

Tesis defendida por
Araceli Cazares Salazar
y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Beatriz Cordero Esquivel
Director de tesis

Dr. Benjamín Barón Sevilla
Director de tesis

Dra Mónica Hernández Rodríguez
Miembro del Comité

Dra. Bertha Eugenia Lavaniegos
Espejo
Miembro del Comité

Dra Bertha Olivia Arredondo Vega
Miembro del Comité

M. en C. Marco Antonio Anzueto
Sánchez
Miembro del Comité

Dra. Beatriz Cordero Esquivel
Coordinador
del Posgrado en Ciencias en
Acuicultura

Dr. Jesús Favela Vara
Director de
Estudios de Posgrado

Enero 2014

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DE ENSENADA



Programa de Posgrado en Ciencias
En Acuicultura

Efecto de dietas mixtas de microalgas marinas en el cultivo y composición de
ácidos grasos esenciales del copépodo *Pseudodiaptomus euryhalinus*

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de

Maestro en Ciencias
Presenta:

Araceli Cazares Salazar

Ensenada, Baja California, México

2014

Resumen de la tesis de Araceli Cazares Salazar, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura

Efecto de dietas mixtas de microalgas marinas en el cultivo y composición de ácidos grasos esenciales del copépodo *Pseudodiaptomus euryhalinus*

Resumen aprobado por:

Dra. Beatriz Cordero Esquivel

Director de Tesis

Dr. Benjamín Barón Sevilla

Director de Tesis

Uno de los problemas más comunes en el cultivo de peces marinos es la alimentación de las larvas, principalmente se utilizan como alimento vivo los rotíferos y nauplios de *Artemia* enriquecidos con microalgas o emulsiones de ácidos grasos, sin embargo, se ha demostrado que los copépodos tienen un mayor valor nutricional, por su contenido de ácidos grasos esenciales (DHA, EPA y ARA), mismos que se pueden incrementar con una dieta adecuada. En este trabajo se evaluó el efecto de tres dietas mixtas elaboradas con las microalgas marinas *Isochrysis galbana* (ISG), *Rhodomonas salina* (RHS) y *Chaetoceros muelleri* (CHM) en el crecimiento, la supervivencia, proporción de sexos, el tiempo de maduración y en la composición de ácidos grasos del copépodo *Pseudodiaptomus euryhalinus*. Las microalgas se mantuvieron en cultivo semicontinuo en condiciones controladas y cada cinco días se recolectaron muestras para analizar el perfil y la concentración de ácidos grasos. Para formular las dietas se consideró una mezcla 1:1 y una ración inicial de $5.47 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ PSO de cada microalga. Para evaluar el efecto de las dietas mixtas en *P. euryhalinus*, se sembraron nauplios recién eclosionados y se alimentaron con las tres dietas. Después de 11 días de cultivo se observaron los mejores resultados con la dieta ISG-CHM ($P \leq 0.05$), ya que se obtuvo una supervivencia del 90.3 %, un 48% de hembras ovígeras y una longitud del prosoma de 928 μm . La proporción de sexos fue de 1:1 sin diferencias significativas entre dietas ($P \geq 0.05$). La concentración del ácido graso DHA fue mayor en *I. galbana* con $6.40 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$, y *C. muelleri* tuvo una mayor concentración de ARA y EPA, con $2.08 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ y $6.16 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ respectivamente. De las tres dietas utilizadas en este trabajo la compuesta por ISG-CHM dio los mejores resultados en el cultivo de los copépodos, ya que se obtuvieron proporciones de DHA/EPA y EPA/ARA de 0.91 y 2.55, respectivamente. En los copépodos alimentados con las dietas ISG-CHM, ISG-RHS se obtuvieron proporciones de DHA/EPA de 1.3:1 y 2.5:1 y de EPA/ARA de 3.3:1 y 3.5:1. Estos organismos podrían ser utilizados como alimento para peces marinos, ya que cumplen aproximadamente con lo propuesto por Sargent *et al.* (1997), de una relación de DHA/ EPA de 2:1, considerada adecuada para un buen crecimiento y formación del tejido nervioso de las larvas de peces marinos.

Palabras clave: **Microalgas, dietas mixtas, copépodos, ácidos grasos esenciales.**

Abstract of the thesis presented by Araceli Cazares Salazar as a partial requirement to obtain the Master in Science degree in Aquaculture

Effect of mixed diets of marine microalgae the culture and essential fatty acid composition of the copepod *Pseudodiaptomus euryhalinus*

Abstract approved by:

Dra. Beatriz Cordero Esquivel

Director de Tesis

Dr. Benjamín Barón Sevilla

Director de Tesis

One of the most common problems found in the marine fish culture is the larvae feeding. The rotifers and *Artemia* nauplii are used principally as live food enriched with microalgae or fatty acids emulsions; nevertheless, it has been demonstrated that copepods have a higher nutritional value for their essential fatty acids (DHA, EPA and ARA) content, which could increase with a suitable diet. In this work, the effect of three mixed diets made with marine microalgae *Isochrysis galbana* (ISG), *Rhodomonas salina* (RHS) and *Chaetoceros muelleri* (CHM) was evaluated in the growth, survival, sex proportion, maturity time and fatty acid composition of the copepoda *Pseudodiaptomus euryhalinus*. The microalgae were maintained in semi-continuous culture under controlled conditions; five-day samples were collected to analyse the profile and concentration of the fatty acids. To formulate the diets a 1:1 mix and an initial ratio of $5.47 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ PSO from each microalgae were considered. To evaluate the effect of mixed diets in *P. euryhalinus*, newly hatched nauplii were sown and were fed with each of the three diets. After 11 days of culture the best results were observed with diet ISG-CHM ($P \leq 0.05$), obtaining a survival of 90.3 %, 48 % of ovigerous females and a length of the prosoma of 928 μm . The sex ratio was 1:1, without significant differences between diets ($P \geq 0.05$). The DHA fatty acid concentration was higher in *I. galbana* with $6.40 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$, and *C. muelleri* had a higher concentration of ARA and EPA, $2.08 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ and $6.16 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ respectively. Of the three diets used in this work, the one composed by ISG-CHM gave the best results in the copepod culture, with DHA/EPA and EPA/ARA proportions of 0.9 and 2.5, respectively. The copepods fed with the ISG-CHM, ISG-RHS diets presented DHA/EPA proportions of 1.3:1 and 2.5:1, and EPA/ARA proportions of 3.3:1 and 3.5:1. These organisms are suitable to be used as marine fish larvae feed, as they present the DHA/EPA 2:1 relation proposed by Sargent *et al.* (1997), considered as the right relation for well growth and nervous tissue formation of marine fish larvae.

Keywords: mixed diets, microalgae, copepod, essential fatty acid

Dedicatorias

A mis padres por dejarme partir en busca de mis sueños.
A mis hermanos por su apoyo incondicional en esta locura.
A mis sobrinos por inspirarme a ver al final del camino.
A ti Aguilón donde quiera que estés, esto sin duda es para ti.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada para realizar esta tesis, al Centro de Investigación Ciencia y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), en particular al Posgrado en Ciencias en Acuicultura.

A mi directora Dra. Beatriz Cordero por aceptarme en su laboratorio, por enseñarme sobre el cultivo de microalgas, por su apoyo y paciencia para la realización de este trabajo, por la confianza depositada en mí en todo momento y porque siempre estuvo pendiente de lo que hiciera falta en mi vida académica y personal. Gracias Bety, por hacer esto posible.

A mi director Dr. Benjamín Barón, por el apoyo recibido para la realización de este trabajo, por las enseñanzas durante todo este tiempo que van más allá de lo académico. Pero sobre todo por la confianza y las palabras de aliento en momentos difíciles. Muchas Gracias Doc por todas sus enseñanzas.

A Dra. Bertha Olivia Arredondo, por abrirme las puertas de su laboratorio y de su casa durante mis estancias en CIBNOR, por compartir sus conocimientos, por las sugerencias y comentarios para mejorar este trabajo Gracias Kitty.

A M. en C. Marco Anzueto, por enseñarme a cerca de los copépodos, por su ayuda en el diseño y realización de la parte experimental de este trabajo, pero sobre todo por su amistad y paciencia. Gracias Marco, sin tus regaños no lo hubiera logrado.

A mis sinodales, Dra. Mónica Hernández y Dra. Bertha Lavaniegos, por sus observaciones y sugerencias para mejorar este trabajo.

Al M. en C. Adrián Celaya (Lab. de Microalgas), y Jesús Mariscal (Lab. de Peces Marinos), por su apoyo en la instalación de los sistemas de cultivo.

A Dra. Marysabel Baez por su asesoría en los análisis estadísticos, por sus consejos académicos y personales.

A Enrique Zepeda Lupio, por maltratar y asesinar a mis copépodos y contaminar mis cultivos de microalgas en mi ausencia y en mi presencia. Gracias por soportar todo esto conmigo (sobre todo a mí), sin tu apoyo esto no hubiera sido posible.

Al CIBNOR por recibirme en sus instalaciones durante mis estancias para el análisis de ácidos grasos.

A mis padres que una vez más fueron ejemplo y fortaleza, por dejarme partir en busca de mis sueños. A mis hermanos Carelia y Ricardo, por ser mis cómplices y siempre estar ahí. A mis sobrinos Erick, Karla y Eder por inspirarme con su sonrisa.

A mis compañeros y amigos de generación: Miriam, Pablo, Rigoberto, Roberto, Jorge, Raquel, David, Paulito, Luisito y Omar, por los desvelos de estudio o fiestas, sin Ustedes esta aventura no hubiera sido igual. Gracias a todos.

A los Dinos: Dulce y Rogelio por compartir esta aventura en Ensenada, a pesar de todo y contra todo. Iniciamos como desconocidos y terminamos como.....

A los mejores compañeros de laboratorio: Vinc y Paty, por su amistad incondicional y desinteresada, por compartir tardes-noches-madrugadas de trabajo, charlas y más, pero sobre todo por todo su apoyo académico y personal. Gracias Betitos.

A los compañeros del posgrado, Diego, Edgar, Chava, Julio, Berna, Benito, Gabo, Meli, Brenda, Anaíd Jorge, Miguel, por cada momento de trabajo, risas, fiestas y más.....

A Yanet, Brizz, Jessy, Arge, Ena, Angie, Marlen, Alessandra, Andesina, Juan, Ariel por su amistad, Ensenada no hubiera sido lo mismo sin Ustedes.

A los amigos del CIB: Fredy, Omar, Amelia, Hamid, Aldo, Selena, por su valiosa ayuda en mis estancias en el CIB y por su apoyo a la distancia.

A mis amigos, Tere, Cass, Nancy, Norma M., Norma Z., Idania, Samuel, David, Manuel, Marco, Rodo, Rodrigo, Jorge y Ezequiel, que a pesar de la distancia siempre estuvieron conmigo.

Contenido

	Página
Resumen español	ii
Resumen inglés	iii
Dedicatorias	iv
Agradecimientos	v
Lista de Figuras	ix
Lista de Tablas	x
Capítulo 1. Introducción	1
Capítulo 2. Antecedentes	6
2.1 Microalgas	6
2.2 Copépodos	8
2.3 Alimentación en copépodos	9
2.4 <i>Pseudodiaptomus</i>	11
2.4.1 <i>Pseudodiaptomus eryhalinus</i>	11
Capítulo 3. Objetivos	13
Hipótesis	14
Capítulo 4. Material y métodos	15
4.1 Cultivo de microalgas	15
4.1.1. Origen de las cepas	15
4.1.2 Condiciones del cultivo de microalgas	15
4.1.3 Cultivo semicontinuo	15
4.1.4 Evaluación de las microalgas	16
4.1.4.1. Recuento al microscopio	16
4.1.4.2. Peso seco total (PST) y peso seco orgánico (PSO)	17

4.1.4.3. Formulación de las dietas mixtas	17
4.1.4.4 Análisis de ácidos grasos	18
4.1.4.5 Extracción y cuantificación de ácidos grasos	18
4.2 Cultivo de copépodos	19
4.2.1. Mantenimiento de la cepa	19
4.3 Diseño experimental	20
4.4 Evaluación del cultivo de <i>P. euryhalinus</i>	21
4.4.1. Crecimiento y supervivencia	21
4.4.2. Peso seco (total y orgánico) de <i>P. euryhalinus</i>	22
4.4.3. Composición de ácidos grasos de <i>P. euryhalinus</i> .	22
4.5. Análisis estadístico	22
Capítulo 5. Resultados	23
5.1 Cultivo de microalgas	23
5.1.1 Cultivo semicontinuo	24
5.1.2. Peso seco total (PST) y orgánico (PSO).	24
5.1.3 Perfil de ácidos grasos	25
5.2 Dietas mixtas	28
5.2.1 Peso seco total (PST) y peso seco orgánico (PSO)	28
5.2.2 Perfil de ácidos grasos de las dietas mixtas.	29
5.3. Cultivo de copépodos	29
5.3.1 Supervivencia	29
5.3.2. Crecimiento, maduración y proporción de sexos.	32
5.3.3. Peso seco total (PST) y peso seco orgánico (PSO)	33
5.3.4 Perfil de ácidos grasos	34
Capítulo 6. Discusión	37
Conclusiones	45
Referencias bibliográficas	46

Lista de figuras

Figura		Página
1	Longitud del prosoma en un ejemplar adulto de un copépodo calanoide.	21
2	Crecimiento (cél•mL ⁻¹) de las microalgas <i>Isochrysis galbana</i> (a) <i>Chaetoceros muelleri</i> (b) y <i>Rhodomonas salina</i> (c) cultivadas en forma semicontinua.	23
3	Supervivencia (%) de <i>Pseudodiaptomus euryhalinus</i> alimentado con tres diferentes dietas elaboradas a base de mezclas de microalgas marinas.	32

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Formulación de dietas mixtas de microalgas marinas, en peso seco orgánico (PSO) y su equivalente en número de células.	17
2	Biomasa en peso seco total, peso seco orgánico, (en $\text{pg}\cdot\text{cél}^{-1}$) y porcentaje de cenizas, de las microalgas marinas <i>Isochrysis galbana</i> , <i>Chaetoceros muelleri</i> y <i>Rhodomonas salina</i> , cultivadas en forma semicontinua.	24
3	Concentración de ácidos grasos ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de peso seco total), de las microalgas marinas <i>Isochrysis galbana</i> , <i>Chaetoceros muelleri</i> y <i>Rhodomonas salina</i> cultivadas en forma semicontinua.	26
4	Concentración de ácidos grasos en porcentaje, de las microalgas marinas <i>Isochrysis galbana</i> , <i>Chaetoceros muelleri</i> y <i>Rhodomonas salina</i> cultivadas en forma semicontinua.	27
5	Peso seco total (PST) y orgánico (PSO) (en $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y porcentaje de cenizas, de las mezclas de microalgas marinas <i>Isochrysis galbana</i> , <i>Chaetoceros muelleri</i> y <i>Rhodomonas salina</i> .	28
6	Concentración de ácidos grasos ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de peso seco total) de mezclas de microalgas marinas <i>Isochrysis galbana</i> : <i>Chaetoceros muelleri</i> , <i>Isochrysis galbana</i> : <i>Rhodomonas salina</i> , <i>Chaetoceros muelleri</i> : <i>Rhodomonas salina</i> .	30
7	Concentración de ácidos grasos porcentaje de mezclas de las microalgas marinas <i>Isochrysis galbana</i> : <i>Chaetoceros muelleri</i> , <i>Isochrysis galbana</i> : <i>Rhodomonas salina</i> y <i>Chaetoceros muelleri</i> : <i>Rhodomonas salina</i> .	31
8	Longitud del prosoma (μm) de <i>Pseudodiaptomus euryhalinus</i> al día 11 de cultivo, alimentado con tres dietas a base de mezclas de microalgas marinas.	32
9	Número promedio de organismos, proporción de sexos y porcentaje de hembras maduras de <i>Pseudodiaptomus euryhalinus</i> al día 11 de cultivo, alimentado con tres diferentes dietas a base de mezclas de microalgas marinas.	33
10	Peso seco total y orgánico (PST y PSO), $\mu\text{g}\cdot\text{org}^{-1}$ y porcentaje de cenizas, de <i>Pseudodiaptomus euryhalinus</i> alimentado con tres diferentes dietas a base de mezclas de microalgas marinas.	34
11	Concentración de ácidos grasos ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de peso seco total) de <i>Pseudodiaptomus euryhalinus</i> alimentado con tres dietas mixtas a base de microalgas marinas.	35
12	Concentración de ácidos grasos (porcentaje) de <i>Pseudodiaptomus euryhalinus</i> alimentado con tres dietas mixtas a base de microalgas marinas.	36

Capítulo 1

Introducción

El rápido crecimiento de la acuicultura ha estimulado el desarrollo de nuevas tecnologías orientadas a mejorar los procesos de producción y los rendimientos económicos de los cultivos. El mejoramiento genético, el control y la prevención de enfermedades y sobre todo, la alimentación y nutrición de los organismos que se cultivan, son algunos de los campos de investigación más activos en relación con los organismos marinos, entre los que se incluyen diversas especies de crustáceos, moluscos y peces (Kraul, 1989).

El cultivo de peces marinos a nivel experimental se remonta 50 años atrás y a nivel comercial a 30 años (Tucker, 1998; Lazo, 2000). Algunos países como Japón, Francia, Noruega y Canadá, han logrado avances notables en el cultivo de peces marinos, sin embargo, han enfrentado diversos retos, particularmente el del cultivo larvario, ya que este estadio de la ontogenia se caracteriza por la fragilidad de las larvas, y por su susceptibilidad a pequeños cambios en las condiciones de cultivo, tales como la salinidad, la temperatura, la concentración de oxígeno, el fotoperiodo y la intensidad de luz, así como al manejo rutinario. Todos estos factores pueden ser causa suficiente para ocasionar una mortalidad masiva en el cultivo larvario (Shepherd y Bromage, 1992; Stottrup, 2000) y tienen una relación directa con el estado nutricional de las larvas (Prieto *et al.*, 2006).

