



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



**EFFECTO DE LA COMPOSICION BIOQUIMICA DE
MICROALGAS SOBRE EL VALOR NUTRITIVO DE DOS
CEPAS DE *Artemia***

TESIS

que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias
presenta:

Christine Johanna Band Schmidt

CICIMAR
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS
BIBLIOTECA
I. P. N.
DONATIVO

La Paz, B.C.S., abril de 1999.

INDICE

	Pag
GLOSARIO.	I
RELACION DE FIGURAS.	II
RELACION DE TABLAS.	III
RESUMEN.	V
ABSTRACT	VI
I.- INTRODUCCION.	1
II.- ANTECEDENTES.	3
2.1.- Composición bioquímica de las microalgas.	3
2.2.- <i>Chaetoceros</i> sp.	4
2.3.- <i>Neochloris oleoabundans</i> .	4
2.4.- <i>Dunaliella</i> sp.	5
2.5.- <i>Artemia</i> en la acuicultura.	6
2.6.- Requerimientos nutricionales de <i>Artemia</i> .	8
2.7.- Poblaciones de <i>Artemia</i> en Oaxaca.	10
III.- JUSTIFICACION.	13
IV.- OBJETIVOS.	14
V.- AREA DE COLECTA.	15
VI.- METODOLOGIA.	17
6.1.- Origen de las cepas y condiciones de cultivo.	17
6.1.1.- Cepas.	17
6.1.2.- Aislamiento de <i>Dunaliella</i> sp.	17
6.1.3.- Medios de cultivo.	17
6.1.4.- Condiciones de cultivo.	18
6.2.- Curvas de crecimiento.	18
6.2.1.- Raciones.	18
6.3.- Procesamiento de las muestras de microalgas.	19
6.3.1.- Biomasa.	19
6.3.2.- Paquete celular.	19
6.3.3.- Proteínas y carbohidratos.	20
6.3.4.- Lípidos totales.	20
6.4.- Obtención de nauplios de <i>Artemia</i> .	20
6.4.1.- Colecta de quistes.	20
6.4.2.- Lavado de quistes.	20
6.4.3.- Secado.	21
6.4.4.- Hidratación de quistes.	21
6.4.5.- Descapsulación.	21
6.4.6.- Incubación.	21
6.4.7.- Nauplios.	21
6.5.- Control de organismos y sobrevivencia.	21
6.6.- Formación de parejas y producción de progenie.	22
6.7.- Procesamiento de las muestras de <i>Artemia</i> .	22
6.7.1.- Recolecta de adultos.	22
6.7.2.- Biomasa.	22
6.7.3.- Proteínas, lípidos y carbohidratos.	23
6.8.- Tratamiento estadístico.	23
VII.- RESULTADOS.	24
7.1.- Cultivo de microalgas.	24
7.1.1.- Aislamiento.	24
7.1.2.- Curvas de crecimiento.	24
7.1.3.- Composición bioquímica.	29
7.2.- Cultivos de <i>Artemia</i> .	30
7.2.1.- Condiciones de cultivo	30
7.2.2.- Porcentaje de sobrevivencia.	31
7.2.3.- Crecimiento.	32
7.2.4.- Estadios.	41
7.2.5.- Formación de parejas.	42

7.2.6.- Producción de nauplios.	45
7.3.- Composición bioquímica.	48
VIII.- DISCUSION.	49
8.1.- Cultivo de microalgas.	49
8.1.1.- Curvas de crecimiento.	49
8.1.2.- Composición bioquímica.	52
8.2.- Cultivo de <i>Artemia</i> .	53
8.2.1.- Sobrevivencia.	53
8.2.2.- Crecimiento y estadios	54
8.2.3.- Formación de parejas.	56
8.2.4.- Producción de nauplios.	57
8.2.5.- Composición bioquímica.	58
IX.- CONCLUSIONES.	60
X.- RECOMENDACIONES.	61
XI.- ANEXO.	62
XII.- LITERATURA CITADA.	63

GLOSARIO

Artemia: crustáceo primitivo de los anostracos perteneciente a la subclase Branchiopoda; se caracteriza por presentar un cuerpo alargado y carecer de caparazón rígido. Tiene un elevado valor económico por su aplicación en la acuicultura.

Carbohidratos: compuestos orgánicos integrados por carbono, hidrógeno y oxígeno, incluyen los azúcares, almidones y celulosas.

Eficiencia de eclosión: número de nauplios que se producen a partir de 1 g de quistes secos cuando se les incuban bajo condiciones estándar de eclosión (48 horas de incubación, agua de mar a 35 ‰ saturada de oxígeno a 25°C, mínimo de 1000 lux de iluminación y pH entre 8 y 8.5).

Estrés: estímulo o sucesión de estímulos de tal magnitud que tienden a alterar la homeostasis de un organismo.

Lípidos: compuesto perteneciente a una clase de sustancias que contienen hidrocarburos alifáticos de largas cadenas y sus derivados, tales como ácidos grasos, alcoholes, aminoalcoholes y aldehídos.

Metanauplio: estado larvario primitivo de ciertos crustáceos decápodos caracterizados por poseer siete pares de apéndices, sigue al estado de nauplio. Se inicia con la primera muda y comprende cuatro estadios de desarrollo. En el primer estadio se inicia la ingestión de alimento por filtración.

Microalga: microorganismo fotosintético no vascular que contiene clorofila "a" y posee estructuras reproductoras simples.

Nauplio: estado larvario con cuerpo insegmentado y oval, posee tres pares de apéndices: anténulas unirramadas, antenas y mandíbulas birramadas. En *Artemia* abarca desde que el nauplio emerge del quiste hasta la primera muda.

Porcentaje de eclosión: número de nauplios que pueden ser producidos a partir de 100 quistes hidratados y conteniendo un embrión.

Postmetanauplio: incluye siete estadios de desarrollo, se completa el número de somitas del tronco y el inicio de la transformación de las antenas hacia su forma y función definitiva.

Proteínas: cualquier tipo de polímero de alto peso molecular compuesto por una gran variedad de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos.

Tasa de sincronía: tiempo transcurrido entre la eclosión del 10% y el 90% del total de los nauplios eclosionables.

RELACION DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1.- Localización del área de colecta.	16
Figura 2.- Concentración celular de <i>Chaetoceros</i> sp. cultivada en medio f/2 y medio MII. Valores calculados y observados.	24
Figura 3.- Concentración celular de <i>Dunaliella</i> sp. cultivada en medio f/2 y medio MII. Valores calculados y observados.	25
Figura 4.- Concentración celular de <i>Neochloris oleoabundans</i> cultivada en medio f/2 y medio MII. Valores calculados y observados.	26
Figura 5.- Arcoseno de la raíz cuadrada del porcentaje de sobrevivencia hasta el inicio de la formación de parejas en la <i>Artemia</i> San Francisco y <i>Artemia</i> de La Colorada alimentadas con <i>Chaetoceros</i> sp. y <i>Dunaliella</i> sp. con un valor de confianza de 0.05.	32
Figura 6.- Gráfica de interacción de dos vías de la talla de <i>Artemia</i> de San Francisco y <i>Artemia</i> de La Colorada hasta los nueve días de edad alimentadas con <i>Chaetoceros</i> sp. con un valor de confianza de 0.05.	35
Figura 7.- Gráfica de interacción de dos vías de la talla de <i>Artemia</i> de San Francisco y <i>Artemia</i> de La Colorada hasta los siete días de edad alimentadas con <i>Dunaliella</i> sp. con un valor de confianza de 0.05.	35
Figura 8.- Logaritmo natural de la talla en micras de <i>Artemia</i> San Francisco alimentada con <i>Chaetoceros</i> sp. y <i>Dunaliella</i> sp.	36
Figura 9.- Logaritmo natural de la talla en micras de <i>Artemia</i> La Colorada alimentada con <i>Chaetoceros</i> sp. y <i>Dunaliella</i> sp.	37
Figura 10.- Regresión exponencial de <i>Artemia</i> San Francisco alimentada con <i>Chaetoceros</i> sp. y <i>Dunaliella</i> sp.	38
Figura 11.- Regresión exponencial de <i>Artemia</i> La Colorada alimentada con <i>Chaetoceros</i> sp. y <i>Dunaliella</i> sp.	38
Figura 12.- Regresión exponencial de <i>Artemia</i> San Francisco y La Colorada alimentada con <i>Chaetoceros</i> sp. hasta el día nueve.	40
Figura 13.- Arcoseno de la raíz cuadrada del porcentaje de formación de parejas de <i>Artemia</i> San Francisco y <i>Artemia</i> La Colorada alimentadas con <i>Chaetoceros</i> sp. y <i>Dunaliella</i> sp. con un valor de confianza de 0.05.	43
Figura 14.- Gráfica de interacción de dos vías del número total de parejas de <i>Artemia</i> San Francisco y <i>Artemia</i> La Colorada alimentadas con <i>Chaetoceros</i> sp. y <i>Dunaliella</i> sp. con un valor de confianza de 0.05.	44
Figura 15.- Gráfica de interacción de dos vías del número de nauplios de <i>Artemia</i> San Francisco y <i>Artemia</i> La Colorada alimentadas con <i>Chaetoceros</i> sp. y <i>Dunaliella</i> sp. con un valor de confianza de 0.05.	46
Figura 16.- Gráfica de interacción de dos vías de la relación nauplios/pareja de <i>Artemia</i> San Francisco y <i>Artemia</i> La Colorada alimentadas con <i>Chaetoceros</i> sp. y <i>Dunaliella</i> sp. con un valor de confianza de 0.05.	47

Tabla 17.- Valor del estadístico "q" y significancia de la comparación entre cada par de pendientes.	39
Tabla 18.- Análisis de regresión realizado con los datos ajustados al modelo exponencial para los tratamientos de <i>Artemia</i> alimentados con <i>Chaetoceros</i> sp. hasta el día nueve.	40
Tabla 19.- Análisis de covarianza de los modelos de crecimiento obtenidos alimentando ambas cepas de <i>Artemia</i> con <i>Chaetoceros</i> sp. hasta los nueve días de edad con un valor de confianza de 0.05.	40
Tabla 20.- Duración en días de los diferentes estadios de <i>Artemia</i> La Colorada y San Francisco con tres dietas.	41
Tabla 21.- Datos del total de formación de parejas de <i>Artemia</i> de La Colorada y <i>Artemia</i> de San Francisco alimentadas con tres dietas.	43
Tabla 22.- Análisis de varianza de doble vía para el arcoseno del porcentaje de formación de parejas de <i>Artemia</i> San Francisco y <i>Artemia</i> La Colorada alimentadas con <i>Chaetoceros</i> sp. y <i>Dunaliella</i> sp. con un valor de confianza de 0.05.	44
Tabla 23.- Análisis de varianza del número total de parejas de <i>Artemia</i> San Francisco y <i>Artemia</i> La Colorada alimentadas con <i>Chaetoceros</i> sp. y <i>Dunaliella</i> sp. con un valor de confianza de 0.05.	44
Tabla 24.- Producción total de nauplios y nauplios por pareja durante 72 horas de <i>Artemia</i> de San Francisco y <i>Artemia</i> de La Colorada con tres dietas de microalgas.	45
Tabla 25.- Análisis de varianza de dos vías para el número de nauplios en <i>Artemia</i> de San Francisco y <i>Artemia</i> La Colorada alimentadas con la dieta de <i>Chaetoceros</i> sp. y <i>Dunaliella</i> sp. con un valor de confianza de 0.05.	46
Tabla 26.- Análisis de varianza de dos vías para la relación nauplios/pareja de ambas cepas de <i>Artemia</i> con la dieta de <i>Chaetoceros</i> sp. y <i>Dunaliella</i> sp. con un valor de confianza de 0.05.	47
Tabla 27.- Contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos de <i>Artemia</i> de San Francisco y <i>Artemia</i> de La Colorada alimentadas con. <i>Chaetoceros</i> sp. y <i>Dunaliella</i> sp. cultivadas en medio f/2.	48

RELACION DE TABLAS

	Pag.
Tabla 1.- Géneros de algas que se utilizan más frecuentemente como alimento para <i>Artemia</i> sp.	9
Tabla 2.- Registro de salinas del Estado de Oaxaca (México), datos hasta junio de 1990.	11
Tabla 3.- Raciones diarias de alimento para <i>Artemia franciscana</i> alimentada con <i>Chaetoceros</i> sp., <i>Dunaliella</i> sp. y <i>Neochloris oleoabundans</i> .	19
Tabla 4.- Modelo lineal del logaritmo natural de las concentraciones celulares de <i>Chaetoceros</i> sp., <i>Dunaliella</i> sp. y <i>N. oleoabundans</i> cultivadas en medio f/2 y medio MIII.	26
Tabla 5.- Análisis de covarianza de la densidad celular de <i>Chaetoceros</i> sp. cultivada en medio f/2 y medio MIII del primer día hasta el segundo y del primer día hasta el tercero respectivamente.	27
Tabla 6.- Análisis de covarianza de la densidad celular de <i>Dunaliella</i> sp. cultivada en medio f/2 y medio MIII desde el primer día hasta el tercero.	27
Tabla 7: Análisis de covarianza de la densidad celular de <i>N. oleoabundans</i> cultivada en medio f/2 y medio MIII del primer día hasta los nueve días.	27
Tabla 8.- Valores de tasa de crecimiento, tiempo de generación y número de generaciones por día de <i>Chaetoceros</i> sp., <i>Dunaliella</i> sp. y <i>N. oleoabundans</i> , en medio f/2 y medio MIII.	28
Tabla 9.- Contenido de carbohidratos, proteínas y lípidos en <i>Chaetoceros</i> sp., <i>Neochloris oleoabundans</i> y <i>Dunaliella</i> sp. en medio f/2 y medio MIII (valores medios y desviación estándar).	29
Tabla 10.- Condiciones fisicoquímicas en los acuarios con <i>Artemia</i> de San Francisco y <i>Artemia</i> de La Colorada alimentados con tres especies de microalgas cultivadas en medio f/2 (valores medios y desviación estándar).	30
Tabla 11.- Porcentaje de sobrevivencia de <i>Artemia</i> de La Colorada y <i>Artemia</i> San Francisco al alimentarlas con tres especies de microalgas hasta el inicio de la formación de parejas (valores medios y desviación estándar).	31
Tabla 12.- Análisis de varianza de dos vías para el arcoseno del porcentaje de sobrevivencia de <i>Artemia</i> de San Francisco y La Colorada alimentadas con las dietas de <i>Chaetoceros</i> sp. y <i>Dunaliella</i> sp. con un valor de confianza de 0.05.	31
Tabla 13.- Tallas y estadios de <i>Artemia</i> San Francisco y <i>Artemia</i> de La Colorada alimentadas con tres dietas hasta el noveno día del cultivo.	33
Tabla 14.- Análisis de varianza triple para las tallas (μm) transformadas a \ln de las cepas de <i>Artemia</i> con las dietas de <i>Chaetoceros</i> sp. y <i>Dunaliella</i> sp. durante siete días con un valor de confianza de 0.05.	34
Tabla 15.- Análisis de regresión realizado con los datos ajustados al modelo exponencial para todos los tratamientos hasta el día siete con un valor de confianza de 0.05.	37
Tabla 16.- Análisis de covarianza de los modelos obtenidos hasta los siete días de cultivo con un valor de confianza de 0.05.	39

RESUMEN

Con el propósito de emplear microalgas endémicas para el cultivo de *Artemia* regional, se aisló una microalga de la salina La Colorada, ubicada en el municipio de Santiago Astata, Oax., la cual se identificó tentativamente como *Dunaliella* sp. Esta microalga junto con *Chaetoceros* sp. y *Neochloris oleoabundans* se cultivó en dos medios de cultivo: el f/2 de Guillard y un medio no convencional, preparado con fertilizantes agrícolas (MIII). Se comparó el valor nutritivo de las tres microalgas cultivadas en medio f/2 al alimentar nauplios eclosionados de quistes de la salina La Colorada y nauplios de quistes de San Francisco. Los nauplios se alimentaron con raciones diarias progresivas desde 150 hasta 2750×10^3 cel/ml, evaluando la sobrevivencia, el crecimiento, la duración de estadios, el número de parejas formadas, la producción de nauplios y la composición bioquímica en porcentaje de peso seco total de proteínas, carbohidratos y lípidos. En las tres cepas de microalgas hubo una diferencia significativa entre las tasas de crecimiento al ser cultivadas en medio f/2 y medio MIII, *Chaetoceros* sp. y *Dunaliella* sp. presentaron mayores tasas de crecimiento en medio MIII y *N. oleoabundans* en medio f/2. Las densidades del cultivo en todos los casos fue menor en medio MII. El contenido de proteínas de *Chaetoceros* sp. fue más elevado en medio MIII ($40.2 \pm 1\%$) que en medio f/2 ($25.5 \pm 8\%$). *Dunaliella* sp. presentó mayor contenido de carbohidratos en medio MIII que en medio f/2 ($49.3 \pm 3\%$ y $15.5 \pm 5\%$ respectivamente). *N. oleoabundans* presentó mayor contenido de carbohidratos en medio f/2 que en medio MIII. Tanto *Artemia* de La Colorada como *Artemia* de San Francisco, al ser alimentadas con las dietas de *Dunaliella* sp. y *Chaetoceros* sp., presentaron una sobrevivencia arriba del 60%. El análisis de covarianza correspondiente indica que no existe una diferencia importante en la velocidad de crecimiento entre las dos cepas de *Artemia* con la dieta de *Chaetoceros* sp. y *Dunaliella* sp. pero sí en las tallas alcanzadas, siendo mayor con la dieta de *Chaetoceros* sp. para *Artemia* de San Francisco y para *Artemia* de La Colorada con la dieta de *Dunaliella* sp. *Artemia* de San Francisco con la dieta de *Chaetoceros* sp. presentó mayor número de parejas, en *Artemia* de La Colorada no se observaron diferencias significativas en la formación de parejas con las dietas de *Chaetoceros* sp. y *Dunaliella* sp. Al alimentar a *Artemia* de San Francisco y *Artemia* de La Colorada con *Chaetoceros* sp. hubo una mayor producción de nauplios. *Artemia* de La Colorada alimentada con *Dunaliella* sp. alcanzó en menor tiempo la fase adulta que con la dieta de *Chaetoceros* sp. *N. oleoabundans* no es una dieta adecuada para *Artemia*, ya que hubo una gran mortalidad desde los estadios iniciales. Dado los resultados se consideró que *Artemia* de La Colorada y *Artemia* de San Francisco podría ser alimentada con *Dunaliella* sp. y *Chaetoceros* sp. Para comparar las curvas de crecimiento de las microalgas se utilizó el análisis de covarianza. Se emplearon tres repeticiones por dieta y se realizaron análisis estadísticos de Bartlett y Kolmogorov-Smirnov, prueba "t" de Student y análisis de varianza bi y trifactorial con un α de 0.05, realizando una transformación arcoseno previa a los datos expresados en porcentaje.

ABSTRACT

With the aim of using endemic microalgae for the cultivation of regional *Artemia* we isolated a microalgae which has been identified tentatively as *Dunaliella* sp. from the saline La Colorada, situated in Santiago Astata, Oax. This microalgae, *Chaetoceros* sp. and *N. oleoabundans* were cultivated in two media: f/2 of Guillard and a non conventional media, prepared with agricultural fertilizers (MIII). The nutritive value of the three microalgae cultivated in media f/2 were compared by feeding *Artemia* nauplii from cysts from La Colorada and *Artemia* nauplii from cysts of San Francisco. The nauplii were fed with daily rations that incremented progressively from 150 to 2750 x 10³ cell/ml, evaluating the percentage of survival, total length, duration of stages, number of couples formed, production of nauplii and biochemical composition (protein, carbohydrate and lipid) expressed in percentage of dry weight. In the three strains of microalgae there was a significant difference in the growth rates when cultivated in both media, *Chaetoceros* sp. and *Dunaliella* sp. had higher growth rates in media MIII and *N. oleoabundans* in f/2. The densities obtained in all the strains were lower in media MIII. The content of protein in *Chaetoceros* sp. was higher in media MIII (40.2 ± 1%) than in f/2 (25.5 ± 8%); on the other hand *Dunaliella* sp. presented a higher concentration of carbohydrates in media MIII than in f/2 (49.3 ± 3% and 15.5 ± 5% respectively). *N. oleoabundans* had a higher content of carbohydrates when cultivated in f/2. *Artemia* of La Colorada and San Francisco fed with *Dunaliella* sp. and *Chaetoceros* sp. presented a survival above 60%. The covariance analysis indicates that there isn't a significant difference in the growth rate between both strains of *Artemia* with the diet of *Chaetoceros* sp. and *Dunaliella* sp., but there was a significant difference in the length obtained, being higher with the diet of *Chaetoceros* sp. in *Artemia* of San Francisco and in *Artemia* La Colorada with the diet of *Dunaliella* sp. *Artemia* of San Francisco fed with *Chaetoceros* sp. presented a higher number of couples, in *Artemia* La Colorada there weren't significant differences between the different diets. Both strains of *Artemia* fed with *Chaetoceros* sp. had a higher production of nauplii. *Artemia* La Colorada with the diet of *Dunaliella* sp. reached in a shorter period the adult stage, than with the diet of *Chaetoceros* sp. *N. oleoabundans* isn't a good diet for *Artemia* because there was a high mortality in the initial stages. *Artemia* La Colorada and *Artemia* San Francisco can be fed with *Dunaliella* sp. and *Chaetoceros* sp. Three repetitions per trial were realized. The statistical analysis used were: Bartlett and Kolmogorov-Smirnoff test, "t" of Student test, covariance analysis and bi o trifactorial variance analysis with a previous arcsen transformation of the data with a significant value of 0.05.

I.- INTRODUCCION

El objetivo principal en la producción de alimento vivo es establecer una cadena alimenticia controlada, que normalmente inicia cultivando células algales microscópicas para alimentar a organismos zooplanctónicos, los cuales a su vez servirán de alimento a peces y/o invertebrados. Sin este requisito la red alimenticia en un sistema intensivo se encuentra incompleta, por lo cual los acuicultores tratan de superar esta deficiencia racionando alimentos en forma de hojuelas, mezclas gelatinizadas, refrigerados y/o congelados. A pesar de los cuidados que se tengan al utilizar alimentos no vivos o procesados, generalmente se tienen problemas debido a deficiencias nutricionales o por degradación de la calidad del agua. Experiencias en el cultivo de peces e invertebrados acuáticos en sus primeros estadios han demostrado que se obtiene una mayor sobrevivencia al utilizar alimento vivo exclusivamente o combinándolo con algún alimento inerte (Johnson, 1976; Hoff y Snell, 1993).

Desde el punto de vista nutricional, las microalgas son una fuente de macronutrientes (proteínas, carbohidratos, lípidos), micronutrientes (vitaminas y minerales) y en el grupo de los lípidos los ácidos grasos esenciales; además proveen de pigmentos que acentúan la coloración en organismos que los ingieren (Hoff y Snell, 1993). De acuerdo a las características anteriores las microalgas son una buena fuente alimenticia para organismos como corales, esponjas, rotíferos, balanos, poliquetos, ascidias, moluscos, crustáceos y peces (Hoff y Snell, 1993); por lo que un sistema acuicultural debe contar con métodos eficientes de producción que garanticen la cantidad y calidad de las microalgas ya que constituye un paso indispensable para la continuidad del sistema.

Por otra parte, se han utilizado varias especies de microalgas en la acuicultura que no siempre son adecuadas para mantener el crecimiento de un organismo en particular. Lo anterior se debe a que existen diferencias de tamaño, digestibilidad y valor nutricional; este último depende principalmente de la composición bioquímica de la microalga y de las necesidades nutricionales específicas del organismo a cultivar (Brown *et al.*, 1989).

Dentro de las especies más frecuentemente utilizadas en la acuicultura se encuentran las siguientes: *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira pseudonana*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Chaetoceros calcitrans*, *Pavlova lutheri*, *Isochrysis galbana*, *Isochrysis* sp. "Thaiti", *Tetraselmis suecica*, *Dunaliella salina*, *Spirulina* sp., *Monochrysis lutheri*, *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp. y *Tetraselmis chui* (Le Borgne, 1990).

El tipo y las concentraciones de microalgas, son problemas de importancia primaria en la acuicultura y por esto las investigaciones en este sentido son de gran utilidad. En general, se busca obtener a través del suministro de una dieta específica la máxima tasa de crecimiento posible del organismo en cultivo, con lo cual se consigue una optimización espacial de las

instalaciones, del tiempo de cultivo y de la biomasa obtenida por unidad de volumen y tiempo, que dan como resultado una reducción en los costos de producción (Sommer *et al.*, 1990).

Es importante señalar que no es suficiente mantener una elevada producción algal, sino que también hay que transferir eficientemente este alimento a organismos alimentados con microalgas (Fábregas *et al.*, 1986). Para que esto se logre, se debe de tomar en cuenta al menos tres características de la célula: composición bioquímica, tamaño y digestibilidad (Fernández-Reiriz *et al.*, 1989), así como considerar la técnica de cultivo (continuo, semicontinuo), tasa de dilución, concentración y nutrientes requeridos, factores fisicoquímicos y la fase de crecimiento en que se coseche a las microalgas (Fábregas *et al.*, 1989; Fogg y Thake, 1987).

Un sistema acuícola frecuentemente inicia la trama alimenticia con la producción de: microalgas y zooplancton (como rotíferos, cladóceros y *Artemia*). Para desarrollar proyectos de acuicultura es importante la producción de alimento vivo, con métodos eficientes que garanticen la cantidad y calidad de la producción para la continuidad del sistema.

A pesar de que la *Artemia* no forma parte de la dieta natural de peces y crustáceos, se ha usado ampliamente en la acuicultura como alimento de dichos organismos, debido principalmente a su calidad nutricional, ciclo biológico de 12 a 17 días y a la facilidad de su manejo en el laboratorio, ya que al formar quistes, estos se pueden utilizar cuando se requieran, bastando solamente ponerlos en condiciones favorables de salinidad, temperatura, oxígeno, pH e iluminación (Castro y Gallardo, 1985).

La calidad nutricional de la *Artemia* varía tanto geográfica como temporalmente de una cepa a otra, así como con el alimento que se le ofrezca. En el medio natural su principal fuente de alimentación son microalgas, bacterias y detritus; sin embargo en cultivo se han probado alimentos provenientes de diversas fuentes, tales como levaduras, bacterias, microalgas, salvado de trigo, de arroz, microencapsulados, etc. (Castro y Gallardo, 1985; Chiu-Liao *et al.*, 1986). Dentro de las microalgas que cumplen con sus requerimientos nutricionales se encuentran *Pavlova lutheri*, *Tetraselmis maculata*, *Isochrysis galbana*, *Rhodomonas* sp. (Provasoli *et al.*, 1970) y *Chaetoceros* sp. (Arriaga-Haro, 1993).

