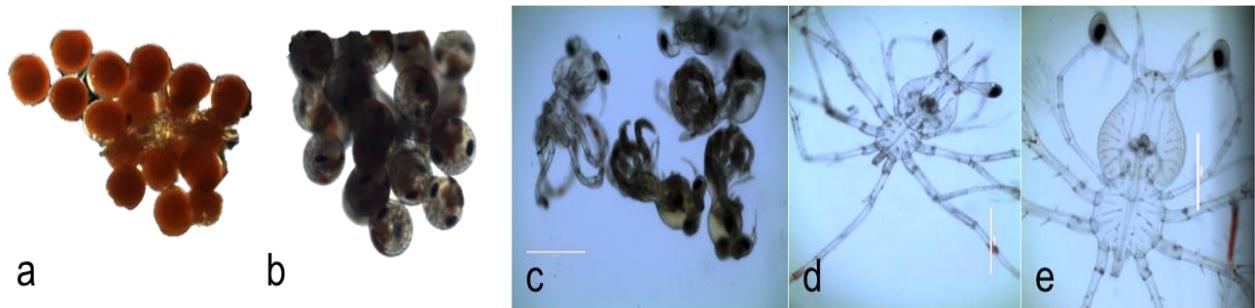
Supervivencia*	Tratamiento	
	MA+A	A
Total III	13.34 (0.94) <sup>a</sup>	10.60 (1.23) <sup>a</sup>
Total IV	9.01 (0.80) <sup>a</sup>	6.66 (1.97) <sup>a</sup>

\* Al 70% del total de las filósomas que alcanzaron el estadio indicado.

### 3.4 Descripción de los estadios de desarrollo de larvas filósoma de *P. interruptus*

El desarrollo de la freza en la hembra tuvo una duración de aproximadamente 8 semanas a una temperatura de 18 °C. Durante este tiempo, se observaron tres cambios de coloración de los huevos previo a la eclosión de las larvas: primetamente cambió de un tono naranja a un tono rojizo y finalmente a un color café con partes transparentes, en donde se observaba con facilidad el desarrollo de los pedúnculos oculares y cromatóforos en las larvas.

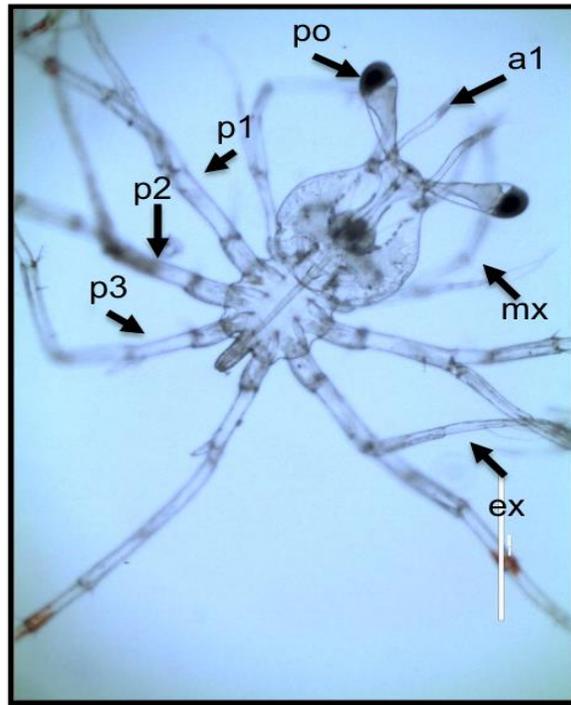
El día de la eclosión de las larvas fue posible coleccionar una pequeña muestra de la freza, en donde se observó el estadio conocido como naupliosoma, el cual mudó instantes después a filósoma estadio I (Figura 8c y d).



**Figura 8.** Desarrollo de huevos y primeros estadios de langosta roja *P. interruptus*. Coloración inicial de los huevos (a), estado de los huevos a días previos a la eclosión (b); Naupliosoma recién eclosionada (c); filosoma I (d); filosoma estadio III (e).

Las clasificaciones de los cambios de estadios fueron realizadas tomando en cuenta las principales características descritas por Johnson (1956). Durante el bioensayo se alcanzaron los primeros 4 estadios larvarios descritos para esta especie (Figuras 9 a 13).

Las principales características morfológicas de la filosoma I de *P. interruptus* son: solo tres pereopodos, de los cuales el tercero no tiene bien desarrollado el tercer exopodito, el cual se encuentra como primordio y se desarrollara en los estadios posteriores. Además, los pedúnculos oculares son redondeados y sin segmentación (Figura 9).

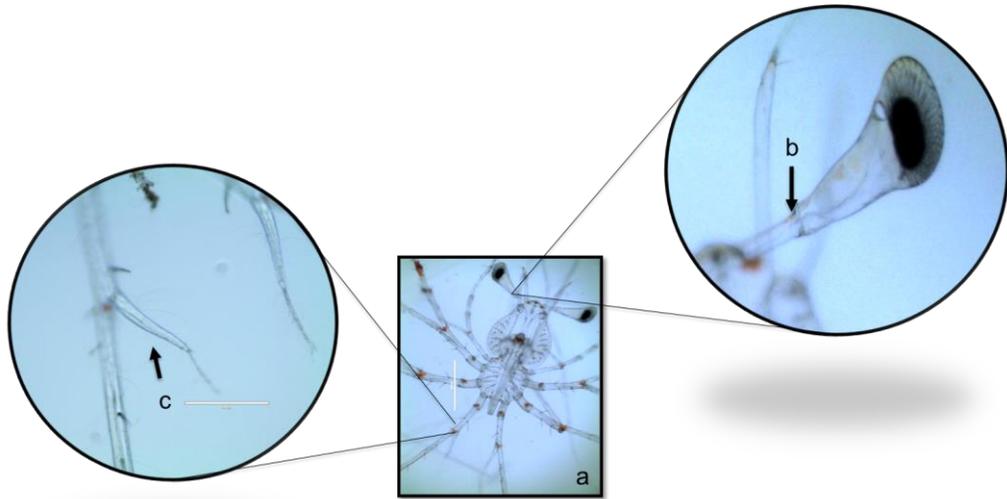


**Figura 9.** Filosoma I de *Panulirus interruptus*. po: pedúnculos oculares sin segmentación; p1 y p2: los dos primeros pares de pereiópodos desarrollados; p3: tercer par de pereiópodos; a1: antena; mx: maxilípedos; ex: exopoditos.

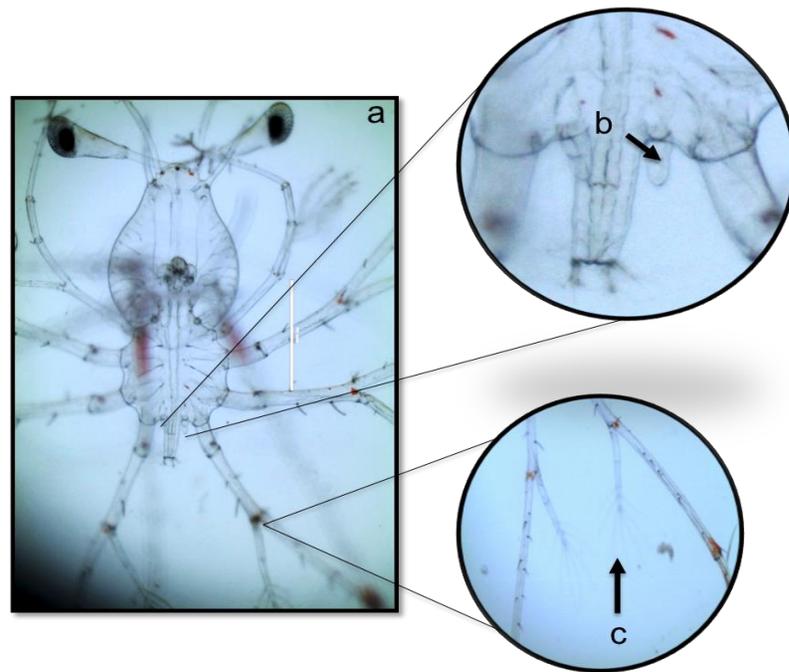
El estadio II se obtuvo, en promedio, a los 12 días después de la eclosión DDE. Sus características morfológicas fueron: el aumento en el tamaño corporal con respecto a las larvas en estadio I, la segmentación de los pedúnculos oculares y un aumento en el tamaño del exopodito localizado en el tercer par de pereiópodos (Figura 10).

El estadio III se alcanzó al día 27 DDE, así como las características morfológicas que distinguen a este estadio. Estas son: el aumento en el tamaño corporal, la aparición de los primordios que darán lugar al 4to y 5to par de pereiópodos, y el completo desarrollo de los exopoditos localizados en el tercer par de pereiópodos, los pedúnculos oculares se encuentran más cercanos entre sí y separados de la región cefálica (Figura 11).

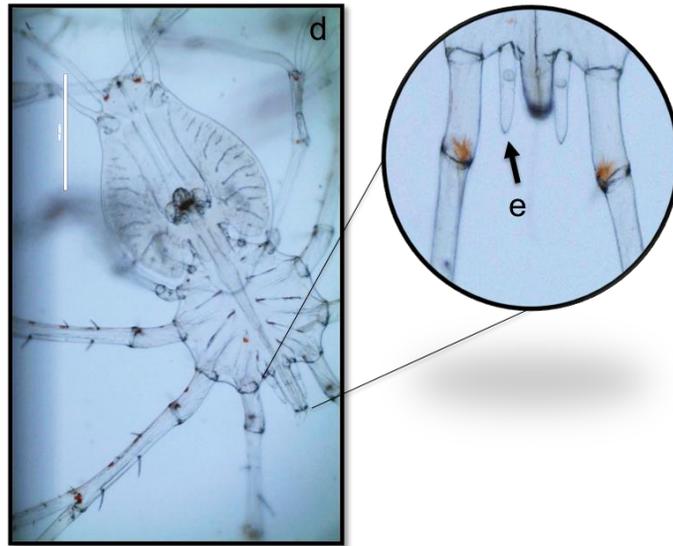
También fue registrada una muda extra con variantes morfológicas, la cual se catalogó como instar (III+) misma que ocurrió el día 41. Se diferenció por un aumento en el tamaño corporal y en el tamaño del segmento que dará lugar al 4to par de pereiópodos (Figura 12), sin embargo, este no fue posible medirlo.



**Figura 10.** Filosoma II de *Panulirus interruptus* (a); pedúnculos oculares segmentados (b); incremento en el tamaño del exopodito del tercer par de pereiópodos (c).

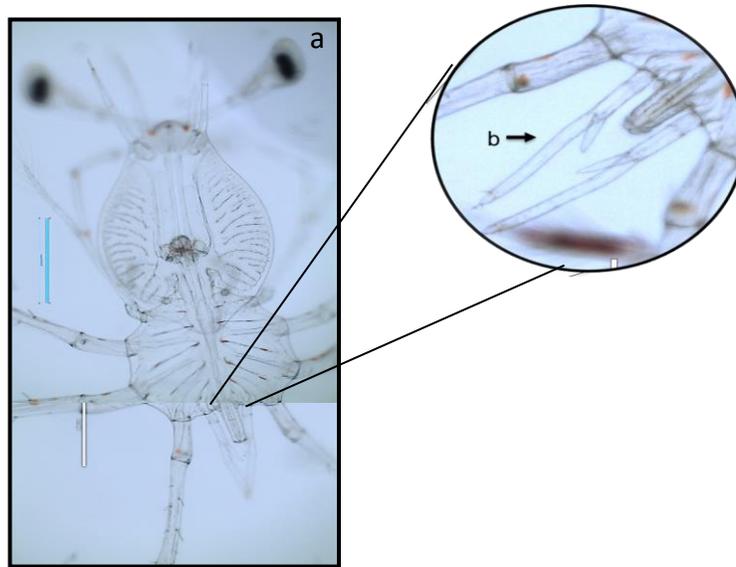


**Figura 11.** Filosoma III (a) de *Panulirus interruptus*, se observa primordio que dará lugar al 4to par de pereopodos (b), los exopoditos (c) del tercer par de pereiópodos están bien desarrollados y funcionales.



**Figura 12.** Instar de la filosoma III (d), en donde se observó un aumento en el tamaño corporal, además de un aumento en el tamaño del primordio que dará lugar al 4to par de pereiópodos (e).

El estadio IV se obtuvo entre los días 53 y 70 DDE, la característica más notoria fue el aumento en el tamaño del brote que dará lugar al 4to par de pereiópodos, el cual presentaba de 1 a 2 segmentaciones. La primera antena se observa sin segmentos (Figura 13), sin embargo, se observó la aparición de un brote que dará lugar al endopodito. El primordio que dará lugar a los exopoditos es más alargado, pero sin segmentación, se observan también los cromatóforos rojos característicos de la especie.



**Figura 13.** Filosoma IV de *Panulirus interruptus* (a). En el 4to par de pereiópodos (b) aún en desarrollo se observan de 1 a 2 segmentaciones.

### 3.5 Crecimiento de larvas filosoma de *P. interruptus*

La longitud total promedio de las larvas al inicio del experimento fue de 1.64 mm al día 1. En el estadio II la longitud total alcanzó promedios de 2.14 mm, y de 2.16 mm (con la dieta MA+A y la dieta A respectivamente) y no mostró diferencias significativas ( $p= 0.50$ ).

En el estadio III, tampoco se observaron diferencias significativas ( $p= 0.54$ ) en el promedio de la LT. En el estadio IV la diferencia de la LT entre las larvas de ambos tratamientos fue de 0.04 mm, teniendo una LT promedio de 3.73 mm en las larvas del tratamiento A y de 3.69 mm en las larvas alimentadas con la dieta MA+A, sin diferencias significativas ( $p= 0.18$ ).

La tasa de crecimiento (TC) expresada como el incremento en la longitud total por día ( $\text{mm día}^{-1}$ ), y el porcentaje de aumento corporal o índice corporal (IC) fueron similares entre los tratamientos.

**Tabla 8.** Longitud total (LT, mm) de larvas filosoma en estadios tempranos de desarrollo, alimentadas con dos dietas: MA+A (Mezcla de microalgas y aceite) y A (Aceite). También se muestra la tasa de crecimiento (TC: mm-día<sup>-1</sup>) y el porcentaje de incremento en longitud total (IC) en cada cambio de estadio. Se muestran datos promedio y entre paréntesis se presenta el error estándar. Letras iguales indican diferencias no significativas entre los tratamientos. n=6.