El crecimiento y la supervivencia de las larvas de peces depende en gran medida de la relación entre la eficiencia con que capturan el alimento y el valor nutritivo de la presa ingerida, por esta razón, es muy importante que el tamaño del alimento sea adecuado para el tamaño de la boca y que contenga todos los nutrientes que la larva requiere. En general, el tamaño de las presas comúnmente utilizadas para el cultivo de larvas de peces y crustáceos marinos de interés comercial está en el orden de 50 a 500 μm de longitud (Yufero y Pascual, 1984; Amat-Domenech, 1993).

Las larvas de peces marinos de importancia económica son en su mayoría zooplanctofagas y los copépodos son las principales presas que consumen en el medio natural. Los copépodos son un alimento altamente disponible ya que cerca del 70% de la producción secundaria del zooplancton en el océano se debe a estos organismos, Los copépodos son el grupo más diverso y abundante del zooplancton en cualquier ecosistema marino. Además por sus diversos hábitos alimenticios, asimilan, convierten y transfieren la energía producida por el fitoplancton hacia los niveles tróficos superiores (Hulsemann, 1996).

Uno de los principales problemas a los que se enfrenta el desarrollo de la acuicultura es el de la nutrición de los diferentes estadios de vida de las especies cultivadas, particularmente de los peces marinos de importancia económica. Con frecuencia, las dietas formuladas resultan insuficientes o inadecuadas para cubrir los requerimientos nutricionales durante la fase larvaria, ya sea porque las larvas tienen una actividad enzimática limitada, lo que a su vez restringe su capacidad digestiva o porque no son capaces de ingerir los alimentos formulados, lo que impide que las células del sistema digestivo reciban los estímulos necesarios para la secreción de las enzimas digestivas (Lazo 2000).

Por otro lado, ninguna dieta balanceada ha demostrado ser tan atractiva para las larvas como el alimento vivo, el cual está constituido principalmente por fitoplancton (microalgas) y zooplancton (copépodos, otros microcrustáceos, larvas y huevos de otros organismos marinos y rotíferos). Además, en términos generales, el alimento vivo es más fácil de digerir y asimilar que los alimentos peletizados (Delbare *et al.*, 1996; Kurokawa *et al.*, 1998; Kolkovski, 2001).

Entre los componentes de las dietas, hay varios compuestos que son esenciales (nutrimentos que no pueden ser sintetizados por el organismo y que deben ser adquiridos con el alimento), como las vitaminas, algunos aminoácidos y varios ácidos grasos insaturados de cadena larga (Kleppel, 1993; Lazo, 2000).

Los ácidos grasos más importantes para los estadios larvarios de peces son los poliinsaturados de cadena larga (Sargent *et al.*, 1997). En particular el ácido docosahexaenoico (DHA), estimula el crecimiento de la larva y se complementa con el ácido eicosapentaenoico (EPA). Además, la inclusión del ácido araquidónico (ARA) en la dieta facilita los procesos de pigmentación y es el precursor de eicosanoides (Bell *et al.*, 2003).

El periodo más crítico del desarrollo temprano de los peces es cuando las larvas terminan de absorber el saco vitelino e inician la alimentación exógena. En esta transición, el alimento vivo es esencial, ya que estimula el consumo y provee los nutrientes en cantidad y calidad, promoviendo un adecuado crecimiento y supervivencia (Halver, 1988).

Las microalgas son la base de la alimentación durante los primeros estadios de vida de muchos organismos de importancia acuícola y a pesar de los esfuerzos realizados durante las últimas décadas para reemplazarlas por dietas formuladas, la acuicultura depende aún de su producción y utilización (Abalde y Herrero 2004, Bastien, 2006). Por tal motivo, se han realizado numerosos estudios relacionados con el valor nutricional de diversas microalgas para la alimentación de larvas y juveniles de moluscos (Lavens y Sorgeloos, 1999, Cerón *et al.*, 2009) juveniles y reproductores de peces (Prieto *et al.*, 2006; Hemre, 2006) crustáceos como artemia (Sexias *et al.*, 2009), copépodos (Farhadian *et al.*, 2008, Anzueto, en prep.) y rotíferos (Ferreira *et al.*, 2008).

Las microalgas son la fuente primaria de ácidos grasos en los ecosistemas marinos y aunque su diversidad es muy grande, en el ámbito de la acuicultura se han utilizado un número relativamente reducido de especies, entre las que se encuentran: *Isochrysis galbana*, considerada una de las mejores fuentes de DHA, sin embargo tiene bajo contenido de EPA y no contiene ARA. Por el contrario, *Cheatoceros muelleri* es pobre en DHA, pero es rica en EPA y ARA, y *Rhodomonas salina*, la cual tiene niveles bajos de EPA y niveles altos de DHA y ARA (Renaud *et al.*, 2002; Pernet *et al.*, 2003; Tremblay *et al.*, 2007).

Los rotíferos y *Artemia* son los organismos más utilizados para la alimentación de la mayoría de las larvas de los peces marinos y para algunos crustáceos cultivados, debido a su facilidad de cultivo y alta supervivencia (Sorgeloos *et al.*, 2001). Sin embargo su calidad nutricional es inadecuada, por esta razón, ha surgido la necesidad de investigar nuevas alternativas alimenticias que aminoren la dependencia de estos organismos y que incrementen la calidad nutricional de larvas las de peces (Shields, 2001; Callan *et al.*, 2003).

La elección de las especies que conformarán el alimento vivo para las larvas de peces marinos debe considerar características tales como: el tamaño y el valor nutritivo (Payne y Rippingale, 2000; Payne *et al.*, 2001), deben ser pelágicas, con un comportamiento de natación que facilite su captura, tener un ciclo de vida relativamente corto, una elevada tasa de fecundidad, eclosión y supervivencia, un alto contenido energético y digestibilidad, ser resistentes a las prácticas de cultivo y a los cambios bruscos en el ambiente, deben tolerar altas densidades de cultivo y además, deben ser fáciles de alimentar (Sun y Fleeger, 1995; Stottrup y Norsker, 1997).

Los copépodos son una alternativa para la alimentación de larvas de peces y crustáceos marinos, ya que son su alimento natural y tienen un alto contenido de proteínas y lípidos, principalmente de ácidos grasos esenciales (HUFAs, por sus siglas en inglés) indispensables para el desarrollo de las larvas (Payne y Rippingale, 2000; Puello *et al.*, 2009).

Pseudodiaptomus euryhalinus es uno de los copépodos con potencial para su uso en la acuicultura, ya que, es una especie planctónica, con tamaño y forma del cuerpo variable a lo largo de su ciclo de vida, además de que se distribuye en toda la columna de agua, incrementando su disponibilidad para las larvas pelágicas. Puello *et al.* (2009), evaluaron el crecimiento y producción naupliar de *Pseudodiaptomus euryhalinus* alimentado con dietas monoalgales y mixtas de microalgas marinas, y obtuvieron los mejores resultados de crecimiento y producción naupliar en los organismos alimentados con la mezcla de *Chaetoceros muelleri-Isochrysis galbana*. Sin embargo, en *P. euryhalinus* aún se desconoce la composición bioquímica, específicamente el perfil de

ácidos grasos, por lo cual, en este trabajo se evaluó el efecto de tres mezclas de las microalgas marinas *Isochrysis galbana*, *Rhodomonas salina* y *Chaetoceros muelleri* como alimento para el copépodo *P. euryhalinus*.

Capítulo 2

Antecedentes

2.1 Microalgas

Las microalgas marinas están presentes en el medio natural en una gran diversidad de especies, son la base de la cadena trófica y constituyen el alimento principal de diferentes estadios de vida de los moluscos, crustáceos y peces, entre otros organismos (Abalde y Herrero 2004). En el ámbito de la acuicultura se han utilizado principalmente como alimento de organismos filtradores, especialmente durante todo el ciclo de vida de los moluscos bivalvos (Martínez *et al.*, 2000; Flores–Vergara *et al.*, 2004; Milke *et al.*, 2008 y Cerón-Ortíz *et al.*, 2009). También sirven de alimento para el cultivo de zooplancton, que a su vez se utiliza en la alimentación de larvas de peces, principalmente rotíferos, *Artemia* y algunas especies de copépodos (Treece y Allen 2000; Campa, 2002; Lora-Vilchis *et al.*, 2004; Puello-Cruz *et al.*, 2009 y Guevara *et al.*, 2011).

Algunas de las especies que se han utilizado para alimentar rotíferos y *Artemia* son *Isochrysis* sp, *Chaetoceros muelleri*, *Nannochloropsis* sp., *Synechococcus* sp., *Tetraselmis suecica*, *Dunaliella salina*, *Phaeodactylum tricornutum* y *Rhodomonas salina* (Campa, 2002, Lora-Vilchis *et al.*, 2004, Guevara *et al.*, 2011). Generalmente se utilizan dietas monoalgales, sin embargo, por su perfil bioquímico algunas especies son incapaces de satisfacer por completo los requerimientos nutricionales de los organismos que las consumen, debido a que carecen de compuestos esenciales como aminoácidos y ácidos grasos (Brown, 2002).

El valor nutricional de las microalgas reside en su composición bioquímica, por lo que es necesario conocerla y poder formular la combinación más adecuada de diferentes especies, de manera que se complementen las deficiencias de cada una y sea posible satisfacer los requerimientos nutricionales de los organismos que las consumen (Abalde y Herrero 2004).

Diversos estudios han demostrado que entre las especies de microalgas con mejores propiedades nutricionales, ya sea que se utilicen en forma monoalgal o en dietas mixtas, se encuentran *Chaetoceros muelleri*, *Chaetoceros calcitrans*, *Pavlova lutheri*, *Isochrysis aff galbana* (T.ISO), *Tetraselmis suecica* y *Thalassiosira pseudonana* (Enright *et al.*, 1986; Thompson *et al.*, 1993; Brown *et al.*, 1997). La composición bioquímica de las microalgas está influenciada por diferentes factores, como la intensidad y calidad de la luz (Thompson *et al.*, 1996), la temperatura (Webb y Chu, 1983) el pH (Roncarati *et al.*, 2004), los medios de cultivo (Valenzuela-Espinoza, 1997) y la fase de crecimiento en la que se cosechan (Trujillo-Valle y Voltolina, 1994).

Entre los estudios de la composición bioquímica de las microalgas, se ha hecho énfasis en la composición de ácidos grasos, principalmente de los altamente insaturados (HUFAs, por sus siglas en inglés). La importancia de los HUFAs en el desarrollo de los organismos es fundamental como componentes de las membranas biológicas, ya que forman parte de la estructura de los fosfolípidos que las constituyen y determinan su permeabilidad (Thompson *et al.*, 1996). Algunos derivados de los ácidos grasos actúan como hormonas o mensajeros (Lenhinger, 1995).

Los ácidos eicosapentaenóico (20:5 ω 3, EPA) y docosahexaenóico (22:6 ω 3, DHA), tienen una función muy importante en la formación de nuevos tejidos, particularmente en el tejido nervioso, la retina, y en procesos como la pigmentación de especies marinas (Lazo, 2000). Otro de los ácidos grasos importantes es el ácido araquidónico (20:4 ω 6, ARA), precursor de un grupo de prostaglandinas y leucotrienos, sustancias hormonales de actividad paracrina importante en la respuesta fisiológica al estrés y en los procesos de coagulación (Castell *et al.*, 1994; Sargent *et al.*, 1997). Las larvas de peces e invertebrados marinos, tienen una capacidad limitada para convertir el ácido linoleico (18:3 ω 3) en EPA y posteriormente en DHA. Esto se debe a que carecen o tienen una actividad limitada de la enzima delta-5-desaturasa, responsable de alargar y desaturar (Sargent *et al.*, 1997). La incapacidad de algunos organismos de sintetizar los ácidos grasos como el EPA y DHA a partir del ácido linolénico (18:3 ω 3), hace indispensable el incorporarlos en las dietas diseñadas para la alimentación larval (Lazo, 2000).

2.2. Copépodos.

Los copépodos se han utilizado en la acuicultura desde los años 1970s, cuando se demostró que las malformaciones y altas mortalidades larvales de peces cultivados, como *Pagrus major*, *Acanthopagrus schelegelii*, *Limanda yokohame* y *Oplegnatus fasciatus*, se debía a una mala calidad nutricional del alimento vivo (Fukusho *et al.*, 1980; Fukuhara, 1987). Este efecto se atribuía a que, a diferencia de los copépodos, tanto los rotíferos como los nauplios de *Artemia*, carecían de algunos ácidos grasos altamente insaturados considerados esenciales para estas larvas (Watanabe *et al.*, 1983; Watanabe y Kiron, 1994).

La práctica más común para la alimentación de larvas, principalmente de peces y crustáceos, es la utilización de rotíferos y nauplios de *Artemia* (Léger *et al.*, 1986), enriquecidos con diferentes complementos para mejorar su calidad nutricional (Mohanakumaran *et al.*, 2007). No obstante, a pesar del enriquecimiento de estos organismos, los mejores resultados se han obtenido utilizando copépodos ya que naturalmente contienen un perfil nutricional que satisface los requerimientos de las larvas de especies marinas. Sin embargo, tienen el inconveniente de ser difíciles de producir en el laboratorio y la producción a gran escala no está totalmente resuelta (Lazo, 2000).

Diversos estudios han demostrado que la inclusión de copépodos como alimento vivo de los peces marinos asegura un buen desarrollo de las larvas, mejoran el crecimiento (Stottrup y Norsker, 1997) y la supervivencia (Shields *et al.*, 1999). Además de reducir algunas malformaciones o pigmentaciones anormales (Stottrup, y Norsker, 1997; Stottrup, 2000), mejoran el desarrollo del sistema digestivo (Shields *et al.*, 1999) y sirven como fuente exógena de enzimas (Spenelli, 1979; Stottrup, 2000).

Estas bondades de los copépodos, son resultado de su digestibilidad, de su contenido de lípidos, aminoácidos, ácidos grasos esenciales (Driellet *et al.*, 2011; Evjemo *et al.*, 2003; Schipp, 2006) y de antioxidantes tales como astaxatina y vitaminas (McKinnon, *et al.*, 2003, Van-Nieuwerburgh, 2004;). Además, los copépodos tienen un tamaño

pequeño, adecuado para sus consumidores. Algunas especies de copépodos son lo suficientemente pequeñas para ser consumidas por larvas que requieren un tamaño de partícula equivalente a 0.4 a 0.6 veces el ancho de su boca (Knights, 1983; Dabrowski y Bardega, 1984). Además tienen un movimiento natatorio que estimula la conducta predatoria de las larvas de peces (Stottrup, 2000, McKinnon, *et al.*, 2003;).

Los copépodos son un grupo muy diverso de crustáceos, que habitan diversos ambientes, tanto marinos como dulceacuícolas. Algunas especies son parásitas y otras de vida libre, estas últimas forman parte del bentos y del plancton. Se pueden identificar tres grupos de copépodos de vida libre importantes para la acuicultura: Calanoides y Ciclopoides, que son principalmente planctónicos y los Harpacticoides, que son casi exclusivamente bentónicos.

El orden Calanoida es el más abundante del zooplancton marino y la mayoría de las especies son de vida libre. Su cuerpo está dividido en: cabeza, tórax y abdomen; sin embargo, la cabeza está fusionada con el tórax en un cefalotórax o prosoma. Se caracterizan por tener el punto de inflexión y división entre el tórax y el abdomen, por detrás del último segmento torácico; son reconocidos también porque el primer par de antenas es largo y consta de 16 a 28 segmentos (Marshall y Orr, 1972; Campos-Hernández y Suarez-Morales, 1994).

En la actualidad se dispone de métodos de cultivo probados para un número muy reducido de especies, entre los que destacan: los calanoides *Acartia tonsa*, *Eurytemora affinis*, *Calanus firmarchicus*, *Calanus helgolandicus* y *Gladioferens imparipes* (Lavens y Sorgeloos, 1999, Payne y Rippingale 2000); y los harpacticoides *Tisbe holoturidae*, *Tigriopus japonicus*, *Tisbenta elongata* y *Shizopera elatensis* (Lavens y Sorgeloos, 1999).

2.3 Alimentación de los copépodos

Se han realizado numerosos estudios relacionados con la alimentación de diversas especies de copépodos. Rosas *et al.* (1998) observaron un mayor crecimiento del

ciclopide *Oithona ovalis* cuando fue alimentado con las microalgas *Dunalliella salina* y *Tretaselmis chuii*, así como la producción de un mayor número de hembras maduras en menor tiempo y una alta producción de nauplios. En contraste, en los organismos alimentados con *Nannochloropsis* y *Chorella* sp., se observó un menor crecimiento, mayor tiempo de maduración y baja producción de nauplios. Posteriormente, Rosas *et al.*, (2007), analizaron el perfil de ácidos grasos de *O. ovalis* y observaron una composición bioquímica variable con respecto a la dieta. En los copépodos alimentados con *Isochrysis* sp., se encontraron niveles superiores de EPA, a diferencia de los alimentados con *Chlorella* sp., en donde encontraron que había altos niveles de DHA.

