

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



**Programa de Posgrado en Ciencias
en Acuicultura**

**Crecimiento y supervivencia de larvas filosomata tempranas
de la langosta roja *Panulirus interruptus* alimentadas con
nauplios de *Artemia* enriquecidos**

Tesis

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

Presenta:

Ingrid Miriam Bautista Soto

Ensenada, Baja California, México
2016

Tesis defendida por

Ingrid Miriam Bautista Soto

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Eugenio Díaz Iglesias
Codirector de tesis

Dra. Beatriz Cordero Esquivel
Codirector de tesis

Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega

Dra. Bertha Eugenia Lavaniegos Espejo

Dr. Benjamín Barón Sevilla



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

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Ingrid Miriam Bautista Soto © 2016

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

Resumen de la tesis que presenta **Ingrid Miriam Bautista Soto** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura

Crecimiento y supervivencia de larvas filosomata tempranas de la langosta roja *Panulirus interruptus* alimentadas con nauplios de *Artemia* enriquecidos

Resumen aprobado por:

Dr. Eugenio Díaz Iglesias
Codirector de tesis

Dra. Beatriz Cordero Esquivel
Codirector de tesis

La langosta representa un ingreso importante en la pesquería mexicana, no obstante la captura se encuentra en su punto máximo sostenible, por lo que la langosticultura es un potencial desarrollo tecnológico para la obtención sustentable de organismos. En el presente estudio se evaluaron dietas para larvas filosomata tempranas de *Panulirus interruptus*, con base en nauplios de *Artemia* enriquecidos con las microalgas marinas *Phaeodactylum tricornutum* e *Isochrysis T-iso* (μ) y aceite de orbita de atún rico en ácidos grasos altamente insaturados (Ω) y su efecto en la supervivencia y el crecimiento. Tras un análisis de ácidos grasos (AG) se encontraron cantidades elevadas de los altamente insaturados (AGAI) en las dietas enriquecidas, siendo mejores la Dieta Ω ($24.91 \pm 3.64\%$) y Dieta $\Omega + \mu$ ($20.68 \pm 3.69\%$). Los datos más elevados de supervivencia se obtuvieron con la Dieta Ω (66%) y la Dieta $\Omega + \mu$ (40%). Se encontraron diferencias altamente significativas entre los resultados obtenidos en la tasa de crecimiento (0.027 y 0.024 mm·día⁻¹), el índice de crecimiento (24.11 y 29.99%) y los días en aparecer la primera muda (9.88 y 11.44 días), todos estos resultados obtenidos con las dietas Ω y $\Omega + \mu$. Además el desarrollo morfológico de las filosomata en estadio I, II, III fue descrito para las condiciones de cultivo en laboratorio. Por lo tanto la Dieta Ω y Dieta $\Omega + \mu$ después de doce horas de enriquecimiento son las que incrementaron de manera significativa los factores de crecimiento y supervivencia.

Palabras clave: **Filosoma, langosta roja, *Artemia* enriquecida.**

Abstract of the thesis presented by **Ingrid Miriam Bautista Soto** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Aquaculture.

Growth and survival of early larvae phyllosomata of red lobster *Panulirus interruptus* fed enriched *Artemia* nauplii

Abstract approved by:

Dr. Eugenio Díaz Iglesias
Codirector thesis

Dra. Beatriz Cordero Esquivel
Codirector thesis

Lobster represents an important entry in Mexican fishery, however capture is at maximum sustainable yield, so the lobster culture is a potential technological development for obtaining sustainable organisms. In the present study diets for early larval phyllosomata of *Panulirus interruptus* were evaluated, based on *Artemia* nauplii enriched with marine microalgae *Phaeodactylum tricornutum* and *Isochrysis* T-iso (μ) and tuna orbit oil rich highly unsaturated fatty acids (Ω) and its effect on survival and growth. After an analysis of fatty acid (FA) high amounts of highly unsaturated (HUFA) were found in the enriched diets, being better the Diet Ω ($24.91 \pm 3.64\%$) and Diet $\Omega + \mu$ ($20.68 \pm 3.69\%$). The higher survival data were obtained with the Diet Ω (66%) and the Diet $\Omega + \mu$ (40%). Were found highly significant differences between the results obtained in the growth rate (0.027 and 0.024 mm day⁻¹), the growth rate (24.11 and 29.99%) and days to appear the first molt (9.88 and 11.44 days), all these results with Ω and $\Omega + \mu$ diets. Besides the morphological development of phyllosomata stage I, II, III was described for laboratory culture conditions. Therefore Diet Ω and $\Omega + \mu$ after twelve hours enrichment are those that significantly increased the survival and growth factors

Keywords: **Phyllosoma, red lobster, enriched *Artemia*.**

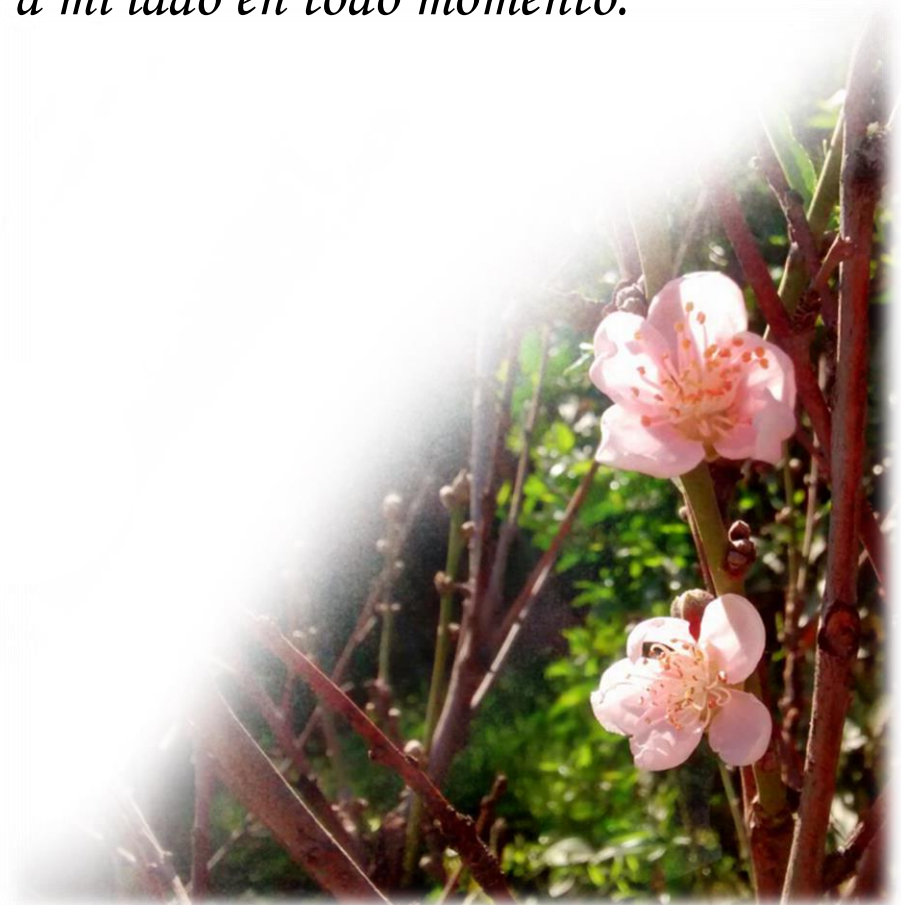
Dedicatoria

A mis queridos padres, Maria del Carmen y Miguel, por su inmenso amor, apoyo y esfuerzo en todos estos años. Gracias a ustedes he logrado llegar hasta aquí y ser quien soy. Es un gran privilegio y orgullo ser su hija, son los mejores padres que pude desear, un gran ejemplo a seguir, los mejores guías e inigualables personas.

A mi querida hermanita Michelle por alegrarme todos los días con alguna ocurrencia y apoyarme siempre que puedes hacerlo.

A Giovanni por estar a mi lado en todo momento.

Los amo con locura.



Agradecimientos

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

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada para realizar esta tesis y una estancia en La Paz, Baja California.

A la Dra. Beatriz Cordero Esquivel, mi directora de tesis, por apoyarme de forma incondicional y en todo momento, por todas esas horas que compartimos aprendiendo y por aceptarme en el Laboratorio de Microalgas Marinas, donde hice una nueva y muy agradable extensión de mi familia.

Al Dr. Eugenio Díaz Iglesias, mi director, por compartir el conocimiento y el amor por tan hermosas criaturas que son las langostas, por las inigualables experiencias y apoyo.

A la Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega (CIBNOR), miembro de mi comité, por recibirme amablemente en su hogar, brindarme su amistad, compartir muy buenos momentos y por su apoyo en el análisis de los ácidos grasos a través de los proyectos:

AC0.2: Productos de alto valor agregado a partir del cultivo de microalgas y cianobacterias.

913-0: Desarrollo e implementación de una tecnología innovadora y eficiente para la fabricación de gomitas formuladas con ingredientes funcionales.

Al Dr. Benjamín Barón Sevilla, miembro de mi comité, por compartir su conocimiento, mantener mi curiosidad siempre activa, por apoyarme durante proyecto tentativo de cultivo masivo de filosomata y sus apreciables consejos.

A la Dra. Bertha Eugenia Lavaniegos Espejo, miembro de mi comité, por siempre recibirme amablemente y brindarme de su valioso tiempo para compartir su experiencia en diferentes temas, es un maravilloso pequeño mundo marino.

A la Dra. Marysabel Báez Hidalgo por su apoyo en temas estadísticos para encontrar las diferencias ALTAMENTE SIGNIFICATIVAS de la vida, aunque estén entre una micra y otra.

Al M. en C. Adrián Celaya Ortega, por apoyarme siempre con las diferentes actividades necesarias para que el experimento se desarrollara adecuadamente.

A la M. en C. Yanet Guerrero Rentería por su apoyo en el análisis bacteriológico de mi sistema de cultivo, por escucharme y apoyarme.

A la Bióloga Sandra Luz Contreras Sánchez, por su apoyo y excelente trabajo durante la realización de experimento y el análisis de los datos.

A Elizabeth Aviles Becerril por su apreciable ayuda en la edición del formato de tesis.

A Luis Alberto Murillo Valenzuela y José Carlos Carballo Bastidas por su ayuda durante el desarrollo del experimento.

A KIKEINO® por ayudarme en la edición y limpieza de las imágenes.

A mis guías por los días de neófito en el laboratorio de microalgas, Vincent, Paty y Araceli, gracias por estar conmigo en muchas formas, espero que podamos reunirnos nuevamente para “tomar” cosas pendientes.

A Eliot, que se aventuró en un laborioso mundo de filosomas y fue de gran ayuda durante el bioensayo de filosomas.

A Jonathan Pinto y Benito Niebla, que siguen por el camino de la **langosticultura**. Seamos parte de esta nueva aventura en México.

A Uvinaí Salgado, Jesús Mariscal y Fernando Chepo (Lab. de Peces Marinos), por guiarme cuando estaba perdida en el laboratorio y temerosa aun de mi inexperiencia.

A mis amiguis de la maestría, a cada uno de los que compartieron esta etapa de mi vida, Cariñoñis, Dennisse, Sara, Stef, Lucia, Candy, Yess, Alondra, Fernando, Humberto y al del relajo, Hector.

A Kitty, Rosa, Ara, Amelia, Estef, Laura, Fredy y Charito por hacer tan amena mi estancia en La Paz, gracias por los buenos momentos que serán recuerdos inolvidables, espero podamos formar más en un futuro.

A mi familia, mi abuelita Alicia Reyes que siempre piensa en mí, mis tíos que me desean lo mejor, mis primos que nunca han dejado de creer en mí y ser cómplices de muchas formas, mis hermanos que me hacen más alegre la vida.

A todas las filosomas, langostas, *Artemias*, microalgas, baterías, hongos y de más parásitos que dieron sus vidas en pos de la ciencia y específicamente de la langosticultura.

No por ser los últimos los menos importantes, al CLUB PEZUÑA® por las tardes de apoyo, desestres, películas y mucho más. GRACIAS!!!

Tabla de contenido

Resumen en español	ii
Resumen en inglés	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Lista de figuras	ix
Lista de tablas	x
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Producción acuícola mundial de langosta.....	1
1.2 Alimentación larval.....	8
1.3 Enfermedad en langosta.....	10
1.4 Hipótesis.....	11
1.5 Objetivo general.....	12
1.6 Objetivos particulares.....	12
Capítulo 2. Materiales y métodos	13
2.1 Dietas para nauplios de <i>Artemia franciscana</i>	13
2.1.1 Cultivo de microalgas.....	13
2.1.2 Preparación de la emulsión del aceite Omegamex® para el enriquecimiento de nauplios de <i>Artemia franciscana</i>	14
2.1.3 Producción de nauplios de <i>Artemia franciscana</i>	14
2.1.4 Enriquecimiento de nauplios de <i>Artemia franciscana</i>	15
2.2 Evaluación del efecto de los enriquecedores.....	16
2.2.1 Análisis de ácidos grasos: cromatografía de gases espectrometría de masas (GCMS).....	17
2.3 Bioensayo con <i>P. interruptus</i>	19
2.3.1 Obtención y mantenimiento de reproductores.....	19
2.3.2 Obtención de naupliosomas y filosomata.....	19

2.3.3	Cultivo de filosomata.....	20
2.4	Análisis estadístico.....	22
Capítulo 3. Resultados		23
3.1	Calidad de dietas.....	23
3.2	Supervivencia.....	32
3.3	Crecimiento.....	33
3.4	Desarrollo morfológico.....	35
Capítulo 4. Discusión		40
Capítulo 5. Conclusiones		47
Lista de referencias bibliográficas		48

Lista de figuras

Figura		Página
1	Distribución de las especies de langosta en la plataforma de México.	3
2	Ciclo de vida de <i>Panulirus interruptus</i>	6
3	Supervivencia de larvas filosomata de <i>Panulirus interruptus</i> en sistema estático individual, alimentadas con 4 dietas: Dieta Control: nauplios de <i>Artemia</i> en ayuno, Dieta Ω : nauplios de <i>Artemia</i> enriquecida con emulsión de aceite Omegamex®, Dieta μ : nauplios de <i>Artemia</i> enriquecida con la mezcla (1:1) de las microalgas (<i>Isochrysis T-iso</i> y <i>Phaeodactylum tricornutum</i>); Dieta $\mu+\Omega$: nauplios de <i>Artemia</i> enriquecida con emulsión de aceite Omegamex® y mezcla de microalgas. Las flechas indican el cambio de estadio (ciclos de muda completados) y la estrella indica un instar. n=15 larvas por tratamiento.....	32
4	Desarrollo embrionario de la langosta roja <i>Panulirus interruptus</i> . Se observa: a) mórula, b) epibionte, c) ojo naupliar, d) pedúnculo ocular en desarrollo, C) huevos desarrollados, e) pereiópodos desarrollándose, f) pedúnculo ocular desarrollado y g) cromatóforos..	35
5	Prenaupliosomas (A) y naupliosoma (B). Se observa: a) cromatóforos, b) pereiópodos, c) pereiópodos ligeramente enroscados y d) pedúnculos oculares pegados al cefalón.....	36
6	Naupliosoma de <i>Panulirus interruptus</i> mudando a estadio I. Se observa: a) exuvia y b) filosoma I.	37
7	Filosoma I de <i>Panulirus interruptus</i> se observa: a) pedúnculos oculares redondos y sin segmentación, b) primordios de los exopoditos en el tercer par de pereiópodos.	37
8	Filosoma II de <i>Panulirus interruptus</i> . Se observan: a) crecimiento de los primordios del tercer par de pereiópodos y, b) pedúnculos oculares segmentados con un ángulo más obtuso entre los pedúnculos oculares.	38
9	Filosoma III de <i>Panulirus interruptus</i> , se observa: a) forma alargada los pedúnculos oculares, con b) una segmentación y ángulo de 180 grados entre ellos. c) El exopodito en el segundo segmento del tercer par de pereiópodos está totalmente desarrollado.	39

10 Parásitos observados durante el experimento. Se observa: A) filosoma III con ectoparásito filamentosos (a). B) pereiópodo con infestación de ectoparásitos. C) filosoma I con un quiste (c) causado probablemente por *Vibrio* sp. y rodeado de posibles fagocitos (b) o de una fase del estadio ameboideo del parasito *Hematodinium* sp. D) segmento de pereiópodos con *Epistylis* (e) y otra fase de desarrollo de *Hematodinium* sp. (d)

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Producción acuícola mundial de langosta y bogavantes.....	1
2	Características del desarrollo larval completo de especies cultivadas.	7
3	Composición y porcentaje del total de los ácidos grasos de la Dieta Control (nauplios de <i>Artemia</i> en ayuno por 48 horas) cosechada en diferentes tiempos (h). Desviación estándar entre paréntesis. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre los diferentes tiempos de enriquecimiento. n=9 (por dieta/hora de enriquecimiento).....	24
4	Composición y porcentaje del total de los ácidos grasos de los nauplios de <i>Artemia</i> enriquecidos con una emulsión de aceite Omegamex® (Dieta Ω) y cosechados en diferentes tiempos (h). Desviación estándar entre paréntesis. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre los diferentes tiempos de enriquecimiento. n=9 (por dieta/hora de enriquecimiento).....	26
5	Composición y porcentaje del total de los ácidos grasos de los nauplios de <i>Artemia</i> alimentados con una mezcla 1:1 de las microalgas <i>Phaeodactylum tricornutum</i> e <i>Isochrysis</i> T-iso (Dieta μ), cosechada en diferentes tiempos (h). Desviación estándar entre paréntesis. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre los diferentes tiempos de enriquecimiento. n=9 (por dieta/hora de enriquecimiento).....	27
6	Composición y porcentaje del total de los ácidos grasos de los nauplios <i>Artemia</i> alimentados con una emulsión de aceite Omegamex® y una mezcla 1:1 de las microalgas <i>Phaeodactylum tricornutum</i> e <i>Isochrysis</i> T-iso (Dieta $\Omega+\mu$), cosechada en diferentes tiempos (h). Desviación estándar entre paréntesis. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre los diferentes tiempos de enriquecimiento. n=9 (por dieta/hora de enriquecimiento).....	29