Por otra parte, a pesar de que la alimentación en cultivos de moluscos, peces y crustáceos se basa en cepas de *Artemia* comerciales de una calidad nutricional conocida, representa una inversión fuerte en el desarrollo de un cultivo, el utilizar cepas regionales podría ser una manera de abaratar los costos de producción. El interés de este proyecto fue el de realizar estudios nutricionales con especies de microalgas regionales para alimento de dos cepas de *Artemia*, una regional colectada de la salina de La Colorada, Oaxaca (México) comparándola con una cepa de *Artemia* comercial de la Bahía de San Francisco, CA., EE.UU.

II.- ANTECEDENTES

2.1.- COMPOSICION BIOQUIMICA DE LAS MICROALGAS

La concentración de proteínas, carbohidratos y lípidos de las microalgas puede modificarse alterando las condiciones ambientales como: concentración de nutrientes, temperatura, intensidad luminosa, así como el estado fisiológico: edad de la población, densidad de la población, desarrollo autotrófico o heterotrófico (Dubinsky *et al.*, 1978; Aaronson *et al.*, 1980; Ben-Amotz *et al.*, 1985; Becker, 1986; Gudín y Thepenier, 1986).

El contenido de proteínas en las algas puede variar de un 30 a un 65% de su peso seco (Becker, 1986). El valor nutricional de las proteínas está determinado por el contenido y proporción de los aminoácidos estos no varían entre las diferentes especies de microalgas, por lo tanto las diferencias en la calidad nutricional de las microalgas, en la mayoría de los casos no está relacionada con la composición de los aminoácidos (Webb y Chu, 1983).

La composición de carbohidratos, en términos de azúcares específicos, puede variar considerablemente entre las especies de algas. Generalmente la glucosa se encuentra en concentraciones mayores, seguido por galactosa, manosa y ribosa. Mientras que las proporciones relativas pueden ser significativas, la estructura del azúcar es igualmente importante. Los azúcares pueden presentarse como monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos o polisacáridos. El tipo y los enlaces específicos de un polisacárido determinan si los azúcares que lo componen podrán ser digeridos por el organismo a alimentar (Brown *et al.*, 1989). Han sido pocos los análisis detallados sobre la composición de los carbohidratos de las microalgas (Parsons *et al.*, 1961; Chu *et al.*, 1982; Whyte, 1987). Existen diferencias en la naturaleza de los polisacáridos encontrados en los diferentes grupos de microalgas. Los polisacáridos de las diatomeas contienen principalmente crisolaminarina y mananos (Mykelstad, 1974; Whyte, 1987), en cambio los fitoflagelados contienen glucanos, principalmente glucosa y galactosa (Whyte, 1987); mientras que las microalgas rojas acumulan grandes cantidades de polisacáridos sulfatados (Ramus, 1972; Dubinsky *et al.*, 1983).

La fracción lipídica puede dividirse en dos grupos principales: los lípidos polares (que incluyen glicolípidos y fosfolípidos) y los lípidos neutros (que incluyen a los triglicéridos, diglicéridos, hidrocarburos, alquenonas, esteroides y pigmentos) (Brown *et al.*, 1989). La mayoría de los lípidos microalgales son lípidos polares, que son componentes de membranas; y los triglicéridos que son una reserva de ácidos grasos para la división celular, energía metabólica, mantenimiento de la membrana, síntesis y una amplia variedad de funciones fisiológicas. Los triglicéridos pueden llegar a constituir hasta el 80% del total de lípidos en microalgas eucariotas. Las cantidades relativas de cada clase de lípido en las

células microalgales pueden cambiar considerablemente con variaciones de las condiciones de cultivo (Abalde *et al.*, 1995).

En las algas verdes, los ácidos grasos saturados pueden constituir del 15 al 30% de los ácidos grasos totales; en las diatomeas constituyen del 30 al 40%. Las microalgas verdes presentan bajas concentraciones de ácidos grasos monoinsaturados (5-20%) y altas concentraciones de poliinsaturados (50-80%). Los niveles de ácidos grasos poliinsaturados 20:5(n-3) y 22:6(n-3) son importantes para la nutrición de organismos a cultivar (Watanabe *et al.*, 1983; Brown *et al.*, 1989).

2.2.- *Chaetoceros* sp:

Es una microalga unicelular, pero puede formar cadenas al interconectar las espinas con células adyacentes. Al observar las células lateralmente presentan una forma cuadrada, 12-14 μm de largo y 15-17 μm de ancho, con espinas que sobresalen de las esquinas. Las células pueden formar cadenas de 10-20 células alcanzando una longitud de 200 μm . Cuando se cultiva con aereación fuerte no forma cadenas. Se utiliza como alimento en cultivos de rotíferos, almejas, ostiones y larvas de camarón (Rosen, 1990).

En el caso particular de esta cepa, se ha empleado en establecimientos comerciales para la alimentación de larvas de peneidos, de *Crassostrea gigas* y de *Mytilus galloprovincialis*. En el laboratorio de Acuicultura del CICESE, se ha empleado con éxito para el cultivo de *Artemia* y para varios moluscos bivalvos. Puede cultivarse en agua salobre (12 ppm) sin que se modifique su tasa de crecimiento. Su composición proximal y bioquímica, así como su tasa de crecimiento, puede ser modificada utilizando luz azul sola o mezclada con luz blanca (Trujillo-Valle, 1993). Puede preservarse por congelación a -20°C por lo menos durante dos meses, sin alterar su composición bioquímica. La preservación en seco causa una pérdida importante de lípidos (Cordero-Esquivel *et al.*, 1993).

Correa-Reyes (1993) utilizó *Chaetoceros* sp. cultivado bajo tres diferentes tipos de luz (blanca, azul y mezcla de ambas), para alimentar a *A. franciscana*, obteniendo una sobrevivencia de 89.8% con luz azul, 81.22% con luz azul mezclada y con luz blanca de 30.41%.

2.3.- *Neochloris oleoabundans*:

Neochloris oleoabundans, es una microalga edáfica de ambientes semi-áridos. Su diámetro varía de 6 a 25 μm , es uninucleada, presenta una pared celular que se engrosa más de un extremo que de otro y un cloroplasto parietal en forma de copa. En cultivos de 3 o más semanas, se encuentran las células con cantidades considerables de gotas de aceite. La reproducción es mediante zoosporas ovoides biflageladas (Archibald, 1973).

N. oleoabundans tiene un alto contenido de lípidos totales en base a su peso seco y está constituido principalmente por triacilgliceroles. A bajas concentraciones de nitrógeno, los lípidos totales van desde 35 a 54% en base a su peso seco, y de estos, más del 80% de los lípidos totales son triacilgliceroles (Tornabene *et al.*, 1983). El contenido de lípidos también se incrementa al aumentar la concentración de NaCl en el medio (Vázquez-Duhalt y Arredondo-Vega, 1990).

N. oleoabundans resiste cambios de salinidad de 0 a 35 ppm de NaCl. El efecto inmediato más importante es un decremento en el contenido de polisacáridos y un incremento en el contenido intracelular de sacarosa que contribuye a la osmorregulación de la célula (Band-Schmidt *et al.*, 1992).

2.4.- *Dunaliella* sp.:

Las microalgas del género *Dunaliella* sp. pertenecen a la División Chlorophyta, son unicelulares, ovoides y presentan dos flagelos polares. Su reproducción es asexual (división longitudinal) y sexual isogámica (Bold y Wynne, 1978).

Se puede encontrar en agua dulce, salobre, en habitats extremadamente salinos (hasta 330 ppt) y en suelo (Bold y Wynne, 1978; Borowitzka y Borowitzka, 1988). En ambientes hipersalinos frecuentemente es uno de los principales productores primarios (Borowitzka, 1981). También presenta un amplio rango de tolerancia al pH (1-11) (Borowitzka y Borowitzka, 1988).

Este es uno de los géneros más estudiados en cultivos a nivel masivo, dado su capacidad de acumular β -caroteno y glicerol (Ben-Amotz, 1980; Borowitzka y Borowitzka, 1988). Carece de pared celular rígida lo que facilita su digestión. Es una fuente de proteína unicelular, vitaminas y se utiliza como complemento para alimentos de peces (Fábregas y Herrero, 1985; 1986). La composición celular aproximada de este género es de 50% de proteínas, 20% de carbohidratos y 8% de lípidos (Spectorova *et al.*, 1982). Bajo ciertas condiciones de cultivo puede acumular hasta el 80% de carotenos respecto a su peso seco (Ben-Amotz *et al.*, 1982), esto se favorece en condiciones de alta salinidad, temperatura e intensidad luminosa.

GRANDE BIBLIOTECA DE CIENCIAS MAR
BIBLIOTECA
I. I. R. R.
DOMESTIC

2.5.- *Artemia* EN LA ACUICULTURA

La utilización de *Artemia* como alimento para diferentes organismos se inició en los 30's, cuando varios investigadores encontraron que era un alimento excelente para larvas recién eclosionadas de peces (Seale, 1933; Gross, 1937; Rollesen, 1939). En la década de los años 50, las fuentes comerciales de *Artemia* provenían de dos lugares principales: de las salinas de San Francisco, California y del Gran Lago Salado, Utah, ambos situados en los Estados Unidos de Norte América. El costo de los quistes era muy bajo (menos de \$10 dls/kg). Con el inicio de la investigación en el cultivo de peces marinos y crustáceos en los años 60, se amplió el mercado de los quistes, y se abrió otra fuente de abastecimiento que fue el Lago Chaplin situado en Saskatchewan, Canadá. El auge en la investigación en el área de la acuicultura a nivel mundial continuó en la década de los 70's, coincidiendo con un decremento en la producción de quistes del Gran Lago Salado y del Lago Chaplin por causas climatológicas; esto aunado con una posible escasez de quistes provocada por ciertas compañías comerciales ocasionó un incremento severo en el costo de los quistes de *Artemia*, por lo que a mediados de la década de los 70's los precios oscilaban entre \$50-100 dls/kg. En los 80's se observó un cambio notable en la situación de *Artemia*, entraron al mercado nuevos productos de Argentina, Australia, Brasil, Colombia, República Popular de China, Francia y Tailandia, bajando considerablemente el costo del producto (Bengston *et al.*, 1991); además, se presentó el problema de la variación en la calidad nutricional de *Artemia* entre las diferentes fuentes de suministro y lotes (Vanhaecke y Sorgeloos, 1983; Sorgeloos, 1986). Actualmente, la producción de quistes, su disponibilidad y su costo se han mantenido relativamente estables, debido a los esfuerzos en la investigación y al desarrollo en las técnicas de cultivo de *Artemia* en la primera mitad de la década de los años 80's (Lèger *et al.*, 1986; Sorgeloos *et al.*, 1987b). El costo de los quistes depende de la calidad del mismo, variando desde \$25 dls/kg (nauplios de gran tamaño, bajos niveles del ácido graso esencial 20:5(n-3) hasta \$80 dls/kg (quistes con un alto porcentaje de eclosión, eclosión sincronizada, nauplios pequeños, libres de contaminantes y con un alto nivel de 20:5(n-3) (Bengston *et al.*, 1991).

Aunque en la actualidad las fuentes comerciales de *Artemia* abastecen las demandas, se requiere de una mayor diversidad de fuentes comerciales de quistes de *Artemia* para asegurar mayor cantidad de quistes en el mercado. Hoy en día, más del 70% de los quistes provienen del Gran Lago Salado (Bengston *et al.*, 1991).

La escasez de quistes de *Artemia* podría producir una situación de cuello de botella para la acuicultura mundial; esta empezó a vislumbrarse a mediados de la década de los 70's (Sorgeloos *et al.*, 1986), no sólo no se ha encontrado solución, sino que se ha agravado notablemente, dado el constante aumento de la demanda y el descenso en la disponibilidad de las fuentes tradicionales de los quistes de *Artemia* (Brasil, Salinas de San Francisco, California). De este modo, el

único suministro regular y en cantidad suficiente lo ofrecen los quistes procedentes del Gran Lago Salado, cuyo inadecuado valor nutritivo obliga al empleo de sustancias enriquecedoras de sus nauplios, lo cual limita su uso a ciertas fases de vida larvaria (Navarro, 1990).

En la década de los 80's, los trabajos de investigación sobre las propiedades nutritivas de *Artemia* se intensificaron en cuanto a conocer el contenido de ácidos grasos y aminoácidos esenciales de las distintas cepas (Fujita *et al.*, 1980; Watanabe *et al.*, 1980 y Léger *et al.*, 1986). Simultáneamente se establecieron los criterios de eclosión que permitieron seleccionar las cepas con mejor viabilidad y mejor velocidad de emergencia (Sorgeloos *et al.*, 1986).

Ante tales circunstancias, se está desarrollando una intensa actividad de localización y estudios de nuevas poblaciones de *Artemia* en todo el mundo (Amat *et al.*, 1990). En México hasta 1982 se tenían registradas 17 poblaciones naturales de *Artemia* distribuidas en los siguientes estados de la República: Baja California Sur, Sonora, Sinaloa, Oaxaca, San Luis Potosí, Chiapas y Yucatán (Castro y Gallardo, 1985). Castro *et al.*, (1987) trabajaron con ocho de ellas realizando descripciones climatológicas, faunísticas y florísticas en cada habitat, así como estudios biométricos de los quistes, sin embargo, aún faltan estudios desde el punto de vista nutricional. La producción en salinas pequeñas, a pesar de no contribuir de manera significativa al suplemento mundial de quistes, provee oportunidades para el desarrollo de comercios locales (Sorgeloos *et al.*, 1987a; Bengston *et al.*, 1991). Es de vital importancia determinar la calidad nutricional de la cepa de *Artemia* empleada, ya que este valor nutricional, varía tanto geográficamente como temporalmente de una cepa de *Artemia* a otra.

A pesar de los recientes avances en la formulación de dietas preparadas, el alimento vivo como *Artemia* es esencial para el desarrollo de la acuicultura ya que todavía no se ha encontrado un alimento adecuado que lo sustituya en la alimentación de especies marinas y dulceacuícolas en cultivo (Abalde *et al.*, 1995), como los peces y crustáceos (Hoff y Snell, 1993). También es utilizado para alimentar diversos grupos de organismos como los foraminíferos, celenterados, poliquetos, calamares, insectos, quetognatos, crustáceos y peces (Sorgeloos, 1979). A más del 85% de los organismos marinos cultivados se les ha ofrecido *Artemia* como una fuente de alimento, ya sea combinándolo con otros alimentos o solo (Kinne, 1977).

En la mayoría de los casos se utiliza *Artemia* en el estadio de nauplio recién eclosionado, sin embargo, existen reportes de que la *Artemia* adulta es mejor alimento para varios depredadores presentando las siguientes ventajas nutricionales (Kelly *et al.*, 1977; Purdom y Preston, 1977; Sorgeloos, 1979):

a) Es 20 veces más grande y aumenta 500 veces más en peso que los nauplios recién eclosionados (Reeve, 1963).

b) Su valor nutritivo cambia considerablemente durante el crecimiento: el contenido de lípidos disminuye de un 20% a menos del 10% del peso seco, y el contenido de proteínas incrementa de 42% a más del 60% (Von Hentig, 1971; Helfrich, 1973).

c) Hay mayor sobrevivencia, crecimiento más rápido y mayor desarrollo de color que al utilizar otras dietas (Hoff y Snell, 1993).

d) Los nauplios son deficientes en histidina, metionina, fenilalanina y treonina, y la *Artemia* adulta es rica en todos los aminoácidos esenciales (Stults, 1974; Gallagher y Brown, 1975; Watanabe *et al.*, 1978; Claus *et al.*, 1979)

e) Es un crustáceo eurihalino, euritérico y un filtrador no selectivo, pudiéndose alimentar de microalgas, levaduras, macroalgas, harinas, salvado de arroz y soya, entre otras (Castro *et al.*, 1995a).

f) Presenta una alta eficiencia de conversión alimenticia y puede cultivarse a altas densidades (Helfrich, 1973; Sorgeloos y Persoone, 1975).

g) Presenta un período generacional corto.

h) Alta tasa de fecundidad (más de 100 nauplios cada 4 días).

i) Período de vida de más de 6 meses (Nimura, 1967; Ivleva, 1969).

j) Su exoesqueleto tiene un grosor de 1 micra lo que permite que se consuma el organismo sin procesarse.

k) Hay cientos de cepas naturales de *Artemia* con distintas características (Abalde *et al.*, 1995) y diferentes perfiles nutricionales.

2.6.-REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES DE *Artemia*

Se ha demostrado en diversas ocasiones que la calidad nutricional de la *Artemia* puede modificarse a través de la dieta que se le proporcione. El alimento más abundante en el medio natural para *Artemia* son las especies de microalgas halotolerantes como *Dunaliella* sp., que probablemente constituyan su dieta principal. Otras microalgas que cumplen con sus requerimientos nutricionales se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 1.- Géneros de algas que se utilizan más frecuentemente como alimento para *Artemia* sp.

FAMILIA	GENERO
CHLOROPHYCEAE	<i>Brachiomonas</i> sp., <i>Chlamydomonas</i> sp., <i>Chlorella</i> sp., <i>Stichococcus</i> sp., <i>Nannochloris</i> sp., <i>Platymonas</i> sp., <i>Dunaliella</i> sp., <i>Stephanoptera</i> sp.
CHRYSOPHYCEAE	<i>Chrysochromulina</i> sp., <i>Isochrysis</i> sp., <i>Sbochochrysis</i> sp.
BACILLARIOPHYCEAE	<i>Chaetoceros</i> sp., <i>Cyclotella</i> sp., <i>Cyclotella</i> sp., <i>Phaeodactylum</i> sp., <i>Rhizosolenia</i> sp., <i>Skeletonema</i> sp.
CYANOPHYCEAE	<i>Spirulina</i> sp.

Modificado de Castro *et al.*, 1995a.

Las proteínas de las microalgas cubren los requerimientos de nitrógeno y aminoácidos esenciales de los organismos; la cantidad requerida está influenciada genéticamente y por el ambiente. La edad del organismo también es importante, debido a que al disminuir el crecimiento, sus tasas metabólicas y sus requerimientos de proteína también disminuyen.

Larvas y organismos juveniles presentan mayor requerimiento de proteínas y niveles de ácidos grasos esenciales que los adultos (Teshima y Kanazawa, 1984). De manera general, se ha encontrado que la proteína dietética con un patrón de amino ácidos esenciales similares a aquel del cuerpo del organismo a cultivar o de las proteínas de los huevos, presentan un mejor valor nutritivo para este organismo en particular (Arai, 1981; Deshimaru, 1981).

Para los crustáceos, las microalgas con concentraciones de proteínas entre 30 y 60% del peso seco, han dado resultados satisfactorios (Kanazawa *et al.*, 1982; Lèger *et al.*, 1985; Abalde *et al.*, 1995). Hanaoka (1973) y Sick (1976) mostraron que la tasa de crecimiento de *Artemia* está positivamente correlacionada con la cantidad de proteínas en la dieta.

Son pocos los estudios con crustáceos sobre los requerimientos de carbohidratos. Von Hentig (1971) reportó que los carbohidratos son la principal reserva energética para nauplios de *Artemia*, mientras que durante el desarrollo posterior de *Artemia* los lípidos y las proteínas son la fuente principal de energía.

Los lípidos son una fuente de energía (Holland y Spencer, 1973; Holland, 1978) y de metabolitos específicos que son esenciales para el crecimiento del organismo, ej: ácidos grasos, fosfolípidos, esteroides, hidrocarburos y alquenonas (Brown *et al.*, 1989). Las dietas con un 10 y 20% de lípidos generan un crecimiento satisfactorio (Cowey y Sargent, 1979; Castell *et al.*, 1986; Petriella *et al.*, 1984).

Así, para este caso el aspecto más importante de su nutrición es el contenido y proporción de ácidos grasos. Los requerimientos de las diferentes especies de crustáceos no es uniforme, pero el 18:2 (n-6), 18:3(n-3), 20:5(n-3) y 22:6(n-3) pueden ser importantes (Castell, 1983).

Otros aspectos a considerar para la nutrición de *Artemia* que recomienda Castell (1983) son:

- a) La relación óptima proteínas:carbohidratos está entre 1:3 y 1:5.
- b) Los aminoácidos esenciales probablemente sean los mismos para crustáceos en general.
- c) Los nucleótidos y esteroides exógenos son esenciales.
- d) Las vitaminas esenciales son la tiamina, nicotinamina, Ca-pantotenato, piridoxina, riboflavina, ácido fólico y putrescina.
- e) Los ácidos grasos poliinsaturados no son esenciales para el crecimiento pero si estimulan la reproducción.

2.7.- POBLACIONES DE *Artemia* EN OAXACA

En la costa de Oaxaca existen diferentes cuerpos de agua hipersalina en los cuales se ha reportado la presencia de *Artemia* (Tabla 2), una de ellas es la salina de La Colorada perteneciente al municipio de Santiago Astata, la cual presenta una extensión de 132 ha.

En La Colorada durante los meses de primavera (marzo a junio), es fácil encontrar en la orilla acumulaciones de quistes. Estos quistes no sólo se evidencian en la superficie del agua, en los bordes más externos y en las bandas de acumulación, sino que se encuentran también bajo las costras formadas al cuartearse los fondos que van quedando al descubierto (Porrás *et al.*, 1994).

En cuanto a la composición bioquímica, la población de *Artemia* de la laguna La Colorada, es muy variable, esto se debe a los distintos aportes de alimento, así como al estado de desarrollo del individuo, considerando que de acuerdo a la profundidad y a los sedimentos registrados, existe gran cantidad de materia orgánica finamente particulada del bentos que se acumula como detrito en el tubo digestivo de *Artemia*, de acuerdo al valor de cenizas de las muestras de la laguna. La proteína en base al peso seco alcanzó 39.11 % como promedio y en base al peso húmedo 6.67% (Porrás *et al.*, 1994).

Tabla 2.- Registro de salinas del Estado de Oaxaca (México), datos hasta junio de 1990.

NOMBRE	MUNICIPIO	SUPERFICIE (ha)
José Diego	Santiago Astata	600
Ampl. Amparo	Juchitán	138
La Colorada*	Santiago Astata	131.8
Garrapatero*	Tehuantepec	100
Laguna Grande	Tehuantepec	100
Tehuantepec*		
S. de la Blanca	Tehuantepec	100
Laguna Grande 2*	Tehuantepec	98
Laguna Grande 3*	Tehuantepec	97
Salinitas 2	Santiago Pinotepa Nacional	95
Amp. 2 Cascalote*	Unión de Hidalgo	88
Amp. 2 Frayle*	Tehuantepec	83.6
Descabezadero	Santiago Pinotepa Nacional	83
Amp. 1 Cascalote*	Unión de Hidalgo	81.68
Salinitas 4	Santiago Pinotepa Nacional	74
Salinitas 3	Santiago Pinotepa Nacional	72
Amp. 1 Frayle*	Tehuantepec	64.3
Pta. Agua	Juchitán	50
Cascalote	Unión de Hidalgo	35
Sta. Cruz	Juchitán	32.93
Isla de León	Ixhuatán	28.59
Duvaguichi	Unión de Hidalgo	20
El Frayle *	Tehuantepec	18
El Amparo	Juchitán	18
Sn. Ramón	Juchitán	15
Contreras	Sn Dionisio	13.74
Laguna Vichi	Ixhuatán	12.48
Tinongo	Ixhuatán	11.98
Conchalito	Ixhuatán	9.46
IV Mezquite	Ixhuatán	9
S. Lodo	Sn Dionisio	6.92
Yucla	Juchitán	6
Huelahuichana	Unión de Hidalgo	6
Buena Vista	San Dionisio	3.92
Suvacina	Xandani	0.90

*salinas con presencia de *Artemia* registrados en 1993-1994 (Porrás *et al.*, 1994).

Estos autores reportan un tamaño para quistes no tratados de 212.3 a 215.4 μm para quistes no tratados, y para quistes descapsulados de 184.2 a 189.5 μm . El tamaño de nauplio recién eclosionada varió entre 450 y 463 μm (Porrás *et al.*, 1994).

Posteriormente Castro y colaboradores (1995b) indican que para *Artemia* de la salina La Colorada el tamaño de los quistes hidratados y descapsulados presentan un diámetro de 240 μm y 225 μm respectivamente; la talla del nauplio recién eclosionado es de 432 μm . Estas dimensiones son favorables para su utilización como alimento de larvas, ya sea de peces o crustáceos.

El período de vida es de 65.2 días; después de 25 días de haber nacido los organismos alcanzan su etapa reproductiva, la cual tiene una duración aproximada de 35 días. La reproducción es sexual, las hembras en promedio, presentan 10 puestas, con una producción promedio total por hembra de 60 nauplios y 6.7 quistes (Malpica *et al.*, 1996).

Los quistes de *Artemia* de La Colorada presentan un porcentaje y una eficiencia de eclosión bajos: 27.75% y 67,879 org/g respectivamente. Sometiéndolos a un proceso de descapsulación, estos valores se incrementan a 89.33% y 235,504 org/g respectivamente (Castro *et al.*, 1995b). Experiencias previas han obtenido un porcentaje de eclosión que fluctúa entre 63.47 y 92.29 %; y la eficiencia de eclosión fue de 50,880 a 113,128 org/g, con una tasa de sincronía entre 4.0 y 4.7 (Porrás *et al.*, 1994). Malpica y colaboradores (1995, 1996) recomiendan hacer cruces de la población de *Artemia* de La Colorada con la población de *Artemia* del Gran Lago Salado, Utah, ya que el potencial reproductivo de las hembras aumenta notablemente, obteniéndose en promedio total por hembra 1,478 nauplios y 1,425 quistes, esto es un 246% y 2,126% respectivamente. Se ha calculado que si la población silvestre se cultiva, se podría obtener una producción bimestral por hectárea de 1,500 kg de biomasa (peso húmedo) y 237 kg de quistes (peso seco).

III.- JUSTIFICACIÓN

La demanda mundial de quistes de *Artemia* ha ido aumentando con el paso del tiempo, en 1985 fué de 85 t y se espera que en el año 2000 la demanda de quistes alcance las 170 t debido al creciente desarrollo de las plantas de cultivo de peces y crustáceos (Abalde *et al.* 1995).

El estado de Oaxaca tiene un gran potencial para el desarrollo de actividades acuiculturales en su línea costera, contando con 597 km y 61 lagunas estuarinas, cuya extensión es de 106,000 ha representando el 6.8% a nivel nacional. Estas condiciones son interesantes para los acuicultores e inversionistas, propiciando en este rubro una política de apoyo a los sectores social y privado, por lo que se prevé un fuerte desarrollo de esta actividad en los próximos años.