Payne y Rippingale (2000), en su trabajo con el calanoide *Gladioferens imparies* observaron mayor supervivencia con las dietas unialgales de *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros muelleri*, en contraste, con *Nannochloropsis oculata* y levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) las supervivencias fueron menores. Por otro lado, McKinnon *et al.* (2003) cultivaron los copépodos *Acartia sinjiensis*, *Bestiona similis* y *Parvocalanus crassiostris* y demostraron que cuando los organismos fueron alimentados con *Rhodomonas* sp., presentaron una mayor producción de huevos, a diferencia de los alimentados con *Dunalliella* sp. Knuckey *et al.* (2005) confirmaron que la mejor dieta para el cultivo de *A. sinjiensis*, fue *Rhodomonas* sp., a diferencia de las dietas monoalgales de *Isochrysis* sp., *Pavlova* sp. y *Tretaselmis* sp.

Ohs *et al.* (2010), encontraron altas supervivencias en el copépodo *Pseudodiaptomus pelagicus* alimentado con dietas monoalgales de *Rhodomonas lens* o *Chaetoceros gracilis*. A diferencia de *Isochrysis galbana*, a pesar de que produce una menor supervivencia el tiempo de maduración fue menor, pero el mayor porcentaje de hembras ovígeras se obtuvo con la dieta de *Rhodomonas lens* y *Tretaselmis suecica*.

En *Pseudodiaptomus euryhalinus* se han evaluado principalmente diferentes dietas monoalgales, como *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros muelleri*, *Tretaselmis suecica* y *Nannochloropsis oculata*, obteniendo mejores resultados de supervivencia con *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros muelleri* (Puello–Cruz *et al.*, 2009).

2.4. *Pseudodiaptomus*

Existen cerca de 77 especies del género *Pseudodiaptomus*, se distribuyen en aguas costeras tropicales y templadas. Las especies que se conocen en el Pacífico oriental se distribuyen desde California EUA, hasta Guayaquil, Ecuador. En general, se consideran tolerantes a amplios intervalos de salinidad y temperatura y son de hábitos epibentónicos (Johnson, 1948).

Jacobs (1961) cultivó *P. coronatus* a una temperatura de 20°C durante cuatro generaciones y describió sus características biológicas y aspectos ecológicos. Encontró un mayor número de machos en la población, así como un marcado dimorfismo sexual en el estadio adulto. Observó que durante la cópula el macho permanece sujeto a la hembra a través del quinto par de apéndices torácicos. Además, observó un cambio de hábito para los diferentes estadios de vida, con nauplios pelágicos, a diferencia de los copepoditos y adultos, que son epibentónicos, por lo que se desplazan al fondo o a las paredes de las unidades experimentales.

2.4.1 *Pseudodiaptomus euryhalinus*

Pseudodiaptomus euryhalinus fue descrito por Johnson (1939) y clasificado taxonómicamente como:

Subfilum: Crustacea

Clase: Maxillopoda

Subclase Copepoda

Orden: Calanoida

Género: *Pseudodiaptomus*

Especie: *Pseudodiaptomus euryhalinus*

Johnson (1948), menciona que esta especie tiene cinco estadios naupliares de vida libre después de la eclosión, seguidos por 6 estadios copepodito, diferenciándose sexualmente en el estadio copepodito VI. La hembra tiene forma redondeada, con 4 segmentos abdominales y puede portar hasta dos sacos de huevos. La longitud de la

hembra incluyendo las ramas caudales es de 1.24 a 1.69 mm. El macho tiene forma oval y presenta cinco segmentos abdominales, con la anténula derecha geniculada con dos segmentos terminales. Su longitud, incluyendo la rama caudal es de 0.72 a 0.89 mm (Johnson 1939, 1948) Su distribución geográfica va desde la Bahía de San Francisco California USA, hasta la península de Baja California y el Golfo de California (Walter, 1989). Esta especie tolera amplios intervalos de temperatura y salinidad (Johnson, 1939, 1948).

La especie *P. euryhalinus*, que se abordó en este trabajo, fue aislada en la Bahía de Todos Santos, Ensenada, Baja California, México, por Anzueto-Sánchez en 2010, quien evaluó su cultivo con dietas monoalgales, sin embargo, aún es necesario realizar estudios para optimizar su cultivo, en donde se aborden temas sobre su alimentación con dietas mixtas, así como sobre sistemas de cultivo a nivel masivo, entre otros.

Capítulo 3

Objetivos

General

Evaluar el efecto de tres mezclas de las microalgas marinas *Isochrysis galbana* (ISG), *Rhodomonas salina* (RHS) y *Chaetoceros muelleri* (CHM), sobre algunos parámetros poblacionales y en la composición de ácidos grasos del copépodo *Pseudodiaptomus euryhalinus*.

Específicos

- Evaluar el crecimiento, la supervivencia, la proporción de sexos y el tiempo de maduración en el copépodo *P. euryhalinus* alimentado con tres mezclas de microalgas marinas: ISG:CHM, ISG:RHS, CHM:RHS
- Evaluar la composición de ácidos grasos de las microalgas en forma individual y sus mezclas.
- Evaluar la composición y contenido de ácidos grasos esenciales (DHA, EPA, ARA) de *P. euryhalinus* alimentado con las tres mezclas de microalgas marinas.

Hipótesis:

Las dietas mixtas compuestas por las microalgas marinas *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros muelleri*, *Rodhomonas salina* con adecuada concentración de ácidos grasos altamente insaturados, complementarán la proporción DHA:EPA:ARA en el copépodo *P. euryhalinus*, incrementarán el crecimiento y la supervivencia y disminuirán el tiempo de desarrollo y la edad de maduración.

El contenido de ácidos grasos esenciales (DHA, EPA y ARA) en las diferentes dietas mixtas se verá reflejado en el contenido de ácidos grasos esenciales del copépodo *P. euryhalinus*.

Capítulo 4

Material y métodos

4.1 Cultivo de microalgas

4.1.1 Origen de las cepas

Las cepas de las microalgas *Isochrysis galbana* (Parke), *Chaetoceros muelleri* (Lemmermann) y *Rhodomonas salina* (Wislouch) utilizadas en este trabajo, se obtuvieron del Centro Pravasoli Guillard (NCMA) National Center for marine Algae and microbiota.

4.1.2 Condiciones de cultivo de las microalgas

Los cultivos se iniciaron a partir de inóculos de 10 mL, haciendo escalamientos sucesivos a 100, 500 1000 y 2500 mL. Para las tres microalgas se utilizó el medio de cultivo "f" (Guillard y Ryther, 1962), con silicatos para el caso de la diatomea *Chaetoceros muelleri*. Los cultivos se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura ($20\pm 1^\circ\text{C}$), salinidad (35 UPS) y pH (7.5-8), el cual se controló con inyección directa de CO_2 . La iluminación fue continua, proporcionada por lámparas fluorescentes de luz blanca-fría.

El agua de mar que se utilizó en los cultivos de microalgas se filtró a través de una serie de cartuchos (de 10, 5 y 1 μm), se irradió con luz ultravioleta y posteriormente se esterilizó en autoclave a 110°C y 482.6 kPa (70 PSI).

4.1.3 Cultivo semicontinuo

El cultivo de microalgas en volúmenes de 2500 mL, se inició a partir de una densidad de 1×10^6 cél $\cdot\text{mL}^{-1}$ para *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros muelleri*. En el caso de *Rhodomonas salina*, la densidad inicial fue de 0.5×10^6 cél $\cdot\text{mL}^{-1}$. Los cultivos de cada especie se realizaron por triplicado.

Los cultivos de 2500 mL se mantuvieron sin cosecha hasta que alcanzaron la fase de máximo crecimiento exponencial, entonces se inició la etapa de cultivo semicontinuo, aplicando diluciones diarias del 20% para *Isochrysis galbana* (ISG) y *Chaetoceros muelleri* (CHM) y del 10% para *Rhodomonas salina* (RHS), estas diluciones fueron determinadas en base a trabajos previos realizados en el Laboratorio de Microalgas por Flores-Vergara (2006), Ortega-Acosta (2011) y Anzueto-Sánchez (en prep.). El monitoreo de la densidad celular se realizó antes y después de cada dilución. El medio utilizado para la renovación del cultivo en cada dilución fue el medio “f” (Guillard y Ryther, 1962).

4.1.4 Evaluación de las microalgas

4.1.4.1 Recuento celular al microscopio

Diariamente se tomó un volumen conocido de cada unidad experimental y se fijó con una gota de lugol, el recuento celular se realizó con un hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad, con la ayuda de un microscopio compuesto.

Para calcular la densidad celular, se utilizó la siguiente ecuación (1):

$$N = C * 10^4 \quad (1)$$

Dónde:

$N = \text{cél} \cdot \text{mL}^{-1}$

$C =$ promedio de las células contadas en los cuadrantes

$10^4 =$ Factor de conversión para convertir a $\text{cél} \cdot \text{mL}^{-1}$ considerando el volumen de la cámara.

4.1.4.2 Peso seco total y peso seco orgánico

Para evaluar los cultivos semicontinuos de microalgas, se tomaron tres muestras consecutivas de 20 mL, una cada cinco días (por triplicado), se filtraron a través de filtros Whatman GF/C de fibra de vidrio, de 47 mm de diámetro y 1.2 μm de retención. Los filtros fueron previamente lavados, incinerados en una mufla a 490°C y pesados. Durante el filtrado las muestras se lavaron con formiato de amonio al 3% para eliminar las sales. Los filtros con microalgas se colocaron en una estufa a 70°C por 24 h para obtener el peso seco total (PST), posteriormente se incineraron en la mufla a 490°C por 24 h, para cuantificar el peso de las cenizas, finalmente por diferencia entre el PST y el de las cenizas, se obtuvo el peso seco orgánico (PSO) (Sorokin, 1973).

4.1.4.3 Formulación de las dietas mixtas

Para la formulación de las mezclas de microalgas marinas, se consideraron los resultados de ingestión de *Isochrysis* sp. obtenidos en un estudio previo de Anzueto-Sánchez (en prep). Se consideró la equivalencia del peso seco orgánico de cada una de las especies de microalgas utilizadas con respecto al número de células (Tabla 1). Considerando como raciones inicial y final, una biomasa de 5.47 y 10.94 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, PSO, con una proporción de peso 1:1 entre las dieta.

Tabla 1. Formulación de dietas mixtas de microalgas marinas, en peso seco orgánico (PSO) y su equivalente en número de células.

Día de cultivo	Biomasa monoalgal μg PSO	Biomasa mezcla μg PSO	ISG-CHM (cél·mL ⁻¹ x10 ⁴)		ISG-RHS (cél·mL ⁻¹ x10 ⁴)		CHM-RHS (cél·mL ⁻¹ x10 ⁴)	
1	2.7	5.4	19.0	6.6	19.0	2.5	6.6	2.5
2	3.1	6.2	21.7	7.6	21.7	2.9	7.6	2.9
3	3.5	7.0	24.4	8.6	24.4	3.3	8.6	3.3
4	3.9	7.8	27.1	9.5	27.1	3.6	9.5	3.6
5	4.3	8.6	29.8	10.5	29.8	4.0	10.5	4.0
6	4.6	9.3	32.5	11.4	32.5	4.4	11.4	4.4
7	5.0	10.1	35.2	12.4	35.2	4.7	12.4	4.7
8	5.4	10.9	38.0	13.3	38.0	5.1	13.3	5.1
9	5.4	10.9	38.0	13.3	38.0	5.1	13.3	5.1
10	5.4	10.9	38.0	13.3	38.0	5.1	13.3	5.1
11	5.4	10.9	38.0	13.3	38.0	5.1	13.3	5.1

4.1.4.4 Análisis de ácidos grasos

Cada cinco días se tomaron volúmenes conocidos de cada especie de microalga y de las mezclas de microalgas preparadas previamente (dietas). Se centrifugaron a 3500 rpm a una temperatura de 10°C por 10 minutos, el paquete celular obtenido se resuspendió en 2 mL de formiato de amonio al 3% y se colocó en un tubo eppendorf de 2 mL. Posteriormente se centrifugó a 1500 rpm y a 10°C por 10 minutos, el sobrenadante se desechó y las muestras obtenidas se mantuvieron a -70°C para su posterior análisis.

4.1.4.5 Extracción y cuantificación de ácidos grasos

La extracción de ácidos grasos se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de Microalgas del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), en La Paz, Baja California Sur. Se utilizó el método propuesto por Sato y Murata (1988), de esterificación directa. Las muestras se liofilizaron, se pesaron previamente y se sometieron a derivatización ácida utilizando 3 mL de la mezcla de HCl-CH₃OH (5:95 v/v) durante 2.5 horas en baño maría a 85°C (Sato y Murata, 1988). Los ácidos grasos metil esterificados obtenidos se extrajeron con 3 mL de hexano grado HPLC. Posteriormente el hexano se secó con nitrógeno gaseoso para obtener los ácidos grasos metil esterificados. Esta fracción de ácidos grasos metil esterificados se resuspendieron en 750 µl de hexano grado HPLC, y se colocó 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 hizo por cromatografía de gases/espectrometría de masas, utilizando un Cromatografo de Gases Espectrómetro de masas GCD 1800B con el software de integración Wsearch. Se inyectó 1µl de muestra y se utilizó helio de alta pureza como gas transportador en una columna de sílica de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 µm de espesor de película (Omegawax 250).

La identificación de los ácidos grasos se hizo mediante la comparación de los tiempos de retención (TR) de los picos en los cromatogramas de las muestras con respecto a los TR de los picos de un patrón comercial de una mezcla de 37 estándares metil

esterificados (Supelco 47885 U). Así mismo, se confirmó la identificación de los ácidos grasos de las muestras a través de los espectros de masas característicos de cada grupo de ácidos grasos, lo que permitió identificar aquellos ácidos grasos que no están disponibles de manera comercial en los estándares.

Para calcular la concentración de los ácidos grasos presentes en las muestras se integró el área bajo la curva de los cromatogramas. Posteriormente los valores integrados se interpolaron con la curva de calibración previamente realizada para una mezcla comercial de 37 ácidos grasos metil esterificados, en un intervalo de concentraciones de 10 a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Este intervalo de concentraciones fueron definidas de acuerdo a la sensibilidad del equipo de cromatografía de gases espectrometría de masas. Para cada ácido graso se calculó la pendiente de la recta y se utilizó como factor de conversión para obtener la concentración en $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ a partir del área.

Para calcular la concentración de cada ácido graso se utilizó la siguiente ecuación (2):

$$C (\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}) = ((A / \text{FC}) * \text{Volumen hexano (mL)}) / \text{PM (mg)} \quad (2)$$

Dónde:

C= Concentración

A= área

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

PM= peso de la muestra

4.2 Cultivo de copépodos

4.2.1. Mantenimiento de la cepa

La cepa de *P. euryhalinus* se mantuvo en matraces Fernbach de 2 L, con aireación suave y constante, luz continua a una intensidad de $50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, a una temperatura de 24 ± 1 °C. Fueron alimentados diariamente con las mezclas de microalgas (ISG:CHM ISG:RHS,RHS:CHM). Cada dos días se hizo un recambio del 100 % del medio de cultivo (agua de mar y la mezcla correspondiente de microalgas).

Durante los recambios de agua, los copépodos adultos se separaron de los copepoditos y nauplios con un tamiz de 150 μm y fueron retenidos en un tamiz de 50 μm . Los adultos se regresaron a sus respectivos matraces, en tanto que los nauplios y copepoditos se trasladaron a contenedores de 50 L y fueron alimentados con las mezclas de microalgas (ISG:CHM, ISG:RHS, RHS:CHM). El agua de mar utilizada para los recambios fue filtrada a través de una serie de cartuchos de 5 y 1 μm e irradiada con luz ultravioleta.

Las microalgas utilizadas para alimentar a los copépodos, fueron cultivadas en forma semicontinua, en un volumen de 15 L, con una dilución diaria del 20% y con el medio de cultivo "f" (Guillard y Ryther, 1962). Se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura ($20\pm 1^\circ\text{C}$), salinidad (35 ups) y pH (7.5-8), el cual se controló con la inyección diaria de CO_2 . La iluminación fue continua, proporcionada por lámparas fluorescentes de luz blanca-fría. El agua de mar filtrada a 1 μm se esterilizó con cloro comercial ($3 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$) durante 24 h, posteriormente se agregó tiosulfato de sodio ($150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), y aireación continua para la eliminación total del cloro residual.

4.3 Diseño experimental

A partir de los copépodos cultivados en los contenedores de 50 L, se recolectaron suficientes nauplios con una edad máxima de 24 h, se sembraron en contenedores de 5 L, con un volumen útil de 3 L a una densidad de $1 \text{ org}\cdot\text{mL}^{-1}$, en agua de mar previamente filtrada, con una salinidad de 35 ups, temperatura de $24\pm 0.1^\circ\text{C}$, luz continua y aireación suave. La duración del bioensayo fue de 11 días, con recambio diario del 100% y alimentación diaria. Los copépodos se alimentaron con las microalgas obtenidas de las cosechas diarias de los cultivos semicontinuos (sección 4.1.3) y se mezclaron para obtener las siguientes dietas: ISG:CHM, ISG:RHS, RHS:CHM (sección 4.1.4.3).

4.4. Evaluación del cultivo de *P. euryhalinus*

4.4.1. Crecimiento y supervivencia

Para evaluar el crecimiento de los copépodos alimentados con las tres dietas, diariamente se colectaron diez organismos de cada unidad experimental (n=30) y se les midió la longitud del prosoma con ayuda de un microscopio, provisto de una reglilla micrométrica en el ocular, previamente calibrada con una regla micrométrica (Figura 1).

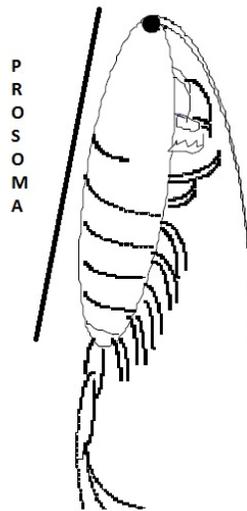


Figura 1. Longitud del prosoma de un copépodo calanoide adulto (Tomado y modificado de Ripplingale y Payne, 2001 página4).