- 7 Composición y porcentaje del total de los ácidos grasos de los nauplios de *Artemia* enriquecidos con diferentes dietas, durante diferentes tiempos (h). Dieta Control (nauplios de *Artemia* en ayuno por 48 horas), Dieta Ω (emulsión de aceite Omegamex®), Dieta μ (mezcla de las microalgas *Phaeodactylum tricornutum* e *Isochrysis* T-iso) y Dieta $\Omega+\mu$ (emulsión de aceite Omegamex® y una mezcla de las microalgas *Phaeodactylum tricornutum* e *Isochrysis* T-iso). Desviación estándar entre paréntesis. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre las diferentes dietas, para cada tiempo de enriquecimiento. n=9 (por dieta/hora de enriquecimiento)..... 31
- 8 Duración del primer ciclo de muda de las larvas filosomata de *Panulirus interruptus* alimentadas con cuatro dietas. Dieta Control: nauplios de *Artemia* en ayuno, Dieta Ω : nauplios de *Artemia* enriquecida con emulsión de aceite Omegamex®, Dieta μ : nauplios de *Artemia* enriquecida con la mezcla (1:1) de las microalgas (*Isochrysis* T-iso y *Phaeodactylum tricornutum*), Dieta $\mu+\Omega$: nauplios de *Artemia* enriquecida con emulsión de aceite Omegamex® y mezcla de microalgas. Desviación estándar entre paréntesis. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre dietas..... 33
- 9 Tasa de crecimiento ($\text{mm}\cdot\text{día}^{-1}$) de las larvas filosomata de *Panulirus interruptus* alimentadas con cuatro dietas. Dieta Control: nauplios de *Artemia* en ayuno, Dieta Ω : nauplios de *Artemia* enriquecida con emulsión de aceite Omegamex®, Dieta μ : nauplios de *Artemia* enriquecida con la mezcla (1:1) de las microalgas (*Isochrysis* T-iso y *Phaeodactylum tricornutum*), Dieta $\mu+\Omega$: nauplios de *Artemia* enriquecida con emulsión de aceite Omegamex® y mezcla de microalgas. Desviación estándar entre paréntesis. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre dietas..... 34
- 10 Índice de crecimiento (%) de filosomata I a II de *Panulirus interruptus*, alimentadas con cuatro dietas. Dieta Control: nauplios de *Artemia* en ayuno, Dieta Ω : nauplios de *Artemia* enriquecida con emulsión de aceite Omegamex®, Dieta μ : nauplios de *Artemia* enriquecida con la mezcla (1:1) de las microalgas (*Isochrysis* T-iso y *Phaeodactylum tricornutum*), Dieta $\mu+\Omega$: nauplios de *Artemia* enriquecida con emulsión de aceite Omegamex® y mezcla de microalgas. Desviación estándar entre paréntesis. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre dietas 34

Capítulo 1. Introducción

1.1 Producción acuícola mundial de langosta

La langosta es un producto de interés comercial muy apreciado por los consumidores en todo el mundo. La producción mundial acuícola corresponde a 90.43 millones de toneladas, de las cuales 66.63 millones son de productos marinos. El 9.7 por ciento de la producción acuícola destinada al sector alimenticio está integrada por diferentes especies de crustáceos, entre los que se encuentran el camarón, langostinos, cangrejos y langosta principalmente (FAO, 2014). Para el 2012, la producción de langostas y bogavantes fue de 2035 t, lo que significó un incremento de poco más de 58 veces la producción en 2003. El aumento más significativo se dio entre los años 2007 y 2008, (70 y 1092 t respectivamente). Además, los bogavantes y langostas son de los pocos grupos de especies cuyo valor económico, en millones de dólares, es equivalente a 10 veces su producción en tonelaje (Tabla 1).

Tabla 1. Producción acuícola mundial de langosta y bogavantes (modificada de FAO, 2014).

	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Toneladas producidas	35	39	29	35	70	1092	1412	1611	1805	2035
Producción en miles de dólares	502	660	527	710	1863	11251	14140	16285	18821	20967

La producción acuícola mundial de langostas y bogavantes sigue en aumento (Tabla 1) pero la base de la producción fue el desarrollo de la técnica de captación de puerulos del medio natural para la posterior engorda. Los principales productores son Vietnam, India, Australia, Nueva Zelanda y Japón. En América Latina también se ha desarrollado la tecnología de cultivo para *Panulirus argus* en Cuba, donde Díaz-Iglesias *et al.* (1991) y Báez-Hidalgo *et al.* (1996), obtuvieron resultados favorables en la cría de puerulos y postlarvas. En México los primeros intentos de cultivo a partir de puerulos se hicieron con *P. interruptus* y dieron resultados igualmente favorables, se obtuvieron buenas

tasas de conversión alimenticia (Díaz-Iglesias, com. per.), lo que permite suponer que esta forma de cultivo puede ser rentable. Actualmente se busca hacer de la engorda de puerulos una producción importante en Baja California Sur (Vega-Velázquez, com. per.).

En la actualidad no se cultivan langostas en México. Los datos que se obtienen del Anuario estadístico de acuicultura y pesca 2013, colocan a la langosta, por el volumen de captura, en el lugar 34° de la producción pesquera en México y en el lugar 6° por la captación de divisas. Se ha calculado además, que el crecimiento de la producción en los últimos 10 años aumentó en promedio un 0.74%. (CONAPESCA, 2013).

La pesquería de langosta se sostiene con 4 de las 5 especies de langosta: *P. interruptus*, *P. argus*, *P. inflatus*, y *P. gracilis*, la quinta es *P. peniciliatus* no es una especie de valor comercial dado que en México su pesca es escasa y su distribución es muy pequeña con respecto a las otras especies, solo se localiza en las islas de Revillagigedo (Figura 1).

Las dos especies de mayor importancia comercial son *P. interruptus* y *P. argus*, que sostienen fuertemente el mercado, han sido certificadas porque son especies en las cuales se ha regulado su extracción (modificación de las artes de pesca, establecimiento de tiempos de veda y estudios de la población para regular el esfuerzo pesquero de la siguiente temporada). Las otras dos especies no representan una producción importante, pero son de interés comercial.

En México, los estados con mayor producción de langosta son Baja California y Baja California Sur, que juntas representan casi el 78%, seguida de la producción en Quintana Roo y Yucatán que representan el 19%.

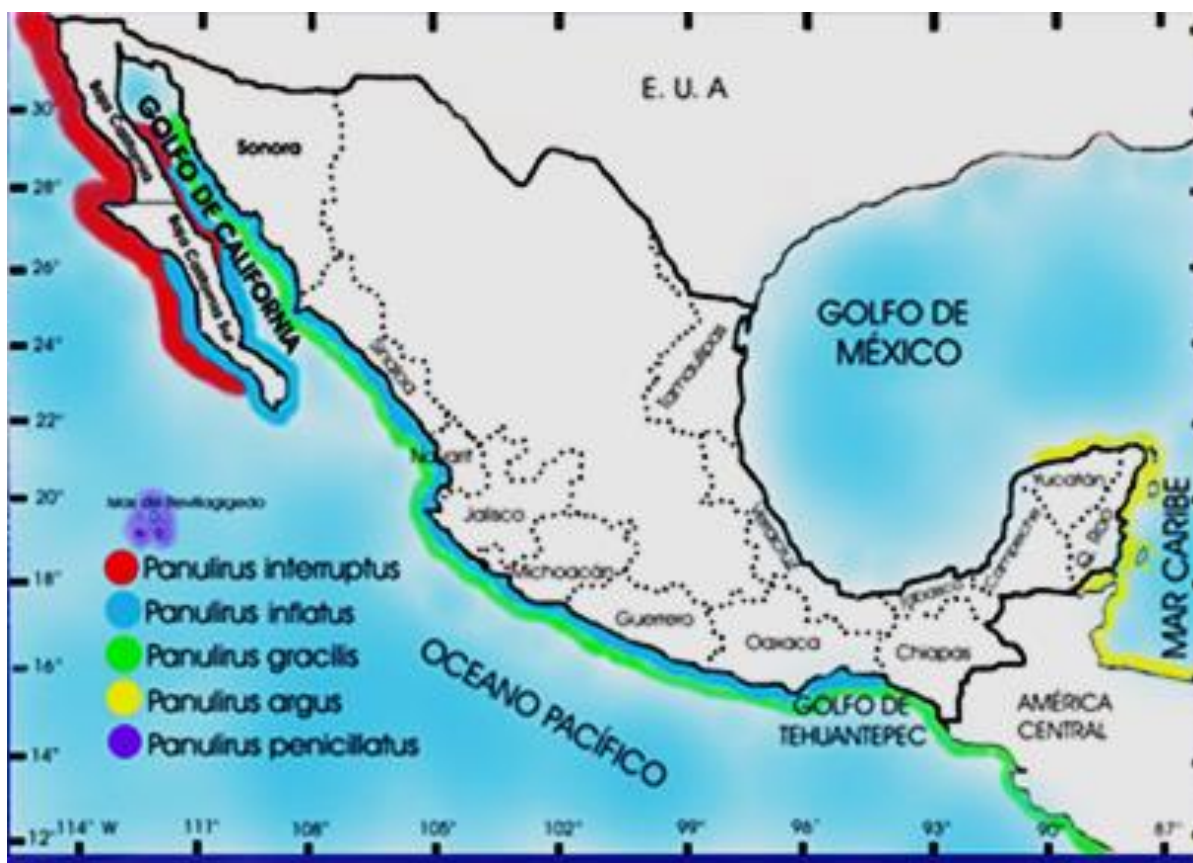


Figura 1. Distribución de las especies de langosta en la plataforma de México (Kailola *et al.*, 1993) modificado por Robles-Murillo (2005).

La forma en la que la pesquería ha sido regulada, para las dos especies más importantes en México (*P. interruptus* y *P. argus*), ha sido la veda, que para ambos casos es de siete meses (16 de febrero al 15 de septiembre) (Federación, 1992; Vega-Velázquez, 2003), lo que propicia la pesca pirata (Díaz-Iglesias, com. per.), además, han reducido la cantidad de embarcaciones que capturan langosta y con esa medida ha disminuido el esfuerzo pesquero, es decir por cada embarcación se obtiene una mayor cantidad de langosta capturada, de manera tal que los costos de producción han disminuido, todo esto ha permitido que las ganancias aumenten y que la población siga estable.

Las poblaciones naturales de langostas están en su punto de captura máxima sostenible e incluso algunas de ellas han superado este punto (Sibeni y Calderini, 2012), es por esa razón que el desarrollo de la langosticultura podría producir

suficientes toneladas para satisfacer el mercado (Fotedar y Phillips, 2011; Phillips y Matsuda, 2011), además los costos de producción disminuirían y se tendría un efecto positivo en las poblaciones naturales. El efecto que tendría la extracción de puerulos en las poblaciones naturales de langosta sería mínimos y fácilmente trazables. Los beneficios de producir langosta son muchos, incluyendo la reutilización de mermas de las empresas procesadoras de mariscos para alimentar a los estadios posteriores a puerulo, siempre y cuando dichas mermas sean frescas.

El término langosta o langosta espinosa es más utilizado para referirse a organismos de la familia Palinuridae (Gracia y Kensler, 1980). Se han realizado numerosas investigaciones relacionadas con las langostas espinosas enfocadas a diferentes aspectos de su taxonomía, distribución de las especies, pesquería, ciclo de vida y a la producción acuícola. En la actualidad, el mayor interés se ha enfocado a este último sector dado que la pesquería no satisface la demanda internacional, esto debido al agotamiento de algunas poblaciones por sobre captura y además, la implementación de vedas para mantener el nivel de captura máxima sostenible, lo que limita la extracción y la disponibilidad para el mercado (Sibeni y Calderini, 2012).

El ciclo de vida de las langostas comienza con la fecundación de la freza, la cual ocurre cuando la hembra frota el parche colocado por el macho y los espermatozoides se liberan, el desarrollo embrionario se lleva a cabo durante la migración que realiza la hembra, alejándose de la costa hasta 60 m, después de la eclosión emerge una larva que se denomina primer estadio larval o naupliosoma, éste es efímero (2-4 h), a partir de la primera muda la larva se denomina filosoma (phyllós "hoja", soma "cuerpo") (Figura 2); la morfología característica de este estadio es un cuerpo aplanado dorsoventralmente, con una apariencia translúcida y pequeñas manchas de coloración característica entre las diferentes especies, rojas en el caso de *P. interruptus* (Phillips, 2008). La fase filosoma comprende 11 estadios y su desarrollo puede durar más de ocho meses. Son capaces de realizar migración vertical, que expone a las larvas a las corrientes marinas, lo que ocasiona su desplazamiento y dispersión, de forma tal que se pueden alejar entre 800 y 1000 km de la costa, donde se pueden desarrollar en aguas prístinas, alimentándose del zooplancton. El proceso para la identificación de la especie, en la fase filosoma, considera los ciclos de muda presentes, así como el número de mudas

entre estadios (instars) y características morfológicas, especialmente las diferentes ornamentaciones de los apéndices (Brusca y Brusca, 2003).

Después del último estadio como filosoma, ocurre la metamorfosis y se observa un cambio morfológico radical, de una apariencia aplanada y de aspecto arácniforme cambia a una forma semejante a la de una langosta y se denomina puerulo o postlarva. Este estadio tiene una apariencia translúcida y el proceso de mineralización del exoesqueleto aún no le provee la dureza propia de un organismo juvenil o adulto. En este estadio larval se inicia el desplazamiento de regreso a la zona costera, en donde localiza un sustrato apropiado para su desarrollo. Una vez establecida, puede mudar de dos a tres veces antes de adoptar el comportamiento bentónico característico de un adulto, es entonces cuando se considera como un juvenil, se completa el proceso de mineralización del exoesqueleto y comienza a ser evidente la coloración típica de la especie. En esta etapa comienza a alimentarse y se considera que se ha reclutado satisfactoriamente a la población (Phillips, 2008).

Durante todo este proceso de desarrollo larval, la mortalidad que se presenta en el medio natural es elevada, representando un 97% desde la eclosión hasta que el organismo es una postlarva, de esta etapa, hasta el estadio adulto, la mortalidad es del 42%, lo que resulta en una supervivencia total del 1.72% (Booth y Phillips, 1994).

Los estudios previos de langostas en el medio natural, sirvieron como base para el desarrollo de su cultivo. Los estudios comienzan en Japón a finales del siglo antepasado (Hattori y Oishi, 1899) y continúan a mediados del siglo pasado con el estudio descriptivo de los estadios larvales, principalmente de *P. argus* (Lewis *et al.*, 1952), *P. interruptus* (Johnson, 1956) y *P. japonicus* (Nonaka *et al.*, 1958). Dexter (1972) realizó estudios sobre el cultivo de diferentes especies de langosta espinosa en Estados Unidos de Norteamérica; en sus cultivos de *P. interruptus* solo produjo filosomata I y VI.

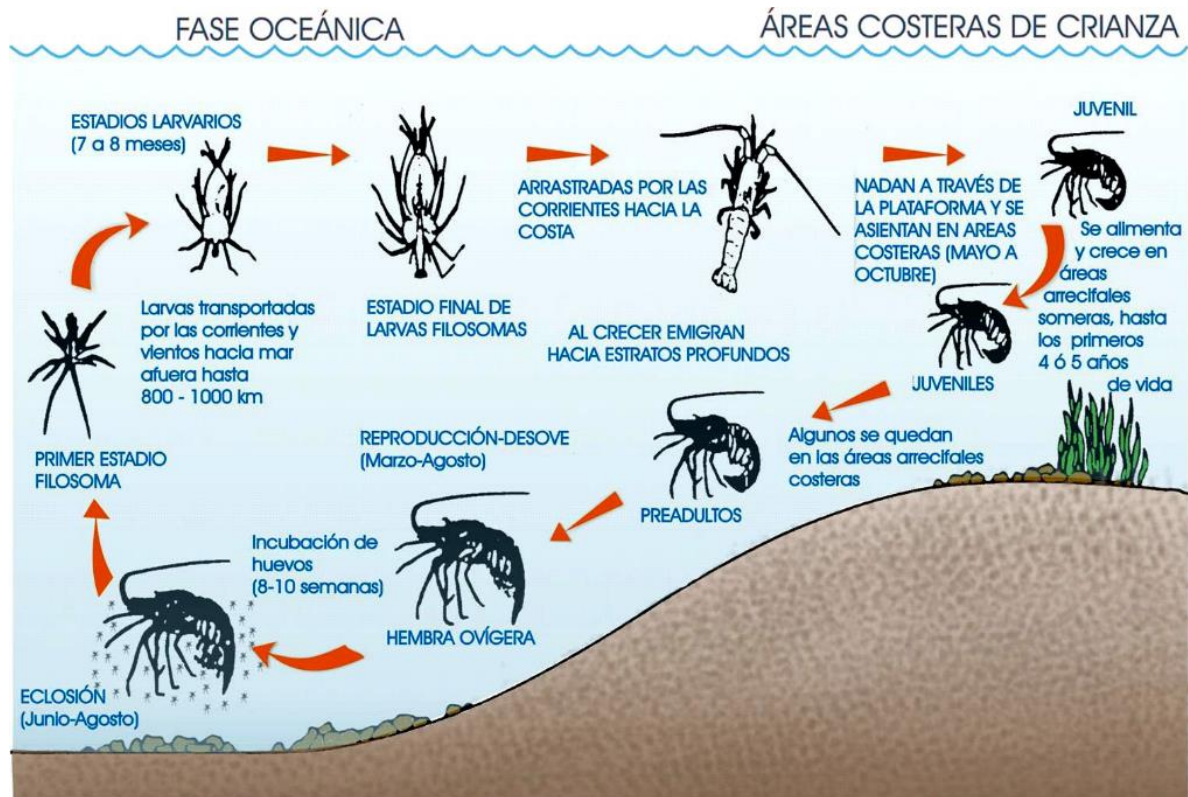


Figura 2. Ciclo de vida de *Panulirus interruptus* (Kailola et al., 1993) modificado por Robles-Murillo (2005).