Uno de los aspectos a considerar para el desarrollo de un cultivo es la alimentación, sobre todo en las primeras etapas del desarrollo del organismo. Los acuicultores generalmente utilizan microalgas y lotes de *Artemia* importados, encareciendo con ello significativamente el desarrollo de su cultivo. El utilizar microalgas y cepas de *Artemia* regionales, permite por un lado tener cepas que soporten las condiciones climáticas de la zona, facilitando con ello su cultivo y por otro lado ayuda a disminuir los costos de producción.

En Oaxaca se cuenta con 34 salinas que abarcan una superficie de 1,319.89 ha, en nueve de ellas se ha reportado la presencia de *Artemia*, siendo la Laguna de La Colorada una de ellas. Sin embargo, se carece de información respecto a la calidad de los quistes, perfil de ácidos grasos, requerimientos nutricionales, densidad y estructura poblacional, etc. Esta falta de información repercute en la subutilización del recurso, por lo que este trabajo pretende ser un primer acercamiento que permita conocer la potencialidad de esta cepa particular de *Artemia* respecto a una cepa comercial.

IV.- OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar la calidad nutricional de tres especies de microalgas cultivadas en medio f/2 y medio MIII, utilizándolas como alimento para dos cepas de *Artemia*.

OBJETIVOS PARTICULARES:

a) Conocer la tasa de crecimiento de *Chaetoceros* sp., *Neochloris oleoabundans* y una microalga aislada de la salina "La Colorada" que serán cultivadas en dos medios de cultivo: medio f/2 y un medio a base de fertilizantes agrícolas (MIII).

b) Determinar el contenido de proteínas, lípidos totales y carbohidratos de las microalgas durante el inicio de la fase estacionaria de crecimiento en ambos medios de cultivo.

c) Evaluar en las dos cepas de *Artemia* alimentadas con las tres microalgas, la sobrevivencia desde la fase de nauplio hasta la fase de adulto, tasa de crecimiento, duración de los estadios nauplio, metanauplio y juvenil, tiempo total entre eclosión y el inicio de la reproducción y producción de progenie.

d) Evaluar la calidad nutricional a través de análisis químicos proximales en dos cepas de *Artemia* en estado adulto al alimentarlas con diferentes microalgas.

V.- AREA DE COLECTA

La laguna La Colorada se encuentra ubicada en el municipio de Santiago Astata al oeste del puerto de Salina Cruz en las coordenadas 15°57'10" a 15°57'50" LN y 95°33'30" a 95°34'38" LO en un clima A(wo)(w)ig (García, 1973), que corresponde a un clima de tipo cálido subhúmedo con lluvias en verano e invierno seco. La precipitación media anual es de 817.7 mm. La temperatura ambiente, en la franja costera en veinte años está entre 42°C como máximo extremo y 12.6°C como mínimo extremo. El grado de insolación es elevado, con una media anual de 2,400 horas, siendo el mes de agosto el que registra una insolación menor con 180 horas (Tamayo, 1976).

El área aproximada es de 131.8 ha en tiempo de estiaje con una profundidad de 0.4 m. En temporada de lluvias, el área alcanza una superficie de 176.6 ha con una profundidad promedio al centro de la laguna de 0.6 m. En los márgenes se encuentra vegetación secundaria de selva baja caducifolia, su abertura al mar se encuentra cerrada en época de estiaje y cuenta con dos canales naturales, que en época de lluvias aportan agua dulce al sistema y un ojo de agua permanente (Porrás *et al.*, 1994).

El sistema es altamente oligotrófico, donde existe una baja productividad primaria y condiciones hipersalinas alcanzando niveles de hasta 160 ‰ (Secretaría de Pesca, 1990).

La laguna La Colorada actúa como un almacén de depósito evaporador de salmueras, ya que en algunos márgenes litorales se han construido tanques de concentración y cristalización de diferentes tamaños utilizando maderas y arcilla a manera de bordos, su dimensión varía de 100 m de ancho a 300 m de largo y de 40 a 60 cm de profundidad (Porrás *et al.*, 1994).

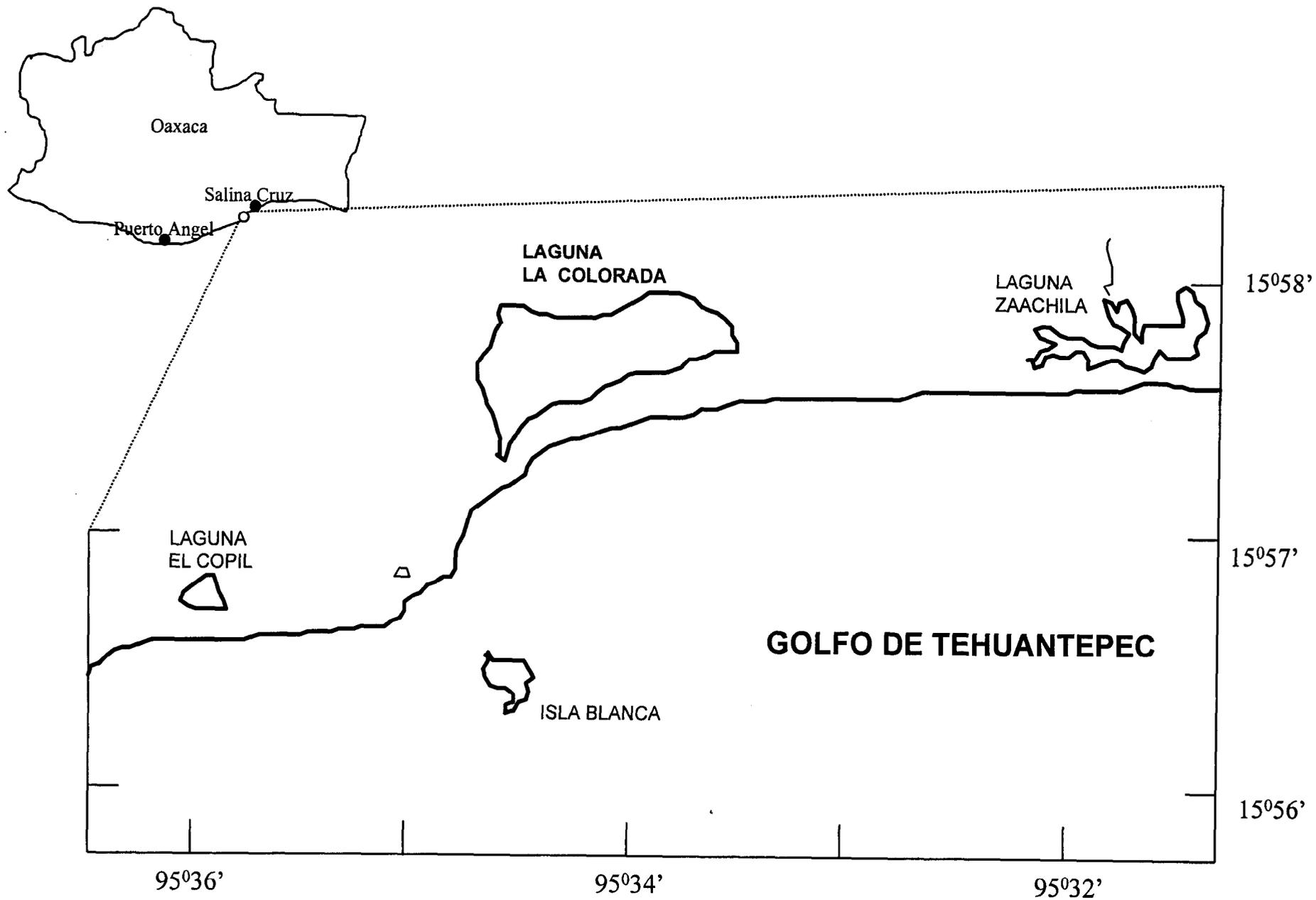


Figura 1.- Localización del área de colecta.

VI.- METODOLOGIA

6.1.- ORIGEN DE LAS CEPAS DE MICROALGAS Y CONDICIONES DEL CULTIVO

6.1.1.- Cepas

Chaetoceros sp.: donada de la colección de algas del departamento de Acuicultura del CICESE en Ensenada, B.C. Clave CH-X-1. Aislada por Trujillo-Valle (1993) de la Bahía de Todos Santos, B.C. México.

Neochloris oleoabundans: proviene de la colección de algas del Departamento de Biología Experimental del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste en La Paz, B.C.S. Aislada por Chantanachat y Bold (1962) de una localidad de Arabia Saudita localizada entre los 21°15' latitud norte y 55°15' longitud oeste.

Cepa aislada: identificada tentativamente a nivel genérico como *Dunaliella* sp. (González-Esparza, CICESE, com. pers.) colectada de la salina La Colorada, Santiago Astata, Oax. Aislada por Band-Schmidt (1994).

6.1.2.- Aislamiento de *Dunaliella* sp.

Se tomaron muestras de fitoplancton en la salina La Colorada, filtrando 50 l de agua a través de una red de 100 µm de luz de malla. Una alícuota de las muestras se inocularon inmediatamente en un medio estéril de enriquecimiento f/2 (Guillard y Ryther, 1962), con el fin de mantener e incrementar el número de organismos. A las 72 horas se volvieron a inocular en el mismo medio de cultivo realizando diluciones sucesivas. También se realizaron siembras en medio solidificado con agar al 1% para tratar de lograr el aislamiento por ambos métodos. Las condiciones iniciales de incubación fueron: temperatura 20±2°C, iluminación continua con lámparas de luz de día de 75 W y agitación manual cada 24 horas.

6.1.3.- Medios de cultivo

El medio f/2 solidificado se empleó solamente para el aislamiento de la microalga, el cuál se preparó agregando agar al 1% y glucosa al 2%.

Se utilizó medio f/2 (Guillard y Ryther, 1962) que consiste en una base nitrogenada, sales, elementos traza y vitaminas disueltas en agua de mar filtrada y otro medio no convencional basado en fertilizantes agrícolas para el cuál se tomó como referencia el medio MIII (Trujillo-Valle, 1992) (ver anexo).

6.1.4.- Condiciones del cultivo

Temperatura $20 \pm 2^\circ\text{C}$; iluminación continua utilizando lámparas de luz de día de 75 W; aireación constante; pH 8 y salinidad a 35‰ .

6.2.- CURVAS DE CRECIMIENTO

Para obtener las curvas de crecimiento de las microalgas, se tomaron muestras diarias de 3 experimentos independientes durante 7 días. Se realizaron cuentas directas en un hematocitómetro determinando el número de células por mililitro y se ajustaron al modelo logístico de crecimiento. Las tasas de crecimiento se obtuvieron con los valores de densidades de los primeros días del cultivo que se ajustaron a un modelo lineal. Con los valores obtenidos de la densidad celular se determinó el tiempo de generación y el número de generaciones aplicando las siguientes fórmulas:

Tiempo de generación (g): $g = 0.6931/Ke$

Número de generaciones (n): $n = t/g$

(Guillard, 1973).

Donde :

t = tiempo (Días).

Nt = tamaño de la población en el tiempo t (cel/ml).

Para la alimentación de las cepas de *Artemia* se empleó la técnica de cultivo semicontinuo para el cultivo de las microalgas, utilizando cultivos terminales de volúmenes progresivamente crecientes desde 100 ml en matraces Erlenmeyer hasta los de nivel productivo (garrafones de 18 ℓ con 10 ℓ de cultivo), que se mantuvieron con una tasa de dilución del 20% durante 15 días.

6.2.1.- Raciones

Para alimentar a *Artemia*, se tomó como referencia las raciones diarias que empleo Correa-Sandoval (1991).

Tabla 3: Raciones diarias de alimento para *Artemia franciscana* alimentada con *Chaetoceros* sp., *Dunaliella* sp. y *N. oleoabundans*.

EDAD DE LA <i>Artemia</i> (días)	Ración diaria (cel x 10 ³ por organismo)
1	150
2,3,4	300
5,6	450
7	600
8	750
9	1120
10,11	1140
12,13	1800
14,15	2160
16,17	2520
días subsecuentes	2750

6.3.- PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE MICROALGAS

6.3.1.- Biomasa

Para determinar el peso seco se filtraron 25 ml del cultivo a través de una membrana de fibra de vidrio GF/C con un diámetro de poro de 45 μm , la cuál fue puesta a peso constante. Las muestras se colocaron en una estufa a 60°C durante 24 horas y posteriormente se colocaron en un desecador por 30 minutos.

6.3.2.- Paquete celular

Se concentraron 25 ml del cultivo a 4,000 rpm durante 10 minutos y se lavaron 2 veces con una solución isotónica, obteniendo con ello una pastilla celular, descartándose el sobrenadante.

La pastilla celular obtenida se resuspendió en 3 ml de una mezcla de cloroformo-metanol (1:2). Se agitó vigorosamente, se tapó la muestra y se dejó en refrigeración durante 24 horas. Posteriormente se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos separando el paquete celular de la mezcla cloroformo-metanol. El paquete celular se lavó 3 veces con la misma mezcla, agitándola cada vez y separando la mezcla. El paquete celular se utilizó para determinar el contenido de carbohidratos y proteínas.

6.3.3.- Proteínas y carbohidratos

El paquete celular se suspendió en 1 ml de agua destilada, se agitó vigorosamente y se separó en 2 alícuotas de 0.5 ml. A una de éstas partes se le agregaron 3 ml de HCl (2N) y a la otra 3 ml de NaOH (1N), se taparon las muestras y se colocaron en un baño a ebullición a 100°C durante 1 hora (Kochert, 1978). El hidrolizado ácido se utilizó para determinar el contenido de carbohidratos (Yemm y Willis, 1954) y el hidrolizado básico para determinar el contenido de proteínas (Lowry *et al.* 1951).

6.3.4.- Lípidos totales

A la fase cloroformo-metanol se le añadió agua destilada para romper el equilibrio cloroformo-metanol, obteniendo con ello 2 fases: la clorofórmica conteniendo los lípidos, y la fase metanol-agua o fase acuosa. La fase clorofórmica anterior se colocó en un papel filtro Whatman No.1 de 5.5 cm de diámetro con sulfato de sodio anhidro para eliminar por completo el agua. La muestra se concentró en un rotavapor y se pasó a unos viales previamente lavados con agua destilada, etanol y cloroformo, secados en una estufa a 60°C y pesados. Los viales se volvieron a secar con la muestra en una estufa a 60°C y por diferencia de peso se obtuvo el contenido de lípidos totales (Kates, 1982).

6.4.- OBTENCION DE NAUPLIOS DE *Artemia*

En el tratamiento que se les dio a los quistes hasta la obtención de nauplios se consideró las recomendaciones de Sorgeloos *et al.*, 1986.

6.4.1.- Colecta de quistes

Los quistes empleados se colectaron en la salina La Colorada, Oaxaca (Fig. 1). Para ello se utilizó una red de doble malla de 500 μm y 120 μm . Para eliminar desechos de los quistes se tamizó el producto recogido a través de mallas de 1 mm, 0.5 mm y 0.15 mm. Los quistes recolectados se transportaron en un recipiente cerrado.

6.4.2.- Lavado de quistes

Los quistes se lavaron minuciosamente con agua dulce para eliminar los restos de sal. Utilizando una luz de malla no superior a 150 μm . Esta fase de lavado duró de 5 a 10 minutos.

6.4.3.- Secado

Después del tratamiento con agua dulce se esparcieron los quistes en capas finas uniformemente sobre charolas. Las charolas se colocaron al aire libre bajo techo. El secado se completó en una estufa a 35-38°C durante 3 horas.

6.4.4.- Hidratación de los quistes

Se pesaron 5 g de quistes y se incubaron en recipientes cónicos de plástico de 1 l durante 2 horas en agua de mar (35 ‰), 25°C, aireación constante, iluminación con lámparas de 75 W y pH 8-9. Tan pronto como todos los quistes se hidrataron, se transfirieron a una solución de hipoclorito de sodio al 25%.

6.4.5.- Descapsulación

Los quistes se descapsularon en una solución de hipoclorito de sodio al 25% durante 7 minutos con movimientos manuales constantes hasta que obtuvieron una coloración naranja. Se enjuagaron en un flujo de agua continua en tamices de 100 µm hasta que los huevos perdieron el olor a cloro.

6.4.6.- Incubación

Los quistes descapsulados se dejaron eclosionar durante 24 horas en recipientes cónicos de plástico de 1 l con agua de mar a 35 ‰, aireación e iluminación constante y una temperatura de $21 \pm 1^\circ\text{C}$.

6.4.7.- Nauplios

Los nauplios se mantuvieron a una densidad de 1 organismo/ml (1000 organismos por recipiente de 1 l) con agua de mar a 35 ‰ y a una temperatura de $21 \pm 1^\circ\text{C}$ y aireación continua. En ésta etapa se inició la alimentación con las microalgas, hasta la obtención de la progenie en fase adulta.

6.5.- CONTROL DE ORGANISMOS Y SOBREVIVENCIA

Se colocaron 6 acuarios de 1 litro por tratamiento con una densidad inicial de 1 organismo por mililitro para cada tratamiento. Los primeros 3 acuarios se utilizaron para observar el crecimiento, el número de parejas formadas y la producción de progenie. Los otros 3 se utilizaron para llevar a cabo los análisis bioquímicos y determinar la sobrevivencia. Los organismos se empezaron a alimentar al primer día después de la eclosión. El alimento se suministró en concentraciones progresivamente mayores según la edad de los organismos (Correa-Sandoval, 1991). Las demás condiciones del cultivo fueron: temperatura, $21 \pm 1^\circ\text{C}$, salinidad 35 ‰ y aireación constante. Diariamente se registró la temperatura con un termómetro de mercurio de -10°C a $+120^\circ\text{C}$ con precisión de

1°C, la salinidad con un refractómetro y el pH con potenciómetro manual Corning pH106, antes de efectuar un cambio total de agua.

A partir del primer día y cada segundo día se tomaron muestras de 10 organismos mediante sifoneo de cada uno de los 3 primeros recipientes, con la finalidad de medir su longitud total y determinar el crecimiento por estadio. Las muestras se fijaron con una solución de formol al 4%.

Los organismos de los recipientes 4, 5 y 6, se cosecharon en el día que se observó la primera formación de parejas, se evaluó la sobrevivencia y los organismos fueron lavados con agua destilada y preservados mediante congelación para determinar su composición bioquímica.

6.6.- FORMACION DE PAREJAS Y PRODUCCION DE PROGENIE

La evaluación de formación de parejas en los tres primeros recipientes se hizo de la siguiente forma: cada 24 horas las parejas de cada recipiente se transfirieron a recipientes diferentes, hasta que el número de parejas formadas, después de alcanzar su máximo número disminuyó. La producción de crías se contabilizó en cada recipiente, durante las 72 horas posteriores a la aparición de la primera pareja, con la finalidad de evaluar la producción diaria por pareja siguiendo las recomendaciones de Arriaga-Haro (1993).

6.7.- PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE *Artemia*

6.7.1.- Recolecta de adultos

La recolecta de los adultos se realizó una vez que se observó la primera formación de pareja. Se filtraron y se lavaron con agua destilada e inmediatamente se colocaron a peso constante para realizar las determinaciones posteriores.

6.7.2.- Biomasa

Para determinar el peso seco se tomó 0.5 g de base húmeda de la muestra y se colocó sobre papel aluminio a peso constante; las muestras se colocaron en una estufa a 60°C durante 12 horas, se enfriaron en un desecador y se volvieron a pesar.

6.7.3.- Proteínas, lípidos y carbohidratos

El contenido de proteínas se determinó por el método de Macrokjeldal (AOAC, 1990), el contenido de lípidos por el método de la AOAC (1990) y el contenido de carbohidratos se obtuvo por el método de Antrona (Yemm y Willis, 1954).

6.8.- TRATAMIENTO ESTADISTICO

Se aplicaron las pruebas de Bartlett y Kolmogorov-Smirnov (Sokal y Rohlf, 1979), a todos los datos obtenidos con el fin de comprobar su normalidad y homoscedasticidad.

Las curvas de crecimiento de las cepas de microalgas cultivadas en medio f/2 y medio MIII se ajustaron al modelo logístico.

Se utilizó el análisis de covarianza para comparar las tasas de crecimiento de las microalgas durante los días que su crecimiento se ajustara a un modelo lineal. Para ello se emplearon los datos transformados a logaritmo natural (Sokal y Rohlf, 1981).

Para comprobar si había una diferencia significativa entre la composición bioquímica de las microalgas y la composición bioquímica de *Artemia* se utilizó la prueba de "t" de Student con un valor de significancia de α de 0.05.

Para obtener las constantes de las curvas de crecimiento de las cepas de *Artemia* se utilizó el método de mínimos cuadrados con los valores de talla transformados a logaritmo natural.

Finalmente, para determinar diferencias significativas en la sobrevivencia, tallas, producción total de nauplios y total de parejas de ambas cepas de *Artemia* alimentadas con las diferentes dietas se aplicó un análisis de varianza bi o trifactorial con un valor de significancia de α de 0.05, realizando previamente una transformación arcoseno de los datos que se expresaban en porcentaje.

VII.- RESULTADOS

7.1.- CULTIVOS DE MICROALGAS

7.1.1.- Aislamiento

Se aisló una microalga verde unicelular de la salina La Colorada identificándose tentativamente a nivel genérico como *Dunaliella* sp.

7.1.2.- Curvas de crecimiento

En la figura 2 se muestra la curva de crecimiento ajustada al modelo logístico hasta el inicio de la fase estacionaria de *Chaetoceros* sp. cultivada en los medios f/2 y MIII expresados en número de células por mililitro ($\text{cel/ml} \times 10^6$). En el medio f/2 la densidad máxima se alcanza al cuarto día del cultivo con un valor de $2.38 \times 10^6 \pm 0.62 \times 10^6$ cel/ml observándose una disminución en la densidad del cultivo en los días posteriores. En el medio MIII la densidad más alta se presenta al noveno día del cultivo con un valor de $1.73 \times 10^6 \pm 0.24 \times 10^6$ cel/ml .

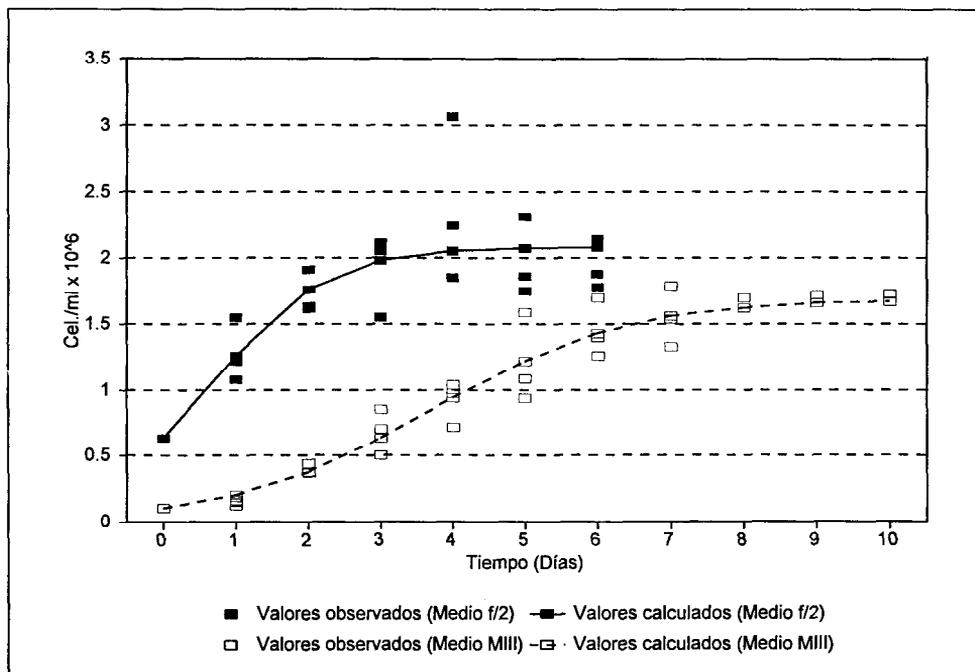


Figura 2: Concentración celular de *Chaetoceros* sp. cultivada en medio f/2 y medio MIII. Valores calculados y observados. Modelo medio f/2: $y = 2.077.85 / \{(1 + 2.285)(\exp(1.26 * x))\}$; Modelo medio MIII: $y = 1684.94 / \{(1 + 15.59)(\exp(0.7455 * x))\}$.

En la figura 3 se muestra la curva de crecimiento de *Dunaliella* sp. ajustada al modelo logístico en los medios f/2 y MIII. En el medio f/2 la mayor densidad se registra al décimo día del cultivo con una concentración de $1.78 \times 10^6 \pm 0.41 \times 10^6$ cel/ml .

cel/ml. En el medio MIII la densidad máxima alcanzada es de 0.91×10^6 cel/ml y se presenta al séptimo día del cultivo.

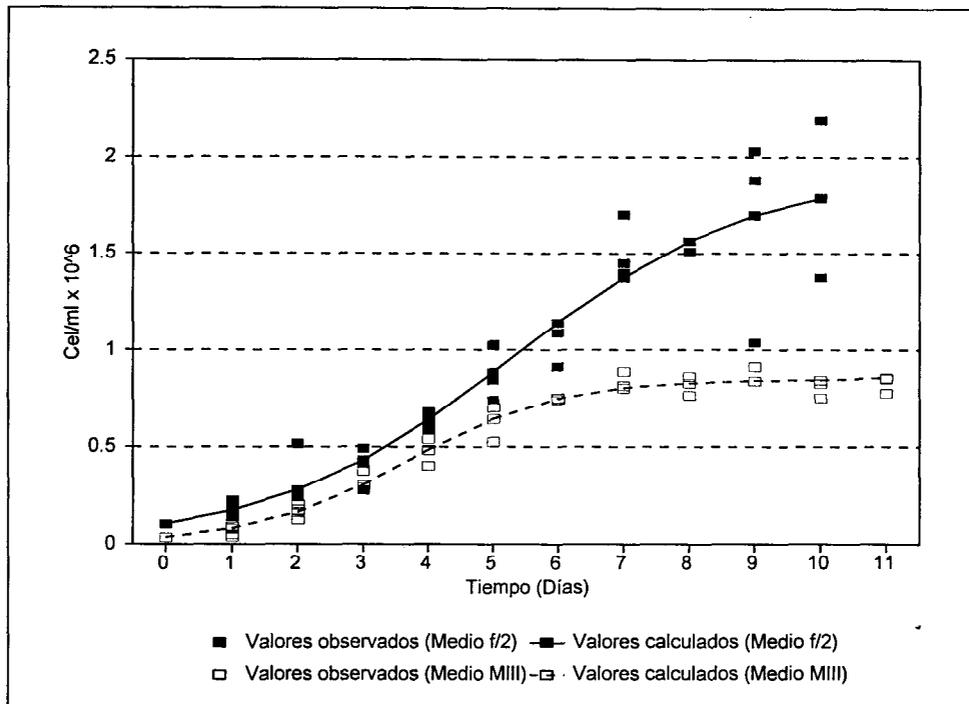


Figura 3: Concentración celular de *Dunaliella* sp. cultivada en medio f/2 y medio MIII. Valores calculados y observados. Modelo medio f/2: $y = 1925.44 / \{(1+17.64)(\exp(0.5406 \cdot x))\}$; Modelo medio MIII: $y = 846.47 / \{(1+23.04)(\exp(0.8532 \cdot x))\}$.