Para evaluar la supervivencia diaria de los copépodos, cada 24 horas se tomaron muestras de 50 mL, agitando suavemente cada unidad experimental. La muestra se fijó con formalina al 5% y posteriormente se realizó el recuento total de organismos de cada muestra.

Al finalizar el experimento, los copépodos de cada unidad experimental se concentraron en tamices de 75 μ m, se fijaron en una solución de formalina al 5% preparada con agua de mar y posteriormente se contaron y midieron en un microscopio. La supervivencia total se calculó por diferencia entre la cantidad inicial de nauplios y el número total de copépodos al final del cultivo.

4.4.2. Peso seco total y orgánico de *P. euryhalinus*

Al finalizar el ensayo de alimentación se tomaron 250 organismos de cada unidad experimental, los cuales se filtraron a través de filtros Whatman GF/C de fibra de vidrio de 25 mm de diámetro, previamente lavados, incinerados en la mufla a 490°C y pesados. Para el análisis del PST y el PSO se siguió el método descrito previamente para las microalgas.

4.4.3. Composición de ácidos grasos de *P. euryhalinus*

La composición de ácidos grasos de los copépodos se analizó con las técnicas descritas previamente para las microalgas. Para el análisis de los resultados, los ácidos grasos se agruparon en saturados (AGS), monoinsaturados (AGM) y poliinsaturados (AGP). De estos últimos, se agruparon los de cadenas de 18 a 20 átomos de carbono con más de 2 enlaces dobles (AGPI) y los altamente insaturados de 20 a 22 C con más de 4 enlaces dobles (AGAI). Se analizaron individualmente los ácidos grasos linoleico (18:2 ω 6), linolénico (18:3 ω 3), eicosapentaenoico (EPA; 20:5 ω 3), araquidónico (ARA; 20:4 ω 6) y docosahexaenoico (DHA; 22:6 ω 3), ya que son esenciales para los organismos marinos.

4.5. Análisis estadístico

Para los análisis estadísticos se utilizó el programa Statistica 7. Se comprobó la homocedasticidad y normalidad de cada variable de respuesta. En el caso de los datos de porcentaje de supervivencia se transformaron con la función Arcoseno. Para contrastar diferencias entre los tratamientos en cada variable se realizaron análisis de varianza (ANOVA). En los casos donde se encontraron diferencias significativas, se realizó una prueba de comparación de medias de Tukey con un nivel de confianza del 95%.

Capítulo 5

Resultados

5.1 Cultivo de microalgas

5.1.1 Cultivo semicontinuo

Una vez iniciados los cultivos semicontinuos de las microalgas *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros muelleri* y *Rhodomonas salina*, la biomasa ($\text{cél}\cdot\text{mL}^{-1}$) se mantuvo estable durante 11 días, sin diferencias significativas en este periodo ($P \geq 0.05$) (Figura 2).

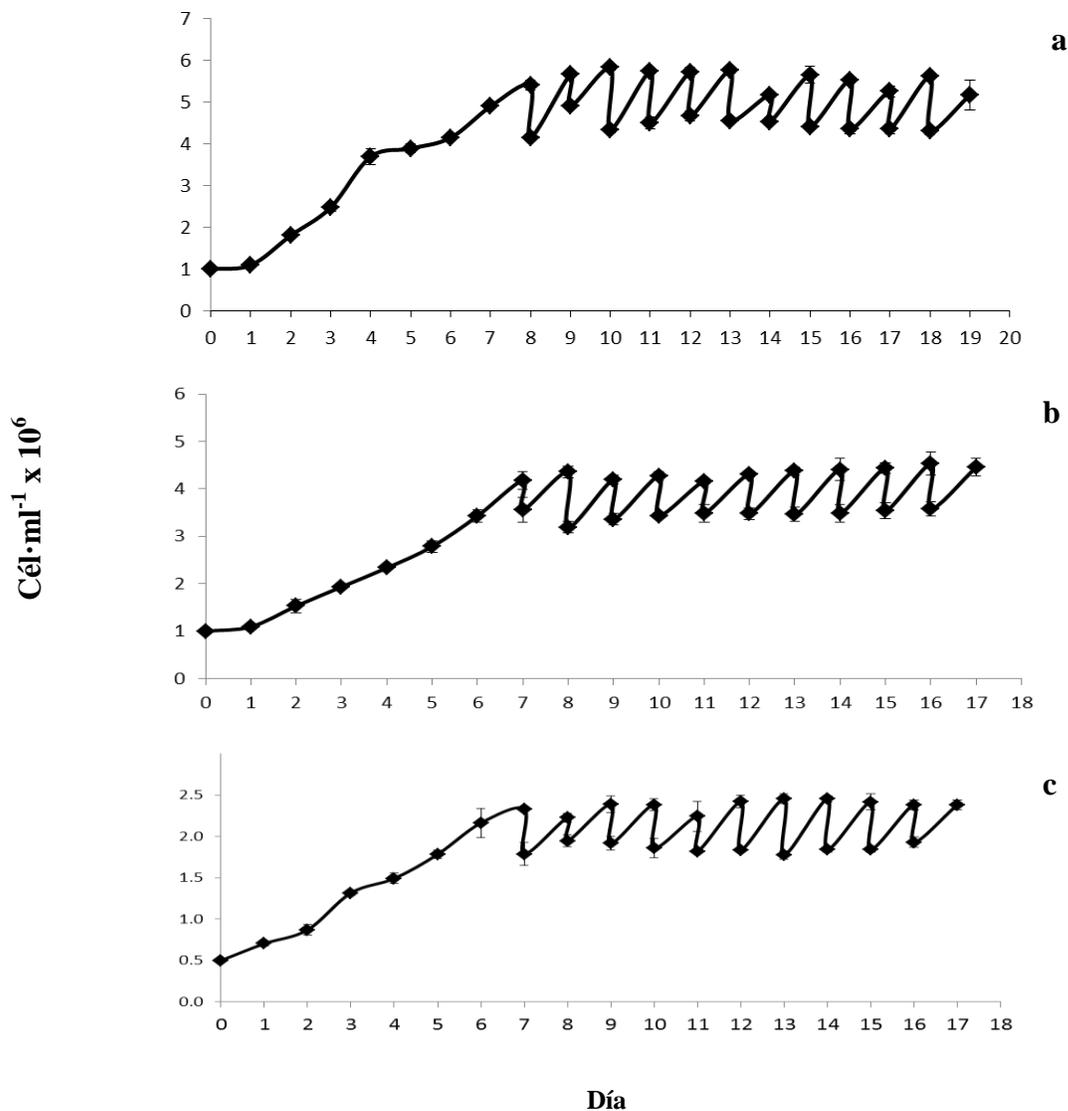


Figura 2. Crecimiento ($\text{cél}\cdot\text{mL}^{-1}$) de las microalgas *Isochrysis galbana* (a) *Chaetoceros muelleri* (b) y *Rhodomonas salina* (c) cultivadas en forma semicontinua. Valores promedio y error estándar.

5.1.2. Peso seco total y orgánico

En la tabla 2 se muestra el promedio (de los tres muestreos), de la biomasa en peso seco total (PST), peso seco orgánico (PSO) (en $\text{pg}\cdot\text{cél}^{-1}$) y el porcentaje de cenizas (PC), de las microalgas *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros muelleri* y *Rhodomonas salina* mantenidas en sistemas de cultivo semicontinuo.

El PST promedio de las microalgas ISG, CHM y RHS fue de 70.0, 123.6 y 241.1 $\text{pg}\cdot\text{cél}^{-1}$ respectivamente, sin diferencias significativas entre los muestreos realizados cada cinco días, para cada una de la microalgas ($P \geq 0.05$). El PSO promedio fue de 58.0, 83.74 y 175.52 $\text{pg}\cdot\text{cél}^{-1}$ para ISG, CHM y RHS respectivamente, sin diferencias significativas entre los muestreos ($P \geq 0.05$). El PST y el PSO de RHS fue dos y tres veces mayor que el de CHM e ISG respectivamente. El contenido de cenizas en las tres microalgas fue de 17.3 a 31.9%, siendo este último valor para CHM. No se encontraron diferencias significativas ($P \geq 0.05$) entre los muestreos sucesivos de cada especie

Tabla 2. Biomasa en peso seco total (PST), peso seco orgánico (PSO) y porcentaje de cenizas, de las microalgas marinas *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros muelleri* y *Rhodomonas salina*, cultivadas en forma semicontinua. Error estándar entre paréntesis.

	Muestreo	PST ($\text{pg}\cdot\text{cél}^{-1}$)	PSO ($\text{pg}\cdot\text{cél}^{-1}$)	CENIZAS (%)
<i>Isochrysis galbana</i>	1	50.5 (1.7)	41.5 (1.9)	17.8 (2.7)
	2	80.0 (3.9)	69.0 (3.8)	13.9 (1.1)
	3	79.4 (2.8)	63.2 (2.1)	20.3 (0.4)
	Promedio	70.0 (1.6)	58.0 (1.4)	17.3 (1.2)
<i>Chaetoceros muelleri</i>	1	107.1 (1.6)	74.5 (8.3)	30.2 (3.8)
	2	141.3 (2.0)	90.3 (2.1)	36.1 (1.5)
	3	122.3 (1.6)	86.3 (1.9)	29.3 (1.4)
	Promedio	123.6 (1.7)	83.7 (8.2)	31.9 (1.6)
<i>Rhodomonas salina</i>	1	226.8 (1.5)	176.0 (1.4)	22.4 (0.9)
	2	255.2 (1.0)	173.4 (6.8)	31.9 (2 .5)
	3	241.3 (3.8)	177.1 (1.5)	26.6 (2.2)
	Promedio	241.1 (1.4)	175.5 (1.8)	27.0 (1.6)

5.1.3 Perfil de ácidos grasos

En la tabla 3 se muestran el perfil y la concentración (en $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$) de los ácidos grasos identificados en las tres microalgas marinas *I. galbana*, *C. muelleri* y *R. salina* mantenidas en cultivo semicontinuo. Se presentan tanto en forma individual como agrupados, en: ácidos grasos saturados (AGS), monoinsaturados (AGMI), poliinsaturados (AGPI) y altamente insaturados (AGAI).

La suma de la concentración de los AGS y AGMI en *I. galbana* y *C. muelleri*, fueron estadísticamente más altas que en *R. salina* ($P\leq 0.001$). En cambio, la suma de AGPI y AGAI fue significativamente más alta en *R. salina*, en donde se representaron concentraciones de 39.45% y 41.72% respectivamente (Tabla 4).

La concentración de DHA fue mayor en *I. galbana* con $6.40 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de peso seco total ($P\leq 0.001$) y representó el 10.91% del total de ácidos grasos. Las mayores concentraciones de ARA y EPA se encontraron en *C. muelleri* con 5.96 y 14.33% ($2.08 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ y $6.16 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$) respectivamente ($P\leq 0.001$). *R. salina* mostró concentraciones intermedias de estos ácidos grasos respecto a las encontradas en las otras dos especies (Tabla 3 y 4).

La relación DHA/EPA fue mayor en *I. galbana* (15.6); mientras que en *C. muelleri* y *R. salina* fue menor que 1.0. La relación EPA/ARA fue muy similar en las tres especies de microalgas, entre 2.96 en *R. salina* y 2.2 en *C. muelleri* (Tabla 4).

Tabla 3. Concentración de ácidos grasos (en $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de peso seco total), de las microalgas marinas *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros muelleri* y *Rhodomonas salina* cultivada en forma semicontinua. Error estándar entre paréntesis. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas cuando se compararon los tratamientos (ANOVA).

AGS: Ácidos grasos saturados, AGMI: Ácidos grasos monoinsaturados, AGPI: Ácidos grasos poliinsaturados, AGAI: Ácidos grasos altamente insaturados, DHA: Ácido docosahexaenoico EPA: Ácido eicosapentaenoico ARA: Ácido araquidónico.

Ácido graso	<i>Isochrysis galbana</i>	<i>Chaetoceros muelleri</i>	<i>Rhodomonas salina</i>	
$\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$				
12:0	0.06 (0.01)	0.02 (0.01)	0.09 (0.03)	
14:0	8.50 (1.3)	4.04 (0.46)	3.33 (0.65)	
15:0	0.24 (0.05)	0.27 (0.03)	0.07 (0.01)	
16:0	0.20 (10.5)	4.07 (0.79)	1.18 (0.39)	
16:1 ω 11	1.71 (0.45)	6.97 (1.5)	0.39 (0.09)	
16:1 ω 9	1.03 (0.29)	2.92 (1.7)	0.44 (0.08)	
16:1 ω 7	-	0.41 (0.07)	0.49 (0.10)	
16:2 ω 6	0.22 (0.08)	1.95 (0.27)	0.04 (0.01)	
16:2 ω 3	0.69 (0.07)	0.76 (0.11)	-	
17:0	0.64 (0.01)	0.08 (0.26)	0.82 (0.01)	
16:3 ω 3	-	2.40 (0.36)	0.40 (0.05)	
18:0	0.31 (0.10)	0.70 (0.44)	0.41 (0.12)	
18:1 ω 9c+t	6.94 (1.0)	0.27 (0.02)	0.33 (0.02)	
18:1 ω 9c	1.03 (0.15)	0.37 (0.04)	1.06 (0.29)	
18:2 ω 6	1.98 (0.46)	b 0.30 (0.15)	c 7.69 (1.20)	a
18:3 ω 6	1.37 (0.52)	0.27 (0.08)	3.40 (1.25)	
18:3 ω 3	3.63 (1.03)	b 0.46 (0.15)	c 7.10 (0.97)	a
18:4 ω 6	-	0.27 (0.08)	-	
18:4 ω 3	4.2 (0.50)	0.31 (0.09)	7.89 (0.86)	
20:4 ω 6	0.16 (0.04)	c 2.08 (0.21)	a 1.58 (0.20)	b
20:4 ω 3	-	-	1.03 (0.57)	
20:5 ω 3	0.41 (0.10)	c 6.16 (0.48)	a 4.44 (0.73)	b
22:0	0.12 (0.01)	0.22 (0.01)	0.12 (0.01)	
24:0	-	0.21 (0.02)	-	
22:5 ω 6	1.92 (0.30)	-	-	
22:6 ω 3	6.40 (1.09)	a 0.53 (0.04)	c 3.15 (0.38)	b
Σ AGS	10.48 (1.24)	a 9.61 (1.16)	a 5.39 (0.91)	b
Σ AGMI	10.71 (1.57)	a 10.94 (1.26)	a 2.71 (1.11)	b
Σ AGPI	7.90 (2.03)	b 6.14 (0.29)	b 18.6 (2.88)	a
Σ AGAI	12.93 (1.95)	b 9.35 (0.65)	c 18.09 (2.0)	a
DHA/EPA	15.6	0.08	0.75	
EPA/ARA	2.50	2.20	2.96	

Tabla 4. Concentración de ácidos grasos en porcentaje, de las microalgas marinas *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros muelleri* y *Rhodomonas salina* cultivada en forma semicontinua. Error estándar entre paréntesis. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas cuando se compararon los tratamientos (ANOVA).

AGS: Ácidos grasos saturados, AGMI: Ácidos grasos monoinsaturados, AGPI: Ácidos grasos polinsaturados, AGAI: Ácidos grasos altamente insaturados, DHA: Ácido docosahexaenoico EPA: Ácido eicosapentaenoico ARA: Ácido araquidónico.

Ácido graso	<i>Isochrysis galbana</i>			<i>Chaetoceros muelleri</i>			<i>Rhodomonas salina</i>		
	%								
12:0	0.17	(0.03)		0.08	(0.01)		0.19	(0.04)	
14:0	17.71	(3.74)		11.35	(0.87)		7.49	(0.51)	
15:0	0.42	(0.06)		0.77	(0.05)		0.17	(0.01)	
16:0	11.77	(2.30)		11.23	(1.95)		3.06	(0.92)	
16:1 ω 11	5.98	(1.96)		20.63	(4.39)		2.00	(1.44)	
16:1 ω 9	2.44	(0.67)		6.93	(4.06)		0.97	(0.14)	
16:1 ω 7	-			1.17	(0.15)		1.23	(0.26)	
16:2 ω 6	0.97	(0.40)		5.33	(0.61)		0.12	(0.02)	
16:2 ω 3	1.70	(0.16)		2.08	(0.22)		-		
17:0	0.15	(0.01)		0.35	(0.19)		0.16	(0.02)	
16:3 ω 3	-			6.59	(0.77)		0.88	(0.09)	
18:0	0.67	(0.11)		2.27	(0.35)		0.75	(0.16)	
18:1 ω 9c+t	15.11	(1.34)		0.86	(0.09)		0.88	(0.19)	
18:1 ω 9c	2.29	(0.24)		1.28	(0.36)		1.93	(0.45)	
18:2 ω 6	4.21	(0.59)	b	1.47	(1.01)	c	16.27	(0.69)	a
18:3 ω 6	2.26	(0.91)		0.83	(0.25)		6.49	(1.83)	
18:3 ω 3	6.98	(1.36)	b	1.86	(0.99)	c	15.69	(0.82)	a
18:4 ω 6	-	(0.88)		0.32	(0.06)		-		
18:4 ω 3	8.27	(1.09)		1.28	(0.66)		18.14	(1.04)	
20:4 ω 6	0.59	(0.25)	c	5.96	(0.27)	a	3.50	(0.09)	b
20:4 ω 3	-			-			2.21	(1.12)	
20:5 ω 3	1.76	(0.68)	c	14.33	(0.48)	a	10.67	(1.36)	b
22:0	0.36	(0.06)		0.68	(0.04)		1.85	(1.36)	
24:0	-			0.62	(0.04)		-		
22:5 ω 6	4.03	(0.32)		-			-		
22:6 ω 3	10.91	(1.31)	a	1.73	(0.32)	c	7.19	(0.41)	b
Σ AGS	31.25	(3.27)	a	27.35	(1.36)	a	13.65	(0.71)	b
Σ AGMI	25.82	(1.46)	a	30.87	(2.34)	a	5.78	(1.42)	b
Σ AGPI	16.12	(2.42)	b	18.16	(0.76)	b	39.45	(1.69)	a
Σ AGAI	25.56	(1.81)	b	23.62	(1.13)	c	41.72	(2.07)	a

5.2 Dietas mixtas

5.2.1 Peso seco total y orgánico

El PST promedio fue significativamente más alto ($P \leq 0.05$), en las dietas mixtas constituidas por las microalgas ISG-CHM y ISG-RHS, con promedios de $647.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y $589.94 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. El PST obtenido con la mezcla CHM-RHS fue de $501.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. El PSO de las mezclas ISG-CHM y ISG-RHS varió de 430.7 a $389.9 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, sin diferencias significativas ($P \geq 0.05$), mientras que el PSO promedio de la mezcla CHM-RHS fue significativamente menor al de las otras dos dietas, con $321.7 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($P \leq 0.05$). El porcentaje de ceniza (PC) en las dietas mixtas ISG-CHM y ISG-RHS fue similar (30%), pero mas bajo que en la dieta constituida por las microalgas CHM-RHS, donde promedió 38.4% ($P \leq 0.05$) (Tabla 5).