En años posteriores, se desarrollaron técnicas de cultivo (Tabla 2) que permitieron observar cada fase del desarrollo, desde la eclosión del huevo hasta la obtención del puerulo. Esto permitió encontrar errores de identificación en algunas especies y propició un mejor entendimiento del ciclo de vida de diferentes especies en las que el periodo larval se ha completado en laboratorio (Phillips y Kittaka, 2000; Phillips, 2008).

Las técnicas de cultivo que han sido empleadas frecuentemente son: a) sistema de agua verde o ecosistémico, desarrollado en Japón, consiste en la inclusión de microalgas, *Nannochloropsis oculata* (para mejorar la calidad del agua y atenuar el crecimiento bacteriano) en donde se cultivan las filosomata y la adición de la dieta (Kittaka, 2000) y, b) sistema oligotrófico, implementado en Australia (Ritar, 2001), donde

se mantiene la misma calidad de agua que en el ecosistémico (agua filtrada a 1 μm , tratada con luz UV y con ozono) y la adición de la dieta (nauplios de *Artemia franciscana*), pero sin microalgas.

Tabla 2. Características del desarrollo larval completo de especies cultivadas (Phillips, 2008).

Especie	Ciclos de muda	Duración de la filosoma (meses)	Duración del puerulo (Días)	Autor(es)
<i>Jasus lalandii</i>	15	10	>31	Kittaka (1988)
<i>Jasus edwardsii</i>	15 – 23	10.5 – 13.4	19	Kittaka <i>et al.</i> (1988, 2005)
<i>Sagmariasus verreauxi</i>	16 – 17	6.1 – 11.6	25.5	Kittaka <i>et al.</i> (1997), Moss <i>et al.</i> (2000 ^a)
<i>Palinurus elephas</i>	6 – 9	2.0 – 4.2	11 – 15	Kittaka e Ikegami (1988)
<i>Panulirus japonicus</i>	20 – 31	7.5 – 12.6	9 – 26	Matsuda y Takenouchi (2005)
<i>Panulirus longipes</i>	17	9.1 – 9.5	-	Matsuda y Yamakawa (2000)
<i>Panulirus homarus</i>		5.5 - 8		Murakami, k (2006)
<i>Panulirus penicillatus</i>	22	8.3 – 9.4	-	Matsuda <i>et al.</i> (2006)
<i>Panulirus ornatus</i>	23 – 24	4 – 6.5	9 - 25	M G Kailis Group (Barnard, R)
<i>Panulirus argus</i>	18 – 21	4.5 – 6.5	11 - 26	Goldstein <i>et al.</i> (2006); Matsuda <i>et al.</i> (2008)
<i>Panulirus versicolor</i>	-	6 – 8	-	Smith <i>et al.</i> (2009)

Actualmente los estudios realizados se enfocan en identificar las condiciones adecuadas de cultivo como la calidad de la dieta, la temperatura, el fotoperiodo, la densidad de cultivo y la presencia de enfermedades. Lo anterior es de vital importancia dado que la rentabilidad del cultivo de filosomata para la obtención de puerulos, se ve afectada por su alta mortalidad, causada principalmente por agentes patógenos (Matsuda y Takenouchi, 2005) y la inadecuada alimentación (Phillips y Kittaka, 2000).

1.2 Alimentación larval

Uno de los aspectos críticos para el cultivo de larvas en cualquier especie es la calidad de su alimento. En los seres vivos se ha demostrado una relación directa entre la calidad de las dietas y la supervivencia, el crecimiento y en particular en los crustáceos, la duración del periodo intermuda y la cantidad de instares que se observen en una misma especie. Para definir una dieta adecuada para el cultivo de un organismo, generalmente se identifican los alimentos que la especie consume en su ambiente natural y se le alimenta con estos (Sargent *et al.*, 1997), o se formula una dieta que imite en lo posible el perfil nutricional (Nelson *et al.*, 2002).

Los nutrientes importantes, que son una constante en todos los organismos heterótrofos superiores, son las proteínas, vitaminas y lípidos, de manera particular los ácidos grasos (AG) de cadena de carbono larga, con más de tres enlaces dobles, es decir, los ácidos grasos poliinsaturados (AGP) y principalmente los altamente insaturados (AGPI). Estos AG representan una fracción importante de los lípidos que deben ser consumidos para satisfacer los requerimientos del organismo. Comúnmente, los lípidos saturados son empleados como fuente de energía y los insaturados para diferentes funciones de la célula (señalización, permeabilidad de la membrana y producción de tejido metabólicamente activo) (McEvoy *et al.*, 1995).

En crustáceos marinos se ha estudiado la importancia de cierto grupo de ácidos grasos poliinsaturados (linoleico y linolénico) altamente insaturados (araquidónico: ARA, eicosapentanoico EPA y docosahexaenoico DHA) que tienen funciones importantes durante su desarrollo larval. Diferentes estudios han revelado que los ácidos grasos poliinsaturados son vitales para los procesos de muda, como precursores hormonales (Anger, 2001). Un ejemplo de la función de los AGPI es el ácido ARA (20:4n6), que se acumula durante el periodo de intermuda para ser utilizado poco antes y durante la ecdisis como precursor de la hormona de la muda (HM). Otros AGPI importantes son el EPA (20:5n3), que participa en el metabolismo de los azúcares en la glándula digestiva y el DHA (22:6n3) que como en muchos organismos, participa en los procesos de desarrollo del sistema nervioso (Castell *et al.*, 1994; Sargent *et al.*, 1997, 1999).

Las larvas filosomata se alimentan de zooplancton en el medio natural (Phillips y Kittaka, 2000), los organismos que componen esta comunidad se caracterizan por almacenar ácidos grasos que provienen del fitoplancton. De esta comunidad, los copépodos son el grupo de organismos que forman una parte importante de la dieta de las larvas planctónicas de muchos organismos marinos ya que los proveen de ácidos grasos esenciales. Aunque algunas especies ya se cultivan en laboratorio, es difícil poder tener densidades altas y el tiempo requerido para alcanzar una talla adecuada para la alimentación de filosomata podría representar un riesgo, debido a que durante este periodo se puede presentar evento de mortalidad elevada principalmente por contaminación del cultivo. Debido a esto, se emplean nauplios de *Artemia* que son fáciles de cultivar, resistentes al manejo en laboratorio, crecen rápidamente y tienen un método de alimentación (filtración no selectiva) que permite enriquecerla fácilmente y así aumentar su valor nutricional, este proceso es importante, porque generalmente la *Artemia*, como tal, no provee los ácidos grasos esenciales para el desarrollo de la filosoma.

Diversos estudios han evaluado el enriquecimiento de nauplios de *Artemia*, con dietas a base de microalgas marinas con alto contenido de ácidos grasos esenciales o con aceites enriquecedores comerciales, de esta manera se utilizan los nauplios como bioencapsuladores de ácidos grasos y de otros nutrientes importantes (Chakraborty *et al.*, 2010).

Entre las microalgas que se han utilizado para la alimentación de organismos intermediarios (*Artemia*, rotíferos y copépodos, entre otros), para la alimentación de peces y crustáceos destacan por su contenido de ácidos grasos esenciales (DHA, EPA y ARA), *Isochrysis* sp., *Phaeodactylum tricornutum* y *Nannochloropsis oculata*. Algunas de estas microalgas son utilizadas en combinación con aceite de pescado para el enriquecimiento de los nauplios de *Artemia* (Han *et al.*, 2000) que se utilizan para la alimentación de larvas filosomata de *P. interruptus* (Kittaka, 1997; Ritar, 2001; Matsuda y Takenouchi, 2005; Matsuda *et al.*, 2006; Goldstein *et al.*, 2008).

Además de la importancia nutricional que tienen las microalgas en la alimentación de los organismos filtroalimentadores, también producen metabolitos secundarios que

tienen propiedades antibacteriales. Por ejemplo el extracto de la microalga *N. oculata* ha mostrado un efecto contra *Vibrio* sp. (Saracco-Álvarez, 2007), lo que disminuye la probabilidad de mortalidades inducidas por dicho patógeno.

Los metabolitos que producen las microalgas (ácidos grasos polinsaturados, pigmentos, vitaminas, entre otros) son de vital importancia para diferentes organismos, ya sea que las consuman en forma directa (filtroalimentadores) o indirecta (intermediarios en la alimentación de larvas de peces y crustáceos), es por ello que se han realizado una gran cantidad de estudios para describir su composición bioquímica en las diferentes etapas del crecimiento (Brown, *et al.*, 1989). En este sentido, *P. tricornutum*, produce una cantidad elevada de ácidos grasos poliinsaturados (linoleico y EPA) en la fase de máximo crecimiento exponencial, además, la facilidad con la que crece esta microalga permite tener cantidades elevadas de biomasa disponibles para la alimentación de los organismos intermediarios que bioencapsulan los nutrientes y que a su vez son esenciales para la alimentación de las larvas de diferentes especies de peces y crustáceos, en particular de las larvas filosomata de los palinuridos (Léger *et al.*, 1987).

1.3 Enfermedades en langostas

Las enfermedades presentes en la langosticultura han sido estudiadas a profundidad en el estadio adulto, donde se han observado organismos simbióticos, parásitos y causantes de enfermedades, todos ellos pertenecientes a grupos de virus, bacterias, hongos, protozoarios y helmintos. Todos estos organismos pueden estar presentes en las poblaciones silvestres y cultivadas de langostas, sin representar un problema, pero si se produce un evento anómalo que induzca estrés, puede provocar que los organismos oportunistas desarrollen enfermedades o que mueran. No obstante, los estadios más tempranos en la vida de una langosta (larvas filosomata), son más susceptibles a las enfermedades (Matsuda y Takenouchi, 2005).

Una de las enfermedades más importantes que se han presentado en langostas adultas, es la infección de la hemolinfa, ocasionada por la bacteria *Aerococcus viridans*

(Bobes y Díaz-Iglesias, 1988); si una langosta infectada es consumida por un humano, le puede provocar el endurecimiento del tejido cardíaco (Díaz-Iglesias, com. per.).

Las larvas filosomata tienen una mayor susceptibilidad a los epibiontes y a las enfermedades bacterianas del exoesqueleto, que les impide moverse ágilmente y las vuelven más visibles. La colonización fúngica las imposibilita para alimentarse y la infestación con protozoarios aumenta la resistencia hidrodinámica durante el nado. Las enfermedades que afectan internamente, producto de la infección por algunas bacterias del género *Vibrio*, dinoflagelados como *Hematodinium* sp. y amibas, producen metabolitos dañinos y activan la producción de fagocitos, lo que propicia un gasto energético y el consumo adicional de recursos nutricionales. Todos los procesos antes mencionados inducen estrés, provocan que las larvas filosomata no se alimenten y/o consuman las reservas de nutrientes, disminuyendo así las probabilidades de una muda exitosa y aumentando las probabilidades de mortalidad (Shields *et al.*, 2006).

Una alimentación adecuada puede ayudar a incrementar la capacidad del sistema inmune (respuesta humoral y/o celular), en esta condición, a pesar de que el organismo tenga alguna enfermedad, la mortalidad puede variar, dependiendo de la calidad de la dieta (Glencross, 2009). Esta premisa ha desencadenado la búsqueda del alimento ideal, que aunado con las condiciones óptimas de cultivo eleven la supervivencia de las mismas.

1.4 Hipótesis

La concentración de ácidos grasos altamente insaturados DHA, EPA y ARA suministrados en la dieta de nauplios de *Artemia franciscana*, con base en la mezcla de microalgas marinas y el aceite comercial Omegamex®, acelerará el crecimiento y garantizará la supervivencia de los estadios larvales tempranos de la langosta *Panulirus interruptus*.

1.5 Objetivo general

Evaluar el efecto de la alimentación de larvas filosomata de *Panulirus interruptus* con nauplios de *Artemia franciscana* enriquecidos con: a) aceite comercial Omegamex®, b) una dieta mixta de microalgas marinas y c) una mezcla de aceite comercial de órbita de atún (Omegamex®) y una mezcla de microalgas marinas, sobre la supervivencia, el crecimiento, duración de los ciclos de muda y el desarrollo morfológico.

1.6 Objetivos particulares

-Evaluar la composición de ácidos grasos de nauplios de *A. franciscana* enriquecidos con Omegamex®, microalgas marinas y una combinación de Omegamex® y microalgas marinas.

-Evaluar la supervivencia, el crecimiento y el tiempo de muda de larvas filosomata tempranas alimentadas con nauplios de *Artemia franciscana* enriquecidos con Omegamex®, microalgas marinas y una combinación de Omegamex® y microalgas marinas.

-Describir los estadios larvales tempranos de la langosta roja *P. interruptus* con base en su morfología, crecimiento y la duración del ciclo de muda.

Capítulo 2. Materiales y métodos

2.1 Dietas para nauplios de *Artemia franciscana*

2.1.1 Cultivo de microalgas

Las microalgas utilizadas en este trabajo fueron *P. tricornutum* (National Marine Fisheries Service, La Joya, California, USA.) e *Isochrysis* T-iso (Bigelow Laboratory, CCMP1324), se obtuvieron del Cepario de Microalgas del Departamento de Acuicultura del CICESE.

La producción de biomasa de las dos especies de microalgas se hizo por medio de escalamientos sucesivos, desde 10 ml hasta 2500 ml. El agua de mar utilizada para los cultivos se pasó a través de filtros de 10, 5 y 1 μm y finalmente por luz ultravioleta, posteriormente se esterilizó en autoclave (Yamato SM310) a 120 libras de presión por 20 min.

El medio de cultivo utilizado fue “f/2” (Guillard y Ryther, 1962), con adición de silicatos en el caso de *P. tricornutum*. Se empleó el doble de la concentración de vitaminas indicadas para este medio.

Los cultivos de cada una de las microalgas se realizaron por triplicado y se mantuvieron en un sistema semicontinuo, con una tasa de dilución del 20%, para mantener el cultivo estable en la fase de máximo crecimiento exponencial. Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$, con aireación constante para mantener el intercambio de gases y evitar la sedimentación de las células. El pH fue regulado con inyección de CO_2 y se mantuvo entre 8 y 8.5.

Para evaluar la biomasa producida se realizaron conteos diarios del número de células (antes y después de cada dilución). Dichos conteos se hicieron con ayuda de un contador de partículas (Celeromics accelerating science) asegurando que los cultivos se encontraban estables a través del tiempo.

2.1.2 Preparación de la emulsión del aceite Omegamex® para el enriquecimiento de nauplios de *Artemia franciscana*

El aceite Omegamex® es una fuente con alto contenido de ácidos grasos. Este aceite no fue tratado para la eliminación de lecitinas, de forma tal que se emulsionó con facilidad, este proceso se realizó usando una batidora eléctrica por 3 min, para lograr una mayor homogeneidad en el tamaño de las micelas de aceite suspendidas en el agua. Inmediatamente después de emulsificar el aceite se tomaba una alícuota para medir el diámetro de las micelas y asegurar que el tamaño fuera adecuado para utilizarse en el proceso de enriquecimiento de los nauplios, considerando que el tamaño de la boca de los nauplios mide menos de 30µm.

Para verificar que los nauplios ingirieran las micelas, una muestra de estos organismos se lavó con agua dulce por un minuto y posteriormente se lavó con agua de mar a presión en una piseta, a continuación se hizo una disección longitudinal, esto se logró eliminando el agua del portaobjeto cuidadosamente hasta que la *Artemia* no pudo moverse, se cortó con un bisturí y enseguida se colocó una gota de agua destilada sobre ésta y se colocó en un microscopio invertido (EVOS® XL) y en la gota de agua se observó la presencia de las micelas que estaban en el tracto digestivo de la *Artemia*.

2.1.3 Producción de nauplios de *Artemia franciscana*

Para la producción de nauplios de *Artemia* se siguió el proceso que se utiliza de forma rutinaria en el laboratorio de peces marinos del Departamento de Acuicultura del CICESE y que toma como base el protocolo descrito por Sorgeloos *et al.* (1986). Los quistes se hidrataron con agua dulce por una hora y con aireación intensa para provocar que la hidratación fuera homogénea, a continuación, se eliminó la aireación y después de 5 a 10 min, se retiraron los quistes que no eran viables. Una vez hidratados, se colocaron en una mezcla 1:1 de agua de mar e hipoclorito de sodio (cloro comercial), a este proceso se le conoce como desenquistado o descapsulación (que

tuvo una duración de 1.5 a 2 min), lo que significa que la primera capa protectora del quiste (corion) se retira para facilitar y sincronizar la eclosión del nauplio. Se tuvo especial cuidado con el incremento de la temperatura durante este proceso, porque se corría el riesgo de inhabilitar los quistes si la temperatura llegaba a 35 °C. Los quistes estuvieron listos cuando su coloración se tornó anaranjada. Enseguida se lavaron con abundante agua dulce para eliminar totalmente cualquier residuo de cloro.