	FII		FIII		FIV		
	MA+A	A	MA+A	A	MA+A	A	
LT	1.64 (0.06)	2.14 (0.06) <sup>a</sup>	2.16 (0.08) <sup>a</sup>	2.58 (0.07) <sup>m</sup>	2.60(0.08) <sup>m</sup>	3.69(0.06) <sup>x</sup>	3.73(0.03) <sup>x</sup>
TC	-	0.04 (0.00)	0.04 (0.00)	0.04 (0.01)	0.03 (0.00)	0.05 (0.01)	0.06 (0.01)
IC	-	31.82 (1.11)	33.16 (1.21)	49.95 (2.55)	50.46 (2.21)	175.03 (4.97)	180.77 (3.20)

### 3.5.1 Duración del periodo de intermuda

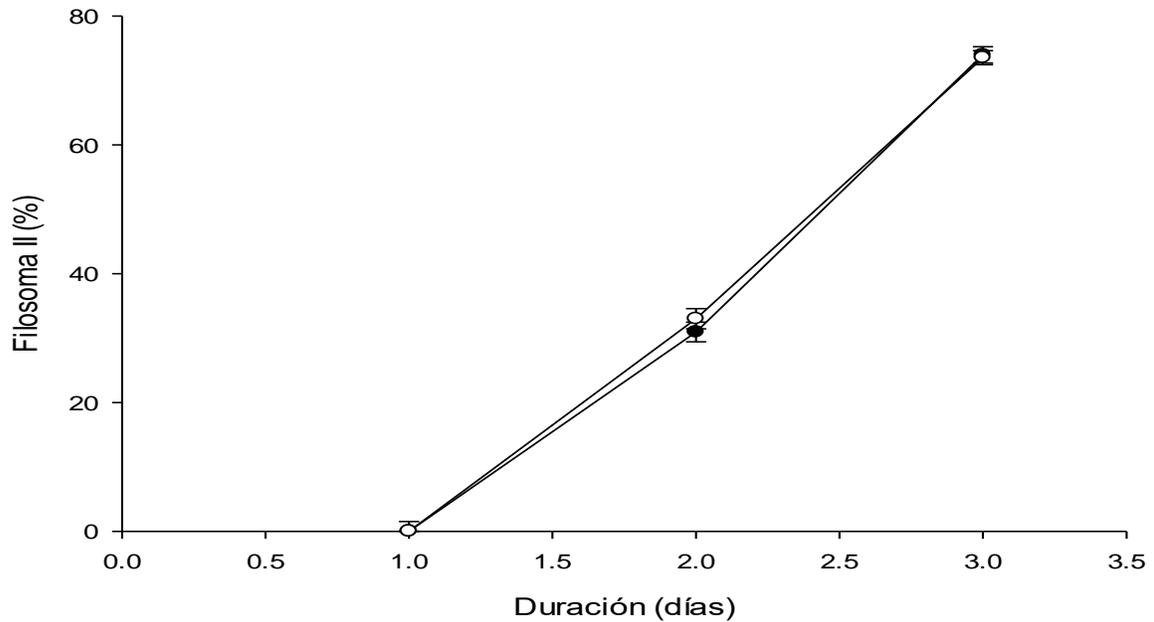
La duración del periodo de intermuda (TI) del estadio I a II tuvo una duración de 12 días en ambos tratamientos (Tabla 9), mientras que del estadio II al III el TI fue de 12 días la dieta MA+A y de 13 en las larvas alimentadas con el tratamiento A. No obstante, al alcanzar el estadio IV el TI fue significativamente más corto ( $p<0.05$ ) en las larvas alimentadas con la dieta A (18 días), en comparación con larvas alimentadas con el tratamiento MA+A, que tuvieron un TI de 22 días.

**Tabla 9.** Duración del periodo de intermuda de larvas filosoma tempranas de *P. interruptus* alimentadas con dos dietas: MA+A (*A. franciscana* enriquecida con la mezcla de microalgas y aceite Omegamex®) y A (solo aceite Omegamex®). Se muestran datos promedio y entre paréntesis se presenta el error estándar. n=6.

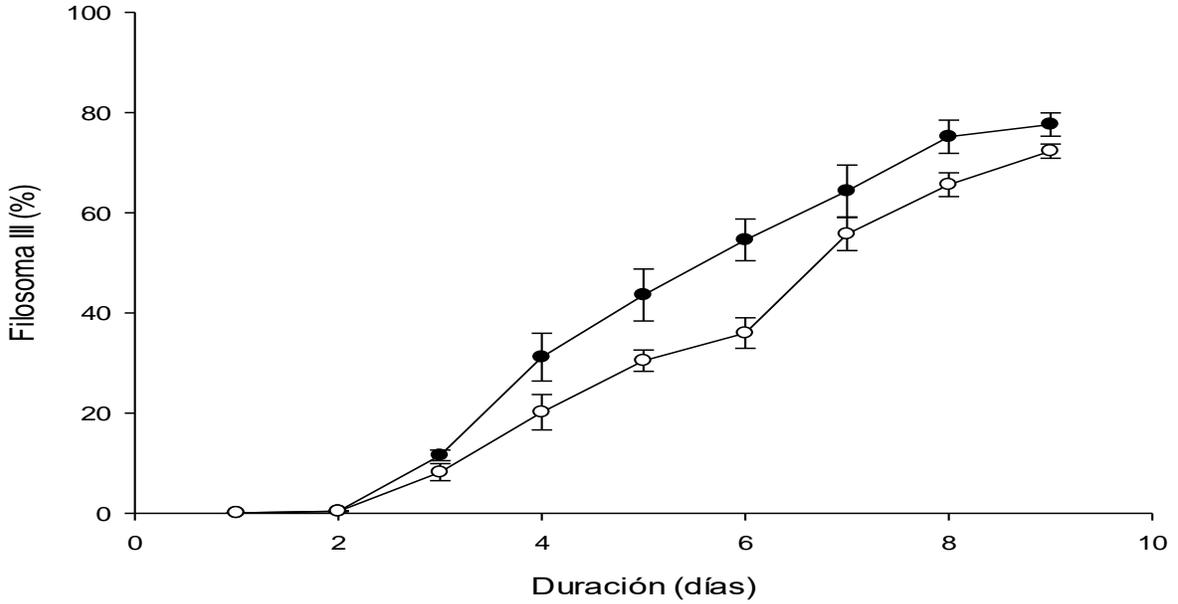
Estadio	Duración del periodo de intermuda (días)	
	MA+A	A
I-II	12 (0.00) <sup>a</sup>	12 (0.00) <sup>a</sup>
II-III	12 (0.22) <sup>a</sup>	13 (0.21) <sup>a</sup>
III-IV	22 (0.58) <sup>a</sup>	18 (0.33) <sup>b</sup>

Dentro del ciclo de muda se calculó el tiempo que tardaba cada tratamiento en llegar al 70 % del estadio al cual estaban mudando las larvas, es decir, del estadio I al estadio II, del estadio II al III y del estadio III al IV. Durante este evento se observó que el tiempo que tardaban las larvas para llegar al 70 % se prolongó más días durante los cambios de los estadios III y IV; siendo el estadio filosoma I al II el más corto, el cual tuvo una duración de 3 días en ambos tratamientos (Figura 14), seguido del estadio filosoma II a III en el cual se

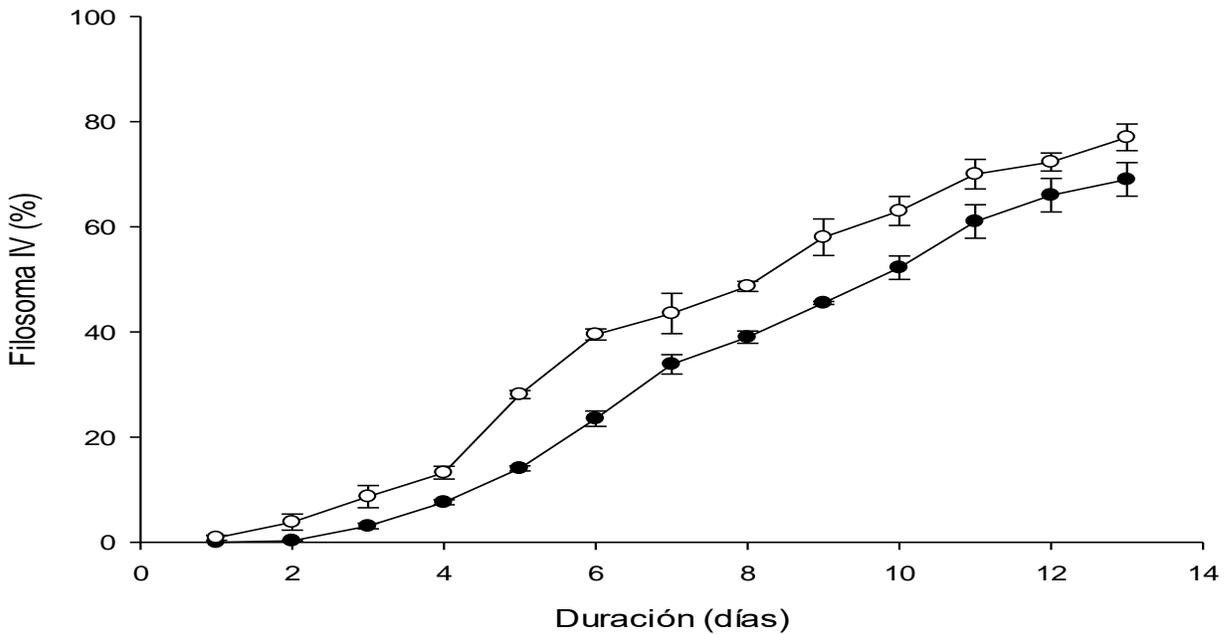
obtuvo el 70 % de filosoma III a los 8 días con el tratamiento MA+A y a los 9 días en el tratamiento A (Figura 15). Finalmente, el cambio del estadio III al IV llevo más tiempo en alcanzar el 70 % con respecto a los estadios anteriores, con 10 días en el tratamiento de larvas alimentadas con la dieta A y 13 días con el tratamiento MA+A (Figura 16), que prolongó la duración del periodo de intermuda en ambos tratamientos. Sin embargo, se observó una tendencia a una duración del periodo de intermuda más corto en las larvas alimentadas con la dieta A.



**Figura 14.** Porcentaje de larvas filosoma que mudaron del estadio I al II en función del tiempo, alimentadas con dos dietas. Círculos color blanco: alimentadas con *Artemia franciscana* enriquecida solo con aceite Omegamex® (A), círculos color negro: alimentadas con *Artemia franciscana* enriquecida con microalgas y aceite Omegamex® en relación 1:1 (MA+A). Se muestran datos promedio y las barras indican el error estándar. n=6.



**Figura 15.** Porcentaje de larvas filosa que mudaron del estadio II al III en función del tiempo, alimentadas con dos dietas. Círculos color blanco: alimentadas con *Artemia franciscana* enriquecida solo con aceite Omegamex® (A), círculos color negro: alimentadas con *Artemia franciscana* enriquecida con microalgas y aceite en relación 1:1 (MA+A). Se muestran datos promedio y las barras indican el error estándar. n=6.



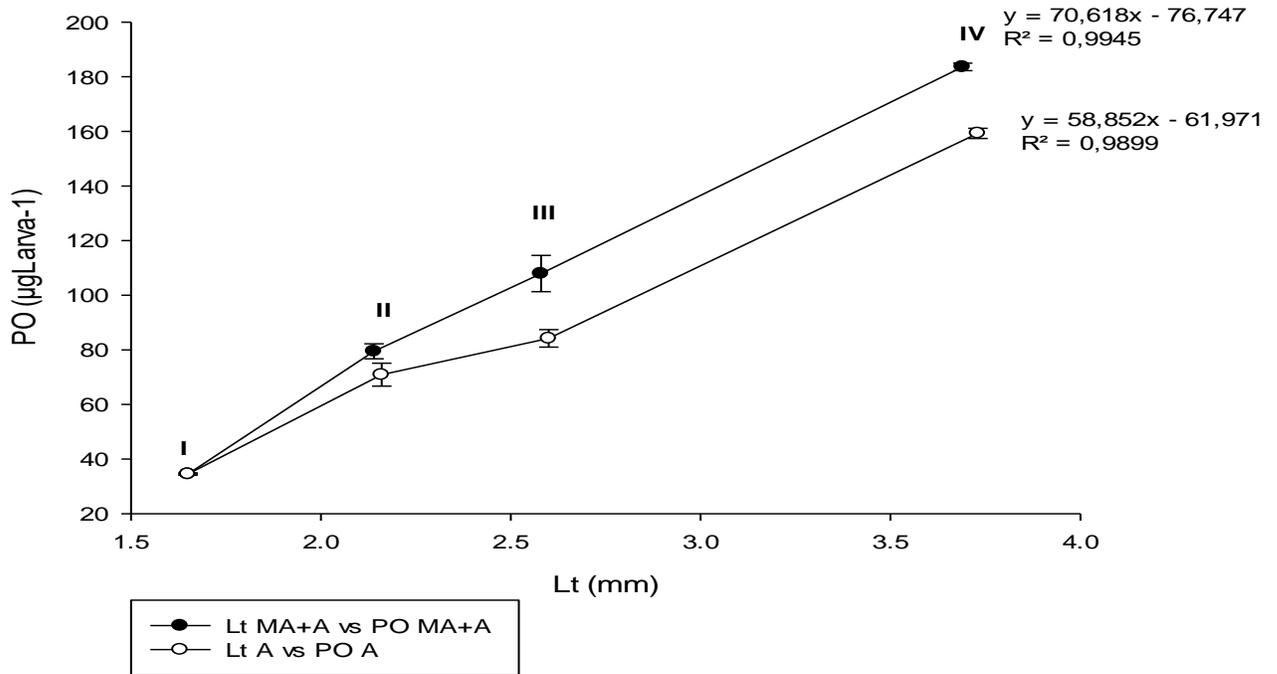
**Figura 16.** Porcentaje de larvas filosa que mudaron del estadio III al IV en función del tiempo, alimentadas con dos dietas. Círculos color blanco: alimentadas con *A. franciscana* enriquecida solo con aceite Omegamex® (A), círculos color negro: alimentadas con la dieta compuesta por MA+A (*Artemia franciscana* enriquecida con microalgas y aceite Omegamex®, en relación 1:1). Se muestran datos promedio y las barras indican el error estándar. n=6.

El promedio de PST por larva en el estadio I fue de 42.16  $\mu\text{g}\cdot\text{Larva}^{-1}$  y el peso orgánico de 34.52  $\mu\text{g}\cdot\text{Larva}^{-1}$  (Tabla 10). En el estadio II no se observaron diferencias significativas entre tratamientos. El PST y PO de los estadios III y IV fue significativamente mayor ( $p<0.001$ ) en las larvas alimentadas con la dieta MA+A, obteniendo un promedio de PST de 102.67  $\mu\text{g}\cdot\text{Larva}^{-1}$  y 79.46  $\mu\text{g}\cdot\text{larva}^{-1}$  de PO en el estadio II, de 139.25 y 107.94  $\mu\text{g}\cdot\text{larva}^{-1}$  en el estadio III y 237.31 y 183.63  $\mu\text{g}\cdot\text{Larva}^{-1}$  para el estadio IV.

**Tabla 10.** Peso seco total y peso seco orgánico ( $\mu\text{g}\cdot\text{larva}^{-1}$ ) de larvas filosoma de los estadios I, II, III y IV, alimentadas con las dietas MA+A y A. Se muestran datos promedio y entre paréntesis se presenta el error estándar. Letras iguales indican no diferencia entre los tratamientos ( $a>b$ ).  $n=6$ .

Estadio	PST ( $\mu\text{g}\cdot\text{Larva}^{-1}$ )		PO ( $\mu\text{g}\cdot\text{Larva}^{-1}$ )	
	MA+A	A	MA+A	A
I	42.16 (1.40) <sup>a</sup>	42.16 (1.40) <sup>a</sup>	34.52 (0.36) <sup>a</sup>	34.52 (0.36) <sup>a</sup>
II	102.67 (3.10) <sup>a</sup>	94.85 (4.78) <sup>a</sup>	79.46 (2.74) <sup>a</sup>	70.90 (4.17) <sup>a</sup>
III	139.25 (7.34) <sup>a</sup>	111.74 (4.20) <sup>b</sup>	107.94 (6.65) <sup>a</sup>	84.19 (3.22) <sup>b</sup>
IV	237.31 (1.77) <sup>a</sup>	205.83 (2.40) <sup>b</sup>	183.63 (1.37) <sup>a</sup>	159.27 (1.86) <sup>b</sup>

Al comparar el PO de las larvas en función de la longitud, se observó que las larvas de ambos tratamientos presentaron el mejor ajuste a una función de crecimiento lineal con un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0.99 y 0.98 para los tratamientos MA+A y A, respectivamente. Se observó que a pesar de que en la LT no mostró diferencias significativas, las larvas alimentadas con la dieta MA+A presentaron un mayor peso en los estadios III y IV (Figura 17).