Tabla 5. Peso seco total y orgánico (PST y PSO, $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y porcentaje de cenizas, de las dietas *Isochrysis galbana:Chaetoceros muelleri* (ISG-CHM); *Isochrysis galbana:Rhodomonas salina* (ISG-RHS) y *Chaetoceros muelleri:Rhodomonas salina* (CHM-RHS). Error estándar entre paréntesis. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas cuando se compararon los tratamientos (ANOVA).

Mezclas	Muestreo	PST	PSO ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	CENIZAS %
ISG-CHM	1	677.0 (5.4)	399.5 (9.6)	33.0 (1.7)
	2	664.9 (2.9)	451.0 (18.5)	31.8 (2.4)
	3	600.5 (5.0)	442.5 (43.8)	26.4 (1.12)
	Promedio	647.5 (44.6) a	430.7 (32.5) a	30.4 (1.3) b
ISG-RHS	1	593.3 (6.7)	398 (5.3)	23.9 (1.4)
	2	587.6 (9.3)	367 (4.2)	37.5 (0.3)
	3	587.8 (15.5)	403 (4.6)	29.18 (0.6)
	Promedio	589.9 (32.8) a	389.9 (18.6) a	30.2 (2.1) b
CHM-RHS	1	523.5 (36.7)	327 (3.5)	34.6 (0.6)
	2	465.0 (17.4)	307 (8.7)	44.7 (1.9)
	3	516.6 (54.0)	330 (5.5)	36.07 (0.25)
	Promedio	501.0 (30.4) b	321.7 (25.5) b	38.4 (1.6) a

5.2.2 Perfil de ácidos grasos de las dietas mixtas

La concentración total de AGS fue similar en las tres dietas ($P \geq 0.05$), mientras que la concentración de AGPI fue mayor en la dieta CHM-RHS ($P \leq 0.001$), donde se obtuvieron concentraciones del 29.41%. En tanto que las dietas constituidas por ISG-CHM y ISG-RHS tuvieron mayores concentraciones de AGAI, con 27.57 % y 35.87% respectivamente (Tabla 6 y 7).

El contenido de DHA fue mayor en ISG-RHS ($4.13 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ de peso seco total), que equivale al 9.5% del total de ácidos grasos ($P \leq 0.001$). Las concentraciones de ARA y EPA fueron estadísticamente más altas en la dieta CHM-RHS con $1.90 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ y $4.85 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ (4.32 y 11.04% respectivamente) ($P \leq 0.001$) (Tabla 6 y 7).

Las relaciones DHA/EPA y EPA/ARA fueron mayores en la dieta ISG-RHS (2.35 y 4.4 respectivamente) (Tabla 6).

5.3. Cultivo de copépodos

5.3.1 Supervivencia

La supervivencia de *P. euryhalinus* hasta el quinto día de cultivo fue similar con las tres dietas ($P = 0.32$), con un valor promedio de 92.0%. A partir del día 6 se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) y esta tendencia se observó hasta el final del cultivo (día 11). La mayor supervivencia se observó con la dieta ISG-CHM (90.3%), mientras que la supervivencia obtenida con ISG-RHS y CHM-RHS fue similar ($P \leq 0.05$), con un promedio de 60.0% al final del cultivo (Fig.3).

Tabla 6. Concentración de ácidos grasos (en $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de peso seco total) de mezclas de microalgas marinas *Isochrysis galbana:Chaetoceros muelleri* (ISG-CHM), *Isochrysis galbana:Rhodomonas salina* (ISG-RHS), *Chaetoceros muelleri:Rhodomonas salina* (CHM-RHS). Error estándar entre paréntesis. Letras iguales indican no diferencias significativas cuando se compararon los tratamientos (ANOVA).

AGS: Ácidos grasos saturados, AGMI: Ácidos grasos monoinsaturados, AGPI: Ácidos grasos polinsaturados, AGAI: Ácidos grasos altamente insaturados, DHA: Ácido docosahexaenoico EPA: Ácido eicosapentaenoico ARA: Ácido araquidónico.

Ácido graso	ISG-CHM	ISG-RHS	CHM-RHS		
	$\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$				
12:0	0.04 (0.01)	0.06 (0.01)	0.04 (0.0)		
14:0	5.53 (1.1)	6.40 (0.8)	4.32 (0.5)		
15:0	0.24 (0.02)	0.11 (0.01)	0.22 (0.03)		
16:0	5.51 (0.8)	5.0 (0.4)	5.8 (0.4)		
16:1 ω 11	3.70 (0.9)	0.64 (0.14)	6.9 (0.8)		
16:1 ω 9	3.10 (0.9)	0.5 (0.11)	6.9 (0.8)		
16:1 ω 7	0.19 (0.04)	0.30 (0.3)	0.72 (0.10)		
16:2 ω 6	1.10 (0.09)	0.4 (0.05)	1.4 (0.17)		
16:2 ω 3	0.72 (0.5)	-	0.6 (0.06)		
17:0	0.06 (0.01)	0.06 (0.01)	0.08 (0.11)		
16:3 ω 3	1.09 (0.16)	0.04 (0.00)	0.24 (0.06)		
18:0	0.41 (0.05)	0.20 (0.02)	0.63 (0.10)		
18:1 ω 9c+t	0.96 (0.32)	1.03 (0.12)	0.82 (0.11)		
18:1 ω 9c	3.25 (0.41)	4.02 (0.42)	0.61 (0.13)		
18:2 ω 6	1.12 (0.11)	b 2.79 (0.54)	a 3.33 (0.55)		a
18:3 ω 6	0.67 (0.14)	1.92 (0.61)	3.08 (0.50)		
18:3 ω 3	1.30 (0.22)	c 4.32 (0.64)	a 2.97 (0.48)		b
18:4 ω 6	1.91 (0.35)	5.19 (0.62)	-		
18:4 ω 3	2.08 (0.34)	2.69 (0.57)	-		
20:4 ω 6	1.08 (0.13)	b 0.4 (0.05)	b 1.90 (0.29)		a
20:4 ω 3	-	0.15 (0.01)	0.14 (0.01)		
20:5 ω 3	2.75 (0.32)	b 1.76 (0.21)	b 4.85 (0.73)		a
22:0	0.13 (0.01)	0.11 (0.02)	0.07 (0.01)		
24:0	0.17 (0.03)	-	0.13 (0.2)		
22:5 ω 6	0.86 (0.07)	1.13 (0.21)	-		
22:6 ω 3	2.50 (0.26)	b 4.13 (0.49)	a 1.68 (0.29)		c
Σ AGS	12.09 (1.5)	11.9 (1.3)	11.29 (1.5)		
Σ AGMI	11.6 (0.8)	a 6.49 (0.6)	b 16.13 (1.1)		a
Σ AGPI	6.09 (0.36)	c 9.47 (1.5)	b 11.62 (1.6)		a
Σ AGAI	11.16 (1.15)	a 15.09 (1.79)	a 8.57 (1.3)		b
DHA/EPA	0.91	2.35	0.35		
EPA/ARA	2.55	4.4	2.55		

Tabla 7. Concentración de ácidos grasos en porcentaje de mezclas de microalgas marinas *Isochrysis galbana*:*Chaetoceros muelleri* (ISG-CHM) *Isochrysis galbana*:*Rhodomonas salina* (ISG-RHS), *Chaetoceros muelleri*:*Rhodomonas salina* (CHM-RHS). Error estándar entre paréntesis. Letras iguales indican no diferencias significativas cuando se compararon los tratamientos (ANOVA).

AGS: Ácidos grasos saturados, AGMI: Ácidos grasos monoinsaturados, AGPI: Ácidos grasos polinsaturados, AGAI: Ácidos grasos altamente insaturados, DHA: Ácido docosahexaenoico EPA: Ácido eicosapentaenoico ARA: Ácido araquidónico.

Ácido graso	ISG-CHM	ISG-RHS		CHM-RHS		
	%					
12:0	0.11 (0.02)		0.15 (0.12)		0.12 (0.03)	
14:0	12.77 (2.27)		14.68 (0.55)		10.13 (0.31)	
15:0	0.59 (0.02)		0.26 (0.02)		0.56 (0.05)	
16:0	13.56 (0.52)		11.71 (0.3)		13.60 (0.65)	
16:1 ω 11	9.15 (2.17)		1.49 (0.25)		16.86 (0.84)	
16:1 ω 9	8.36 (2.57)		1.27 (0.23)		0.41 (0.10)	
16:1 ω 7	0.48 (0.10)		0.73 (0.09)		1.67 (0.06)	
16:2 ω 6	2.80 (0.11)		0.97 (0.13)		3.24 (0.11)	
16:2 ω 3	1.79 (0.06)		-		1.41 (0.05)	
17:0	0.14 (0.01)		0.15 (0.01)		0.23 (0.06)	
16:3 ω 3	2.81 (0.41)		0.10 (0.01)		3.80 (0.08)	
18:0	1.01 (0.08)		0.48 (0.03)		1.48 (0.13)	
18:1 ω 9c+t	8.05 (0.89)		9.38 (0.35)		1.32 (0.14)	
18:1 ω 9c	2.35 (0.77)		2.37 (0.10)		1.91 (0.08)	
18:2 ω 6	2.77 (0.20)	b	6.34 (0.98)	a	7.44 (0.38)	a
18:3 ω 6	1.62 (0.34)		4.25 (1.15)		6.89 (0.39)	
18:3 ω 3	3.16 (0.46)	c	9.82 (0.52)	a	6.71 (0.60)	b
18:4 ω 6	4.74 (0.85)		12.26 (1.04)		-	
18:4 ω 3	4.94 (0.61)		5.95 (0.80)		-	
20:4 ω 6	2.60 (0.18)	b	1.13 (0.09)	b	4.32 (0.12)	a
20:4 ω 3	-		0.36 (0.2)		0.43 (0.10)	
20:5 ω 3	6.47 (0.44)	b	4.09 (0.28)	b	11.04 (0.34)	a
22:0	0.32 (0.01)		0.26		0.21 (0.07)	
24:0	0.43 (0.10)		-		0.38 (0.09)	
22:5 ω 6	2.12 (0.09)		2.58 (0.13)		-	
22:6 ω 3	6.07 (0.27)	b	9.50 (0.49)	a	4.21 (0.70)	c
Σ AGS	28.87 (2.7)		26.53 (0.72)		26.69 (1.27)	
Σ AGMI	28.46 (1.89)	a	15.24 (0.62)	b	22.16 (0.79)	a
Σ AGPI	13.95 (0.94)	c	21.48 (2.17)	b	29.41 (1.32)	a
Σ AGAI	27.57(0.95)	B	35. 87 (1.34)	a	20.00 (0.95)	b

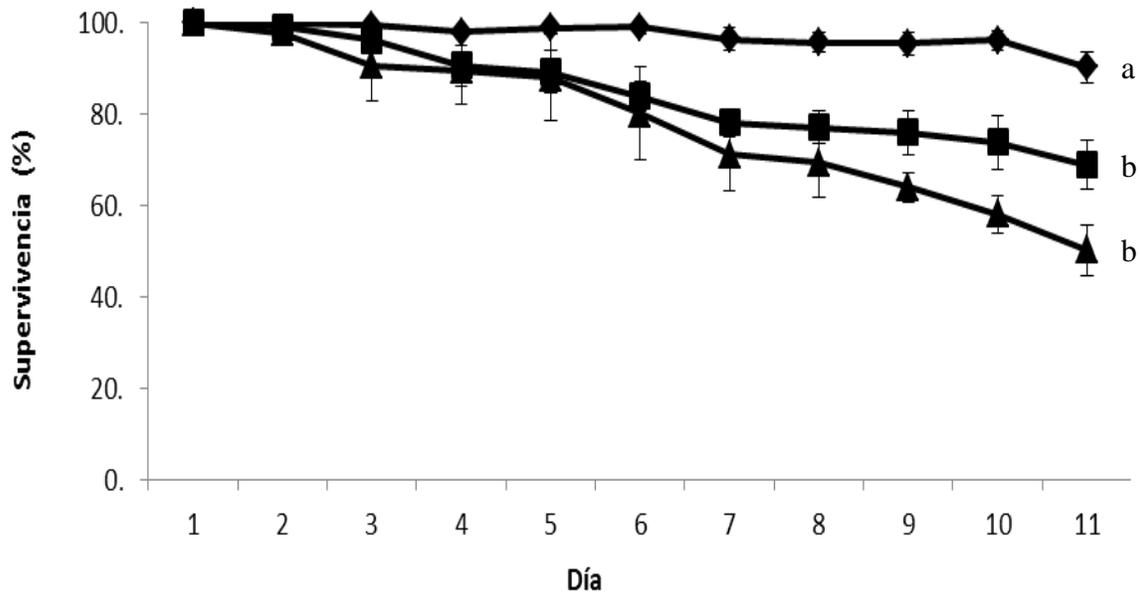


Figura 3. Supervivencia (%) de *Pseudodiaptomus euryhalinus* alimentado con tres diferentes dietas elaboradas a base de mezclas de microalgas marinas. *Isochrysis galbana:Chaetoceros muelleri* (◆), *Isochrysis galbana:Rhodomonas salina* (■), *Chaetoceros muelleri:Rhodomonas salina* (▲) Error estándar. Letras iguales indican no diferencias significativas.

5.3.2. Crecimiento, Maduración y Proporción de sexos

La longitud promedio del prosoma de las hembras de *Pseudodiaptomus euryhalinus* fue mayor con las dietas ISG-CHM ($P \leq 0.05$) y ISG-RHS, en donde se alcanzaron valores de 928 y 913 μm respectivamente. En el caso de los machos no se encontraron diferencias significativas en la longitud promedio del prosoma (517 μm) entre las tres dietas ($P=0.13$) (Tabla 8).

Longitud prosoma de hembras (μm)			Longitud prosoma de machos (μm)		
ISG-CHM	928 (6.0)	a	ISG-CHM	521 (4.6)	a
ISG-RHS	913 (6.5)	ab	ISG-RHS	520 (2.7)	a
CHM-RHS	866 (28.4)	b	CHM-RHS	510 (5.0)	a

La proporción de sexos fue de 1:1 entre machos y hembras sin diferencias significativas entre las dietas ($p=0.09$). Hasta el decimo día de cultivo se observaron hembras maduras en aquellas alimentadas con las dietas ISG-CHM y ISG-RHS, sin diferencias significativas entre estas dos dietas ($P=0.91$). Al día 11 de cultivo se observó el 48% de hembras ovígeras con la dieta ISG-CHM, con diferencias altamente significativas con respecto a las otras dietas ($p=0.001$) (Tabla 9).

Tabla 9. Número promedio de organismos, proporción de sexos y % de hembras maduras de *Pseudodiaptomus euryhalinus* al día 11 de cultivo, alimentado con tres diferentes dietas a base de mezclas de microalgas marinas. *Isochrysis galbana*: *Chaetoceros muelleri* (ISG-CHM), *Isochrysis galbana*:*Rhodomonas salina* (ISG-RHS) y *Chaetoceros muelleri*:*Rhodomonas salina* (CHM-RHS). Error estándar entre paréntesis.

	Número de Machos	Número de Hembras	Proporción Machos:Hembras	Día de la primera maduración	% Hembras ovígeras
ISG-CHM	922 (43.2)	871 (43.2)	1.05 : 1	10 (2.3) a	48 (0.43) a
ISG-RHS	598 (53.3)	604 (28.0)	0.99 : 1	10 (5.3) a	14 (4.17) b
CHM-RHS	489 (64.9)	404 (18.3)	1.2 : 1	11 (0.0) b	9.07 (1.8) b

5.3.3. Peso seco total y orgánico

El PST promedio de los copépodos alimentados con la mezcla ISG-RHS fue mayor ($12.3 \mu\text{g}\cdot\text{org}^{-1}$) ($P \leq 0.05$) que con los otros dos tratamientos. En tanto que los copépodos alimentados con CHM-RHS y ISG-CHM, tuvieron pesos similares con promedios de 9.6 y $10.5 \mu\text{g}\cdot\text{org}^{-1}$ respectivamente ($P \geq 0.05$) (Tabla 10).