La curva de crecimiento ajustada al modelo logístico de *Neochloris oleoabundans* en los dos medios de cultivo se observan en la figura 4. Al ajustar los datos al modelo logístico no se observa el inicio de la fase estacionaria, sin embargo al graficar las medias de las tres réplicas de los datos observados, la fase estacionaria en medio f/2 se presenta al 15avo día con una concentración de $6.78 \times 10^6 \pm 2.09 \times 10^6$ cel/ml. En MIII la fase estacionaria de crecimiento se observa a los diecisiete días con una concentración de $4.42 \times 10^6 \pm 0.19 \times 10^6$ cel/ml.

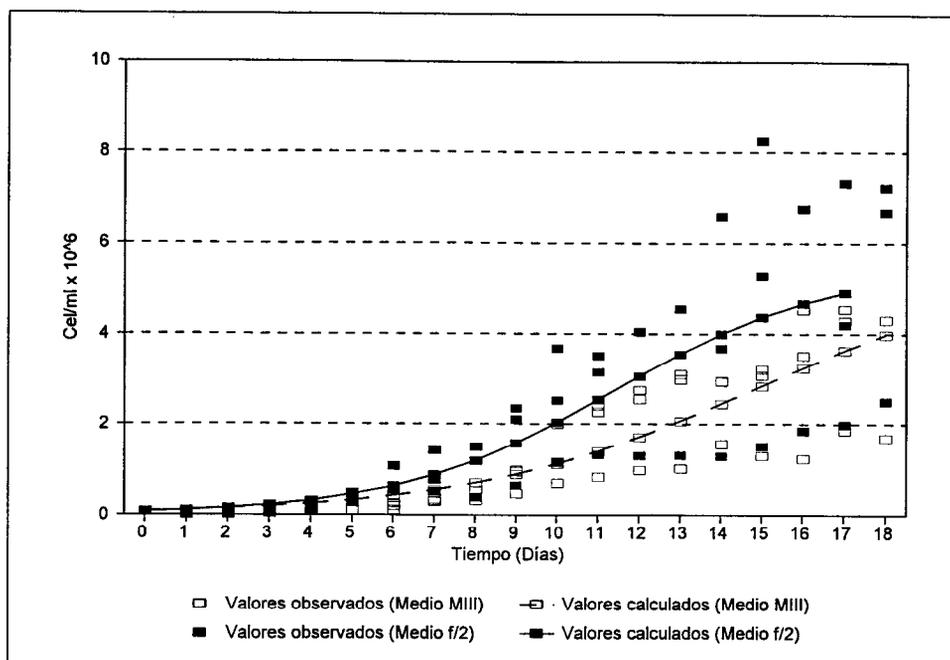


Figura 4: Concentración celular de *N. oleoabundans* cultivada en medio f/2 y medio MIII. Valores calculados y observados. Modelo medio f/2: $y = 5519.87 / \{(1+73.06)(\exp(0.3752 \cdot x))\}$; Modelo medio MIII: $y = 5733.60 / \{(1+66.71)(\exp(0.2789 \cdot x))\}$.

Para comparar las tasas de crecimiento de las cepas de microalgas cultivadas en medio f/2 y medio MIII, se realizó una regresión lineal con las densidades de los primeros dos días para *Chaetoceros* sp. cultivada en medio f/2 y hasta los tres días para esta misma cepa en medio MIII. En el caso de *Dunaliella* sp. se utilizaron los tres primeros días y para *N. oleoabundans* los primeros nueve días para ambos medios de cultivo. Los modelos obtenidos de la regresión lineal para las tres cepas se muestran en la tabla 4.

Tabla 4: Modelo lineal del logaritmo natural de las concentraciones celulares de *Chaetoceros* sp., *Dunaliella* sp. y *N. oleoabundans* cultivadas en medio f/2 y medio MIII.

CEPA	MEDIO f/2	MEDIO MIII
<i>Chaetoceros</i> sp.	$y = 0.235 + 0.4354x$	$y = -1.434 + 0.8733x$
<i>Dunaliella</i> sp.	$y = -1.655 + 0.6584x$	$y = -2.955 + 1.848x$
<i>N. oleoabundans</i>	$y = -3.586 + 1.715x$	$y = -4.221 + 1.705x$

Los modelos obtenidos de cada cepa en ambos medios de cultivo se compararon mediante un análisis de covarianza utilizando el logaritmo natural de los datos observados (Tablas 5, 6 y 7). En las tres cepas se observa que existe una diferencia significativa entre las tasas de crecimiento en los primeros días del cultivo entre el medio f/2 y medio MIII.

Tabla 5: Análisis de covarianza de la densidad celular de *Chaetoceros* sp. cultivada en medio f/2 y medio MIII del primer día hasta el segundo y del primer día hasta el tercero respectivamente.

GRADO DE VARIACION	df	SS y	SP xy	SS x	b yx	ss y	df	ss YX	ms YX
<i>Chaetoceros</i> sp. Medio f/2	5	0.22	0.31	0.72	0.44	0.29	4	0.09	0.02
<i>Chaetoceros</i> sp. Medio MIII	8	3.77	1.61	1.85	0.87	1.41	7	2.37	0.34
Sumatoria de grupos							11	2.45	0.22
Entre b's							1	0.10	0.10
Regr. Mezcl.	13	4	1.93	2.57	0.75	1.45	12	2.65	0.21
Medias ajustadas							1	88.98	88.98
TOTAL	14	91.56	0.75	24.83			13	9.15	
Grupos	1	5.52	-1.17	0			0	0	0

Fs: 419.75, $F_{0.001}(1,12) = 18.6$

Tabla 6: Análisis de covarianza de la densidad celular de *Dunaliella* sp. cultivada en medio f/2 y medio MIII desde el primer día hasta el tercero.

GRADO DE VARIACION	df	SS y	SP xy	SS x	b yx	ss y	df	ss YX	ms YX
<i>Dunaliella</i> sp. medio f/2	8	1.48	1.21	1.85	0.65	0.80	7	0.68	0.17
<i>Dunaliella</i> sp. medio MIII	8	7.39	3.42	1.85	1.84	6.32	7	1.06	0.15
Sumatoria de grupos							14	1.74	0.12
Entre b's							1	-3.86	-3.86
Regr. Mezcl.	16	3.7	4.64	3.7	1.25	5.81	15	-2.11	-0.14
Medias ajustadas							1	-12.61	-12.61
TOTAL	1	10.07	4.63	2.79			16	2.38	
Grupos	1	6.07	-0.01	0.22			0	6.06	0

Fs: 89.40, $F_{0.001}(1,16) = 16.1$

Tabla 7: Análisis de covarianza de la densidad celular de *N. oleoabundans* cultivada en medio f/2 y medio MIII del primer día hasta los nueve días.

GRADO DE VARIACION	df	SS y	SP xy	SS x	b yx	ss y	df	ss YX	ms YX
<i>N. oleoabundans</i> medio f/2	26	49.57	21.31	12.41	1.716	36.59	25	12.97	3.24
<i>N. oleoabundans</i> medio MIII	26	36.47	20.08	12.41	1.617	32.504	25	3.97	0.15
Sumatoria de grupos							48	16.94	4.73
Entre b's							1	-61.15	-61.15
Regr. Mezcl.	52	24.83	41.4	24.83	1.66	69.03	51	-44.22	-0.90
Medias ajustadas							1	-1491	-44.91
TOTAL	53	91.56	46.07	24.83			52	6.08	
Grupos	1	5.52	4.67	0			0	0	0

Fs: 49.78, $F_{0.001}(1, 51) = 12$

En la Tabla 8 se muestran los cálculos de la tasa de crecimiento (cel/ml/día), tiempo de generación ($\text{día}^{-1}; \text{hora}^{-1}$) y número de generaciones por día. Estos datos se obtuvieron con los valores de los primeros días que se ajustaron al modelo lineal.

Tabla 8: Valores de tasa de crecimiento, tiempo de generación y número de generaciones por día de *Chaetoceros* sp., *Dunaliella* sp. y *N. oleoabundans*, en medio f/2 y medio MIII.

CEPA	MEDIO DE CULTIVO	TASA DE CRECIMIENTO (Ke) (cel/ml/día)	TIEMPO DE GENERACION (g) (día^{-1})[hora^{-1}]	NUMERO DE GENERACIONES POR DIA
<i>Chaetoceros</i> sp.	f/2	0.435	1.59[31.8]	1.26
	MIII	0.873	0.79[18.96]	3.80
<i>Dunaliella</i> sp.	f/2	0.650	1.06[25.44]	2.83
	MIII	1.84	0.37[8.88]	8.11
<i>N. oleoabundans</i>	f/2	1.71	0.40[9.6]	22.50
	MIII	1.61	0.43[10.32]	20.90

Chaetoceros sp. y *Dunaliella* sp. presentaron una tasa de crecimiento más alta en medio MIII, 0.873 y 1.84 cel/ml/día respectivamente. *N. oleoabundans* presentó una tasa mayor en medio f/2 con 1.71 cel/ml/día.

El tiempo de generación más largo se encontró en *Chaetoceros* sp. en medio f/2 (31.8 h^{-1}), seguida por *Dunaliella* sp. (25.44 h^{-1}) también en medio f/2. Por el contrario *N. oleoabundans* presentó el tiempo de generación más largo en medio MIII con 10.32 h^{-1} con respecto al medio f/2 (9.6 h^{-1}).

Al cultivar a *Chaetoceros* sp. y *Dunaliella* sp. en medio MIII el número de generaciones por día fue más alto que en f/2 (3.80 y 8.11 respectivamente). En *N. oleoabundans* ocurrió lo inverso, en medio f/2 presentó 22.50 generaciones/día y en medio MIII 20.90 generaciones/día.

7.1.3.- Composición bioquímica

Las tres especies de microalgas presentaron diferentes respuestas en cuanto a su composición bioquímica al cultivarse en medio f/2 y medio MIII (Tabla 9). El contenido de proteínas de *Chaetoceros* sp. expresados en porcentaje de peso seco incrementó significativamente en el medio MIII con respecto al medio f/2 de $25.5 \pm 7.6\%$ a $40.2 \pm 1.2\%$. El contenido de carbohidratos no varió, y el contenido de lípidos incrementó 2.5 veces más en el medio MIII con respecto al medio f/2.

Dunaliella sp. presentó mayor contenido de proteínas en medio f/2 (32.7% respecto al peso seco), pero ésta diferencia no fue significativa al aplicar una prueba "t" de Student con un α de 0.05. En el contenido de carbohidratos si hubo una diferencia significativa siendo mayor en el medio MIII ($49.3\% \pm 3.0$). El contenido de lípidos fue 1.8 veces mayor en medio f/2 que en *Chaetoceros* sp. cultivada en medio f/2.

En *N. oleoabundans* el contenido de carbohidratos respecto al peso seco disminuyó significativamente en MIII de $14.0 \pm 1.2\%$ a $9.4 \pm 3.0\%$. El contenido de proteínas incrementó de $23.1 \pm 5.0\%$ a $32.2 \pm 12.3\%$, sin representar una diferencia significativa. El contenido de lípidos en ambos medios de cultivo fue menor que en *Chaetoceros* sp. cultivada en medio f/2 (1.4 veces menos en medio f/2 y 2.2 veces menos en medio MIII).

Tabla 9: Contenido de carbohidratos, proteínas y lípidos en *Chaetoceros* sp., *N. oleoabundans* y *Dunaliella* sp. en medio f/2 y medio MIII (valores medios y desviación estándar).

CEPA	MEDIO DE CULTIVO	PROTEINAS (%)	CARBOHIDRATOS (%)	LIPIDOS (%)
<i>Chaetoceros</i> sp.	f/2	$25.5^* \pm 7.6$	10.6 ± 1.0	45.3 ± 19.9
	MIII	$40.2^* \pm 1.2$	10.7 ± 5.4	2.5 veces más+
<i>Dunaliella</i> sp.	f/2	32.7**	$15.5^* \pm 4.8$	1.8 veces más+
	MIII	27.5 ± 4.4	$49.3^* \pm 3.0$	2.2 veces menos+
<i>N. oleoabundans</i>	f/2	23.1 ± 5.0	$14.0^* \pm 1.2$	1.4 veces menos+
	MIII	32.2 ± 12.3	$9.4^* \pm 3.0$	2.2 veces menos+

* Diferencia significativa aplicando prueba "t" de Student con un valor de confianza de 0.05.

**Datos únicos.

+ Estos valores son respecto al contenido de lípidos de *Chaetoceros* sp. en medio f/2.

7.2.- CULTIVOS DE *Artemia*

7.2.1.- Condiciones de cultivo

Las condiciones físicas y químicas de los cultivos de *Artemia* durante los experimentos tuvieron muy poca variación (Tabla 10); la temperatura se mantuvo entre 20.9°C y 22.6°C, la salinidad entre 34.8 y 36.8 ‰, con excepción del experimento de *Artemia* de La Colorada alimentada con *Chaetoceros* sp. que presentó una salinidad promedio mayor que el resto de los acuarios (38.4 ‰). El pH osciló entre 8.06 y 8.58 en todos los acuarios.

Tabla 10.- Condiciones fisicoquímicas en los acuarios con *Artemia* de San Francisco y *Artemia* de La Colorada alimentados con tres especies de microalgas cultivadas en medio f/2 (valores medios y desviación estándar).

CEPA DE <i>Artemia</i>	DIETA	TEMPERATURA (°C)	SALINIDAD (‰)	pH
San Francisco	<i>Chaetoceros</i> sp	22.6 ± 0.4	36.8 ± 0.2	8.2 ± 0.1
	<i>Dunaliella</i> sp.	21.5 ± 0.3	36.8 ± 0.1	8.1 ± 0.1
	<i>N. oleoabundans</i>	20.9 ± 0.6	34.8 ± 0.9	8.5 ± 0.1
La Colorada	<i>Chaetoceros</i> sp.	22.5 ± 0.2	38.4 ± 0.2	8.6 ± 0.1
	<i>Dunaliella</i> sp.	21.8 ± 0.3	34.8 ± 0.3	8.1 ± 0.1
	<i>N. oleoabundans</i>	21.2 ± 0.2	35.3 ± 0.3	8.6 ± 0.0

7.2.2.- Porcentaje de sobrevivencia

La sobrevivencia de ambas cepas de *Artemia* hasta el inicio de la formación de parejas al alimentarlas con *Chaetoceros* sp. y *Dunaliella* sp. fue satisfactoria (Tabla 11) con excepción de la dieta de *N. oleoabundans* por lo que no se incluyó en el análisis de los datos. El análisis de varianza de dos vías se realizó con la información obtenida con *Chaetoceros* sp. y *Dunaliella* sp., mostrando una diferencia significativa en la interacción *Artemia* y dieta (Tabla 12, Fig. 5). *Artemia* de La Colorada presentó una mayor sobrevivencia al alimentarse con *Chaetoceros* sp. ($69 \pm 16\%$) que con *Dunaliella* sp. ($44 \pm 7\%$), ésta diferencia fue significativa al comparar el arcoseno de la raíz cuadrada del porcentaje de sobrevivencia (Fig. 6) mediante el análisis de varianza con un α de 0.05. En *Artemia* de San Francisco se observó lo contrario, presentándose una mayor sobrevivencia al alimentarse con *Dunaliella* sp. ($66 \pm 1\%$) y menor con *Chaetoceros* sp. ($61 \pm 1\%$), sin embargo no fue significativamente diferente.

Al alimentar a las cepas de *Artemia* con *N. oleoabundans* hubo una mortalidad muy alta al inicio del experimento y no se llegó a la etapa de adulto. Con *Artemia* de San Francisco al quinto día del cultivo hubo una sobrevivencia de $1 \pm 1\%$ y con *Artemia* de La Colorada el porcentaje de sobrevivencia al sexto día fue de solo $2 \pm 1\%$.

Tabla 11: Porcentaje de sobrevivencia de la *Artemia* de La Colorada y *Artemia* de San Francisco al alimentarlas con tres especies de microalgas hasta el inicio de la formación de parejas (valores medios y desviación estándar).

CEPA DE <i>Artemia</i>	SOBREVIVENCIA (%)					
	<i>Chaetoceros</i> sp	tiempo (días)	<i>Dunaliella</i> sp.	tiempo (días)	<i>N. oleoabundans</i>	Tiempo (días)
San Francisco	$61 \pm 2\%$	14	$66 \pm 1\%$	11	$1 \pm 1\%$	5
La Colorada	$69 \pm 16\%$	11	$44 \pm 7\%$	10	$2 \pm 1\%$	6

Tabla 12: Análisis de varianza de dos vías para el arcoseno del porcentaje de sobrevivencia de *Artemia* de San Francisco y La Colorada alimentadas con las dietas de *Chaetoceros* sp. y *Dunaliella* sp. con un valor de confianza de 0.05.

Fuente de variación	g.l.	S.C.	C.M.	F	P
<i>Artemia</i>	1	36.1227	36.1227	1.141300	0.316551
Dieta	1	114.7008	114.7008	3.623984	0.093437
<i>Artemia</i> -Dieta	1	255.5787	255.5787	8.075033	0.021756*
Error	8	253.2039	31.6505		

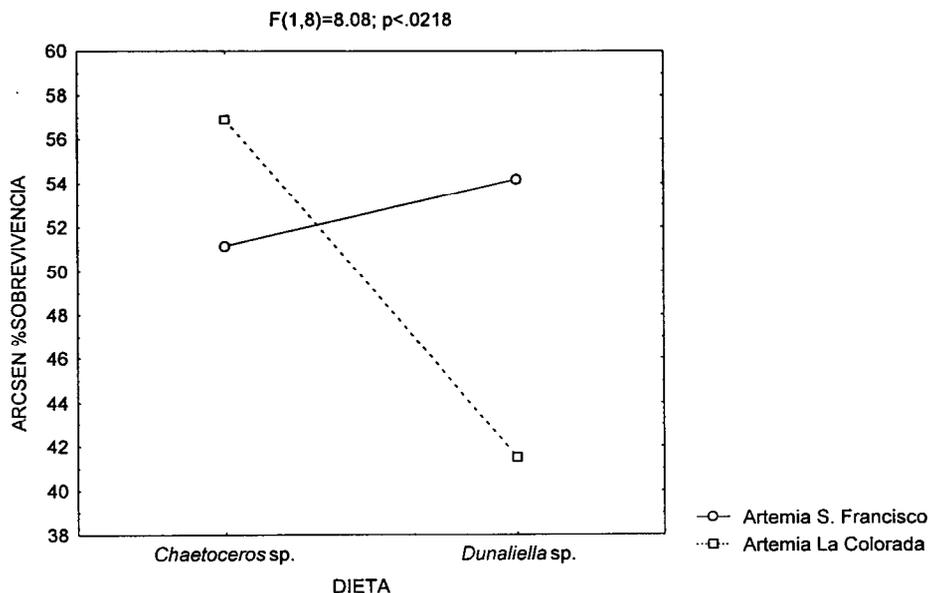


Figura 5.- Arcoseno de la raíz cuadrada del porcentaje de sobrevivencia hasta el inicio de la formación de parejas en la *Artemia* San Francisco y *Artemia* de La Colorada alimentadas con *Chaetoceros* sp. y *Dunaliella* sp. con un valor de confianza de 0.05.

7.2.3.- Crecimiento

El incremento de talla de *Artemia* de La Colorada y San Francisco alimentadas con las tres dietas hasta la fase adulta se muestra en la Tabla 13. La *Artemia* de San Francisco con las dietas de *Chaetoceros* sp. y *Dunaliella* sp. alcanza la etapa adulta después del noveno día, por el contrario *Artemia* La Colorada con la dieta de *Dunaliella* sp. alcanza al noveno día la madurez reproductiva y al séptimo día presenta una talla de 2.5 ± 0.27 mm.

Los metanauplios sobrevivientes de ambas cepas de *Artemia* alimentadas con *N. oleoabundans* al quinto día sólo alcanzaron una longitud de 0.9 mm, longitud que alcanzan e incluso rebasan al segundo día al ser alimentarlas con *Chaetoceros* sp. y *Dunaliella* sp., por ello no se incluyeron en los análisis estadísticos que a continuación se presentan.

Tabla 13: Tallas y estadios de *Artemia* de San Francisco y *Artemia* de La Colorada alimentadas con tres dietas, hasta el noveno día de cultivo.

CEPA DE <i>Artemia</i>		EDAD (días)		D I E T A					
				<i>Chaetoceros</i> sp.		<i>Dunaliella</i> sp.		<i>N. oleoabundans</i>	
				TALLA (mm)	ESTADIO	TALLA (mm)	ESTADIO	TALLA (mm)	ESTADIO
San Francisco	1	0.64 ± 0.05	n	0.65 ± 0.05	n	0.64 ± 0.07	n		
	3	1.00 ± 0.03	mn	1.44 ± 1.02	mn	0.69 ± 0.07	n		
	5	1.50 ± 0.09	mn	1.40 ± 0.07	pm	0.98 ± 0.08	mn		
	7	2.60 ± 0.11	pm	2.09 ± 0.03	pm	---	---		
	9	3.40 ± 0.30	pm	3.01 ± 0.43	pm	---	---		
La Colorada	1	0.32 ± 0.09	n	0.32 ± 0.10	n	0.56 ± 0.01	n		
	3	0.98 ± 0.02	pm	0.83 ± 0.07	mn	0.60 ± 0.02	n		
	5	1.31 ± 0.11	pm	1.52 ± 0.11	pm	0.90 ± 0.09	mn		
	7	2.06 ± 0.08	pm	2.5 ± 0.27	pm	---	---		
	9	2.72 ± 0.22	pm			---	---		

n: nauplio; mn: metanauplio; pm: postmetanauplio.

Para realizar el análisis de varianza de las dos cepas de *Artemia* alimentadas con la dieta de *Chaetoceros* sp. y *Dunaliella* sp. se transformaron los valores de talla expresados en micras a logaritmo natural. Se transformaron debido a que la varianza tiende a aumentar conforme la media (son heteroscedásticos). Esta transformación corrige esa desviación. El resultado del análisis trifactorial se muestra en la tabla 14, mostrando una diferencia significativa en el tiempo, en la interacción *Artemia*-dieta, dieta-tiempo y en la triple interacción (cepa de *Artemia*, dieta y tiempo). Esto se observa también en las figuras 6 y 7.

Tabla 14: Análisis de varianza triple para las tallas (μm) transformadas a \ln de las cepas de *Artemia* con las dietas de *Chaetoceros* sp. y *Dunaliella* sp. durante siete días con un valor de confianza de 0.05.

Fuente de variación	g.l.	S.C.	C.M.	F	P
A	1	0.095143	0.095143	2.567349	0.111555
B	1	0.104540	0.104540	2.820919	0.095482
C	3	31.45730	10.48576	282.9472	0.000000*
AB	1	0.494273	0.494273	13.33744	0.000377*
AC	3	0.395258	0.131752	3.555208	0.016299*
BC	3	0.121240	0.040413	1.090518	0.355655
ABC	3	5.246731	1.748910	47.19248	0.000000
Error	128	4.743563	0.037059		

Donde: A- *Artemia*, B-Dieta, C-Tiempo.

Con la dieta de *Chaetoceros* sp. se observa en la gráfica de interacción (Fig. 6) que *Artemia* de San Francisco presenta tallas mayores que la *Artemia* de La Colorada, principalmente en el tercer y quinto día. Al alimentarlas con *Dunaliella* sp. (Fig. 7) *Artemia* La Colorada al quinto y séptimo día del cultivo presenta una talla mayor que *Artemia* de San Francisco.

INSTITUTO VETEROZOOTECUARIO DE
CIENCIAS MARINAS
BIBLIOTECA

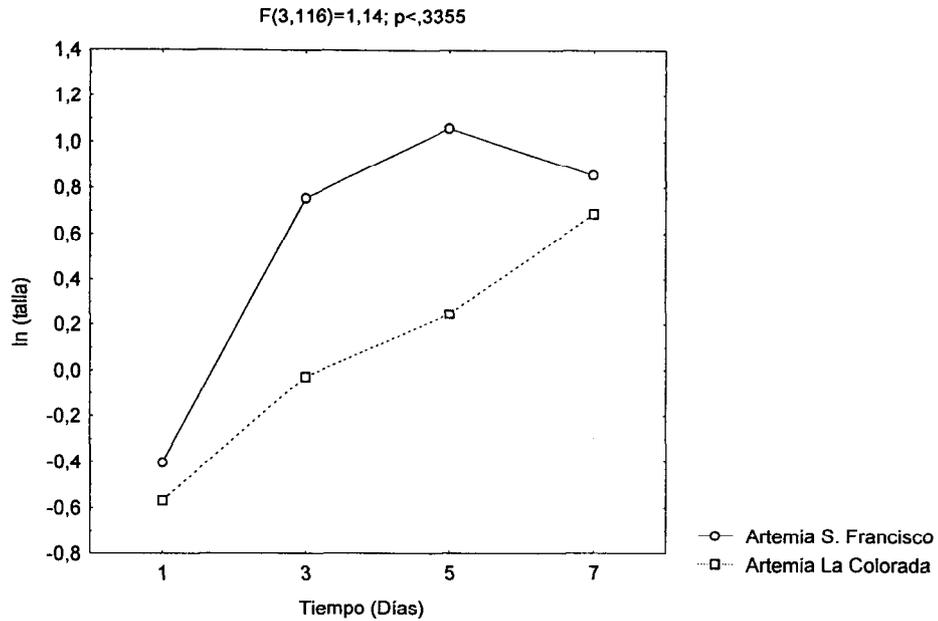


Figura 6: Gráfica de interacción de dos vías de la talla de *Artemia* de San Francisco y *Artemia* de La Colorada hasta los nueve días de edad alimentadas con *Chaetoceros* sp. con un valor de confianza de 0.05.