**Figura 17.** Peso orgánico (PO,  $\mu\text{g}\cdot\text{larva}^{-1}$ ) en función de la longitud total (LT, mm) de larvas filosoma tempranas de *P. interruptus* de los estadios I al IV. Los puntos negros indican la dieta MA+A (microalgas+aceite Omegamex®), los puntos blancos indican la dieta A (solo aceite Omegamex®). Los números sobre los puntos (I, II, III y IV) indican el estadio larval. Se muestran datos promedio y las barras indican el error estándar. n=6.

### 3.6 Ácidos grasos en filosomata de *P. interruptus*

En la tabla 1 se muestra la composición de ácidos grasos (%) en larvas filosoma recién eclosionadas (FI) y del estadio FII al estadio FIV, alimentadas con las dos dietas de *A. franciscana* enriquecida (MA+A y A).

En el estadio FI, los grupos de ácidos grasos más abundantes fueron los AGS (49.32 %, ) y AGMI (34.15 % y ) mientras que las concentraciones de AGPI y AGAI fueron bajas (16.54 %, y 12.48 %, respectivamente). De manera individual, los ácidos grasos de mayor concentración de este estadio fueron el 16:0, 18:0, 18:1n9, 18:1n7, EPA y ARA los cuales sumaron el 80 % del total de ácidos grasos. El DHA alcanzó una concentración promedio de 2.36 % ( $0.83 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ). La relación n6/n6 fue de 0.98:1, mientras que la razón DHA/EPA fue de 0.50:1.

**En el estadio FII** (%), se encontraron diferencias significativas AGS ( $p<0.05$ ) y AGMI ( $p<0.001$ ), siendo las filosomata alimentadas con la dieta A, donde se obtuvieron los mayores porcentajes (31.31 % y 30.05 % respectivamente). Por otro lado, los AGPI y AGAI fueron significativamente mayores ( $p<0.001$ ) en las larvas alimentadas con la dieta MA+A, con valores de 46.38 % y 28.59 % respectivamente. Los ácidos grasos, ARA (20:4n6) y EPA (20:5n3), también fueron mayores ( $p<0.001$ ) en las filosomata alimentadas con MA+A, con valores de 6.52 % y 14.28 % respectivamente. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas ( $p=0.07$ ) en el ácido graso DHA (22:6n3) entre ambos tratamientos.

Las razones DHA/EPA y DHA/ARA fueron significativamente mayores ( $p<0.001$ ) en las larvas alimentadas con la dieta A (0.42:1 y 0.96:1), mientras que la relación n3:n6 fue mayor ( $p<0.05$ ) en larvas alimentadas con la dieta MA+A (3.37:1).

**En el estadio FIII**, las sumatorias de los AGS, AGMI y AGPI no presentaron diferencias significativas ( $p=0.86$ ,  $p=0.18$  y  $p=0.12$ , respectivamente) entre los tratamientos. No obstante, los AGAI presentaron un porcentaje significativamente mayor ( $p<0.05$ ) en las filosomata alimentadas con la dieta A (25.36 %). Así mismo, se encontró que los porcentajes de ARA y DHA fueron mayores ( $p<0.001$ ) en las larvas alimentadas con la dieta A con 5.66 % y 5.46 % respectivamente. Sin embargo, los ácidos grasos: 18:2n6 (linoléico, LOA) y 18:3n3 (linolénico, LNA) presentaron porcentajes mayores ( $p<0.05$ ) en el tratamiento MA+A, con valores de 3.90 % y 12.79 %, respectivamente.

Las relaciones n3/n6 y EPA/ARA (3.57:1 y 2.61:1) fueron significativamente mayores ( $p<0.05$  y  $p<0.001$ , respectivamente) en el tratamiento con la dieta MA+A. Sin embargo, la razón DHA/EPA fue mayor ( $p<0.001$ ) en las larvas alimentadas con la dieta A con una relación de 0.47:1.

**En el estadio FIV** no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos en los grupos de ácidos grasos. Dentro de los AGPI, el ARA, fue significativamente mayor ( $p<0.001$ ) en las filosomata alimentadas con la dieta MA+A (7.23 %); mientras que las larvas alimentadas con la dieta A tuvieron el porcentaje significativamente más alto de DHA, con 10.39 % ( $p<0.05$ ).

Las filosomata alimentadas con la dieta A presentaron los valores mayores en las relaciones: n3/n6 (2.67:1), DHA/EPA (0.68:1) y EPA/ARA (3.87:1).

Al comparar los grupos de ácidos grasos entre los diferentes estadios, fueron estadísticamente diferentes ( $p<0.05$ ): las FI, presentaron las mayores concentraciones de AGS (49.32 %) y AGMI (34.15). No obstante,

presentaron los porcentajes más bajos de AGPI (16.54 %) y AGAI (12.48 %), los cuales tuvieron una tendencia a incrementarse en los siguientes estadios. Los mayores valores de AGPI se encontraron en las filosomata en estadio II alimentada con la dieta MA+A (46.38 %) y en los estadios IV de ambos tratamientos (43.84-44.42 %). Mientras que en los AGAI solo en las larvas estadio IV de ambos tratamientos (31.18-31.67 %).

Dentro de los AGPI, se encontró que las filosomata del estadio IV alimentadas con ambas dietas tuvieron los mayores porcentajes de DHA (de 7.58 a 10.39 %), de EPA (14.98 a 15.24 %) y de LOA (5.81 a 6.22 %). Al mismo tiempo, los mayores porcentajes de ARA se obtuvieron en los estadios II y IV del tratamiento MA+A (6.52-7.23 %). Finalmente, los estadios II y III de ambas dietas tuvieron los mayores valores de LNA (9.89-12.79 %).

La relación n3/n6 más alta se presentó en los estadios II y III alimentados con la dieta MA+A (3.37:1-3.57:1), mientras que las filosomata estadio IV-A tuvieron las mayores relaciones DHA/EPA (0.68:1), EPA/ARA (3.87:1) y DHA/ARA (2.64:1).

**Tabla 11.** Porcentaje de ácidos grasos (respecto al total de los ácidos grasos) de las larvas filosoma de *Panulirus interruptus* (estadio II-IV) alimentadas con nauplios de *A. franciscana* enriquecidos con dos dietas: microalgas+aceite (MA+A) y solo con aceite Omegamex® (A). Se muestran datos promedio y entre paréntesis el error estándar. Letras minúsculas iguales indican que no hay diferencias significativas entre las dietas en cada estadio (Estadio II: a>b, Estadio III m>n, Estadio IV x>y). Letras mayúsculas iguales indican que no hay diferencias significativas entre los estadios (A>B>...E). n=6.

Ácido graso (%)	F I	FII		FIII		FIV	
		MA+A	A	MA+A	A	MA+A	A
<b>14:0</b>	2.44 (0.04)	1.41 (0.04)	1.40 (0.16)	1.62 (0.05)	1.54 (0.06)	1.68 (0.04)	1.66 (0.01)
<b>15:0</b>	1.57 (0.06)	0.41 (0.02)	0.48 (0.04)	0.46 (0.01)	0.48 (0.02)	0.48 (0.05)	0.36 (0.00)
<b>16:0</b>	27.18 (0.12)	13.15 (0.24)	15.36 (0.75)	15.49 (0.20)	15.39 (0.38)	15.22 (0.12)	14.68 (0.36)
<b>18:0</b>	18.13 (0.18)	12.34 (0.22)	14.07 (0.57)	14.84 (0.61)	14.73 (0.87)	13.85 (0.24)	15.57 (1.11)
<b>ΣAGS</b>	49.32 (0.29) <sup>A</sup>	27.31 (0.41) <sup>Cb</sup>	31.31 (1.48) <sup>Ba</sup>	32.41 (0.76) <sup>Bm</sup>	32.14 (1.27) <sup>Bm</sup>	31.22 (0.36) <sup>Bx</sup>	32.27 (0.77) <sup>Bx</sup>
<b>16:1n7</b>	4.62 (0.33)	2.43 (0.09)	1.80 (0.12)	2.03 (0.11)	1.34 (0.04)	1.46 (0.04)	1.21 (0.04)
<b>18:1n9</b>	17.69 (0.05)	14.94 (0.25)	17.80 (0.65)	15.80 (0.37)	15.40 (0.45)	14.47 (0.13)	14.25 (0.18)
<b>18:1n7</b>	7.41 (0.07)	7.76 (0.18)	9.06 (0.30)	8.11 (0.13)	7.93 (0.13)	7.09 (0.38)	7.30 (0.10)
<b>20:1n9</b>	4.43 (0.01)	1.18 (0.05)	1.38 (0.07)	1.19 (0.02)	1.21 (0.05)	1.34 (0.08)	1.13 (0.06)
<b>ΣAGMI</b>	34.15 (0.36) <sup>A</sup>	26.31 (0.39) <sup>Cb</sup>	30.05 (1.11) <sup>Ba</sup>	27.14 (0.61) <sup>Cm</sup>	25.9 (0.63) <sup>CDm</sup>	24.36 (0.13) <sup>CDx</sup>	23.89 (0.38) <sup>Dx</sup>
<b>18:2n6</b>	1.19 (0.02) <sup>D</sup>	3.15 (0.10) <sup>Ca</sup>	3.18 (0.23) <sup>Ca</sup>	3.90 (0.07) <sup>Bm</sup>	3.35 (0.12) <sup>Cn</sup>	5.81 (0.02) <sup>Ax</sup>	6.22 (0.18) <sup>Ax</sup>
<b>18:3n3</b>	0.43 (0.01) <sup>D</sup>	11.17 (0.26) <sup>ABa</sup>	9.89 (1.45) <sup>Ba</sup>	12.79 (0.29) <sup>Am</sup>	11.31 (0.42) <sup>ABn</sup>	5.06 (0.16) <sup>Cx</sup>	4.53 (0.06) <sup>Cx</sup>
<b>18:4n3</b>	-	2.63 (0.15)	0.94 (0.19)	1.65 (0.06)	1.05 (0.11)	0.30 (0.01)	0.22 (0.01)
<b>20:2n6</b>	2.44 (0.01)	0.85 (0.03)	0.81 (0.08)	0.77 (0.02)	0.91 (0.03)	1.57 (0.03)	1.69 (0.03)
<b>20:3n6</b>	-	0.14 (0.02)	0.13 (0.08)	0.10 (0.01)	0.09 (0.01)	0.09 (0.02)	0.10 (0.00)
<b>20:3n3</b>	0.05 (0.00)	0.74 (0.02)	0.44 (0.08)	0.46 (0.02)	0.34 (0.04)	0.16 (0.01)	0.10 (0.05)
<b>20:4n6</b>	4.72 (0.05) <sup>C</sup>	6.52 (0.27) <sup>Aa</sup>	5.03 (0.14) <sup>BCb</sup>	4.09 (0.19) <sup>Dn</sup>	5.66 (0.20) <sup>Bm</sup>	7.23 (0.06) <sup>Ax</sup>	3.94 (0.07) <sup>Dy</sup>
<b>20:4n3</b>	0.44 (0.05)	2.85 (0.14)	1.93 (0.33)	2.27 (0.05)	2.25 (0.08)	1.64 (0.00)	1.42 (0.19)
<b>20:5n3</b>	4.72 (0.05) <sup>C</sup>	14.28 (0.79) <sup>Aa</sup>	11.45 (0.41) <sup>Bb</sup>	10.65 (0.31) <sup>Bm</sup>	11.55 (0.30) <sup>Bm</sup>	14.98 (0.08) <sup>Ax</sup>	15.24 (0.02) <sup>Ax</sup>
<b>22:6n3</b>	2.36 (0.03) <sup>E</sup>	4.06 (0.12) <sup>CDa</sup>	4.85 (0.38) <sup>Ca</sup>	3.75 (0.29) <sup>Dn</sup>	5.46 (0.09) <sup>Cm</sup>	7.58 (0.22) <sup>Bx</sup>	10.39 (0.05) <sup>Ay</sup>
<b>ΣAGPI</b>	16.54 (0.07) <sup>C</sup>	46.38 (0.73) <sup>Aa</sup>	38.64 (2.57) <sup>Bb</sup>	40.45 (0.61) <sup>ABm</sup>	41.97 (0.66) <sup>ABm</sup>	44.42 (0.49) <sup>Ax</sup>	43.84 (0.38) <sup>Ax</sup>
<b>ΣAGAI</b>	12.48 (0.02) <sup>E</sup>	28.59 (0.98) <sup>Ba</sup>	23.83 (1.05) <sup>Cb</sup>	21.34 (0.78) <sup>CDn</sup>	25.36 (0.54) <sup>Cm</sup>	31.67 (0.28) <sup>Ax</sup>	31.18 (0.12) <sup>ABx</sup>
<b>n-3</b>	8.18 (0.08)	35.73 (0.84)	29.49 (2.31)	31.58 (0.47)	31.96 (0.53)	29.71 (0.48)	31.89 (0.25)
<b>n-6</b>	8.35 (0.02)	10.65 (0.26)	9.15 (0.30)	8.87 (0.18)	10.01 (0.21)	14.71 (0.01)	11.95 (0.13)
<b>n-3/n-6</b>	0.98 (0.01) <sup>E</sup>	3.37 (0.14) <sup>ABa</sup>	3.20 (0.18) <sup>Ba</sup>	3.57 (0.05) <sup>Am</sup>	3.20 (0.06) <sup>Bn</sup>	2.02 (0.03) <sup>Dy</sup>	2.67 (0.01) <sup>Cx</sup>
<b>DHA/EPA</b>	0.50 (0.01) <sup>B</sup>	0.29 (0.02) <sup>Eb</sup>	0.42 (0.02) <sup>Ca</sup>	0.35 (0.02) <sup>Dn</sup>	0.47 (0.01) <sup>BCm</sup>	0.51 (0.01) <sup>By</sup>	0.68 (0.00) <sup>Ax</sup>
<b>EPA/ARA</b>	1.00 (0.02) <sup>D</sup>	2.21 (0.16) <sup>Ca</sup>	2.28 (0.07) <sup>Ca</sup>	2.61 (0.05) <sup>Bm</sup>	2.04 (0.03) <sup>Cn</sup>	2.07 (0.03) <sup>Cy</sup>	3.87 (0.09) <sup>Ax</sup>
<b>DHA/ARA</b>	0.50 (0.00) <sup>D</sup>	0.63 (0.02) <sup>Cb</sup>	0.96 (0.07) <sup>Ba</sup>	0.91 (0.04) <sup>Bm</sup>	0.97 (0.04) <sup>Bm</sup>	1.05 (0.04) <sup>By</sup>	2.64 (0.03) <sup>Ax</sup>

AGS: ácidos grasos saturados, AGMI: ácidos grasos monoinsaturados, AGPI: ácidos grasos poliinsaturados, AGAI: ácidos grasos altamente insaturados.

