

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



**EFFECTO DE LAS DIETAS MICROALGALES EN LA
ALIMENTACIÓN Y PRODUCCIÓN DE HUEVOS DE
Parvocalanus crassirostris (COPÉPODA, CALANOIDEA)**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS**

PRESENTA

BIOL. MAR. JORGE ALEJANDRO SANTOYO FLORES

LA PAZ, B. C. S., JUNIO DE 2020



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14
REP 2017

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de **La Paz, B.C.S.**, siendo las **12:00** horas del día **05** del mes de **Junio** del **2020** se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Posgrado de: **CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS** para examinar la tesis titulada:

"EFECTO DE LAS DIETAS MICROALGALES EN LA ALIMENTACIÓN Y PRODUCCIÓN DE HUEVOS DE *PARVOCALANUS CRASSIROSTRIS* (COPEPODA, CALANOIDEA)"

del (la) alumno (a):

Apellido Paterno:	SANTOYO	Apellido Materno:	FLORES	Nombre (s):	JORGE ALEJANDRO
-------------------	---------	-------------------	--------	-------------	-----------------

Número de registro:

A 1 8 0 5 3 6

Aspirante del Programa Académico de Posgrado:

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS

Una vez que se realizó un análisis de similitud de texto, utilizando el software antiplagio, se encontró que el trabajo de tesis tiene un 9 % de similitud. **Se adjunta reporte de software utilizado (Turnitin).**

Después que esta Comisión revisó exhaustivamente el contenido, estructura, intención y ubicación de los textos de la tesis identificados como coincidentes con otros documentos, concluyó que en el presente trabajo **SI** ☐ **NO** ☒ **SE CONSTITUYE UN POSIBLE PLAGIO.**

JUSTIFICACIÓN DE LA CONCLUSIÓN: *(Por ejemplo, el % de similitud se localiza en metodologías adecuadamente referidas a fuente original)*

El grado de similitud es muy bajo según el Tunitin y se centra en la bibliografía y la metodología

****Es responsabilidad del alumno como autor de la tesis la verificación antiplagio, y del Director o Directores de tesis el análisis del % de similitud para establecer el riesgo o la existencia de un posible plagio.**

Finalmente y posterior a la lectura, revisión individual, así como el análisis e intercambio de opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR** ☒ **SUSPENDER** ☐ **NO APROBAR** ☐ la tesis por **UNANIMIDAD** ☐ o **MAYORÍA** ☐ en virtud de los motivos siguientes:

"SATISFACE LOS REQUISITOS SEÑALADOS POR LAS DISPOSICIONES REGLAMENTARIAS VIGENTES"

COMISIÓN REVISORA DE TESIS

M en C. JOSÉ RICARDO PALOMARES GARCÍA
Director de Tesis
Nombre completo y firma

DRA. SILVIE DUMAS
Nombre completo y firma

DRA. ROXANA DE SILVA DÁVILA
Nombre completo y firma

M en C. MAURICIO CONTRERAS OLGUIN
2° Director de Tesis (en su caso)
Nombre completo y firma

DRA. CHRISTINE JOHANNA BAND SCHMIDT
Nombre completo y firma

DR. SERGIO HERNÁNDEZ TRUJILLO
Nombre completo y firma
PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 05 del mes de Junio del año 2020

El (la) que suscribe BM. JORGE ALEJANDRO SANTOYO FLORES Alumno (a) del Programa

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

con número de registro A180536 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS

manifiesta que es autor(a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:

M EN C. JOSÉ RICARDO PALOMARES GARCÍA Y M EN C. MAURICIO CONTRERAS OLGUIN

y cede los derechos del trabajo titulado:

“EFECTO DE LAS DIETAS MICROALGALES EN LA ALIMENTACIÓN Y PRODUCCIÓN DE HUEVOS DE

PARYOCALANUS CRASSIROSTRIS (COPÉPODA, CALANOIDEA)”

al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Éste, puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: santoyo.jorge93@gmail.com - rpalomar@ipn.mx - mcontreras@ipn.mx

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

BM. JORGE ALEJANDRO SANTOYO FLORES

Nombre y firma del alumno

DEDICATORIA

“La naturaleza es siempre más sutil, más compleja y elegante de lo que somos capaces de imaginar”.

Carl Sagan

En especial a mis padres y familia que sin ellos sería incapaz de cumplir mis sueños.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Politécnico Nacional y al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, por la formación académica obtenida a través del grupo de investigadores y docentes.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), a los Proyectos “Variación estacional de la comunidad zooplanctónica en la Bahía de Ohuira, Sinaloa” SIP 20181350, “Caracterización de la comunidad de copépodos en el corredor pesquero Loreto – Isla Espíritu Santo”, SIP 20196005 y “Alimento vivo para cultivo larvario de peces marinos: de lo convencional a la innovación”, SIP 20181123 y Beca de Estímulo Institucional de Formación de Investigadores (BEIFI) del Instituto Politécnico Nacional, por las becas y apoyo otorgado para la realización de esta investigación.

En especial al M. C. Ricardo Palomares y M. C. Mauricio Contreras por la oportunidad de trabajar bajo su dirección y su tiempo dedicado a esta investigación.

Al comité revisor Dra. Silvie Dumas, Dra. Christine Band, Dra. Roxana de Silva por su tiempo, comentarios y revisiones.

Por su amistad y apoyo, Laura, Mauricio, Itzi, Ulises, Brenda y todos los colegas con los que compartí durante este tiempo.

A las amistades que siempre están cerca aun en la lejanía...

	Página
ÍNDICE GENERAL	
RELACION DE FIGURAS	I
RELACION DE TABLAS	II
GLOSARIO Y LISTA DE ACRONIMOS	III
RESUMEN	IV
ABSTRACT	V
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	5
JUSTIFICACIÓN	13
HIPÓTESIS	14
OBJETIVO	14
Objetivos particulares	15
MATERIALES Y METODOS	15
Cultivo de microalgas	15
Determinación de contenido de carbono de microalgas	16
Dietas y raciones	17
Cultivo de copépodos	18
Diseños experimentales	19
Tasa de aclaramiento	19
Tasa de ingestión	21
Ración diaria	21
Tasa de producción de huevos	22
Tasa de producción de huevos-peso específica	22
Tasa de eclosión	22
Cálculo de contenido de carbono en hembras y huevos	22
Producción intensiva a escala piloto	23
Análisis estadísticos	24
RESULTADOS	26
Biovolumen y contenido de carbono de microalgas	26
Tasa de aclaramiento, ingestión y ración diaria	27
Tasa de producción de huevos y eclosión	34
Tasa de producción de huevos-peso específica	38
Contenido de carbono en hembras y huevos	40
Producción a escala piloto	40
DISCUSIÓN	42
CONCLUSIONES	51
RECOMENDACIONES	51
LITERATURA CITADA	52
ANEXOS	64

RELACIÓN DE FIGURAS

Figura	Contenido	Página
1	Fotografía de referencia de cada microalga (40 x), figura geométrica seleccionada y ecuación para obtener el biovolumen celular. (A) <i>I. galbana</i> , (B) <i>C. calcitrans</i> , (C) <i>H. niei</i> y (D) <i>T. suecica</i> .	16
2	Mediciones realizadas en la hembra y huevo de <i>P. crassirostris</i> para la posterior obtención de su contenido de carbono.	22
3	Alimentación en hembras de <i>P. crassirostris</i> con dietas de microalgas. A) Tasa de aclaramiento, B) Tasa de ingestión y C) Tasa de ingestión de carbono, con cuatro dietas y sus tres raciones sin la incorporación del dinoflagelado.	29
4	Alimentación en las hembras de <i>P. crassirostris</i> A) Tasa de aclaramiento B) Tasa de ingestión celular y C) Tasa de ingestión de carbono, en las dietas y tres raciones con la incorporación del dinoflagelado. ¹	31
5	Ración diaria de <i>P. crassirostris</i> en las tres raciones en A) Dietas sin la incorporación del dinoflagelado y B) Dietas con la incorporación del dinoflagelado.	33
6	Tasa de producción de huevos y eclosión, en las tres raciones en las dietas sin la incorporación del dinoflagelado.	35
7	Tasa de producción de huevos y eclosión, en las tres raciones en las dietas con la incorporación del dinoflagelado.	37
8	Tasa de producción de huevos-peso específica de <i>P. crassirostris</i> en las tres raciones en A) Dietas sin la incorporación del dinoflagelado y B) Dietas con la incorporación del dinoflagelado.	39
9	Producción total promedio de huevos y nauplios de <i>P. crassirostris</i> a escala piloto.	41

RELACIÓN DE TABLAS

Tabla	Contenido	Página
I	Tasas de ingestión (ng Carbono Hembra ⁻¹ día ⁻¹) de distintas especies de copépodos alimentados con diversas dietas de microalgas.	8
II	Tasa de producción de huevos de distintas especies de copépodos obtenidas al alimentarlos con diversas dietas de microalgas.	11
III	Valores estandarizados de producción intensiva de especies de copépodos, volumen y producción de huevos y nauplios.	13
IV	Ecuaciones que relacionan la proporción Biovolumen y contenido de carbono propuestas por Menden-Deuer, 2000.	17
V	Dietas y raciones experimentales (µg C L ⁻¹) empleadas para evaluar su efecto en la alimentación y producción de huevos de <i>P. crassirostris</i> .	18
VI	Características de las especies de microalgas empleadas como alimento para <i>P. crassirostris</i> .	26
VII	Producción total (huevos + nauplios) de <i>P. crassirostris</i> en tanques a escala piloto, alimentados con las dietas control (<i>I. galbana</i> y Mezcla 1) y las dietas seleccionadas por su mayor productividad en los ensayos previos (<i>H. niei</i> y Mezcla 2).	41
VIII	Valores estandarizados de producción total de cultivos intensivos del copépodo <i>P. crassirostris</i> con distintas dietas de microalgas.	48
IX	Densidad celular promedio y desviación estándar de <i>I. galbana</i> y <i>C. calcitrans</i> durante los días de cultivo.	64
X	Densidad celular promedio y desviación estándar de <i>T. suecica</i> y <i>H. niei</i> durante los días de cultivo.	65
XI	Alimentación de <i>P. crassirostris</i> en base a las distintas dietas y raciones.	66
XII	Alimentación de <i>P. crassirostris</i> en base a las dietas plurialgales.	67
XIII	Producción de huevos en hembras de <i>P. crassirostris</i> en base a las distintas dietas y raciones.	68

GLOSARIO Y LISTA DE ACRONIMOS

Ácidos grasos esenciales (AGE): Ácidos grasos poliinsaturados de las series n-3 y n-6, que no pueden ser sintetizados o solo en pequeñas cantidades y deben ser obtenidos del alimento porque son necesarios para la vida de los organismos (Gunstone *et al.*, 1994)

Ácidos grasos altamente insaturados (HUFA por sus siglas en inglés): Ácidos grasos con 20 o más carbonos y tres dobles enlaces (insaturaciones) (Gunstone *et al.*, 1994).

Ácidos grasos poliinsaturados (PUFA por sus siglas en inglés): Ácidos grasos con más de un doble enlace. Los dobles enlaces tienen por lo general configuración *cis* y son metilenos interrumpidos (Gunstone *et al.*, 1994)

DHA: Ácido docosaheptaenoico, Ácido graso esencial poliinsaturado de la serie omega-3, formado por 22 carbonos con 6 dobles enlaces (Gunstone *et al.*, 1994).

EPA: Ácido eicosapentaenoico, Ácido graso poliinsaturado esencial de la serie omega 3, formado por 20 carbonos con cinco dobles enlaces (Gunstone *et al.*, 1994)

SDA: Ácido estearidónico (SDA por su acrónimo en inglés) Ácido graso esencial poliinsaturado de la serie omega-3, formado por 18 carbonos con 4 dobles enlaces (Gunstone *et al.*, 1994).

Dieta: Cantidad de cada tipo de alimento que ingiere un organismo durante un período de tiempo (Kleppel, 1993).

Ración: Porción de carbono delimitado para cada dieta experimental, para fines comparativos se definieron como ración baja, intermedia y alta.

Aclaramiento: Cantidad de alimento que puede obtener un organismo que se alimenta por filtración, determinado por la velocidad de agua que puede filtrar a través de su aparato de captura de alimentos en un determinado tiempo (Gauld, 1951).

RESUMEN

El uso de los copépodos en la acuicultura presenta restricciones ya que su cultivo a nivel intensivo ha mostrado limitaciones para mantener densidades elevadas con una buena producción de huevos. Esto altamente asociado con la calidad de las dietas microalgales otorgadas, las cuales influyen en las tasas de producción y eclosión de huevos. En este trabajo se determinó la tasa de ingestión, aclaramiento y ración diaria, así como la producción y eclosión de huevos del copépodo *Parvocalanus crassirostris* utilizando dietas monoalgales y plurialgales con la finalidad de mostrar la idoneidad del tipo de alimentación, con miras a optimizar su utilización en la producción acuícola. Se evaluaron las especies de microalgas utilizadas como dietas monoalgales *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros calcitrans*, *Tetraselmis suecica* y el dinoflagelado *Heterocapsa niei*, así como cuatro dietas plurialgales definidas como Mezcla 1 (*I. galbana* + *C. calcitrans* + *T. suecica*, 2:2:1), Mezcla 2 (*I. galbana* + *H. niei*, 1:2), Mezcla 3 (*I. galbana* + *C. calcitrans* + *H. niei*, 1:1:2) y Mezcla 4 (*I. galbana* + *H. niei*, 1:1). Se determinó el biovolumen celular y con base en ello el contenido de carbono celular, para realizar el cálculo de las raciones de carbono con base a las microalgas y sus combinaciones empleadas como dietas. Las menores tasas de aclaramiento se presentaron en las células de mayor biovolumen (*C. calcitrans*, *H. niei* y *T. suecica*) y las mayores en las dietas plurialgales Mezcla 2 y Mezcla 3. La mayor tasa de ingestión se presentó en la dieta pluriagal Mezcla 2, compuesta por *I. galbana* y *H. niei*. Al determinar la tasa de producción de huevos, la dieta Mezcla 2 mostro la mayor producción promedio con 20.2 a 23.5 h H⁻¹ d⁻¹. La tasa de eclosión en la mayoría de los tratamientos fue > 84%, a excepción de las dietas *I. galbana* y *H. niei* en sus raciones bajas con 82.2% y 73.7%, respectivamente. Se realizó un escalamiento exitoso del cultivo intensivo a escala piloto, demostrando que la incorporación del dinoflagelado *H. niei* a la dieta satisface de mejor manera las necesidades nutricionales del copépodo *P. crassirostris*.

Palabras clave: Tasa de aclaramiento, ingestión, ración diaria, huevos de copépodos, *Parvocalanus crassirostris*.

ABSTRACT

The use of copepods in aquaculture has restrictions because its intensive cultivation has shown limitations to keep high densities with good egg production. This is highly associated with the quality of the microalgal diets which influence the production and hatching rates of eggs. In this work, the clearance rate, ingestion rate, and daily ration were determined, as well as the production and hatching rate of eggs in the copepod *Parvocalanus crassirostris*, using monoalgal and pluralgal diets to show the suitability of the type of feeding for this copepod and to optimize its use in aquaculture production. The following microalgae species were evaluated as monoalgal diets *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros calcitrans*, *Tetraselmis suecica*, and the dinoflagellate *Heterocapsa niei*, as well as four pluralgal diets defined as *Mixture 1* (*I. galbana* + *C. calcitrans* + *T. suecica*, 2:2:1), *Mixture 2* (*I. galbana* + *H. niei*, 1: 2), *Mixture 3* (*I. galbana* + *C. calcitrans* + *H. niei*, 1:1:2) and *Mixture 4* (*I. galbana* + *H. niei*, 1:1). The cellular biovolume was determined and used to quantify the cellular carbon content of each microalgae, to calculate the carbon rations and their combinations used as diets for *P. crassirostris*. The lowest clearance rates in the cells with the highest biovolume cells (*C. calcitrans*, *H. niei* and *T. suecica*) and the highest in the pluralgal diets *Mixture 2* and *Mixture 3*. The highest ingestion rate was presented in the pluralgal diet *Mixture 2*, composed of *I. galbana* and *H. niei*. When determining the egg production rate, the diet *Mixture 2* showed the highest average production with 21.8 h $H^{-1} d^{-1}$. The hatching rate in most treatments was >84%, except for the diets *I. galbana* and *H. niei* in their low rations with 82.2% and 73.7%, respectively. A successful escalation of intensive cultivation was carried out at the pilot-scale, which showed that incorporation of dinoflagellate *H. niei* into the diet better meet the nutritional needs for the cultivation of the copepod *P. crassirostris*.

Key words: clearance rate, ingestion, daily ration, copepod eggs, *Parvocalanus crassirostris*

INTRODUCCIÓN

Los copépodos son pequeños crustáceos (0.2 a 28 mm), comunes tanto en ambientes marinos como dulceacuícolas, donde se han descrito más de 12,000 especies (Suárez-Morales *et al.*, 2000; Boxshall y Halsey, 2004). Estos organismos constituyen entre el 90 y el 97% de la biomasa de zooplancton y tienen un papel imprescindible en las redes tróficas acuáticas, dado que actúan como el principal eslabón entre los productores primarios y los organismos heterótrofos (de Puelles *et al.*, 2014). En la naturaleza, los copépodos y especialmente sus fases naupliares son consideradas como la presa natural de todas las larvas de peces (Hunter, 1981). En la acuicultura, se ha privilegiado el uso de rotíferos y nauplios de *Artemia*, por su facilidad de manejo, para la alimentación de algunas especies de peces. No obstante, algunas especies de peces marinos como pargos (familia Lutjanidae) y meros (familia Serranidae) registran bajas supervivencias al suministrarles este tipo de alimento. Por lo anterior, en años recientes se han generado investigaciones relacionadas al cultivo y utilización de los nauplios de copépodos para la alimentación de las larvas de peces en etapas tempranas de desarrollo. De hecho, los copépodos han demostrado un gran potencial en la maricultura, en función de su composición bioquímica que concuerda con los requerimientos nutricionales de las larvas de peces, gracias al elevado contenido de ácidos grasos esenciales (AGE), como el docosahexaenoico (DHA), y el eicosapentaenoico (EPA) así como aminoácidos libres y astaxantina. Estos compuestos son fundamentales para el desarrollo, crecimiento y supervivencia de las larvas de peces marinos (McKinnon *et al.*, 2003; Alajmi *et al.*, 2014).

Actualmente son pocas las especies de copépodos utilizadas como alimento vivo en la acuicultura. se han probado especies pertenecientes a los tres grupos principales: harpaticoides, ciclopoides y calanoides. En un principio las especies harpaticoides mostraron grandes ventajas debido a la gran tolerancia a variaciones de temperatura y salinidad, habilidad de alimentarse de dietas vivas e inertes, una mayor fecundidad y facultad de soportar su cultivo a densidades elevadas (100,000 org. L⁻¹) (Battaglia, 1970; Chandler, 1986; Fleeger 2005; Olivotto *et al.*, 2008). No obstante, su naturaleza bentónica se contrapone con la necesidad de estar disponibles en la columna de agua para facilitar la alimentación de las larvas de

peces (Støttrup 2003; Fleeger, 2005; Schipp, 2006; Buttino, 2009; Ajiboye *et al.*, 2011). Ante esta desventaja, las especies de copépodos calanoides han sido consideradas como mejores candidatos para su aprovechamiento dentro de la crianza de larvas de peces, debido al tamaño pequeño de sus nauplios, su hábitat planctónico y su calidad nutritiva (Støttrup *et al.*, 2006; Alajmi *et al.*, 2014). Tales características son deseables para cualquier alimento vivo, sin embargo, sus protocolos de cultivo aún no se encuentran del todo establecidos en comparación con los de copépodos de hábitos bentónicos. Esto debido a que los copépodos calanoides son más sensibles a los cambios en la calidad del agua, requieren alimentarse principalmente de microalgas vivas y presentan una menor capacidad reproductiva, en comparación con los ciclopoides y harpaticoides (Payne y Rippingale, 2001; Støttrup, 2006; Camus y Zeng, 2010). Por ello es importante comprender los procesos de alimentación y cómo estos influyen en la producción de huevos, para generar las condiciones adecuadas para su escalamiento y la optimización de su cultivo (Gusmão y McKinnon, 2009).

Dentro de la gran cantidad de especies de copépodos, se presentan distintos tipos de alimentación (herbívora, omnívora, detritívora y carnívora). Una característica importante para que el copépodo obtenga el alimento es su capacidad de movimiento ya que sin ella no tardaría mucho en agotar la provisión de las microalgas o partículas orgánicas del agua circundante. Este movimiento se consigue por el movimiento de las patas torácicas, apéndices bucales, anténulas y antenas. En las especies calanoides se reconocen tres tipos de movimientos: impulsos y giros rápidos, deslizamientos suaves y por espasmos (Marshall, 1973; Fernández de Puelles, 2015). Entre estos se describen dos tipos fundamentales de alimentación: por filtración o captación directa de partículas gracias a la presencia de sétulas en sus maxilas que permiten filtrar o capturar las células. El tamaño de las partículas que retienen los filtradores depende de la separación de las sétulas en las sedas plumosas de las maxilas. Se observa que ciertas especies herbívoras las tienen muy juntas, variando su distancia en función de las especies. En los carnívoros, en cambio, las sétulas están transformadas en ganchos que capturan las presas, aunque algunas sedas no muestran esta característica, como ocurre con *Centropages typicus* o *Acartia clausii*, entre otras especies, dando lugar a la

alimentación mixta de los omnívoros (Heinrich, 1963; Fernández de Puelles, 2015). Si el organismo presenta algún mecanismo de detección de partículas (sedas en las anténulas) sería una alimentación por choque o encuentro, teoría de “alimentación por encuentro” (Cushing, 1955). En caso de que el copépodo detecte la partícula a cierta distancia, la persigue intentando capturarla, constituyendo la teoría de “cacería activa” (Becklemishev, 1962) Se considera que en un mismo organismo se pueden observar varios tipos de alimentación en función de las circunstancias o del alimento del medio (Mullin, 1963; Fernández de Puelles, 2015).