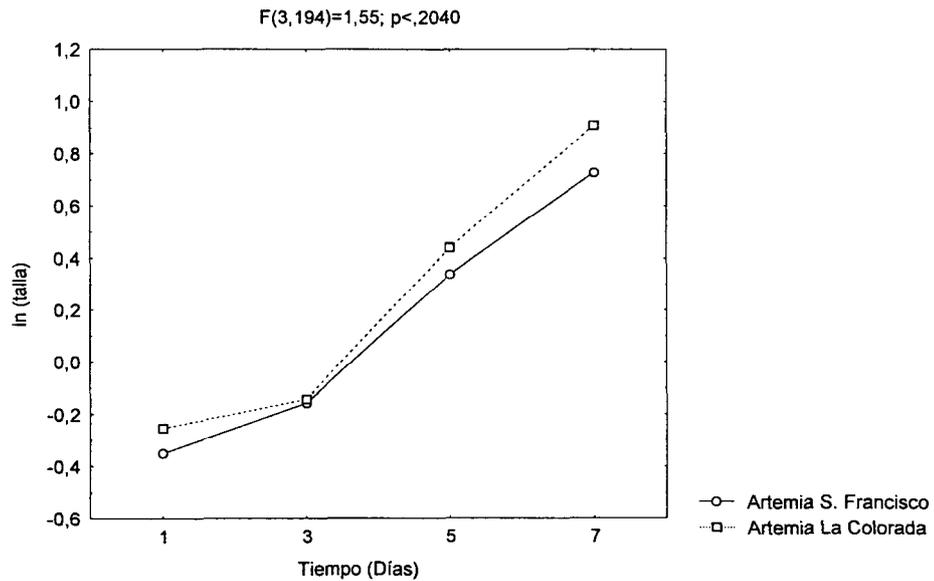


Figura 7: Gráfica de interacción de dos vías de la talla de *Artemia* San Francisco y *Artemia* La Colorada hasta los siete días de edad alimentadas con *Dunaliella* sp. con un valor de confianza de 0.05.

Al graficar el \ln de las tallas expresado en micras (Figs. 8 y 9) no se observa una diferencia significativa en *Artemia* San Francisco con ambas dietas. También se aprecia que el crecimiento de ambas cepas de *Artemia* es de tipo exponencial, ya que aparecen como líneas rectas. Por ello se considero conveniente realizar un análisis de covarianza con el fin de comparar las pendientes de cada cepa de *Artemia* con ambas dietas.

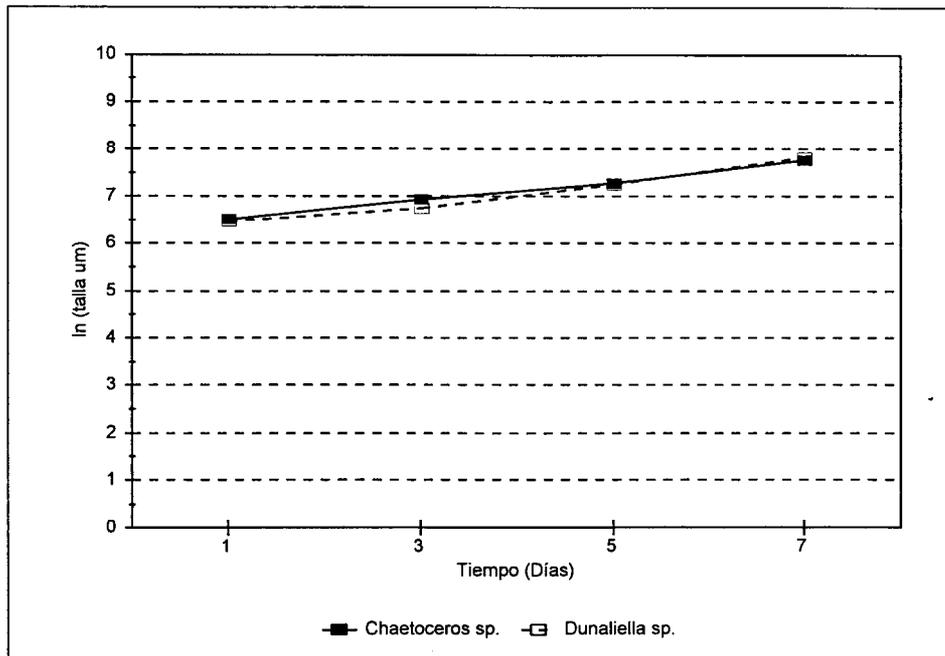


Figura 8: Logaritmo natural de la talla en micras de *Artemia* San Francisco alimentada con *Chaetoceros* sp. y *Dunaliella* sp.

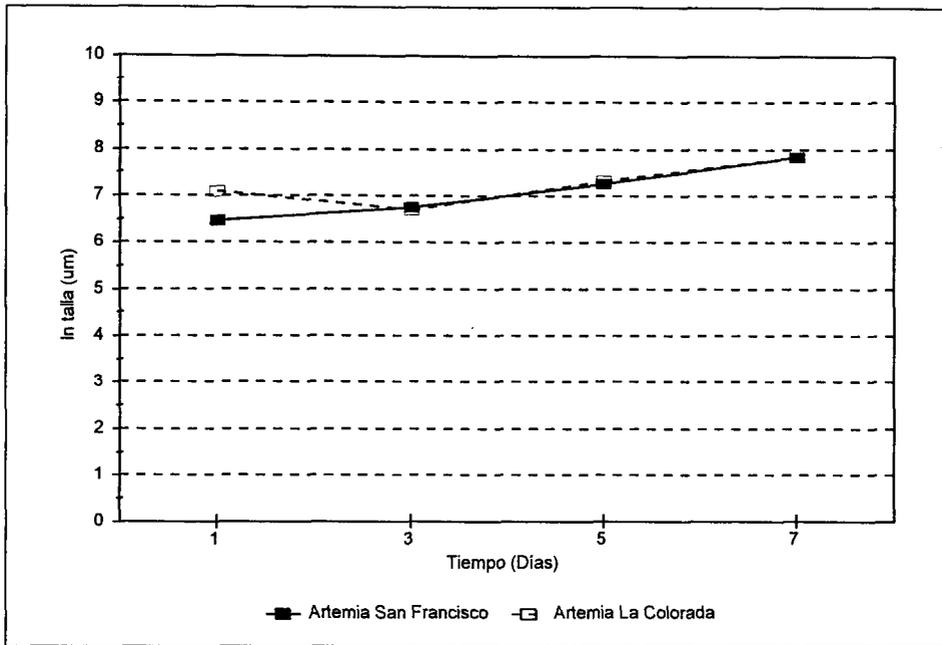


Figura 9: Logaritmo natural de la talla en micras de *Artemia* La Colorada alimentada con *Chaetoceros* sp. y *Dunaliella* sp.

El resumen de los análisis de regresión hasta el día siete para ambas cepas de *Artemia* con las dos dietas se presentan en la tabla 15.

Tabla 15: Análisis de regresión realizado con los datos ajustados al modelo exponencial para todos los tratamientos hasta el día siete con un valor de confianza de 0.05.

Cepa de <i>Artemia</i>	Dieta	F[1,n-2]	P
San Francisco	<i>Chaetoceros</i> sp.	433.85	3.45E-37
San Francisco	<i>Dunaliella</i> sp.	980.27	7.52E-52
La Colorada	<i>Chaetoceros</i> sp.	365.41	3.82E-32
La Colorada	<i>Dunaliella</i> sp.	611.14	6.62E-44

En la figura 10 se presenta la regresión exponencial de *Artemia* San Francisco con las dietas de *Chaetoceros* sp. y *Dunaliella* sp. El análisis de covarianza correspondiente indica que no existe una diferencia importante en la velocidad de crecimiento pero si en las tallas alcanzadas siendo mayor con la dieta de *Chaetoceros* sp. para *Artemia* de San Francisco. *Artemia* la Colorada a partir del quinto día presenta tallas mayores con la dieta de *Dunaliella* sp. (Fig. 11).

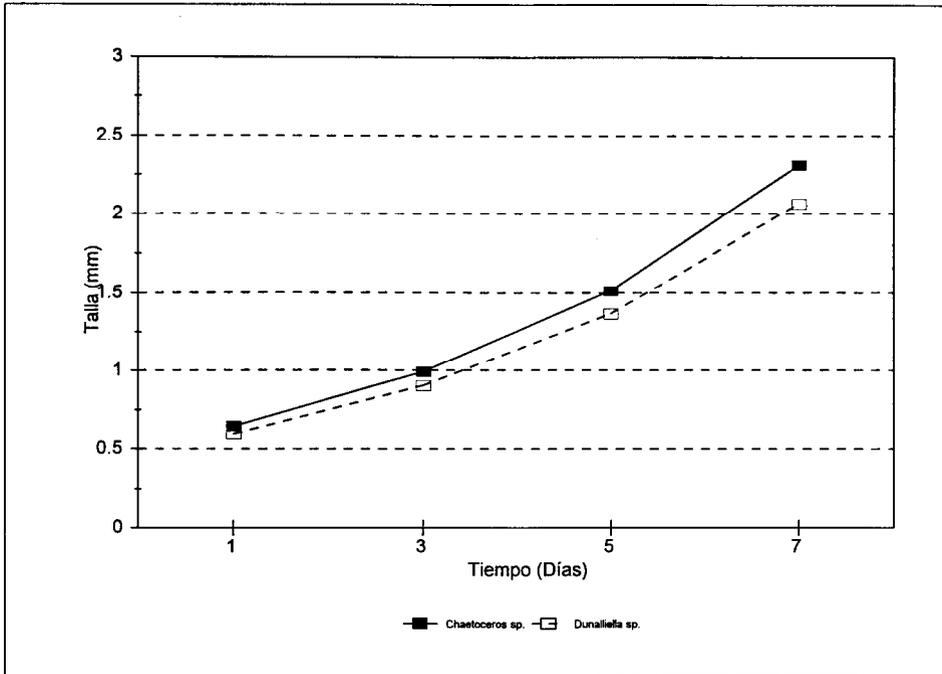


Figura 10: Regresión exponencial de *Artemia* San Francisco alimentada con *Chaetoceros* sp. y *Dunaliella* sp.

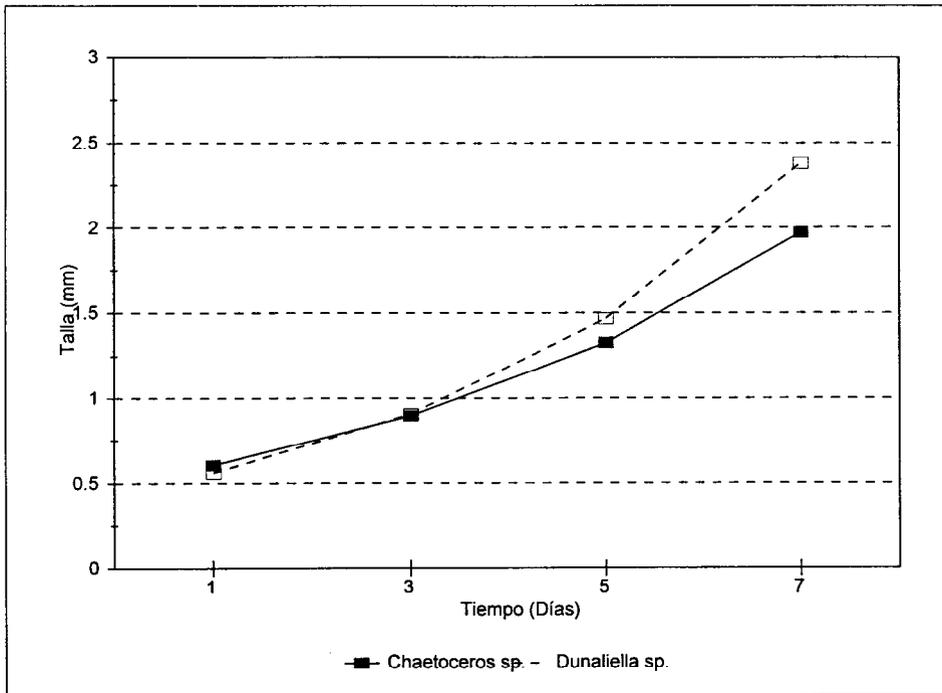


Figura 11: Regresión exponencial de *Artemia* La Colorada alimentada con *Chaetoceros* sp. y *Dunaliella* sp.

Las tablas 16 y 17 resumen el análisis de covarianza efectuado con las curvas de crecimiento hasta los siete días de edad. Mostrando que existen diferencias significativas en las tallas alcanzadas entre ambas cepas de *Artemia* con la dieta de *Dunaliella* sp. y en *Artemia* La Colorada al alimentarse con ambas dietas.

Tabla 16: Análisis de covarianza de los modelos obtenidos hasta los siete días de cultivo con un nivel de confianza de 0.05.

Cepa de <i>Artemia</i>	Dieta	SCx	SPxy	SCy	b	SC exp.	gl	SC n.ex.	CMyx	F	P	a
San Francisco	<i>Chaetoceros</i> sp.	198.97	42.14	9.69	0.2118	8.93	37	0.76	0.021	433.9	3.4e-37	6.2625
San Francisco	<i>Dunaliella</i> sp.	394.64	81.52	18.47	0.2066	16.84	95	1.63	0.017	980.3	7.5e-52	6.1864
La Colorada	<i>Chaetoceros</i> sp.	350.31	69.06	16.71	0.1971	13.62	83	3.09	0.037	365.4	3.8e-32	6.2060
La Colorada	<i>Dunaliella</i> sp.	403.00	97.31	27.27	0.2415	23.50	98	3.77	0.038	611.1	6.6e-44	6.0838
Regr. Mezcl.							313	9.25	0.030			
Entre b's							3	0.42	0.141	4.8	2.8e-3	
Regr. común		1346.92	290.04	72.14	0.2153	62.46	316	9.68	0.031	2039.3		

Tabla 17: Valor del estadístico "q" y significancia de la comparación entre cada par de pendientes.

	LC- <i>Chaetoceros</i> sp.	SF- <i>Dunaliella</i> sp.	SF- <i>Chaetoceros</i> sp.	LC- <i>Dunaliella</i> sp.
LC- <i>Dunaliella</i> sp.	181	193	135	
SF- <i>Chaetoceros</i> sp.	120	132		2.643
SF- <i>Dunaliella</i> sp.	178		0.631	4.165*
LC- <i>Chaetoceros</i> sp.		1.116	1.303	4.408*

Donde: *Diferencia significativa menor a 0.01; LC= *Artemia* La Colorada; SF= *Artemia* San Francisco.

De esta forma se presentan los siguientes grupos, resaltando el hecho de que la *Artemia* de San Francisco alimentada con *Chaetoceros* sp. se encuentra en una posición intermedia, es decir no manifiesta diferencia significativa con ninguno de los otros tratamientos.

	LC- <i>Chaetoceros</i> sp.	SF- <i>Dunaliella</i> sp.	SF- <i>Chaetoceros</i> sp.	LC- <i>Dunaliella</i> sp.
Valores de la pendiente b	0.1971	0.2066	0.2118	0.2415

Por último se obtuvo la regresión exponencial (Tabla 18) y el análisis de covarianza de dos de los tratamientos, para los cuales se obtuvieron datos complementarios hasta los nueve días de edad (Tabla 19). Estos resultados son interesantes porque son la prolongación de dos de los experimentos analizados anteriormente, sirviendo principalmente para confirmar que no existe diferencia significativa entre la velocidad de crecimiento entre la *Artemia* de San Francisco y

de La Colorada al ser alimentados con la microalga *Chaetoceros* sp., sin embargo permite establecer que si existe una diferencia en cuanto a la altura de las curvas de crecimiento, siendo mayor para la *Artemia* de San Francisco (Fig. 12). Esto implica que dentro de los primeros nueve días de edad, en estas condiciones experimentales, la *Artemia* de San Francisco presentará una talla promedio consistentemente mayor que la *Artemia* de La Colorada.

Tabla 18: Análisis de regresión realizado con los datos ajustados al modelo exponencial para los tratamientos de *Artemia* alimentados con *Chaetoceros* sp. hasta el día nueve.

Cepa de <i>Artemia</i>	Dieta	F[1,n-2]	P
San Francisco	<i>Chaetoceros</i> sp.	818.94	8.11E-32
La Colorada	<i>Chaetoceros</i> sp.	706.65	1.06E-49

Tabla 19: Análisis de covarianza de los modelos de crecimiento obtenidos alimentando ambas cepas de *Artemia* con *Chaetoceros* sp. hasta los nueve días de edad con un valor de confianza de 0.05.

Cepa de <i>Artemia</i>	Dieta	SCy	SPxy	SCx	b	SC exp.	gl	SC n.ex.	CMyx	F	P	a
San Francisco	<i>Chaetoceros</i> sp.	17.89	83.37	411.28	0.2027	16.90	48	0.99	0.021	818.9	8.1e-32	6.2898
La Colorada	<i>Chaetoceros</i> sp.	28.95	134.48	721.96	0.1863	25.05	110	3.9	0.035	706.6	1.1e-49	6.2471
Regr. Mezcl.							158	4.89	0.031			
Entre b's							1	0.07	0.071	2.3	1.3e-1	
Regr. común		46.84	217.84	1133.24	0.1922	41.88	159	4.96	0.031	1342.3		
Med. Aj.							1	0.58	0.583	18.7	2.7e-5	
Total		46.84	217.70	1147.75			160	5.54				

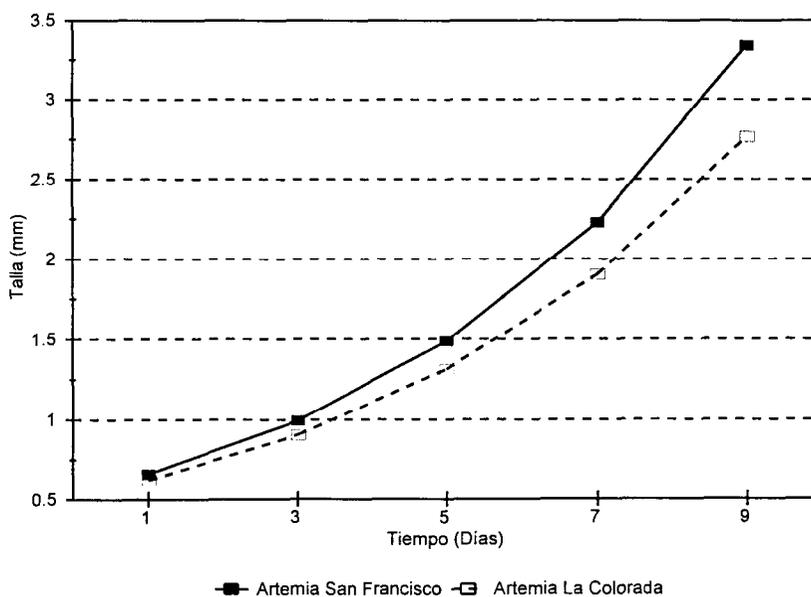


Figura 12: Regresión exponencial de *Artemia* San Francisco y La Colorada alimentada con *Chaetoceros* sp. hasta el día nueve.

7.2.4.- Estadios

El estadio de nauplio en todos los casos se presentó en el primer día del experimento (Tabla 20). El estadio de metanauplio en *Artemia* de La Colorada alimentada con *N. oleoabundans* empieza a presentarse en el primer día, y dura hasta el quinto día; en *Artemia* de San Francisco se presenta desde el tercer día hasta el quinto día. Este mismo estadio en la cepa de *Artemia* La Colorada alimentada con *Chaetoceros* sp. inicia al segundo día, por sólo un día. Con *Dunaliella* sp. también inicia al tercer día, por solo un día, mientras que en *Artemia* de La Colorada va del tercer día hasta el quinto día. La etapa postmetanauplio se presenta primero en *Artemia* de La Colorada con *Chaetoceros* sp. desde el tercer día hasta el décimo, en *Artemia* de San Francisco abarca del séptimo al noveno día. En ambas cepas de *Artemia* alimentadas con *Dunaliella* sp. el estadio postmetanauplio se presenta al quinto día, y tiene una duración de 2 a 4 días respectivamente. En *N. oleoabundans* el estadio postmetanauplio se presenta al quinto día en la cepa de San Francisco, pero *Artemia* de La Colorada no llega a este estadio. La etapa de adulto se alcanza primero en *Artemia* de La Colorada alimentada con *Dunaliella* sp. al séptimo día, seguida por *Artemia* de San Francisco alimentada con *Dunaliella* sp. al décimo día, y finalmente *Artemia* de La Colorada alimentada con *Chaetoceros* sp. (día 11) y *Artemia* de San Francisco alimentada con *Chaetoceros* sp. (día 11). Al utilizar a *N. oleoabundans* como alimento no se alcanzó la etapa de adulto en ninguna de las dos cepas de *Artemia*.

Tabla 20: Duración en días de los diferentes estadios de *Artemia* de La Colorada y San Francisco con tres dietas.

Cepa de <i>Artemia</i>	Dieta	E S T A D I O S (días)			
		nauplio	metanauplio	posmetanauplio	adulto
San Francisco	<i>Chaetoceros</i> sp.	1	3-5	7-9	11
	<i>Dunaliella</i> sp.	1	3	5-9	10
	<i>N. oleoabundans</i>	1	3-5	5	---
La Colorada	<i>Chaetoceros</i> sp.	1	2	3-10	11
	<i>Dunaliella</i> sp.	1	3-5	5-7	7
	<i>N. oleoabundans</i>	1	1-5	---	---

7.2.5.- Formación de parejas

Ambas cepas de *Artemia* presentaron un comportamiento similar en cuanto a la formación de parejas (Tabla 21). En la gráfica de interacción del arcoseno de la raíz cuadrada del porcentaje de formación de parejas (Fig. 13) se observa un incremento al alimentar a ambas cepas de *Artemia* con *Dunaliella* sp., pero sólo es mucho mayor en el caso de *Artemia* de La Colorada (Tabla 22).

En cuanto al número total de parejas se observó que *Artemia* de San Francisco con la dieta de *Chaetoceros* sp. presentó el mayor número de parejas (Fig.14). Con *Artemia* de La Colorada no se observaron diferencias significativas entre ambas dietas. En la tabla 23 se presenta el resumen del análisis de varianza del número total de parejas mostrando que existe una diferencia significativa en el comportamiento de ambas cepas, ya que *Artemia* de San Francisco reduce sustancialmente el número total de parejas al ser alimentadas con *Dunaliella* sp.

Las parejas se presentaron entre el décimo y el onceavo día en *Artemia* de La Colorada alimentada con *Dunaliella* sp., al onceavo día en *Artemia* de San Francisco y La Colorada alimentadas con *Chaetoceros* sp., y hasta el catorceavo día en *Artemia* de San Francisco con la dieta de *Chaetoceros* sp.

La duración de la presencia de parejas en el cultivo también fue variable, en *Artemia* de San Francisco alimentada con *Chaetoceros* sp. solo duró de 7 a 8 días, en *Artemia* de San Francisco alimentada con *Dunaliella* sp. entre 10, 12 y hasta 20 días en uno de los acuarios, y en *Artemia* de La Colorada con ambas dietas once días.

El número máximo de parejas se presentó generalmente al doceavo día con excepción de *Artemia* de San Francisco alimentada con *Chaetoceros* sp. donde se presentó hasta el quinceavo día, con 93 ± 21 parejas. El valor más bajo se encontró en *Artemia* de San Francisco alimentada con *Dunaliella* sp. donde hubo 71 ± 7 parejas.

Tabla 21: Datos del total de parejas en *Artemia* de La Colorada y *Artemia* de San Francisco alimentadas con tres dietas.

CEPA DE <i>Artemia</i>	DIETA	P A R E J A S					
		PROMEDIO (%)	TOTAL (día)	INICIO (días)	TERMINO (días)	DURACION (días)	MAXIMO PAREJAS/ DIA
San Francisco	<i>Chaetoceros</i> sp.	96 ± 3	579 ± 29	14	21-22	7-8	93 ± 21/(15,16)
	<i>Dunaliella</i> sp.	97 ± 0.4	322 ± 3	11	21-23-31	10,12,20	71 ± 7/(12,16)
	<i>N.oleoabundans</i>	0	0	--	---	--	---
La Colorada	<i>Chaetoceros</i> sp.	86 ± 5	224 ± 53	11	17-19	11	85 ± 15/(12)
	<i>Dunaliella</i> sp.	98 ± 1	224 ± 47	10-11	17-18	11	89 ± 18/(12-13)
	<i>N.oleoabundans</i>	0	0	--	---	--	---

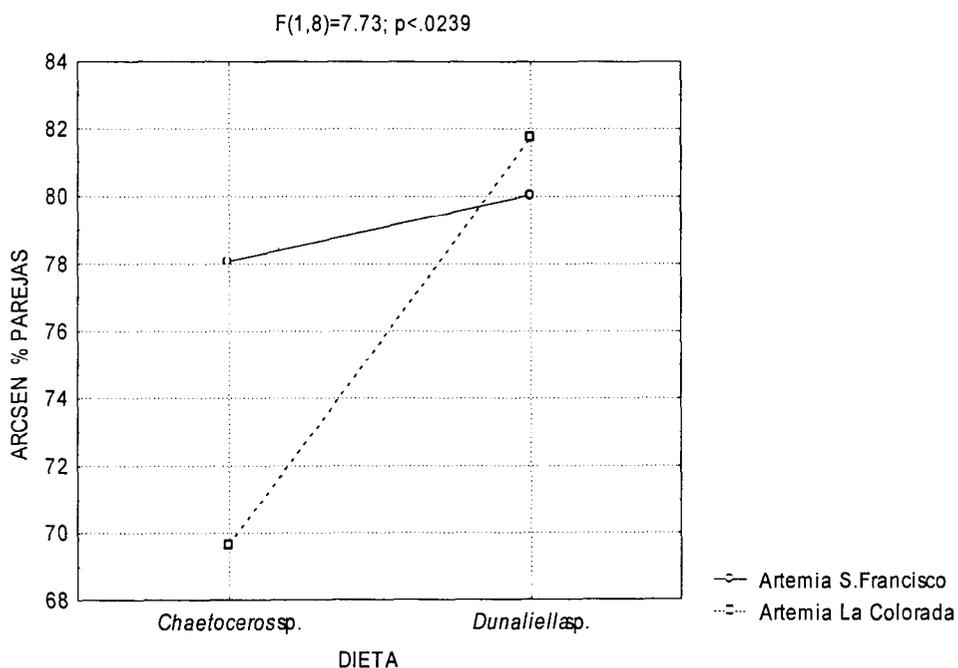


Figura 13: Arcoseno de la raíz cuadrada del porcentaje de formación de parejas de *Artemia* San Francisco y *Artemia* La Colorada alimentadas con *Chaetoceros* sp. y *Dunaliella* sp. con un valor de confianza de 0.05.