Considerando la concentración de ácidos grasos, con base en el peso seco orgánico ( $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ): en el **estadio II**, el contenido de los AGPI y AGAI tuvo diferencias significativas ( $p < 0.001$ ) entre los tratamientos, siendo las larvas alimentadas con la dieta MA+A las que presentaron una mayor concentración (24.14 y 14.92  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$  respectivamente). Individualmente, dentro de los AGPI, las larvas alimentadas con la dieta MA+A tuvieron las mayores concentraciones de los ácidos grasos EPA (7.28  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ), ARA (3.31  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) y LNA (5.69  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) en el DHA, no hubo diferencias significativas ( $p = 0.69$ ) entre los tratamientos.

**En el estadio III**, las filosomata alimentadas con la dieta A, presentaron las mayores ( $p < 0.001$ ) concentraciones de: AGAI (10.95  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ), ARA (2.44  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ), EPA (4.98  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) y DHA (2.36  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) (Tabla 12).

En las larvas filosoma **estadio IV**, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos en los AGS, AGMI, AGPI y AGAI. No obstante, se encontró que las filosomata alimentadas con la dieta MA+A presentaron mayores concentraciones de LNA (1.75  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) y ARA (2.51  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ). Mientras que las larvas alimentadas con la dieta A tuvieron las mayores concentraciones de: LOA (2.27  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ), EPA (5.56  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) y DHA (3.79  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ).

Al comparar las concentraciones de los diferentes grupos de ácidos grasos entre todos los estadios de desarrollo, las larvas FI presentaron la mayor concentración de AGS (20.66  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ), y junto con los estadios II y III, las mayores concentraciones de AGMI (11.64-13.81  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ). Las mayores concentraciones de AGPI y AGAI fueron del estadio II tratamiento MA+A (24.14 y 14.92  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) y las menores las encontradas en las FI (5.90 y 4.48  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ).

Dentro de los AGPI también se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los estadios (Tabla 12). Las filosomata estadio IV presentaron las mayores concentraciones de LOA (2.01 - 2.27  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) y DHA (2.62-3.79  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ), el LNA fue significativamente mayor en los estadios II y III (4.31-5.69  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) con una tendencia a disminuir en el estadio IV. El ARA tuvo las mayores concentraciones en el estadio II-MA+A (3.31  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ). Finalmente, las menores concentraciones de los AGPI mencionados anteriormente fueron encontradas en las FI.

**Tabla 2.** Composición de ácidos grasos ( $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$  de peso orgánico) de las larvas filosoma de *Panulirus interruptus* alimentadas con nauplios de *A. franciscana* enriquecidos con dos dietas: microalgas+aceite (MA+A) y solo con aceite (A). Se muestran datos promedio y entre paréntesis el error estándar. Letras minúsculas iguales indican que no hay diferencias significativas entre las dietas en cada estadio (Estadio II: a > b, Estadio III m > n, Estadio IV x > y) Letras mayúsculas iguales indican que no hay diferencias significativas entre los estadios (A>B>...E). n=6.

Ácido graso ( $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ )	FI	II (MA+A)	II (A)	III (MA+A)	III (A)	IV (MA+A)	IV (A)
<b>14:0</b>	0.86 (0.01)	0.72 (0.03)	0.62 (0.08)	0.72 (0.02)	0.67 (0.03)	0.58 (0.03)	0.61 (0.01)
<b>15:0</b>	0.55 (0.03)	0.21 (0.01)	0.21 (0.02)	0.20 (0.01)	0.21 (0.01)	0.16 (0.01)	0.13 (0.00)
<b>16:0</b>	9.53 (0.17)	6.71 (0.23)	6.78 (0.49)	6.87 (0.18)	6.65 (0.37)	5.27 (0.23)	5.36 (0.26)
<b>18:0</b>	6.36 (0.08)	6.30 (0.22)	6.20 (0.39)	6.57 (0.26)	6.36 (0.65)	4.80 (0.25)	5.67 (0.27)
<b>ΣAGS</b>	20.66 (0.35) <sup>A</sup>	15.85 (0.62) <sup>Ba</sup>	15.76 (1.08) <sup>Ba</sup>	16.07 (0.41) <sup>Bm</sup>	15.78 (0.52) <sup>Bm</sup>	12.76 (0.54) <sup>Cx</sup>	13.96 (0.08) <sup>Cx</sup>
<b>16:1n7</b>	1.62 (0.15)	1.24 (0.06)	0.80 (0.07)	0.91 (0.07)	0.58 (0.03)	0.50 (0.01)	0.44 (0.03)
<b>18:1n9</b>	6.20 (0.16)	7.62 (0.21)	7.85 (0.49)	7.03 (0.33)	6.68 (0.31)	5.01 (0.13)	5.20 (0.19)
<b>18:1n7</b>	2.60 (0.08)	3.95 (0.07)	4.00 (0.24)	3.60 (0.14)	3.43 (0.10)	2.46 (0.22)	2.66 (0.10)
<b>20:1n9</b>	1.55 (0.04)	0.60 (0.04)	0.61 (0.05)	0.53 (0.02)	0.53 (0.03)	0.46 (0.01)	0.41 (0.03)
<b>ΣAGMI</b>	13.17 (0.44) <sup>A</sup>	13.81 (0.36) <sup>Aa</sup>	13.65 (0.88) <sup>Aa</sup>	12.46 (0.57) <sup>ABm</sup>	11.64 (0.48) <sup>Bm</sup>	8.73 (0.32) <sup>Cx</sup>	9.05 (0.35) <sup>Cx</sup>
<b>18:2n6</b>	0.42 (0.00) <sup>C</sup>	1.61 (0.07) <sup>Ba</sup>	1.39 (0.11) <sup>Ba</sup>	1.73 (0.07) <sup>Bm</sup>	1.46 (0.08) <sup>Bn</sup>	2.01 (0.06) <sup>Ay</sup>	2.27 (0.12) <sup>Ax</sup>
<b>18:3n3</b>	0.15 (0.00) <sup>C</sup>	5.69 (0.17) <sup>Aa</sup>	4.31 (0.65) <sup>Ab</sup>	5.69 (0.26) <sup>Am</sup>	4.91 (0.28) <sup>Am</sup>	1.75 (0.01) <sup>Bx</sup>	1.65 (0.06) <sup>By</sup>
<b>18:4n3</b>	-	1.35 (0.10)	0.41 (0.04)	0.74 (0.04)	0.46 (0.06)	0.10 (0.00)	0.08 (0.00)
<b>20:2n6</b>	0.85 (0.02)	0.43 (0.02)	0.35 (0.04)	0.34 (0.00)	0.39 (0.01)	0.54 (0.01)	0.62 (0.02)
<b>20:3n6</b>	-	0.07 (0.01)	0.06 (0.04)	0.05 (0.00)	0.04 (0.01)	0.03 (0.01)	0.04 (0.00)
<b>20:3n3</b>	0.02 (0.00)	0.38 (0.02)	0.19 (0.03)	0.21 (0.01)	0.15 (0.02)	0.05 (0.00)	0.04 (0.02)
<b>20:4n6</b>	1.66 (0.06) <sup>E</sup>	3.31 (0.09) <sup>Aa</sup>	2.21 (0.08) <sup>Cb</sup>	1.81 (0.05) <sup>Dn</sup>	2.44 (0.05) <sup>Bm</sup>	2.51 (0.11) <sup>Bx</sup>	1.44 (0.01) <sup>Fy</sup>
<b>20:4n3</b>	0.15 (0.01)	1.45 (0.08)	0.84 (0.14)	1.01 (0.03)	0.97 (0.04)	0.57 (0.02)	0.52 (0.08)
<b>20:5n3</b>	1.66 (0.02) <sup>D</sup>	7.28 (0.43) <sup>Aa</sup>	5.01 (0.12) <sup>BCb</sup>	4.71 (0.06) <sup>Cn</sup>	4.98 (0.06) <sup>BCm</sup>	5.19 (0.16) <sup>BCy</sup>	5.56 (0.13) <sup>Bx</sup>
<b>22:6n3</b>	0.83 (0.03) <sup>F</sup>	2.07 (0.05) <sup>Da</sup>	2.11 (0.09) <sup>Da</sup>	1.65 (0.10) <sup>En</sup>	2.36 (0.07) <sup>Cm</sup>	2.62 (0.02) <sup>By</sup>	3.79 (0.07) <sup>Ax</sup>
<b>ΣAGPI</b>	5.90 (0.011) <sup>D</sup>	24.14 (0.55) <sup>Aa</sup>	16.91 (1.01) <sup>BCb</sup>	18.24 (0.36) <sup>Bm</sup>	18.22 (0.56) <sup>Bm</sup>	15.70 (0.39) <sup>Cx</sup>	16.00 (0.52) <sup>BCx</sup>
<b>ΣAGAI</b>	4.48 (0.09) <sup>D</sup>	14.92 (0.50) <sup>Aa</sup>	10.41 (0.24) <sup>BCb</sup>	9.68 (0.18) <sup>BCn</sup>	10.95 (0.17) <sup>Bm</sup>	11.29 (0.31) <sup>Bx</sup>	11.38 (0.31) <sup>Bx</sup>
<b>n-3</b>	2.87 (0.04)	18.22 (0.59)	12.86 (0.88)	14.00 (0.31)	13.84 (0.46)	10.29 (0.20)	11.64 (0.36)
<b>n-6</b>	3.03 (0.08)	5.91 (0.11)	4.05 (0.17)	4.24 (0.06)	4.38 (0.11)	5.41 (0.19)	4.36 (0.15)
<b>ΣTotal</b>	39.73 (0.90) <sup>C</sup>	53.80 (1.30) <sup>Aa</sup>	46.32 (1.66) <sup>Bb</sup>	46.76 (1.11) <sup>Bm</sup>	45.64 (1.05) <sup>Bm</sup>	37.19 (1.25) <sup>Cx</sup>	39.00 (0.94) <sup>Cx</sup>

AGS: ácidos grasos saturados, AGMI: ácidos grasos monoinsaturados, AGPI: ácidos grasos poliinsaturados, AGAI: ácidos grasos altamente insaturados.

### **3.7 Factores abióticos del agua en el sistema de cultivo de *P. interruptus***

Los parámetros fisicoquímicos del agua en el sistema de recirculación acuícola (SRA) se mantuvieron constantes a lo largo de todo el experimento en ambos tratamientos. La temperatura del agua se mantuvo en promedio a 19.29 (0.25) °C, salinidad en 33.01 (0.30) ups, oxígeno disuelto en 7.52 (0.08) mg·L<sup>-1</sup>, el promedio del pH para todo el sistema fue de 7.99 (0.10), el cual se mantuvo estable mediante la adición de bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>). Finalmente el nitrógeno amoniacal total (NAT), pasó de no detectable, a 0.03 (0.01) mg·L<sup>-1</sup>, concentración considerada como aceptable para el cultivo larval.

## Capítulo 4. Discusión

---

El cultivo de microalgas marinas tiene un amplio impacto en la acuicultura de organismos marinos; debido a su calidad nutricional. Su uso como fuente de alimentación ha permitido el desarrollo larval de diferentes especies, así como de organismos intermediarios (*Artemia*, rotíferos y copépodos), utilizados en la alimentación de estadios avanzados de peces y crustáceos (Volkman *et al.*, 1989; Brown *et al.*, 1997). Estos últimos, al igual que otros organismos marinos, tienen habilidad limitada para la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), como el DHA, EPA y ARA, que intervienen en procesos de la formación de membranas y en la respuesta inmune, por lo que son considerados esenciales para su desarrollo (Volkman, 1992; Tocher 1984).

La eficacia de especies utilizadas en este experimento, *Isochrysis sp.* y *Phaeodactylum tricornutum* han sido probadas en una amplia variedad de cultivos de moluscos bivalvos, etapas larvarias de peces y de crustáceos y como enriquecimiento para *Artemia*, la que a su vez ha sido utilizada en el desarrollo larval de diferentes especies de langostas espinosas en las que se ha completado su desarrollo hasta puerulo (Brown., 2002; Matsuda *et al.*, 2006; Goldstein *et al.*, 2008). Estas microalgas se caracterizan por producir altas concentraciones de AGPI (Brown *et al.*, 1989), por lo que el valor nutricional en la mezcla de microalgas utilizada en este trabajo se caracterizó por su alto contenido de este grupo de ácidos grasos (43.14 %), el cual fue mayor al porcentaje reportado por Cazares-Salazar (2014), quien obtuvo 13.95% en una mezcla de *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros muelleri*, que fue utilizada en la alimentación del copépodo *Pseudodiaptomus eurialinus*.

No obstante, en la mezcla de microalgas utilizadas en este estudio, el contenido de DHA (8.64%) fue menor al reportado en otros trabajos, que mencionan que *Isochrysis sp.*, puede producir hasta un 15.8% de DHA (Brown *et al.*, 1989; Volkman *et al.*, 1989; Patil *et al.*, 2007; Anzueto-Sánchez, 2014), aunque produce bajas concentraciones de EPA (2.72 %) según lo reportado por Renaud *et al.* (1994). La concentración de EPA (9.96%) en este trabajo fue mayor a la de DHA, y puede deberse principalmente al aporte de *P. tricornutum*, la cual se ha reportado pueden alcanzarse concentraciones promedio de hasta 28 % (Yongmanitchai y Ward, 1991; Brown *et al.*, 1997).

La concentración de ARA (0.06 %,  $0.01 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) fue casi nula en la mezcla de microalgas, ambas especies presentan una baja o nula producción de este ácido graso (Brown *et al.*, 1989). Cazares-Salazar (2014),

obtuvo 0.59 % de ARA en cultivos mono-específicos de *Isochrysis galbana*, mientras que en *P. tricornutum* se han detectado concentraciones de ARA de hasta 0.60 % (Cavonius *et al.*, 2015).

La relación DHA/EPA de 0.90:1, fue el resultado de la complementación positiva de las dos especies de microalgas utilizadas. La relación obtenida en esta investigación es considerada adecuada para la alimentación de crustáceos marinos (Li *et al.*, 2014). La relación EPA/ARA, no fue calculada para esta mezcla, debido a que la concentración de ARA (0.06 %), fue despreciable.

Los nauplios de *Artemia* spp. han sido ampliamente utilizados en acuicultura como dieta para larvas de crustáceos (Navarro *et al.*, 1999). Sin embargo, su perfil nutricional y, en específico de los ácidos grasos poliinsaturados, ha demostrado no ser el ideal para el desarrollo óptimo de organismos marinos, incluyendo a larvas de *P. interruptus* (Kittaka 1997; Matsuda *et al.*, 2009; Bautista-Soto, 2016). Sobre todo presenta deficiencias en DHA, ya que los nauplios de *A. franciscana* no lo sintetizan (Léger *et al.*, 1986). Esto ha hecho necesario su enriquecimiento con emulsiones comerciales o naturales (fitoplancton), para garantizar el desempeño de los organismos que los consumen (Kanazawa, 1993; Watanabe, 1993).

Las concentraciones de las sumatorias de los AGPI, AGAI, y el ácido graso DHA, en la dieta MA+A, fue aproximadamente un 50% menor que las obtenidas con la dieta A, sugiriendo un mayor aporte por parte del aceite Omegamex® (50% Omegamex®). Con respecto a la mezcla de microalgas. Esta misma tendencia fue observada por Bautista-Soto (2016). Los ácidos grasos presentes en el aceite Omegamex®, el cual contiene en promedio: 42-44% de AGPI y AGAI y 30% de DHA (Navarro-Hurtado, 2011), pudieron ser el reflejo de las mayores concentraciones de éstos ácidos grasos obtenidas en la dieta A.