Finalmente los quistes se colocaron en un tanque de incubación y eclosión, a una salinidad de 20 a 22 ups, una temperatura de 26°C, aireación abundante y una fuente de luz. Después de 24 h se realizó la cosecha de los nauplios de *A. franciscana* a través de tamices de 20 µm y se concentraron en un volumen conocido para hacer una evaluación de la eclosión en donde eventualmente se realizaba el enriquecimiento.

2.1.4 Enriquecimiento de nauplios de *Artemia franciscana*

Los nauplios de *Artemia* cosechados de los tanques de incubación se distribuyeron en cuatro matraces Fernbach, colocando, en cada uno, entre 12,000 y 14,000 nauplios de 48 h de edad (después de la eclosión). Posteriormente, se añadió el enriquecedor y enseguida los matraces fueron aforados a 2000 ml con agua de mar filtrada y esterilizada con luz UV.

Para el enriquecimiento de los nauplios de *A. franciscana* con el aceite Omegamex® (Ω), se agregó la cantidad necesaria de la emulsión, inmediatamente después de su preparación, en una proporción de 0.33 ml•l⁻¹ (Matus-Nivón, com. per).

Para el enriquecimiento con la mezcla de las microalgas, se suministraron 3000 cél•nauplio⁻¹ de una mezcla de *Isochrysis* T-iso y *P. tricornutum* (µ), en una proporción 1:1.

Para el enriquecimiento de los nauplios con la mezcla de microalgas y aceite Omegamex® (µ+Ω), se utilizó una proporción 1:1 volumen-volumen de microalgas y

emulsión de Omegamex®. La Dieta Control consistió en nauplios de *A. franciscana* mantenidos en ayuno por 48 h.

Los nauplios de *Artemia* se mantuvieron en el enriquecedor por un periodo de 12 horas (Matus-Nivón, com. per.), a continuación se cosecharon y contabilizaron, posteriormente se agregó una solución de iodopovidona (Yodo Polivinil Pirrolidona) a 5 ppm por un lapso de 20 min para eliminar o reducir el contenido de bacterias y evitar problemas de infección de las larvas filosomata.

Las raciones se suministraron al mismo tiempo en las diferentes unidades experimentales, para evitar posibles variaciones en la calidad de la alimentación de las filosomata.

En un experimento adicional, los nauplios de *Artemia* se enriquecieron por diferentes tiempos (0, 2, 3, 6, 8 y 12 h), con las diferentes dietas (Dieta Ω , Dieta μ y Dieta $\Omega + \mu$) y un control sin enriquecimiento. El tiempo de 0 h de enriquecimiento de las dietas, se consideró cuando una densidad conocida de *Artemia* se cosecho recién agregado el enriquecedor y consecutivamente se cosecharon transcurridos cada uno de los tiempos indicados. Para la eliminación de bacterias, se siguió el procedimiento de limpieza descrito anteriormente.

Para el análisis de los ácidos grasos (AG) por cromatografía de gases con espectro de masas (CG/MS), una vez transcurridos los periodos de enriquecimiento se tomaron muestras de nauplios por triplicado, equivalentes a 3.0 mg.

2.2 Evaluación del efecto de los enriquecedores

Para la evaluación de la composición y contenido de ácidos grasos de las dos especies de microalgas, cada 15 días se recolectaron alícuotas de 15 ml, se centrifugaron a 3000 rpm por 15 min, a 10 °C, en una centrífuga refrigerada (marca Thermo Scientific Heraeus Megafuge 16R), los paquetes celulares se resuspendieron con formiato de

amonio al 3% y se centrifugo nuevamente, (este proceso se repitió tres veces) para asegurar la eliminación de la mayor cantidad de sales posibles, posteriormente se almacenaron en tubos eppendorf a -70 °C.

Para analizar los ácidos grasos de los nauplios de *A. franciscana*, se recolectaron entre 20 mil y 22 mil nauplios antes y después de enriquecerlos con las diferentes dietas, se filtraron con una malla de 20 µm, se lavaron con agua de mar estéril y a continuación con agua destilada para eliminar las sales y se almacenaron en tubos eppendorf a -70 °C.

Para cuantificar el peso seco de los nauplios de *Artemia*, se tomó una muestra de volumen y densidad conocida, se colocaron en una liofilizadora por 24 h y posteriormente se pesaron en una balanza analítica, se realizaron dos mediciones para comprobar que la muestra no estaba rehidratada.

2.2.1 Análisis de ácidos grasos: cromatografía de gases espectrometría de masas (GCMS)

La extracción de ácidos grasos se hizo en el Laboratorio de Biotecnología de Microalgas del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR). Las muestras fueron liofilizadas y de los concentrados obtenidos se tomaron muestras de un peso conocido, las cuales se sometieron a derivatización por medio de hidrólisis ácida con 3 ml de la mezcla de HCl-CH₃OH (5:95 v/v) durante 2.5 horas en un termo baño a 85 °C (Sato y Murata, 1988). Los ácidos grasos metil esterificados obtenidos se extrajeron con 3 ml de hexano grado HPLC, se colocaron en un vial con tapa de teflón, se sellaron y se almacenaron a -20 °C para su posterior análisis.

El análisis de ácidos grasos se realizó por cromatografía de gases espectrometría de masas, utilizando un cromatógrafo de gases espectrómetro de masas (HP GCD 1800B) con detector de ionización electrónica. Se inyectó 1µl de muestra en una columna capilar de sílica con dimensiones de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro externo y

0.25 μm de espesor de película (Omegawax TM250). El gas acarreador fue helio de alta pureza. Previamente se elaboró la curva de calibración con una mezcla comercial de 37 ácidos grasos metilados de origen marino (SUPELCO 47885U). La identificación de los ácidos grasos de las muestras se realizó comparando los tiempos de retención (TR) con respecto a los de la curva de calibración. La identificación se confirmó a través de los espectros de masas de los diferentes tipos de ácidos grasos en los que se observa la presencia de ciertos iones característicos de cada tipo de ácido graso (saturado, monoinsaturado, biinsaturado, poliinsaturado, n3, n6, otros). Para la identificación se usó el software de integración WSearch2005 liberado gratuitamente en internet por la Universidad de Australia. Mediante este software se pudo identificar ácidos grasos que normalmente no están disponibles como estándares comerciales.

Para calcular la concentración de cada ácido graso se utilizó la siguiente ecuación (1):

$$C = \frac{\left(\frac{A}{FC}\right)(V \text{ de } H)}{PM} \quad (1)$$

Donde:

C= Concentración ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$)

A= Área del pico del cromatograma

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

V de H = Volumen de hexano (ml)

PM= Peso de la muestra (mg)

2.3 Bioensayo con *P. interruptus*

2.3.1 Obtención y mantenimiento de reproductores

Las hembras frezadas de *P. interruptus* fueron recolectadas de la zona de El Rosario B.C. México, para lo cual se contó previamente con un permiso emitido por SAGARPA y CONAPESCA (RNPA UE: 0203016282).

Las hembras fueron capturadas por los métodos convencionales (jaulas de fondo). Se transportaron hasta el Laboratorio de Maduración de Langosta, del Departamento de Acuicultura del CICESE.

El transporte se realizó en una hielera con aireación constante por medio de una bomba y con recambios de agua continuos, de manera tal que se tuvieron los máximos cuidados para garantizar la supervivencia de la freza, ya que los huevos fecundados son altamente susceptibles a morir por asfixia o por intoxicación con amonio.

Una vez en el laboratorio, las hembras fueron colocadas en un tanque de 900 l con aireación moderada (para no dañar la freza) y un flujo de agua constante. Diariamente se retiraron los sedimentos y cada tres días se limpiaron las paredes del tanque. Las hembras fueron alimentadas con mejillones (*Mytilus galloprovincialis*). Diariamente se realizaron mediciones de oxígeno disuelto y de temperatura. Las hembras fueron marcadas con distintivos comerciales numerados Sphyrón Marks, para su identificación y para el seguimiento de la maduración de la freza.

2.3.2 Obtención de naupliosomas y filosomata

La obtención de los naupliosomas requirió monitoreo constante del desarrollo de la freza, ya que el cambio de color (de naranja a rojiza) y la aparición de los pedúnculos

oculares permiten estimar la fecha aproximada de la eclosión. Se tomaron muestras de larvas visiblemente acumuladas en el fondo y en el filtro de desagüe.

Los naupliosomas (primer estadio de desarrollo de *P. interruptus*) (Dupré y Guisado, 1996), se lograron observar gracias al monitoreo diario de las frezas durante las noches, una vez que la freza tenía un color rojizo.

Durante la mañana posterior (6 horas después de la eclosión), las larvas filosomata se recolectaron de la superficie del tanque con la ayuda de un tamiz de 150 μm y se concentraron en un recipiente de un volumen conocido para su cuantificación. Este proceso se llevó a cabo con el máximo cuidado para minimizar los daños a las filosomata y evitar el desarrollo de enfermedades durante el bioensayo.

2.3.3 Cultivo de filosomata

Después de la cuantificación de las filosomata, se seleccionaron solo aquellas que nadaban activamente cerca de la superficie del agua, con fototropismo positivo más activo. Para reducir la cantidad de bacterias, se les aplicó un baño profiláctico con una solución de formalina 10 ppm en agua de mar, por 20 min.

Para el desarrollo del bioensayo se colocaron larvas individuales en recipientes de vidrio con 200 ml de agua de mar filtrada, pasada por UV y ozonificada. Diariamente fueron alimentadas con las diferentes dietas. Por cada tratamiento se tuvieron 15 repeticiones.

Para extraer los residuos de alimento y reducir el desarrollo de bacterias, cada día se hizo un recambio del agua de mar del 20% en cada unidad experimental. Se mantuvo un fotoperiodo de 12:12 h luz:oscuridad, ya que se ha demostrado que produce mejores resultados en la sincronización de las mudas (Phillips, 2008). Diariamente se controlaron las condiciones de temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), salinidad (35 ups), oxígeno disuelto (6 y 7 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), pH (7-8) y nitrógeno amoniacal total (0.04 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Se realizaron observaciones diarias para registrar los eventos de muda o la muerte de las larvas. Cuando se encontraba una exuvia en el recipiente se consideraba ese día como el comienzo del siguiente periodo de intermuda. Además, se pudo observar el cambio de estadio y el número de mudas entre estadios. Con la ayuda de un microscopio (EVOS XL®), se capturaron imágenes de las larvas y se midió la longitud cefalotorácica con lo que se calculó la tasa de crecimiento y el índice de crecimiento, con las fórmulas 2 y 3:

$$TC = \frac{(Lc_f - Lc_i)}{t} \quad (2)$$

$$Ic = \frac{(Lc_f - Lc_i)}{Lc_i} 100 \quad (3)$$

Donde:

TC = Tasa de crecimiento (mm·día⁻¹)

Ic = Índice de crecimiento (mm)

Lc_i = Longitud cefalotorácica inicial (mm)

Lc_f = Longitud cefalotorácica final (mm)

t = Tiempo (días)

2.4 Análisis estadístico

Para comparar el efecto de las dietas sobre el desarrollo larval, se aplicó la prueba de homocedasticidad de Levene y al ajustarse a una distribución normal, se aplicó un ANOVA. Al encontrarse diferencias significativas, se utilizó la prueba de comparaciones múltiples de Duncan con un nivel de significancia de 0.05 (Sokal y Rolf, 1979).

Capítulo 3. Resultados

3.1 Calidad de dietas

En las Tablas 3 a 6 se presenta la composición de los ácidos grasos de las dietas utilizadas en la alimentación de las larvas filosomata de la langosta roja *Panulirus interruptus*, basadas en el enriquecimiento de *Artemia franciscana* con diferentes fuentes de ácidos grasos.

En relación a la Dieta Control (nauplios de *Artemia* en ayuno por 48 horas) (Tabla 3) los porcentajes promedio de ácidos grasos saturados (AGS), monoinsaturados (AGMI) y poliinsaturados (AGPI) fueron 29.43, 23.32 y 47.25% respectivamente, sin diferencias significativas entre las horas de cosecha.

Entre los ácidos grasos altamente insaturados, el ARA (20:4n6) tuvo un promedio de 4% entre las horas de enriquecimiento, sin diferencias significativas entre éstas; para la concentración del ácido graso EPA (20:5n3) cambió con el tiempo, el mayor porcentaje se obtuvo a las 12 h (7.63%) y el menor a las 0 h (5.38%). El ácido graso DHA (22:6n3) no se detectó. Durante las primeras tres horas (0, 2 y 3 h), la razón n3/n6 se mantuvo alrededor del 3.2, mientras que en las últimas horas (6, 8 y 12 h) disminuyó a 3.0.

Tabla 3. Composición y porcentaje del total de los ácidos grasos de la Dieta Control (nauplios de *Artemia* en ayuno por 48 horas) cosechada en diferentes tiempos (h). Desviación estándar entre paréntesis. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre los diferentes tiempos de enriquecimiento. n=9 (por dieta/hora de enriquecimiento).

AG	Horas					
	0	2	3	6	8	12
Saturados						
14:0	0.66 (0.3)	1.13 (0.1)	1.10 (0.2)	1.17 (0.3)	1.15 (0.1)	1.05 (0.2)
15:0	0.32 (0.0)	0.30 (0.0)	0.30 (0.0)	0.31 (0.1)	0.30 (0.0)	0.29 (0.0)
16:0	16.12 (0.4)	15.92 (0.6)	15.62 (0.8)	15.18 (1.3)	15.18 (1.0)	14.62 (1.4)
18:0	12.40 (2.5)	12.54 (2.5)	12.52 (2.5)	12.83 (2.5)	12.67 (2.5)	12.93 (2.2)
∑AGS	29.49 (2.6)a	29.88 (1.8)a	29.54 (1.7)a	29.49 (1.8)a	29.30(1.6)a	28.89 (0.9) a
Monoinsaturados						
16:1 n9	0.97 (0.1)	0.95 (0.1)	0.96 (0.1)	0.96 (0.1)	0.95 (0.1)	0.91 (0.1)
16:1 n7	3.71 (0.4)	3.63 (0.4)	3.50 (0.5)	3.38 (0.4)	3.47 (0.4)	3.18 (0.6)
18:1 n9 c	16.67 (3.5)	16.71 (3.1)	16.66 (3.2)	17.13 (3.5)	17.25 (3.1)	17.42 (2.4)
18:1 n9 t	0.28 (0.0)	0.29 (0.0)	0.33 (0.1)	0.41 (0.2)	0.33 (0.0)	0.37 (0.1)
18:1 n7	0.42 (0.1)	0.43 (0.1)	0.43 (0.1)	0.44 (0.1)	0.42 (0.1)	0.43 (0.1)
20:1 n9	1.09 (0.1)	1.14 (0.1)	1.14 (0.1)	1.13 (0.0)	1.19 (0.1)	1.22 (0.0)
∑AGMI	23.14 (3.3)a	23.16 (2.8)a	23.01 (2.9)a	23.44 (3.2)a	23.61 (2.7)a	23.53 (1.9)a
Poliinsaturados						
16:3 n6	0.54 (0.2)	0.49 (0.2)	0.51 (0.2)	0.51 (0.2)	0.49 (0.2)	0.44 (0.2)
18:2 n6	6.73 (0.7)a	6.62 (0.6)a	6.61 (0.7)a	6.51 (0.6)a	6.53 (0.6)a	6.4 (0.7)a
18:3 n3	30.78 (5.9)a	30.08 (5.3)a	29.81 (5.3)a	29.53 (5.2)a	29.18 (5.2)a	28.11 (4.4)a
20:4 n6	3.95 (0.8)a	4.20 (1.0)a	4.22 (0.9)a	4.51 (1.1)a	4.67 (1.0)a	4.98 (1.3)a
20:5 n3	5.38 (0.7)c	5.56 (0.7)bc	6.30 (2.0)b	6.01 (0.9)bc	6.23 (0.9)bc	7.63 (2.3)a
22:6 n3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
∑AGPI	47.37 (5.9)a	46.95 (4.6)a	47.45 (4.4)a	47.07 (4.4)a	47.10 (4.2)a	47.57 (2.5)a
n3/n6	3.22 (0.5)a	3.16 (0.5)ab	3.20 (0.5)a	3.09 (0.5)bc	3.04 (0.5)c	3.05 (0.4)c

AG: Ácidos grasos, AGS: Ácidos grasos saturados, AGMI: Ácidos grasos monoinsaturados, AGPI: Ácidos grasos poliinsaturados, ND: No detectado.

En relación a la Dieta Ω (*Artemia* alimentada con una emulsión de aceite Omegamex®), (Tabla 4), las concentraciones promedio de AGS y AGMI disminuyen con respecto al tiempo.

En el caso de los AGPI las concentraciones aumentaron en relación directa con el tiempo, los mayores valores se encontraron entre las horas 3 y 12 de enriquecimiento (50.1%), sin diferencias significativas durante este periodo.

El ácido graso 20:4n6 tuvo su mayor porcentaje a las 12 horas con 4.6%, el mayor porcentaje de ácido eicosapentaenoico (20:5n3) se obtuvo a las 12 horas con 9.2%.

En el ácido graso 22:6n3 se encontraron valores promedio máximos en las últimas dos horas de enriquecimiento (8 y 12h). En relación a la razón n3/n6, los mayores valores promedio se encontraron entre las 3 y las 12 h (3.9).