Tabla 22: Análisis de varianza de doble vía para el arcoseno del porcentaje de formación de parejas de *Artemia* San Francisco y *Artemia* La Colorada alimentadas con *Chaetoceros* sp. y *Dunaliella* sp. con un valor de confianza de 0.05.

Fuente de variación	g.l.	S.C.	C.M.	F	P
Artemia	1	34.1719	34.1719	3.43677	0.100878
Dieta	1	147.630	147.630	14.8476	0.004855*
Artemia-Dieta	1	76.8614	76.8614	7.73019	0.023913*
Error	8	79.5441	9.94302		

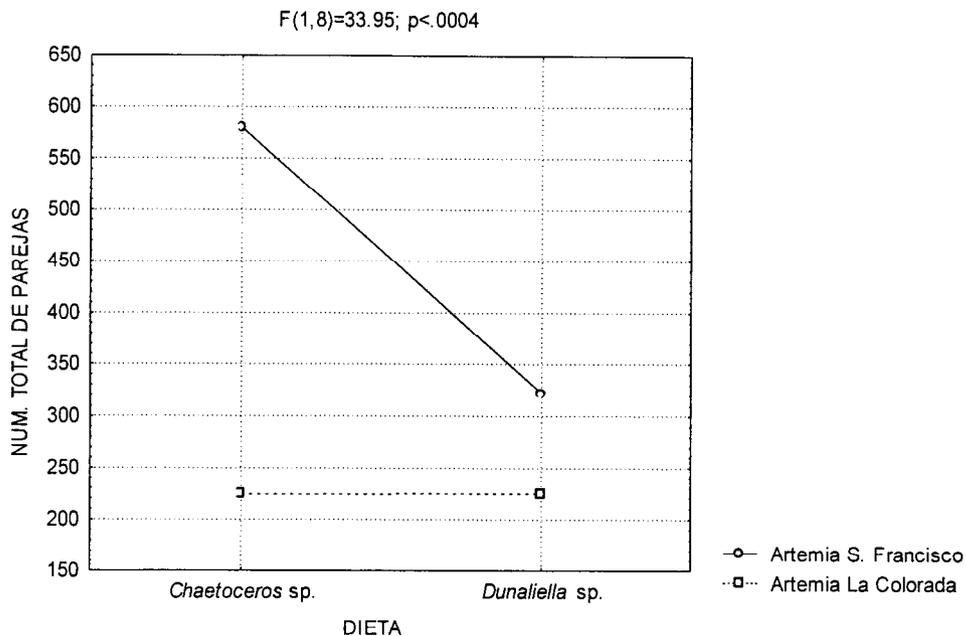


Figura 14: Gráfica de interacción de dos vías del número total de parejas de *Artemia* San Francisco y *Artemia* La Colorada alimentadas con *Chaetoceros* sp. y *Dunaliella* sp. con un valor de confianza de 0.05.

Tabla 23: Análisis de varianza del número total de parejas de *Artemia* San Francisco y *Artemia* La Colorada alimentadas con *Chaetoceros* sp. y *Dunaliella* sp. con un valor de confianza de 0.05.

Fuente de variación	g.l.	S.C.	C.M.	F	P
Artemia	1	154133.3	154133.3	104.8170	0.000007*
Dieta	1	49408.3	49408.3	33.5997	0.000407*
Artemia-Dieta	1	49923.0	49923.0	33.9497	0.000393*
Error	8	11764.0	1470.50		

7.2.6.- Producción de nauplios

La máxima producción de nauplios fue de 7926 ± 1351 en *Artemia* de San Francisco alimentada con *Chaetoceros* sp. y en *Artemia* de La Colorada alimentada con la misma dieta presentó 5650 ± 1283 nauplios (Tabla 24). Al alimentarse con *Dunaliella* sp. *Artemia* de San Francisco produjo 3855 ± 1511 nauplios y *Artemia* de La Colorada 3060 ± 1111 nauplios. En la gráfica de interacción (fig.15) se observa que en ambas cepas de *Artemia* hay una disminución importante en la producción de nauplios con la dieta de *Dunaliella* sp., y que la *Artemia* de San Francisco con ambas dietas presenta mayor cantidad de nauplios que la cepa de La Colorada, ambas diferencias son significativas (Tabla 25).

La relación de nauplios/pareja no es significativamente mayor en *Artemia* de La Colorada al alimentarse con *Chaetoceros* sp. (25) que con *Dunaliella* sp. (14). *Artemia* de San Francisco tampoco presentó mayores promedios de nauplios/pareja al ser alimentada con *Chaetoceros* sp. (14) que con *Dunaliella* sp. (12) (Fig. 16, Tabla 26).

Tabla 24: Producción total de nauplios y nauplios por pareja durante 72 horas de *Artemia* de San Francisco y *Artemia* de La Colorada alimentada con tres dietas de microalgas.

CEPA DE <i>Artemia</i>	DIETA	P R O D U C C I O N D E N A U P L I O S			
		TOTAL (media y d.s.)	MINIMO	MAXIMO	NAUPLIOS/PAREJA (media y d.s.)
San Francisco	<i>Chaetoceros</i> sp.	7926 ± 1351	66	3877	14 ± 3
	<i>Dunaliella</i> sp.	3855 ± 1511	11	1620	12 ± 5
	<i>N.oleoabundans</i>	0	0	0	0
La Colorada	<i>Chaetoceros</i> sp.	5650 ± 1283	33	2450	25 ± 6
	<i>Dunaliella</i> sp.	3060 ± 1111	15	1820	14 ± 9
	<i>N.oleoabundans</i>	0	0	0	0

d.s. desviación estándar

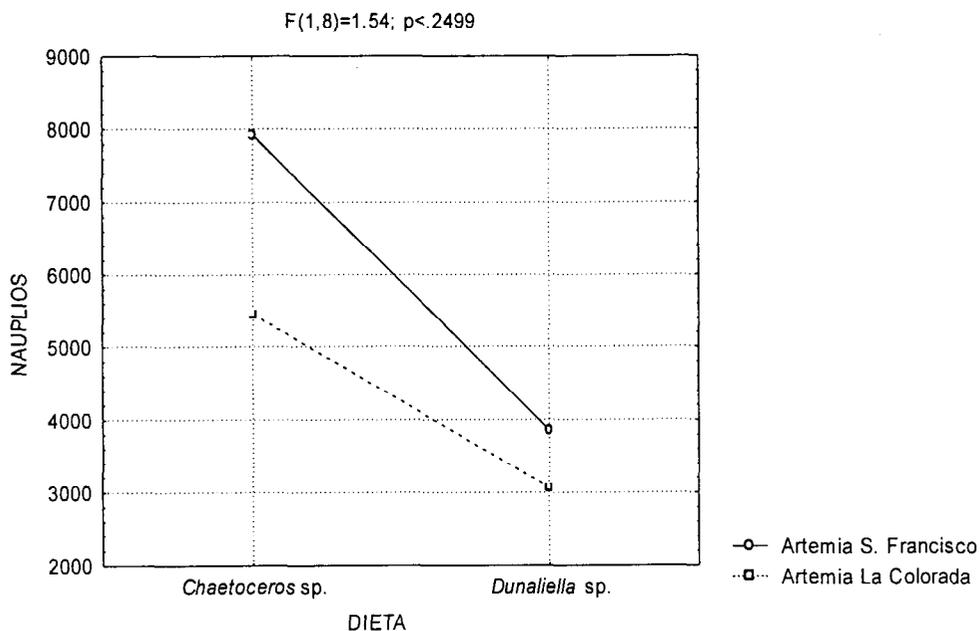


Figura 15: Gráfica de interacción de dos vías del número de nauplios de *Artemia* San Francisco y *Artemia* La Colorada alimentadas con *Chaetoceros* sp. y *Dunaliella* sp. con un valor de confianza de 0.05.

Tabla 25: Análisis de varianza de dos vías para el número de nauplios en *Artemia* de San Francisco y *Artemia* La Colorada alimentadas con la dieta de *Chaetoceros* sp. y *Dunaliella* sp. con un valor de confianza de 0.05.

Fuente de variación	g.l.	S.C.	C.M.	F	P
Artemia	1	8024581	8024581	5.82261	0.042309*
Dieta	1	31308390	31308390	22.71728	0.001415*
Artemia-Dieta	1	2121002	2121002	1.53899	0.249915
Error	8	11025400	1378175		

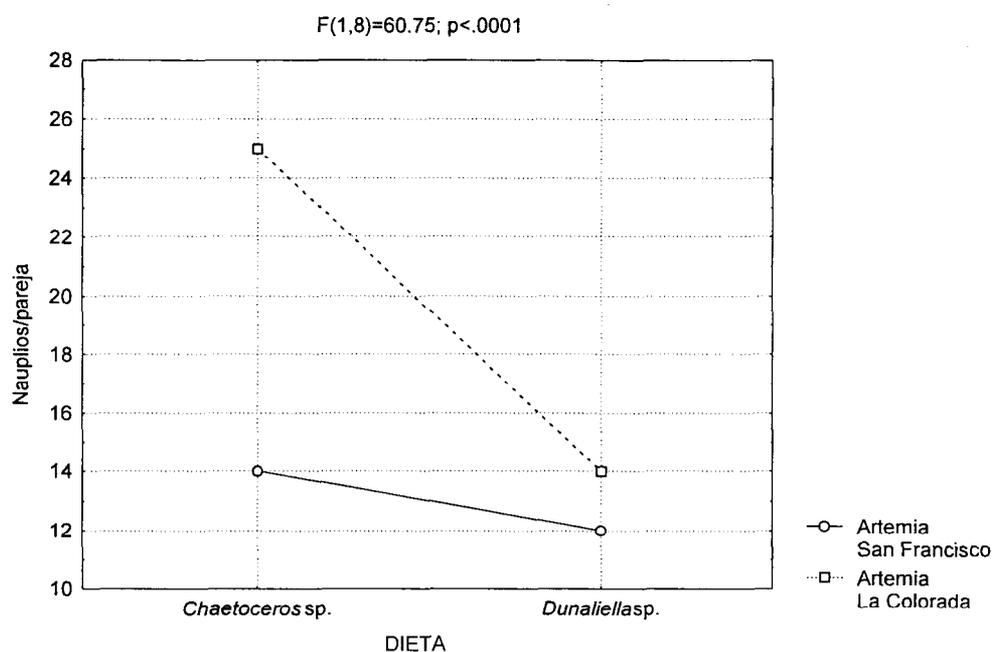


Figura 16.- Gráfica de interacción de dos vías de la relación nauplios/pareja de *Artemia* San Francisco y *Artemia* La Colorada alimentadas con *Chaetoceros sp.* y *Dunaliella sp.* con un valor de confianza de 0.05.

Tabla 26.- Análisis de varianza de dos vías para la relación nauplios/pareja de ambas cepas de *Artemia* con la dieta de *Chaetoceros sp.* y *Dunaliella sp.* con un valor de confianza de 0.05.

Fuente de variación	g.l.	S.C.	C.M.	F	P
Artemia	1	168.7500	168.7500	4.69837	0.06205
Dieta	1	114.0833	114.0833	3.17630	0.11256
Artemia-Dieta	1	70.0833	70.0833	1.95127	0.19998
Error	8	287.333	35.916		

7.3.- COMPOSICION BIOQUIMICA DE *Artemia*

El contenido de proteínas de *Artemia* de La Colorada y *Artemia* de San Francisco alimentadas con *Chaetoceros* sp. y *Dunaliella* sp. se encontró entre el 39% y el 48.7% respecto al peso seco (Tabla 27).

El contenido de carbohidratos fue menos homeogeneo, el valor más bajo se encontró en *Artemia* de La Colorada alimentada con *Dunaliella* sp. (0.12%) y el más alto fue con la misma cepa de *Artemia* alimentada con *Chaetoceros* sp. (10.6%).

Ambas cepas de *Artemia* presentaron mayor contenido de lípidos al alimentarse con *Dunaliella* sp. que con la dieta de *Chaetoceros* sp.

Tabla 27: Contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos de *Artemia* de San Francisco y *Artemia* de La Colorada alimentadas con *Chaetoceros* sp. y *Dunaliella* sp. cultivadas en medio f/2.

CEPA DE <i>Artemia</i>	DIETA	PROTEINAS %	CARBOHIDRATOS %	LIPIDOS %
La Colorada	<i>Chaetoceros</i> sp.	39.2 ± 1.0	10.6*	0.09 veces menos+
	<i>Dunaliella</i> sp.	44.2 ± 0	0.12 ± 0.1"	2.4 veces más+
San Francisco	<i>Chaetoceros</i> sp.	48.7*	3.8 ± 1.4	17.2 ± 8.7
	<i>Dunaliella</i> sp.	41.4 ± 2.5	4.1 ± 0.8	1.3 veces más+

*datos únicos

" diferencia significativa

+ respecto a *Artemia* San Francisco alimentada con *Chaetoceros* sp.

VIII.- DISCUSION

8.1.- CULTIVO DE MICROALGAS

8.1.1.- Curvas de crecimiento

Las algas planctónicas en cultivo y bajo condiciones normales de luz, temperatura, aireación y enriquecimiento inicial de nutrientes, pasan a través de una fase exponencial de crecimiento donde la síntesis de metabolitos y la división celular es acelerada y el número de células se incrementa geométricamente. Después de esta fase se alcanza la fase estacionaria, donde la densidad celular permanece constante y la viabilidad de ellas se mantiene a través de las reservas energéticas (Fogg, 1975). Además tienen una gran capacidad de adaptarse a diferentes condiciones ambientales, modificando algunos de sus procesos fisiológicos (Jorgensen y Nielsen, 1965). Tales modificaciones pueden verse reflejadas en el crecimiento y/o en la composición bioquímica.

Las curvas de crecimiento de *Chaetoceros* sp., *Dunaliella* sp. y *N. oleoabundans* en ambos medios de cultivo (f/2 y MIII) se ajustaron al modelo logístico, obteniéndose las mayores densidades en medio f/2.

En el medio f/2, el inicio de la fase estacionaria de crecimiento en *Chaetoceros* sp. se alcanzó entre el tercer y cuarto día de cultivo, coincidiendo con lo reportado por otros autores (González-Medina, 1994; Nieves-Soto y Vega-Pérez, 1994), obteniéndose una densidad de $2.38 \times 10^6 \pm 0.62 \times 10^6$ cel/ml. En medio MIII la fase estacionaria se alcanza al octavo día del cultivo con una densidad de 1.7×10^6 cel/ml. Nieves-Soto y Vega-Pérez (1994), obtuvieron una biomasa máxima al tercer día con una densidad de 2.7×10^6 cel/ml en un sistema de cultivo estático de 10 l en medio F, mientras que, López-Elías y Voltolina (1993) no encontraron diferencias significativas con esta cepa cultivada en medio F y un medio alternativo elaborado con fertilizante para cítricos en cultivos semicontinuos de 10 l con diferentes tasas de dilución, teniendo una densidad celular mayor que la obtenida por nosotros (entre 3.69 y 5.88×10^6 cel/ml); Arriaga-Haro (1993) obtuvo densidades de *Chaetoceros* sp. de 5×10^6 cel/ml con medio F en volúmenes de 10 l, enriqueciendo el medio de cultivo con doble cantidad de silicatos que la indicada en la formulación original.

La tasa de crecimiento de *Chaetoceros* sp. (cel/ml/día) (Tabla 8) hasta el segundo día de cultivo fue significativamente mayor en medio MIII (1.84) que en medio f/2 (0.44) (Tabla 5), sin embargo debe de considerarse la diferencia en las densidades iniciales del cultivo (Figura 2). El número de generaciones por día fue de 3.80 en medio MIII y 1.26 en medio f/2, siendo estos resultados altos, comparados con lo reportado por Nieves-Soto y Vega-Pérez (1994), donde

encontraron una tasa de crecimiento máxima de 1.18 con 2.75 divisiones/día al segundo día del cultivo en medio F.

Esta cepa de *Chaetoceros* sp. puede crecer en agua salobre y en agua de mar sin que se vea afectada la tasa de crecimiento exponencial, sin embargo, hay cambios en la producción de biomasa, teniendo menor densidad en los cultivos de agua salobre, como en el trabajo de González-Medina (1994), donde la máxima tasa de crecimiento de *Chaetoceros* sp. en medio F en cultivos de 10 l fue de 1.45 ± 0.4 generaciones/día en agua de mar con una biomasa de $2.65 \times 10^6 \pm 0.08$ cel/ml y en agua salobre de $2.12 \pm 0.43 \times 10^6$ cel/ml, siendo valores de biomasa muy cercanos a nuestros resultados.

La cepa aislada de La Colorada, se identificó tentativamente a nivel genérico como *Dunaliella* sp. (González-Esparza, CICESE com. pers.), ésta cepa es susceptible de cultivarse a nivel masivo, porque presenta una alta tasa de crecimiento, densidades altas en el cultivo, tolera un amplio intervalo de salinidad (0-230 ‰), temperaturas desde 20° a 35° C y pH entre 6 y 8.

D. tertiolecta una especie marina tolera salinidades de hasta aproximadamente 100 ‰ NaCl, *D. viridis* una especie halofílica tolera salinidades desde 0 ‰ hasta 300 ‰ NaCl y *D. salina* (especie también halofílica) de 30 ‰ hasta 350 ‰ NaCl (Borowitzka y Borowitzka, 1988). El pH óptimo varía con las diferentes especies de *Dunaliella*, para *D. tertiolecta* es de 6 y para *D. salina* y *D. viridis* es de 9 (Baas-Becking, 1930; Loeblich, 1972). En cuanto al intervalo de temperaturas, *D. salina* puede sobrevivir a temperaturas desde -35°C a 40°C (Massyuk, 1966; Ben-Amotz y Avron, 1980), siendo el óptimo entre 20°C y 40°C (Borowitzka, 1981). La temperatura óptima para *D. tertiolecta* es de 20°C y para *D. viridis* se encuentra entre los 14°C y 30°C (Gibor, 1956). El grado de la tolerancia a la temperatura está relacionada con la concentración de NaCl. Las células adaptadas a mayores salinidades son más resistentes a la temperatura, debido posiblemente a la protección que ofrece al alto contenido de glicerol hacia las proteínas (Borowitzka y Borowitzka, 1988).

Es claro que para determinar con exactitud a que especie pertenece la microalga que aislamos faltaría realizar estudios de microscopía electrónica de barrido, así como determinar sus intervalos óptimos de crecimiento variando las condiciones físicas de cultivo, la concentración de nutrientes y realizar determinaciones del contenido de pigmentos y ácidos grasos principalmente, así como.

El medio MIII no cubrió adecuadamente los requerimientos nutricionales de *Dunaliella* sp., ya que la densidad máxima fue la mitad de la obtenida en f/2 (0.91×10^6 cel/ml y 1.78×10^6 cel/ml $\pm 0.41 \times 10^6$ respectivamente), esto se puede deber a la formulación del medio, ya que para *Dunaliella salina*, *D. viridis* y *D. tertiolecta* la mejor fuente de nitrógeno es el nitrato de sodio (Mil'ko, 1962 y Grant, 1968). El medio MIII presenta fosfato de amonio y sulfato de amonio, las sales de

amonio son fuentes menos eficaces de nitrógeno y en concentraciones mayores de 25 M pueden ser letales (Gibor, 1956 ; Mil'ko, 1962).

El número de generaciones por día (hasta el tercer día) en medio MIII para *Dunaliella* sp. fue de 8.11 y en medio f/2 de 2.83 (Tabla 8). Herrero *et al.* (1991) cultivaron a *Dunaliella tertiolecta* en medio Algal-1 comparándolo con el medio Walne, ES y f/2. En el medio Algal-1 en la fase logarítmica *D. tertiolecta* presentó entre 0.85 y 1.16 duplicaciones/día y una densidad máxima de 16.15×10^6 cel/ml, siendo significativamente mayor a las densidades presentadas en los otros medios de cultivo y con nuestra cepa de *Dunaliella*. Al variar las concentraciones de urea del cultivo *D. tertiolecta* presentó una densidad máxima entre 5.87 y 7.96×10^6 cel/ml, y una tasa de duplicación/día entre 0.40 y 0.44 (Herrero, *et al.* 1994). Comparado con nuestro trabajo la velocidad de crecimiento fue menor pero la densidad máxima del cultivo fue mayor.

La concentración óptima de fosfato para el crecimiento de *D. salina* y *D. viridis* es de 0.02 a 0.025 g/l de fosfato de potasio (Gibor, 1956; Mil'Ko, 1962), concentraciones mayores a 5 g/l inhiben el crecimiento. En medio MIII se utilizó fosfato de amonio y la concentración fue de 9.5 g/l. Probablemente esta concentración tan alta de fosfato contribuyó a una densidad menor y menor desarrollo de las cepas en este medio de cultivo.

Neochloris oleoabundans fue la cepa que alcanzó la mayor densidad, siendo más alta en medio f/2 (6.8×10^6 cel/ml) que en MIII (4.5×10^6 cel/ml) (fig. 4). Sin embargo, es una cepa de lento crecimiento ya que la fase estacionaria en medio f/2 se inicia al 15avo día y en MIII al 17avo día. En otros trabajos, donde se ha cultivado a *Neochloris oleoabundans* en un medio de agua dulce (MD), se obtuvo la máxima tasa de crecimiento con 0.44 cel/ml/día en la primera semana del cultivo (Band-Schmidt, 1991), menor que la presentada en medio f/2 y medio MIII (1.71 y 1.61 respectivamente). El número de generaciones por día fue menor en medio MIII (20.90) que en medio f/2 (22.50) (Tabla 8).

Las tres cepas de microalgas presentaron una diferencia significativa con un valor de confianza de 0.05 en la tasa de crecimiento, siendo mayor en MIII que en medio f/2 para *Chaetoceros* sp. y *Dunaliella* sp. (Tablas 5, 6 y 7), sin embargo todas presentaron una menor densidad en medio MIII. Esto sugiere que las cepas se pudieron adaptar al medio MIII, pero que algunos factores se volvieron limitantes más rápidamente que en f/2, tales como la falta de un agente quelante y metales traza en el medio de cultivo, o como en el caso para *Dunaliella* sp., en que algunos elementos no se encontraron en concentraciones óptimas; una deficiencia o exceso en estos elementos se refleja en una disminución en el contenido de clorofila, afectando el proceso de la fotosíntesis y por lo tanto disminuyendo la producción de biomasa obtenida (Kaplan *et al.*, 1986; Boney, 1989). También se debe considerar que el medio MIII está formulado a base de fertilizantes agrícolas y generalmente se encuentran impurezas que afectan el crecimiento de las cepas. No obstante, esto no es desalentador, ya que las microalgas cultivadas en medio MIII presentaron una composición bioquímica

aceptable, además de tomar en cuenta la densidad del cultivo y la calidad del producto obtenido, se considerarían los costos de producción, ya que los medios de cultivo elaborados a base de fertilizantes agrícolas generalmente abaten los costos en más del 50% que los medios elaborados a base de reactivos (Nieves-Soto y Vega-Pérez, 1994). Otra explicación para las mayores tasas de crecimiento en el medio MII puede ser que las células bajo condiciones de estrés tiendan a reproducirse a mayor velocidad que en condiciones normales.

8.1.2.- Composición bioquímica

El contenido de proteínas, carbohidratos y minerales contribuyen en un 90-95% de la materia seca de las microalgas. El porcentaje restante se debe a los ácidos nucleicos (Becker, 1986). La composición bioquímica de las microalgas puede modificarse al variar las condiciones de cultivo como: temperatura, salinidad, intensidad luminosa, pH, tipo y concentración de nutrientes, fotoperíodo, tipo de nutrición y sistema de cultivo, entre otras (Fábregas *et al.*, 1986; Arredondo-Vega y Vázquez-Duhalt, 1991; Arredondo-Vega *et al.*, 1995b; Fábregas *et al.*, 1995; Otero *et al.*, 1995; Cordero *et al.*, 1996).

La manipulación de los parámetros fisicoquímicos en los cultivos de microalgas, constituye una ventaja muy importante, ya que de esta manera, es posible obtener una cepa con una composición bioquímica que al utilizarla en la alimentación de especies marinas como moluscos, crustáceos y peces generalmente en fase larvaria, puede provocar efectos directos en el desarrollo y sobrevivencia de los organismos.

Las tres especies de microalgas cultivadas presentaron diferentes respuestas en cuanto a la variación en su composición bioquímica al cultivarse en medio MIII y medio f/2, por ello no se puede generalizar el efecto que tiene la composición del medio de cultivo sobre las microalgas, debido a que el metabolismo y la respuesta de cada especie de microalga a su entorno es muy particular (Brown *et al.*, 1989).

Chaetoceros sp. y *N. oleoabundans* presentaron un incremento en el contenido de proteínas al cultivarse en medio MIII, sin embargo esta diferencia solo fue significativa en *Chaetoceros* sp. (Tabla 9); este efecto ya se había reportado en un medio con base en fertilizantes para cítricos. El incremento en el contenido de proteínas en el medio alternativo se puede deber a que la relación de N:P es mayor en este medio. También se observó un incremento en el contenido de lípidos en medio MIII con respecto al medio f/2. Las microalgas al estar en condiciones de estrés (baja concentración de nutrientes, alta salinidad, etc.) pueden desviar su metabolismo hacia la producción de sustancias de reserva como son los lípidos (López-Elías y Voltolina, 1993).

Spectorova *et al.* (1982) reportan que la composición bioquímica aproximada de *D. tertiolecta* es de 50% de proteínas, 20% de carbohidratos y 8%

de lípidos, Paniagua-Chávez (1993) reporta para *Dunaliella* sp. 32.4% de proteínas y 17.9% de carbohidratos respecto al peso seco. La cepa que aislamos identificada tentativamente como *Dunaliella* sp. presenta un contenido de proteínas y carbohidratos al ser cultivada en medio f/2 de 32.7% y 15.3% respectivamente (Tabla 9). La similitud en la composición bioquímica de las dos cepas de *Dunaliella* sp., nos da más pautas para considerar que pertenece a este género. Desafortunadamente el contenido de lípidos en nuestras cepas dieron valores altos, ya que al realizar la suma en porcentaje de los lípidos, proteínas y carbohidratos se rebasaba el 100%, por ello se expresa el contenido de lípidos únicamente como proporción en relación al contenido de lípidos encontrados en *Chaetoceros* sp. al cultivarse en medio f/2.

En el medio MIII, *Dunaliella* sp. incrementó significativamente el contenido de carbohidratos. Quizá las células de *Dunaliella* sp. tienden a desviar su ruta metabólica hacia la síntesis de carbohidratos, para utilizarlas como reservas energéticas y obtener energía de manera más inmediata. Caso contrario ocurre en *N. oleoabundans* siendo menor el contenido de carbohidratos en medio MIII (Tabla 9).