La concentración más alta de EPA, que de DHA, en ambas dietas, puede ser debida a la actividad metabólica que tiene *Artemia* para transformar DHA a EPA (Navarro *et al.*, 1999). Durante el enriquecimiento pudo haber realizado esta transformación, previo a su asimilación, incrementando la concentración de EPA e igualando las concentraciones presentes en ambas dietas. El mismo patrón fue encontrado por Furuita *et al.* (1996), quienes al enriquecer *Artemia* solo con DHA, en dos diferentes concentraciones, encontraron la misma concentración de EPA en ambos tratamientos. Puede ser que los nauplios de *A. franciscana*, al haber tenido alrededor de 24h de ayuno previo, y el corto tiempo de enriquecimiento (3h), hayan podido realizar el rápido catabolismo del DHA en este periodo y por consiguiente disminuir su disponibilidad para las filosomata.

No obstante, al comparar las concentraciones de estos ácidos grasos con las obtenidas por otros autores, con fuentes y tiempos de enriquecimiento similares, se encontró que los valores de estos ácidos grasos fueron entre 7 y 9.8 veces menores en AGPI que las obtenidas por Bautista-Soto (2016) y 3.2 veces menores que Chakraborty *et al.* (2010). Así mismo, los AGAI y el EPA fueron 4 veces más bajas y de 10 y 12 veces menores en DHA que las registradas por Bautista-Soto (2016).

Los valores bajos de ácidos grasos registrados en las dietas, pueden estar relacionados con el tiempo de exposición de los nauplios de *A. franciscana* a los enriquecedores. Según las recomendaciones de Chakraborty *et al.* (2010), los valores más altos de AGAI, DHA y EPA se obtienen a las 3 horas de enriquecimiento de *Artemia* sp. Sin embargo, las concentraciones de AGPI, DHA y EPA obtenidas en este experimento después de las 3 horas de enriquecimiento apenas superaron la concentración de estos ácidos grasos en nauplios de *Artemia* sin enriquecer (Rees *et al.*, 1994). De acuerdo a otras fuentes de la literatura, un intervalo de 12 y 24 horas de enriquecimiento parece ser el óptimo para obtener altas concentraciones de los AGAI (Evjemo *et al.*, 1997; Coutteau y Mourente, 1997; Han *et al.*, 2000; Phleger *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2003; Nelson *et al.*, 2004; Liddy *et al.*, 2005; Bautista-Soto, 2016).

La baja concentración de los ácidos grasos esenciales obtenidas con ambos tratamientos puede no ser suficiente para satisfacer los requerimientos nutricionales de algunos crustáceos marinos. En el cultivo de algunos peneidos como *Marsupenaeus japonicus* y *Penaeus monodon*, se ha encontrado un requerimiento mínimo del 1% de DHA en sus dietas (Rees *et al.*, 1994), porcentaje mayor al obtenido en los enriquecimientos de este experimento. Aunado a esto, Williams (2007) menciona que debido a la poca información sobre los requerimientos de ácidos grasos esenciales en larvas filosoma, es recomendable utilizar como perfil cercano, los requerimientos de ácidos grasos en peneidos.

Sin embargo, el perfil de ácidos grasos de *Artemia* sp. enriquecida con diferentes dietas y utilizada como alimento para filosomata de otras especies de langostas espinosas, presenta amplios rangos en porcentajes de AGPI (26.43-42.4), DHA (0.08-13.78) y EPA (2.40 – 13.90) y ARA (0.50 - 13.98). Además, los resultados obtenidos en crecimiento y supervivencia de larvas filosoma no han sido del todo claros (Phleger *et al.*, 2001; Nelson *et al.*, 2003, 2004; Liddy *et al.*, 2005). No obstante, el perfil nutricional de *Artemia* sp. con bajas concentraciones de los ácidos grasos mencionados anteriormente parece ser suficiente para satisfacer los requerimientos de ácidos grasos de larvas filosoma en estadios tempranos pero se debe considerar el uso de enriquecedores ricos en lípidos polares, debido a su uso como almacenamiento de energía, ya que estos son asimilados de manera más eficiente por las larvas de crustáceos (Nelson *et al.*, 2004; Liddy *et al.*, 2005).

La razón DHA/EPA de ambos tratamientos fue similar a la obtenida por Bautista-Soto (2016), no obstante, fue menor a las recomendadas por Sargent *et al.* (1997) e Ibeas *et al.* (1997), que es de 2.5:1 para el adecuado desarrollo de organismos marinos, en específico de peces. Por otro lado, Li *et al.* (2014) probaron distintas razones de DHA/EPA en la jaiba *Portunus trituberculatus* y encontraron que razones entre 0.4:1 - 1:1 mejoraban la supervivencia de este crustáceo. Considerando este intervalo, la razón DHA/EPA de la dieta A (0.47), se encontraría en el límite inferior recomendada por este autor. Así mismo, algunos enriquecimientos con razones DHA:EPA <1, utilizados para alimentar larvas de langostas espinosas, han dado buenos resultados o no difieren significativamente en la supervivencia y el crecimiento de los primeros estadios de filosomata (Nelson *et al.*, 2003, 2004; Liddy *et al.*, 2005, Wu *et al.*, 2012).

#### **4.1 Crecimiento de filosomata de *P. interruptus***

La familia Palinuridae se encuentra entre los organismos acuáticos con el desarrollo larval de mayor duración (Thorson, 1950). En *P. interruptus*, el desarrollo de la fase filosoma incluye una serie de 11 estadios y un estimado de 7.5 meses de desarrollo (Johnson, 1956). Las investigaciones sobre el ciclo larval de esta especie se han llevado a cabo de manera indirecta principalmente mediante censos de organismos del medio natural, ya que debido a su duración y la dificultad para su desarrollo *exsitu*, se ha limitado su estudio en cautiverio, donde se han obtenido bajas supervivencias (Dexter, 1972; Ortuño-Manzanares, 2000; López-Zenteno, 2004; Galicia-Galicia 2006; Peñaloza-Mayorazgo, 2008; Bautista-Soto, 2016; Niebla-López, 2016).

Las investigaciones sobre el cultivo de la etapa larvaria de diferentes especies de langostas espinosas han concluido que los principales factores se encuentran: a) las capacidades de alimentación de las filosomata, b) el sistema de cultivo larval y, sobre todo c) la calidad nutricional del alimento, la cual debe satisfacer los requerimientos de las larvas a lo largo de todo su desarrollo (Kittaka y Booth 2000; Ritar 2001; Nelson *et al.*, 2002, 2003). No obstante, poco se sabe sobre las preferencias de la dieta de filosomata en el ambiente natural por lo que actualmente este tema ha sido uno de los principales enfoques en la larvicultura de langostas espinosas (Jeffs *et al.*, 2004; Suzuki *et al.*, 2008; Chow *et al.*, 2011).

En el caso específico de *P. interruptus*, el crecimiento depende de múltiples factores como son: la temperatura durante el desarrollo de las larvas, el tamaño de la hembra (longitud de cefalotórax) (Galicia-Galicia, 2006), el flujo y velocidad del agua (Rosas *com. per.*) y la disponibilidad y calidad de alimento

(Bautista-Soto, 2016). Sin embargo, los factores que han demostrado tener mayor influencia en el desarrollo de larvas filosoma son la temperatura (López-Zenteno, 2004 y Niebla-López, 2016) y la calidad de la dieta.

Durante este experimento se evaluó la influencia de la dieta sobre el desarrollo de larvas tempranas (I-IV) de *P. interruptus*, no obstante, no se observaron diferencias significativas en el crecimiento, expresado como longitud total (LT) de las filosomata alimentadas con ambos tratamientos en los estadios alcanzados. Se encontraron valores de LT cercanos a los obtenidos por otros autores (Tabla 13) que han trabajado en la larvicultura de la misma especie (Dexter, 1972; López-Zenteno, 2004, Galicia-Galicia, 2006, Bautista-Soto, 2016 y Niebla-López, 2016). Por el contrario, la mayor diferencia entre la LT fue con las obtenidas por Johnson (1956). Esto se atribuye a que las mediciones del autor fueron realizadas con larvas colectadas del medio natural y las longitudes de cada estadio pueden enmascarar instares extra, además de que, en el medio natural, las larvas tienen las condiciones óptimas para el crecimiento, como temperatura, disponibilidad y calidad nutricional del alimento.

La principal variación en la LT, con respecto a otras investigaciones, puede originarse a partir de las filosomata estadio I, esto debido a la influencia que tiene la hembra en la calidad de la descendencia (Smith *et al.*, 2004; Galicia-Galicia, 2006). La comparación en crecimiento expresado en LT no es robusta si los organismos utilizados pertenecen a diferentes hembras, por lo que la tasa de crecimiento es la comparación más adecuada entre organismos de la misma especie, pero en diferentes condiciones de cultivo y dietas (Guillaume, 2001).

En los estadios II y IV la LT obtenida en este experimento fue similar a la reportada por Niebla-López (2016), quien utilizó como alimento la dieta del tratamiento A y el mismo corte de larvas, pero una temperatura mayor (24°C), teniendo una mayor influencia de la temperatura cálida durante el estadio III, permitió que alcanzaran mayor longitud con respecto a las de este experimento.

López-Zenteno (2004), registró longitudes totales muy similares en la filosoma IV a una temperatura de 22°C, con una dieta de *A. franciscana* enriquecida con microalgas como alimento, aunque no se detalla el tiempo de enriquecimiento y la concentración de microalgas utilizada. No obstante, las especies *Chaetoceros mulleri* e *Isochrysis* sp. que se utilizaron se caracterizan por su alto contenido de ácidos grasos EPA y DHA con lo que se alcanza una complementación positiva (Cazares-Salazar, 2014).

**Tabla 13.** Longitud total (mm) de estadios tempranos de larvas filosoma de *Panulirus interruptus* obtenidas en este trabajo y por otros autores. A: Aceite Omegamex®, MA+A: microalgas+aceite Omegamex®. Los datos se muestran en promedio y entre paréntesis la desviación estándar.

Estadio	Johnson (1956) <sup>b</sup>	Dexter (1972) <sup>a</sup>	López-Zenteno (2004) <sup>a</sup>	Galicia (2006)	Niebla-López (2016)*	MA+A	A
I	1.35 (0.21)	1.44 (0.13)	1.69 (0.41)	1.66 (0.10)	1.72 (0.11)	1.64 (0.06)	1.64 (0.06)
II	2.60 (0.28)	1.81 (0.14)	2.22 (0.08)	2.07 (0.10)	2.16 (0.12)	2.14 (0.07)	2.16 (0.08)
III	3.65 (0.35)	2.14 (0.11)	2.66 (0.12)	-	3.09 (0.25)	2.58 (0.10)	2.60 (0.11)
IV	4.40 (0.42)	3.01 (0.07)	3.73 (0.17)	-	3.72 (0.21)	3.69 (0.25)	3.73 (0.22)

\*Cultivadas a una temperatura de 24 °C, y mismo corte de larvas.

<sup>a</sup> Cultivados a una temperatura de 20 °C

<sup>b</sup> Obtenidas del medio natural

El efecto de la dieta tampoco se vio reflejado en el crecimiento expresado como tasa de crecimiento ( $T_c$ ,  $\text{mm}\cdot\text{día}^{-1}$ ) e índice de crecimiento (IC, %) (Tabla 14 y 15). Sin embargo, otros autores obtuvieron mayores valores en organismos de la misma especie cultivados en una temperatura más cálida obteniendo un tiempo de intermuda más corto y por consiguiente se alcanzaron estadios más avanzados en un periodo de tiempo menor (Dexter, 1972; López-Zenteno, 2004 y Niebla-López, 2016).

**Tabla 14.** Comparación de tasa de crecimiento ( $T_c$ ,  $\text{mm}\cdot\text{día}^{-1}$ ) de larvas filosoma de *Panulirus interruptus* con trabajos de otros autores.

Estadio	Dexter (1972) <sup>b</sup>	López-Zenteno (2004) <sup>a</sup>	Galicia (2006)	Bautista-Soto (2015) <sup>a</sup>	Este experimento	
					MA+A	A
FII	0.04	0.05	0.02	0.03 (0.01)	0.04 (0.00)	0.04 (0.00)
FIII	0.04	0.05	-	0.03 (0.01)	0.04 (0.01)	0.03 (0.00)
FIV	0.06	0.06	-	-	0.05 (0.01)	0.06 (0.01)

<sup>a</sup> Cultivados a una temperatura de 21 °C

<sup>b</sup> Cultivados a una temperatura de 20 °C

**Tabla 15.** Comparación del índice de crecimiento de larvas filosoma de *Panulirus interruptus* con trabajos de otros autores.

Estadio	Dexter	López-Zenteno	Galicia-Galicia	Bautista-Soto	Este experimento	
	(1972) <sup>b</sup>	(2004) <sup>a</sup>	(2006)	(2015) <sup>a</sup>	MA+A	A
I -II	35.86	40.02	34.4	24.11 (4.47)	31.82 (1.11)	33.16 (1.21)
II - III	50.71	54.61	-	-	49.95 (2.55)	50.46 (2.21)
III - IV	130.04	153.00	-	-	175.03 (4.97)	180.77 (3.20)

<sup>a</sup> Cultivados a una temperatura de 21 °C

<sup>b</sup> Cultivados a una temperatura de 20 °C

En este trabajo, el periodo de intermuda (TI), no presentó diferencias significativas en los estadios I-II y II-III, pero sí en el TI de las filosomata III-IV; siendo las alimentadas con la dieta A, las del tiempo más corto, lo que puede sugerir que la dieta A tuvo una mejor influencia en la reducción del TI al estadio IV. Al comparar el TI de los estadios I al III, con los registrados por otros autores, es evidente que éstos están más influenciados por la temperatura que por el tipo de enriquecimiento utilizado para el alimento (López-Zenteno, 2004; Niebla-López, 2016). Este efecto ha sido observado con otras especies como *P. japonicus* y *P. cygnus*, con las cuales se ha reducido de manera significativa el TI utilizando temperaturas cálidas en estadios tempranos (Liddy *et al.*, 2004; Matsuda y Takenouchi 2006).

En crustáceos el número de mudas entre los estadios larvales varían ampliamente entre las especies (Wu *et al.*, 2012). Durante este experimento solo se observó un evento de instar durante el estadio III al IV en ambos tratamientos. Esto coincide con Bautista-Soto (2016), quien también detectó solo un instar entre la filosoma III y IV. Sin embargo, Niebla-López (2016) encontró 4 diferentes instar entre estos estadios. La incidencia del instar entre el estadio III y IV, observados por Bautista-Soto (2016) y en este trabajo, podría estar relacionada a que se utilizó un mismo protocolo de alimentación y enriquecimiento descrito en la dieta A, pero a una temperatura de 21 °C, mientras que Niebla-López (2016) utilizó una temperatura de 24 °C. Dexter (1972), quien evaluó el desarrollo individual de filosomata de la misma especie, describió también 4 instar entre el estadio III y IV, y observó algunas irregularidades morfológicas en las larvas. Debido a la baja frecuencia de aparición sugirió considerar algunos instar como “artefactos” de laboratorio que podría ser un efecto de las condiciones de cultivo en laboratorio.