La reproducción en los copépodos es un proceso multivariante (Mauchline, 1998), cuyo objetivo principal es mantener la producción de nauplios viables y saludables en cada generación. Muchos factores, intrínsecos o extrínsecos a los copépodos, pueden favorecer o alterar el proceso reproductivo. Diversos autores han mencionado efectos de diferentes compuestos químicos de algunas microalgas sobre la fecundidad, la embriogénesis y la eclosión de los huevos de copépodo. También se han informado otros aspectos, relacionados con la edad de las hembras y la reducción de la capacidad de fertilización masculina debido a la ingestión de tipos específicos de dinoflagelados (Pond *et al.*, 1996; Jonasdottir y Kiørboe, 1998; Kleppel *et al.*, 1998; Koski *et al.*, 1998; Miralto *et al.*, 1999; Laabir *et al.*, 2001). Los principales factores que regulan la producción de huevos en los copépodos son la calidad y cantidad de alimento suministrado (Camus *et al.*, 2009). Ambos factores están relacionados, pero es necesario investigar sobre ciertas cualidades de las microalgas en base a su tamaño, morfología celular, así como al aporte de carbono al organismo consumidor. Otros aspectos que considerar en la selección de microalgas como dietas, incluyen la posible presencia de compuestos tóxicos, su composición mineral y el contenido de componentes bioquímicos tales como aminoácidos, ácidos grasos poliinsaturados, carbohidratos y vitaminas (Shin *et al.*, 2003). No obstante, dentro de la amplia gama de microalgas disponibles para la acuicultura, su selección se ha basado en la calidad nutricional y su factibilidad para cultivarse de forma intensiva.

Algunas especies de copépodos son capaces de seleccionar y rechazar ciertas partículas al alimentarse (Donaghay y Small, 1979; Paffenhofer y Van Sant, 1985). Las células de fitoplancton contienen una variedad de compuestos orgánicos

disueltos y se ha propuesto que cada célula se encuentra rodeada de exudados químicos característicos. Estos exudados pueden ser detectados por los copépodos los cuales pueden ser capaces de seleccionar las partículas nutritivas de una mezcla de células (Fogg, 1966; Donaghay y Small, 1979; Andrews, 1983). En particular, algunas especies de dinoflagelados con potencial tóxico son rechazados por procesos mediados químicamente (Huntley *et al.*, 1986, Gill y Harris, 1987). En contraste, otros dinoflagelados han demostrado ser un excelente alimento debido a su perfil nutricional (altos niveles de ácidos grasos, EPA y estearidónico, SDA), el tamaño de su célula y a que se mantienen suspendidos en la columna de agua (Breteler, 1980; McKinnon, 2003; Shin *et al.*, 2003; Schultz y Kiørboe, 2009).

Investigaciones recientes han demostrado que los copépodos calanoides son adaptables al cautiverio y a las condiciones de cultivo intensivo (Payne y Rippingale, 2001; Alajmi *et al.*, 2015) pero su viabilidad como cultivo de apoyo para los cultivos de peces continua en investigación. Uno de los retos en el escalamiento del cultivo de copépodos es su tendencia a dejar de reproducirse al aumentar la densidad de cultivo (Kline y Laidley, 2015), lo cual puede ser a consecuencia del crecimiento poblacional o bien a que no se satisfacen debidamente los requerimientos dietéticos (Shin *et al.*, 2003). El rol de los componentes dietéticos esenciales (vitaminas, aminoácidos y ácidos grasos) en varias funciones fisiológicas de moluscos, crustáceos y peces marinos ha sido establecido anteriormente (Sargent *et al.*, 1993; Watanabe, 1993), aunque todavía no se ha establecido hasta qué punto la disponibilidad de tales elementos esenciales limita la reproducción en los copépodos (Kleppel *et al.*, 1998; Koski *et al.*, 1998; Anderson y Pond, 2000; Lacoste *et al.*, 2001). Las dietas microalgales que inducen la máxima fecundidad y el rápido desarrollo son importantes para el escalamiento intensivo del cultivo de copépodos, en especial las de alto contenido de ácidos grasos altamente insaturados (HUFA) como EPA y DHA, los cuales se han considerado como componentes dietéticos esenciales para los copépodos marinos (Lee, *et al.*, 2006). Algunas de las especies de microalgas más utilizadas en el cultivo de copépodos son: *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros calcitrans*, *Tetraselmis suecica* y *Nannochloropsis oculata* (Knuckey *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006; Puello-Cruz *et al.*, 2009; Alajmi y Zeng, 2013).

El copépodo seleccionado en el presente estudio, *Parvocalanus crassirostris* (Dahl F., 1894) es un copépodo calanoide, pelágico, de distribución tropical-subtropical y omnívoro. Tiene un tiempo de generación relativamente corto y produce huevos de tamaño reducido ($71.0 \pm 0.4 \mu\text{m}$), que son liberados por las hembras en la columna de agua, con un tiempo de eclosión cercano a las 7 horas. (VanderLugt y Lenz, 2009; Alajmi *et al.*, 2014). Los nauplios comienzan a alimentarse a partir del estadio tres y alcanzan la madurez entre los 8 a 10 días. Dado que los nauplios de copépodos son la presa preferida de las larvas de peces marinos y además cuentan con un perfil nutricional adecuado (Kline y Laidley, 2015), el copépodo *P. crassirostris* se seleccionó como una opción ideal para la primera alimentación de larvas de huachinango del Pacífico (*Lutjanus peru*) (Taylor-Cota, 2017).

En este estudio se determinó la tasa de aclaramiento, ingestión y ración diaria, así como la tasa de producción y eclosión de huevos del copépodo *Parvocalanus crassirostris* utilizando dietas monoalgales y plurialgales con la finalidad de determinar la idoneidad del tipo de alimentación para este copépodo, con fines de producción acuícola.

ANTECEDENTES

Las investigaciones relacionadas a la utilización de los copépodos como alimento vivo en la acuicultura se remontan a más de tres décadas, con los primeros intentos por mantener algunas especies en condiciones de laboratorio por una o más generaciones (Støttrup *et al.*, 1986). La búsqueda de estas especies se concentró en el cumplimiento de ciertas características biológicas que permitieran su cultivo con eficiencia y rentabilidad de las cuales pueden destacarse especies con: a) ciclos de vida cortos, b) elevadas tasas de fecundidad, eclosión y sobrevivencia, c) alto contenido energético y digestibilidad, d) resistencia al manejo y cambios de ambiente, y e) factibilidad a cultivarse a altas densidades (Støttrup y Norsker, 1997; Nanton y Castell, 1998; Pérez-Morales, 2005). Su importancia dentro de la acuicultura especialmente en la cría de larvas de peces marinos, así como los altos contenidos de ácidos grasos HUFA, y la proporción de estos (DHA/EPA) los posiciona como una alternativa viable ante otros alimentos vivos utilizados comúnmente como son rotíferos y artemias (Pinto *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2006; Rasdi

et al., 2016). Por lo tanto, el comprender la manera de satisfacer las necesidades nutricionales de *P. crassirostris* y como esto influye en aspectos de su dinámica poblacional, específicamente en la fecundidad, aportara información biológica importante para garantizar el impulso de su producción acuícola.

Tasas de aclaramiento, ingestión y ración diaria

Las primeras mediciones de la cantidad de alimento ingerido se realizaron en copépodos herbívoros, suponiendo que eran filtradores en su totalidad, por lo cual los resultados son generalmente expresados como volumen de agua filtrada o aclaramiento y es habitual expresar las cantidades en términos de peso (carbono o nitrógeno) asimilado por copépodo o por unidad de peso corporal (contenido de carbono o nitrógeno) (Frost, 1972, 1975; Marshall, 1973). La cantidad de alimento que puede obtener un organismo que se alimenta por filtración está determinado por el volumen de agua que puede filtrar en un tiempo definido, la concentración de alimento en el agua y la eficiencia en su mecanismo de filtración. Por otro lado, las condiciones experimentales como el tamaño del recipiente, la temperatura, el estado de desarrollo y sexo tienen implicaciones en la tasa de consumo (Anraku, 1964; Marshall y Orr, 1966).

Huskin et al., (2000), evaluaron la implicación de los afloramientos monoalgales en la especie *Calanus helgolandicus* donde las tasas de aclaramiento más bajas se presentaron al ser alimentado con *Emiliania huxleyi* con tasas de aclaramiento máximas de $0.40 \text{ ml Hembra}^{-1} \text{ hora}^{-1}$ ($\text{ml H}^{-1} \text{ hr}^{-1}$), alimentados a una ración de $468 \text{ } \mu\text{g Carbono Litro}^{-1}$ ($\mu\text{g C L}^{-1}$). Con las especies *Coccolithus pelagicus* y *Dunaliella tertiolecta* las tasas de aclaramiento fueron de $1.25 \text{ ml H}^{-1} \text{ hr}^{-1}$ (a una ración de $58 \text{ } \mu\text{g C L}^{-1}$) y $1.05 \text{ ml H}^{-1} \text{ hr}^{-1}$ (a una ración de $24 \text{ } \mu\text{g C L}^{-1}$), respectivamente. Las tasas más altas de aclaramiento se presentaron al alimentarse con *Prorocentrum micans* y *Thalassiosira weissflogii* con $3.45 \text{ ml H}^{-1} \text{ hr}^{-1}$ (a una ración de $220 \text{ } \mu\text{g C L}^{-1}$) y $4.17 \text{ ml H}^{-1} \text{ hr}^{-1}$ (a una ración de $123 \text{ } \mu\text{g C L}^{-1}$), respectivamente. Aunque se tuvo una baja tasa de aclaramiento ante los cocolitofóridos y clorofíceas, así como una preferencia a las otras microalgas, el autor concluye sobre la importancia de una dieta diversa en la alimentación de los copépodos.

Schultz y Kiørboe (2009) evaluaron la tasa de aclaramiento del copépodo *Pseudocalanus elongatus*, ante dos especies de dinoflagelados, el tóxico *Karenia mikimotoi* y el no tóxico *Gyrodinium instriatum*, observando una tasa de aclaramiento de 2.3 y 2.2 ml H⁻¹ hr⁻¹, respectivamente. Con las mismas dietas el copépodo *Temora longicornis* presentó tasas de aclaramiento menores de 1.09 y 2.1 ml H⁻¹ hr⁻¹, respectivamente. Al otorgar ambas especies en una mezcla en relación celular 1:1, los copépodos continuaron ingiriendo el dinoflagelado tóxico, pero redujeron su tasa de aclaramiento mientras que la tasa de ingesta para *G. instriatum* la tasa se mantuvo inalterada como una evidencia de la capacidad del copépodo para seleccionar o rechazar el alimento.

Band-Schmidt *et al.*, (2008) observaron una clara relación entre el tipo de alimento y las tasas de ingestión, para las especies *Acartia clausi* y *A. lilljeborgii*. Las menores tasas de ingestión (<300 ng Carbono Hembra⁻¹ hora⁻¹ (ng C H⁻¹ h⁻¹)), se presentaron al ser alimentados con *Cylindrotheca closterium*, *Dytilum brightwelli*, *Scrippsiella* sp., y *Gyrodinium* sp. en raciones de 400 a 1,000 µg C L⁻¹, en cambio, ambas especies de *Acartia* presentaron tasas de ingestión por encima de 700 ng C H⁻¹ hr⁻¹ al ser alimentado con dietas compuestas de células de mayor tamaño (9,000 a 40,000 µm³) como *Odontella longicruris*, *Prorocentrum rhathymum*, y *Chattonella* sp., lo cual sugiere que células pequeñas pudieran ser desfavorables para la ingestión, ya que se dificulta la captura y/o manipulación del alimento para el copépodo.

Alajmi y Zeng (2015) demostraron que la tasa de ingestión de *P. crassirostris* mantenidos en laboratorio era mayor a los de organismos recién capturados del medio ambiente. Al alimentarlos con *Isochrysis* sp. a una ración de 1,000 µg C L, obtuvieron tasas de ingestión de 888.4 y 775.3 ng C H⁻¹ hr⁻¹, respectivamente. La explicación fue que la domesticación y acondicionamiento a la dieta monoalgal (>2 años) favoreció a los organismos mantenidos en laboratorio mientras que los organismos silvestres estaban influenciados por la estacionalidad y cambios que implican la diversidad y ración del alimento, lo que jugó un papel fundamental en la tasa de ingestión (Tabla 1).

Tabla I. Tasas de ingestión (ng Carbono Hembra⁻¹ día⁻¹) de distintas especies de copépodos alimentados con diversas dietas de microalgas.

Especies	T(°C)	Ingestión	Dieta	Referencias
Calanoides				
<i>Calanus helgolandicus</i>	15	8.9	<i>E. huxleyi</i>	Huskin et al., (2000)
		1826	<i>P. micans</i>	
			<i>C. closterium</i>	
<i>Acartia clausi</i>	24	< 300	<i>D. brightwelli</i>	Band-Schmidt et al., (2008)
<i>A. lilljeborgii</i>			<i>Scrippsiella</i> sp.	
			<i>Gyrodinium</i> sp.	
<i>A. clausi</i>	24	> 700	<i>O. longicruris</i>	Band-Schmidt et al., (2008)
<i>A. lilljeborgii</i>			<i>Chaetoceros</i> sp.	
			<i>P. rhathymum</i>	
			<i>Chattonella</i> sp.	
<i>Parvocalanus crassirostris</i>	26	888.4	<i>Isochrysis</i> sp.	Alajmi y Zeng (2015)
	26	775.3	<i>Isochrysis</i> sp.	

Para estandarizar y comparar las tasas de ingestión de alimento de los copépodos, los resultados se expresan mediante el porcentaje del peso corporal ingerido diariamente (Marshall, 1973; Harris et al., 2000). Cushing y Vucetic (1963) relacionaron la ración diaria con las tasas de crecimiento específico de hembras silvestres de *Calanus finmarchicus*, al observar un consumo máximo de 390% de su peso corporal, sugiriendo que, con altas densidades de alimento, los copépodos entran en una fase de alimentación superflua, donde la asimilación pasa a segundo plano y no se refleja en un aumento de la capacidad reproductiva. Por otra parte, Kleppel (1992) con la especie *Acartia tonsa* observó raciones diarias en un rango de 3 al 96% del peso corporal de las hembras relacionado con las mayores tasas de ingestión en temporadas cálidas (21.6°C) de alta abundancia de nanoplancton, así como las raciones más bajas observadas en la temporada fría (14.6°C) caracterizada por una alimentación selectiva del copépodo en base a ciliados y dinoflagelados. Estas observaciones implican variaciones en la ingesta relacionadas al tamaño de

las células y a la saciedad de sus necesidades nutritivas considerando la respuesta del organismo ante las variaciones ambientales en la naturaleza. Bajo condiciones de laboratorio, Gaudy (1974) observó que el tamaño celular y la ración de las microalgas utilizadas para la alimentación de copépodos pelágicos juegan un rol importante en la tasa de ingestión con rangos de raciones diarias de 50% hasta 300% para *Calanus helgolandicus*, de 45% a 380% en *Centropages typicus*, de 50% a 1000% en *Temora stylifera* y de 33% a 400% en *Acartia clausi* respecto al peso corporal del organismo.

Producción de huevos y tasas de eclosión

Discernir los factores que regulan la producción de huevos, en cada especie de copépodo es una forma útil para mejorar su producción dentro de la acuicultura, además de que puede ser utilizado como un índice de productividad del cultivo. Los principales factores que regulan esta producción son la temperatura, así como la calidad y cantidad de alimento (Gusmao, 2009). En años recientes, se ha documentado el efecto de la dieta a base de microalgas en la dinámica poblacional de varias especies de copépodos en cultivo, demostrándose que el tipo de alimento (especies de microalgas), la calidad (composición química) y cantidad de alimento disponible mejoran la productividad de los copépodos, en cuanto a la producción de huevos, el éxito de eclosión, el desarrollo (nauplio, copepodito, adulto) y la supervivencia (Nogueira *et al.*, 2018). También se ha observado que un incremento en la ración de alimento promueve la producción de huevos, acorde a una función sigmoideal hasta llegar a un nivel de saturación (Dam *et al.*, 1994). Reconocer estos niveles de saturación en los copépodos en cultivo aporta información valiosa que permite optimizar la selección y producción de especies de microalgas, así como establecer las concentraciones ideales para su alimentación con relación a su máxima producción de huevos (Gusmao, 2019).

De las especies de copépodos utilizadas en cultivo *Euterpina acutifrons*, *Paracyclopina nana* y *Parvocalanus crassirostris* destacan por las tasas de producción de huevos obtenidas en base a la utilización de dietas monoalgales con 13.5, 17.2 y 31 huevos Hembra⁻¹ día⁻¹ (h H⁻¹ d⁻¹) respectivamente. Las dietas plurialgales evaluadas en las especies *E. acutifrons*, *P. crassirostris* y *Acartia*

sinjiensis también mostraron una producción de 19.5, 29 y 17.6 h H⁻¹ d⁻¹, respectivamente (Tabla II). Las dietas monoalgales utilizadas para el cultivo de los copépodos han mostrado carencias de ciertos nutrientes esenciales, como de ácidos grasos insaturados, esteroides o aminoácidos, mientras que las dietas plurialgales mostraron un efecto positivo en las tasas de producción de huevos, debido a la complementación de sus perfiles nutricionales, lo cual ha sugerido que el contenido de los ácidos grasos de cadenas largas insaturadas (HUFA) y la relación DHA:EPA en la dieta suministrada a los copépodos puede tener implicaciones de gran significancia para la producción de huevos (Kleppel *et al.*, 1998; Breteler *et al.*, 1999; Müller-Navarra *et al.*, 2008).

Kjørboe (1985) relacionó las tasas metabólicas en la especie *Acartia tonsa* con las tasas de crecimiento, en base a la ingestión y producción de huevos con una dieta de *Rhodomonas baltica* alimentado a tres raciones de carbono (500; 1,000 y 1,500 µg C L⁻¹). La tasa de ingestión máxima fue de 0.71 µg C, equivalente al 180% del carbono corporal y la tasa de producción de huevos más alta observada fue de 0.27 µg C (65% del carbono corporal) mostrando un incremento en las tasas de ingestión, así como en la producción de huevos relacionado con la ración de alimento. Kleppel (1992), con una población silvestre del copépodo *A. tonsa* observó las máximas tasas de ingestión en intervalos de 0.03-0.96 µg C equivalentes al 3-96% del peso corporal del organismo y las tasas de producción de huevos observadas variaron de 0.04 a 0.35 µg C equivalente a un rango de consumo entre el 4 y 35 % del carbono corporal diario. Esto sugiere que dentro de los límites metabólicos regidos por la temperatura, la respuesta de alimentación de *A. tonsa* depende de la ración de alimento, mientras que la producción de huevos depende más de los atributos cualitativos del alimento ingerido.

Tabla II. Tasa de producción de huevos (huevos Hembra⁻¹ día⁻¹) de distintas especies de copépodos obtenidas al alimentarlos con diversas dietas de microalgas.

Especies	h H ⁻¹ d ⁻¹	T (°C)	Dieta	Referencias
Harpaticoides				
<i>Euterpina acutifrons</i>	19.5		<i>C. muelleri</i> <i>Tetraselmis chuii</i>	
	13.5	27	<i>C. muelleri</i>	Camus y Zeng (2012)
Ciclopoides				
<i>Paracyclops nana</i>	17.2	24	<i>T. suecica</i>	Lee et al., (2006)
<i>Apocyclops royi</i>	13.5	30	<i>T. chuii</i>	Su et al., (2005)
Calanoides				
<i>Gladioferens imparipes</i>	25	25	<i>I. galbana</i>	Payne y Rippingale (2001)
<i>Acartia sinjiensis</i>	17.6	30	<i>Isochrysis</i> sp <i>T. chuii</i>	Camus y Zeng (2008)
<i>A. lilljeborgii</i>	38	24	<i>Scrippsiella</i> sp	
<i>A. clausi</i>	47	24	<i>Prorocentrum</i> <i>rhathymum</i>	Band-Schmidt et al., (2008)
<i>Parvocalanus crassirostris</i>	31	27	<i>Heterocapsa niei</i>	
	29	26	<i>Isochrysis</i> sp <i>Chaetoceros</i> sp	McKinnon et al., (2003)

Ensayo de producción a escala piloto

Se han desarrollado protocolos de producción intensiva para distintas especies de copépodos, bajo condiciones controladas, mostrando altas tasas de producción y con un requerimiento de espacio menor que el requerido por los sistemas extensivos. (Støttrup *et al.*, 1986; Fleeger *et al.*, 1995; Støttrup y Norsker 1997; Schipp *et al.*, 1999). Las especies utilizadas a niveles de producción intensiva requieren presentar tiempos de generación cortos y resistencia a elevados niveles de densidad poblacional, principalmente en las etapas adultas (Conceição, 2010). También se han desarrollado protocolos de producción para copépodos pertenecientes a distintos grupos, pero sobre todo para especies del orden Harpaticoida y Calanoida, los cuales han mostrado mejor adaptabilidad a las condiciones de cultivo intensivo. Los calanoides destacan por sus ventajas ante los harpaticoides, ya que presentan hábitos pelágicos durante todo su ciclo de vida y algunas especies tienen estadios naupliares pequeños, mientras que los harpaticoides pueden presentar un tamaño de nauplio adecuado pero son de hábitos bentónicos en una o todas sus etapas de vida, por lo que requieren de superficies u objetos para posarse, lo cual les imposibilita mantenerse disponibles como alimento para las larvas de peces en la columna de agua (McKinnon *et al.*, 2003; Shields *et al.*, 2005; Schipp, 2006). Dentro de los valores estandarizados de producción de huevos y nauplios resaltan los resultados obtenidos con las dietas pluricelulares de *Isochrysis* sp + *Chaetoceros* sp. empleadas para alimentar a las especies harpaticoides *Tisbe holothuriae* y *T. biminiensis* con 7.14×10^6 huevos $\text{m}^{-3} \text{ día}^{-1}$ ($\text{h m}^{-3} \text{ d}^{-1}$) y 28×10^6 $\text{h m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, respectivamente, así como los valores de producción obtenidos con el copépodo calanoide *P. crassirostris* en distintos volúmenes de cultivo con una producción de 4×10^6 $\text{h m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ (Shields y Laidley, 2003). Kline y Laidley (2015), con la misma especie calanoide, obtuvieron una producción de 18×10^6 $\text{h m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ alimentando mediante una dieta pluri-algal de *Chaetoceros muelleri* y *Tisochrysis lutea* aumentando el volumen de cultivo y la densidad de adultos. En la Unidad Piloto de Maricultivo del IPN-CICIMAR la producción fluctúa entre 12 y 24×10^6 $\text{h m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ donde se mantiene a la especie *P. crassirostris* en tanques de plástico de 1,000 L alimentados con una dieta pluri-algal de *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros*

calcitrans y *Tetraselmis suecica* obteniendo producciones altas, pero sin mostrar una regularidad en términos de la producción de huevos y nauplios (Tabla III).