El PSO de *P. euryhalinus* fue mayor con la dieta compuesta de ISG-RHS, con $11.4 \mu\text{g}\cdot\text{org}^{-1}$, con respecto a los otros tratamientos ($P \leq 0.05$). El PSO registrado con ISG-CHM y CHM-RHS fue similar, con promedios de 9.9 y $8.9 \mu\text{g}\cdot\text{org}^{-1}$ respectivamente ($P \geq 0.05$) (Tabla 10).

El porcentaje de cenizas de *P. euryhalinus* alimentado con las diferentes dietas estuvo en el intervalo de 5.1% a 7.5%, sin diferencias significativas entre tratamientos ($P \geq 0.05$) (Tabla 10).

Tabla 10. Peso seco total y orgánico (PST y PSO) y porcentaje de cenizas de *Pseudodiaptomus euryhalinus* alimentado con tres diferentes dietas a base de mezclas de microalgas marinas: *Isochrysis galbana:Chaetoceros muelleri* (ISG-CHM), *Isochrysis galbana:Rhodomonas salina* (ISG-RHS), *Chaetoceros muelleri:Rhodomonas salina* (CHM-RHS). Error estándar entre paréntesis. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas cuando se compararon los tratamientos (ANOVA).

Tratamientos	PST	PSO		CENIZAS
		$(\mu\text{g}\cdot\text{org}^{-1})$		
ISG-CHM	10.5 (0.33)	b	9.9 (0.31)	b 5.1 (0.44)
ISG-RHS	12.3 (0.72)	a	11.4 (0.71)	a 7.5 (0.51)
CHM-RHS	9.6 (0.25)	b	8.9 (0.21)	b 7.4 (1.10)

5.3.4 Perfil de ácido grasos

Las concentraciones de AGS y AGPI en *P. euryhalinus* alimentado con las tres dietas fueron similares ($P=0.16$; $P=0.56$ respectivamente). En cambio si se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de los AGMI y los AGAI, siendo mayor en los copépodos alimentados con la mezcla ISG-CHM ($P\leq 0.001$), donde alcanzaron concentraciones de 57.88 y 56.95 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de peso seco respectivamente (Tabla 11).

Las mayores concentraciones de ARA, EPA y DHA fueron encontradas en los copépodos alimentados con la mezcla ISG-CHM, con 3.07, 10.09 y 12.58% respectivamente y concentraciones de 5.9, 19.4 y 24.2 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de peso seco total ($P\leq 0.001$). Las relaciones DHA/EPA y EPA/ARA fueron mayores en los copépodos alimentados con la mezcla ISG-RHS, con valores de 2.5 y 3.5 respectivamente (Tabla 11 y 12).

Tabla 11. Concentración de ácidos grasos (en $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de peso seco total) de *Pseudodiaptomus euryhalinus* alimentado con tres dietas mixtas a base de microalgas marinas. *Isochrysis galbana*:*Chaetoceros muelleri* (ISG-CHM), *Isochrysis galbana*:*Rhodomonas salina* (ISG-RHS), *Chaetoceros muelleri*:*Rhodomonas salina* (CHM-RHS). Error estándar entre paréntesis. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas cuando se compararon los tratamientos (ANOVA). AGS: Ácidos grasos saturados, AGMI: Ácidos grasos monoinsaturados, AGPI: Ácidos grasos polinsaturados, AGAI: Ácidos grasos altamente insaturados, DHA: Ácido docosahexaenoico EPA: Ácido eicosapentaenoico ARA: Ácido araquidónico.

Ácido graso	ISG-CHM	ISG-RHS	CHM-RHS	
		$\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$		
12:0	0.13 (0.06)	0.09 (0.02)	0.12 (0.02)	
14:0	12.62 (11.2)	8.46 (2.15)	8.87 (3.53)	
14:0 iso	0.88 (0.19)	0.49 (0.15)	0.31 (0.09)	
14:0 ante	0.47 (0.30)	-	-	
15:0	0.79 (0.02)	0.73 (0.52)	0.50 (0.09)	
16:0	23.95 (0.1)	13.59 (2.7)	15.53 (1.1)	
16:1 ω 11	18.13 (7.1)	1.71 (0.4)	1.71 (0.4)	
16:1 ω 9	18.13 (7.1)	-	-	
16:0 iso	1.18 (0.06)	0.70 (0.16)	0.71 (0.07)	
16:2 ω 6	4.58 (0.5)	0.40 (0.0)	1.93 (0.87)	
16:2 ω 3	3.32 (0.32)	-	1.20 (0.60)	
17:0	1.94 (0.90)	1.79 (0.0)	1.33 (0.10)	
16:3 ω 3	6.42 (0.72)	-	2.46 (1.30)	
18:0	2.94 (1.06)	2.92 (0.59)	3.45 (0.24)	
18:1 ω 9 c+t	15.37 (4.58)	3.10 (1.64)	3.21 (1.82)	
18:1 ω 9c	3.73 (0.35)	2.92 (0.59)	3.09 (0.28)	
18:2 ω 6	6.0 (0.6)	a 9.3 (1.9)	a 6.1 (1.2)	a
18:3 ω 6	3.85 (1.92)	-	4.99 (1.22)	
18:3 ω 3	9.8 (4.8)	a 10.51 (4.9)	a 6.33 (1.5)	a
18:4 ω 3	14.7 (0.9)	12.0 (2.6)	4.9 (1.2)	
20:0	0.44 (0.05)	0.18 (0.04)	-	
20:1 ω 9	0.36 (0.11)	0.81 (0.21)	0.16 (0.04)	
20:2 ω 6	0.38 (0.22)	1.75 (0.63)	1.52 (0.41)	
21:0	1.79 (0.04)	0.88 (0.14)	-	
20:4 ω 6	5.9 (1.1)	a 2.1 (0.5)	b 4.4 (0.4)	a
20:4 ω 3	0.27 (0.0)	0.36 (0.07)	0.46 (0.17)	
20:3 ω 3	-	0.74 (0.17)	-	
20:5 ω 3	19.4 (3.5)	a 7.4 (1.6)	a 14.9 (1.7)	b
22:0	1.28 (0.10)	0.36 (0.08)	0.80 (0.08)	
22: 1 ω 9	0.35 (0.0)	0.36 (0.05)	0.60 (0.14)	
22:2 ω 6	-	0.25 (0.02)	-	
23:0	0.55 (0.04)	0.50 (0.08)	-	
24:0	-	-	0.44 (1.6)	
22:5 ω 6	7.18 (0.2)	a 3.1 (0.8)	b 2.0 (1.3)	b
22:6 ω 3	24.2 (1.3)	a 18.8 (0.7)	b 9.0 (0.2)	c
24:1 ω 9	1.79 (0.33)	1.37 (0.31)	0.76 (0.47)	
Σ AGS	47.79 (8.3)	29.99 (5.0)	30.91 (4.7)	
Σ AGMI	57.88 (3.6)	a 10.27 (2.2)	b 9.53 (5.0)	b
Σ AGPI	35.91 (7.3)	22.0 (5.5)	24.34 (3.4)	
Σ AGAI	56.95 (5.9)	a 31.5 (6.3)	b 30.76 (6.0)	b
DHA/EPA	1.3	2.5	0.6	
EPA/ARA	3.3	3.5	3.4	

Tabla 12. Concentración de ácidos grasos en porcentaje de *Pseudodiaptomus euryhalinus* alimentado con tres dietas mixtas a base de microalgas marinas. *Isochrysis galbana:Chaetoceros muelleri* (ISG-CHM), *Isochrysis galbana:Rhodomonas salina* (ISG-RHS), *Chaetoceros muelleri:Rhodomonas salina* (CHM-RHS). Error estándar entre paréntesis. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas cuando se compararon los tratamientos (ANOVA).

AGS: Ácidos grasos saturados, AGMI: Ácidos grasos monoinsaturados, AGPI: Ácidos grasos polinsaturados, AGAI: Ácidos grasos altamente insaturados, DHA: Ácidos docosaheptaenoico EPA: Ácido eicosapentaenoico ARA: Ácido araquidónico

Ácido graso	ISG-CHM		ISG-RHS		CHM-RHS	
			%			
12:0	0.06 (0.02)		0.08 (0.02)		0.011 (0.02)	
14:0	6.09 (0.12)		7.70 (0.59)		7.48 (1.99)	
14:0 iso	0.46 (0.12)		0.44 (0.07)		0.27 (0.04)	
14:0 ante	0.23 (0.14)		-		-	
15:0	0.41 (0.15)		1.02 (0.86)		0.45 (0.06)	
16:0	12.39 (0.84)		12.67 (0.09)		14.18 (1.03)	
16:1 ω11	9.57 (3.77)		1.56 (0.07)		9.28 (1.49)	
16:1 ω9	0.21 (0.06)		-		-	
16:0 iso	0.61 (0.04)		0.64 (0.02)		0.64 (0.03)	
16:2ω6	2.04 (0.55)		0.41 (0.10)		1.6 (0.54)	
16:2ω3	1.70 (0.15)		-		0.98 (0.38)	
17:0	1.02 (0.47)		1.85 (1.85)		1.22 (0.14)	
16:3ω3	3.28 (0.20)		-		1.99 (0.84)	
18:0	1.55 (0.63)		2.72 (0.09)		3.25 (0.59)	
18:1ω9 c+t	7.78 (2.01)		3.06 (1.34)		2.61 (1.17)	
18:1ω9c	1.93 (0.24)		2.86 (0.52)		2.92 (0.59)	
18:2ω6	3.09 (0.21)	c	8.70 (0.21)	a	5.94 (1.68)	b
18:3 ω6	1.91 (0.88)		-		1.59 (0.29)	
18:3ω3	4.90 (2.23)	b	9.72 (0.39)	a	6.15 (1.90)	a
18:4ω3	7.55 (0.19)		11.13 (0.40)		4.80 (1.42)	
20:0	0.22 (0.02)		0.17 (0.04)		-	
20:1ω9	0.18 (0.5)		0.90 (0.37)		0.15 (0.50)	
20:2ω6	0.20 (0.13)		1.49 (0.37)		1.49 (0.50)	
21:0	0.92 (0.05)		0.87 (0.16)		-	
20:4ω6	3.07 (0.57)	a	1.97 (0.08)	b	4.02 (0.29)	a
20:4ω3	0.13 (0.01)		0.34 (0.01)		0.44 (0.17)	
20:3ω3	-		0.68 (0.04)		-	
20:5ω3	10.09 (1.92)	a	6.85 (0.42)	b	13.50 (0.89)	a
22:0	0.66 (0.05)		0.33 (0.01)		0.73 (0.02)	
22: 1ω9	0.18 (0.01)		0.34 (0.01)		0.58 (0.18)	
22:2ω6	-		0.24 (0.05)		-	
23: 0	0.28 (0.02)		0.55 (0.23)		-	
24:0	-		-		0.40 (0.04)	
22:5ω6	3.70 (0.10)	a	2.91 (0.23)	b	1.61 (0.89)	b
22:6ω3	12.58 (1.20)	b	14.61 (0.42)	a	10.55 (1.18)	c
24:1ω9	0.91 (0.15)		1.25 (0.05)		0.62 (0.31)	
Σ AGS	24.96 (3.21)		28.14 (1.11)		27.60 (1.51)	
Σ AGMI	20.76 (2.18)	a	9.97 (0.90)	c	16.16 (2.19)	b
Σ AGPI	17.94 (2.68)		20.68 (0.95)		19.74 (2.74)	
Σ AGAI	29.57 (3.59)		26.68 (0.74)		30.12 (1.50)	

Capítulo 6

Discusión

Los copépodos son una buena alternativa de alimento vivo para el cultivo de larvas de peces marinos, ya que cuentan con los requerimientos nutricionales necesarios para su desarrollo (Drillet *et al.*, 2011). Para el cultivo de los copépodos se han utilizado dietas monoalgales de microalgas, principalmente de *Isochrysis* sp., *Chaetoceros* sp., *Tetraselmis* sp., *Rhodomonas* sp., *Nannochloropsis* sp., y *Thalassiosira* sp., y se han obtenido buenos resultados, aunque la mayoría de los autores mencionan que una mezcla de dos o más microalgas, puede mejorar el desarrollo del cultivo, ya que la combinación podría complementar las deficiencias nutricionales que cada microalga podría ocasionar en las larvas (Knuckey *et al.*, 2005; Milione y Zeng 2007). Considerando que *Isochrysis galbana* es una de las mejores fuentes de DHA, al mezclarla con *Chaetoceros muelleri* que es rica en EPA y ARA, se complementa el contenido de ácidos grasos poliinsaturados. La combinación de *Isochrysis galbana*, rica en DHA y pobre en EPA, con *Rhodomonas salina* que tiene porcentajes altos de DHA, EPA y ARA, complementa el contenido de éstos ácidos grasos. Así mismo, *Chaetoceros muelleri* rica en EPA y ARA, combinada con *Rhodomonas salina*, aumenta el contenido de DHA y ARA, obteniendo porcentajes bajos de EPA en esta dieta.

La concentración celular en los cultivos de microalgas es importante para la acuicultura, una mayor concentración disminuye los costos de producción, sin embargo, es aún más importante mantener el valor nutricional de las células, por lo que en este trabajo se ha hecho énfasis en el estudio del contenido de los ácidos grasos en las microalgas.

En este trabajo se alcanzó biomasa de 6.0×10^6 cél·mL⁻¹ de *Isochrysis galbana* en un volumen de 2.5 L cultivo, similar a lo reportado por Renaud *et al.* (1994, 2002) en sistemas de cultivo semicontinuo y en unidades de cultivo de 1.5 L. El peso orgánico fue de 48.8 pg·cél⁻¹, muy superior si se compara con el observado por Zhu *et al.* (1997), de 20.8 pg·cél⁻¹ aunque el contenido de cenizas fue similar.

Los resultados de *Chaetoceros muelleri*, en cuanto al número de células promedio de $4.4 \times 10^6 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ y un peso seco orgánico de $83.7 \text{ pg}\cdot\text{cél}^{-1}$, así como el porcentaje de cenizas 31.9%, son cercanos a los observados por otros autores, quienes reportan de 3.8×10^6 a $4.5 \times 10^6 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ y $75.0 \text{ pg}\cdot\text{cél}^{-1}$, así como un 44% de cenizas, en cultivos semicontinuos con tasas de dilución del 10 al 30% (Lemus *et al.*, 2006; Pacheco *et al.*, 2010 y Renaud *et al.*, 2002),

La densidad de *R. salina* fue mayor, con $2.4 \times 10^6 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$, con un peso orgánico promedio de $175.5 \text{ pg}\cdot\text{cél}^{-1}$ y 27% de cenizas, en cultivo semicontinuo, con una tasa de dilución del 10%. En cultivos por lotes, *Rhodomonas salina*, Patil *et al.* (2007) y Renaud *et al.* (2002), obtuvieron valores cercanos, con una concentración de $2.0 \times 10^6 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$, en la fase de máximo crecimiento exponencial, con un promedio de peso seco orgánico de $150.0 \text{ pg}\cdot\text{cél}^{-1}$ y un contenido del 20 % de cenizas.

Las diferencias en el contenido de cenizas entre los cultivos de Patil *et al.* (2007) y Renaud *et al.* (2002) y los registrados en este trabajo se deben a una insuficiente eliminación de sales durante el proceso de filtración. No obstante, cuando se comparan diferentes especies de microalgas se debe tomar en consideración la constitución de la pared celular. En este sentido, *Chaetoceros muelleri* tiene una pared celular de sílice, a diferencia de *Isochrysis galbana* y *Rhodomonas salina* que carecen de pared celular. Es por ello que para evitar una formulación errónea de las dietas mixtas se utilizó el peso seco orgánico de las microalgas.

Diversos estudios sobre la composición de ácidos grasos de las microalgas muestran diferencias entre las especies, en el caso de *Isochrysis galbana* cultivada en lotes, el contenido de DHA puede ser de hasta el 12% de los ácidos grasos totales (Renaud *et al.*, 2002; Roncati *et al.*, 2004), similares a los registrados en este trabajo. En contraste, en *Chaetoceros muelleri*, el contenido de DHA fue muy pobre (1.7%) y coincide con los registrados por Lemus *et al.* (2006), Pacheco *et al.* (2010) y Renaud *et al.* (2002) para esta especie cultivada en sistemas estáticos, al final de la fase de crecimiento exponencial.

La concentración de DHA en *Rhodomonas salina* (7.1%) cuantificada en este trabajo fue mayor que la registrada por Sexias *et al.* (2009) en sistemas de cultivo por lotes (6.9%).

En lo que respecta al contenido de ácido eicosapentaenoico (EPA) de *Isochrysis galbana* (1.76%), fue similar al observado por Renaud *et al.* (1994) y Roncati *et al.* (2004) donde alcanzaron hasta 2.72% en cultivos en lotes. En contraste, para *Chaetoceros muelleri*, resultaron porcentajes mas altos en este trabajo (14.3%), aunque menores que los reportados por Lemus *et al.* (2006), Pacheco *et al.* (2010) y Renaud *et al.* (2002) en sistemas de cultivo por lotes y cosechados al final de la fase de crecimiento exponencial. Para *Rhodomonas salina* el porcentaje de EPA en este trabajo fue de 10.6%, mayor al observado en cultivos por lotes en otros estudios (8.4%) (Patil *et al.*, 2007; Renaud *et al.*, 2002; Schipp *et al.*, 2006 y Sexias *et al.*, 2009).