En un cultivo masivo es difícil detectar la cantidad específica de instar que ocurren a través de cada cambio de estadio (Matsuda y Takenouchi, 2006), ya que reconocer las mudas y cuantificar su frecuencia puede resultar impreciso y la manipulación de los organismos puede ocasionar mortalidad, sesgando otros

resultados del experimento. Por esto es conveniente la descripción de los estadios en cultivos de menor densidad de larvas o bien en cultivo de los organismos de manera individual (Bautista-Soto, 2016).

A pesar de no observar diferencias significativas entre las dietas en la LT y la TC durante los estadios I-IV, el peso orgánico (PO) fue mayor en las larvas estadios III-IV alimentadas con la dieta MA+A. Sin embargo, el contenido total de ácidos grasos no tuvo diferencias significativas entre los tratamientos en los estadios III-IV. No obstante, esta diferencia podría estar relacionada con el contenido de proteínas o carbohidratos acumulados en las larvas, ya que se ha demostrado que los lípidos, a pesar de su variación, no contribuyen de manera importante en el aumento o reducción del peso seco en filosomata (Smith *et al.*, 2004).

El efecto no significativo de las dietas enriquecidas con AGPI, sobre el crecimiento de larvas filosoma ha sido observado en estadios tempranos de *P. cygnus* y *J. edwardsii*, y se ha atribuido también a que las dietas utilizadas presentan la misma cantidad de lípidos totales (Nelson *et al.*, 2003; Liddy *et al.*, 2005). Por otro lado, Nelson *et al.* (2004) observaron efectos de la dieta sobre el TI hasta el estadio V en larvas de *J. edwardsii*, siendo la mejor una dieta mixta, con microalgas y aceite, pero en relación 1:2 v/v. Dicho tratamiento permitió concentraciones de ácidos grasos similares a las obtenidas con la dieta A de este experimento. También en *J. edwardsii* se observó el efecto de distintas dietas sobre el crecimiento a partir del estadio IV (Liddy *et al.*, 2005), por lo que la dieta enriquecida con diferentes fuentes y altas concentraciones de AGPI podría marcar diferencias en el crecimiento en filosomata de *P. interruptus* a partir de estadios intermedios ( $\geq$ IV).

#### **4.2 Supervivencia en filosomata de *P. interruptus***

La baja supervivencia de larvas filosoma, ha sido el principal cuello de botella en el cultivo de langostas espinosas, lo cual ha impedido su desarrollo a escala industrial. Durante este experimento no fue posible evaluar la supervivencia diariamente, pues se observó que, al realizar los muestreos de las larvas en cada tanque, estas eran afectadas por la turbulencia causada por el homogenizado de las larvas, las cuales se enredaban entre sí, impidiendo su nado y precipitándose en el fondo o dañando sus extremidades en el intento por separarse. Por dicha razón solo fue posible calcular la supervivencia al estadio III y IV la cual fue evaluada durante la toma de muestras para el análisis de ácidos grasos.

En el estadio II, las larvas alimentadas con la dieta MA+A tuvieron mayores concentraciones de ARA y EPA, sin diferencias significativas en las concentraciones de DHA. Esto podría sugerir que las larvas del tratamiento MA+A incorporaron mejor estos ácidos grasos durante este estadio. Sin embargo, al no contar con el dato de supervivencia de este estadio, no se puede afirmar que esta dieta fue mejor. No obstante, el crecimiento similar entre las larvas de los dos tratamientos y el tiempo de intermuda, no tuvo diferencias significativas, por lo que ambas dietas podrían ser adecuadas para el desarrollo del estadio II de *P. interruptus*.

La supervivencia obtenida hasta el estadio III en el tratamiento MA+A (13.34 %) fue similar a la obtenida por Dexter (1972), quien registró una supervivencia del 16 % a una temperatura de 20 °C. López-Zenteno (2004), obtuvo supervivencias del 0.07 % hasta el estadio III, aunque cabe mencionar que en otro de sus experimentos alcanzó el estadio VI con una supervivencia del 3 %.

La mayor supervivencia de esta especie registrada en laboratorio al llegar al estadio III, fue la obtenida por Bautista-Soto (2016), que fue de 66.6 %, utilizando nauplios de *A. franciscana* enriquecidos durante 12 horas con Omegamex® en un sistema de cultivo larvario individual y estático, mediante el cual también se han obtenido las mejores supervivencias con otras especies de filosomata, e.g. filosomata de *P. japonicus* con 50 % supervivencia hasta puerulo en cultivo individual, además, otra ventaja del cultivo individual es la descripción más detallada de aspectos morfológicos (Matsuda y Takenouchi, 2006).

La supervivencia obtenida en el estadio IV (9.01 %) durante este experimento, en el tratamiento MA+A (Tabla 16), es comparable con la obtenida por Dexter (1972) que fue del 8 % pero con una temperatura de 22°C. Este autor observó una tendencia en la supervivencia del 50% entre cada cambio de estadio (16 % al estadio III y 8 % al estadio IV), una tendencia similar fue observada en este experimento con el tratamiento A durante el estadio III al IV. Sin embargo, no fue posible obtener la supervivencia al estadio II durante este bioensayo, pero en un experimento preliminar se había conseguido la supervivencia al estadio II de 21.20 % en condiciones de cultivo idénticas, posteriormente en este experimento se obtuvo una supervivencia de 10.60 % al estadio III y 6.66 % al estadio IV en el mismo tratamiento, lo que sugeriría una tendencia similar a la observada por Dexter (1972). No obstante, la supervivencia obtenida por estadios es baja, pues con especies como *J. edwardsii* o *P. cygnus* se han obtenido supervivencias de más de 80 % entre los cambios de estadios tempranos (Smith *et al.*, 2004; Liddy *et al.*, 2005).

**Tabla 16.** Supervivencia (%) de larvas filosoma obtenidas en este trabajo y por otros autores con *Panulirus interruptus*.

Estadio	Dexter (1972) <sup>c</sup>	López-Zenteno (2004) <sup>b</sup>	Bautista-Soto (2015) <sup>b</sup>	MA+A	A
FII	40	-	73	-	-
FIII	16	0.07	66.6	13.34 (0.94)	10.60 (1.23)
FIV	8	-	-	9.01 (0.80)	6.66 (1.97)

<sup>a</sup> Cultivadas a una temperatura de 24°C, y mismo corte de larvas.

<sup>b</sup> Cultivados a una temperatura de 21 °C

<sup>c</sup> Cultivados a una temperatura de 20 °C

La supervivencia total al estadio IV es cercana a las obtenidas con *J. edwardsii* y *P. cygnus* (8.3 %-6.8 %) alimentadas con diferentes dietas y donde se analizó el perfil de ácidos grasos. En estos experimentos tampoco presentaron diferencias significativas entre los tratamientos (Hart *et al.*, 2001, Nelson *et al.*, 2004; Liddy *et al.*, 2005).

Por otro lado, Nelson *et al.* (2003), usando el doble de densidad de larvas filosoma que la de este trabajo, obtuvieron mejores supervivencias (>50 %) hasta estadios intermedios con una dieta mixta entre una emulsión rica en DHA y la microalga *C. muelleri*, pero en relación 1:2 (1:1 en tratamiento MA+A), obteniendo un perfil nutricional de ácidos grasos similar al de la dieta A. Sin embargo, este autor menciona que la aplicación de antibióticos diariamente en los cultivos permite obtener resultados más claros sobre el efecto de las dietas, pues disminuye la variación en el crecimiento y supervivencia derivado del estrés que puede ocasionar la presencia de bacterias u organismos patógenos en las larvas. Por lo que otros factores como la calidad del agua pudieron haber influido en los resultados.

A pesar de que los factores abióticos del agua, como oxígeno, pH y temperatura se mantuvieron constantes, diferentes autores han utilizado agua filtrada con poro más fino a 0.2 µm, tanto en el cultivo de larvas filosoma como en el de *Artemia* (Phleger *et al.*, 2001; Ritar *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2002; Nelson *et al.*, 2004) logrando supervivencias de entre 50 y 90 % en estadios intermedios (V). Díaz-Iglesias (*com. per.* 2015), hace referencia a que en Japón se han logrado supervivencias de hasta el 90 % en estadios intermedios de *P. Japonicus*, utilizando tanques tanques circulares de acrílico (plankton kreisel), sin utilizar generador de ozono y con filtros de membrana de hasta 0.1 µm; en contraste con los filtros de 1 µm utilizada en el presente experimento.

Tomando como referencia lo anterior, uno de los principales motivos a los cuales se puede atribuir la baja supervivencia obtenida durante este experimento es la presencia de bacterias y protozoarios derivados de una inadecuada calidad del agua, debida específicamente al tamaño de filtración de partículas (Murakami *et al.*, 2007). Durante el proceso experimental no fue posible cuantificar la cantidad de bacterias o protozoarios presentes en el sistema de cultivo. La presencia de patógenos podría haberse derivado del alimento, en este caso nauplios de *A. franciscana*, los cuales son una de las principales fuentes de contaminación en el cultivo de organismos acuáticos (Villamil *et al.*, 2003), debido a la cantidad de bacterias que acumulan cuando se encuentran en forma enquistada, y las cuales probablemente no son eliminadas eficazmente durante la desinfección de los nauplios.

La presencia de bacterias y protozoarios en el agua de cultivo, afecta de manera crítica la supervivencia de las larvas (Nelson *et al.*, 2004). En el presente trabajo, se observaron algunos casos, de larvas moribundas mientras intentaban mudar y al observarlas bajo el estereoscopio se encontró la presencia de epibiontes como protozoarios del género *Epistylis* (Kittaka, 1997; Álvarez-Tinajero *et al.*, 2004), o bacterias filamentosas como *Leucothrix* sp., este último es considerado como uno de los epibiontes comunes en larvas de peces y crustáceos, y su presencia está asociada principalmente a la calidad del agua (Dworkin y Falcow, 2006).

En otros trabajos con filosomata de *P. interruptus* se han atribuido altas mortalidades a la presencia de la bacteria filamentosas *Leucothrix* sp. que infesta el exoesqueleto, impidiendo la natación de las larvas y dificultando su alimentación (López-Zenteno., 2004; Bautista-Soto, 2015; Niebla-López, 2016). En este experimento al mantener una temperatura del agua relativamente baja (19 °C), la presencia de esta bacteria fue menor y no ocasiono alta mortalidad. Dworkin y Falcow (2006) mencionan que las altas temperaturas (>24 °C) y bajo pH (<7.5) propician el crecimiento de *Leucothrix* sp., por lo que el haber mantenido una temperatura templada y un pH superior a 7.8 durante todo el bioensayo, pudo haber controlado la proliferación de este epibionte en el sistema. Cabe mencionar que las larvas eliminaban por completo la infestación de epibiontes cuando ocurrían procesos de muda.

### **4.3 Ácidos grasos en filosomata de *P. interruptus***

Los organismos marinos en etapas larvianas tienen un alto requerimiento de AGPI para su óptimo desarrollo y supervivencia, en especial DHA y EPA (Sargent *et al.*, 1997; Navarro *et al.*, 1999).

En las filosomata recién eclosionadas, los ácidos grasos más abundantes fueron los saturados 16:0 (27.18 %) y 18:0 (18.13 %) y el monoinsaturado 18:1n9 (17.69 %). El contenido de 16:0 y 18:0 obtenido en el experimento fue mayor al reportado por otros autores en especies como *J. edwardsii* (Phleger *et al.*, 2001; Nelson *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2004), *P. cygnus* (Liddy *et al.*, 2005) y *P. ornatus* (Wu *et al.*, 2012), con rangos de: 8.3-18.36 % y 4.2-11.01% respectivamente. Por otro lado, el contenido de 18:1n9 se encontró dentro del rango determinados en esas especies (11.99-27.3%). Sin embargo, los AGPI, fueron más bajos (23.8%-46.5%) que los reportados, incluso para la especie tropical *P. ornatus* (36.54 %).

El contenido de ARA (4.72 %) en las larvas recién eclosionadas fue elevado en relación a los demás AGPI, considerando que usualmente los organismos zooplanctonicos presentan bajas concentraciones de este ácido graso (Olsen, 1998). Sin embargo, la concentración de ARA coincidió con lo reportado por otros autores que han determinado el contenido de ácidos grasos en larvas filosoma recién eclosionadas (Phleger *et al.*, 2001; Ritar *et al.*, 2003; Liddy *et al.*, 2004), esto puede estar directamente relacionado a la influencia de la dieta maternal sobre el perfil de ácidos grasos de la descendencia. Pues se ha encontrado mediante desoves de hembras mantenidas en cautiverio y alimentadas con dietas formuladas, que la concentración de este ácido graso en su descendencia es baja en comparación con los niveles de larvas filosoma obtenidas de hembras que opositaron en el medio natural (Smith *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2012).

La concentración de EPA (4.72 %) fue alta y baja en DHA (2.36 %) en las larvas recién eclosionadas, con razones DHA/EPA (0.50) y EPA/ARA (1.00), las cuales son ligeramente más bajas a las reportadas en larvas recién eclosionadas de *P. cygnus* y *J. edwardsii* de desoves de hembras recolectadas del medio natural (Phleger *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2003, Liddy *et al.*, 2005).

En los estadios filosoma II-IV de *P. interruptus*, los ácidos grasos presentes en mayor cantidad, fueron los AGS: 16:0 (13.15-15.49 %), 18:0 (12.34-15.57 %), los AGMI: 18:1n9 (14.25-17.80 %), 18:1n7 (9.09-9.06 %) y los AGAI: ARA (3.94-7.23 %), EPA (10.65-15.24 %) y DHA (3.75-10.39 %). Este mismo patrón fue encontrado para otras especies en las que se ha evaluado la composición de ácidos grasos durante estadios tempranos (Liddy *et al.*, 2004; Nelson *et al.*, 2003, 2004; Smith *et al.*, 2004).

Considerando la alta concentración de los ácidos grasos 16:0, 18:0 y 18:1n9 en las larvas filosomas con respecto a la de otras especies, y dado que estos son utilizados como reserva energética en periodos de ayuno, se podría considerar que estas tienen una reserva energética que les permitiría tolerar largos periodos en condiciones de ayuno, pues se observó en *J. edwardsii* que, con porcentajes menores de dichos ácidos grasos, la filosoma I puede sobrevivir hasta 8 días en periodo sin alimento.

En algunos trabajos con filosomata de langostas espinosas durante sus estadios tempranos, se ha encontrado gran similitud entre el perfil de ácidos grasos de las larvas y de sus dietas (Hart *et al.*, 2001; Nelson *et al.*, 2004; Liddy *et al.*, 2005). Esto coincide con lo encontrado en esta investigación durante los estadios III y IV alimentados con el tratamiento A, los cuales presentaron las mayores concentraciones de DHA. Lo cual corresponde al mayor contenido de este ácido graso en su dieta, aunque variaron los porcentajes (0.73 % en dieta A y 3.75-10.39 en filosomata del mismo tratamiento). Por otro lado, la mayor concentración de DHA en las larvas de este tratamiento no reflejó diferencias significativas en el crecimiento expresado como LT, TC, y la supervivencia con respecto a las larvas de la dieta MA+A. No obstante, la mayor concentración de DHA, podría haber influido en la reducción del periodo intermuda, el cual fue menor en las larvas alimentadas con la dieta A, por lo que este tratamiento pudo satisfacer mejor los requerimientos de las larvas para llevar a cabo el ciclo de muda.

La baja relación DHA/EPA, principalmente durante el estadio II (MA+A: 0.29, A: 0.42) también fue similar a la obtenida en sus respectivas dietas (MA+A: 0.21, A: 0.47). A su vez, la concentración de los ácidos grasos 16:1n7 y 18:4n3, los cuales son utilizados como biomarcadores de *Isochrysis* sp. y diatomeas (Smith *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015) fueron similares entre las larvas del tratamiento MA+A y su dieta.