Tabla III. Valores estandarizados de producción intensiva diferentes especies de copépodos (Modificada de Kline y Laidley, 2015).

Especies	Volumen (L)	Producción (m³ d⁻¹)	Referencias
Harpaticoides			
<i>Amphiascoides atipus</i>	1,440	1.94 x 10 ⁶	Sun y Fleeger (1995)
<i>Tisbe holothuriae</i>	10	7.14 x 10 ⁶	Gaudy y Guerin (1982)
	150	1.53 x 10 ⁶	Støttrup y Norksker (1997)
<i>Tisbe biminiensis</i>	4.5	28 x 10 ⁶	Sun y Fleeger (1995)
Ciclopoides			
<i>Apocyclops panamensis</i>	40	4.5 x 10 ⁶	Phelps y Sumiarsa (2005)
Calanoides			
<i>Gladioferens imparipes</i>	500	0.88 x 10 ⁶	
	1,000	0.52 x 10 ⁶	Payne y Rippingale (2001)
<i>Pseudodiaptomus pelagicus</i>	1,800	>1.0 x 10 ⁶	Cassiano (2009)
<i>Acartia tonsa</i>	450	0.20 x 10 ⁶	Støttrup <i>et al.</i> , (1986)
	1,000	0.25 x 10 ⁶	Schipp <i>et al.</i> , (1999)
	70,000	0.12 x 10 ⁶	Ogle <i>et al.</i> , (2005)
<i>Parvocalanus crassirostris</i>	400	4.0 x 10 ⁶	Shields y Laidley (2003)
	400	3.75 x 10 ⁶	Shields <i>et al.</i> , (2005)
	1,500	18 x 10 ⁶	Kline y Laidley (2015)
	1,000	12-24 x 10 ⁶	Contreras-Olguín, com. pers., (2018)

JUSTIFICACIÓN

Dentro de los beneficios de usar copépodos en la acuicultura se incluye su tamaño pequeño, adecuado nivel nutricional, alta digestibilidad, patrones de movimiento que estimulan la respuesta de alimentación en las larvas de peces, así como la importancia relativa al formar parte de la cadena alimenticia de las larvas de peces en la naturaleza. A pesar de estos beneficios, la mayor limitante para el uso de los copépodos como alimento vivo, es el establecimiento de altas densidades

poblacionales, que garanticen una cosecha estable de estadios naupliares y que cubra las necesidades del cultivo larvario de peces marinos. Sin embargo, son pocos los trabajos de investigación enfocados en la solución de estos problemas ya que, la gran mayoría abordan aspectos de la nutrición, reproducción o aspectos fisiológicos de los copépodos. Estos ensayos se han hecho a escala de laboratorio, utilizando pocos organismos, volúmenes pequeños (1 a 5 L) y periodos breves de tiempo (Fleeger *et al.*, 1995; Schipp *et al.*, 1999). Por lo que es necesario evaluar a escala piloto estos conocimientos generados y determinar en primera instancia la viabilidad técnica de su producción (Støttrup, 2000; Alajmi *et al.*, 2014; Kline y Laidley, 2015). La mayoría de los sistemas de cultivo de copépodos a gran escala se basan en técnicas de policultivo semicontrolado al aire libre lo cual no garantiza la obtención de nauplios del tamaño y la cantidad adecuada, además aumenta el riesgo de contaminación con parásitos y la introducción de depredadores, así como la imposibilidad de garantizar su suministro. Aunque se han realizado varios intentos para cultivar algunas especies de copépodos en sistemas intensivos, su tecnificación y manejo a grandes escalas continúan en proceso de investigación (Støttrup *et al.*, 1986; Støttrup y Norsker, 1997).

HIPÓTESIS

Las distintas dietas y raciones de microalgas en la alimentación del copépodo *P. crassirostris* serán determinantes en el contenido de carbono transferido a la producción secundaria representada por huevos. Por lo tanto, el optimizar la calidad y cantidad de alimento suministrado, permitirá mejorar las tasas de producción de huevos de hembras tanto en condiciones de aislamiento, como en condiciones de cultivo intensivo a escala piloto.

OBJETIVO

Determinar la dieta y ración óptima de microalgas (*Isochrysis galbana*, *Chaetoceros calcitrans*, *Tetraselmis suecica* y *Heterocapsa niel*), que garanticen la máxima producción del copépodo *P. crassirostris* en condiciones de cultivo.

Objetivos particulares

1. Determinar el biovolumen y contenido de carbono de las especies de microalgas utilizadas en la dieta del copépodo.
2. Establecer la tasa de aclaramiento, la tasa de ingestión y la ración diaria de alimento de hembras del copépodo *P. crassirostris* al suministrar distintas dietas de microalgas.
3. Evaluar los efectos de distintas dietas (monoalgal y pluri-algal) en la tasa de producción y eclosión de huevos.
4. Establecer el contenido de carbono de hembras y huevos, relacionando la tasa de ingestión y producción de huevos con el contenido de carbono corporal de la hembra.
5. Evaluar el efecto de dietas monoalgales y pluri-algales en la tasa de producción de huevos bajo condiciones de cultivo intensivo a escala piloto.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de microalgas

Los cultivos de las especies de microalgas Prymnesiofitas *I. galbana*, *C. calcitrans* y la Bacilariofita *T. suecica* se obtuvieron del laboratorio de cultivo de alimento vivo de la Unidad Piloto de Maricultivo, UPIMA-CICIMAR). El dinoflagelado *Heterocapsa niei*, se obtuvo del laboratorio de dinoflagelados, del CICIMAR. Las cepas se cultivaron en medio f/2, bajo condiciones controladas de temperatura, fotoperiodo y luminosidad ($24 \pm 1^\circ\text{C}$, 16L:8O, Irradiación 100 μmol). El escalamiento de los cultivos se realizó en matraces de 2 L a bolsas de 50 L y columnas de 350 L, según el requerimiento de alimento en los experimentos dentro del laboratorio de alimento vivo. Las muestras para los conteos de los cultivos y los remanentes de alimento fueron obtenidas mediante una pipeta de 1 ml y fijadas en una solución de formol al 4% en relación 1:1 para posteriormente realizar su contabilización en el caso de prymnesiofitas y bacilariofitas en las cámaras de Neubauer. Las células del dinoflagelado se contabilizaron en una cámara de Sedgewick-Rafter. Para evitar la extracción de las hembras de copépodos durante los experimentos de alimentación se introdujo un tamiz de 100 μm a través del cual se obtuvo la muestra. Se calculó la curva de crecimiento de las cuatro microalgas mediante la obtención del promedio

y desviación estándar de los conteos de densidad celular durante los días de cultivo en las bolsas de 50 L (Anexo 1 y 2). Para la alimentación de los copépodos los cultivos se utilizaron en la fase exponencial (*I. galbana* y *C. calcitrans*) y la fase estacionaria (*T. suecica* y *H. niei*).

Determinación de contenido de carbono de microalgas

Se utilizó la metodología descrita por Hillebrand (1999), para la determinación del biovolumen de las microalgas con base a su semejanza con figuras geométricas (Fig. 1). Para lo cual se obtuvieron las mediciones lineales de al menos 30 imágenes de células obtenidas mediante un microscopio electrónico de barrido Leica DMI 8, en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) para posteriormente realizar el cálculo del biovolumen celular (μm^3).

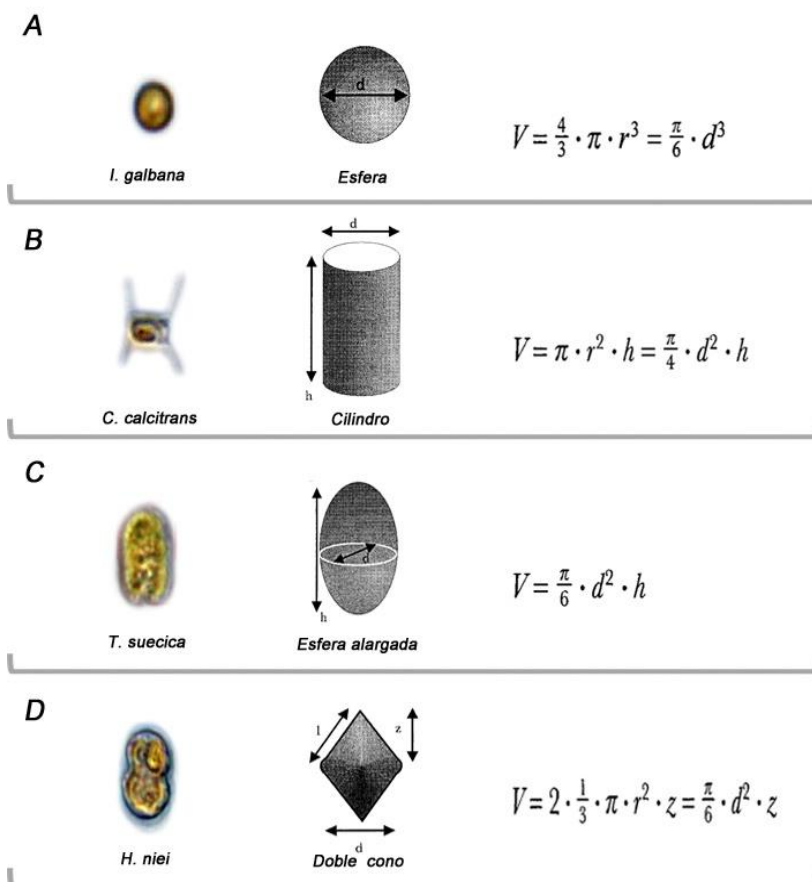


Figura 1. Fotografía de referencia de cada microalga (40 x), figura geométrica seleccionada y ecuación para obtener el biovolumen celular. (A) *I. galbana*, (B) *C. calcitrans*, (C) *H. niei* y (D) *T. suecica*.

El contenido de carbono de las microalgas (pg C) se obtuvo con base a las ecuaciones de la proporción Biovolumen: Carbono generadas por Menden-Deuer, (2000) (Tabla IV).

Tabla IV. Ecuaciones que relacionan la proporción Biovolumen y contenido de carbono propuestas por Menden-Deuer, 2000.

Microalgas	Biovolumen: Carbono
Prymnesiofitas y Bacilariofita	$0.288 \times [BV(\mu m^3)]^{0.811}$
Dinoflagelados	$0.760 \times [BV(\mu m^3)]^{0.819}$

Dietas y raciones

Basado en los antecedentes bibliográficos (McKinnon *et al.*, 2003; Shields y Laidley, 2003; Shields *et al.*, 2005; Kline y Laidley, 2015) y experiencia en el cultivo del copépodo *P. crassirostris* en la UPIMA-CICIMAR (Hernández-Alarcón, 2016; Contreras-Olguín, com. pers., 2018), se probaron cuatro dietas monoalgales y cuatro dietas plurialgales, todas ellas con tres raciones en cuanto a su aporte de carbono: baja, intermedia y alta. Las dietas monoalgales fueron *I. galbana*, *C. calcitrans*, *T. suecica* y *H. niei*, así como las cuatro dietas plurialgales definidas como *Mezcla 1* (*I. galbana* + *C. calcitrans* + *T. suecica*, 2:2:1), *Mezcla 2* (*I. galbana* + *H. niei*, 1:2), *Mezcla 3* (*I. galbana* + *C. calcitrans* + *H. niei*, 1:1:2) y *Mezcla 4* (*I. galbana* + *H. niei*, 1:1) que involucran combinaciones de microalgas en proporciones en base al contenido de carbono que aportan a las raciones establecidas previamente. De esta manera se probaron un total de 24 tratamientos experimentales constituidos por ocho dietas y tres raciones.

Para fines de su análisis se agruparon aquellas dietas y raciones que no incorporan el dinoflagelado y por otro lado aquellas que si incorporan el dinoflagelado.

Tabla V. Dietas y raciones experimentales ($\mu\text{g C L}^{-1}$) empleadas para evaluar su efecto en la alimentación y producción de huevos de *P. crassirostris*.

Dietas que no incorporan dinoflagelado	Ración		
	Baja	Intermedia	Alta
<i>Isochrysis galbana</i>	500	1,000*	1,500
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	500	1,000	1,500
<i>Tetraselmis suecica</i>	500	1,000	1,500
Mezcla 1: <i>I. galbana</i> + <i>C. calcitrans</i> + <i>T. suecica</i> (2:2:1)	500	1,000	1,500*
Dietas que sí incorporan dinoflagelado			
<i>Heterocapsa niei</i>	1,100*	2,200	3,300
Mezcla 2: <i>I. galbana</i> + <i>H. niei</i> (1:2)	800*	1,600	2,400
Mezcla 3: <i>I. galbana</i> + <i>C. calcitrans</i> + <i>H. niei</i> (1:1:2)	600	1,200	1,800
Mezcla 4: <i>I. galbana</i> + <i>H. niei</i> (1:1)	650	1,300	1,950

* indica los tratamientos seleccionados para evaluar en ensayos de producción a escala piloto.

Cultivo de copépodos

Los copépodos de la especie *P. crassirostris* que se utilizaron en esta investigación proceden del laboratorio de la UPIMA-CICIMAR los cuales se cultivan desde el año 2012 con agua de mar a una temperatura entre 23 y 27°C, con un régimen de alimentación a base de una dieta monoalgal (*I. galbana*) o pluri-algal compuesta de *I. galbana*, *C. calcitrans* y *T. suecica*, a una densidad de 80,000 a 120,000 cel. ml^{-1} .

Previo al inicio de este trabajo, se obtuvieron nuevas generaciones de nauplios de copépodos manejados como cohortes de la misma edad, con un desfase de siembra de 3 a 4 días, con 75,000 nauplios, en tolvas de fondo cónico de fibra de vidrio, en un volumen de cultivo de 75 L (densidad inicial 1 org. ml^{-1}). Se utilizó agua

de mar filtrada a 10 μm , esterilizada con cloro (5 ppm) y neutralizada con tiosulfato de sodio, a una temperatura de 23 ± 0.5 °C, fotoperiodo 12:12 luz/oscuridad, salinidad de 36 ups y pH 7. Para disminuir el efecto de cambio de dieta, los copépodos fueron alimentados hasta la madurez reproductiva con una mezcla de las cuatro microalgas a una ración entre 1,000 a 1,500 $\mu\text{g C L}^{-1}$ (densidad celular de 60,000 a 85,000 cel. ml^{-1}).

El trabajo experimental se realizó con organismos maduros (10 a 12 días de edad), separándolos previamente mediante su retención en un tamiz de 100 μm y puestos en inanición durante 48 horas para minimizar la influencia de la alimentación previa. Posterior a la etapa de inanición, nuevamente fueron retenidos en un tamiz de 100 μm y contenidos en un recipiente plástico de 5 L con agua de mar y aireación. Bajo el estereoscopio y con pipeta Pasteur se seleccionaron al azar exclusivamente hembras maduras y se colocaron en cajas Petri para corroborar la cantidad requerida y su estado aparente de salud (vivas y antenas enteras) antes de trasvasarlos a los recipientes experimentales.

Para evaluar la ingestión de alimento por cada dieta se emplearon frascos con un volumen de 200 ml de cultivo, conteniendo diez hembras maduras por cada uno de los 24 tratamientos experimentales con cinco replicas, además de cinco frascos utilizados como control sin copépodos. Cada frasco contaba con aireación tenue en la zona central para contrarrestar la sedimentación de las microalgas.

La parte experimental de producción de huevos se realizó en cajas Petri con un volumen efectivo de cultivo de 15 ml sin aireación, colocando hembras de manera individual. Inmediatamente se agregaron las dietas y raciones correspondientes a los 24 tratamientos con 30 réplicas. En todos los casos el tiempo de experimentación fue de 24 horas, a 23 ± 0.5 ° C de temperatura.

Diseños experimentales

Tasa de aclaramiento (F)

La tasa de aclaramiento se determinó como el volumen de agua filtrada por organismo por unidad de tiempo. La diferencia en el cambio de la concentración de alimento respecto al tiempo de experimentación se obtuvo mediante la ecuación de Frost (1972):

$$F = (V * g) / n$$

Dónde V corresponde al volumen del frasco, g el coeficiente de alimentación y n al número de organismos en el experimento. Se utilizó una corrección bajo un modelo exponencial debido a que las microalgas continúan con su ciclo de crecimiento durante el experimento (Harris, 2000):

$$F = V / n * \{(Co - Ct) + [C] * (exp(k * t) - 1)\} / ([C] * t)$$

Dónde V corresponde al volumen del frasco, n al número de organismos en el experimento, Co es la concentración inicial de alimento depositado en el frasco, Ct la concentración final de alimento, $[C]$ es la concentración promedio de alimento, k es el constante de crecimiento algal y t es el tiempo de experimentación.

Constante de crecimiento algal (k)

Se define como el cambio en la concentración de alimento dentro de los frascos sin organismos depredadores, basado en el aumento de biomasa de cada microalga:

$$k = \ln Ct / Co * t$$

Donde Ct es la concentración final de alimento, Co es la concentración inicial de alimento depositado en el frasco y t es el tiempo de experimentación.

Cambio de concentración de alimento (g')

Se basa en el cambio en la concentración de alimento de los frascos con la presencia de los organismos depredadores y tomando en cuenta el aumento de biomasa de cada microalga:

$$g' = -1 * (\ln Ct / Co / t)$$

Donde Ct es la concentración final de alimento, Co es la concentración inicial de alimento depositado en el frasco y t es el tiempo de experimentación.

Coeficiente de alimentación (g)

Se define como el cambio de concentración dentro de los frascos con la presencia de los organismos depredadores y el aumento de biomasa en los frascos sin depredadores:

$$g = g' + k$$

Donde g' es el cambio de concentración de alimento y k la constante de crecimiento algal.

Tasa de ingestión (I)

La tasa de ingestión se define como la cantidad (número o unidad de masa) de alimento ingerido por unidad de tiempo y consumidor. El cálculo de la tasa de ingestión se basa en relación con la tasa de filtración:

$$I = (V * g / n) * C$$

Dónde V corresponde al volumen del cultivo, g el coeficiente de alimentación, n al número de organismos en el experimento y C a la concentración de alimento. Debido al ciclo de producción de las microalgas durante el experimento se utiliza una ecuación corregida por lo cual:

$$I = \{Co - Ct + [C] * (exp(k * t) - 1)\} / (n * t)$$

Donde Co es la concentración inicial del alimento, Ct la concentración final, $[C]$ es la concentración promedio de alimento, k es el constante de crecimiento algal, t es el tiempo de incubación y n el número de organismos en el experimento.

Ración diaria (RD)

Se define como la masa de alimento ingerida por día, expresada como porcentaje de la masa corporal del organismo consumidor (B) por lo cual:

$$RD = I * 24 / (B * t) * 100\%$$

Dónde I es expresado como masa h^{-1} , donde ambos I y B tendrán las mismas unidades (carbono, $\mu g C$), t es el tiempo de incubación.

Después de transcurridas las 24 horas del experimento, se obtuvo la muestra para evaluar el remanente de alimento y el volumen de agua fue filtrado para retirar a las hembras, al retenerlas en un tamiz de 100 μm y colocarlas en cajas de Petri para sedarlas con una solución de esencia de clavo al 1% diluida en agua de mar previamente filtrada, posteriormente se procedió a fotografiarlas para realizar la medición del prosoma y obtener la proporción de carbono.

Tasa de producción de huevos

Se estimó la tasa de producción de huevos (huevos Hembra⁻¹ día⁻¹) expresado como un promedio de los conteos entre replicas.

Tasa de producción de huevos-peso específica

El cálculo de la tasa específica de peso-producción de huevos se obtuvo por medio de la siguiente formula:

$$TPH = (E / B) * (24 / t) * 100\%$$

Donde *E* es el peso de todos los huevos liberados (µg C) obtenido de manera indirecta mediante una relación peso-longitud, durante el tiempo de experimentación *T* (horas) y *B* el peso de la hembra (µg C). La tasa específica de peso-producción es expresada como un porcentaje de la masa corporal de la hembra, lo cual permite evaluar el esfuerzo reproductivo.

Tasa de eclosión

Las hembras fueron retiradas de las cajas de Petri y los huevos permanecieron durante 8 horas en las mismas condiciones. Enseguida fueron fijados con formol al 4%. Bajo el estereoscopio se contabilizaron los nauplios y huevos sin eclosionar.

Cálculo de contenido de carbono en hembras y huevos

Se calcularon los pesos individuales de carbono (µg C) en base al largo del prosoma (µm) de las hembras, utilizando la relación peso-longitud descrita anteriormente para *P. crassirostris* (ln P= 3.25; ln LP 19.65, Hopcroft, *et al.*, 1998). Se asumió que el contenido de carbono de la hembra era el 40% de su peso seco en base a lo reportado por Parsons *et al.*, (1977) y Sun *et al.*, (2011).

Los huevos se fotografiaron para su posterior medición, cálculo de volumen y contenido de carbono. Los huevos fueron considerados como esferas perfectas y el volumen del huevo fue convertido a unidades de carbono mediante la relación 0.14 x 10⁻⁶ mg. C mm⁻³ (Kiørboe *et al.*, 1985; Sun *et al.*, 2011, Fig. 2).