En *Isochrysis galbana* se cuantificaron pequeñas cantidades, del ácido araquidónico (ARA) (0.59%), muy similares a las observadas por Flynn *et al.* (1992) y Roncati *et al.* (2004) de 0.99%. En forma comparativa, *Chaetoceros muelleri* es una microalga rica en ARA, ya que en el presente estudio su contenido fue de 5.9%, ligeramente mayor que el 4.8% observado por Lemus *et al.* (2006), Pacheco *et al.* (2010) y Renaud *et al.* (2002), posiblemente debido a la forma de cultivo, ya que estos autores utilizaron un sistema de cultivo por lotes y la cosecha la hicieron al final de la fase de crecimiento exponencial. Para *Rhodomonas salina* los contenidos de ARA en este trabajo (3.5%) fueron, mayores a los observados en sistemas de cultivo por lotes (0.3%) (Patil *et al.*, 2007; Renaud *et al.*, 2002; Schipp *et al.*, 2006 y Sexias *et al.*, 2009).

Al comparar el perfil y la concentración de ácidos grasos de cada una de las microalgas, con respecto a sus mezclas, se observó que en ISG-CHM, los contenidos de DHA, EPA y ARA se complementan positivamente, dando concentraciones de $2.50 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de DHA, $2.75 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de EPA y $1.08 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de ARA y las proporciones de DHA/EPA y EPA/ARA fueron de 0.91 y 2.55 respectivamente. Para la mezcla ISG-RHS, *Isochrysis galbana* aporta la mayor cantidad de DHA, que se complementa con el contenido de EPA y ARA de *Rhodomonas salina*, lo que resulta en concentraciones de $4.13 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$

de DHA, $1.76 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de EPA y $0.4 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de ARA y en una proporción de DHA/EPA y EPA/ARA de 2.35 y 4.4 respectivamente. En ambas dietas se obtienen proporciones similares a las recomendadas por Sargent *et al.* (1997), de una relación de DHA/EPA/ARA de 5:2:1, considerada adecuada para un buen desarrollo en organismos marinos.

Al combinar *Chaetoceros muelleri* con *Rhodomonas salina*, como ambas microalgas tienen un bajo contenido de DHA, la concentración de DHA en esta mezcla resultó bajo ($1.68 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$), en tanto que los contenidos de EPA y ARA son mayores que los encontrados en las otras mezclas, con $4.85 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ y $1.90 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$, respectivamente (Tabla 6).

Para evaluar la calidad nutricional de una dieta, además de la composición bioquímica, se puede evaluar el desempeño de los organismos que la consumen. En los estudios relacionados con los copépodos, las variables más comunes incluyen el crecimiento, la supervivencia, maduración y la producción naupliar entre otras (Nanton y Castell, 1999; Millione y Zeng, 2007; Puello *et al.*, 2009; Ohs *et al.*, 2010a; Payne y Rippingale, 2000; Rhyne *et al.*, 2009). Sin embargo, cabe destacar que los resultados obtenidos en estas variables dependen de las especies de copépodos y de las microalgas que consumen.

En dos especies de copépodos harparticoides, Nanton y Castell (1999) reportan una mayor supervivencia cuando utilizaron *Isochrysis galbana* como dieta monoalgal a diferencia de la observada con *D. tertiolecta*. Millione y Zeng (2007) utilizaron dietas monoalgales y la mezcla de *Isochrysis galbana*-*Tetraselmis* sp., en *A. sinjensis* y obtuvieron supervivencias más altas con la dieta mixta que con las dietas monoalgales.

Puello-Cruz *et al.* (2009) y Ohs *et al.* (2010a) evaluaron diferentes dietas monoalgales en *P. euryhalinus* y *P. pelagicus* y obtuvieron mayor supervivencia cuando los alimentaban con las microalgas *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros muelleri*, en comparación con la menor supervivencia registrada con *Tetraselmis* sp., *Thalassiosira* sp. y *Rhodomonas lens*. Sin embargo, Puello-Cruz *et al.* (2009), reportaron mayores

supervivencias de *P. euryhalinus* con la mezcla de *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros muelleri* a diferencia de cuando se utilizaron estas microalgas como dietas monoalgales.

En el presente trabajo se observó que *P. euryhalinus* obtuvo una mayor supervivencia y crecimiento con la mezcla de *Isochrysis galbana*-*Chaetoceros muelleri*, a diferencia de lo obtenido con las mezclas de *Isochrysis galbana*-*Rhodomonas salina* y *Chaetoceros muelleri*-*Rhodomonas salina*, en ésta última mezcla se obtuvo la supervivencia más baja (50%) al día 11 después de la eclosión.

El uso de *Rhodomonas* da como resultado bajas supervivencia, Millione y Zeng (2007), recomiendan el uso de esta microalga en *A. sinjensis* para la alimentación solo de copepoditos y de copépodos adultos, ya que posiblemente las bajas supervivencias que encontraron en los estadios naupliares se deba al tamaño y digestibilidad de *Rhodomonas* sp.

Los resultados de este estudio indican que la proporción de sexos no está influenciada por la dieta, Ohs *et al.* (2010a), observaron una respuesta similar en *P. pelagicus* utilizando las dietas monoalgales de *Chaetoceros gracilis* y *Rhodomonas lens*, sin embargo existen otros parámetros como la salinidad y la temperatura los cuales afectan directamente esta proporción (Osorio-Galindo, 1998; Ohs *et al.*, 2010b; Rhyne *et al.*, 2009).

El efecto de la dieta también se ve reflejado en el tiempo de maduración, en el caso de *P. pelagicus*, Ohs *et al.* (2010a) reportaron la primera maduración al día 7 después de la eclosión cuando fue alimentado con *Rhodomonas lens*. Puello-Cruz *et al.* (2009), obtienen la primera maduración de *P. euryhalinus* al día 9 después de la eclosión al alimentarlo con una dieta compuesta por la mezcla de tres microalgas: *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros muelleri* y *Tetraselmis* sp. (en proporción 2:2:1). En este estudio *P. euryhalinus* maduró sexualmente por primera vez al día 10 después de la eclosión, cuando se alimentó con las dietas *Isochrysis galbana*:*Chaetoceros muelleri* e *Isochrysis galbana*:*Rhodomonas salina*, a diferencia de cuando se alimenta con *Chaetoceros*

muelleri:*Rhodomonas salina* en donde la maduración sexual se alcanza hasta el día 11 después de la eclosión.

En cuanto a la maduración del total de la población, en este trabajo se obtuvieron los mejores resultados con la dieta de *Isochrysis galbana*:*Chaetoceros muelleri* (en proporción 1:1), ya que al día 11 después de la eclosión todas las hembras presentaban sacos ovígeros. Estos resultados siguen el mismo patrón observado por Puello *et al.* (2009) en *P. euryhalinus* alimentado con la misma mezcla de *Isochrysis galbana*:*Chaetoceros muelleri* (en proporción 2:1).

En contraste, las dietas que contenían la microalga *Rhodomonas salina*, se retrasa la primera maduración hasta el día 11 después de la siembra. Esta respuesta varía entre especies de copépodos, como lo observado en *A. sinjensis* y *P. pelagicus*, en donde se obtuvieron altos porcentajes de hembras maduras cuando fueron alimentados solamente con *Rhodomonas* sp. (Millione y Zeng, 2007; Ohs *et al.*, 2010).

En este trabajo, el retraso observado en la maduración con la dieta CHM-RHS se puede explicar por una proporción inadecuada de DHA/EPA (0.35), ya que DHA es promotor de las hormonas que regulan la reproducción, maduración y eclosión de los huevos en los crustáceos (Middleditch *et al.*, 1980; Cahu *et al.*, 1995).

Se ha relacionado positivamente el efecto de la composición nutricional de los copépodos con el estado nutricional de las larvas de peces marinos, haciendo énfasis en el contenido y proporción de los ácidos grasos poliinsaturados docosahexaenóico (DHA), eicosapentanoico (EPA) y araquidónico (ARA) (Bell, *et al.*, 2003; Støttrup, 2000). Bell *et al.*, (1994) mencionan que los altos contenidos de EPA, inhiben la producción de eicosanoides provenientes del ARA, encargados de la síntesis de prostaglandinas, ya que tienen un papel importante en reproductiva y en la producción hormonal.

El contenido de ácidos grasos de las dietas utilizadas en este trabajo se ve reflejado positivamente en el contenido de ácidos grasos esenciales de los copépodos. Las proporciones de DHA/EPA y EPA/ARA de la mezcla de las microalgas ISG-CHM (0.91 y 2.55 respectivamente), son similares a las proporciones observadas en los copépodos que se alimentaron con esta dieta (DHA/EPA: 1.3 y EPA/ARA: 3.3). En los copépodos alimentados con la mezcla ISG-RHS no se observan diferencias entre las proporciones DHA/EPA de la mezcla (2.3) y los copépodos (2.5), mientras que en la proporción EPA/ARA se obtuvieron valores diferentes, de 4.4 y 3.5 para las mezclas de microalgas y copépodos, respectivamente. En el caso de los copépodos alimentados con la mezcla CHM-RHS (con proporciones de DHA/EPA y EPA/ARA de 0.35 y 2.5, respectivamente), los copépodos tuvieron proporciones de estas razones de 0.60 y 3.4 respectivamente.

Entre los trabajos que se han enfocado en la alimentación de los copépodos, pocos han estudiado su composición de ácidos grasos (Sargent *et al.*, 1997; Nanton y Castell, 1999; Støttrup, 2000; McKinnon *et al.*, 2003; Prieto *et al.*, 2006).

De acuerdo con Støttrup (2000) y Sargent *et al.* (1999), los copépodos calanoides deben obtener los ácidos grasos DHA, EPA y ARA en su dieta microalgal, ya que posiblemente no tengan las enzimas para desaturar y elongar cadenas de ácidos grasos que son indispensables para la conversión de $18:2\omega6$ a $20:5\omega6$ y de $18:3\omega3$ a $20:5\omega3$ y para convertir el $20:5\omega3$ a $22:6\omega3$. Es importante analizar el contenido de éstos compuestos en los copépodos, principalmente los ácidos grasos esenciales, si lo que se pretende es utilizarlos como alimento para larvas de peces marinos.

Sargent *et al.* (1997) mencionan que una relación de DHA/ EPA de 2:1 es adecuada para un buen crecimiento y para la formación del tejido nervioso de las larvas de peces marinos, en tanto que la relación adecuada de EPA/ARA es de 5:1. En el caso de los crustáceos la proporción de ácidos grasos esenciales recomendados en la dieta son 1:1 para que las hembras maduras puedan llevar a cabo la síntesis de triglicéridos en la formación de huevos y almacenamiento de tejido corporal, mientras que en larvas su función principal es promover el crecimiento (Middleditch *et al.*, 1980; Cahu *et al.*, 1995).

Los copépodos alimentados con la dieta ISG-RHS cubrirían los requerimientos de los peces marinos, ya que las proporciones DHA/EPA son de 2.5:1. Los copépodos alimentados con esta dieta tuvieron una proporción de EPA/ARA de 3.5:1, siendo más alejada de la recomendable por Sargent *et al.* (1997). No obstante, los requerimientos absolutos de estos ácidos grasos y sus proporciones son especie específicos, por lo que resulta esencial evaluar el aporte nutricional de los copépodos alimentados con estas dietas algales sobre la fisiología de las larvas de peces.

En los copépodos alimentados con la dieta CHM-RHS las proporciones de DHA/EPA y EPA/ARA fueron de 0.6:1 y 3.4:1 respectivamente, por lo que no cumplirían con los requerimientos mencionados, la menor proporción de DHA/EPA en los copépodos alimentados con la dieta está siendo definida por un mayor contenido de EPA que de DHA, por lo que no sería recomendable utilizarlos como alimento de peces marinos.

Sargent *et al.* (1999) mencionan que altos contenidos de EPA inhiben la producción de eicosanoides provenientes del ARA, debido a que el EPA y el ARA compiten por la enzima ciclooxigenasa involucrada en la síntesis de prostaglandinas, las cuales están involucradas en varios procesos de regulación celular incluyendo el control de fluidos y el flujo de electrólitos, procesos de coagulación, la regulación del sistema cardiovascular, las funciones reproductivas, la modulación de la transmisión de información en el sistema neural, el funcionamiento del hipotálamo y en la regulación del flujo sanguíneo cerebral (Bell *et al.*, 1994; Sargent *et al.*, 1997), así como en la producción de hormonas involucradas en la metamorfosis y la pigmentación (Estévez *et al.*, 1997).

Conclusiones

La microalga *Rhodomonas salina* tiene un perfil de ácidos grasos adecuado, ya que contiene los tres ácidos grasos esenciales, pero al mezclarla con otra microalga, no produce buenos resultados en el cultivo a *P. euryhalinus*. *Rhodomonas salina* podría ser evaluada como dieta monoalgal en el cultivo de esta especie.

Los perfiles de ácidos grasos de las microalgas *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros muelleri*, se complementan de manera adecuada para ser utilizada como dieta mixta en *P. euryhalinus*.

Las dieta compuesta por *Isochrysis galbana*-*Chaetoceros muelleri* es adecuada para el cultivo de *P. euryhalinus* ya que con esta se obtiene mayor supervivencia y crecimiento así como menor tiempo de maduración en los copépodos.

Cuando *P. euryhalinus* se alimenta con *Isochrysis galbana*-*Rhodomonas salina* sus proporciones de DHA/EPA cumplen con las recomendadas para el cultivo de larvas de peces marinos, por lo que es necesario evaluar sus efectos en el desempeño de las larvas de peces marinos.

Referencias bibliográficas

- Abalde, J., Herrero, C. (2004). Microalgas en acuicultura: calidad nutricional. ALGAS. Boletín de la sociedad Española de Ficología. 32. 16-18 p.
- Amat-Domenech, F. (1993). Producción de zooplancton. En: F. Castelló-Orvay (Ed). Acuicultura Marina. Fundamentos biológicos y tecnología de la producción. Universidad de Barcelona. 331-358 p.
- Bastien, A. (2006). Why live microalgae are better than non-living substitutes for aquaculture feeding. Rev. Invest. Mar. 25:3. 247-249 p.
- Bell, J, Tocher D, & Sargent, J. (1994). Effect of Supplementation whit 20:3n6, 20:4n6 and 20:5n3 on the Production of Prostaglandins E and F of the 1-,2- and 3- series in Turbot (*Scophthalmus maximus*) Brain Astroglial Cells in Primary Culture. Biochim Biophys Acta. 1211:335-342 p.
- Bell, J.G., McEvoy, L.A., Estevez, A., Shields, R.J. & Sargent, J.R. (2003). Optimising lipid nutrition in firts-feeding flatfish larvae. Aquaculture. 227: 211-220 p.
- Bligh, G.E., Dyer, J.W. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology. 37:3.911-917 p.
- Brown, M.R., Jeffrey, S.W., Volkman, J.K. & Dunstan, G.A. (1997). Nutritional properties of microalgae for mariculture. Aquaculture. 151: 315-331
- Brown, M.R. (2002). Nutritional value of microalgae for aquaculture. In: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G., Simoes, N. (eds.). Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México.
- Cahu C., Cuzon G. & Quazuguel P. (1995). Effect of highly unsaturated fatty acids, α -tocopherol and ascorbic acid in broodstock diet on egg composition and development of *Penaeus indicus*. Comp. Biochem. Physiol. 112A (3/4), 417-424 p.
- Callan, C., Jordan, A. & Kling, L. (2003). Reducting *Artemia* use in the culture of Atlantic cod (*Gadus morhua*) Aquaculture. 219: 585-595 p.
- Campa-Avila, M.A. (2002). Evaluación del efecto en el valor nutricio del rotífero *Brachiopus plicatilis* alimentado con una microalga y una cianobacteria. Tesis de Maestría en Ciencias. Departamento de Acuicultura, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). 106 p.

Campos-Hernández, A., Suarez-Morales.(1994). Copépodos del Golfo de México y Mar Caribe. *Biología y Sistemática*. Conacyt. 360 p.

Castell, J.D., Bell, J.G., Tocher, D.R. & Sargent, J.R. (1994). Effects of purified diets containing different combinations of arachidonic and docohexaenoic acid on survival, growth and fatty acid composition of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*. 128, 315-333 p.

Cerón-Ortiz A. N., Cordero-Esquivel, B., Arredondo-Vega, B.O. y Voltolina, D. (2009). Effect of algal diet and temperature on survival, growth and biochemical composition of spat of the lion's paw scallop *Nodipecten subnodosus*. *Aquaculture*. 298: 64-69 p.

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

Curbelo, R., Leal, S., Nuñez, N. y Almaguer, Y. (2006). Alimentación de las primeras postlarvas de camarón *Litopenaus schmitti* con una especie de diatomea bentónica. *Rev. Invest. Mar.* 27(3): 231.236 p.

Dabrowski, M.,Bardega. R. (1984). Mouth size and predicted food size preferences of larvae of three cryprinid fish species. *Aquaculture*. 40:41-46 p.

Delbare, D., Dhert P. & Lavens, P. (1996). Manual on production and use of live food for aquaculture: Zooplankton, FAO. 252-282 p.

Driller, G., Stephane, F., Shichlau, M., Jepsen, P., Hojga, J., Almagir, K. & Hansen, B. (2011). Status and recomendations on marine copepod cultivation for use a live feed. *Aquaculture*. 315: 155-166 p.

Enright, C.T., Newkirk,G.F., Craigie, J.S. & Castell, J.D. (1986). Evaluation of phytoplankton as diets for juvenile *Ostrea edulis*. *Exp. Mar. Biol. Ecol.* 96:1-13

Estévez, A. Ishikawa, M. & Kanazawa, A. (1997). Effects of arachidonic acid on pigmentation and fatty acid composition of japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck and Schlegel). *Aquaculture*. 28: 279-289 p.

Evjemo, J., Reitan, K.I. & Olsen, Y. (2003). Copepods as live food organisms in the larval rearing of halibut larvae (*Hippoglossus hipoglossus*) with special emphasis on the nutritional value. *Aquaculture*. 227:191:210.