8.2.- CULTIVO DE ARTEMIA

8.2.1.- Sobrevivencia

El menor porcentaje de sobrevivencia en ambas cepas de *Artemia* se obtuvo con la dieta *N. oleoabundans* con valores de 1 a 2% en los primeros cinco días, por lo que se reflejó que este alimento es inadecuado para *Artemia*, al menos para el estadio de metanauplio (Tabla 11). Esto se puede deber al tamaño de partícula (6 a 25 μm), además de que esta cepa tiende a agruparse formando conglomerados de mayor tamaño, que dificultan su ingestión para la *Artemia* o a la producción de sustancias mucilaginosas (Band-Schmidt, 1991) que podrían interferir con su mecanismo de ingestión (Takano, 1967).

Chaetoceros sp. y *Dunaliella* sp. fueron una mejor dieta para ambas cepas de *Artemia*, encontrándose una sobrevivencia entre el 44% y el 69% (Tabla 11). Las dos cepas presentan menor tamaño que *N. oleoabundans*, 4-6 x 6-8 μm *Chaetoceros* sp. y 5-9 x 6-10 μm *Dunaliella* sp. Existe una interacción significativa entre la cepa de *Artemia* y la dieta, que se manifiesta en que *Chaetoceros* sp. es mejor alimento para *Artemia* de La Colorada y *Dunaliella* sp. para la *Artemia* de San Francisco (Fig.6; Tabla 12). Otros estudios indican que *Chaetoceros* sp. es un buen alimento para diferentes estadios de *Artemia franciscana*. Si comparamos estos datos con los reportados en la literatura, se observa que son aceptables. Arriaga-Haro (1993) obtuvo un intervalo de sobrevivencia muy amplio en *Artemia* de San Francisco alimentada con *Chaetoceros* sp. entre el 37% y el 94%; con *Dunaliella* sp. obtuvo una sobrevivencia entre el 2% y 19% y con *Spirulina maxima*

entre 0.6% y 3%. En condiciones de salinidad reducida, *Artemia* de San Francisco alimentada con la misma cepa de *Chaetoceros* sp. presentó una sobrevivencia del 56.4% y con *Nannochloropsis* sp. de 68% (Gonzalez-Medina, 1994). Castro y colaboradores (1995) evaluaron tres dietas en el crecimiento y sobrevivencia de *Artemia franciscana*, una de las dietas utilizadas fue *Spirulina* deshidratada mezclada con un producto comercial llamado Microfeast-100, al doceavo día lograron una sobrevivencia de 18.9%. Castelo-Branco y Sasso (1989) colectaron quistes de Alcohete Portugal, y los alimentaron con *Tetraselmis suecica* cultivada en un medio elaborado con base en estiércol de cerdo al 1%, y obtuvieron una sobrevivencia del 65%.

La dominancia de las especies de fitoplancton entre las diferentes salinas es variable, se ha observado que *Dunaliella* sp. es el principal productor primario en el Gran Lago Salado de Utah (Newman, com. pers.; Gillespie y Stephens, 1977), *Dunaliella viridis* y *D. salina* son dominantes en varios lagos salados incluyendo al Gran Lago Salado (Wirick, 1972), *Nannochloris* domina en Mono Lake (Jellison y Melack, 1988). Se ha demostrado que todas estas especies son dietas adecuadas para *Artemia*. En el caso de la salina La Colorada fueron varios aislamientos a lo largo del año que se hicieron y siempre dominaba *Dunaliella* sp. por lo que se podría suponer que es uno de los principales productores primarios de esta laguna y por lo tanto un componente importante en la dieta de *Artemia* en su habitat natural. Sin embargo sería importante realizar un perfil de aminoácidos de la *Artemia* de La Colorada y de varias cepas de microalgas, así como probar diferentes raciones y combinaciones de dietas para elegir aquella que tenga un perfil de aminoácidos más similar al de la *Artemia*, ya que esto repercutiría en un mejor crecimiento y mayor sobrevivencia del organismo.

8.2.2.- Crecimiento y estadios

Cuando se alimentaron a ambas cepas de *Artemia* con *N. oleoabundans*, las que sobrevivieron permanecieron en estadio metanauplio hasta el quinto día con una longitud menor que las otras dos dietas, esto posiblemente se atribuya al mayor tamaño de las células de *N. oleoabundans* (de 6 a 25 μm) y/o a la menor digestibilidad de sus componentes (Tabla 13). Al ser alimentadas con *Chaetoceros* sp. y *Dunaliella* sp. ambas cepas de *Artemia* alcanzan la etapa reproductiva después del noveno día, con excepción de *Artemia* La Colorada alimentada con *Dunaliella* sp. que alcanza la etapa reproductiva al séptimo día, reduciendo en un 40% el tiempo para alcanzar la madurez del organismo (Tabla 20).

Arriaga-Haro (1993) con *Dunaliella* sp. obtuvo la fase adulta al sexto día, obteniendo un mayor crecimiento con respecto a *Chaetoceros* sp. y a *Spirulina*, esto se observó del quinto hasta el noveno día. Sin embargo tuvo una mortalidad elevada y lo atribuye a que esta cepa particular de *Dunaliella* sp., se adhiere al recipiente del cultivo, por lo que se dificulta su digestión por parte de *Artemia*,

situación que no se observó con la cepa de *Dunaliella* sp. que se aisló de La Colorada. Malpica *et al.* (1996) reportan que la *Artemia* de La Colorada alcanza su etapa reproductiva a los 25 días de haber eclosionado alimentando la *Artemia* con una dieta mixta de *Spirulina* deshidratada y harina de arroz.

Al realizar el análisis de varianza triple para las tallas (μm) transformados a logaritmo natural (\ln) de ambas cepas de *Artemia* con las dietas (Tabla 14; Figs. 7 y 8) y el análisis de covarianza para la comparación de las pendientes de la regresión exponencial vemos que no existe una diferencia significativa con un α del 0.05 en la velocidad de crecimiento de las cepas de *Artemia*, pero sí en las tallas alcanzadas siendo mayor con la dieta de *Chaetoceros* sp. para *Artemia* de San Francisco (Figs. 7 y 11) y con la dieta de *Dunaliella* sp. para *Artemia* de La Colorada (Figs. 8 y 12). Al noveno día, *Artemia* de San Francisco con la dieta de *Chaetoceros* sp. tiene la mayor talla (3.40 ± 0.30 mm en estadio de postmetanauplio), el estadio de adulto lo alcanzan hasta el doceavo día; esto deja ver que existen diferencias nutricionales entre las dos cepas, y que *Dunaliella* sp. cubrió de mejor manera los requerimientos nutricionales de *Artemia* de La Colorada en el crecimiento y velocidad de desarrollo. Es importante recordar que las poblaciones de *Artemia* se encuentran en cuerpos de agua que difieren en las características químicas del agua, estacionalidad, comunidad biológica y productividad, estas características propias de su ambiente natural se ven reflejadas al realizar experimentos a nivel de laboratorio en su desarrollo, probablemente como resultados de presiones selectivas a las que están sujetas en su medio natural (Brown *et al.* 1984).

Posiblemente se puede incrementar las tallas, la sobrevivencia y la tasa de crecimiento de *Artemia* alimentada con *Dunaliella* sp., debido a que las raciones que se proporcionaron fueron en base a la ración de *Artemia* de San Francisco alimentada con *Chaetoceros* sp. Durante el desarrollo del trabajo se observó que al alimentarse con *Dunaliella* sp. el alimento se consumía a mayor velocidad con respecto a *Chaetoceros* sp. por lo que sería conveniente incrementar la ración de *Dunaliella* sp. para las dos cepas de *Artemia*.

Al alimentar nauplios de quistes de *Artemia* colectados en Alcochete Portugal, con *Tetraselmis suecica* cultivadas en estiércol de cerdo al 1%, a una densidad de 1 nauplio/ml se obtuvo una longitud final de 2.78 ± 0.6 mm (Castelo-Branco y Sasso, 1989); mientras que la dieta de *Spirulina* y *Dunaliella*, dió una longitud entre 6 y 7 mm al séptimo día (Johnson, 1980), sin embargo con la dieta de *Dunaliella* se utilizó una concentración mayor (1.08 mg peso seco/*Artemia*) para obtener una talla similar que con *Spirulina* (0.60 mg peso seco/*Artemia*). Esta ración fue mayor que la que se utilizó en este experimento y las tallas obtenidas fueron mucho mayores que las que nosotros obtuvimos (Tabla 13), lo que nos hace suponer que la ración empleada de *Dunaliella* sp. en nuestro trabajo debió incrementarse.

La longitud total obtenida en *Artemia* de San Francisco alimentada con *Chaetoceros* sp. fue de 3.4 ± 0.3 mm, este resultado concuerda con los datos obtenidos de Arriaga-Haro (1993) en donde *Artemia* de San Francisco obtiene una talla al noveno día de 3.61 mm al ser alimentada con *Chaetoceros* sp., también reporta que *Chaetoceros* sp. fue una buena dieta para el estadio de metanauplio y juvenil de *Artemia*. Por otra parte, los resultados obtenidos por González-Medina (1994) indican que en agua de mar y en condiciones de penumbra, *Artemia* alcanza tallas mayores (4.7 mm) al noveno día utilizando *Chaetoceros* sp. como alimento.

8.2.3.- Formación de parejas

En ambas cepas de *Artemia* con las dietas de *Chaetoceros* sp. y *Dunaliella* sp., más del 85% de la población formó parejas (Tabla 21). Trabajos previos reportan un porcentaje de formación de parejas entre 51 y 98% al alimentar *Artemia* de San Francisco con *Chaetoceros* sp., y de 31-46% de formación de parejas cuando *Artemia* de San Francisco se alimentó con una dieta mixta de *Spirulina máxima* (90%) y de *Chaetoceros* sp. (10%) (Arriaga-Haro, 1993).

El intervalo que reporta Arriaga-Haro (1993) entre 51-98% de formación de parejas es muy amplio, por lo que no es posible considerar que al repetir el experimento se obtenga un 98% de formación de parejas; sin embargo, los datos obtenidos en el presente trabajo, fueron del 86-98% cuando se alimentaron con *Chaetoceros* sp. y *Dunaliella* sp., sugiriendo un mejor rendimiento al utilizar estas cepas de microalgas. *Artemia* La Colorada presentó mayor formación de parejas al alimentarse con *Dunaliella* sp., esto fue significativamente diferente con un α de 0.05 al comparar el arcoseno de la raíz cuadrada del porcentaje de formación de parejas (Fig. 13).

De acuerdo a la Tabla 21 el mayor número de parejas se presentó en *Artemia* de San Francisco alimentada con *Chaetoceros* sp. (579), lo que coincide con Arriaga-Haro (1993) donde obtiene en *Artemia* de San Francisco y con la misma dieta 560-762 parejas, sin embargo con una dieta del 90% de *Spirulina maxima* y el 10% *Chaetoceros* sp. solo hubo de 74 a 110 parejas. Al alimentar la *Artemia* de San Francisco con *Dunaliella* sp. se formaron 322 parejas; la cepa de *Artemia* de La Colorada presentó significativamente menor número de parejas con ambas dietas (224) (Fig. 15). En *Artemia* San Francisco con la dieta de *Chaetoceros* sp. hubo mayor formación de parejas que con la dieta de *Dunaliella* sp. siendo significativamente mayor ésta diferencia con un α de 0.05 (Fig. 15; Tabla 22).

El inicio y la duración de la formación de parejas también fue variable. *Artemia* de San Francisco al igual que la *Artemia* de La Colorada alimentada con *Dunaliella* sp. alcanzan la etapa reproductiva antes que con la dieta de *Chaetoceros* sp. (Tabla 21), por ello en este caso sólo se reportan las tallas hasta

el séptimo día de cultivo, ya que al noveno día se estaban formando las parejas. El mayor contenido de carbohidratos de *Dunaliella* sp. o su mayor digestibilidad pudo haber favorecido el desarrollo de la *Artemia* en sus etapas tempranas teniendo como resultado una madurez temprana. En *Artemia* de La Colorada alimentada con *Dunaliella* sp. inició la formación de parejas al octavo día, durando once días; mientras que con la dieta de *Chaetoceros* sp., se inició tres días después con el mismo tiempo de duración. En la *Artemia* de San Francisco la duración de la etapa reproductiva fue de 7 a 8 días con *Chaetoceros* sp. y de 10 a 20 días con *Dunaliella* sp. Malpica *et al.* (1995) reportan que alimentando *Artemia* de La Colorada con *Spirulina* deshidratada y harina de arroz, el período pre-reproductivo dura 25 días, el reproductivo 35 y el post-reproductivo 52 días. Las diferencias en el inicio de la etapa reproductiva es muy grande, reduciéndose en más del 50% con una dieta de microalgas vivas. Este dato es importante considerarlo al realizar cultivos de *Artemia* a mayor escala, ya que a reserva de realizar un análisis de costo beneficio, una dieta a base de microalgas pudiera abaratar en gran medida el costo del cultivo.

8.2.4.- Producción de nauplios

Lenz y Browne (1991) han observado que las hembras silvestres producen mayor cantidad de progenie, tienen un periodo reproductivo más largo resultando en un mayor número de nauplios, esto no se observa en este estudio. El periodo reproductivo de *Artemia* La Colorada con las dietas de *Chaetoceros* sp. y *Dunaliella* sp. fue de 11 días, con la dieta de *Chaetoceros* sp. el periodo reproductivo en *Artemia* San Francisco dura de 7 a 8 días, pero con la dieta de *Dunaliella* sp. fue muy variable durando entre 10 y 20 días (Tabla 21). Sin embargo sí se observa una marcada influencia de la dieta (Tabla 24; Fig.16) en cuanto a la producción de nauplios. Con la dieta de *Chaetoceros* sp. se obtuvo, en ambas cepas de *Artemia* la mayor producción (7926 ± 1351 para *Artemia* de San Francisco y de 5650 ± 1283 para *Artemia* de La Colorada), la menor cantidad de nauplios producidos en *Artemia* de La Colorada podría ser explicada por la presencia de un saco ovífero de menor tamaño que el de *Artemia* de San Francisco (Castro *et al.* 1995b); por el otro lado, al comparar el número de nauplios/pareja en *Artemia* de San Francisco alimentada con *Chaetoceros* sp. (14 n/p) con *Artemia* de La Colorada alimentada con *Dunaliella* sp. (25 n/p) vemos que este último no es significativamente mayor. Con la dieta de *Dunaliella* sp. *Artemia* La Colorada tampoco presentó una diferencia significativa en la relación nauplios/pareja que en *Artemia* de San Francisco con la misma dieta (14 y 12 respectivamente) (Fig. 17).

Arriaga-Haro (1993) reportó una producción de progenie para de San Francisco entre 34 y 39 nauplios/día con la dieta de *Chaetoceros* sp. y con la dieta mixta respectivamente, iniciando la producción de progenie al veintinueve día en *Chaetoceros* sp. y a los dieciocho días con la dieta mixta a base de *Chaetoceros*

sp. (10%) y *Spirulina máxima* (90%). En este estudio el periodo reproductivo inició en *Artemia* de San Francisco alimentada con *Chaetoceros* sp. al catorceavo día.

8.2.5.- Composición bioquímica

De manera general se observa que ambas cepas de *Artemia* con las dieta de *Chaetoceros* sp. presentan mayor contenido de proteínas, seguida por el contenido de lípidos y un menor contenido de carbohidratos, coincidiendo con lo reportado por otros autores (López-Elías y Voltolina, 1993, Paniagua-Chavéz, 1993 ; González-Medina, 1994) (Tabla 27). No se observa una influencia clara por la dieta en la composición bioquímica. Probablemente al realizar una comparación del perfil de ácidos grasos tanto de las microalgas como de la *Artemia* alimentada con las diferentes dietas o utilizando otra metodología se observe una mayor influencia de la dieta.

Los requerimientos dietéticos en proteínas para crustáceos oscilan entre 20% (Corbin *et al.* 1983) y 40% del alimento (Millikin *et al.*, 1980), y habitualmente su dieta natural está formada por organismos con elevados contenido proteicos. Los niveles máximos de proteína hallados en dietas comerciales de peces carnívoros oscilan entre 37 y 55.3% en peso seco total (Pérez, 1984). Si se trata de peces omnívoros, los niveles de proteína de la dieta pueden descender a un 32% (Nose, 1979).

Los crustáceos no toleran altos niveles de grasa en la dieta, las dietas comerciales no suelen exceder del 8% de lípidos en peso seco (Conk-Lin *et al.* 1983). Las dietas para peces muestran niveles de lípidos que oscilan entre 2 y 18% en peso seco (Pérez, 1984; Pérez *et al.* 1987).

En cuanto a los niveles óptimos de carbohidratos para crustáceos se conoce muy poco. Las necesidades de carbohidratos para peces varían entre 13 y 44% en peso seco (Gozalbo y Amat, 1988).

Ambas cepas de *Artemia* alimentadas con *Chaetoceros* sp. y *Dunaliella* sp. de acuerdo a nuestros análisis contienen la cantidad adecuada de proteínas requeridas para la alimentación de crustáceos y peces. El contenido de lípidos es más alto de lo requerido en el caso de crustáceos, pero alimentadas con *Chaetoceros* sp. ambas cepas cumplen con lo requerido para peces. No hay que olvidar que estos parámetros son generales y que cada especie tiene sus requerimientos particulares que varían con su etapa de desarrollo.

Este breve análisis bioquímico de las dos cepas de *Artemia* nos permite ver que ofrecen alternativas para actividades acuiculturales de la región. Cabe recordar que existen otras sustancias tales como hormonas, vitaminas, factores de crecimiento, así como químicos que incrementan la palatabilidad y aceptación que sin estar perfectamente definidos, juegan un papel importante en al

asimilación y mayor crecimiento en diversas especies de peces y crustáceos (Gozalbo y Amat, 1988).

Este trabajo deja ver que el aprovechamiento de *Artemia* de La Colorada puede ser muy interesante. Su utilización con recolecciones frecuentes, adecuados métodos de manipulación y en fases larvarias adecuadas puede aportar notables beneficios a los proyectos acuiculturales en zonas próximas. Lo mismo puede decirse de otras salinas no estudiadas en las costas oaxaqueñas, que cuentan con poblaciones naturales de *Artemia*. Además ofrece otras alternativas para los ejidatarios de las salinas que actualmente sólo aprovechan la sal de estos lugares. Las diferencias observadas entre ésta cepa y la *Artemia* de San Francisco son mínimas, reforzando la importancia de aprovechar las cepas locales y reemplazar a las cepas comerciales que incrementan notablemente los costos de operación. Ambas dietas fueron favorables para las dos cepas de *Artemia*, resalta el hecho de que *Artemia* de La Colorada alimentada con *Dunaliella* sp. alcanza el estadio reproductivo en menos tiempo, y ambas cepas de *Artemia* con esta dieta forman mayor número de parejas. La dieta de *Chaetoceros* sp. parece ser una mejor opción para la alimentación de *Artemia* al alcanzar la etapa reproductiva pues hubo una mayor producción de nauplios con ésta dieta.

IX.- CONCLUSIONES

- La microalga aislada de la laguna La Colorada identificada a nivel genérico como *Dunaliella* sp., es una cepa que cubrió los requerimientos nutricionales para *Artemia* de La Colorada, principalmente en el estadio de postmetanauplio (pm) alcanzando la fase reproductiva en menor tiempo que la *Artemia* de San Francisco.
- *Dunaliella* sp., también fue un buen alimento para *Artemia* de San Francisco, desde los estadios de metanauplio (mn) y postmetanauplio (pm).
- Dada las características de tamaño, adaptabilidad, tiempo de generación *Dunaliella* sp. puede ser cultivada fácilmente, por lo tanto puede ser empleada como alimento para otros organismos.
- *Chaetoceros* sp., *Dunaliella* sp. y *Neochloris oleoabundans* pueden cultivarse en medio MIII, sin embargo la densidad del cultivo es más baja que en medio f/2.
- *N. oleoabundans* no es una buena dieta para *Artemia* de La Colorada ni para *Artemia* de San Francisco.
- *Chaetoceros* sp. y *Dunaliella* sp. fueron buenas dietas para la *Artemia* de La Colorada y *Artemia* de San Francisco.
- Con la dieta de *Chaetoceros* sp. se obtuvo mayor producción de progenie en ambas cepas de *Artemia*.
- La *Artemia* de La Colorada es susceptible de aprovecharse para la actividades de investigación de la región alimentada con *Dunaliella* sp. y *Chaetoceros* sp.

X.- RECOMENDACIONES

- Identificar a nivel de especie la microalga aislada de La Colorada.
- Continuar con la experimentación del medio MIII en cultivos de microalgas endémicas enriqueciéndolas con micronutrientes y silicatos para el caso de las diatomeas.
- Encontrar la ración óptima de *Dunaliella* sp. para *Artemia* de La Colorada y *Artemia* de San Francisco.
- Realizar análisis de ácidos grasos esenciales de la *Artemia* de La Colorada.
- Realizar prospecciones en las diferentes salinas del estado de Oaxaca para proponer un aprovechamiento sustentable de *Artemia* .

XI.-ANEXO

FORMULACION DEL MEDIO MIII (Trujillo-Valle, 1992).

$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	Fertilizante	9.5 g/l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Fertilizante	116.16 g/l
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Reactivo	22.89 g/l

XII.- LITERATURA CITADA

- AARONSON, S; T. BERNER y Z. DUBINSKY, 1980. Microalgae as a source of chemical and natural products. pp. 576-560. En: **Algae Biomass**: G. Shelef y C.J. Soeder (Eds.). Elsevier/North-Holland. Biomedical Press. 852 p.
- ABALDE, J.; CID, A; FIDALGO, J.P.; TORRES, E. y HERRERO, C. 1995. **Microalgas: Cultivo y aplicación**. Lab. de Microbiología. Depto. de Biología Celular y Molecular. Fac. de Ciencias. Universidad de la coruña. España. 210 pp.
- AMAT, F; HONTORIA, F; NAVARRO, J.C. y VARO, I. 1990. Características de 3 poblaciones de *Artemia* originarias de la Zona Mediterránea con vistas a su aprovechamiento en acuicultura. **Actas III Congreso Nacional de Acuicultura**. pp. 687-692.
- AOAC., 1990. Official Methods of Analysis, Vol. 1, 15th Edition. **Ass. Off. Analyt. Chem.**, Arlington, VA.
- ARAI, S. 1981. A purified test diet for coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, fry. **Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.**, **47**:547-550.
- ARCHIBALD, P., 1973. The genus *Neochloris* Starr (Chlorophyceae, Chlorococcales). **Phycologia**. **12** (3/4):187-193.
- ARREDONDO-VEGA, B.O. y VAZQUEZ DUHALT, R. 1991. Aplicaciones biotecnológicas en el cultivo de microalgas. **Ciencia y Desarrollo**, **27** (98):99-111.
- ARREDONDO-VEGA, B.O.; BAND-SCHMIDT, C.J. y VAZQUEZ DUHALT, R. 1995a. Biochemical composition on *Neochloris oleoabundans* adapted to marine medium. **Cytobios** (**83**):201-205.
- ARREDONDO-VEGA, B.O.; LAMELA, M.T. ; OTERO, A. ; PATIÑO, M. y FÁBREGAS, J. 1995b. Mixotrophic production of arachidonic acid and eicosapentaenoic acid by *Porphyridium cruentum*. **J. Mar. Biotechnol.** **3** : 79-81.
- ARRIAGA-HARO, V.M. 1993. Evaluación de 2 dietas frescas y una preservada para *Artemia franciscana*. **Tesis para obtener al grado de Maestro en Ciencias**. Departamento de Acuicultura. División de Oceanología (CICESE). 53 p.
- BAAS-BECKING, L.G.M. 1930. Observations on *Dunaliella viridis* Teodoresco. **Contributions on Marine Science, Stanford University**, pp. 102-114.
- BAND-SCHMIDT, C.J. 1991. Cinética del cambio fisiológico en *Neochloris oleoabundans* (Chlorococcaceae; Chlorophyceae) sometida a un choque osmótico salino. **Tesis para obtener el grado de Biólogo Marino (UABCS)**. La Paz, B.C.S.
- BAND-SCHMIDT; C.J.; ARREDONDO-VEGA, B.O.; VAZQUEZ-DUHALT, R. y GREPPIN, H. 1992. Effect of a salt osmotic upshock on the edaphic microalgae *Neochloris oleoabundans*. **Plant Cell Environ.**, **15**, 129-133.
- BECKER, E.W. 1986. Nutritional properties of microalgae: potential and constraints. p. 339-419. En: **Handbook of microalgal mass culture**. Richmond, A. (ed.) CRC Press, Florida.
- BEN-AMOTZ, S., 1980. Glycerol production in the alga *Dunaliella*. En: **Biochemical and photosynthetic aspects of energy production**. A. San Pietro (Ed.) N.Y. Academic Press, pp. 191-208.
- BEN-AMOTZ, S. y AVRON, M. 1980. Glycerol, b-carotene and dry algal meal production by commercial cultivation of *Dunaliella*. En: **Algal Biomass**. G. Shelef y C.J. Soeder (De.) pp. 603-610. Amsterdam, Elsevier/North-Holland Biomedical Press.
- BEN-AMOTZ, S, KATZ, y AVRON. M., 1982. Accumulation of b-carotene in halotolerant algae: purification and characterization of b-carotene-rich globules from *Dunaliella bardawill* (Chlorophyceae). **J. Phycol.** **18**:529-537.
- BEN-AMOTZ, S; TORNABENE, T.G. y THOMAS, W.H. 1985. Chemical profile of selected species of microalgae with emphasis on lipids. **J. Phycol.** **21**: 72-81.
- BENGSTON, D.A.; LEGER, P. y SORGELOOS, P. 1991. Use of *Artemia* as a food source for aquaculture. pp. 255-285. En: **Artemia biology**. Brown, R.A.; Sorgeloos, P. y Trotman, C.N.A. (Eds.) CRC Press. pp. 374.
- BOLD, H.C. y WYNNE, M.J. 1978. **Introduction to the algae: structure and reproduction**. Prentice-Hall, Inc. EUA. pp. 720.
- BONEY, A.D. 1989. **Phytoplankton**. Edward Arnold. Londres. pp. 118.
- BOROWITZKA, M.A., 1981. The microflora. Adaptations to life in extremely saline lakes. **Hydrobiologia**, **81**: 33-46.
- BOROWITZKA, M.A. y BOROWITZKA, L.J. 1988. *Dunaliella*. En: Borowitzka, M.A. y Borowitzka, L.J (Eds.). **Microalgal Biotechnol.** Cambridge University Press. pp. 27-58.