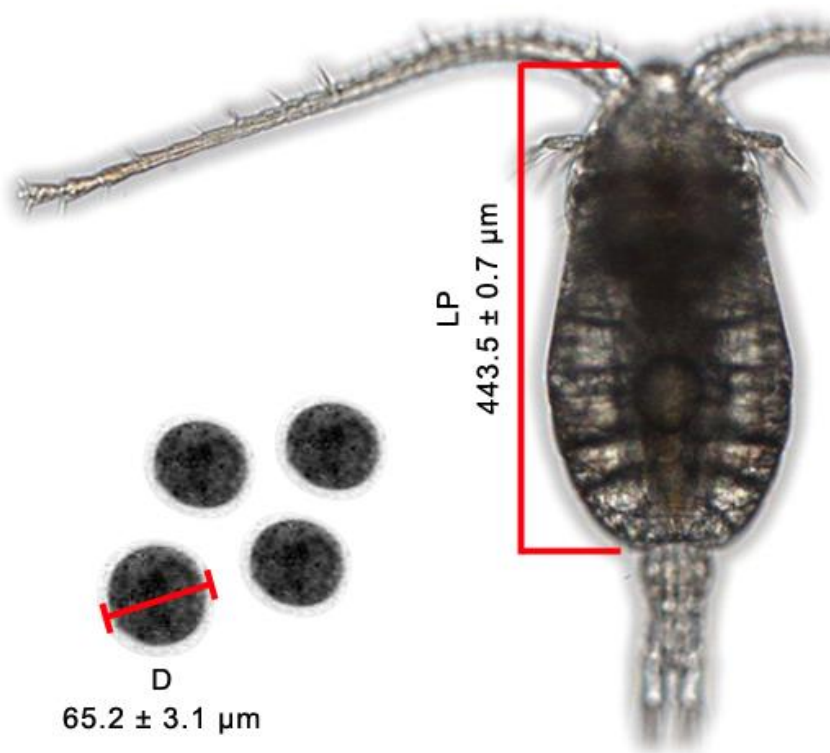


Figura 2. Mediciones realizadas en la hembra y huevo de *P. crassirostris* para la posterior obtención de su contenido de carbono, D: diámetro de huevo, LP: longitud de prosoma, modificada de Welsh, 2013.

Producción intensiva a escala piloto

El componente final de la investigación consistió en la producción a escala piloto para contrastar la evaluación de las dietas control utilizadas en UPIMA-CICIMAR, *I. galbana* ración intermedia (1,000 µg C L) y *Mezcla 1* ración alta (1,500 µg C L) contra las dietas de mayor producción de huevos obtenidas en los experimentos previos a escala experimental, que correspondieron a *H. niei* ración baja (1,100 µg C L) y la *Mezcla 2* ración baja (800 µg C L).

Se realizó el cultivo de nauplios a una densidad inicial de 2 org. ml⁻¹ en tanques plásticos con 500 L de medio de cultivo, bajo las mismas condiciones descritas anteriormente (23.0 ± 0.5°, fotoperiodo 12:12 luz/oscuridad, salinidad de 36 ups y pH de 7). Fueron alimentados cada tercer día con una mezcla de las cuatro especies de microalgas *I. galbana*, *C. calcitrans*, *T. suecica* y *H. niei*, con una ración de 1,000 a 1,500 µg C L⁻¹ (equivalente a 60,000-85,000 cel. ml⁻¹).

Se realizó una determinación poblacional cada segundo día mediante la toma de una muestra representativa de 15 L y el conteo de una submuestra de 250 ml, concentradas mediante la filtración por un tamiz de 40 μm y colocados en una caja de Petri para su fijación con formol. Posteriormente con la ayuda de un estereoscopio se realizó la contabilización de organismos (huevos, nauplios y adultos) para su posterior extrapolación al volumen total y respectiva evaluación de supervivencia. Tal seguimiento del cultivo permitió corroborar la madurez sexual (día 9, dada la presencia de huevos, nauplios, machos y hembras maduras en la muestra). En ese momento los organismos fueron extraídos mediante un sifón de manguera plástica sobre un tamiz de 100 μm , lo que permitió retener solamente adultos para someterlos a inanición durante 48 horas.

Se procedió a la repartición y siembra en tres tanques experimentales a manera de réplica, con volumen de cultivo de 500 L y una densidad de 1 org. ml^{-1} . Después de transcurrir las 24 horas nuevamente se realizó una determinación poblacional y se contabilizó la cantidad de hembras, machos, huevos y nauplios presentes en las submuestras de cada tanque y su extrapolación al volumen total. Se repitió con todas las dietas mencionadas.

Para fines comparativos se estandarizó la producción total (huevos + nauplios) a unidades de producción de 1 m^3 .

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el software estadístico Statistics Versión 10 y Rstudio versión 1.1 de Rstudio, Inc. Todos los datos se sometieron a pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza para determinar el cumplimiento de estos supuestos.

Los datos de longitud de prosoma de las hembras y el radio de los huevos fueron analizados mediante un análisis de varianza de una vía (ANDEVA) así como pruebas de Kruskal-Wallis para probar si los grupos de datos provienen de la misma población.

Los datos de biovolumen y carbono de las células empleadas fueron analizados mediante un análisis de varianza de una vía (ANDEVA) así como pruebas post-hoc de Scheffe para verificar la existencia de diferencias significativas.

Los datos de tasas de aclaramiento, ingestión celular y de carbono, producción de huevos y tasa de eclosión fueron analizados por medio de un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) con dietas y raciones como factores, seguido de una prueba post-hoc de Tukey para verificar la existencia de diferencias significativas. A los datos de producción intensiva se les aplicó análisis de varianza de una vía (ANDEVA) así como de Kruskal-Wallis para verificar la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos.

RESULTADOS

Biovolumen y contenido de carbono de microalgas

La Tabla VI contiene la información utilizada para los cálculos del biovolumen ($\mu\text{m}^3 \text{ cel.}^{-1}$) así como del contenido de carbono (pg C cel.^{-1}) de las especies de microalgas empleadas para alimentar a *P. crassirostris*, las células de *I. galbana* y *C. calcitrans* no presentaron diferencias significativas entre sí y tienen los valores más bajos para ambas características. En cambio, ambas muestran diferencias significativas con respecto a *T. suecica* y *H. niei*. Por otra parte, el mayor valor de biovolumen se presentó en *T. suecica* ($630.4 \mu\text{m}^3 \text{ cel.}^{-1}$), mientras que el mayor contenido de carbono por célula se obtuvo para *H. niei* ($109.4 \text{ pg C cel.}^{-1}$) (Tabla VI).

Tabla VI. Características de las especies de microalgas empleadas como alimento para *P. crassirostris*. Los superíndices en cada columna denotan diferencias significativas.

Especie	Largo (μm)	Ancho (μm)	Biovolumen ($\mu\text{m}^3 \text{ cel.}^{-1}$)	Contenido Carbono (pg C cel.^{-1})
<i>Isochrysis galbana</i>	5.7 ± 0.2		99.5 ^c	12.0 ^c
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	7.0 ± 0.7	4.9 ± 0.5	136.2 ^c	15.4 ^c
<i>Tetraselmis suecica</i>	13.0 ± 1.0	9.6 ± 1.2	630.4 ^a	53.6 ^b
<i>Heterocapsa niei</i>	16.1 ± 1.3	10.1 ± 1.1	431.9 ^b	109.4 ^a

Dado que a los resultados se compararon utilizando un análisis de varianza de dos vías, es requisito indispensable que las variables (dieta y ración) sean predeterminadas, es decir con valores fijos, pero debido a un ajuste en la estimación del biovolumen del dinoflagelado *H. niei*, que fue detectado después de concluir los experimentos, aquellas raciones donde fue incorporado no coincidieron con los valores predeterminados *a priori* del contenido de carbono (500, 1,000 y 1,500 $\mu\text{g CL}^{-1}$). Por ello, para fines del análisis se denominan raciones baja, intermedia y alta. En lo subsecuente se desglosa en cada apartado, en primer lugar, lo referente a las dietas “sin la incorporación del dinoflagelado” y enseguida lo referente a aquellas “con la incorporación del dinoflagelado”.

Tasa de aclaramiento, ingestión y ración diaria.

Dietas sin la incorporación del dinoflagelado

Las hembras del copépodo *P. crassirostris* mostraron las mayores diferencias significativas en las tasas de aclaramiento entre las dietas cuando se le suministraron las dietas *I. galbana* y *Mezcla 1* en sus tres raciones con respecto a las tres raciones de las dietas *C. calcitrans* y *T. suecica* ($I. galbana \approx Mezcla 1 > C. calcitrans = T. suecica$) (Fig. 3, A, $p < 0.05$).

Al hacer las comparaciones entre las raciones de cada dieta, en general, no se apreció alguna tendencia de aumento o disminución en la tasa de aclaramiento conforme al aumento de ración. No hubo diferencias significativas dentro de las raciones de las dietas *C. calcitrans*, *T. suecica* y *Mezcla 1*, pero se observó un aclaramiento mayor en la dieta *I. galbana* ración alta ($3.4 \text{ ml H}^{-1} \text{ hr}^{-1}$) con respecto a su ración intermedia. Comparando las diferentes dietas, se presentó un aclaramiento significativamente mayor ($p < 0.05$) en la ración alta de *I. galbana*. Todas las raciones de las dietas *C. calcitrans* y *T. suecica* fueron significativamente más bajas que las raciones de *I. galbana* y *Mezcla 1* con tasas de aclaramiento promedio de $0.6 \text{ ml H}^{-1} \text{ hr}^{-1}$ lo cual equivale a una diferencia de 5.6 veces con la ración más alta de *I. galbana* (Fig. 3, A, $p < 0.05$).

Referente a la ingestión celular, no se presentaron diferencias significativas entre las raciones de cada dieta para *C. calcitrans* y *T. suecica* mientras que las raciones intermedia y alta de *I. galbana* y la ración alta de la *Mezcla 1* fueron significativamente mayores que las raciones bajas. Comparando entre dietas, la ingesta observada con la ración alta de *I. galbana* fue significativamente más alta que todas las otras raciones de las dietas excepto por la ración intermedia de *I. galbana*. Las ingestas más bajas y que no presentaron diferencias significativas entre si fueron todas las raciones de *T. suecica* y de *C. calcitrans* y las raciones baja e intermedia de la *Mezcla 1* (Fig. 3, B, $p < 0.05$). No se observaron diferencias significativas para la ración baja e intermedia de la *Mezcla 1* ante la dieta *T. suecica*, pero está si presento un consumo significativamente menor ante la dieta *I. galbana*. La ingestión de células significativamente superior en la dieta *I. galbana* ración alta fue de $30,545 \text{ cel. H}^{-1} \text{ hr}^{-1}$ lo cual equivale a una diferencia de ingestión celular de 5.2

veces superior a la ingestión promedio observada en las tres raciones de *T. suecica* y la ración baja de la *Mezcla 1* (5,861 cel. H⁻¹ hr⁻¹).

En cuanto a la ingestión de carbono, no se observaron diferencias significativas entre las raciones bajas de las dietas *Mezcla 1* e *I. galbana* siendo la ración baja de *Mezcla 1* significativamente más baja que todas las otras dietas. No se observaron diferencias significativas entre las raciones de las dietas *C. calcitrans* y *T. suecica*, pero la ración baja de *I. galbana* fue significativamente menor a su ración alta y en la *Mezcla 1*, la ración baja fue significativamente menor a las raciones intermedia y alta. (Fig. 3, C, p<0.05) Las mayores tasas de ingestión se presentaron en las raciones altas de las dietas *I. galbana*, *C. calcitrans* y la ración intermedia de *T. suecica* con una ingestión promedio de 365 ng C H⁻¹ hr⁻¹. La menor ingestión de carbono se presentó en la dieta *Mezcla 1* ración baja con 78.9 ng C H⁻¹ hr⁻¹ lo que representa entre ellas una diferencia de consumo de 4.6 veces.

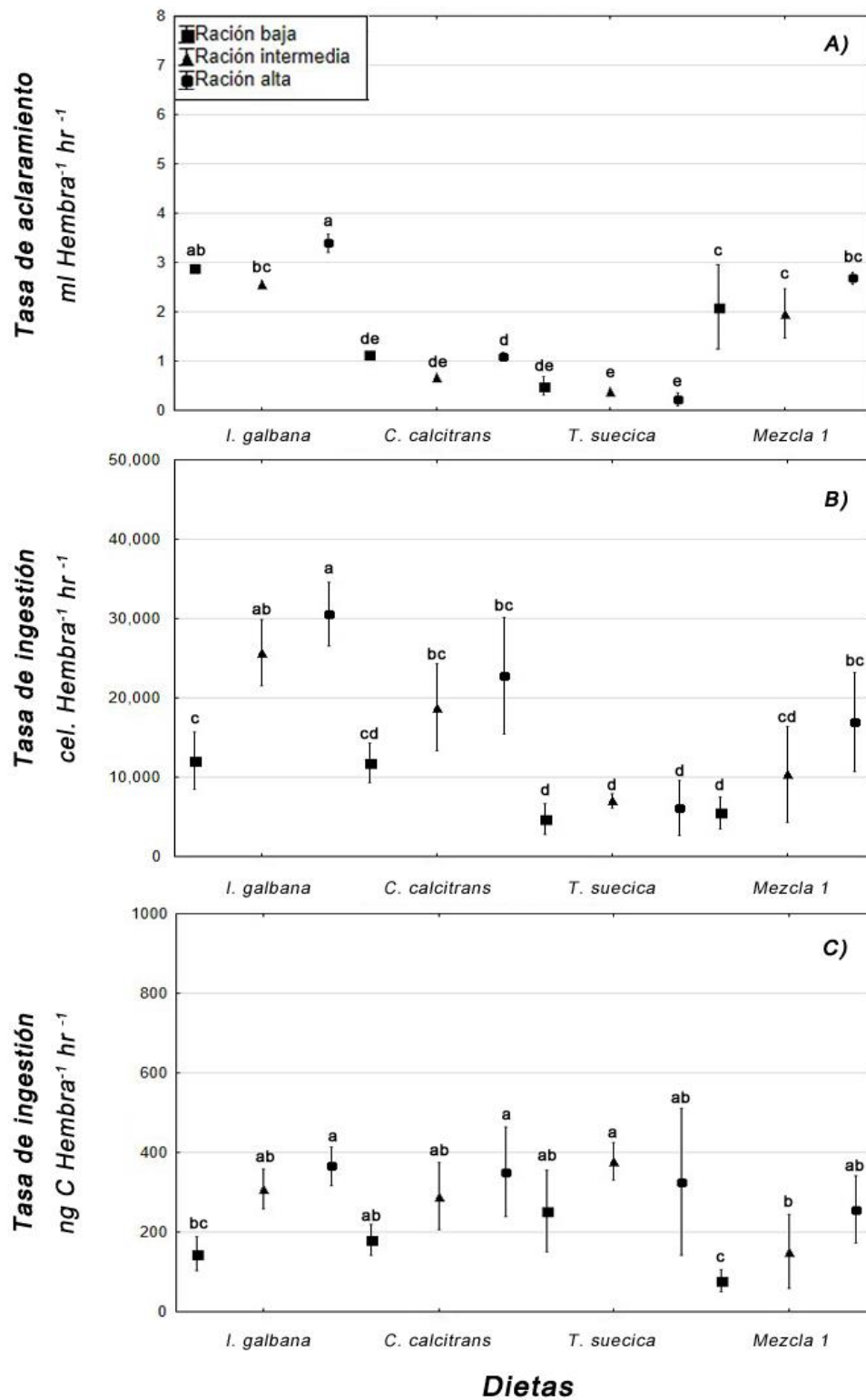


Figura 3. Alimentación en hembras de *P. crassirostris*, A) Tasa de aclaramiento, B) Tasa de ingestión y C) Tasa de ingestión de carbono, (promedio y desviación estándar), con cuatro dietas y sus tres raciones (baja, intermedia y alta) sin la incorporación del dinoflagelado. Diferentes letras denotan diferencias significativas ($p < 0.05$).

Dietas con la incorporación del dinoflagelado

No se presentaron diferencias significativas entre las raciones de *H. niei*. En las otras dietas, no se observó un patrón claro de aumento o disminución del aclaramiento conforme al aumento de ración. Al comparar la tasa de aclaramiento entre las dietas, se observó un aclaramiento significativamente menor en todas las raciones de *H. niei*. Las tres raciones de *H. niei* y *Mezcla 4* fueron significativamente menores a todas las raciones de la *Mezcla 2* y *Mezcla 3*. (Fig. 4, A, $p < 0.05$).

Las mayores diferencias se observaron entre la ración alta de la *Mezcla 3* con respecto a la dieta monoalgal del dinoflagelado *H. niei* en sus tres raciones ($p < 0.05$) con tasas de aclaramiento de 6.8 contra un promedio de $0.23 \text{ ml H}^{-1} \text{ hr}^{-1}$, respectivamente. Esto equivale a una diferencia de 29.6 veces en la tasa de aclaramiento.

En la ingestión celular, la ración alta de la *Mezcla 2* fue significativamente la mayor. Dentro de las dietas *Mezcla 2*, *Mezcla 3* y *Mezcla 4* se presentaron diferencias en sus tres raciones (Fig. 4, B, $p < 0.05$). Las raciones bajas de la *Mezcla 2*, *Mezcla 3* y *Mezcla 4* no mostraron diferencias significativas con las raciones de la dieta *H. niei* con una ingestión promedio de $5,999 \text{ cel. H}^{-1} \text{ hr}^{-1}$ y la mayor tasa de ingestión se presentó en la ración alta de la *Mezcla 2* con $38,893 \text{ cel. H}^{-1} \text{ hr}^{-1}$. Lo cual equivale a una diferencia en la ingestión de 6.4 veces.

Con respecto a la ingestión de carbono, la ración alta de la *Mezcla 2* fue significativamente mayor. No existieron diferencias entre las raciones de las dietas *H. niei* y la *Mezcla 4*, mientras que en la dieta *Mezcla 2* se observaron diferencias significativas entre sus tres raciones, por otra parte, la dieta *Mezcla 3* mostró diferencias entre su ración alta y baja (Fig. 4, C, $p < 0.05$). La mayor ingestión se presentó en la ración alta de la *Mezcla 2* con $1505.9 \text{ ng C H}^{-1} \text{ hr}^{-1}$. La menor ingestión de carbono se presentó en las raciones bajas de las cuatro dietas y la ración intermedia de la *Mezcla 4* con una ingestión promedio de $224.9 \text{ ng C H}^{-1} \text{ hr}^{-1}$, lo cual representa una diferencia de consumo de 6.7 veces.

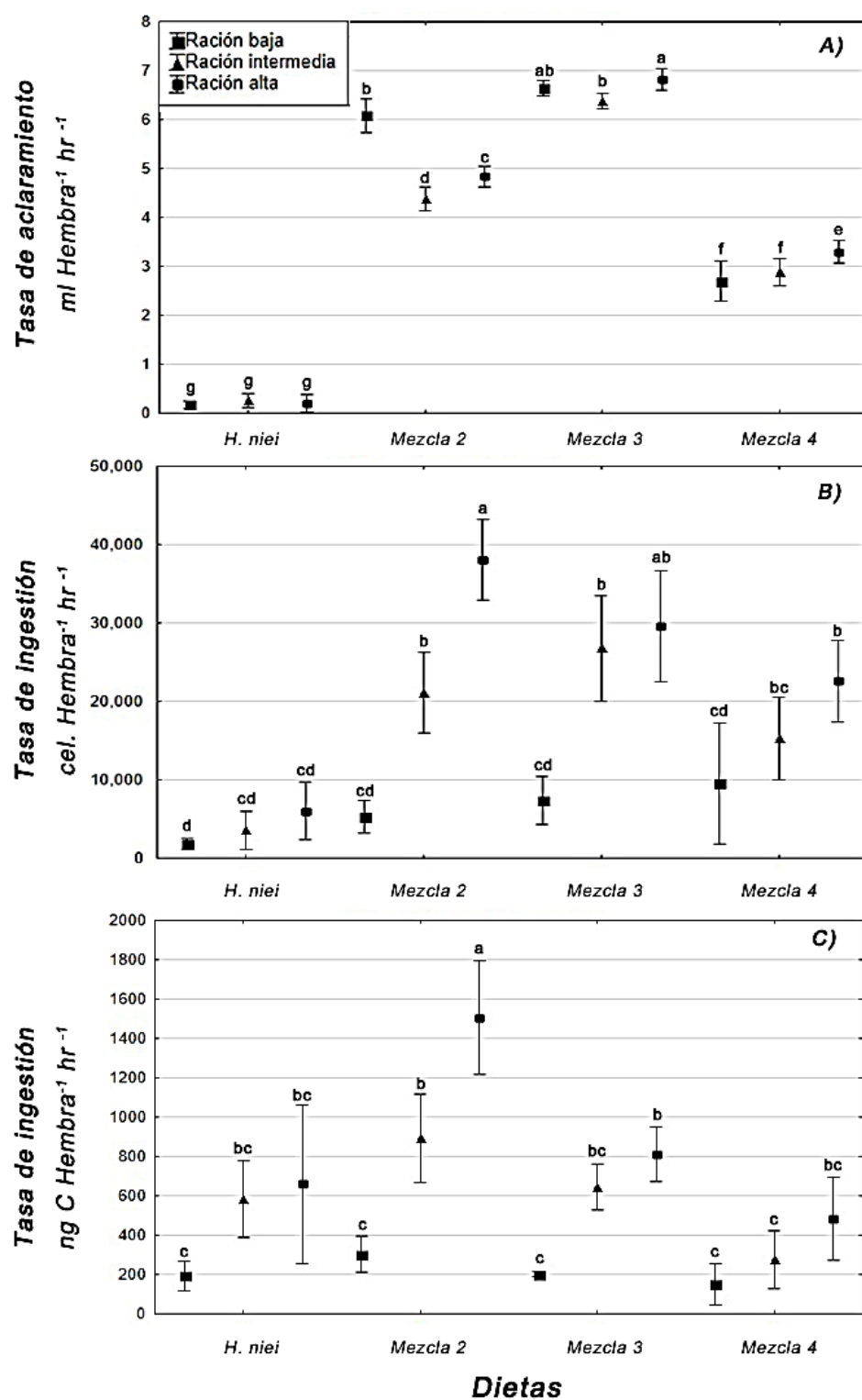


Figura 4. Alimentación en las hembras de *P. crassirostris*, A) Tasa de aclaramiento B) Tasa de ingestión celular y C) Tasa de ingestión de carbono, (promedio y desviación estándar) en las dietas y tres raciones (bajas, intermedias y altas) con la incorporación del dinoflagelado. Diferentes letras denotan diferencias significativas ($p < 0.05$).