- Farhadian, O., Yusoff, F. M., & Mohamed, S. (2008). Nutritional values of *Apocyclops dengizicus* (Copepoda: Cyclopoida) fed *Chaetoceros calcitrans* and *Tetraselmis tetraathele*. *Aquaculture Research*. 40 (1): 74–82 p.
- Ferreira, M., Maseda, A., Fábregas, J. y Otero, A. (2008). Enriching rotifers with “premium” microalgae *Isochrysis* aff. *galbana* clone. *Aquaculture*. 279:4. 126–130 p.
- Flores-Vergara, C., Cordero-Esquivel, B., Cerón- Ortiz, A. N. y Arredondo-Vega, B.O. (2004). Combined effects of temperature and diets on growth and biochemical composition of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) spat. *Aquaculture Research*. 35:1131-1140 p.
- Flores-Vergara, C. (2006). Efecto combinado de la temperatura y la alimentación sobre el cultivo de semillas de ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* (Thunberg) Tesis de Doctorado en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 98 p.
- Flynn, K.J., Garrido, J.L. Zapata, M., Opik, H., & Hipkin, C.R. (1992). Changes in fatty acids, amino acids and carbón/ nitrogen biomass during nitrogen starvation of ammonium and nitrate grow *Isochrysis galbana*. *J Appl Phycol*. 4: 95–104 p.
- Fakusho, K., Arakawa, T. & Watanabe, T. (1980). Food value of copepod, *Tigriopus japonicus*, cultured with w-Yeast for larvae and juveniles of mud dab *Limanda yokohamae*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 46(4): 499-503 p.
- Fukuhara, O. (1987). Seed production of red sea bream, *Pagrus major* (Sparidae) in Japan. En: C J Sindermann (ed.) *Reproduction, maturation and seed production of cultured species*, NOAA Tech. Rep. 47: 13-20 p.
- Guevara, M., Bastardo, L., Cortez, R., Arredondo-Vega, B.O., Romero, L. y Gómez, P. (2011). Pastas de *Rhodomonas salina* como alimento para *Brachionus plicatilis* (Rotifera). *Rev. Biol. Trop.* 59 (4):1503-1515 p.
- Guillard, R.R.L. y Ryther, J.H. (1962). Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. *Can. J. Microbiol.* 8:229-239 p.
- Guillard, R.R.L. (1973). Division rates. En, Stein, J. R. (ed.), *Handbook of Phycological Methods*, V. 1, Cambridge University Press, Cambridge 289-312 p.
- Hamre, K. (2006). Nutrition in cod (*Gadus morhua*) larvae and juveniles. *ICES. Journal of Marine Science*. 63:267-274 p.

Halver, J. E. (1988). Fish nutrition. Academic Press Inc. School of Fisheries University of Washington. 798 p.

Hulsemann, K (1996). Copepoda. En: Gasca R y E. Suarez (eds.). Introducción al estudio de zooplancton marino. 249-295 p. El Colegio de la Frontera Sur. Chetumal, Q. Roo.

Jacobs. J. (1961). Laboratory cultivation of the marine copepod *Pseudodiaptomus coronatus* Williams. Limnol. Oceano. 6:443-446 p.

Johnson, M.W. (1939). *Pseudodiaptomus (Pseudodiaptallos) euryhalinus*, a new subgenus and species of copepoda, with preliminary notes on its ecology. Tran. Am. Microsc. Soc. 58 (3): 349-355 p.

Johnson, M.W. (1948). The postembryonic development of copepod *Pseudodiaptomus euryhalinus* and its phylogenetic significance. Tran. Am. Microsc. Soc. 68 (4): 319-330.

Knights, B. (1983). Food particle-size preferences and feeding behaviour in warm water aquaculture of European eel, *Anguilla Anguilla*. Aquaculture. 30:173-122 p.

Kleppel, G.S. (1993) On the diets of calanoid copepods. Marine Ecology Progress Series. 99: 183-145.

Knights, B. 1983. Food particle-size preferences and feeding behaviour in warm water aquaculture of European eel, *Anguilla Anguilla*. Aquaculture. 30:173-122.

Knuckey, R. M. Semmens, G., Mayer, R.J., & Rimmer, M.(2005). Development of an optimal microalgal diet for the culture of the calanoid copepod *Acartia sinjiensis*: Effect of algal species and feed concentration on copepod development. Aquaculture. 249: 339-351 p.

Kolkovski, M. (2001). Digestive enzymes in fish larvae and juveniles-implications and applications to formulated diets. Aquaculture. 200: 181-201 p.

Kraul, S. (1989). Production of live prey for marine fish larvae. J. World Aquac. Soc. 9: 595-607p.

Kurokawa, T., Shiraishi, T. & Suzuki, T. (1998). Quantification of exogenous protease derived from zooplankton in the intestine of Japanese sardine (*Sardinops melanostictus*) larvae. Aquaculture. 161: 491-499 p.

Lavens, P. y Sorgeloos, P. (1999). Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Fish Teach. Papers. 361. 256 p.

Lazo, C. J.P. (2000). Conocimiento actual y nuevas perspectivas en el desarrollo de dietas para larvas de peces marinos. En: Cruz -Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapiá-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R. (eds.). Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 19-22 Noviembre, Mérida, 300-312 p.

Léger, P., Bengtson, D. A., Simpson K. L. & Sorgeloos P. (1986). The use and nutritional value of *Artemia* as a food source. Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev. 24: 521-623 p.

Lehninger, A.L. (1995). Bioquímica. Segunda edición, Omega. 285-314 p.

Lemus, T., Arredondo-Vega, B., Guevara, M., Vásquez, A. y Carreón-Palau, L. (2006). Crecimiento y perfil bioquímico de *Chaetoceros muelleri* cultivada en sistemas discontinuos y semicontinuos Ciencias Marinas.32:3. 596-603 p.

Lora-Vilchis, M.C., Cordero-Esquivel, B. y Voltolina, D. (2004). Growth of *Artemia franciscana* fed *Isochrysis* sp. and *Cheatoceros muelleri* during its early life stages Aquaculture Research. 35:1086-1091 p.

Marshall, S.M. y Orr, A.P. (1972). The biology of marine copepod. Springer. Darmstand.195 p.

Martínez, G., Aguilera, C., Mettifogo. L. (2000). Interactive effects of diets and temperature on reproductive conditioning of *Argopecten purpuratus* broodstocks. Aquaculture. 183: 149-159 p.

McKinnon, A.D., Duggan, P.S., Nichols, P.D., Rimmer, M.A., Semmens, G. & Robino, B. (2003). The potential of tropical paracalanid copepods as live feeds in aquaculture. Aquaculture. 223: 89-106 p.

Middledich, B.S., Missler S.R., Hines H.B., Mcvey J.P., Brown A., Ward D.G. & Lawrence A.L., (1980). Metabolic profiles of penaeid shrimp: dietary lipids and ovarian maturation. Journal of Chromatography, 195: 359-368.

Milke L.M., Bricelj, M.V. & Parrish, C.C. (2008). Biochemical characterization and nutritional value of three *Pavlova* spp. in unialgal and mixed diets with *Chaetoceros muelleri* for postlarval sea scallops, *Placopecten magellanicus*. Aquaculture. 276:130-142 p.

Milione, M. y Zeng, C. (2007). The effects of algal diets on population growth and egg hatching success of the tropical calanoid copepod, *Acartia sinjiensis*. Aquaculture. 273: 656–664 p.

Mohanakumaran, N. C., Salin K. R. & Ashok, K. (2007). Use of Cyclop-eeze as a substitute for *Artemia* nauplii in larval rearing of giant freshwater *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879). *Aquaculture Nutrition*. 13 (2): 88-93 p.

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

Ortega-Acosta, O. (2011). Evaluación del cultivo semicontinuo de microalgas marinas. Tesis de Licenciatura. Universidad de Occidente. Unidad Guasave. 46 p.

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

Ohs, C.L., Rhyne A.L., Grabe S.W. & DiMaggio, M.A. (2010b). Effects of salinity on reproduction and survival of the calanoid copepod *Pseudodiaptomus pelagicus*. *Aquaculture*. 307: 219–224 p.

Osorio Galindo, M. (1998). Efecto de la temperatura y la salinidad en parámetros poblacionales de *Pseudodiaptomus euryhalinus* Johnson (Crustáceo: copépoda calanoidea) en condiciones controladas. Maestría en Manejo de Recursos Marinos. Tesis, Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, La Paz, B. C. S., México, 68 p.

Pacheco M.J., Cadena, A.M., Sánchez Saavedra M.P., Tovar R.D., y Rangel, D.C. (2010). Effect of culture medium and nutrient concentration on fatty acid content of *Chaetoceros muelleri* Rev Latinoam Biotecnol Amb Algal. 1:6-15 p.

Patil, V, T. Kallqvist, E. Olsen. G. Vogt & Gislerod. (2007). Fatty acid composition of 12 microalgas for posibles use in aquaculture feed. *Aquaculture International*.15:1-9.

Pande, S.V., Parvin, R. K. y Venkitasubramanian T.A. 1963. Microdetermination of lipids and serum total fatty acids. *Analyt. Biochem*. 6:415-423 p.

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

Payne, M.F. Ripplingale, R.J. (2001). Intensive cultivation of the calanoid copepod *Gradioleres imparipes*. *Aquaculture*. 201: 329–342 p.

Payne, M.F., Ripplingale, R.J. & Cleary, J.J. (2001). Cultured copepods as food for West Australian dhufish (*Glaucosoma hebraicum*) and pink snapper (*Pagrus auratus*) larvae. *Aquaculture*. 194: 137-150 p.

Pernet, F., Tremblay, R., Demers, E. y Roussy, M. (2003). Variation of lipid class and fatty acid composition of *Chaetoceros muelleri* and *Isochrysis* sp. grown in a semicontinuous system. *Aquaculture*. 221:393-406 p.

Prieto, M., Castaño Sierra, J., Logato, P. y Botero, J. (2006). Alimento vivo en la larvicultura de peces marinos: copépodos y mesocosmos. *Revista MVZ, Universidad de Córdoba*. 11 (1): 30-36 p.

Puello-Cruz, A.C., Mezo-Villalobos, S., González-Rodríguez, B. y Voltolina, D. (2009). Culture of the calanoid copepod *Pseudodiaptomus euryhalinus* (Johnson, 1939) with different microalgal diets. *Aquaculture*. 290: 317–319 p.

Renaud, S.M. Parry, D.L. & Thinidis, L. (1994). Microalgae for use in tropical aquaculture I. Gross chemical and fatty acid compositions of twelve species of microalgae from Northern Territory, Australia. *J. Appl. Phycol.* 6:337-345 p.

Renaud, M., Thinidis, L., Lambrinidis, G. & Parry, D. (2002). Effect of temperature on growth chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch culture. *Aquaculture*. 211:195-214 p.

Ripplingale, J.R. y Payne M.F. (2001). Intensive cultivation of a calanoid copepod *Gladioferens imparipes*. A guide to procedures. Department of environmental Biology Curtin University of Technology. 60 p.

Roncarati A., Meluzzi A., Ciarri, A., Tallarico N. & Meloti, P. (2004). Fatty acid composition of different microalgae strains (*Nannochloropsis* sp., *Nannochloropsis oculata* (Droop) Hibberd, *Nannochloris atomus* Butcher and *Isochrysis* sp.) according to the culture phase and the carbon dioxide concentration. *J. World Aquaculture Society*. 35 (3): 401-411 p.

Rosas, J., Cabrera, T. y Millán J. (1998). Efecto de cuatro especies de microalgas en el crecimiento poblacional del copépodo *Oithona ovalis* Herbst, 1955 (Crustacea: Copepoda) en el laboratorio. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 33(2): 313-323 p.

Rhyne, A.L., Ohs, C.L., & Stenn, E. (2009). Effects of temperature on reproduction and survival of the calanoid copepod *Pseudodiaptomus pelagicus*. *Aquaculture*. 292:53-53 p.

Sargent, J.R., McEnvoy, L.A. & Bell, J.G. (1997). Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. *Aquaculture*. 155: 117-127 p.

Sargent, J., McEvoy, L., Estevez, A., Bell, G., Bell, M., Henderson, J., Toucher. & Douglas. (1999). Lipids nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. *Aquaculture*. 179:217-229.

Sato, N. y Murata, N. (1988.). Membrane lipids. *Methods in Enzymology*.167:251-259.

Schipp, G.R., Bosmans, J.M.P. & Marshall, A.J. (1999). A method for hatchery culture of tropical calanoid copepods, *Acartia* spp. *Aquaculture*. 174: 81-88 p.

Schipp, G.(2006). The use of calanoid copepods in semi-intensive, tropical marine fish larviculture. In: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G., Simoes, N. (eds.). *Avances de nutrición acuícola VII. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 15-17 Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León.

Seixas, P., Coutinho, P., Ferreira, M. & Otero, A. (2009). Nutritional value of the cryptophyte *Rhodomonas lens* for *Artemia* sp. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 381(1): 1–9.

Shepher, J. y Bromage, N. (1992). *Intensive Fish Farming*. Blackwell. Publications. 404 p.

Schipp, G.R., Bosmas J.M, & Marshall, J.A. (1999). A method for hatchery culture of tropical calanoide copepods, *Acartia* spp. *Aquaculture*. 174: 81-88.

Shields, R. (2001). Larviculture of marine finfish in Europe. *Aquaculture*. 200:55-88

Spenelli, J. (1979). Preparation of salmonid diets containing zooplankton and their effect on organoleptic properties of pen reared salmonids. En: J.E. Halver y K. Tiews (eds.). *Proceeding of the world symposium on finfish nutrition and fishfeed technology*, 20-23 June 1978..328-392 p.

Støttrup, J.G (1986). Live food cultures for marine fish larvae *Nordisk Aquaculture*. 2(6): 22-23 p.

Støttrup, J.G. (2000). The elusive copepods: their production and suitability in marine aquaculture. *Aquaculture Research*. 31: 703–711 p.

Støttrup, J.G y Norsker N.H. (1997). Production and use of copepods in marine fish larviculture. *Aquaculture*, 155: 231-247 p.

Sorgeloos, P., Dhert, P. & Candevra, P. (2001). Use the brine shrimp *Artemia* sp., in marine fish larviculture. *Aquaculture*. 200:147-159 p.

Sorokin C. (1973). Dry weight packed cell volume and optical density. En: *Handbook of Phycological Methods. Culture methods and growth measurement*, Cambridge University Press. 321-343 p.

Sun, B. y Fleeger, J. W. (1995.) Sustained mass culture of *Amphiascoides atopus* a marine harpacticoid copepod in a recirculating system. *Aquaculture*. 136:313-321 p.

Thompson, P.A., Gua, M., Harrison, P.J. & Whyte, J.N.C. (1993). Effects of variation in temperature.II. on the fatty acid composition of eight species of marine phytoplankton. *J.Phycol.* 28: 488- 197.

Thompson, P.A., Gua, M., Harrison, P.J. & Whyte, J.N.C. (1996) Nutritional value of diets that vary in fatty acid composition for larval Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*.143: 379-391.

Treece, G. D. y Davies A. D. (2000). Culture of small zooplankters for the feeding of larval fish. Southern Regional Aquaculture Center. Publication 701.

Tremblay, R., Cartier, S., Miner, P., Pernet, F., Quere, C., Moal, J., Muzellec, M. & Samain, J. (2007). Effect of *Rhodomonas salina* addition to a standard hatchery diet during the early ontogeny of the scallop *Pecten maximus*. *Aquaculture*. 262: 410-418 p.

Trujillo- Valle, M.L. Voltolina D. (1994). Cultivo de microalgas para la acuicultura. Serie Científica, UABCS 2(1): 7-85 p.

Tucker, J.W. (1998). *Marine fish culture*. Kluwer. 750 p

Valenzuela-Espinoza, E. (1997). Uso de un medio alterno al f/2 para el cultivo de *Isochrysis aff galbana* (CLONE T-ISO). Tesis de Maestría, UABC. Ensenada, Baja California.51 p.

Van Nieuweburgh. L. (2004). Experimental studies on the regulation of pigment dynamics in phytoplankton and copepods by dissolved Inorganic nutrients. Tesis de Doctorado, Acta Universitatis Upsaliensis. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology. 134 p.

- Walter, T.C. (1989). Review of the new world species of *Pseudodiaptomus* (Copepoda:Calanoidea) with a key to the species, Bull.Mar.Sci. 45(3): 590-628.
- Watanabe, T., Kitajima, C., Fujita. S. 1983. Nutricional values of live organism used in Japan for mass propagation on fish: A review. Aquaculture. 34: 1115-143 p.
- Watanabe, T. y Kiron, V. (1994). Review prospects in larval fish dietetics. Aquaculture, 124: 223-251 p.
- Watanabe, T., Kitajima, C., Fujita. S. 1983. Nutricional values of live organism used in Japan for mass propagation on fish: A review. Aquaculture. 34: 1115-143
- Webb, K.L. y Chu F.E. (1983). Phytoplankton as a food source for bivalve larvae. 272-291. En: Pruder; C.J. Langdon y D.E. Conklin (eds.). Proceedings of the Second International Conference on Aquaculture Nutrition: Biochemical and physiological approaches to shellfish nutrition, Spec. Publ. 2, G.D. Louisiana State Univ.
- Yufera, M. y Pascual, E. (1984). La producción de organismos zooplanctónicos para la alimentación larvaria en acuicultura marina. Inf. Tec. Inst. Inv. Pesqueras.119:27 p.
- Zhu, C. J., Lee, Y.T., & Chao, T. M. (1997). Effects of temperatura and grow phase on lipid and biochemical composition of *Isochrysis galbana* TK1. Journal of Applied Phycology 9:451-457 p.