Tabla 4. Composición y porcentaje del total de los ácidos grasos de los nauplios de *Artemia* enriquecidos con una emulsión de aceite Omegamex® (Dieta Ω) y cosechados en diferentes tiempos (h). Desviación estándar entre paréntesis. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre los diferentes tiempos de enriquecimiento. n=9 (por dieta/hora de enriquecimiento).

AG	Horas					
	0	2	3	6	8	12
Saturados						
14:0	1.27 (0.2)	1.39 (0.1)	1.32 (0.1)	1.30 (0.1)	1.30 (0.0)	1.20 (0.1)
15:0	0.43 (0.1)	0.50 (0.1)	0.49 (0.0)	0.50 (0.0)	0.52 (0.0)	0.48 (0.0)
16:0	17.47 (1.7)	17.44 (0.8)	17.32 (0.7)	17.35 (1.2)	17.35 (0.7)	16.30 (0.4)
18:0	12.02 (2.5)	10.95 (1.8)	10.96 (2.1)	10.68 (2.3)	10.58 (1.8)	10.28 (1.4)
Σ AGS	31.19 (4.4)a	30.28 (2.8)ab	30.08 (2.6)ab	29.84 (3.4)b	29.75 (2.5)b	28.26 (1.3)c
Monoinsaturados						
16:1 n9	0.96 (0.1)	0.88 (0.1)	0.85 (0.1)	0.87 (0.1)	0.87 (0.1)	0.86 (0.1)
16:1 n7	4.07 (0.4)	4.22 (0.3)	4.10 (0.3)	4.29 (0.1)	4.24 (0.1)	4.12 (0.2)
18:1 n9 c	15.50 (3.0)	13.49 (1.8)	13.13 (1.9)	13.08 (2.0)	12.83 (1.7)	12.78 (1.1)
18:1 n9 t	0.30 (0.1)	0.33 (0.0)	0.37 (0.1)	0.39 (0.1)	0.37 (0.0)	0.36 (0.0)
18:1 n7	0.41 (0.1)	0.39 (0.1)	0.39 (0.1)	0.37 (0.1)	0.37 (0.1)	0.37 (0.1)
20:1 n9	1.17 (0.1)	1.32 (0.1)	1.37 (0.1)	1.45 (0.1)	1.52 (0.1)	1.54 (0.1)
Σ AGMI	22.41 (3.1)a	20.62 (1.9)b	20.21 (1.9)b	20.45 (2.0)b	20.20 (1.7)b	20.03 (0.9)b
Poliinsaturados						
16:3 n6	0.51 (0.2)	0.45 (0.2)	0.43 (0.2)	0.41 (0.1)	0.38 (0.1)	0.38 (0.1)
18:2 n6	6.34 (0.7)	5.87 (0.7)	5.76 (0.7)	5.57 (0.6)	5.52 (0.5)	5.42 (0.6)
18:3 n3	27.53 (6.0)	24.61 (5.4)	23.66 (5.6)	22.11 (5.3)	21.26 (4.7)	21.00 (4.9)
20:4 n6	3.66 (0.5)d	3.94 (0.7)c	3.99 (0.8)c	4.17 (0.7)bc	4.29 (0.7)b	4.60 (0.9)a
20:5 n3	5.40 (0.9)bc	6.62 (0.6)b	7.29 (1.3)b	7.78 (0.5)b	8.16 (0.8)b	9.22 (1.4)a
22:6 n3	2.97 (1.4)d	7.61 (1.4)c	8.57 (1.2)c	9.67 (0.9)b	10.44 (0.9)ab	11.09 (1.6)a
Σ AGPI	46.40 (7.5)c	49.09 (4.6)b	49.70 (4.3)ab	49.72 (5.4)ab	50.05 (4.2)ab	51.71 (2.2)a
n3/n6	3.39 (0.5)c	3.79 (0.5)b	3.89(0.5)ab	3.89 (0.5)ab	3.92 (0.5)ab	3.98 (0.3)a

AG: Ácidos grasos, AGS: Ácidos grasos saturados, AGMI: Ácidos grasos monoinsaturados, AGPI: Ácidos grasos poliinsaturados.

Con respecto a la Dieta μ (Tabla 5), los mayores porcentajes de AGS se presentaron con valores de 32.33% hasta 36.03% a las 6 y 8 h respectivamente. En el caso de los AGMI se obtuvieron valores máximos de 30.1% a las 8 h y mínimos a las 0, 2, 3 y 12 h.

Tabla 5. Composición y porcentaje del total de los ácidos grasos de los nauplios de *Artemia* alimentados con una mezcla 1:1 de las microalgas *Phaeodactylum tricornutum* e *Isochrysis T-iso* (Dieta μ), cosechada en diferentes tiempos (h). Desviación estándar entre paréntesis. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre los diferentes tiempos de enriquecimiento. n=9 (por dieta/hora de enriquecimiento).

AG	Horas					
	0	2	3	6	8	12
Saturados						
14:0	1.39 (0.1)	1.87 (0.1)	2.12 (0.3)	3.03 (0.9)	3.35 (1.2)	3.11 (0.5)
15:0	0.32 (0.0)	0.31 (0.0)	0.30 (0.0)	0.33 (0.1)	0.36 (0.1)	0.30 (0.0)
16:0	16.84 (0.6)	16.71 (0.2)	16.79 (0.6)	18.48 (3.7)	20.45 (5.4)	16.59 (0.7)
18:0	11.73 (2.0)	10.64 (1.5)	10.56 (1.6)	10.49 (2.4)	11.87 (3.0)	8.99 (0.7)
ΣAGS	30.28 (2.3)b	29.54 (1.3)b	29.76 (1.3)b	32.33 (6.6)ab	36.03 (9.1)a	29 (1.5)b
Monoinsaturados						
16:1 n9	0.96 (0.1)	0.91 (0.1)	0.87 (0.1)	0.90 (0.2)	0.97 (0.4)	0.79 (0.2)
16:1 n7	5.53 (1.3)	8.32 (2.2)	9.20 (2.4)	12.09 (4.5)	13.56 (6.5)	11.75 (4.4)
18:1 n9 c	16.04 (3.1)	14.58 (2.2)	14.06 (1.9)	13.77 (2.8)	15.39 (4.3)	11.96 (0.5)
18:1 n9 t	0.29 (0.1)	0.31 (0.0)	0.30 (0.0)	0.37 (0.1)	0.50 (0.2)	0.36 (0)
18:1 n7	0.42 (0.1)	0.43 (0.1)	0.42 (0.1)	0.44 (0.1)	0.42 (0.1)	0.42 (0.1)
20:1 n9	1.06 (0.1)	1.01 (0.1)	1.03 (0.0)	0.87 (0.3)	0.89 (0.3)	0.92 (0.2)
ΣAGMI	24.32 (4.1)c	25.57 (4.2)bc	25.88 (4.1)bc	28.44 (6.4)ab	31.73 (10.2)a	26.2 (4.2)bc
Poliinsaturados						
16:3 n6	0.53 (0.2)	0.49 (0.2)	0.46 (0.2)	0.44 (0.2)	0.48 (0.3)	0.38 (0.1)
18:2 n6	6.41 (0.7)	6.11 (0.8)	5.97 (0.8)	5.98 (1.5)	5.23 (2.1)	5.40 (1.1)
18:3 n3	32.77 (2.6)	26.91 (5.7)	25.80 (5.7)	20.68 (9.8)	15.31 (12.0)	21.92 (5.9)
20:4 n6	3.63 (0.7)a	3.38 (0.6)ab	3.25 (0.6)ab	2.54 (0.9)b	1.85 (1.3)c	2.83 (0.2)ab
20:5 n3	5.48 (0.9)b	6.80 (1.2)ab	7.17 (1.3)ab	7.20 (3.3)ab	6.60 (4.6)b	9.91 (3.2)a
22:6 n3	0.29 (0.2)e	1.20 (0.4)d	1.72 (0.6)cd	2.38 (1.3)bc	2.79 (1.3)b	4.36 (0.3)a
ΣAGPI	45.40 (6.3)a	44.90 (5.5)a	44.36 (5.1)a	39.23 (12.2)ab	32.24 (18.0)b	44.80 (3.6)a
n3/n6	3.29 (0.5) ab	3.49 (0.4)ab	3.58(0.4)ab	3.4 (1.3)ab	3.0 (1.6)b	4.23 (0.3)a

AG: Ácidos grasos, AGS: Ácidos grasos saturados, AGMI: Ácidos grasos monoinsaturados, AGPI: Ácidos grasos poliinsaturados.

Los porcentajes de AGPI disminuyeron a las 6 y 8 horas, en el resto de los periodos no se modificó el contenido con respecto al valor inicial (0 h). El ácido graso 20:4 n6, presentó el mayor valor de 3.63% (0 h, sin diferencia con 2, 3 y 12 h) y el menor de 1.85% en la hora 8 de enriquecimiento. Para el ácido graso 20:5n3 se obtuvo el valor máximo de 9.91% a las 12 h, con un valor mínimo de 5.48% a las 0 h. En el caso del ácido graso DHA, presentó el máximo valor a las 12 h, con un 4.36%. La razón n3/n6 fue mayor a las 12 h de enriquecimiento (4.23).

En la Tabla 6 se observan los resultados obtenidos con la Dieta Ω + μ (*Artemia* alimentada con una emulsión de aceite Omegamex® y una mezcla de las microalgas *P. tricornutum* e *Isochrysis* T-iso). La concentración máxima de AGS se observó a las 8 h con 31.71%. Los máximos contenidos de AGMI se obtuvieron a la 6 y 8 h. Los AGPI presentaron valores más altos en las primeras tres horas de enriquecimiento, con un valor promedio máximo de 45.6% y el mínimo fue de 41.46% (8 h). La concentración de ARA disminuyó con el paso del tiempo.

Tabla 6. Composición y porcentaje del total de los ácidos grasos de los nauplios de *Artemia* alimentados con una emulsión de aceite Omegamex® y una mezcla 1:1 de las microalgas *Phaeodactylum tricornutum* e *Isochrysis* T-iso (Dieta $\Omega+\mu$), cosechada en diferentes tiempos (h). Desviación estándar entre paréntesis. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre los diferentes tiempos de enriquecimiento. n=9 (por dieta/hora de enriquecimiento).

AG	Horas					
	0	2	3	6	8	12
Saturados						
14:0	1.43 (0.1)	1.90 (0.1)	2.18 (0.3)	2.99 (0.6)	3.58 (0.7)	3.42 (0.5)
15:0	0.33 (0.0)	0.33 (0.0)	0.34 (0.0)	0.35 (0.0)	0.39 (0.1)	0.36 (0.0)
16:0	16.88 (0.5)	16.76 (0.3)	16.76 (0.4)	17.49 (1.2)	18.5 (2.1)	16.7 (0.6)
18:0	11.52 (2.1)	10.49 (1.3)	9.93 (1.2)	9.04 (0.9)	9.23 (1.2)	8.49 (0.2)
∑AGS	30.16 (2.2)ab	29.47 (1.0)b	29.2 (1.3)b	29.87 (2.1)ab	31.71 (3.9)a	28.97 (1.2)b
Monoinsaturados						
16:1 n9	0.98 (0.1)	0.88 (0.1)	0.86 (0.1)	0.8 (0.2)	0.81 (0.1)	0.78 (0.2)
16:1 n7	5.70 (1.2)	8.35 (2.3)	9.37 (2.9)	11.97 (5.0)	12.59 (5.1)	11.95 (4.3)
18:1 n9 c	15.69 (3.3)	13.95 (1.8)	13.14 (1.5)	11.7 (0.6)	11.57 (0.6)	11.06 (0.3)
18:1 n9 t	0.33 (0.0)	0.31 (0.0)	0.31 (0.0)	0.42 (0.2)	0.36 (0.0)	0.39 (0.0)
18:1 n7	0.45 (0.1)	0.42 (0.1)	0.41 (0.1)	0.41 (0.1)	0.41 (0.1)	0.42 (0.1)
20:1 n9	1.11 (0.1)	1.06 (0.1)	1.06 (0.1)	1.02 (0.2)	1.09 (0.2)	1.01 (0.2)
∑AGMI	24.27 (4.3)c	24.97 (3.9)b	25.15 (4.2)ab	26.31 (5.0)ab	26.83 (5.1)a	25.61 (4.0)ab
Poliinsaturados						
16:3 n6	0.53 (0.2)	0.43 (0.2)	0.66 (0.3)	0.51 (0.2)	0.36 (0.2)	0.33 (0.1)
18:2 n6	5.87 (2.3)	5.94 (0.8)	5.77 (0.9)	5.36 (1.2)	5.21 (1.1)	5.23 (1.1)
18:3 n3	29.14 (2.9)	25.77 (5.5)	24.28 (5.8)	20.8 (6.9)	19.17 (6.3)	19.18 (5.5)
20:4 n6	3.58 (0.8)a	3.42 (0.6)a	3.3 (0.5)a	2.77 (0.2)b	2.53 (0.3)b	2.81 (0.3)b
20:5 n3	5.78 (1.3)d	7.24 (1.4)c	7.79 (1.6)c	9.33 (3.5)ab	8.33 (2.6)bc	10.29 (2.8)a
22:6 n3	0.68 (0.3)d	2.75 (0.9)d	3.85 (1.2)cd	5.04 (2.2)bc	5.85 (1.2)ab	7.59 (1.5)a
∑AGPI	45.58 (6.4)a	45.55 (4.8)a	45.65 (5.2)a	43.81 (6.2)bc	41.46 (6.8)c	45.42 (3.3)b
n3/n6	3.68 (0.9)b	3.65 (0.4)b	3.68 (0.3)b	4.08 (0.4)ab	4.1 (0.2)ab	4.45 (0.3)a

AG: Ácidos grasos, AGS: Ácidos grasos saturados, AGMI Ácidos grasos monoinsaturados, AGPI: Ácidos grasos poliinsaturados.

Los porcentajes de EPA (20:5n3) y DHA (22:6n3) se incrementó en relación directa con el tiempo de enriquecimiento. La relación n3/n6 fue más alta en las últimas tres horas con un valor máximo de 4.45 a las 12 h.

En la Tabla 7 se presentan los porcentajes de los ácidos grasos altamente insaturados (AGAI) en los nauplios de *Artemia* enriquecidos con las cuatro dietas y con los diferentes tiempos de enriquecimiento. En la Dieta Ω , se obtuvo el porcentaje más alto a la hora 12 (24.91%) ($p < 0.001$) (Tabla 6), además, se observaron diferencias altamente significativas con el resto de las dietas en los diferentes tiempos. En la Dieta Control se observaron los valores más bajos a las 12 h (12.61%), en la Dieta μ (0, 6 y 8 h) y Dieta $\Omega + \mu$ (0 h) se observaron valores similares.

Para el ARA, se observó un incremento en la concentración con la Dietas Ω y con el control en relación con el tiempo de enriquecimiento. En contraste, con las Dietas μ y $\Omega + \mu$ las concentraciones disminuyeron. Para el EPA, las concentraciones de incrementaron con todos los enriquecedores. Se observaron los mayores porcentajes en la Dieta Ω , Dieta μ y Dieta $\Omega + \mu$ con valores de hasta 10.29% y en general, los valores bajos se obtuvieron en la Dieta Control. Para el DHA, la concentración más alta (11.09%) se observó en la Dieta Ω y en la Dieta μ se presentaron los valores más bajos (0.29%).

Para la razón de EPA/ARA, se obtuvieron las mayores concentraciones con la Dieta $\Omega + \mu$ y Dieta μ y con los mayores tiempos de enriquecimiento, en contraste, con las dietas Dieta Ω y Dieta Control, se obtuvieron concentraciones significativamente bajas.

Para la relación DHA/ARA, los valores altos se observaron en la Dieta Ω y la Dieta $\Omega + \mu$ con los mayores tiempos de enriquecimiento. Los valores más bajas se presentaron en la Dieta μ .