Ración diaria

Dietas sin la incorporación del dinoflagelado

La ración diaria no mostro un patrón de aumento o disminución conforme a la ración de carbono suministrado en las diferentes dietas excepto en la dieta *I. galbana* donde la ración alta fue significativamente más alta que la ración baja (Fig. 5, A, $p < 0.05$). Las raciones diarias máximas se observaron en la ración alta de *I. galbana* y la ración intermedia de *T. suecica* con una ración promedio de 29.8%, por otra parte, las más bajas se observaron en la ración intermedia y baja de la *Mezcla 1*, así como la ración baja de *I. galbana* con un promedio de 11.03%. Esto equivale a una diferencia en la ración diaria de 18.7%.

Dietas con la incorporación del dinoflagelado

Solamente en el caso de la *Mezcla 2* la ración diaria mostró un patrón de aumento en base al incremento de la ración de carbono, con diferencias significativas en sus tres raciones (Fig. 5, B, $p < 0.05$). La ración diaria máxima se presentó en la ración alta de la *Mezcla 2* con 120.1% y las más bajas se presentaron en siete de las once dietas restantes probadas con un promedio de 23.3%, esto equivale a una diferencia de 96.8% en la ración diaria.

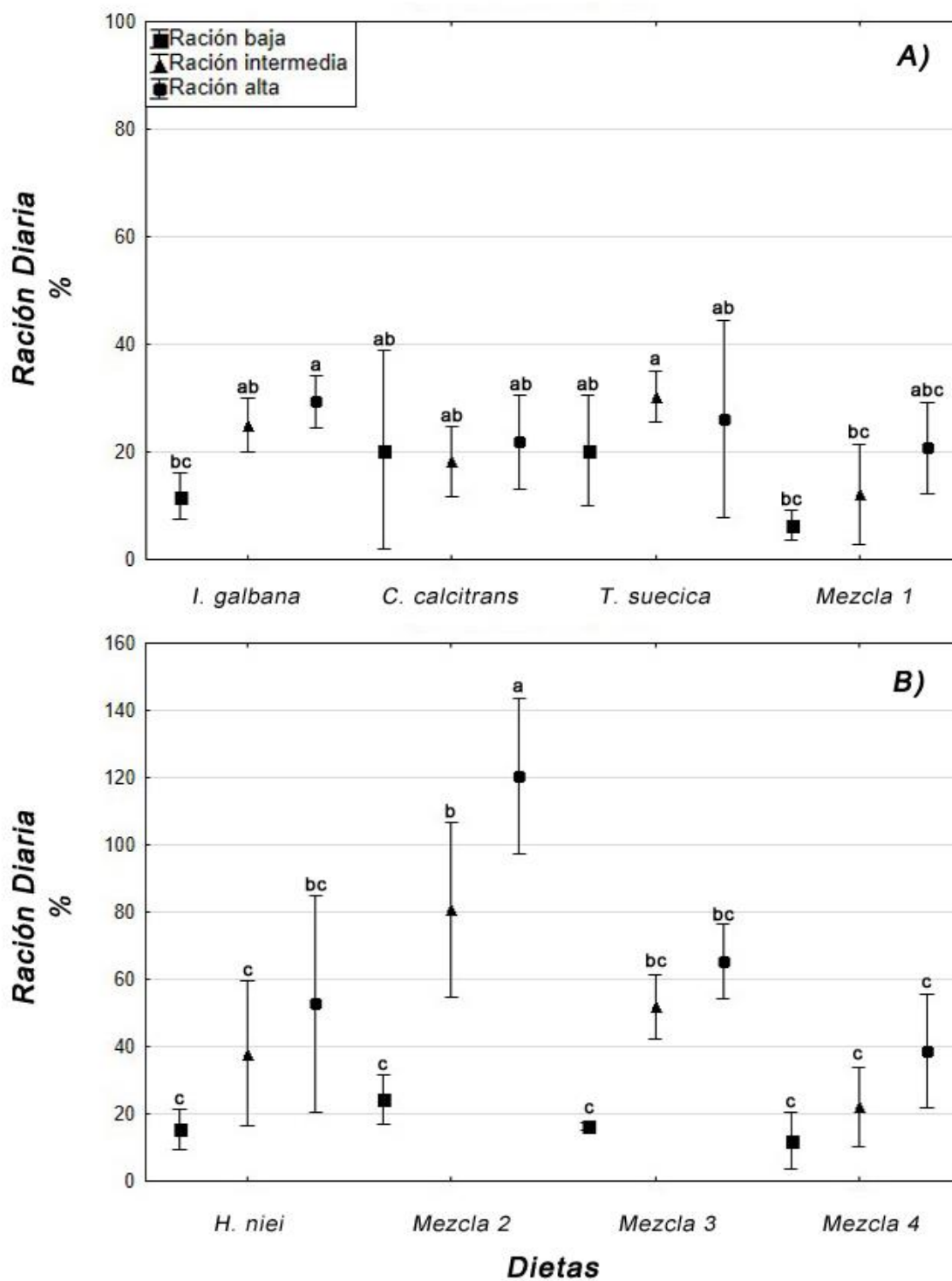


Figura 5. Ración diaria de *P. crassirostris* (Promedio y desviación estándar) en las tres raciones (bajas, intermedias y altas) en A) Dietas sin la incorporación del dinoflagelado y B) Dietas con la incorporación del dinoflagelado.

Tasa de producción de huevos y eclosión

Dietas sin la incorporación del dinoflagelado

No se presentaron diferencias significativas entre las raciones de las dietas *I. galbana* y *Mezcla 1* mientras que para la dieta *C. calcitrans* la producción de huevos fue significativamente mayor en las raciones intermedia y alta, así como en la ración alta de la dieta *T. suecica*. Al comparar las dietas, la producción de huevos mostró diferencias significativas, destacando la dieta *T. suecica* ración alta con $15.6 \text{ h H}^{-1} \text{ d}^{-1}$, equivalente al 15% del carbono corporal de la hembra (Fig. 6, A). Las menores producciones se presentaron en las raciones bajas de las cuatro dietas y la ración intermedia de *Mezcla 1* con un promedio de $8.5 \text{ h H}^{-1} \text{ d}^{-1}$, equivalente al 13.4% del carbono corporal de la hembra. Esto equivale a una diferencia de 1.8 veces en la producción de huevos con respecto a la ración alta de *T. suecica*.

No se presentaron diferencias significativas entre las dietas para el porcentaje de eclosión, excepto para la ración alta de *I. galbana* e intermedia de *C. calcitrans* (98.4% promedio) con respecto a la ración baja de *I. galbana* ($p < 0.05$, Fig. 6, B), que fue significativamente menor (82.2%). Esto equivale a una diferencia en el porcentaje de eclosión del 16.2%.

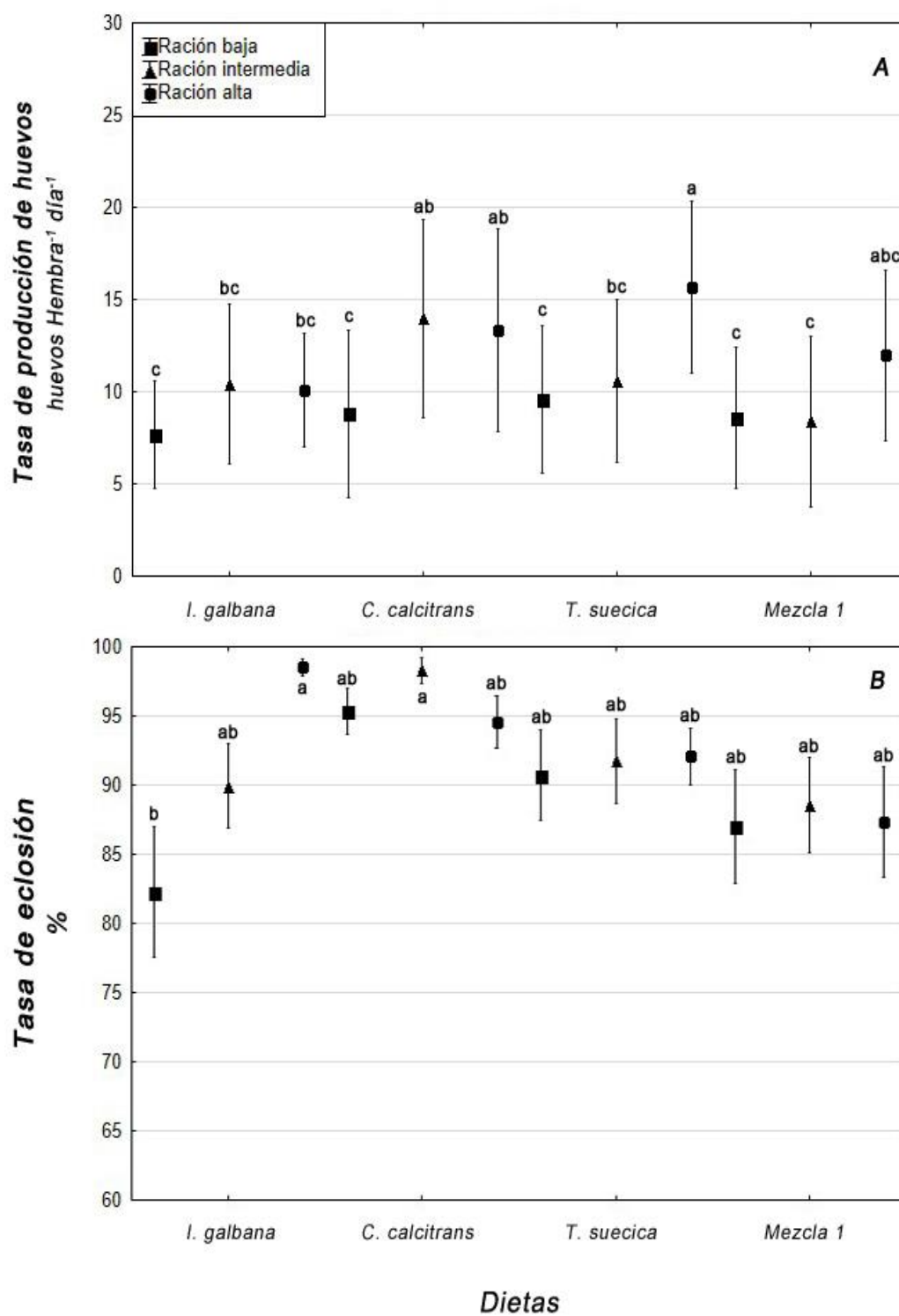


Figura 6. A) Tasa de producción de huevos y B) tasa de eclosión (promedio y desviación estándar), en las tres raciones (bajas, intermedias y altas) en las dietas sin la incorporación del dinoflagelado. Diferentes letras denotan diferencias significativas ($p < 0.05$).

Dietas con la incorporación del dinoflagelado

La producción de huevos mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) de la dieta *Mezcla 2* con respecto a las dietas *H. niei*, *Mezcla 3* y *Mezcla 4* ($\text{Mezcla 2} > H. niei = \text{Mezcla 3} = \text{Mezcla 4}$) (Fig. 7, A). Las mayores tasas de producción se presentaron en las tres raciones de la dieta *Mezcla 2* con un promedio de $21.8 \text{ h H}^{-1} \text{ d}^{-1}$, lo cual representa 34.2% del carbono corporal de la hembra. En las dietas *H. niei*, *Mezcla 3* y *Mezcla 4* no se observaron diferencias significativas entre las raciones bajas, intermedias y altas con un promedio de $13.3 \text{ h H}^{-1} \text{ d}^{-1}$, equivalente al 20.8% de carbono corporal de la hembra. La diferencia entre la mayor y la menor producción promedio fue de 1.6 veces.

Las tasas de eclosión no presentaron diferencias entre las raciones de cada dieta excepto para la ración intermedia de la dieta *H. niei* (88.3%) que fue significativamente más alta que la ración baja (73.7%, Fig. 7, B). Las raciones baja y alta de la dieta *Mezcla 4* fueron significativamente más altas con respecto a la ración baja y alta de *H. niei* ($p < 0.05$), con valores promedio de 97.4% contra 73.7%, respectivamente. Esto hace una diferencia en la tasa de eclosión de 23.7%.

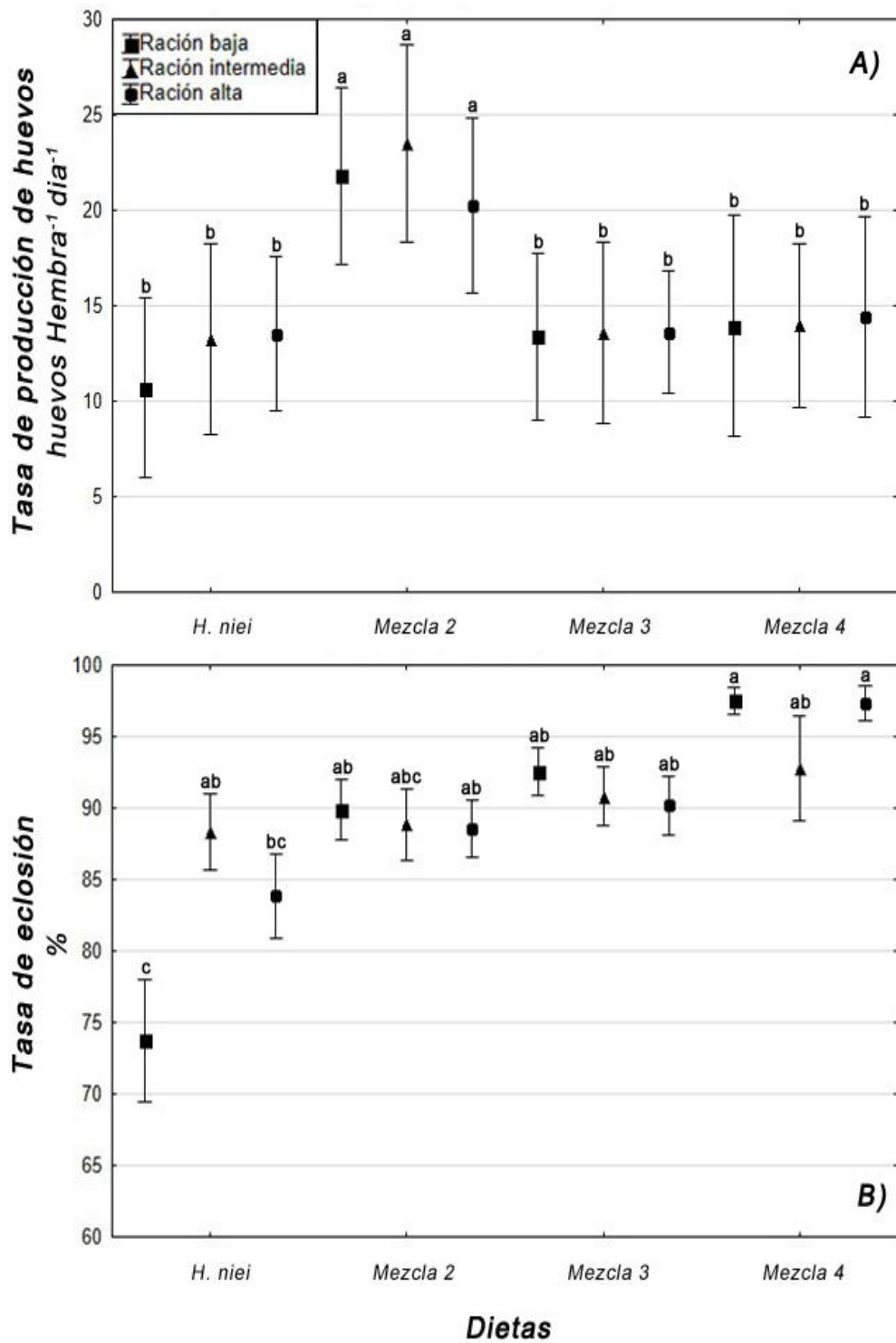


Figura 7. A) Tasa de producción de huevos y B) tasa de eclosión (promedio y desviación estándar), en las tres raciones bajas, intermedias y altas en las dietas con la incorporación del dinoflagelado. Diferentes letras denotan diferencias significativas ($p < 0.05$).

Tasa de producción de huevos-peso específica

Dietas sin la incorporación del dinoflagelado

El esfuerzo reproductivo presentó diferencias significativas entre la ración baja y las raciones intermedia y alta de la dieta *C. calcitrans* mientras que para las dietas *T. suecica* y *Mezcla 1* la ración alta fue significativamente superior a la intermedia y baja (Fig. 8, A). En general, no se observó un patrón de aumento o disminución conforme al incremento de la ración de carbono. Los valores máximos en cuanto a esfuerzo reproductivo al comparar todas las dietas se presentaron en la ración intermedia de *C. calcitrans* y la ración alta de *T. suecica* con un promedio de 23.15% mientras que los valores menores se registraron en las raciones bajas de *I. galbana*, *C. calcitrans* y la ración baja e intermedia de *Mezcla 1* con un valor promedio de 13.07%, equivalente a una diferencia de 10.08% en el esfuerzo reproductivo.

Dietas con la incorporación del dinoflagelado

No se mostró un patrón de aumento o disminución conforme a la ración de carbono en cada dieta (Fig. 8, B). Las tres raciones de la *Mezcla 2* mostraron diferencias significativas contra las otras tres dietas (*Mezcla 2* > *H. niei* = *Mezcla 3* = *Mezcla 4*), con el mayor esfuerzo reproductivo promedio de 34.2%, en contraste con el valor promedio 20.8% correspondiente al resto de los tratamientos, esto equivale a una diferencia de 13.4% en el esfuerzo reproductivo.

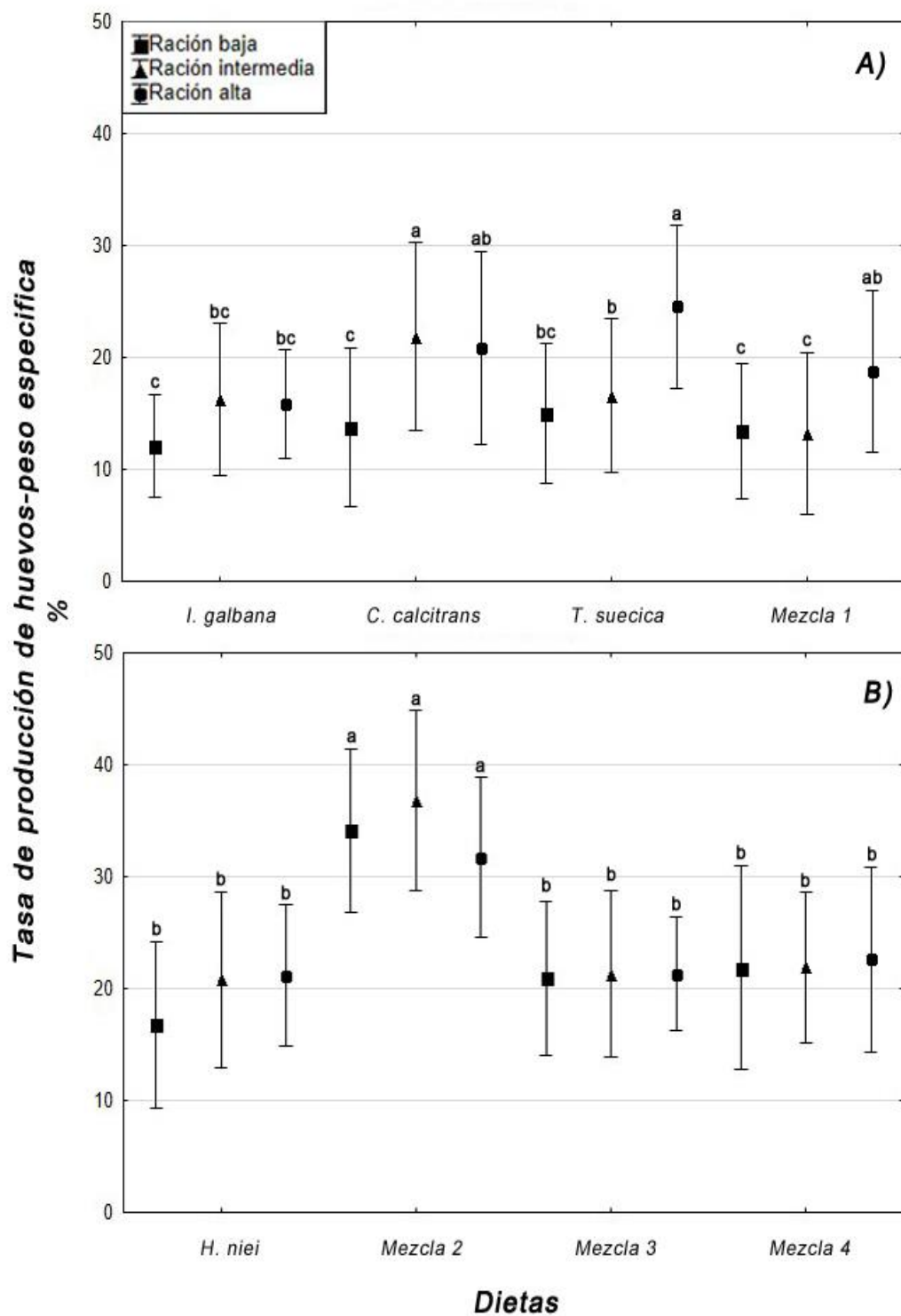


Figura 8. Tasa de producción de huevos-peso específica de *P. crassirostris* (Promedio y desviación estándar) en las tres raciones bajas, intermedias y altas en A) Dietas sin la incorporación del dinoflagelado y B) Dietas con la incorporación del dinoflagelado.