En este trabajo al alcanzar el estadio IV en ambos tratamientos el contenido de DHA en las filosomata incrementó aproximadamente 50%, con ello la relación DHA/EPA incremento. Phleger *et al.* (2001), observaron en larvas colectadas del medio natural, un incremento en las concentraciones de DHA, EPA y sus razones a partir de los estadios IV y V. También en cultivos de larvas filosoma de *P. homarus*, a partir del estadio IV se observó un incremento en DHA (Chakraborty *et al.*, 2010). Esto sugiere un cambio en los requerimientos de ácidos grasos esenciales y, un alto requerimiento de DHA principalmente durante estadios intermedios y avanzados.

Durante el desarrollo larval de las filosomas los requerimientos nutricionales cambian, probablemente por la influencia de las corrientes oceánicas que las transportan en el medio natural. Durante todo su desarrollo larval, la disponibilidad y tipo de presa varían a medida que estas son transportadas (Phleger *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2014) por lo que un cambio en las razones DHA/EPA puede ser una estrategia evolutiva de las larvas en torno al alimento disponible a lo largo de su desarrollo.

Un resultado interesante observado en los estadios II-IV en ambos tratamientos fue la concentración de ARA en comparación con la dieta, la cual fue deficiente en este ácido graso durante el enriquecimiento. Se

ha encontrado que *Artemia* sp. en condiciones de ayuno o después del enriquecimiento, tiene la capacidad de bioconvertir algunos ácidos grasos esenciales a partir de precursores de cadena larga como el LNA, y que a su vez, su metabolismo al catabolizar el DHA, tiene la capacidad de retroconvertir ácidos grasos esenciales, convirtiendo el DHA a EPA y ARA (Barclay y Zeller, 1996; Navarro *et al.*, 1999). Esto sugiere que las larvas podrían haber ingerido *Artemias* que hayan retroconvertido el DHA en ARA, hecho posible, ya que a pesar de la renovación constante del alimento, hay *Artemias* que pueden durar hasta 48 h en los tanques de cultivo antes de ser ingeridas o removidas (Evjemo *et al.*, 1997).

Otra razón de la alta concentración de ARA, puede deberse a la producción de eicosanoides como respuesta del sistema inmune contra bacterias presentes en el exoesqueleto (Chakraborty *et al.*, 2010). Por otro lado, Anzueto-Sánchez (2014), en su estudio con el copépodo *Pseudodiaptomus euryhalinus*, encontró que algunos ácidos grasos no presentes en la dieta o en muy bajas concentraciones, pueden ser incorporados de fuentes diferentes a la dieta otorgada. Este pudo provenir por la presencia de bacterias en el tracto digestivo.

Por último, la alta concentración de ARA, en las filosomata de ambos tratamientos con respecto a las dietas, también ha sido observada en otros trabajos en los que se ha evaluado el perfil de ácidos grasos durante estadios tempranos de filosomata, sugiriendo un alto requerimiento de este ácido graso durante estadios tempranos (Nelson *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014), y mantenerlos constantes incluso en condiciones de ayuno (Smith *et al.*, 2003).

*P. interruptus* se considera como una especie con alto potencial acuícola, por lo cual es imperativo continuar con este y otros tipos de análisis nutricionales para obtener un mayor conocimiento sobre sus requerimientos. Posteriores estudios sobre los ácidos grasos y de otros nutrientes a lo largo de su desarrollo permitirán mejorar y estandarizar un protocolo más uniforme y eficaz para su cultivo en laboratorio.

## Capítulo 5. Conclusiones

---

Debido a la concentración del grupo de AGPI y los ácidos grasos DHA y EPA en la mezcla de las microalgas *Isochrysis* sp. y *P. tricornutum*, con respecto a los niveles encontrados en cultivos monoespecíficos, es evidente una complementación de estos ácidos grasos al usarlas como alimento mixto.

El enriquecimiento de *A. franciscana* con aceite Omegamex®, presentó un mayor contenido del grupo AGPI y del ácido graso DHA, así como una mayor relación DHA/EPA con respecto al enriquecimiento con la dieta mixta de microalgas y aceite Omegamex®, sugiriendo un mayor aporte por parte del aceite a las 3 horas de exposición.

El tiempo de enriquecimiento utilizado para este experimento en ambas dietas (3h) dio como resultado bajas concentraciones del grupo AGPI, los ácidos grasos DHA, ARA y una relación DHA/EPA considerada subóptima para el desarrollo de larvas de crustáceos.

Durante los primeros estadios de desarrollo las larvas filosoma de ambos tratamientos fue evidente cierto grado de similitud en el perfil de ácidos grasos comparado con el de las respectivas dietas. Por lo que las larvas filosoma de *P. interruptus* en cultivo pueden reflejar el perfil nutricional del alimento suministrado.

Las dietas utilizadas no tuvieron diferencias significativas en el crecimiento y la supervivencia de los estadios tempranos (I-III) de larvas filosoma de *P. interruptus*. Sin embargo, se observó una mayor tendencia a la supervivencia en las filosomata alimentadas con la dieta MA+A.

La concentración de los grupos AGPI y AGAI de las larvas en estadios II-IV, con respecto a las dietas, puede indicar que las filosomata de *P. interruptus* de estadios tempranos tienen la habilidad de mantener de manera preferencial ciertos ácidos grasos para su adecuado desarrollo.

El alto contenido de ARA en filosomata con respecto a sus dietas sugiere que este fue obtenido de una fuente distinta a la usada en el enriquecimiento.

## Capítulo 6. Recomendaciones

---

Debido al bajo contenido de ARA en la dieta mixta de microalgas, es recomendable utilizar una especie como *Rhodomonas* sp. La cual, debido a su alto contenido de este ácido graso, podría complementar la deficiencia en la mezcla.

Con base en los resultados obtenidos con el tiempo de enriquecimiento de *A. franciscana* (3h), en la concentración del grupo AGPI, DHA y ARA con respecto a lo óptimo reportado en larvas de crustáceos. Es conveniente incrementar el tiempo de enriquecimiento a un mínimo de 12 horas.

Con respecto a la calidad del agua a pesar de su filtración, se observó la presencia de protozoarios en los tanques de cultivos de larvas filosoma. Esto se atribuyó a las condiciones de cultivo de *A. franciscana* por lo que es recomendable el análisis de otro método de desinfección de *Artemia* previo a su uso como alimento. Además del uso de filtros de poro menor a 1  $\mu\text{m}$  durante el enjuague del alimento vivo y en el cultivo larvario de filosomata.

Dada la presencia de bacterias del tipo *Leucothrix* sp. en la cutícula de larvas de *P. interruptus*, se recomienda el monitoreo periódico de las unidades formadoras de colonia (UFC) en los tanques de cultivo.

Debido a la cantidad de estadios larvales descritos en las filosomata de *P. interruptus* (XI estadios). Y que en este trabajo solo se alcanzaron estadios tempranos (I-IV). Se recomienda evaluar el perfil de ácidos grasos para comprender mejor los requerimientos nutricionales en estadios intermedios y avanzados de filosomata de *P. interruptus*.

Debido a que no se encontraron diferencias en el perfil de ácidos grasos de las larvas filosoma alimentadas con sus respectivas dietas. Se aconseja realizar análisis proximales de las larvas durante estadios tempranos, así como la determinación de los tipos de lípidos presentes tanto en larvas filosoma y en sus dietas para observar si hay un mayor requerimiento por otro tipo de nutrientes.

## Literatura citada

---

- Álvarez-Tinajero, M. del C., Díaz-Iglesias, E., López-Zenteno, M., Cordero-Esquivel, B. y Tinoco-Orta, G.D. 2004. Early phyllosome larval culture of the red lobster *Panulirus interruptus*, en: 7th International Conference and Workshop on Lobster Biology and management. University of Hobart, Hobart, Australia.
- Anger, K. 1998. Patterns of growth and chemical composition in decapod crustacean larvae. *Invertebrate Reproduction and Development*, 33, 159–176.
- Anzueto-Sánchez, M. A. 2014. Efecto de la dieta y la temperatura en los parámetros poblacionales y en el valor nutricional del copépodo *Pseudodiaptomus euryhalinus* cultivado en laboratorio. Tesis de doctorado. Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada. 98p.
- Ayala-Martínez Y. y Chávez, H. 1985. Nota sobre la colecta de larvas y juveniles de langosta roja, *Panulirus interruptus* (Randall), en la costa occidental de Baja California, México. *Ciencias Marinas*, 11(8), 93–100.
- Barclay, W., Zeller, S., 1996. Nutritional enhancement of ny3 and ny6 fatty acids in rotifers and *Artemia nauplii* by feeding spray-dried *Schizochytrium* sp. *J. World Aquacult. Soc.* 27, 314–322.
- Bautista, S. I. M. 2016. Crecimiento y supervivencia de larvas filosoma tempranas de la langosta roja *Panulirus interruptus* alimentadas con nauplios de *Artemia* enriquecidos. Tesis de Maestría, Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada. 53 p.
- Brown, M. R., 2002. Nutritional value of microalgae for aquaculture. In: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G., Simoes, N. (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 3 al 6 de septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México.
- Brown, M. R., Jeffrey, S. W., Volkman, J. K., y Dunstan, G. A. 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, 151(1), 315-331.
- Brown, M. R., Jeffrey, S. W., y Garland, C. D. 1989. Nutritional aspects of microalgae used in mariculture; a literature review. CSIRO. Report 205. 44 p.
- Cavonius, L., Fink, H., Kiskis, J., Albers, E., Undeland, I., y Enejder, A. 2015. Imaging of lipids in microalgae with coherent antistokes Raman scattering microscopy. *Plant physiology*, 167(3), 603-616.
- Cazares-Salazar S. 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 Educación Superior de Ensenada. 66p
- CONAPESCA 2013. Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca. Recuperado de: [http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/anuario\\_2013](http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/anuario_2013)
- Coutteau, P., Mourente, G., 1997. Lipid classes and their content of ny3 highly unsaturated fatty acids (HUFA) in *Artemia franciscana* after hatching, HUFA-enrichment and subsequent starvation. *Marine Biology* 130, 81–91.

- Cox, S.L., Bruce, M.P. y Ritar, A.J. 2011. Ingestion of artificial diets with different textures as determined by the inert marker ytterbium oxide during culture of early-stage phyllosoma of the spiny lobster, *Jasus edwardsii*. *Aquaculture Nutrition* 17: 152–158
- Chakraborty, K., Chakraborty, R. D., Radhakrishnan, E. V. y Vijayan, K. K. 2010. Fatty acid profiles of spiny lobster (*Panulirus homarus*) phyllosoma fed enriched *Artemia*. *Aquaculture Research*, 41, 393–403. Recuperado de: <http://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02469.x>
- Chavarría-Ruiz, J. A. 2013. Distribución y abundancia de larvas de langosta roja (*Panulirus interruptus*) en la costa occidental de la península de Baja California durante 2006-2008. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. 55 p.
- Chow, S., Suzuki, S., Matsunaga, T., Lavery, S., Jeffs, A. y Takeyama, H. 2011. Investigation on natural diets of larval marine animals using peptide nucleic acid-directed polymerase chain reaction clamping. *Marine Biotechnology*, 13(2), 305–313. Recuperado de: <http://doi.org/10.1007/s10126-010-9301-3>
- D'abramo L.R. 1989. Lipid requirements of shrimp. *Advances in tropical aquaculture* 9, 271-285.
- Dexter, D. M. 1972. Molting and growth in laboratory reared phyllosomas of the California spiny lobster, *Panulirus interruptus*. *Calif. Fish and Game*. 58 (2): 107- 115.
- Evjemo, J. O., Coutteau, P., Olsen, Y., y Sorgeloos, P. 1997. The stability of docosahexaenoic acid in two *Artemia* species following enrichment and subsequent starvation. *Aquaculture* 155, 135–48
- FAO, 2014. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO, Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura, Roma. Recuperado de: <http://www.fao.org/fishery/statistics/programme/publications/all/es>
- FAO, 2016. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO, Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura, Roma. Recuperado de: <http://www.fao.org/fishery/statistics/programme/publications/all/es>
- Fowler, J., Cohen, L., y Jarvis, P. (2013). *Practical statistics for field biology*. John Wiley and Sons.
- 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.
- Francis, D. S., Salmon, M. L., Kenway, M. J., y Hall, M. R. 2014. Palinurid lobster aquaculture: Nutritional progress and considerations for successful larval rearing. *Reviews in Aquaculture*, 6(3), 180–203. Recuperado de: <http://doi.org/10.1111/raq.12040>
- Furuuta, H., Takeuchi, T. T., y Toyota, W. M. 1999). EPA and Sea Bream DHA Requirements in Early Juvenile Red Sea Bream Using HUFA Enriched Artemia Nauplii. *Fisheries Science*, 62(2), 246–251.
- García-Kauffman I. 2009. Variación espacio–temporal de estadios larvarios de langosta roja *Panulirus interruptus* (Randall, 1840) en la costa occidental de la Península de Baja California, en un período anómalo frío (1999-2001). Tesis de Maestría. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, Instituto Politécnico Nacional, 74 p.
- Galicia, G. F. 2006. Consumo de oxígeno y excreción amoniaca en larvas filosomas de estadios I y II de la langosta roja, *Panulirus interruptus* (Randall, 1840), durante el día y la noche. Tesis de Maestría, Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada. 63 p.