Tabla 7. Composición y porcentaje del total de los ácidos grasos de los nauplios de *Artemia* enriquecidos con diferentes dietas, durante diferentes tiempos (h). Dieta Control (nauplios de *Artemia* en ayuno por 48 horas), Dieta Ω (emulsión de aceite Omegamex®), Dieta μ (mezcla de las microalgas *Phaeodactylum tricornutum* e *Isochrysis T-iso*) y Dieta $\Omega+\mu$ (emulsión de aceite Omegamex® y una mezcla de las microalgas *Phaeodactylum tricornutum* e *Isochrysis T-iso*). Desviación estándar entre paréntesis. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre las diferentes dietas, para cada tiempo de enriquecimiento. n=9 (por dieta/hora de enriquecimiento).

h	Control	Ω	μ	$\Omega+\mu$
ARA 0	3.95 (0.75)a	3.66 (0.54)ab	3.63 (0.70)ab	3.58 (0.80)b
2	4.20 (0.98)a	3.94 (0.66)b	3.38 (0.59)c	3.42 (0.64)c
3	4.22 (0.94)a	3.99 (0.76)b	3.25 (0.64)c	3.30 (0.55)c
6	4.51 (1.11)a	4.17 (0.66)a	2.54 (0.90)b	2.77 (0.22)b
8	4.67 (1.02)a	4.29 (0.70)a	1.85 (1.27)c	2.53 (0.32)b
12	4.98 (1.29)a	4.60 (0.86)a	2.83 (0.24)b	2.81 (0.30)b
EPA 0	5.38 (0.65)a	5.40 (0.93)a	5.48 (0.91)a	5.78 (1.3)a
2	5.56 (0.72)c	6.62 (0.63)b	6.80 (1.17)ab	7.24 (1.41)a
3	6.30 (2.01)b	7.29 (1.28)ab	7.17 (1.34)ab	7.79 (1.59)a
6	6.01 (0.87)b	7.78 (0.55)ab	7.20 (3.27)ab	9.33 (3.54)a
8	6.23 (0.88)a	8.16 (0.82)a	6.60 (4.57)a	8.33 (2.58)a
12	7.63 (2.31)b	9.22 (1.40)a	9.91 (3.24)a	10.29 (2.80)a
DHA 0	NA	2.97 (1.45)a	0.29 (0.18)c	0.68 (0.3)b
2	NA	7.61 (1.39)a	1.20 (0.45)c	2.75 (0.89)b
3	NA	8.57 (1.23)a	1.72 (0.59)c	3.85 (1.18)b
6	NA	9.67 (0.87)a	2.38 (1.27)c	5.04 (2.19)b
8	NA	10.44 (0.91)a	2.79 (1.31)c	5.85 (1.18)b
12	NA	11.09 (1.64)a	4.36 (0.25)c	7.59 (1.52)b
EPA/ARA 0	1.39 (0.20)c	1.48 (0.21)bc	1.52 (0.17)b	1.63 (0.27)a
2	1.36 (0.19)c	1.70 (0.17)b	2.02 (0.14)a	2.11 (0.07)a
3	1.53 (0.47)c	1.86 (0.36)b	2.21 (0.12)a	2.35 (0.13)a
6	1.37 (0.18)d	1.89 (0.17)c	2.63 (0.74)b	3.34 (1.08)a
8	1.36 (0.17)b	1.92 (0.15)b	3.54 (0.11)a	3.24 (0.69)ab
12	1.57 (0.46)c	2.03 (0.25)b	3.45 (0.88)a	3.61 (0.63)a
DHA/ARA 0	NA	0.80 (0.31)a	0.09 (0.06)c	0.19 (0.09)b
2	NA	1.95 (0.30)a	0.38 (0.17)c	0.83 (0.30)b
3	NA	2.19 (0.35)a	0.57 (0.25)c	1.22 (0.45)b
6	NA	2.38 (0.51)a	0.95 (0.39)c	1.83 (0.77)b
8	NA	2.50 (0.48)a	1.50 (1.26)c	2.33 (0.49)a
12	NA	2.43 (0.19)a	1.55 (0.09)b	2.73 (0.63)a
ΣAGAI 0	9.33 (1.28)b	12.03 (2.69)a	9.41 (1.56)b	10.04 (2.00)b
2	9.76 (1.63)d	18.16 (2.45)a	11.39 (1.58)c	13.41 (2.12)b
3	10.52 (2.45)d	19.85 (2.76)a	12.14 (1.65)c	14.94 (1.94)b
6	10.52 (1.92)c	21.62 (0.87)a	12.13 (4.6)c	17.14 (4.19)b
8	10.90 (1.80)c	22.89 (1.60)a	11.23 (6.49)c	16.71 (2.82)b
12	12.61 (3.07)d	24.91 (3.64)a	17.10 (3.66)c	20.68 (3.69)b

ARA: ácido araquidónico, EPA: ácido eicosapentaenoico, DHA: ácido docosaheptaenoico, AGAI: Ácidos grasos altamente insaturados

3.2 Supervivencia

En la Figura 3 se muestra el porcentaje de supervivencia de larvas filosomata alimentadas con las diferentes dietas con un tamaño de muestra de 15 filosomata por tratamiento. Se observa que con la Dieta Ω (nauplios de *Artemia* enriquecidos con emulsión de aceite Omegamex®), se obtuvo la mayor supervivencia (66.6%) hasta el día 39, con un promedio de diez días de duración del primer ciclo de muda de la filosoma (cambio de estadio I a estadio II) (Tabla 8). La duración del siguiente ciclo de muda (cambio del estadio II a III) ocurrió en el día 32, posteriormente, al día 39, se observó una nueva muda que condujo a un instar (estadio III+).

Las filosomata alimentadas con la Dieta $\Omega+\mu$ tuvieron una supervivencia del 40% al día 39. El cambio del estadio I al II ocurrió en el día 11.4 y el cambio del estadio II al III en el día 32 (Figura 3). Las larvas alimentadas con la Dieta μ , tuvieron una supervivencia del 6.6% al día 39, la primera muda (cambio del estadio I al II) se presentó al día 14, seguida del cambio del estadio II al III en el día 31. El tratamiento con la Dieta Control tuvo una mortalidad del 100% en el día 24 del experimento, por lo que solo se observó una muda el día 15, con un cambio de estadio de I a II (Tabla 8).

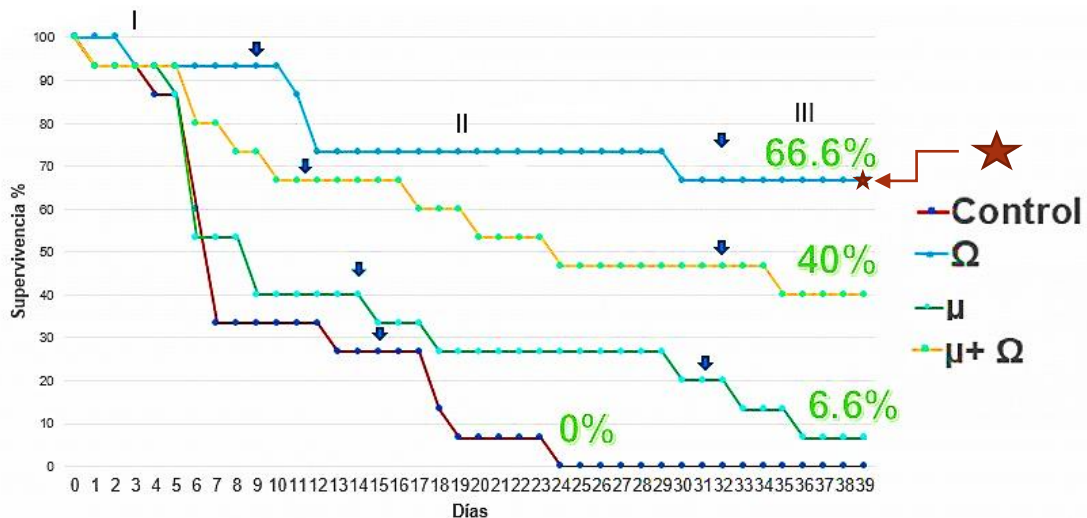


Figura 3. Supervivencia de larvas filosomata de *Panulirus interruptus* en sistema estático individual, alimentadas con 4 dietas: Dieta Control: nauplios de *Artemia* en ayuno, Dieta Ω : nauplios de *Artemia* enriquecida con emulsión de aceite Omegamex®, Dieta μ : nauplios de *Artemia* enriquecida con la mezcla (1:1) de las microalgas (*Isochrysis T-iso* y *Phaeodactylum tricorutum*); Dieta $\mu+\Omega$: nauplios de *Artemia* enriquecida con emulsión de aceite Omegamex® y mezcla de microalgas. Las flechas indican el cambio de estadio (ciclos de muda completados) y la estrella indica un instar. n=15 larvas por tratamiento.

Tabla 8. Duración del primer ciclo de muda de las larvas filosomata de *Panulirus interruptus* alimentadas con cuatro dietas. Dieta Control: nauplios de *Artemia* en ayuno, Dieta Ω : nauplios de *Artemia* enriquecida con emulsión de aceite Omegamex®, Dieta μ : nauplios de *Artemia* enriquecida con la mezcla (1:1) de las microalgas (*Isochrysis T-iso* y *Phaeodactylum tricornutum*), Dieta $\mu+\Omega$: nauplios de *Artemia* enriquecida con emulsión de aceite Omegamex® y mezcla de microalgas. Desviación estándar entre paréntesis. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre dietas.

Dietas	Primera muda (días)
Control	14.75 \pm 0.95 ^a
Ω	9.88 \pm 3.01 ^b
μ	14.20 \pm 0.44 ^a
$\Omega + \mu$	11.44 \pm 1.94 ^b

Se observaron diferencias altamente significativas entre las Dietas Ω y $\Omega + \mu$ con respecto a la Dieta μ y la Dieta Control ($P < 0.001$).

3.3 Crecimiento

La longitud cefalotorácica de las filosomata, expresada en tasas de crecimiento, se muestra en la tabla 9. Las tasas de crecimiento que se obtuvieron con las dietas Ω y $\mu+\Omega$, fueron similares, pero significativamente mayores ($P < 0.05$) que las observadas con las dietas Control y μ , que resultaron similares.

Tabla 9. Tasa de crecimiento ($\text{mm}\cdot\text{día}^{-1}$) de las larvas filosomata de *Panulirus interruptus* alimentadas con cuatro dietas. Dieta Control: nauplios de *Artemia* en ayuno, Dieta Ω : nauplios de *Artemia* enriquecida con emulsión de aceite Omegamex®, Dieta μ : nauplios de *Artemia* enriquecida con la mezcla (1:1) de las microalgas (*Isochrysis* T-iso y *Phaeodactylum tricornutum*), Dieta $\mu+\Omega$: nauplios de *Artemia* enriquecida con emulsión de aceite Omegamex® y mezcla de microalgas. Desviación estándar entre paréntesis. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre dietas.

Dietas	Tasa de crecimiento (mm día^{-1})
Control	0.014 ± 0.006^b
Ω	0.027 ± 0.011^a
μ	0.015 ± 0.007^b
$\Omega+\mu$	0.024 ± 0.006^{ab}

El índice de crecimiento (%) cuantificado a partir del incremento en la longitud cefalotorácica de larvas filosomata I a II varió del 21% al 30% (Tabla 10), con diferencias significativas entre dietas ($P < 0.05$), los mayores crecimientos se observaron con las Dietas $\mu+\Omega$ (29.99%) y μ (24.11%).

Tabla 10. Índice de crecimiento (%) de filosomata I a II de *Panulirus interruptus*, alimentadas con cuatro dietas. Dieta Control: nauplios de *Artemia* en ayuno, Dieta Ω : nauplios de *Artemia* enriquecida con emulsión de aceite Omegamex®, Dieta μ : nauplios de *Artemia* enriquecida con la mezcla (1:1) de las microalgas (*Isochrysis* T-iso y *Phaeodactylum tricornutum*), Dieta $\mu+\Omega$: nauplios de *Artemia* enriquecida con emulsión de aceite Omegamex® y mezcla de microalgas. Desviación estándar entre paréntesis. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre dietas.

Dietas	Índice de crecimiento (%)
Control	21.26 ± 8.25^b
Ω	24.11 ± 4.47^{ab}
μ	21.30 ± 9.79^b
$\Omega+\mu$	29.99 ± 0.72^a

3.4 Desarrollo morfológico

Las observaciones realizadas durante el desarrollo embrionario indicaron una progresión normal, en la que se pudieron reconocer estadios y estructuras características. Se observó el estadio de mórula, un indicativo de que los huevos habían sido fertilizados, posteriormente se observó el ojo naupliar. La etapa media del desarrollo embrionario se definió cuando se observaron los pedúnculos oculares. Previo a la eclosión se apreciaron los cromatóforos rojos y una cantidad pequeña de vitelo, esto indicó que la eclosión ocurriría en menos de 10 días (Figura 4).

Se observaron epibiontes (organismos sin identificar) sobre la fresa, pero puede ser que no hayan tenido un efecto negativo sobre los embriones, ya que visualmente se encontraban intactos. Para definir la fecha más probable en la que ocurriría la eclosión, se hicieron observaciones de los huevos de manera continua y se identificó su color y grado de desarrollo, utilizando la escala de coloración descrita por Buesa-Mas y Alves (1971).

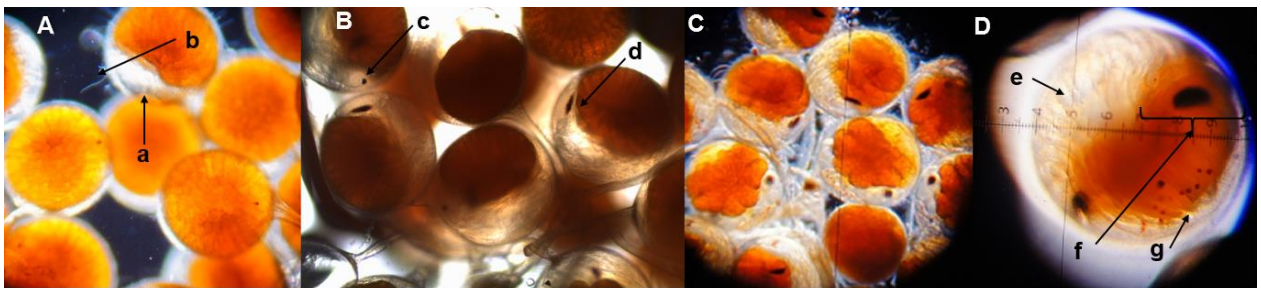


Figura 4. Desarrollo embrionario de la langosta roja *Panulirus interruptus*. Se observa: a) mórula, b) epibionte, c) ojo naupliar, d) pedúnculo ocular en desarrollo, C) huevos desarrollados, e) pereiópodos desarrollándose, f) pedúnculo ocular desarrollado y g) cromatóforos.

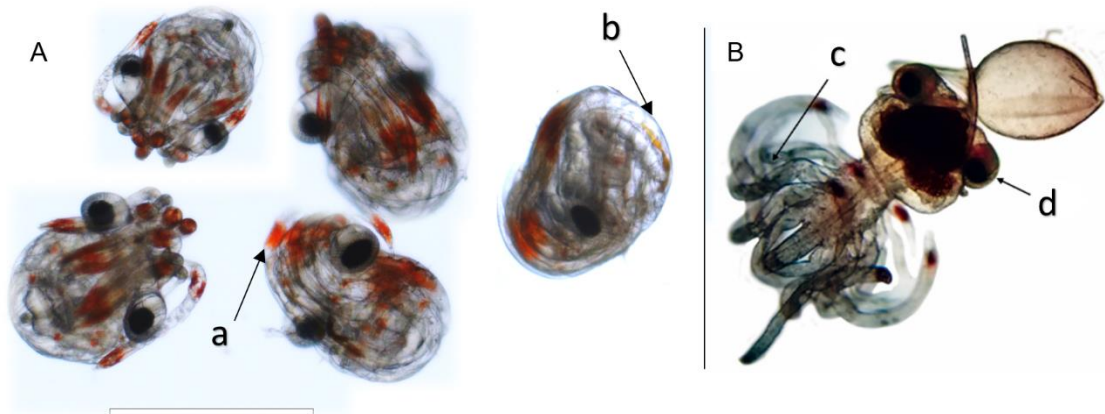


Figura 5. Preenaupliosomas (A) y naupliosoma (B). Se observa: a) cromatóforos, b) pereiópodos, c) pereiópodos ligeramente enroscados y d) pedúnculos oculares pegados al cefalón.

Durante la eclosión, se tomaron muestras de las larvas y se encontraron dos estadios que se analizaron e identificaron como prenaupliosoma y naupliosoma (Dupré y Guisado, 1996; Díaz-Iglesias y Báez-Hidalgo, 2007; Phillips, 2008) (Figura 5 A y B respectivamente), en la primera se aprecian los pedúnculos oculares y pereiópodos de la filosoma, pero la larva aún está dentro de una membrana, que al romperse permitió un desenvolvimiento parcial de las extremidades y se observó una forma semejante a un pequeño pulpo (naupliosoma), esta apariencia se debe a que los pedúnculos aún se encuentran junto al cefalón y los pereiópodos permanecen ligeramente curvados. Además se pudo observar el proceso de muda de una naupliosoma a filosoma I (Figura 6).



Figura 6. Naupliosoma de *Panulirus interruptus* mudando a estadio I. Se observa: a) exuvia y b) filosoma I.

En la Figura 7 se pueden observar las características propias de este estadio, tales como el pedúnculo ocular sin segmentación, con los extremos redondeados en las puntas, así como la presencia de los primordios de los exopoditos en el tercer par de pereiópodos que se desarrollarán en estadios posteriores.

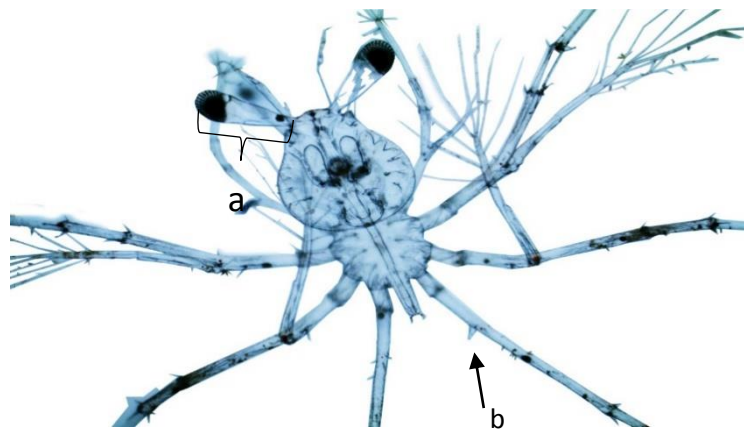


Figura 7. Filosoma I de *Panulirus interruptus* se observa: a) pedúnculos oculares redondos y sin segmentación, b) primordios de los exopoditos en el tercer par de pereiópodos.

Después de un ciclo de muda de 9 días, la primera filosoma I mudó y se pudieron observar las características del estadio II. La filosoma II (Figura 8) tiene como características particulares la segmentación del pedúnculo ocular y el aumento en el tamaño de los primordios del tercer par de pereiópodos. El ángulo formado entre los ejes longitudinales de cada uno de los dos pedúnculos oculares aumentó.