Contenido de carbono en hembras y huevos

Al analizar la talla promedio del prosoma de hembras de *P. crassirostris* no se observaron diferencias significativas ($p>0.05$), con un valor promedio de $443.5 \pm 0.7 \mu\text{m}$. Para esta talla promedio del prosoma el cálculo de su equivalente en contenido de carbono es de $1,240 \pm 260 \text{ ng C}$.

En el caso de los huevos tampoco se evidenciaron diferencias significativas entre raciones y dietas en su diámetro ($p>0.05$), con un valor promedio de $65.2 \pm 3.1 \mu\text{m}$, lo que equivale a un contenido de carbono de $19 \pm 3 \text{ ng C}$.

Producción intensiva a escala piloto

La supervivencia en los 4 ensayos de cultivo (nauplio a fase adulta y madurez reproductiva) fue en promedio 75%.

La producción total promedio de huevos + nauplios fue significativamente más baja con *I. galbana* comparado con las otras tres dietas. En estas dietas, la *Mezcla 1* fue significativamente más baja que la *Mezcla 2*, mientras que no hubo diferencias significativas entre la *Mezcla 1* y *H. niei*, así como entre la *Mezcla 2* y *H. niei* (Fig. 9, A, $p<0.05$). La mayor producción en escala piloto se presentó con la dieta *Mezcla 2*, con un total promedio de $3,770,889 \text{ org. día}^{-1}$ y la menor producción promedio se obtuvo con la dieta *I. galbana* al ser tres veces menor con $1,189,778 \text{ org. día}^{-1}$.

Se registro una reducción poblacional en los tanques a las 24 hrs de experimentación, con una mortalidad promedio del 16%. Esto implicó un cambio en la densidad de adultos en los cuatros tratamientos, la cual disminuyo de 1 a $0.86 \text{ org. ml}^{-1}$ promedio. Así mismo, la proporción de hembras incremento de 67% a 72.5% (Tabla VII).

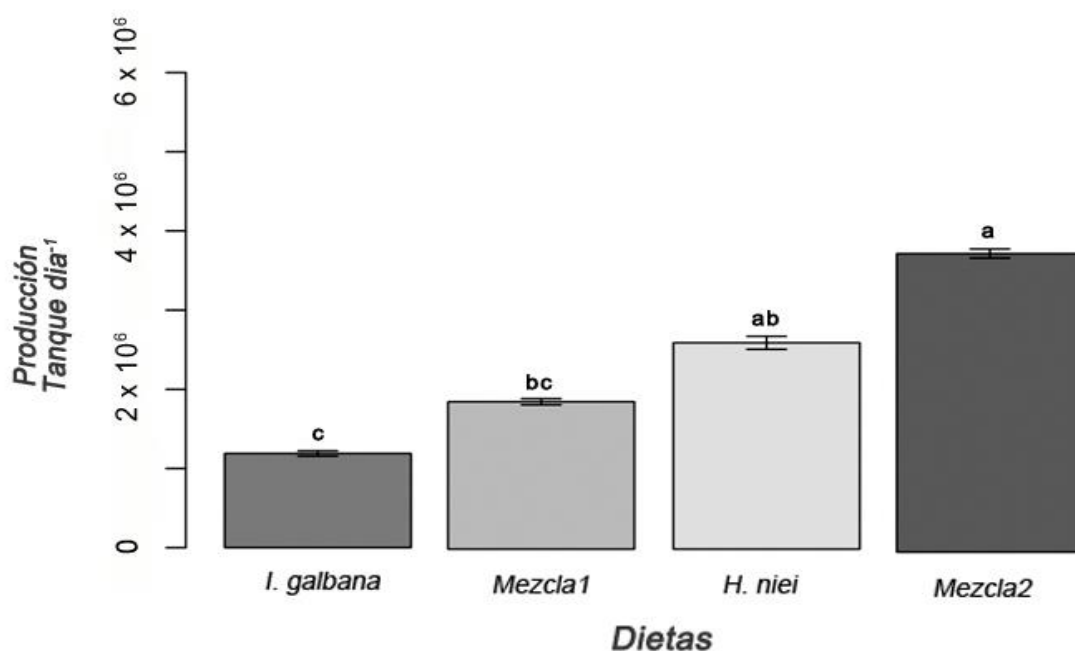


Figura 9. Producción total promedio de huevos y nauplios de *P. crassirostris* a escala piloto (n=3). Diferentes letras denotan diferencias significativas ($p < 0.05$).

Tabla VII. Producción total (huevos + nauplios) de *P. crassirostris* en tanques a escala piloto, alimentados con las dietas control (*I. galbana* y Mezcla 1) y las dietas seleccionadas por su mayor productividad en los ensayos previos (*H. niei* y Mezcla 2). Densidad de siembra de adultos 1 ml⁻¹.

Dieta	Ración ($\mu\text{g C L}^{-1}$)	Densidad celular (Cel. ml ⁻¹)	Densidad adultos (Org. ml ⁻¹)	% hembras	*Producción (m ³ dia ⁻¹)
<i>I. galbana</i>	1,000	85,264	0.93	70	2.2×10^6 c
Mezcla 1	1,500	94,282	0.91	70	3.6×10^6 bc
<i>H. niei</i>	1,100	10,014	0.78	70	5.2×10^6 ab
Mezcla 2	800	25,823	0.82	80	7.5×10^6 a

*Valores de producción estandarizados a m³, para fines comparativos en otras referencias bibliográficas, los superíndices en la columna denotan diferencias significativas.

DISCUSIÓN

En el presente estudio, se evaluó la respuesta funcional de las hembras de *P. crassirostris* ante el consumo de dietas monoalgales y plurialgales, en distintas raciones y combinaciones para determinar sus efectos en la alimentación y producción de huevos. Las microalgas seleccionadas *I. galbana*, *C. calcitrans* y *T. suecica*, se utilizan comúnmente dentro de la UPIMA-CICIMAR como parte de la dieta de esta especie (Contreras-Olguín, com. pers, 2018) así como de otras especies de copépodos como *Acartia tonsa*, *Pseudodiaptomus pelagicus* y *Gladioferens impares* utilizados principalmente como alimento vivo (Schipp *et al.*, 1999; Payne y Rippingale, 2001; Drillet *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2006; Cassiano, 2009).

El dinoflagelado *H. niei* no tóxico se seleccionó debido a que ha mostrado un efecto potenciador en la producción de huevos en especies del género *Acartia* (Knuckey *et al.*, 2005; Tang y Taal, 2005) y en la misma especie de este estudio, *P. crassirostris* (McKinnon, 2003); estos resultados se han relacionado a su contenido nutricional y al tamaño de la célula. Adicionalmente, se ha reportado que las dietas compuestas por dinoflagelados tienen una mayor calidad nutricional debido al alto contenido de ácidos grasos tipo EPA y SDA. (Band-Schmidt *et al.*, 2000; Shin *et al.*, 2003; Band-Schmidt *et al.*, 2008; Nogueira, 2019). En general, su uso en la acuicultura ha sido limitado debido a que los dinoflagelados presentan células de gran tamaño, haciéndolos inadecuados como dieta monoalgal para las primeras etapas naupliares y en general, su cultivo alcanza bajas densidades celulares en comparación con otros grupos de microalgas (Knuckey, 2005). Dentro del laboratorio de alimento vivo de la UPIMA-CICIMAR su escalamiento en cultivo alcanzó densidades máximas promedio de 120,000 cel ml⁻¹ (Anexo 2).

Los copépodos de *P. crassirostris* fueron alimentados con una dieta plurialgal compuesta de las cuatro microalgas (*I. galbana*, *C. calcitrans*, *T. suecica* y *H. niei* en una ración de 1,000 a 1,500 µg C) y fueron sometidos a un periodo de inanición de 48 horas, previo a iniciar los experimentos para disminuir los efectos de la alimentación previa. El periodo de inanición aplicado se consideró adecuado a pesar de ser menor al máximo reportado de 72 horas para el copépodo *Bestiolina similis* (Camus *et al.*, 2009). Considerando el contenido de carbono, las raciones de

alimento empleadas estuvieron tanto por debajo como por encima del punto de saturación ($>1,500 \mu\text{g C}$, Kiørboe *et al.*, 1985) que se ha referido en otras especies de copépodos como *A. sinjiensis*, *B. similis* y *P. crassirostris* (McKinnon *et al.*, 2003; Gusmão y McKinnon, 2009).

Biovolumen y contenido de carbono

El método para estimar el biovolumen celular, muestra ventajas y/o desventajas ya que algunos autores difieren en asignar una figura compleja pero similar a la célula o una figura simple, fácilmente medible, pero menos precisa para la estimación del biovolumen (Hansen, 1992; Hillebrand *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 2000; Young y Ziveri, 2000). A partir de ese biovolumen estimado, se deduce la estimación del contenido de carbono mediante una proporción Biovolumen: Carbono reportadas para diversos grupos planctónicos (Menden-Deuer, 2000). De las cuatro microalgas utilizadas en este experimento, las células de *I. galbana* y *C. calcitrans* presentaron los valores más bajos de biovolumen y contenido de carbono ($99.5 \mu\text{m}^3 \text{ cel.}^{-1}$, $12.0 \text{ pg C cel.}^{-1}$ y $136.2 \mu\text{m}^3$, $15.4 \text{ pg C cel.}^{-1}$, respectivamente). Por otra parte, el mayor valor de biovolumen se presentó en *T. suecica* ($630.4 \mu\text{m}^3 \text{ cel.}^{-1}$), mientras que el mayor contenido de carbono por célula se obtuvo para *H. niei* ($109.4 \text{ pg C cel.}^{-1}$). Las diferencias observadas entre el contenido de carbono de los distintos grupos filogenéticos pudieran ser atribuidas a la variación específica en las especies de microalgas, así como a consecuencia de la composición bioquímica del ambiente o del medio de cultivo (Menden-Deuer, 2000).

Tasa de aclaramiento e ingestión

Los estadios adultos de copépodos pequeños se alimentan con mayor eficacia de células de menor tamaño y tienen una mayor habilidad de detectar y manipular células de menor tamaño. Un parámetro para definir un tamaño óptimo de célula se define mediante la tasa de aclaramiento (Paffenhof, 1984; Price y Paffenhof, 1985; Stottrup y Jensen, 1990). De las cuatro microalgas utilizadas en este experimento, las hembras del copépodo *P. crassirostris* se alimentaron eficientemente de células en un rango de tamaño de 5 a $16 \mu\text{m}$, en las cuales las mayores tasas de aclaramiento se presentaron en la dieta *I. galbana* con un tamaño de célula de $5.7 \mu\text{m}$. Como dieta monoalgal, el aclaramiento promedio de *I. galbana*

fue de $2.90 \text{ ml}^{-1} \text{ H}^{-1} \text{ hr}^{-1}$, por otra parte, dentro de las dietas plurialgales el aclaramiento solo de esta microalga fue mayor dentro de todas las mezclas y diferentes raciones, con tasas de aclaramiento en un rango de 1.08 a $5.59 \text{ ml}^{-1} \text{ H}^{-1} \text{ hr}^{-1}$ (ver Anexo 4). Las hembras de *P. crassirostris* registraron las menores tasas de aclaramiento en las dietas monoalgales a base de *C. calcitrans*, *T. suecica* y *H. niei* con una tasa promedio de $0.5 \text{ ml}^{-1} \text{ H}^{-1} \text{ hr}^{-1}$. En contraste, la mayor tasa de aclaramiento se presentó en la dieta *Mezcla 3* con un aclaramiento promedio de $6.5 \text{ ml}^{-1} \text{ H}^{-1} \text{ hr}^{-1}$ compuesta por *I. galbana*, *C. calcitrans* y *H. niei*. Estas diferencias en la eficiencia de retención de las células podrían relacionarse a las características morfológicas de esta especie de copépodo, en especial al tamaño de separación de las sétulas en sus maxilas con las cuales capturan las células y permiten la alimentación (Heinrich, 1963; Marshall, 1973 y Fernández de Puellas, 2015), la habilidad de retención de las células microalgales y el tiempo de pasaje intestinal (Stottrup y Jensen, 1990) así como a la morfología de las células (presencia de setas o espinas en la diatomea *C. calcitrans* (Southgate y Lucas, 2011) y el mayor biovolumen para las células de *T. suecica* y *H. niei* (630.38 y $431.96 \text{ } \mu\text{m}^3$, respectivamente).

La tasa de ingestión celular de los copépodos se incrementa en proporción directa de la concentración de alimento hasta un punto de saturación determinado por el tiempo de pasaje intestinal y asimilación del alimento (Frost, 1972). Con excepción de la dieta *T. suecica*, las siete dietas restantes (monoalgales y plurialgales) evidenciaron una mayor ingestión celular conforme el aumento de las raciones. Las raciones altas de las dietas *I. galbana* y *Mezcla 2* (*I. galbana* + *H. niei*), presentaron las mayores ingestas celulares con $30,545$ y $38,893 \text{ cel. H}^{-1} \text{ hr}^{-1}$, respectivamente. El mayor consumo celular representado en la *Mezcla 2* muestra una clara preferencia por las células de *I. galbana* al representar el 92% del consumo celular en contraste con el del dinoflagelado *H. niei*.

Respecto a la proporción de carbono ingerido por las hembras de *P. crassirostris* se evidencio una variación significativa con relación al aumento en la ración ($p < 0.05$). La ingestión en las raciones bajas de las dietas monoalgales y plurialgales no superó los $303.3 \text{ ng C H}^{-1} \text{ hr}^{-1}$, por su parte, las raciones intermedias y altas mostraron una ingestión máxima hasta de $1506 \text{ ng C H}^{-1} \text{ hr}^{-1}$. En el caso de

las monoalgales la mayor tasa de ingestión de carbono se presentó en la dieta de *H. niei* con $660 \text{ ng C H}^{-1} \text{ hr}^{-1}$ y en el caso de las dietas plurialgales, en la *Mezcla 2* con $1506 \text{ ng C H}^{-1} \text{ hr}^{-1}$ (*I. galbana* + *H. niei*, ración de $2600 \text{ } \mu\text{g C L}^{-1}$), esta ingestión de carbono observado en las raciones bajas de las dietas y comparado con el consumo de la *Mezcla 2* equivale a una diferencia de 4.9 veces. Estas tasas de ingestión son similares a las obtenidas por Alajmi (2015), con hembras adultas de la misma especie alimentadas con una dieta monoalgal de *Isochrysis* sp. (ración de $1000 \text{ } \mu\text{g C L}^{-1}$) con una ingestión de $888.4 \text{ ng. C H}^{-1} \text{ hr}^{-1}$, aunque la ingestión en el presente trabajo con respecto a esta dieta (*I. galbana*, ración $1000 \text{ } \mu\text{g C L}^{-1}$) fue menor, con una ingestión promedio de $309.1 \text{ ng. C H}^{-1} \text{ hr}^{-1}$. Las diferencias presentadas en la tasa de ingestión pueden atribuirse a la temperatura ($26 \text{ }^{\circ}\text{C}$) siendo menor en este trabajo, 23°C , ya que es considerado el principal factor que afecta las tasas de alimentación. La temperatura es reportada por diversos autores como un modulador de las tasas de alimentación de varias especies de copépodos (Anraku, 1964; Frost, 1972; Almeda *et al.*, 2010).

Tasa de producción de huevos y eclosión

El efecto de las dietas en la tasa de producción de huevos dependerá de la medida en que sean cubiertos los requerimientos nutricionales de determinada especie. En este sentido tendrán relevancia las preferencias alimenticias, adaptaciones a la captura del alimento, necesidades nutricionales e incluso la tolerancia a ciertas sustancias tóxicas, por lo que cada especie de copépodo responderá de una manera distinta a una misma fuente de alimento (Iánora *et al.*, 2003; Koski y Breteler, 2003; Buttino, 2009). La mayor tasa de producción de huevos se presentó en la dieta plurialgal compuesta por la microalga *I. galbana* y la incorporación del dinoflagelado *H. niei* (*Mezcla 2*, ración $1,600 \text{ } \mu\text{g C L}^{-1}$) con una tasa de producción promedio de $23.5 \text{ h H}^{-1} \text{ día}^{-1}$ y eclosión de 88.8%, contrastando con su rendimiento como dietas monoalgales en las tres raciones ya que la producción tanto de *I. galbana* como de *H. niei* no superó los $15 \text{ h H}^{-1} \text{ día}^{-1}$. Dentro de las dietas monoalgales la tasa de producción promedio de huevos fue de 8 a $16 \text{ h H}^{-1} \text{ día}$ y la tasa de eclosión fue de 73.7 a 98.5%, mientras que para las dietas plurialgales la producción fue de 8 a 23.5 h H^{-1} y de 87 a 97.5%. Esta mayor producción y las altas tasas de eclosión asociadas a una dieta plurialgal sugieren que el copépodo *P.*

crassirostris, como otras especies calanoides, es un organismo de alimentación generalista más que un simple herbívoro y se beneficia de una combinación de microalgas en su dieta, en particular cuando se incluyen dinoflagelados no tóxicos como *H. niei* (Mauchline, 1998; Camus y Zeng, 2008; Puello-Cruz *et al.*, 2009; Alajmi y Zeng, 2013; Buttino, 2019).

Las tasas máximas de producción de huevos observadas en este estudio en base a la dieta monoalgal de *H. niei* fueron inferiores (10 a $13 \text{ h H}^{-1} \text{ d}^{-1}$) comparado con el trabajo de McKinnon *et al.*, (2003) donde la producción en hembras de la misma especie alimentadas con el mismo dinoflagelado *H. niei* a una ración de carbono de $1,500 \mu\text{g C L}^{-1}$ fue de 29 a $31 \text{ h H}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Estas variaciones en la producción pueden estar influenciadas por las diferencias en el protocolo de cultivo de los copépodos, así como las diferencias en las cepas de microalgas (McKinnon *et al.*, 2003; Alajmi y Zeng, 2013), pero sobre todo se pueden deber a que las raciones empleadas en este experimento ($1,100$ a $3,300 \mu\text{g C L}^{-1}$) estuvieron por encima del nivel de saturación reportado para otras especies de copépodos calanoides ($>1,500 \mu\text{g C L}^{-1}$, Kiørboe *et al.*, 1985). Otro factor para añadir es la temperatura, la cual, en el trabajo citado anteriormente se llevó a cabo a 27°C contra los 23°C del presente trabajo. Lo cual resalta el efecto que ejerce la temperatura en la eficiencia de la tasa metabólica de los organismos poiquiloterms como los copépodos (Koski y Kuosa, 1999; Cross *et al.*, 2015; Mathews *et al.*, 2018).

Ración diaria y tasa de producción de huevos-peso específica

El carbono se utiliza como un denominador principal para estimar la relación entre la energía intrínseca y las interacciones tróficas, la mayor parte de la atención se centra en relacionar la cantidad de carbono orgánico disponible en las dietas y los diferentes procesos catabólicos y anabólicos, por ejemplo, la ingestión, respiración y el crecimiento (Kiørboe *et al.*, 1985; Berggreen *et al.*, 1988; Thor *et al.*, 2002). Los requerimientos de energía para la formación de biomasa dependen principalmente de dos factores: la composición bioquímica del producto final (tejido somático y huevos) y la composición bioquímica de la dieta (Thor *et al.*, 2002).

La ración diaria observada en las hembras de *P. crassirostris* en base al total de las dietas probadas, fluctuó de 7.1 a 120.5% del carbono corporal de la hembra

(Fig. 3 y 4, C), lo cual se asemeja a lo descrito para diferentes especies de copépodos calanoides como *A. tonsa* (3 a 96 %), *C. finmarchicus* (5 a 148%), *C. pacificus* (40 a 85%) y *T. longicornis* (18 a 170%) (Frost, 1972; Daro, 1980; Kiørboe *et al.*, 1985; Breteler *et al.*, 1990; Kleppel, 1992). En poblaciones silvestres estas variaciones en la ingestión de alimento se deben a los cambios estacionales de temperatura y disponibilidad de alimento (Kiørboe *et al.*, 1985). Bajo condiciones de laboratorio estas variaciones se atribuyen a la ración y tipo de dieta (monoalgal ó pluri-algal), la aclimatación a la dieta, así como la respuesta del copépodo a la calidad nutricional de las células (Cowles *et al.*, 1988; Kleppel, 1992; Paffenhof, 1993). Por su parte, la tasa de producción de huevos-peso específica de las hembras evaluadas en el presente estudio mostro una variación del 12 a 36% del carbono corporal, semejante con los rangos descritos para otras especies calanoides como *Acartia tonsa* (4 a 35%), *A. lilljeborgi* (10 a 59%), *A. grani* (36 a 61%) (Saiz *et al.*, 1992; Blaxter, *et al.*, 1998; Palomares *et al.*, 2003) sugiriendo que la respuesta reproductiva de las hembras depende de los atributos cualitativos y cuantitativos del alimento disponible más que a las variaciones en la temperatura (Kleppel, 1992).

Con respecto a la producción de huevos, la asimilación de carbono más alta se presentó en la dieta *Mezcla 2* en sus tres raciones (puesta promedio de 21.8 h $H^{-1} d^{-1}$) equivalente al mayor esfuerzo reproductivo promedio (34.2%) (Fig. 8, A y B). Los mayores gastos de energía son representados en la asimilación de la materia ingerida en tejido somático o huevos. Si los componentes nutricionales requeridos están disponibles en la dieta, entonces los costos energéticos son menores y se canalizan de manera más eficiente a la producción de huevos. Pero si se debe realizar algún tipo de transformación antes de que se pueda utilizar la materia ingerida, los costos energéticos aumentan (Lehninger, 1973; Thor *et al.*, 2002).

Producción intensiva a escala piloto

En general, la dieta *Mezcla 2*, obtuvo la mayor producción total por día, seguido de la dieta monoalgal *H. niei*, aunque una desventaja de esta dieta fue el gran volumen requerido para satisfacer la ración de carbono (>100 L) en comparación de la dieta pluri-algal *Mezcla 2* (36.8 L). Las diferencias observadas en los resultados obtenidos en este estudio con trabajos anteriores (Tabla VIII) pueden estar relacionadas con las diferencias en el protocolo de cultivo (distintos volúmenes

de cultivo) y alimentación (uso de distintas dietas microalgales), la temperatura (23°C) y la baja densidad poblacional (1 org. ml⁻¹) utilizados en este estudio. (Shields y Laidley, 2003; Shields *et al.*, 2005; Alajmi *et al.*, 2015; Kline y Laidley, 2015).