- Goldstein, J. S., Matsuda, H., Takenouchi, T. y Butler, M. J. 2008. The Complete development of larval Caribbean spiny lobster *Panulirus argus* (Latreille, 1804) in culture. *Journal of Crustacean Biology*, 28(02), 306–327.
- Guillard, R.L. y Ryther, J.H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella* Hustedt, and *Detonula confervacea* Cleve. *Canadian Journal of Microbiology* 8: 229-299.
- Han, K., Geurden, I., & Sorgeloos, P. 2000. Enrichment strategies for *Artemia* using emulsions providing different levels of n y 3 highly unsaturated fatty acids. *Aquaculture*, 183, 335–347.
- Hart, P., Brown, M., Dunstan, G., Crear, B., Ritar, A. y Smith, G. 2001. The lipid requirements of *Jasus edwardsii* phyllosoma. En: *The Development of Rock Lobster Propagation Techniques for Aquaculture in Australia* (Crear, B. & Hart, P. eds), pp. 40–55. Fisheries Research and Development Corporation, Tasmanian Aquaculture and Fisheries Institute, University of Tasmania, Hobart, Australia.
- Hernández-Rodríguez, M., Bückle-Ramírez, L.F., Cordero-Esquivel, B., Barón-Sevilla, B., López-Peraza, D.J., Simón-Díaz, M., Espinoza-Ibarra, J., Murillo-Valenzuela, L.A., Celaya-Ortega A. y Valenzuela-Buriel, F. 2013. Construcción y operación de un sistema para el cultivo experimental de la paralarva del pulpo manchado *Octopus bimaculatus*. CICESE. 15pp.
- Hughes, J. T., Shleser, R. A. y Tchobanoglous, G. 1974. A rearing tank for lobster and other aquatic species. *Prog. Fish Cult.* 36. 129-132.
- Ibeas, C., Cejas, J. R., Fores, R., Badía, P., Gómez, T., y Hernández, A. L. 1997. Influence of eicosapentaenoic to docosahexaenoic acid ratio (EPADHA) of dietary lipids on growth and fatty acid composition of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. *Aquaculture*, 150(1), 91–102. Recuperado de: [http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(96\)01473-1](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(96)01473-1)
- Jeffs, A. G., Nichols, P. D., y Bruce, M. P. 2001. Lipid reserves used by pueruli of the spiny lobster *Jasus edwardsii* in crossing the continental shelf of New Zealand. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 129, 305–11.
- Jeffs, G. A., Nichols, D. P., Mooney, D. B., Phillips, L. K. y Phleger, F. C. (2004). Identifying potential prey of the pelagic larve of the spiny lobster *Jasus edwardsii* using signature lipids. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 137, 487-507.
- Johnson, M. W. 1956. The larval development of the California spiny lobster *Panulirus interruptus* (Randall), with notes on *P. gracilis*. *Streets. Proc. Cal. Aca. Sci. Fourth Ser.*, 29 (1):1–19.
- Johnson, M. W. 1960. The offshore drift of larvae of the California spiny lobster *Panulirus interruptus*. *California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations Reports*, 7, 147–161.
- Johnston, M.D. y Johnston, D.J. 2007. Stability of formulated diets and feeding response of stage I western spiny lobster, *Panulirus cygnus*, phyllosomata. *Journal of the World Aquaculture Society* 38: 262–271
- Kanazawa, A., 1993. Nutritional mechanisms involved in the occurrence of abnormal pigmentation in hatchery-reared flatfish. *The World Aquaculture Society*. 24, 162–166.
- Kittaka, J. 1988. Culture of the palinurid *Jasus lalandii* from egg stage to puerulus. *Nippon Suisan Gakkaishi* 54, 87–93

- Kittaka, J. 1997a. Culture of larval spiny lobsters: a review of work done in northern Japan. *Marine and Freshwater Research*, 48, 923–930.
- Kittaka, J. 1997b. Application of ecosystem culture method for complete development of phyllosomas of spiny lobster. *Aquaculture*, 155, 319–331. Recuperado de: [http://doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00100-2](http://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00100-2)
- Kittaka, J. 2000. Culture of larval Spiny lobster. En: F.B. Phillips y J. Kittaka (eds.). *Spiny lobster: Fisheries and culture*. Fishing News Books Press, USA, 508-532 p.
- Kittaka, J. y Ikegami, E. 1988. Culture of the palinurid *Palinurus elephas* from egg stage to puerulus. *Nippon Suisan Gakkaishi* 54, 1149–54.
- Kittaka, J. y Kimura, K. 1989. Culture of the Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus* from egg to juvenile stage. *Nippon Suisan Gakkaishi* 55, 963–70.
- Lee, R.F., Hagen, W. y Kattner, G. 2006. Lipid storage in marine zooplankton. *Marine Ecology Progress Series*, 307(1):273-306.
- Léger, P., Bengtson, D. A., Simpson, K. L., y Sorgeloos, P. 1986. The use and nutritional value of *Artemia* as a food source. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev*, 24, 521-623.
- Li, X., Wang, J., Han, T., Hu, S., Jiang, Y., y Wang, C. 2014. Effect of dietary phospholipids levels and sources on growth performance, fatty acid composition of the juvenile swimming crab, *Portunus trituberculatus*. *Aquaculture*, 430, 166–172. Recuperado de: <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.03.037>
- Liddy, G. C., Kolkovski, S., Nelson, M. M., Nichols, P. D., Phillips, B. F., y Maguire, G. B. 2005. The effect of PUFA enriched *Artemia* on growth, survival and lipid composition of western rock lobster, *Panulirus cygnus*, phyllosoma. *Aquaculture Nutrition*, 11(5), 375–384. Recuperado de: <http://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2005.00363.x>
- Liddy, G. C., Nelson, M. M., Nichols, P. D., Phillips, B. F., y Maguire, G. B. 2004. The lipid composition of early stage western rock lobster (*Panulirus cygnus*) phyllosoma: Importance of polar lipid and essential fatty acids. *Journal of Shellfish Research*, 23(1), 265–273.
- Liddy, G. C., Phillips, B. F. y Maguire, G. B. 2004. Effects of temperature and food density on the survival and growth of early stage phyllosoma of the western rock lobster, *Panulirus cygnus*. *Aquaculture*, 242, 207–215. Recuperado de: <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.05.034>
- Limbourn, A. J. y Nichols, P. D. 2009. Lipid, fatty acid and protein content of late larval to early juvenile stages of the western rock lobster, *Panulirus cygnus*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology*, 152(3), 292–298. Recuperado de: <http://doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.12.009>
- López-Zenteno, M. 2004. Comparación de dos sistemas de cultivo de la larva fillosoma de la langosta roja *Panulirus interruptus*, a escala de laboratorio. Tesis de Maestría, Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada, Baja California México. 77 pp.
- Matsuda, H., & Takenouchi, T. 2007. Development of technology for larval *Panulirus japonicus* culture in Japan: A review. *Bulletin of Fishery Research Agency*.

- Matsuda, H., Takenouchi, T. y Goldstein, J. S. 2006. The complete larval development of the pronghorn spiny lobster *Panulirus penicillatus* (Decapoda: Palinuridae) in culture. *Journal of Crustacean Biology*, 26(4), 579-600. Recuperado de: <http://doi:10.1651/S-2630.1>
- Moe, M. A. 1991. Lobsters: Florida, Bahamas, the Caribbean. Green Turtle Publications.
- Molina-Cardenas, C. A. 2011. Efecto inhibitorio de diferentes especies de microalgas sobre *Vibrio spp.* Tesis de Maestría, Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada, Baja California México. 96 pp.
- Murakami, K., Jinbo, T., y Hamasaki, K. 2007. Aspects of the technology of phyllosoma rearing and metamorphosis from phyllosoma to puerulus in the Japanese spiny lobster reared in the laboratory. *Bull. Fish. Res. Agen.* No, 20, 59-67.
- Navarro, J. C., Henderson, R. J., McEvoy, L. A., Bell, M. V. y Amat, F. 1999. Lipid conversions during enrichment of *Artemia*. *Aquaculture*, 174 (1-2), 155–166. Recuperado de: [http://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00004-6](http://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00004-6)
- Navarro, J. C., Henderson, R. J., McEvoy, L. a., Bell, M. V., y Amat, F. 1999. Lipid conversions during enrichment of *Artemia*. *Aquaculture*, 174(1–2), 155–166. Recuperado de: [http://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00004-6](http://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00004-6)
- Navarro-Hurtado, C. 2011. Evaluación de una dieta terminal para la producción de músculo enriquecido con ácidos grasos omega 3 en el camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* de talla de cosecha. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur.
- Nelson M, M. 2002. The Effect of Diet on the Biochemical Composition of Juvenile *Artemia*: Potential Formulations for Rock Lobster Aquaculture. *The World Aquaculture Society*, 33(2), 146–157.
- Nelson, M. M., Crear, B. J., Nichols, P. D., y Ritz, D. A. 2003. Feeding southern rock lobster, *Jasus edwardsii* Hutton, 1875, phyllosomata in culture: Recent progress with lipid-enriched *Artemia*. *Journal of Shellfish Research*, 22(1), 225–233.
- Olsen, Y. 1998. Lipids and essential fatty acids in aquatic food webs: what can freshwater ecologists learn from mariculture? In 'Lipids in Freshwater Ecosystems'. (Eds M. T. Arts and B. C. Wainman.) pp. 161–202.
- Ortuño Manzanares, G. 2000. Larvas filiosoma de langosta roja (*Panulirus interruptus*) durante el año 2000. Centro Regional de Investigación Pesquera de Ensenada. 365–380.
- 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.
- Peñaloza Mayorazgo, M. C. 2008. Dinámica larval de la langosta roja (*Panulirus interruptus*) en la costa occidental de la península de Baja California, México, durante el ENOS, 1997-1999. Tesis de Maestría en Ciencias. Instituto Politécnico Nacional. 75 p.
- 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.

- Phillips, B. F. 2013. Lobster as part of marine ecosystems A review. 1-30 p. En: Phillips, B. F. (Ed). Lobsters: biology, management, aquaculture and fisheries. Second edition. Department of Environment and Agriculture, Curtin University. Australia. 471 pp.
- Phillips, B. F., Jeffs, A. G., Melville-Smith, R., Chubb, C. F., Nelson, M. M. y Nichols, P. D. 2006. Changes in lipid and fatty acid composition of late larval and puerulus stages of the spiny lobster (*Panulirus cygnus*) across the continental shelf of Western Australia. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 143, 219–228. Recuperado de: <http://doi.org/10.1016/j.cbpb.2005.11.009>
- Phleger, C. F., Nelson, M. M., Mooney, B. D., Nichols, P. D., Ritar, A. J., Smith, G. G., Hart, P. R. y Jeffs, A. G. 2001. Lipids and nutrition of the southern rock lobster, *Jasus edwardsii* from hatch to puerulus. *Marine and Freshwater Research*, 52, 1475–1486.
- Rees, J. F., Curé, K., Piyatiratitivorakul, S., Sorgeloos, P., y Menasveta, P. 1994. Highly unsaturated fatty acid requirements of *Penaeus monodon* postlarvae: an experimental approach based on *Artemia* enrichment. *Aquaculture*, 122(2), 193-207.
- Ritar, A. J. 2001. The experimental culture of phyllosoma larvae of southern rock lobster (*Jasus edwardsii*) in a flow-through system. *Aquacultural Engineering*, 24(2), 149–156. Recuperado de: [http://doi.org/10.1016/S0144-8609\(00\)00072-8](http://doi.org/10.1016/S0144-8609(00)00072-8)
- Ritar, A. J., Smith, G. G. y Thomas, C. W. 2006. Ozonation of seawater improves the survival of larval southern rock lobster, *Jasus edwardsii*, in culture from egg to juvenile. *Aquaculture*, 261(3), 1014–1025. Recuperado de: <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.08.035>
- Ritar, A. J., Thomas, C. W. y Beech, A. R. 2002. Feeding *Artemia* and shellfish to phyllosoma larvae of southern rock lobster (*Jasus edwardsii*). *Aquaculture*, 212, 179–190. Recuperado de: [http://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00015-7](http://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00015-7)
- Sargent, J.R., McEnvoy, L.A. y Bell, J.G. 1997. Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. *Aquaculture*. 155: 117- 127 p.
- Sato, N. y Murata, N. 1988. Membrane lipids. En: *Methods in Enzymology* 167: 251-259.
- Silva, A., Díaz-Iglesias, E. y Serrano-Flores, E. D. 2013. Consumo de oxígeno de larvas filosoma-1 de la langosta roja (*Panulirus interruptus*), ante variación de temperatura y salinidad con iluminación y oscuridad. *Hidrobiológica*, 23(3), 303–312.
- Smith, E. G., Ritar, A. J., Carter, C. G., Dunstan, G. A. y Brown, M. R. 2003. Morphological and biochemical characteristics of phyllosoma after photothermal manipulation of reproduction in broodstock of the spiny lobster, *Jasus edwardsii*. *Aquaculture*, 220, 299–311. Recuperado de: [http://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00263-6](http://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00263-6)
- Smith, G. G., Ritar, A. J., Johnston, D., y Dunstan, G. A. 2004. Influence of diet on broodstock lipid and fatty acid composition and larval competency in the spiny lobster, *Jasus edwardsii*. *Aquaculture*, 233(1–4), 451–475. Recuperado de: <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.11.009>
- Sorgeloos, P. 1986. Manual para el cultivo y uso de *Artemia* en acuicultura. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Universidad del Estado en Gent, Facultad de Agronomía. Recuperado de: <https://books.google.com.mx/books?id=4Gb9twAACAAJ>

- Suzuki, N., Hoshino, K., Murakami, K., Takeyama, H. y Chow, S. 2008. Molecular diet analysis of phyllosoma larvae of the Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus* (Decapoda:Crustacea). *Marine Biotechnology*, 10(1), 49–55. Recuperado de: <http://doi.org/10.1007/s10126-007-9038-9>
- Thorson G. 1950. Reproductive and larval ecology of marine bottom invertebrates. *Biological Reviews* 25: 1–45. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-185X.1950.tb00585.x>
- Tocher, D.R. 2003. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in Fisheries Science*, 11(2), 107-184.
- Tong, L. J., Moss, G. A. y Paewai, M. P. 2000. Effect of brine shrimp size on the consumption rate, growth, and survival of early stage phyllosoma larvae of the rock lobster *Jasus edwardsii*. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 34 (February), 469–473. Recuperado de: <http://doi.org/10.1080/00288330.2000.9516949>
- Vega-Velázquez, A. 2003. Reproductive strategies of the spiny lobster *Panulirus interruptus* related to the marine environmental variability off central Baja California, Mexico: Management implications. *Fisheries Research*, 65, 123–135. Recuperado de: <http://doi.org/10.1016/j.fishres.2003.09.011>
- Vega-Velázquez, A. 2006. Langosta de la península de Baja California. En: Arreguín, S. F., Beléndez, M. L., Méndez G-H. I., Solana, S. R. y Rangel, D. C. *Sustentabilidad y Pesca Responsable en México: Evaluación y Manejo*. INAPESCA. 155-210. Recuperado de: [http://inapesca.gob.mx/portal/documentos/publicaciones/LIBROS/libro\\_Rojo%202006.pdf](http://inapesca.gob.mx/portal/documentos/publicaciones/LIBROS/libro_Rojo%202006.pdf)
- Villamil, L., Figueras, A., Planas, M. y Novoa, B. 2003. Control of *Vibrio alginolyticus* in *Artemia* culture by treatment with bacterial probiotics. *Aquaculture* 219: 43-56. Recuperado de: [http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00515-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00515-X)
- Volkman, J. K., Jeffrey, S. W., Nichols, P. D., Rogers, G. I. y Garland, C. D. 1989. Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 128(3), 219-240.
- Wang, H. T., Yao, C. H., Liu, Y. N., Meng, Y. Y., Wang, W. L., Cao, X. P., y Xue, S. 2015. Identification of fatty acid biomarkers for quantification of neutral lipids in marine microalgae *Isochrysis zhangjiangensis*. *Journal of Applied Phycology*, 27(1), 249-255.
- Wang, M., MacKenzie, A. D. y Jeffs, A. G. 2014. Lipid and fatty acid composition of likely zooplankton prey of spiny lobster (*Jasus edwardsii*) phyllosomas. *Aquaculture Nutrition*, Recuperado de: <http://doi.org/10.1111/anu.12164>
- Watanabe, T., 1993. Importance of docosahexaenoic acid in marine larval fish. *The World Aquaculture Society* 24, 152–161
- Watanabe, T., Oowa, F., Kitajima, C. y Fujita, S. 1980. Relationship between dietary value of brine shrimp *Artemia franciscana* and their content of omega-3 highly unsaturated fatty acids. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. 46(1), 35-41.
- Williams, C. K. 2007. Nutritional requirements and feeds development for post-larval spiny lobster: A review. *Aquaculture*, 263, 1-14.

- Wu, X., Smith, G. y Hall, M. 2012. Patterns of larval growth, lipid composition and fatty acid deposition during early to mid-stages of development in *Panulirus ornatus* phyllosoma. *Aquaculture*, 330-333, 63-73. Recuperado de: <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.11.022>
- Yongmanitchai, W., y Ward, O.P. 1991. Growth of and omega-3 fatty acid production by *Phaeodactylum tricornutum* under different culture conditions. *Applied and environmental microbiology*, 57(2), 419-425.