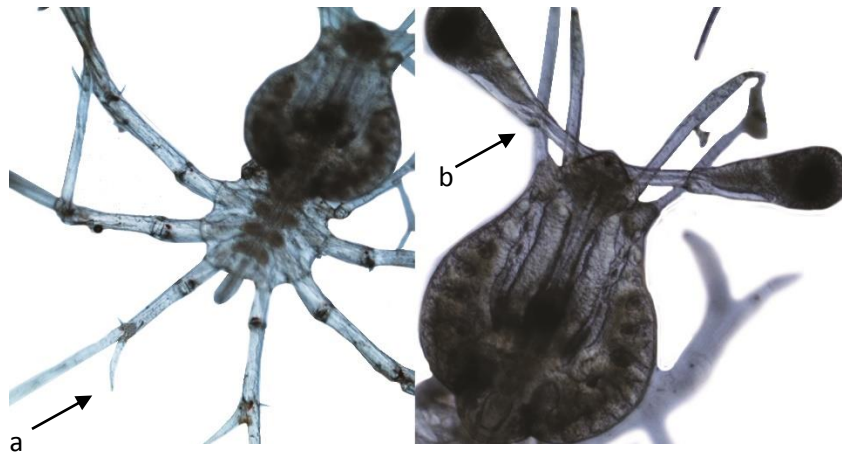


Figura 8. Filosoma II de *Panulirus interruptus*. Se observan: a) crecimiento de los primordios del tercer par de pereiópodos y, b) pedúnculos oculares segmentados con un ángulo más obtuso entre los pedúnculos oculares.

Entre los días 31 y 33, se registró una nueva muda, del estadio II al III. (Figura 9), en el cual, el cambio de las características morfológicas fue más evidente con la aparición del exopodito en el segundo segmento del tercer par de pereiópodos, además la forma de los pedúnculos oculares cambió a una forma más triangular en las puntas y el ángulo entre un pedúnculo y otro se aproximó a los 180 grados. El movimiento del exopodito nuevo, comienza a ser funcional, ayudando a mantener a la filosoma suspendida en la columna de agua.

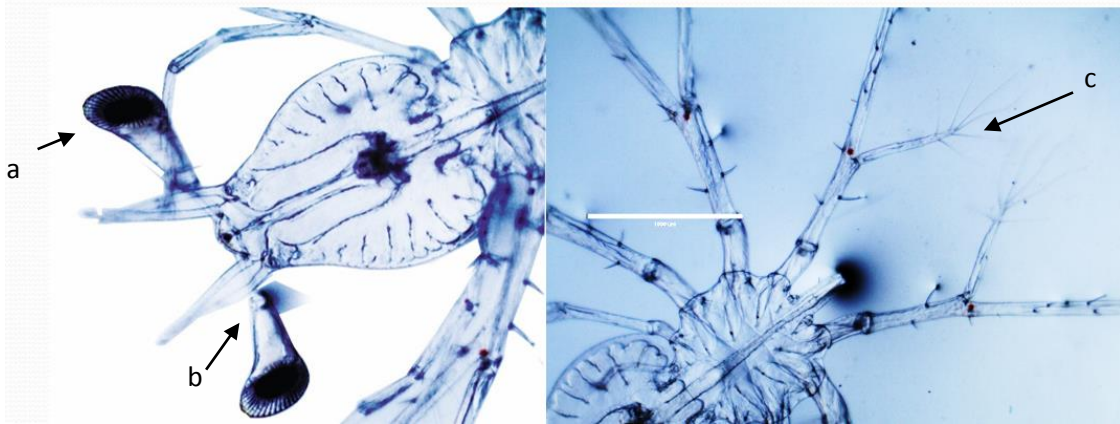


Figura 9. Filosoma III de *Panulirus interruptus*, se observa: a) forma alargada los pedúnculos oculares, con b) una segmentación y ángulo de 180 grados entre ellos. c) El exopodito en el segundo segmento del tercer par de pereiópodos está totalmente desarrollado.

Durante el desarrollo del experimento se pudo observar acumulación de epibiontes en el exoesqueleto de las filosomata.

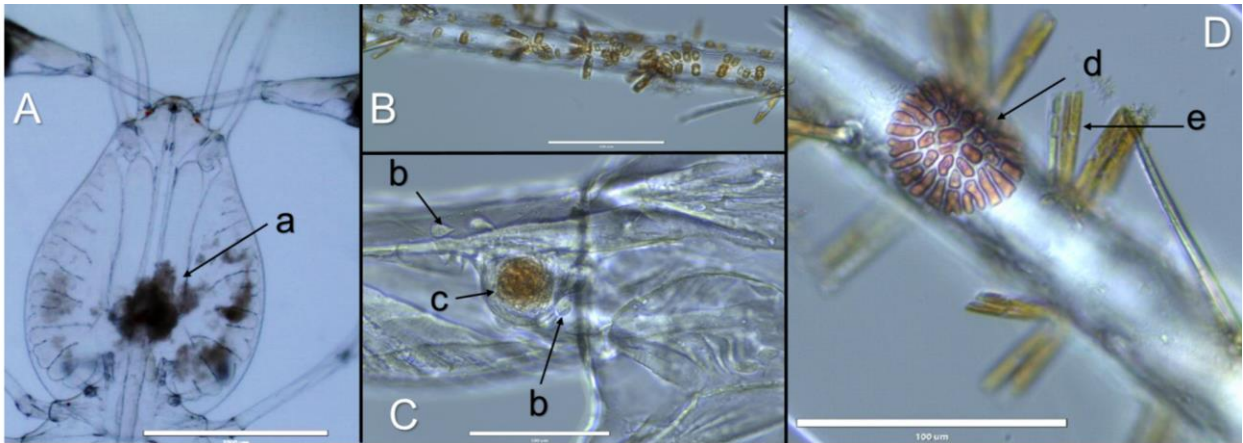


Figura 10. Parásitos observados durante el experimento. Se observa: A) filosoma III con ectoparásito filamentosos (a). B) pereiópodo con infestación de ectoparásitos. C) filosoma I con un quiste (c) causado probablemente por *Vibrio* sp. y rodeado de posibles fagocitos (b) o de una fase del estadio ameboideo del parásito *Hematodinium* sp. D) segmento de pereiópodos con *Epistylis* (e) y otra fase de desarrollo de *Hematodinium* sp. (d) (Phillips, 2008, Díaz-Iglesias y Báez-Hidalgo, 2007).

Capítulo 4. Discusión

Los estudios sobre el desarrollo larval de *P. interruptus* se han enfocado principalmente a la descripción de su morfología y distribución, con muestras colectadas del medio natural (Brown *et al.*, 1989) y son pocos los trabajos que se han dirigido al desarrollo de su cultivo larvario y en todos los casos con reducidas supervivencias. La principal causa de la baja supervivencia está asociada a problemas de calidad del agua de cultivo y a deficiencias nutricionales, que disminuyen la capacidad inmunológica de los organismos marinos (Kolakowska y Olley, 2002; Brusca y Brusca, 2003) y propician el desarrollo de enfermedades ocasionadas por diferentes agentes patógenos. Es por esta razón que aquellos estudios que se han enfocado en la langosticultura, además de buscar condiciones de cultivo adecuadas, se han centrado en la búsqueda de una dieta optima, es decir, aquella que de manera satisfactoria aporte los nutrientes requeridos, sin embargo, aún son necesarios más estudios que permitan definir los requerimientos de compuestos esenciales, principalmente los ácidos grasos, para las filosomata del género *Panulirus*.

Los estudios de los requerimientos alimenticios y nutricionales en los organismos marinos, han comenzado imitando o usando el alimento que las larvas normalmente consumen en el medio natural (zooplancton), el cual tiene un contenido de ácidos grasos altamente insaturados, que son esenciales para el desarrollo de cualquier organismo marino. Derivado de ello se han formulado dietas con diferentes fuentes de DHA, EPA y ARA, las cuales se han suministrado en diferentes fases del desarrollo ontogénico. Los resultados han revelado múltiples beneficios para su desarrollo, como aumento en la supervivencia, del crecimiento, estimulación del sistema inmune, un desarrollo adecuado del sistema nervioso y la reproducción, entre otros (Sargent *et al.*, 1997; Tocher, 2003; Tocher *et al.*, 2008).

Para la toma de decisiones sobre la dieta empleada en este experimento, se consideraron trabajos exitosos para el cultivo de larvas filosomata (Yamakawa y Nishimura, 1989; Kittaka, 1997; Kittaka *et al.*, 1997; Matsuda y Yamakawa, 2000; Sekine *et al.*, 2000; Matsuda y Takenouchi, 2006; Matsuda *et al.*, 2006; Goldstein *et al.*, 2008), en los que se lograron producir puerulos a partir de larvas eclosionadas en el

laboratorio. Es una práctica común el empleo de diferentes estadios de *Artemia*, enriquecidos con diversas fuentes de ácidos grasos altamente insaturados (ya que naturalmente son deficientes en estos lípidos), promoviendo de esta manera un efecto positivo sobre el crecimiento y supervivencia de diferentes especies en cultivo (Gapasin *et al.*, 1998).

Una de las fuentes más utilizadas para el enriquecimiento del alimento vivo que se destina a la alimentación de las larvas de organismos marinos, han sido las emulsiones de lípidos obtenidas a partir de extractos de semillas y aceites de pescados con alto contenido de ácidos grasos altamente insaturados. Alternativamente, se han utilizado microalgas marinas, principalmente *P. tricornutum*, *Chaetoceros muelleri* y *Nannochloropsis oculata*, como fuente de lípidos, en forma particular los AGMI y AGS que tienen una función importante en el metabolismo.

Para los estadios avanzados de desarrollo de las filosomata, la dieta se ha complementado con fuentes aún más ricas en ácidos grasos, como las gónadas de mejillón (Yamakawa y Nishimura, 1989; Kittaka, 1997; Kittaka *et al.*, 1997; Matsuda y Yamakawa, 2000; Sekine *et al.*, 2000; Matsuda y Takenouchi, 2006; Matsuda *et al.*, 2006; Goldstein *et al.*, 2008).

Al comparar los contenidos de AGS y AGMI en las dietas enriquecidas con microalgas durante 8 horas (32.4% y 29.0% respectivamente), con los obtenidos por Chakraborty *et al.* (2010), para los AGS con el empleo del enriquecedor comercial Selco A1, fueron un 14.4% inferiores a los obtenidos en este trabajo, sin embargo, al cabo de 24 h de enriquecimiento, este autor obtuvo hasta un 44.0% de AGS, además, el contenido de AGMI también se incrementó después de este periodo, (de 40.0% a 55.0%).

Lo anterior pudo deberse al catabolismo de los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) que son transformados en ácidos grasos saturados, ya que Bray y Lawrence (1992) y Chakraborty *et al.* (2007) mencionan que los AGS aumentan en crustáceos debido a la presencia limitada de sistemas enzimáticos que elonguen o desaturen ácidos grasos. Los altos porcentajes de AGMI obtenidos por los autores arriba mencionados pudieron ser el resultado del aporte de las microalgas, las cuales tienen un alto contenido de

AGMI, con valores de 20-40% (Brown *et al.*, 1989; Anzueto-Sánchez, 2008, 2014; Cázares-Salazar, 2014).

Además, en el análisis de las dietas, también es importante identificar qué proporción de los lípidos contenidos en éstas corresponde a los ácidos grasos poliinsaturados y específicamente a los altamente insaturados, ya que éstos son de vital importancia para llevar a cabo, de forma eficiente, funciones fisiológicas como el proceso de ecdisis, respuesta inmune y catabolización de enzimas, que afectan la supervivencia y el desarrollo de los crustáceos.

Los AGAI más abundantes se obtuvieron en la Dieta Ω , la cual superó en gran medida a las otras dietas durante todas las horas de enriquecimiento. La Dieta $\Omega+\mu$ también se enriqueció con el aceite Omegamex® (50.0%), no obstante, la cantidad de AGAI observada fue menor, lo que parece indicar que el aporte de estos ácidos grasos por medio del aceite fue mayor al que hicieron las microalgas; sin embargo, los diversos estudios donde se han cultivado las larvas de algunas especies del género *Panulirus* de manera exitosa (Yamakawa y Nishimura, 1989; Matsuda y Yamakawa 2000; Matsuda *et al.*, 2006; Goldstein *et al.*, 2008) han incluido en sus dietas solo la microalga *P. tricornutum*, por lo que puede ser que otros factores contribuyeron al éxito en estos estudios.

La cantidad de los AGAI encontrados en la Dieta Ω , se reflejó en las supervivencias de las filosomata obtenidas con esta dieta, donde se alcanzó hasta el 66% en el estadio III, sin embargo, estas supervivencias son inferiores a las observadas por otros autores, que también se utilizaron nauplios de *Artemia* enriquecidos con la microalga *P. tricornutum* y obtuvieron supervivencias del 90% al 100% en *P. longipes*, *P. japonicus*, *P. penicillatus* y *P. argus* (Matsuda y Yamakawa, 2000; Matsuda y Takenouchi, 2006; Matsuda *et al.*, 2006 y Goldstein *et al.*, 2008); estos autores emplearon condiciones de cultivo similares (estático individual) a las descritas en este estudio. Las diferencias en la supervivencia pudieron estar asociadas a otros factores, como las temperaturas más elevadas.

Las infecciones bacterianas que se presentaron en este trabajo, también pudieron tener un efecto colateral en la supervivencia, ya que pudieron aumentar el gasto de los ácidos grasos altamente insaturados, que son utilizados durante los procesos de la respuesta inmune (Glencross, 2009), por lo que probablemente las filosomata no tuvieron los recursos suficientes para finalizar exitosamente el ciclo de muda.

Otra causa de las bajas supervivencias pudo ser la acumulación de epibiontes en el exoesqueleto, observada durante el desarrollo del experimento. Álvarez-Tinajero *et al.* (2004), mencionan la presencia de epibiontes semejantes en las larvas filosomata de *P. interruptus* y las catalogaron como “similares a *Epistylis*”, además observaron la infestación con otros organismos como *Vibrio* sp. Estas bacterias patógenas tienen la capacidad de producir toxinas que ocasionan daño sistémico en los organismos (Shields *et al.*, 2006).

A partir del estadio filosoma III se presentaron altas mortalidades y, a pesar de los cuidados extremos en los cultivos de *Artemia* y de filosomata (agua filtrada a 1 μm , tratada con luz UV y con ozono), puede ser que la calidad del agua fuera inadecuada, ya que se observó turbiedad en las unidades de cultivo, una disminución en el oxígeno disuelto ($<5.0 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) y altas concentraciones de nitrógeno amoniacal total (NAT $> 0.4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$).

Estas condiciones ambientales fueron el resultado de la contaminación en los tanques de almacenamiento general que surte de agua al laboratorio central. La calidad del agua utilizada en este estudio, pudo haber originado una gran cantidad de materia orgánica, que al ser oxidada por el ozono pudo haber liberado productos tóxicos para las larvas tales como bromuros, sulfuros, etc. (Ritar *et al.*, 2006), además, el análisis del contenido bacteriano (medioTCBS), de una muestra de agua reveló incontables UFC con una dilución 10^4 .

Niebla-López y Pinto-Jiménez (com. per) realizaron estudios con larvas filosomata de *P. interruptus* y observaron eventos de mortalidad elevada, que también asociaron a infestaciones por bacterias filamentosas, que además de dificultar el nado de las larvas, las obligaban a limpiar sus pereiópodos de forma constante, reduciendo el tiempo que

dedicaban a la alimentación, con un costo energético que pudo reducir la energía disponible para el crecimiento y la supervivencia. Todo lo anterior se traduce en una menor cantidad de nutrientes disponibles para alcanzar un óptimo desarrollo (crecimiento y supervivencia).

En este experimento se observó una clara reducción en el tiempo que duró el ciclo de muda entre el estadio I y II con base en el tipo de dieta; las que contenían el aceite Omegamex® resultaron mejores, con 9.88 y 11.44 días (Dieta Ω y Dieta $\Omega+\mu$ respectivamente). Se ha estudiado el desarrollo de las larvas de *P. interruptus* alimentadas con una dieta de nauplios de *Artemia* enriquecidos con la microalga *Chaetoceros mulleri* e *Isochrysis* y observaron que la duración del ciclo de muda (I a II), fue de 8 y 15 días (López-Zenteno, 2004 y Galicia-Galicia, 2006 respectivamente). López-Zenteno (2004) obtuvo mejores resultados que los del presente trabajo. En *P. argus*, *P. longipes*, *P. penicillatus* y *P. homarus*, también se observaron ciclos de muda (I a II) más cortos (8 y 9 días) entre los estadios I y II (Radhakrishnan, 1995; Matsuda y Yamakawa, 2000; Matsuda *et al.*, 2006; Goldstein *et al.*, 2008).

Los autores mencionados anteriormente trabajaron con temperaturas mayores (24 y 27°C) que la de este estudio, lo que puede sugerir que además de la calidad nutricional de las dietas, la temperatura de los cultivos también causa variación en el crecimiento y supervivencia (Sargent *et al.*, 1997; Glencross, 2000; Tocher, 2003) de crustáceos.

Este efecto de la temperatura se ha confirmado en trabajos recientes con *P. interruptus*, donde han comparado los efectos de diferentes temperaturas en la supervivencia y el desarrollo de las larvas. Niebla-López (com. per.) estudió el efecto de dos temperaturas (18 y 24°C) y sus resultados preliminares indican que la temperatura de 24°C tiene efectos positivos en el desarrollo y Pinto-Jiménez (com. per.) evaluó el efecto de diferentes dietas a una temperatura de 19.3°C. El primer autor logró alcanzar el estadio VI+++, en la temperatura más elevada, mientras que en los cultivos de Pinto-Jiménez, se alcanzó el estadio III, resultado similar al obtenido a este trabajo, lo que parece indicar que *P. interruptus* se desarrolla mejor a temperaturas más elevadas.