- BROWN, M.R.; JEFFREY, S.W. y GARLAND, C.D. 1989. Nutritional aspects of microalgae used in mariculture; a literature review. **CSIRO Marine Laboratories, Report 205**. Australia.
- CASTELL, J.D. 1983. Fatty acid metabolism in crustaceans. En: **Proceedings of the Second International Conference on Aquaculture to Shellfish Nutrition**, Oct. 27-29, 1981. Lewes/Rehoboth Beach, Delaware. Pruder, G.D.; Langdon, C.J. y Conklin, D.E. (Eds.). Louisiana State University, Division of Continuing Education, pp. 124-145.
- CASTELL, J.D.; CONKLIN, D.E.; CRAIGIE, J.S.; LALL, S.P. y NORMAN - BOUDREAU, K. 1986. **Aquaculture nutrition**. En: **Realism in aquaculture: achievements, constraints, perspectives**. Billio, M.; Rosenthal, H. y Sindermann, C.J. (Eds.). European Aquaculture Society Bredene (Belgium) pp. 251-308.
- CASTELO-BRANCO, A. y SASSO, P. 1989. Preliminary studies on the culture of *Artemia* using *Tetraselmis suecica* with pig manure. **European Aquaculture Society. EAS Special Publication. No. 10**
- CASTRO, B.T. y GALLARDO, R.C. 1985. *Artemia* sp. en investigación y docencia. **Cuadernos 2 CBS. UAM, Unidad Xochimilco. División Ciencias Biológicas y de la Salud. México.** 43 p.
- CASTRO, B.T., SANCHEZ, L. y DE LARA, R., 1987. Natural sources of brine shrimp (*Artemia*) in Mexico. pp.153-159. En: **Artemia research and its applications. Vol. 3. Ecology. Culturing. Use in aquaculture**. P. Sorgeloos; D.A. Bengston; W. Decler and E. Jaspers (Eds.) Universa Press. Wetteren, Bélgica.
- CASTRO, B.T.; CASTRO, M.J.; GALLARDO, R.C. y MALPICA, S.A. 1995a. Propiedades de *Artemia* spp. para la nutrición en la acuicultura. **Oceanología 1 (5):31-38**.
- CASTRO, M.J.; MALPICA, S.A.; RODRIGUEZ, G.S.A.; CASTRO, B.R. y DE LARA, A.R. 1995b. Análisis morfométrico de la *Artemia* spp. en la salina "Las Coloradas", Oaxaca, México. **Oceanología 2, 6 :117-128**.
- CHANTANACHAT, S. y BOLD, H.C. 1962. Phycological studies II. Some algae from arid soils. **University of Texas. Publication No. 6218, 74 pp**.
- CHIU-LIAO, I., HUEI-MEEI, S. y JAW-HWA, L. 1986. Larval foods for penaeid prawns. pp: 43-69. En: **CRC Handbook of Mariculture. Vol.1 Crustacean Aquaculture**. J. McVey y R. Moore (Eds.) Boca Raton, Florida.
- CHU, F.E.; DUPUY, J.L. y WEBB, K.L. 1982. Polysaccharide composition of five algal species used as food for larvae of the American oyster, *Crassostrea virginica*. **Aquaculture, 29:241-252**.
- CLAUS, C., BENUTS, F. y VANDEPUTTE, G. 1979. The biochemical composition of the larvae of two strains of *Artemia salina* (L.) reared on two different algal foods. **J. exp. mar. Biol. Ecol. 36: 171-183**.
- CONKLIN, D.E., DÁBRAMO, L.R. y NORMAN-BOURDREAU, K. 1983. Lobster nutrition. En: **Handbook of Mariculture. Vol. I. Crustacean Aquaculture**. J.P. McVey (Ed.) CRC Press, Inc. Boca Ratón, Florida, E.U.A. 442 pp.
- CORBIN, J.S., FUGIMOTO, M.M. y IWAI, T.Y. Jr. 1983. Feeding practices and nutritional considerations for *Macrobrachium rosenbergii* culture in Hawaii. En: **Handbook of Mariculture. Vol. I. Crustacean Aquaculture**. J.P. McVey (Ed.) CRC Press, Inc. Boca Ratón, Florida, E.U.A. 442 pp.
- CORDERO-ESQUIVEL, B; VOLTOLINA, D. y CORREA-SANDOVAL, F. 1993. The biochemical composition of 2 diatoms after different preservation techniques. **Com. Biochem. Physiol. 1058:369-373**.
- CORDERO, B.; OTERO, A.; PATIÑO, M.; ARREDONDO-VEGA, B.O. y FABREGAS, J. 1996. Astaxanthin production from the green alga *Haematococcus pluvialis* with different stress conditions. **Biotechnol. Letters 18(2) :213-218**.
- CORREA-REYES, J.G. 1993. Alimentación de *Artemia franciscana* con microalgas cultivadas bajo diferentes tipos de luz. **Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Marinas (UABC). 55p**.
- CORREA-SANDOVAL, F. 1991. Caracterización biológica y bioquímica de algunas poblaciones de *Artemia franciscana*, Kellog 1906. **Tesis de Doctorado en Ciencias (CICESE). 72 p**.
- COWEY, C.B. y SARGENT, J.R. 1979. Nutrition. En: **Fish Physiology, Vol. 8. Bioenergetics and growth**. Haar, W.S.; Randall, D.J. y Brett, J.R. (Eds.). Academic Press, N.Y. pp. 1-69.
- DESHIMARU, O. 1981. Studies on nutrition and diet for the prawn, *Penaeus japonicus*. **Mem. Kagoshima Prefect. Fish. Exp. Stn., 12:1-18**.
- DUBINSKY, Z; BERNER, T. y AARONSON, S. 1978. Potential of large scale algal culture for biomass and lipid production in arid lands. **Biotechnol. Bioeng. Symp. 8:51-68**.

- DUBINSKY, O; LERENTAL, Y.; CHRISTIAEN, D.; GLASER, R.; BARAK, Z. y ARAD, S. 1983. Production and characterisation of polysaccharides in the unicellular red alga *Rhodella reticulata*. En: **Algal Biotechnology**. T. Stadler; J. Mollion; M.C. Verdus; Y. Karamanos; H. Morvan y D. Christiaen (Eds.). Elsevier, London. pp. 451-461.
- FABREGAS, J. y HERRERO, C. 1985. Marine microalgae as a potential source of single cell protein. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 13: 1032-1033.
- FABREGAS, J. y HERRERO, C. 1986. Marine microalgae as a potential source of minerals in fish diets. **Aquaculture**, 51:237-243.
- FABREGAS, J; HERRERO, C.; ABALDE, J; LIAÑO, R. y CABEZAS, B. 1986. Biomass production and biochemical variability of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* Butcher with high nutrient concentrations. **Aquaculture**. 53: 187-199.
- FABREGAS, J.; PATIÑO, M.; ARREDONDO-VEGA, B.O.; TOBAR, J.L. y OTERO, A. 1995. Renewal rate and nutrient concentration as tools to modify productivity and biochemical composition of cyclostat cultures of the marine microalgae *Dunaliella tertiolecta*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 44 :287-292.
- FABREGAS, J; ABALDE, J.; CABEZA, B. y HERRERO, C. 1989. Changes in protein, carbohydrate and gross energy in the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* Butcher by nitrogen concentrations as nitrate, nitrite and urea. **Aquacult. Engin.** 8: 223-239.
- FERNANDEZ-REIRIZ, M.J.; PEREZ-CAMACHO, A; FERREIRO, M.J.; BLANCO, J.; PLANAS, M; CAMPOS, M.J. y LABARTA, U. 1989. Biochemical profile (total protein, carbohydrate, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. **Aquaculture** 83: 17-37.
- FOGG, G.E. 1975. **Algal cultures and phytoplankton ecology**. The University of Wisconsin Press. EUA. pp 175.
- FOGG, G.E; y THAKE, B.1987. **Algal cultures and phytoplankton ecology**. The University of Wisconsin. 269 pp.
- FUJITA, S.; WATANABE, T.; KITAJIMA, C. 1980. Nutritional quality of *Artemia* from different localities as a living feed for marine fish from the viewpoint of essential fatty acids : 277-290. En : **The brine shrimp Artemia**. Vol. 3 **Ecology, Culturing, use in aquaculture**. Persoone, G. Sorgeloos, P.; Roels, O.; Jaspers, E. (Eds.) Universa Press, Wetteren, Belgium.456 pp.
- GALLAGHER, M.L. y BROWN, W.D. 1975. Composition of San Francisco Bay brine shrimp (*Artemia salina*). **J. Agric. Food Chem.** 23 (4):630-632.
- GARCIA, E. 1973. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Koeppen. **Inst. Geog. UNAM**. 2ª. Edición. 246 pp.
- GIBOR, A. 1956. The culture of brine algae. **Biological Bulletin, Woods Hole**, 3 :223-229.
- GILLESPIE, D.M. y STEPHENS, D.W. 1977. Some aspects of plankton dynamics in the Great Salt Lake, Utah. En: Greer D.C. (Ed.). **Desertic terminal lakes. Proceedings from the International Conference on desertic terminal lakes**. Utah State University, Logan, Utah.
- GONZALEZ-MEDINA, S. 1994. **Cultivo de Artemia franciscana en agua de salinidad reducida. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias. División de Oceanología. Depart. de Acuicultura (CICESE). Ensenada, B.C. México.**
- GOZALBO, A. y AMAT, F. 1988. **Composición bioquímica de biomásas silvestres de Artemia (Crustaceae Branchiopoda, Anostraca)**, **Inv. Pesq.**, 52, 3:375-385.
- GRANT, B.R. 1968. The effect of carbon dioxide concentration and buffer system on nitrate and nitrite and assimilation by *Dunaliella tertiolecta*. **J. Gen. Microb.**, 54 :327-336.
- GROSS, F. 1937. Notes on the culture of some marine plankton organisms. **J. Mar. Biol. Ass. U.K.** 21, 753.
- GUDIN, C. y THEPENIER, C. 1986. Bioconversion of solar energy into organic chemicals by microalgae. **Adv. Biotech.Proc.** 6:73-110.
- GUILLARD, R.R.L. y RYTHER, U.H. 1962. Studies on marine planktonic diatoms. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervaceae* (Cleve) **Gran. Can. J. Microb.** 8:229-239.
- GUILLARD, R.R. 1973. Division rates. En: **Handbook of Phycological Methods. Culture methods and growth measurements**. Stein, J.R. (Ed.) Cambridge at the University Press. 448 pp.
- HANAOKA, H. 1973. Cultivation of three sp. of pelagic micro-crustacean plankton. **Bull. Plankton Soc. Japan** 20:19-29.

- HELFRICH, P. 1973. The feasibility of brine shrimp production on Christmas Island. **Sea Grant Technical Report UNIH-Sea Grant-TR-73-02**. 173 p.
- HERRERO, C., CID, A., FABREGAS, J. y ABALDE, J. 1991. Yields in biomass and chemical constituents of four commercially important marine microalgae with different culture media. **Aquacultural Eng.** 10: 99-110.
- HERRERO, C., ABALDE, J., CID, A., FIDALGO, P. y FABREGAS, J. 1994. Variations in the biochemical profile of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) cultured with different nutrient concentrations and urea as a nitrogen source. **Cah. Biol. Mar.** 35:213-223.
- HOFF, F. y SNELL, T. 1993. **Plankton culture manual**. Florida Aqua Farms. 147 p.
- HOLLAND, D.L. y SPENCER, B.E. 1973. Biochemical changes in fed and starved oysters, *Ostrea edulis* L. during larval development, metamorphosis and early spat growth. **J. Mar. Biol. U.K.** 3: 287-298.
- HOLLAND, D.L. 1978. Lipid reserves and energy metabolism in the larvae of benthic marine invertebrates. En: **Biochemical and Biophysical Perspectives in Marine Biology**, vol. 4. Malins, D.C. y sargent, J.R. (Eds.). Academic Press, London, pp. 85-123.
- IVLEVA, V. 1969. Branchiopoda, pp. 62-95. En: **Mass cultivation of invertebrates. Biology and methods**. Academic Science of USSR. All-Union "Navka", Moska. Translated in english by Israel Program for Scientific Translations, Jerusalem 1973. 148 p.
- JOHNSON, H.W. 1976. The biological and economic importance of algae. Part 4: The industrial culturing of algae. **Tuatara** 22, 1-114.
- JOHNSON, H.W. 1980. Evaluation of various diets for optimal growth and survival of selected life stages of *Artemia*, pp. 187-192. En: **The Brine Shrimp Artemia; Vol. 3, Ecology, Culturing, Use in Aquaculture**. G. Persoone, P. Sorgeloos, O. Roels y E. Jaspers (Eds.). Universa Press, Wetteren, Belgium, 456 p.
- JORGENSEN, E. y NIELSEN, E.S. 1965. Adaptation in plankton algae. En: **Primary Productivity in Aquatic Environments**. C.R. Goldman (Ed.). Univ. Of Calif. Press, Berkeley.
- KAPLAN, D.; RICHMOND, A.E.; DUBINSKY, Z.; y AARONSON, S. 1986. Algal Nutrition. En: **Handbook of microalgal mass culture**. Richmond, A. (de) pp:43-67. CRC Press Inc. Boca Ratón, Florida
- KANAZAWA, A.; TESHIMA, S.; SASADA, H. y RAHMAN, S.A. 1982. Culture of prawn larvae with microparticulate diets. **Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.** 48: 195-199.
- KATES, M. 1982. **Techniques of lipidology: isolation, analysis and identification of lipids**. T.S. Work y E. Work (Eds.) North Holland Publishing Company. Holanda.
- KELLY, O.; HASELTINE, A.W. y EBERT, E.E. 1977. Mariculture potential of the spot prawn, *Pandalus platyceros* Brandt. **Aquaculture**, 10:1-16.
- KINNE, O. (Ed.) 1977. **Marine Ecology**, Vol. 3. Cultivation. Part 2. John Wiley and Sons, New York, EUA, 1293 p.
- KOCHERT, G., 1978. Carbohydrate determination by the phenol-sulphuric method. En: J.A. Hellebust y Craigie, J.S. (Eds.) **Handbook of phycological methods: physiological and biochemical methods**. Cambridge University Press.
- LE BORGNE, Y. 1990. Culture of microalgae. En: G. **Aquaculture**. Vol. 1. Barnabé (ed.). Ellis Horwood, N.Y.
- LEGER, P.; BIEBER, G.F.; SORGELOOS, P. 1985. International Study on *Artemia*, 33. Promising results in larval rearing of *Penaeus stylirostris* using a prepared diet as algal substitute and for *Artemia* enrichment. **J. World Maricul. Soc.** 16:354-367.
- LEGER, P.; BENGSTON, D.A.; SIMPSON, K.L., y SORGELOOS; P. 1986. The use and nutritional value of *Artemia* as a food source. **Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev. Aberdeen University Press**, 24, 521-623.
- LOEBLICH, L.A. 1972. **Studies on the brine flagellate *Dunaliella salina***. Tesis Doctoral. Universidad de California. San Diego. EUA
- LOPEZ-ELIAS, J.A. y VOLTOLINA, D. 1993. Cultivos semicontinuos de cuatro especies de microalgas con un medio no convencional. **Cienc. Mar.**, 19(2):169-180.
- LOWRY, O.H., ROSENBOUGH, N.H.; LEWIS, F.A. y RANDALL, R.J. 1951. Protein measurement with the phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193: 265-275.
- MALPICA, S.A.; CASTRO, M.J.; CASTRO, B.T.; DE ARA, A.R. y CASTRO, M.G. 1996. Datos de la capacidad reproductiva de *Artemia franciscana*, variedad Oaxaca que permiten calcular producciones comerciales mediante el cultivo

- de este recurso. **Memorias del Primer Encuentro sobre Investigación y Desarrollo Costero: Guerrero, Oaxaca y Chiapas. 14,15 y 16 de noviembre. pp. 25.**
- MALPICA, S.A.; CASTRO, M.J.; RODRIGUEZ, G.I.; CASTRO, B.T.; GALLARDO, R.C. y DE LARA, A.R. 1995. Características de la reproducción y del período de vida en las hembras de la población de *Artemia* spp. de la salina de "Las Coloradas", Oaxaca, en condiciones de laboratorio. **Oceanología, 3, 7. :127-133.**
- MASSUYUK, N.P. 1966. Mass culture of the carotene-bearing alga *Dunaliella salina* Teod. **Ukranskyia Botanichnyia Zhournal, 23, 12-19.**
- MIL'KO, E.S. 1962. Study of the requirements of two *Dunaliella* spp. in mineral and organic components of the medium. **Moscow University Vestnik, Biology, 6 :21-23.**
- MILLIKIN, M.R.; BIDDLE, G.G.; SIEWICKI, T.C.; FROTNER, A.R. y FAIR, P.H. 1980. Effects of various levels of dietary protein on survival, molting and growth of juvenile blue crab (*Callinectes sapidus*). **Aquaculture, 19: 149-161.**
- MYKELSTAD, S. 1974. Production of carbohydrates by marine planktonic diatoms. 1. Comparison of nine different species in culture, **J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 15:261-274.**
- NAVARRO, 1990. **Tesis Doctoral. Universidad de Valencia. Valencia, España. 336 p.**
- NIEVES-SOTO, M. y VEGA-PEREZ, C. 1994. Tasa de crecimiento, biomasa y costos de producción de *Tetraselmis suecica* (Chlorophyceae) y *Chaetoceros* sp. (Bacillariophyceae) cultivadas con el medio F y tres medios alternativos. **Ciencias del Mar, época 1, 13:39-53.**
- NIMURA, Y. 1967. Biology of the brine shrimp. **Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 33 (7):690-702.**
- NOSE, T. 1979. Diet compositions and feeding techniques in fish culture with complete diets. En: **Finfish nutrition and fishfeed technology.** Halver, J.E. y Tiews, K. (Eds.). Satz und Druck: Heenemann GNhG y Co. Berlin, Alemania, 593 pp.
- OTERO, A.; ARREDONDO-VEGA, B.O.; PATIÑO, M.; LAMELA, T. y FABREGAS, J. 1995. Production of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in semicontinuous cultures of the marine diatom *Phaedactylum tricorutum*. **J. Mar. Biotechnol. 3 :82-85.**
- PANIAGUA-CHAVEZ, C.G. 1993. Viabilidad, composición proximal y valor alimenticio de *Dunaliella* sp. preservada por congelamiento. **Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias (CICESE). 76 p.**
- PARSONS, T.R.; STEPHENS, K. y STRICKLAND, J.D. 1961. On the chemical composition of eleven species of marine phytoplankters. **J. Fish. Res. Bd. Can., 18:1001-1016.**
- PEREZ, J. 1984. Efecto de la hora de ingesta y de la naturaleza de las dietas sobre el metabolismo de *Dicentrarchus labrax*. **Tesis de licenciatura. Univ. de Barcelona. 112 pp.**
- PEREZ, J.; RAMOS, J. y ZANUY, S. 1987. Efecto del origen de la dieta sobre el ritmo de emisión de heces y la digestibilidad de la lubina (*Dicentrarchus labrax* Linneo, 1766). **Inv. Pesq. 51:141-152.**
- PETRIELLA, A.M.; MULLER, M.I.; FENUCC, J.L. y SAEZ, M.B. 1984. Influence of dietary fatty acids and cholesterol on the growth and survival of the Argentine prawn, *Artemesia longinaris* Bate. **Aquaculture, 37:11-20.**
- PORRAS, D.; CASTREJON-OCAMPO, L; MENDOZA-MARAVILLA, A. y BAND-SCHMIDT, C.J. 1994. Bioecología de la *Artemia* de la laguna de La Colorada, Oax. **Informe final. U.Mar. Puerto Angel, Oax. México.**
- PROVASOLI, L; CONKLIN, D.E. y D'Angostino, A. 1970. Factors inducing fertility in aseptic crustacea. **Helgolander Wiss. Meeresunters. 20:443-454.**
- PURDOM, C.E. y PRESTON, A. 1977. A fishy business. **Nature, 266:396-397.**
- RAMUS, J. 1972. The production of extracellular polysaccharide by the unicellular red alga *Porphyridium aeruginum*. **J. Phycol. 8:97-111.**
- REEVE, M.R. 1963. Growth efficiency in *Artemia* under laboratory conditions. **Biol. Bull. 125(1):133-145.**
- ROLLESEN, G. 1939. Artificial rearing of fry seawater fish - preliminary communication. **Rapp. P. V. Reun. Cons. Perm. Int. Explor. Mer. 109, 133.**
- ROSEN, B.H. 1990. **Identification manual for microalgae used in aquaculture.** Florida Aqua Farms.
- SANCHEZ-SAAVEDRA, M.P. y VOLTOLINA, D.1994. The chemical composition of *Chaetoceros* sp. (Bacillariophyceae) under different light conditions. **Comp. Biochem. Physiol. 107b, 1 :39-44.**

- SEALE, A. 1933. Brine shrimp (*Artemia*) as a satisfactory food for fishes. *Trans. Am. Fish. Soc.* **63**, 129.
- SECRETARIA DE PESCA, 1990. **Bases para el ordenamiento costero-pesquero de Oaxaca y Chiapas. Aspectos Generales.** 1a. Edición. México.
- SICK, L.V. 1976. Nutritional effect of five species of marine algae on the growth, development and survival of the brine shrimp *Artemia salina*. *Mar. Biol.* **35**:69-78.
- SOKAL, R. y ROHLF, J. 1979. **Biometría. Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica.** Blume Ediciones. 832 p.
- SOMMER, T.R; POTTS, W.T.; y MORRISSY, N.M. 1990. Recent progress in the use of processed microalgae in aquaculture. *Hidrobiología*, **204/205**:435-443.
- SORGELOOS, P., 1979. The use of the brine shrimp *Artemia* in aquaculture. En: **The brine shrimp *Artemia*. Vol. 3: Ecology, culturing, use in aquaculture.** Persoone, G.;Sorgeloos, P.; Roels,O. y Jaspers, E. Universa Press. Wetteren, Belgium. 456 p.
- SORGELOOS, P., 1986. **Live animal food for larval rearing in aquaculture: the brine shrimp *Artemia*.** En: **Realism in aquaculture: achievements, constraints and perspectives.** Bilio, M.; Rosenthal, H. y Sindermann, C.J. (Eds.). European Aquaculture Society. Bredene, Bélgica. 199.
- SORGELOOS, P. y PERSOONE, G. 1975. Technological improvements for the cultivation of invertebrates as food for fishes and crustaceans. Hatching and culturing of the brine shrimp, *Artemia salina* L. *Aquaculture* **6**:303-317.
- SORGELOOS, P., LAVENS, P.; LEGER, P.; TACKAERT, W. y VERSICHELE, D. 1986. **Manual para el cultivo y uso de *Artemia* en acuicultura.** Programa Cooperativo Gubernamental FAO-Italia. Universidad del Estado en Gent, Bélgica. Facultad de Agronomía. 302 p.
- SORGELOOS, P.; BENGSTON, D.A; DECLEIR, W. y JASPERS, E. (Eds.) 1987a. ***Artemia* research and its applications,** Vol. 1: Morphology, genetics, radiobiology, strain characterization, toxicology. Universa Press. Wetteren, Bélgica.
- SORGELOOS, P.; BENGSTON, D.A; DECLEIR, W. y JASPERS, E. (Eds.) 1987b. ***Artemia* research and its applications,** Vol. 3: Ecology, culturing, use in aquaculture. Universa Press. Wetteren, Bélgica.
- SPECTROROVA, L.V. ; GORONKOVA, O.I., NOSOVA, L.P. y ALBITSKAYA, O.N. 1982. High density culture of marine microalgae promising items for mariculture.
- STULTS, V.J. 1974. Nutritional value of brine shrimp cysts. Encysted eggs of *Artemia salina*. **Tesis. Michigan State University.** East Lansing, EUA. Diss. Abstr. 75-7262, 110 p.
- TAMAYO, J.L. 1976. **Atlas de la República Mexicana.** Secret. Rec. Hidr., México. 253 pp.
- TESHIMA, S. y KANAZAWA, A. 1984. Effects of protein, lipid and carbohydrate levels in purified diets on growth and survival of the prawn larvae. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **50**:1709-1715.
- TORNABENE, T.G.; HOLZER, G.; LIEN, S. y BURRIS, N. 1983. Lipid composition of the nitrogen starved green algae *Neochloris oleoabundans*. *Enzyme Microb. Technol.* **5**:435-440.
- TRUJILLO-VALLE, M.L. 1992. Evaluación de dos sistemas para la producción masiva de microalgas, empleando un medio de cultivo artificial. **Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias (CICESE).** Ensenada, B.C. México.
- TRUJILLO-VALLE, M.L. 1993. La colección de microalgas del CICESE. **Informe técnico. Comunicaciones académicas. Serie Acuicultura.** CICESE, 103 pp. CIACT9301.
- VANAHAECKE, P. y SORGELOOS, P. 1983. International study on *Artemia*. XIX. Hatching data for 10 commercial sources of shrimp cysts and reevaluation of the "hatching efficiency" concept. *Aquaculture*, **30**, 43.
- VAZQUEZ-DUHALT, R. y ARREDONDO-VEGA, B.O. 1990. **Oil production from microalgae under saline stress.** pp:1.547-1.551. En: **Biomass for Energy and Industry.** 5th. E.C. Conference. Vol. 1. Policy, Environment and Harvesting. G.Grassi, G.Goose y G. dos Santos (Eds.). Elsevier Applied Science Publishers. Gran Bretaña.
- VON HENTIG, R. 1971. Einfluss von Salzgehalt und Temperatur auf Entwicklung, Wachstum Fortpflanzung und Energiebilanz von *Artemia salina*, *Mar. Biol.* **9**:145-182.
- WATANABE, T; KITAJIMA, C. y FUJITA, S. 1983. Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: a review. *Aquaculture*, **34**:115-143.

WATANABE, T.; OOWA, F.; KITAJIMA, C. y FUJITA, S. 1980. Nutritional quality of Brine Shrimp, *Artemia salina*, as a living feed from the viewpoint of essential fatty acids for fish. **Bull. Jap. Soc. Scient. Fish.** **44**(10):1115-1121.

WEBB, K.L. y CHU, F.E. 1983. Phytoplankton as a food source for bivalve larvae. En: **Proceedings of the Second International Conference on Aquaculture Nutrition: Biochemical and Physiological Approaches to Shellfish Nutrition**, oct. 27-29, 1981. Lewes/Rehoboth Beach, Delaware. Pruder, G.D.; Langdon, C.J. y Conklin, D.E. (Eds.). Louisiana State University, Division of Continuing Education, pp. 272-291.

WHYTE, J.N.C. 1987. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. **Aquaculture**, **60**:231-241.

YEMM, E.W. y WILLIS, A.J. 1954. The estimation of the carbohydrates in plant extracts by Anthrone. **Biochem. J.** **57**:508-514.