Tabla VIII. Valores estandarizados de producción total (huevos y nauplios) de cultivos intensivos del copépodo *P. crassirostris* a m⁻³ día⁻¹ alimentados con distintas dietas de microalgas.

Recipiente (L)	Densidad Org. ml ⁻¹	Producción estandarizada (m ⁻³ día ⁻¹)	Mezcla	Referencias
400	-	4.0 x 10 ⁶	-	Shields y Laidley (2003)
400	-	3.75 x 10 ⁶	<i>Isochrysis</i> sp <i>Chaetoceros</i> sp	Shields <i>et al.</i> , (2005)
1,500	1 - 4	18 x 10 ⁶	<i>C. muelleri</i> <i>T. lutea</i>	Kline y Laidley (2015)
1,000	1 – 3	12 - 18 x 10 ⁶	<i>I. galbana</i> <i>C. calcitrans</i> <i>T. suecica</i>	UPIMA-CICIMAR (Contreras-Olguín, com. pers., 2018)
1,000	1	7.5 x 10 ⁶	<i>I. galbana</i> <i>H. niei</i>	Este estudio

Investigaciones relacionadas con el efecto de las dietas microalgales dejan en evidencia la relación específica del copépodo con el alimento. Al utilizar dietas monoalgales de *Isochrysis* sp. y *Tetraselmis* sp. en copépodos adultos, las tasas de producción y supervivencia disminuyeron debido a que éstas tienen perfiles nutricionales que no complementan los requerimientos de los copépodos, lo cual puede disminuir la frecuencia de producción de huevos (Koski *et al.*, 1998; Lacoste *et al.*, 2001; Carotenuto *et al.*, 2002; Ismar *et al.*, 2008), reafirmando la importancia de los niveles de ácidos grasos contenidos en las dietas otorgadas en cultivo. En base a estas dietas monoalgales se han logrado exitosamente cultivos hasta la etapa de madurez por lo cual se sugiere que la dieta puede variar conforme al tamaño y etapa de desarrollo del copépodo (Paffenhöfer y Knowles 1979; Carotenuto *et al.*, 2002; Buttino, 2009).

El uso de dietas plurialgales complementa los perfiles nutricionales requeridos, lo que se ha interpretado como un efecto sinérgico que maximiza la producción de huevos. El género *Isochrysis* es rico en DHA (Lee *et al.*, 2006; Hernández-Alarcón, 2016), mientras que los dinoflagelados han mostrado perfiles nutricionales con altos niveles de EPA y SDA (Shin *et al.*, 2003), estos ácidos grasos son de gran importancia para la reproducción y crecimiento de los copépodos (Lee *et al.*, 2006), pero dichos compuestos requieren estar en los alimentos ya que los crustáceos carecen de la maquinaria enzimática que los pueda biosintetizar (Novoa, 2007). El uso de dietas plurialgales complementa y genera un balance en el perfil de ácidos grasos lo cual puede favorecer una alta producción de huevos (Burgess *et al.*, 1993; McKinnon *et al.*, 2003; Shin *et al.*, 2003; Milione & Zeng, 2007; Band-Schmidt *et al.*, 2008; Buttino, 2009, Nogueira, 2019). Recientemente, bajo condiciones de cultivo los dinoflagelados han tomado importancia en la dieta de los copépodos (Kleppel, 1992; McKinnon *et al.*, 2003; Shin *et al.*, 2003; Band-Schmidt *et al.*, 2008; Buttino 2009) debido a que aumenta la producción de huevos mientras estos no sean productores de toxinas o el copépodo muestre la capacidad de ser insensible a los metabolitos tóxicos producidos por el dinoflagelado (Band-Schmidt *et al.*, 2008). Como lo observado en este estudio, diversos autores señalan las ventajas nutricionales de los dinoflagelados y sugieren su implementación en el cultivo de copépodos otorgándole un papel de potenciador de la producción de huevos debido a sus perfiles nutricionales altos en ácidos grasos, en especial SDA (McKinnon *et al.*, 2003; Shin *et al.*, 2003).

En la naturaleza, los nauplios de copépodos son la presa natural de la mayoría de las larvas de peces (Hunter, 1981). En cautiverio, los rotíferos y los nauplios de *Artemia* se muestran como la principal alternativa de uso del alimento vivo. Sin embargo, para algunas especies de peces de interés comercial como pargos (fam. Lutjanidae) y meros (fam. Serranidae) al ser alimentados en base a estas presas, se registran bajas o nulas supervivencias (McKinnon *et al.*, 2003). El copépodo *P. crassirostris* debido a su pequeño tamaño, su tiempo de generación corto, un perfil nutricional acorde a los requerimientos de las larvas de peces y su posibilidad a cultivarse a altas densidades lo posiciona con un alto potencial de

aprovechamiento dentro de la acuacultura (Støttrup 2000; McKinnon *et al.*, 2003; Alajmi *et al.*, 2015).

CONCLUSIONES

- La tasa de aclaramiento en las hembras del copépodo *P. crassirostris* no mostró un patrón claro de aumento o reducción conforme al aumento de ración mientras que la ingestión aumentó en base a la concentración de carbono, con excepto de la dieta *T. suecica*.
- La mayor tasa de producción de huevos se presentó en base a una dieta pluri-algal (*Mezcla 2*) compuesta por *Isochrysis galbana* y *Heterocapsa niei*, lo que confirma la complementación de los perfiles nutricionales requeridos para la producción de huevos en hembras de *P. crassirostris*.
- Las dietas monoalgales y pluri-algales no mostraron un efecto inhibitor en la tasa de eclosión de huevos (todas mostraron rangos de 70 a 98%).
- Tanto la ración diaria, así como el esfuerzo reproductivo mostraron intervalos de 7 a 120.1% y 7 a 36% del carbono corporal de las hembras, respectivamente, el mayor consumo y asimilación se presentó en la dieta *Mezcla 2* (120.1% y 34.2% del carbono corporal).
- El uso del dinoflagelado *H. niei* favoreció la producción de huevos en *P. crassirostris* y puede usarse como un potenciador de la producción de huevos en el cultivo.

RECOMENDACIONES

- Aumentar el período de evaluación de la ingestión de dietas y la producción de huevos en *P. crassirostris* para tener un panorama de la respuesta del copépodo en un lapso mayor.
- Realizar un estudio sobre las tasas de ingestión y producción de huevos a temperaturas más elevadas (27 a 30° C).
- Concentrar esfuerzos en la búsqueda de las condiciones óptimas, así como del uso de distintos medios de cultivo con el propósito de incrementar la productividad del dinoflagelado *H. niei* como alimento vivo rutinario, en virtud de los buenos resultados obtenidos.
- Eliminar el periodo de inanición a nivel de producción piloto y utilizar el dinoflagelado como un potenciador de la producción de huevos al otorgarlo en fases adultas del cultivo de copépodos.

LITERATURA CITADA

- Ajiboye, O. O., Yakubu, A. F., Adams, T. E., Olaji, E. D., & Nwogu, N. A. 2011. A review of the use of copepods in marine fish larviculture. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 21(2), 225-246.
- Alajmi, F., Zeng, C., & Jerry, D. R. 2014. Improvement in the reproductive productivity of the tropical calanoid copepod *Parvocalanus crassirostris* through selective breeding. *Aquaculture*, 420, 18-23.
- Alajmi, F., Zeng, C., & Jerry, D. R. 2015. Domestication as a novel approach for improving the cultivation of calanoid copepods: a case study with *Parvocalanus crassirostris*. *PloS one*, 10(7), 133269.
- Almeda, R., Augustin, C. B., Alcaraz, M., Calbet, A., & Saiz, E. 2010. Feeding rates and gross growth efficiencies of larval developmental stages of *Oithona davisae* (Copepoda, Cyclopoida). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 387(1-2), 24-35.
- Andrews, J. C. 1983. Deformation of the active space in the low Reynolds number feeding current of calanoid copepods. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 40(8), 1293-1302.
- Anraku, M. 1964. Influence of the cape cod canal on the hydrography and on the copepods in buzzards bay and cape cod bay, Massachusetts. Respiration and feeding. *Limnology and Oceanography*, 9(2), 195-206.
- Band-Schmidt, C. J., Pacheco-Chávez R., Carreón-Palau L., Del Ángel-Rodríguez J. A. & Hernández-Trujillo S. 2009. Effect of diatom and dinoflagellate diets on egg production and ingestion rate of *Centropages furcatus* (Copepoda: Calanoida) from a subtropical bay (Bahía de La Paz, Gulf of California). *CICIMAR. Oceánides*, 24(2): 71-83.
- Band-Schmidt, C. J., Pacheco-Chávez, R., & Hernández-Trujillo, S. 2008. Influence of phytoplankton diets on the ingestion rate and egg production of *Acartia clausi* and *A.*

lilljeborgii (Copepoda: Calanoida) from Bahía de La Paz, Gulf of California. *Hidrobiológica*, 18(1), 133-140.

Battaglia, B. 1970. Cultivation of marine copepods for genetic and evolutionary research. *Helgoländer wissenschaftliche Meeresuntersuchungen* 20:385–392.

Blaxter, J. H., Douglas, B., Tyler, P. A., & Mauchline, J. 1998. The biology of calanoid copepods. *Academic Press*, London.

Boxshall, G. A., & Halsey, S. H. 2004. An introduction to copepod diversity. *Ray Society*.

Breteler, W. K., Schogt, N., & Gonzalez, S. R. 1990. On the role of food quality in grazing and development of life stages, and genetic change of body size during cultivation of pelagic copepods. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 135(3), 177-189.

Breteler, W. K., Schogt, N., Baas, M., Schouten, S., & Kraay, G. W. 1999. Trophic upgrading of food quality by protozoans enhancing copepod growth: role of essential lipids. *Marine Biology*, 135(1), 191-198.

Breteler, W. K., Schogt, N., Baas, M., Schouten, S., & Kraay, G. W. 1999. Trophic upgrading of food quality by protozoans enhancing copepod growth: role of essential lipids. *Marine Biology*, 135(1), 191-198.

Burgess, J. G., Iwamoto, K., Miura, Y., Takano, H., & Matsunaga, T. 1993. An optical fiber photobioreactor for enhanced production of the marine unicellular alga *Isochrysis aff. galbana* T-Iso (UTEX LB 2307) rich in docosahexaenoic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 39(4-5), 456-459.

Buttino, I., Ianora, A., Buono, S., Vitello, V., Sansone, G., & Miralto, A. 2009. Are monoalgal diets inferior to plurialgal diets to maximize cultivation of the calanoid copepod *Temora stylifera*. *Marine biology*, 156(6), 1171-1182.

Camus, T., & Zeng, C. 2008. Effects of photoperiod on egg production and hatching success, naupliar and copepodite development, adult sex ratio and life expectancy of the tropical calanoid copepod *Acartia sinjiensis*. *Aquaculture*, 280(1-4), 220-226.

- Camus, T., & Zeng, C. 2010. Roles of microalgae on total egg production over female lifespan and egg incubation time, naupliar and copepodite survival, sex ratio and female life expectancy of the copepod *Bestiolina similis*. *Aquaculture Research*, 41(11), 1717-1726.
- Camus, T., & Zeng, C. 2012. Reproductive performance, survival and development of nauplii and copepodites, sex ratio and adult life expectancy of the harpacticoid copepod, *Euterpina acutifrons*, fed different microalgal diets. *Aquaculture Research*, 43(8), 1159-1169.
- Camus, T., Zeng, C., & McKinnon, A. D. 2009. Egg production, egg hatching success and population increase of the tropical paracalanid copepod, *Bestiolina similis* (Calanoida: Paracalanidae) fed different microalgal diets. *Aquaculture*, 297(1-4), 169-175.
- Carotenuto, Y., Ianora, A., Buttino, I., Romano, G., & Miralto, A. 2002. Is postembryonic development in the copepod *Temora stylifera* negatively affected by diatom diets?. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 276(1-2), 49-66.
- Cassiano, E. J. 2009. Evaluation of the calanoid copepod *Pseudodiaptomus pelagicus* as a first feed for Florida pompano, *Trachinotus carolinus*, larvae (Doctoral dissertation, University of Florida).
- Chandler, G. T. 1986. High density culture of meiobenthic harpacticoid copepods within a muddy sediment substrate. *Can J Fish Aquatic Science* 43:53–59.
- Conceição L, Yúfera M, Makridis P, Morais S, Dinis MT. 2010. Live feeds for early stages of fish rearing. *Aquaculture Research* 41(5), 613-640.
- Cowles, T. J., Olson, R. J., & Chisholm, S. W. 1988. Food selection by copepods: discrimination on the basis of food quality. *Marine Biology*, 100(1), 41-49.
- Cross WF, Hood JM, Benstead JP, Huryn AD, Nelson D. 2015. Interactions between temperature and nutrients across levels of ecological organization. *Global Change Biology* 21:1025–1040.
- Cushing, D. 1955. Production and a pelagic fishery. *Fish. Invest. London Series*, 2 18: 1 – 104.

- Cushing, D. H., & Vucetic, T. 1963. Studies on a *Calanus* patch III. The quantity of food eaten by *Calanus finmarchicus*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 43(2), 349-371.
- Dahl, F. 1894. Die Copepoden Fauna des hinteren Amazoniens. Ber. Naturf. Ges. Freiburg, Vol. 8, pg. 21, figs. 27-28
- de Puellas, M. F., Macias, V., Vicente, L., & Molinero, J. C. 2014. Seasonal spatial pattern and community structure of zooplankton in waters off the Balears archipelago (Central Western Mediterranean). *Journal of Marine Systems*, 138, 82-94.
- Donaghay, P. L., & Small, L. F. 1979. Food selection capabilities of the estuarine copepod *Acartia clausi*. *Marine Biology*, 52(2), 137-146.
- Drillet, G., Jørgensen, N. O., Sørensen, T. F., Ramløv, H., & Hansen, B. W. 2006. Biochemical and technical observations supporting the use of copepods as live feed organisms in marine larviculture. *Aquaculture Research*, 37(8), 756-772.
- Fleeger J. W. 2005. The potential to mass-culture harpacticoid copepods for use as food for larval Wsh. In: Lee C-S, O'Bryen PJ, Marcus NH (eds) *Copepods in Aquaculture*. Blackwell Publisher, Iowa, USA, pp 11–24
- Fleeger, J. W., Yund, P. O., & Sun, B. 1995. Active and passive processes associated with initial settlement and post-settlement dispersal of suspended meiobenthic copepods. *Journal of Marine Research*, 53(4), 609-645.
- Fogg, G. E. 1966. The extracellular products of algae. Oceanography. *Marine Biology*. Ann. Rev., 4, 195-212.
- Frost, B. W. 1972. Effects of size and concentration of food particles on the feeding behavior of the marine planktonic copepod *Calanus pacificus*. *Limnology and Oceanography*, 17(6), 805-815.
- Frost, B. W. 1975. A threshold feeding behavior in *Calanus pacificus*. *Limnology and Oceanography*, 20(2), 263-266.
- Gaudy, R. 1974. Feeding four species of pelagic copepods under experimental conditions. *Marine Biology*, 25(2), 125-141.

- Gaudy, R., Guerin, J. P., & Moraitou-Apostolopoulou, M. 1982. Effect of temperature and salinity on the population dynamics of *Tisbe holothuriae* Humes (Copepoda: Harpacticoida) fed on two different diets. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 57(2-3), 257-271.
- Gill, C. W., & Harris, R. P. 1987. Behavioural responses of the copepods *Calanus helgolandicus* and *Temora longicornis* to dinoflagellate diets. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 67(4), 785-801.
- Gunstone, F. D., & Seth, S. 1994. A study of the distribution of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid between the α and β glycerol chains in fish oils by ^{13}C -NMR spectroscopy. *Chemistry and physics of lipids*, 72(2), 119-126.
- Gusmão, L. F. M., & McKinnon, A. D. 2009. The effect of food type and quantity on egg production and nucleic acid content of *Acartia sinjiensis*. *Aquaculture*, 296(1-2), 71-80.
- Harris, R., Wiebe, P., Lenz, J., Skjoldal, H. R., & Huntley, M. 2000. ICES zooplankton methodology manual. Elsevier, Academic Press.
- Heinrich, A. K. 1963. On the filtering ability of copepods in the boreal and tropical regions of the Pacific. *Trudy Inst. Okeanol.*, 71, 60-71.
- Hernández-Alarcón, I., 2016. Efecto de la dieta en la composición de ácidos grasos del alimento vivo utilizado en la crianza larvaria de peces marinos. Maestría. CICIMAR.
- Hillebrand, H., Dürselen, C. D., Kirschtel, D., Pollinger, U., & Zohary, T. 1999. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of Phycology*, 35(2), 403-424.
- Holling, C. S. 1959. Some characteristics of simple types of predation and parasitism. *The Canadian Entomologist*, 91(7), 385-398.
- Hunter, J. R. 1981. Feeding Ecology and Predation of Marine Fish Larvae. R. Lasker, 1, 34-77.
- Huntley, M., Sykes, P., Rohan, S., & Marin, V. 1986. Chemically mediated rejection of dinoflagellate prey by the copepods *Calanus pacificus* and *Paracalanus parvus*: mechanism, occurrence and significance. *Marine Ecology Prog. Ser.*, 28(10).

- Huskin, I., Anadón, R., Álvarez-Marqués, F., & Harris, R. P. 2000. Ingestion, fecal pellet and egg production rates of *Calanus helgolandicus* feeding coccolithophorid versus non-coccolithophorid diets. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 248(2), 239-254.
- Ianora, A., Poulet, S. A., & Miralto, A., 2003. The effects of diatoms on copepod reproduction: a review. *Phycologia*, 42(4), 351-363.
- Ismar, S. M., Hansen, T., & Sommer, U., 2008. Effect of food concentration and type of diet on *Acartia* survival and naupliar development. *Marine Biology*, 154(2), 335-343.
- Jonasdottir, S. H., Kiørboe, T., Tang, K. W., St. John, M., Visser, A. W., Saiz, E., & Dam, H. G. 1998. Role of diatoms in copepod production: good, harmless or toxic?. *Marine Ecology Progress Series*, 172, 305-308.
- Kiørboe, T., Møhlenberg, F., & Hamburger, K., 1985. Bioenergetics of the planktonic copepod *Acartia tonsa*: relation between feeding, egg production and respiration, and composition of specific dynamic action *Marine Ecology Progress Series*, 26(1-2), 85-97.
- Kleppel, G. S. 1992. Environmental regulation of feeding and egg production by *Acartia tonsa* off southern California. *Marine Biology*, 112(1), 57-65.
- Kleppel, G. S., 1993. On the diets of calanoid copepods. *Marine Ecology Progress Series*, 99, 183-183.
- Kleppel, G. S., Burkart, C. A., & Houchin, L. 1998. Nutrition and the regulation of egg production in the calanoid copepod *Acartia tonsa*. *Limnology and Oceanography*, 43(5), 1000-1007.
- Kline, M. D., & Laidley, C. W. 2015. Development of intensive copepod culture technology for *Parvocalanus crassirostris*: Optimizing adult density. *Aquaculture*, 435, 128-136.
- Knuckey, R. M., Semmens, G. L., Mayer, R. J., & Rimmer, M. A. 2005. Development of an optimal microalgal diet for the culture of the calanoid copepod *Acartia sinjiensis*: effect of algal species and feed concentration on copepod development. *Aquaculture*, 249(1-4), 339-351.

- Koski, M., & Breteler, W. K. 2003. Influence of diet on copepod survival in the laboratory. *Marine Ecology Progress Series*, 264, 73-82.
- Koski, M., & Kuosa, H. 1999. The effect of temperature, food concentration and female size on the egg production of the planktonic copepod *Acartia bifilosa*. *Journal of Plankton Research*, 21(9).
- Koski, M., Breteler, W. K., & Schogt, N. 1998. Effect of food quality on rate of growth and development of the pelagic copepod *Pseudocalanus elongatus* (Copepoda, Calanoida). *Marine Ecology Progress Series*, 170, 169-187.
- Laabir, M., Buttino, I., Ianora, A., & Kattner, G. 2001. Effect of specific dinoflagellate and diatom diets on gamete ultrastructure and fatty acid profiles of the copepod *Temora stylifera*. *Marine Biology*, 138(6), 1241.
- Lacoste, A., Poulet, S. A., Cueff, A., Kattner, G., Ianora, A., & Laabir, M. 2001. New evidence of the copepod maternal food effects on reproduction. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 259(1), 85-107.
- Lee, K. W., Park, H. G., Lee, S. M., & Kang, H. K. 2006. Effects of diets on the growth of the brackish water cyclopoid copepod *Paracyclops nana* Smirnov. *Aquaculture*, 256(1-4), 346-353.
- Lehninger, A. L., 1973. Short course in biochemistry. Worth Publishers, Inc. 1973. 452 p.
- Marshall, S. M., & Orr, A. P. 1966. Respiration and feeding in some small copepods. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 46(3), 513-530.
- Marshall, S. M., 1973. Respiration and feeding in copepods. In *Advances in marine biology* (Vol. 11, pp. 57-120). *Academic Press*.
- Mauchline, J. 1998. The biology of calanoid copepods. *Advances in marine biology*, 33.
- McKinnon, A. D., Duggan, S., Nichols, P. D., Rimmer, M. A., Semmens, G., & Robino, B. 2003. The potential of tropical paracalanid copepods as live feeds in aquaculture. *Aquaculture*, 223(1-4), 89-106.