La tasa de crecimiento y el índice de crecimiento de *P. interruptus* igualmente se ven influenciados por el tipo de dieta. Las dietas que contienen el aceite Omegamex® resultaron las mejores. En el primer caso se obtuvieron tasas de crecimiento específicas de $0.03 \text{ mm}\cdot\text{dia}^{-1}$, muy similares a las reportadas por López-Zenteno (2004), para larvas cultivadas a 25°C y superiores a las calculadas a partir de los resultados descritos por Galicia-Galicia (2006), de $0.02 \text{ mm}\cdot\text{dia}^{-1}$.

Para el índice de crecimiento de las larvas filosomata, se obtuvieron los mejores resultados con las Dietas $\Omega+\mu$ y Ω (30.0% y 24.0% respectivamente), y resultaron similares a los obtenidos por Galicia-Galicia (2006) (34.4%), pero fueron superiores a los reportados por López-Zenteno (2004), quien obtuvo 20.0%. Sin embargo, al calcular el índice de crecimiento diario obtenido en este trabajo, éste es ligeramente mayor al obtenido por los autores mencionados anteriormente.

Suministrar AGAI en la dieta, tiene un efecto positivo en el crecimiento (Tocher, 2003), por lo que la disponibilidad de ácidos grasos que se tenían en las dietas enriquecidas con el aceite Omegamex®, probablemente favorecieron el aumento en la tasa de crecimiento a pesar de la temperatura de cultivo relativamente baja (21°C).

Durante los tres estadios larvales detectados en este trabajo se observaron, durante los ciclos de muda, estructuras características del género *Panulirus* (Phillips, 2008), principalmente: espinas en la intersección entre el primer y segundo segmento de los pereiópodos, cromatóforos rojos y la ausencia de espinas ornamentales en el tercer segmento de los pereiópodos.

La aparición de otros apéndices en cada estadio, así como el número de mudas y el tiempo que se requieren para finalizar el ciclo fueron empleados por Johnson (1956) para la identificación de la especie *P. interruptus*, con organismos que fueron capturados del medio natural; este autor menciona que el estadio III se distingue por la aparición de los primordios en el tercer par de pereiópodos, sin embargo, en este trabajo se observó esta estructura después de que las filosomata I mudaron, por lo que se definieron como filosomata estadio II.

Anger (2001), menciona que en las larvas de algunas especies marinas se han descrito diferentes morfologías para un mismo estadio, lo que se ha asociado a factores nutricionales y medioambientales, esta característica se ha llamado plasticidad larval y es común entre larvas de crustáceos. Esto puede explicar las diferencias morfológicas observadas por Johnson (1956) y las de este estudio.

En este trabajo se hace la primera descripción morfológica de las larvas de *P. interruptus* cultivadas en laboratorio y es un referente para evaluar el efecto de diferentes factores, que pueden modificar los ciclos de muda y/o producir malformaciones. Con esta guía se pueden realizar ajustes en las dietas, temperatura o calidad del agua, entre otros.

En este estudio se pudieron observar los estadios larvales de prenaupliosoma y Naupliosoma, con morfologías similares a los que se han descrito anteriormente en otras especies de langostas (Sims, 1951; Dupré y Guisado, 1996). Johnson (1956) no considera estos estadios como parte del desarrollo larval de *P. interruptus*, sin embargo esto pudo ser debido a que la identificación de estos estadios resulta difícil con organismos obtenidos del medio natural, por lo efímero de cada uno de estos dos estadios iniciales del desarrollo. Esta identificación es posible en cultivos, ya que se tiene la oportunidad de revisar de manera constante el grado de desarrollo embrionario y hacer monitoreos durante la noche, ya que de forma natural las filosomata tienden a eclosionar durante este periodo del día (Phillips, 2008).

Capítulo 5. Conclusiones

Los ácidos grasos altamente insaturados se encontraron en mayor concentración en las dietas de *Artemia* enriquecidas con el aceite Omegamex® y enriquecida con $\Omega+\mu$.

La mayor cantidad de ácidos grasos esenciales se encontraron en la Dieta Ω con 12 horas de enriquecimiento.

La supervivencia de larvas filosomata de la langosta roja *P. interruptus* se incrementó significativamente por la cantidad de ácidos grasos suministrados en las Dietas Ω y $\Omega+\mu$, con 66% y 40%, respectivamente.

El primer ciclo de muda de las filosomata finalizó primero en aquellas dietas que contenían el aceite Omegamex® (Dietas Ω y $\Omega+\mu$).

El desarrollo morfológico observado fue el esperado por lo obtenido en otros estudios de especies cercanas en las que el ciclo de vida fue completado.

Lista de referencias bibliográficas

- 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. (2001). *The biology of decapod crustacean larvae*, 14, 420 p. Lisse: AA Balkema Publishers. 420 p.
- Anzuetto-Sánchez, M.A. (2008). Evaluación del cultivo continuo de tres especies microalgales. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, México. 59 p.
- Anzuetto-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 de Educación Superior de Ensenada, Baja California, México. 82 p.
- Báez-Hidalgo, M., Conceicao, R. N. L., Díaz-Iglesias, E. y Brito, P. R. (1996). Crecimiento y supervivencia de postlarvas de langosta *Panulirus argus* (Latreille, 1804) en condiciones experimentales. *Revista de Investigaciones Marinas.*, 17, 22-29.
- Bobes, R., Díaz, J. y Díaz-Iglesias, E. (1988). Aislamiento e identificación de *Aerococcus viridans* var. *homari* en la langosta *Panulirus argus* con síntomas de septicemia. *Revista de Investigaciones Marinas*, 9, 97-103.
- Booth, J.D. y Phillips, B.F. (1994). Early life history of spiny lobster. *Crustaceana*, 66(3), 271-294.
- Bray, W.A. y Lawrence, A.L. (1992). Reproduction of penaeus species in captivity. En: Arlo J. y James L. (Eds.) *Marine shrimp culture*. (pp. 93-170). Elsevier. doi:10.1016/B978-0-444-88606-4.50011-4
- Brown, M.R. (1989). Nutritional value and use of microalgae in aquaculture. CSIRO Mar. Res.
- Brusca, R.C. y Brusca, G.J. (2003). Invertebrates. (2a ed.). Sinauer Associates Inc. 884 p.
- Buesa-Mas, R. J. y Alves, M. M. (1971). Escala de colores para el estudio del ciclo reproductor de la langosta *Panulirus argus* (Latreille) en el área del mar Caribe. *FAO Fish. Rep*, 71(2), 9-12.

- Castell, J. D., Bell, J. G., Tocher, D. R. y Sargent, J. R. (1994). Effects of purified diets containing different combinations of arachidonic and docosahexaenoic acid on survival, growth and fatty acid composition of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*, 128(3-4), 315-333.
- Cázares-Salazar, A. (2014). Efecto de dietas mixtas de microalgas marinas en el cultivo y composición de ácidos grasos esenciales del copépodo *Pseudodiaptomus euryhalinus*. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, México. 46 p.
- 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(10), e393-e403. doi:10.1111/j.1365-2109.2009.02469.x
- Chakraborty, R. D., Chakraborty, K. y Radhakrishnan, E. V. (2007). Variation in fatty acid composition of *Artemia* salina nauplii enriched with microalgae and Baker's yeast for use in larviculture. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55 (10), 4043-4051.
- CONAPESCA, (2013). Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca, Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca.
- Dexter, D. (1972). Molting and growth in laboratory reared phyllosomes of California spiny lobster, *Panulirus interruptus*. *California Fish Game*, 58(2), 107.
- Díaz-Iglesias, E., Perez, R.B. y Báez-Hidalgo, M. (1991). Cria de postlarvas de langosta *Panulirus argus* en condiciones de laboratorio. *Revista de Investigaciones Marinas*, 12(1-3), 323-331.
- Díaz-Iglesias, E., Báez-Hidalgo, M. (2007). Relative viable fecundity in the red lobster, *Panulirus interruptus* (Randall. 1840), in Baja California, México, en: 8th International Conference and Workshop on Lobster Biology and management. Charlottetown, Prince Edward Island, Canada. 25 de septiembre.
- DOF (1992). Acuerdo por el que se establece veda para la pesca de las especies de langosta roja *Panulirus interruptus*, langosta azul *Panulirus inflatus* y langosta verde o pinta *Panulirus gracilis* en agua de jurisdicción federal del Océano Pacífico incluyendo el Golfo de California. *Diario Oficial de la Federación* 09/09/1992, México, D.F.
- Dupré, M. E. y Guisado, A. C. (1996). Identificación de los primeros estadios de phyllosoma de la langosta de Juan Fernández (*Jasus frontalis*) mantenidos en laboratorio. *Investigaciones Marinas*, 24, 39-50. doi:10.4067/S0717-71781996002400004.
- FAO, (2014). FAO Global Aquaculture Production Volume and Value Statistics Database Updated to 2012, FAO Fisheries and Aquaculture Department, March 2014.

- Fotedar, R.K. y Phillips, B.F. (Eds.). (2011). Recent Advances and New Species in Aquaculture. Wiley-Blackwell. 416 p.
- Galicia-Galicia, F. (2006). Consumo de oxígeno y excreción amoniacal 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 de Educación Superior de Ensenada, Baja California, México. 44 p.
- Gapasin, R., Bombeo, R. y Lavens, P. (1998). Enrichment of live food with essential fatty acids and vitamin C: effects on milkfish (*Chanos chanos*) larval performance. *Aquaculture*, 162(3), 269-286.
- Glencross, B.D. (2009). Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture species. *Reviews in Aquaculture*, 1(2), 71-124.
- 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(2), 306-327.
- Gracia, A. y Kensler, C. (1980). Las langostas de México: su biología y pesquería. An. Centro Cienc. del Mar y Limnol. Univ. Nal. Autón. México, 7, 111-128.
- Guillard, R. y Ryther, J. (1962). Studies of marine planktonic diatoms: *Cyclotella nana* hustedt, and *Detonula confervacea* (cleve) Gran. *Canadian Journal of Microbiology*, 8(2), 229-239.
- Han, K., Geurden, I. y Sorgeloos, P. (2000). Enrichment strategies for *Artemia* using emulsions providing different levels of n-3 highly unsaturated fatty acids. *Aquaculture*, 183(3), 335-347. doi:10.1016/S0044-8486(99)00295-1
- Hattori, T. y Oishi, Y. (1899). Hatching experiment on Ise lobster. Publ. impressed. *Report of the Imperial Fisheries Institute*, 1, 76-132.
- Johnson, M. W. (1956). The larval development of the California spiny lobster: *Panulirus interruptus* (Randall) with notes on *Panulirus gracilis* streets. The academy.
- Kailola, P. J., Williams, M. J., Stewart, P. C., Reichelt, R. E., McNee, A. y Grieve, C. (1993). Australian fisheries resources. Bureau of Resource Sciences, Department of Primary Industries and Energy. *Fisheries Research and Development Corporation, Canberra, Australia*. 422 p.
- Kittaka, J. (1997). Application of ecosystem culture method for complete development of phyllosomas of spiny lobster. *Aquaculture*, 155(1), 319-331.
- Kittaka, J. (2000). Culture of larval spiny lobsters, en: Spiny Lobsters: *Fisheries and Culture*. pp. 508-532.

- Kittaka, J., Ono, K. y Booth, J.D. (1997). Complete development of the green rock lobster, *Jasus verreauxi* from egg to juvenile. *Bulletin of Marine Science*, 61(1), 57-71.
- Kolakowska, A. y Olley, J. (2002). Fish Lipids. En: Sikorski Z. E. y Kolakowska A. (Eds.). Chemical and functional properties of food lipids. CRC Press, Florida, USA, pp. 221-264.
- Lewis, J. B., Moore, H. B. y Babis, W. (1952). The post-larval stages of the spiny lobster *Panulirus argus*. *Bulletin of Marine Science*, 2(1), 324-337.
- Léger, P., Naessens-Foucqaert, E. y Sorgeloos, P. (1987). Techniques to manipulate the fatty acid profile in *Artemia* nauplii and the effect on its nutritional effectiveness for the marine crustacean *Mysidopsis bahia* (M.). *Artemia research and its applications*, 3, 411-424.
- López-Zenteno, M. (2004). Comparación de dos sistemas de cultivo de la larva filosoma de la langosta roja *Panulirus interruptus*, a escala laboratorio. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, México. 77 p.
- Matsuda, H. y Takenouchi, T. (2005). New tank design for larval culture of Japanese spiny lobster, *Panulirus japonicus*. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 39(2), 279-285.
- Matsuda, H. y Takenouchi, T. (2006). Larval molting and growth of the Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus* under laboratory conditions. *Fisheries Science*, 72(4), 767-773.
- 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. doi:10.1651/S-2630.1
- Matsuda, H.I. y Yamakawa, T.A. (2000). The complete development and morphological changes of larval *Panulirus longipes* (Decapoda: Palinuridae) under laboratory conditions. *Fisheries Science*, 66(2), 278-293. doi: 10.1046/j.1444-2906.2000.00045.x
- McEvoy, L. A., Navarro, J. C., Bell, J.G. y Sargent, A. J. (1995). Autoxidation of oil emulsions during the *Artemia* enrichment process. *Aquaculture*, 134(1), 101-112. doi:10.1016/0044-8486(95)00048-7
- Nelson, M. M., Mooney, B. D., Nichols, P. D., Phleger, C. E., Smith, G. G., Hart, P. y Ritar, A. J. (2002). The effect of diet on the biochemical composition of juvenile *Artemia*: potential formulations for rock lobster aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society*, 33(2), 146-157.
- Noga, E. J. (Ed.). (1958). Fish disease: Diagnosis and treatment. (2nd Ed.). Wiley-Blackwell. 536 pp.

- Nonaka, M., Oshima, Y. y Hirano, R. (1958). Cultured and ecdysis of spiny lobster at phyllosoma stage. *Aquaculture*, 5(3), 13-15.
- Phillips, B. F. y Matsuda, H. (2011). A global review of spiny lobster aquaculture, en: Recent advances and new species in aquaculture. Wiley-Blackwell, pp. 22-84. doi:10.1002/9781444341775.ch2
- Phillips, B.F. (Ed.). (2008). Lobsters: Biology, Management, Aquaculture and Fisheries. John Wiley & Sons. 488 p.
- Phillips, B. F. y Kittaka, J. (Eds.). (2000). *Spiny lobsters: fisheries and culture* (p. 679). Oxford: Fishing News Books.
- Radhakrishnan, E. V. (1995). Early larval development of the spiny lobster *Panulirus homarus* (Linnaeus , 1758) reared in the laboratory. *Crustaceana*, 68(2), 151-159.
- 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. doi: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. doi:10.1016/j.aquaculture.2006.08.035
- Robles-Murillo, A.K. (2005). Balance energético de los juveniles de langosta roja *Panulirus interruptus* (Randal, 1840) alimentados con músculos. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Guadalajara. 58 p.
- Saracco-Álvarez, M. del R. (2007). Compuestos con actividad antibacterial producidos por las microalgas *Nannochloropsis oculata* y *Porphyridium cruentum*. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 54 p.
- Sargent, J., McEvoy, L., Estevez, A., Bell, G., Bell, M., Henderson, J. y Tocher, D. (1999). Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. *Aquaculture*, 179(1), 217-229.
- Sargent, J.R., McEvoy, L.A. y Bell, J.G. (1997). Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. *Aquaculture*, 155(1), 117-127. doi:10.1016/S0044-8486(97)00122-1
- Sato, N. y Murata, N. (1988). Membrane lipids. *Methods Enzymol.*, 167, 251-259.
- Sekine, S., Shima, Y., Fushimi, H. y Nonaka, M. (2000). Larval period and molting in the Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus* under laboratory conditions. *Fisheries science*, 66(1), 19-24.. doi:10.1046/j.1444-2906.2000.00002.x

- Shields, J. D., Stephens, F. J. y Jones, B. (2006). Pathogens, parasites and other symbionts. En: Phillips, B.F. (Ed.). (2008). *Lobsters: biology, management, aquaculture and fisheries*. (146-204). John Wiley & Sons.
- Sibeni, F. y Calderini, F. (2012). FishStatJ, a tool for fishery statistics analysis. *Food and Agriculture Organisation of the United Nations*.
- Sims, H.W. (1951). Notes on the occurrence of prenaupliosoma larvae of spiny lobsters in the plankton. *Bulletin of Marine Science*, 15(1), 223-227.
- Sorgeloos, P., Lavens, P., Lè, P., Tackarert, W. y Versichele, D. (1986). Manual para el cultivo y uso de *Artemia* en acuicultura. Documento de campo 10. Programa Cooperativo Gubernamental FAO-ITALIA., Universidad del Estado de Gent, Bélgica.
- Sokal, R. y Rolf, R. (1979). Biometría principios y métodos en la investigación biológica. Blume. Madrid. 832 p.
- Tocher, D.R. (2003). Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in Fisheries Science*, 11(2), 107-184.
- Tocher, D.R., Bendiksen, E.Å., Campbell, P.J. y Bell, J.G. (2008). The role of phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish. *Aquaculture*, 280(1), 21-34.
- Vega-Velázquez, A. (2003). Reproductive strategies of the spiny lobster *Panulirus interruptus* related to the marine environmental variability off Central Baja California, México: management implications. *Fisheries Research*, 65(1) 123-135.
- Yamakawa, T. y Nishimura, M. (1989). Complete larval rearing of the Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus*. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries (Japan)*.