- Menden-Deuer, S., & Lessard, E. J. 2000. Carbon to volume relationships for dinoflagellates, diatoms, and other protist plankton. *Limnology and Oceanography*, 45(3), 569-579.
- Milione, M., & Zeng, C. 2008. The effects of temperature and salinity on population growth and egg hatching success of the tropical calanoid copepod, *Acartia sinjiensis*. *Aquaculture*, 275(1-4), 116-123.
- Miralto, A., Barone, G., Romano, G., Poulet, S. A., Ianora, A., Russo, G. L. & Giacobbe, M. G. 1999. The insidious effect of diatoms on copepod reproduction. *Nature*, 402(6758), 173-176.
- Müller-Navarra, D. C. 2008. Food web paradigms: the biochemical view on trophic interactions. *International Review of Hydrobiology*, 93(4-5), 489-505.
- Mullin, M. M. 1963. Some factors affecting the feeding of marine copepods of the genus *Calanus*. *Limnology and Oceanography*, 8(2), 239-250.
- Nanton, D. A., & Castell, J. D. 1998. The effects of dietary fatty acids on the fatty acid composition of the harpacticoid copepod, *Tisbe* sp., for use as a live food for marine fish larvae. *Aquaculture*, 163(3-4), 251-261.
- Nogueira, N., Sumares, B., Andrade, C. A. P., & Afonso A. 2018. The effects of temperature and photoperiod on egg hatching success, egg production and population growth of the calanoid copepod, *Acartia grani* (Calanoida: Acartiidae). *Aquaculture research*, 49(1), 93-103.
- Nogueira, N., Sumares, B., Nascimento, F. A., Png-Gonzalez, L., & Afonso, A. 2019. Effects of mixed diets on the reproductive success and population growth of cultured *Acartia grani* (Calanoida). *Journal of Applied Aquaculture*, 1-14.
- Novoa, S. 2007. Metabolismo lipídico, ácidos grasos en el cultivo larvario de almeja babosa, *Venerupis pullastra*. 1803. Calidad ovocitaria, larvaria y nutricional con una aproximación al uso de la microencapsulación lipídica. Trabajo de Doctorado en Biología, Univ. Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, España.
- Ogle, J. T., Lemus, J. T., Nicholson, L. C., Barnes, D. N., & Lotz, J. M. 2005. Characterization of an extensive zooplankton culture system coupled with intensive larval rearing of

red snapper *Lutjanus campechanus*. In Copepods in aquaculture (pp. 225-244). Blackwell Scientific Publications Ltd Melbourne.

Olivotto I., Capriotti F., Buttino I., Avella AM., Vitiello V., Maradonna F., Carnevali O. 2008. The use of harpacticoid copepods as live prey for *Amphiprion clarkii* larviculture: effects on larval survival and growth. *Aquaculture* 274:347–352.

Paffenhöfer, G. A., & Van Sant, K. B. 1985. The feeding response of a marine planktonic copepod to quantity and quality of particles. *Marine Ecology Prog. Ser.*, 27, 55-65.

Palomares-García, R., Martínez-López, A., & De Silva-Dávila, R. 2003. Winter egg production rates of four calanoid copepod species in Bahía de La Paz, Mexico. *Contributions to the study of the East Pacific Crustaceans*, 2, 139-152.

Payne, M. F., & Ripplingale, R. J. 2001. Effects of salinity, cold storage and enrichment on the calanoid copepod *Gladioferens imparipes*. *Aquaculture*, 201(3-4), 251-262.

Phelps, R. P., Sumiarsa, G. S., Lipman, E. E., Lan, H. P., Moss, K. K., & Davis, A. D. 2005. Intensive and extensive production techniques to provide copepod nauplii for feeding larval red snapper *Lutjanus campechanus*. *Copepods in aquaculture*, 151-168.

Pinto, C. S., Souza-Santos, L. P., & Santos, P. J. P. 2001. Development and population dynamics of *Tisbe biminiensis* (Copepoda: Harpacticoida) reared on different diets. *Aquaculture*, 198(3-4), 253-267.

Pond, D., Harris, R., Head, R., & Harbour, D. 1996. Environmental and nutritional factors determining seasonal variability in the fecundity and egg viability of *Calanus helgolandicus* in coastal waters off Plymouth, UK. *Marine Ecology Progress Series*, 143, 45-63.

Price, H. J., & Paffenhöfer, G. A. 1985. Perception of food availability by calanoid copepods. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol*, 21, 115-124.

Puello-Cruz, A. C., Mezo-Villalobos, S., Gonzalez-Rodriguez, B., & Voltolina, D. 2009. Culture of the calanoid copepod *Pseudodiaptomus euryhalinus* (Johnson 1939) with different microalgal diets. *Aquaculture*, 290(3-4), 317-319.

- Rasdi, N. W., & Qin, J. G. 2016. Improvement of copepod nutritional quality as live food for aquaculture: a review. *Aquaculture Research*, 47(1), 1-20.
- Saiz, E., Alcaraz, M., & Paffenhöfer, G. A. 1992. Effects of small-scale turbulence on feeding rate and gross-growth efficiency of three *Acartia* species (Copepoda: Calanoida). *Journal of Plankton Research*, 14(8), 1085-1097.
- Schipp, G. 2006. The use of calanoid copepods in semi-intensive, tropical marine fish larviculture. *Avances en nutrición acuícola. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*, Monterrey, Nuevo León, 84-94.
- Schipp, G. R., Bosmans, J. M., & Marshall, A. J. 1999. A method for hatchery culture of tropical calanoid copepods, *Acartia* spp. *Aquaculture*, 174(1-2), 81-88.
- Schultz, M., & Kiørboe, T. 2009. Active prey selection in two pelagic copepods feeding on potentially toxic and non-toxic dinoflagellates. *Journal of Plankton Research*, 31(5), 553-561.
- Shields, R. J., & Laidley, C. W. 2003. Intensively cultured paracalanid copepods: high quality diet for small tropical marine fish larvae. *Global Aquaculture Advocate*, 6, 80-81.
- Shields, R. J., Kotani, T., Molnar, A., Marion, K., Kobashigawa, J., & Tang, L. 2005. Intensive cultivation of a subtropical paracalanoid copepod, *Parvocalanus* sp., as prey for small marine fish larvae. *Copepods in Aquaculture*, 209-223.
- Shin, K., Jang, M. C., Jang, P. K., Ju, S. J., Lee, T. K., & Chang, M. 2003. Influence of food quality on egg production and viability of the marine planktonic copepod *Acartia omorii*. *Progress in Oceanography*, 57(3-4), 265-277.
- Southgate, P., & Lucas, J. (Eds.). 2011. The pearl oyster. *Elsevier*. Academic Press.
- Støttrup, J. G. 2003. Production and nutritional value of copepods. Live feeds in marine aquaculture, 145-205.
- Støttrup, J. G. 2006. A review on the status and progress in rearing copepods for marine larviculture. Advantages and disadvantages among calanoid, harpacticoid and cyclopoid copepods. *Avances en Nutrición Acuicola*.

- Støttrup, J. G., & Jensen, J. 1990. Influence of algal diet on feeding and egg-production of the calanoid copepod *Acartia tonsa* Dana. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 141(2-3), 87-105.
- Støttrup, J. G., & Norsker, N. H. 1997. Production and use of copepods in marine fish larviculture. *Aquaculture*, 155(1-4), 231-247.
- Støttrup, J. G., Richardson, K., Kirkegaard, E., & Pihl, N. J. 1986. The cultivation of *Acartia tonsa* Dana for use as a live food source for marine fish larvae. *Aquaculture*, 52(2), 87-96.
- Suárez-Morales, E., Franco-Gordo, C., & Saucedo-Lozano, M. 2000. On the pelagic copepod community of the central Mexican tropical Pacific (Autumn, 1990). *Crustacean International Journal of Crustacean Research*, 73(6), 751-762.
- Sun, B., & Fleeger, J. W. 1995. Sustained mass culture of *Amphiascoides atopus* a marine harpacticoid copepod in a recirculating system. *Aquaculture*, 136(3-4), 313-321.
- Sun, J., & Liu, D. 2003. Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. *Journal of Plankton Research*, 25(11), 1331-1346.
- Sun, X. H., Sun, S., Li, C. L., & Zhang, G. T. 2011. Seasonal and spatial variability in egg production, abundance and production of small copepods in and near Jiaozhou Bay, China. *Journal of plankton research*, 33(5), 741-750.
- Tang, K. W., & Taal, M. 2005. Trophic modification of food quality by heterotrophic protists: species-specific effects on copepod egg production and egg hatching. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 318(1), 85-98.
- Taylor-Cota, R. 2017. Efecto del tipo de presa sobre el crecimiento y supervivencia larvaria del Huachinango del Pacífico *Lutjanus peru* (Nichols & Murphy, 1922). Maestría. CICIMAR.
- Thor, P., Cervetto, G., Besiktepe, S., Ribera-Maycas, E., Tang, K. W., & Dam, H. G. 2002. Influence of two different green algal diets on specific dynamic action and incorporation of carbon into biochemical fractions in the copepod *Acartia tonsa*. *Journal of Plankton Research*, 24(4), 293-300.

- van der Meeren, T., Olsen, R. E., Hamre, K., & Fyhn, H. J. 2008. Biochemical composition of copepods for evaluation of feed quality in production of juvenile marine fish. *Aquaculture*, 274(2-4), 375-397.
- VanderLugt, K., & Lenz, P. H. 2009. Handbook for the Cultivation of two Hawaiian paracalanid copepods. University of Hawaii, Honolulu.
- Verity, P. G., & Lagdon, C. 1984. Relationships between lorica volume, carbon, nitrogen, and ATP content of tintinnids in Narragansett Bay. *Journal of Plankton Research*, 6(5), 859-868.
- Verity, P. G., Robertson, C. Y., Tronzo, C. R., Andrews, M. G., Nelson, J. R., & Sieracki, M. E. 1992. Relationships between cell volume and the carbon and nitrogen content of marine photosynthetic nanoplankton. *Limnology and Oceanography*, 37(7), 1434-1446.
- Welsh J. 2013. Culture Journal, Species: *Parvocalanus crassirostris*. Marine Breeding Initiative. <http://www.mbisite.org/Forums/tm.aspx?m=79048&mpage=1>.
- Włodarczyk, E., Durbin, A. G., & Durbin, E. G. 1992. Effect of temperature on lower feeding thresholds, gut evacuation rate, and diel feeding behavior in the copepod *Acartia hudsonica*. *Marine Ecology Progress Series*, 93-106.
- Young, J. R., & Ziveri, P. 2000. Calculation of coccolith volume and its use in calibration of carbonate flux estimates. Deep sea research Part II: Topical studies in oceanography, 47(9-11), 1679-1700.

ANEXOS

Anexo 1. Curva de crecimiento de las microalgas utilizadas en el experimento.

A) *Isochrysis galbana*, B) *Chaetoceros calcitrans*.

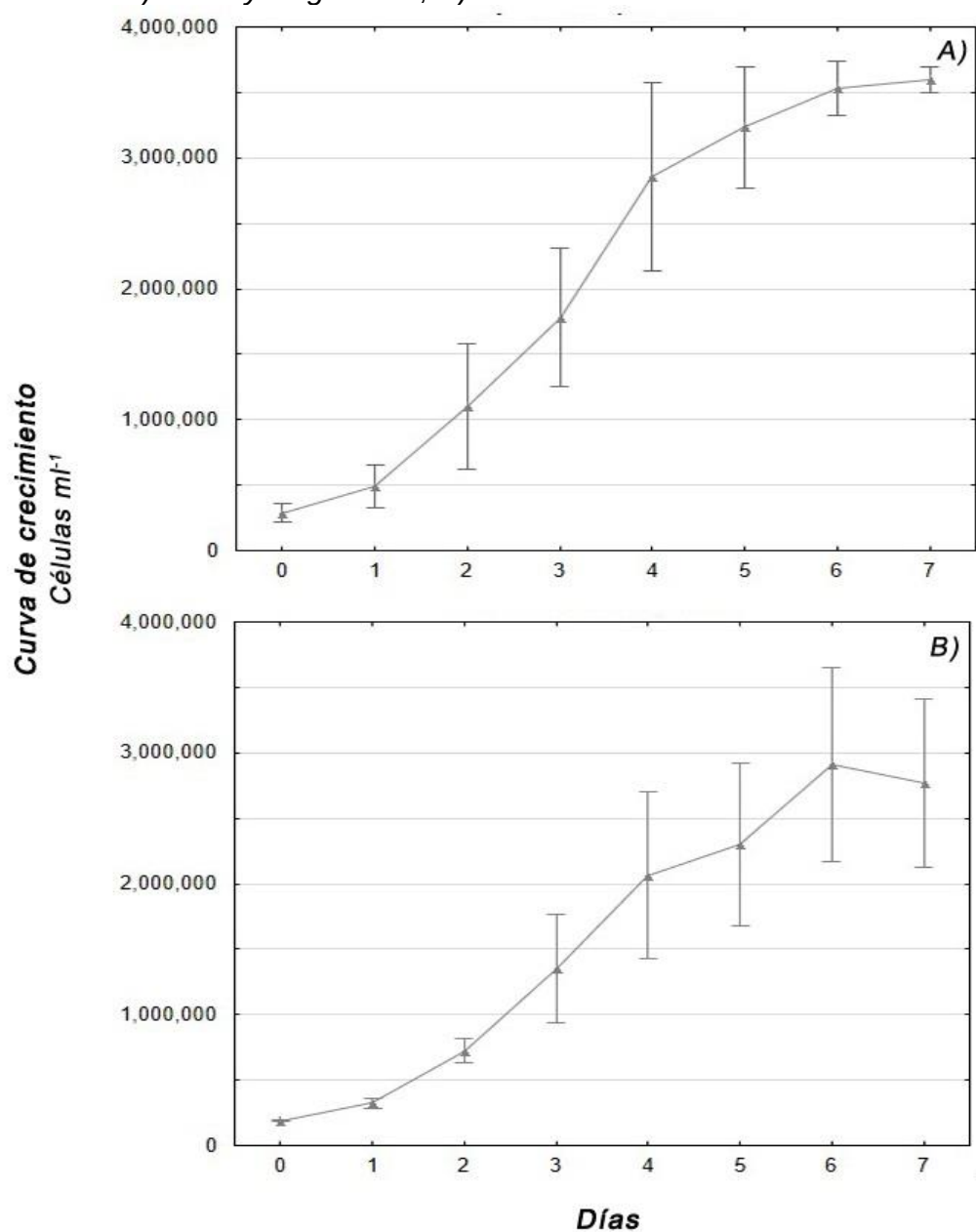


Tabla IX. Densidad celular promedio (células ml⁻¹) y desviación estándar de *I. galbana* y *C. calcitrans* durante los días de cultivo.

Especie	Día							
	0	1	2	3	4	5	6	7
<i>I. galbana</i>	289,773 ± 57,181	488,040 ± 133,048	1,102,540 ± 394,594	1,780,000 ± 431,509	2,856,667 ± 587,329	3,233,333 ± 377,124	3,533,333 ± 169,967	3,600,000 ± 81,650
<i>C. calcitrans</i>	188,153 ± 5,443	325,143 ± 33,085	723,947 ± 78,499	1,350,000 ± 340,294	2,065,333 ± 520,278	2,300,000 ± 504,579	2,913,333 ± 605,769	2,766,667 ± 524,934

Anexo 2. Curva de crecimiento de las microalgas utilizadas en el experimento.

A) *Tetraselmis suecica* y B) *Heterocapsa niei*.

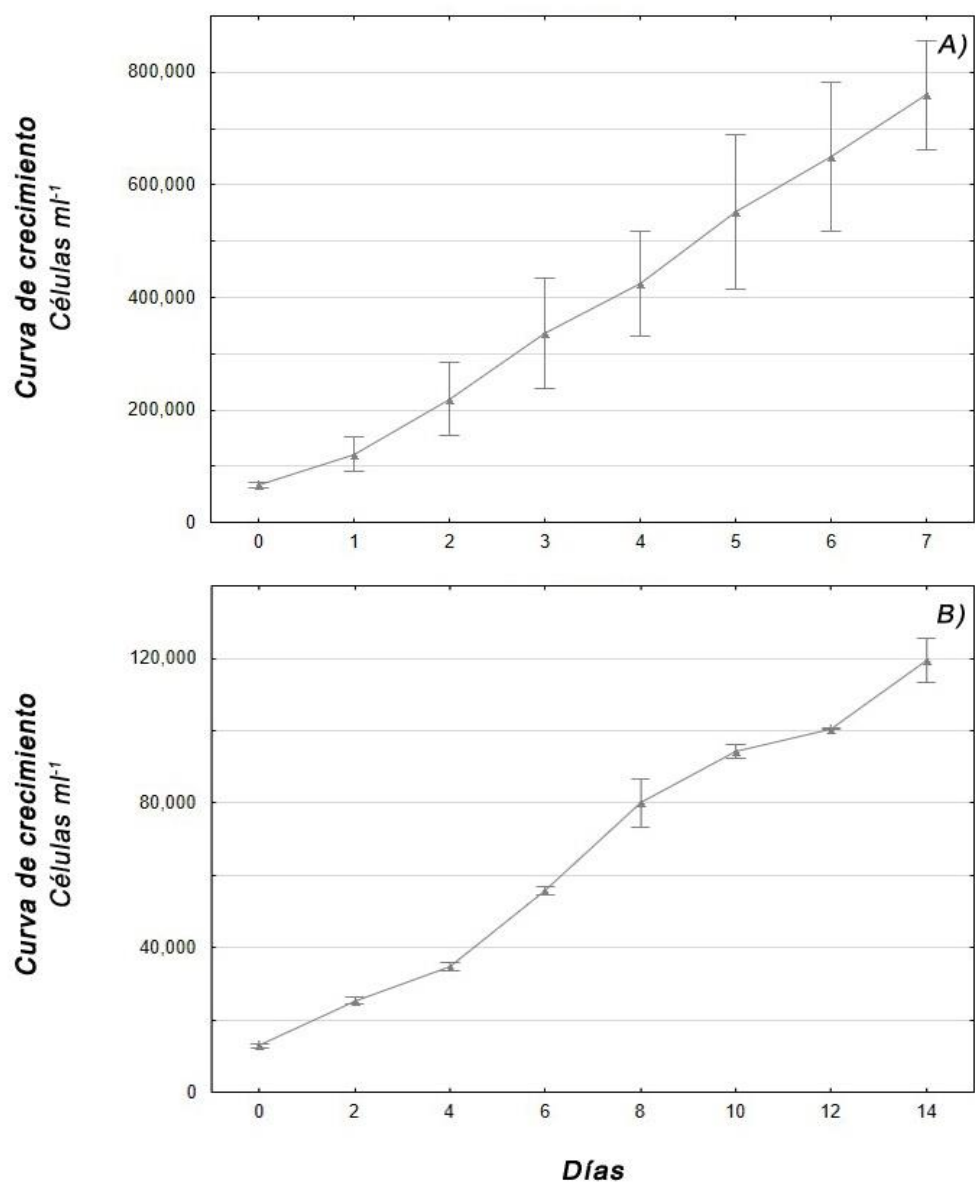


Tabla X. Densidad celular promedio (células ml⁻¹) y desviación estándar de *T. suecica* y *H. niei* durante los días de cultivo.

	Día							
	0	1	2	3	4	5	6	7
<i>T. suecica</i>	66,090 ± 3,265	121,403 ± 25,431	219,707 ± 52,270	335,970 ± 79,802	424,987 ± 75,605	552,577 ± 112,329	650,200 ± 107,735	760,167 ± 78,888
Especie	Día							
	0	2	4	6	8	10	12	14
<i>H. niei</i>	12,867 ± 519	25,333 ± 759	34,700 ± 860	55,783 ± 933	79,983 ± 5,424	94,317 ± 1,555	100,500 ± 245	119,500 ± 4,893

Tabla XI. Alimentación de *P. crassirostris* en base a las distintas dietas y raciones.

<i>Dieta</i>	<i>Ración</i>	<i>Aclaramiento</i>	<i>Ingestión</i>	<i>Ingestión (C)</i>	<i>Ración Diaria</i>
	$\mu\text{g C L}$	$\text{ml H}^{-1} \text{hr}^{-1}$	$\text{cel. H}^{-1} \text{hr}^{-1}$	$\text{ng C H}^{-1} \text{hr}^{-1}$	%
<i>I. galbana</i>	500	2.8 ± 0.1	12149 ± 3230	145.8 ± 43.3	11.7 ± 3.1
	1000	2.5 ± 0.1	25765 ± 3723	309.1 ± 49.9	24.9 ± 3.6
	1500	3.4 ± 0.1	30545 ± 3605	366.4 ± 48.2	29.3 ± 3.4
<i>C. calcitrans</i>	500	1.1 ± 0.1	10497 ± 8082	181.9 ± 38.9	20.4 ± 10.1
	1000	0.6 ± 0.1	18816 ± 4931	289.7 ± 4.9	18.2 ± 4.7
	1500	1.1 ± 0.1	22799 ± 6554	351.2 ± 112.7	21.9 ± 6.2
<i>H. niei</i>	1100	0.2 ± 0.1	1768 ± 602	193.5 ± 76.1	15.5 ± 5.7
	2200	0.3 ± 0.1	4336 ± 2136	583.8 ± 194.5	37.9 ± 18.7
	3300	0.2 ± 0.1	6027 ± 2733	659.7 ± 402.3	52.7 ± 27.8
<i>T. suecica</i>	500	0.5 ± 0.1	4728 ± 1726	253.4 ± 103.4	20.3 ± 7.4
	1000	0.3 ± 0.1	7060 ± 776	378.4 ± 46.5	30.3 ± 3.3
	1500	0.2 ± 0.1	6086 ± 3088	326.2 ± 184.9	26.1 ± 13.2
<i>Mezcla 1</i>	500	2.1 ± 0.8	5513 ± 883	78.9 ± 27.4	7.3 ± 2.0
	1000	1.9 ± 0.4	10367 ± 127	151.3 ± 92.5	14.1 ± 5.6
	1500	2.6 ± 0.1	16958 ± 3145	256.7 ± 84.7	19.7 ± 5.4
<i>Mezcla 2</i>	800	6.0 ± 0.2	5273 ± 1089	303.3 ± 90.7	24.2 ± 10.2
	1600	4.3 ± 0.1	20427 ± 3532	892.3 ± 222.6	80.7 ± 32.4
	2400	4.8 ± 0.1	38893 ± 9230	1505.9 ± 289.1	120.1 ± 35.8
<i>Mezcla 3</i>	600	6.6 ± 0.1	8983 ± 2812	202.35 ± 14.4	15.1 ± 3.1
	1200	6.3 ± 0.1	26771 ± 5728	646.2 ± 116.6	51.9 ± 7.8
	1800	6.8 ± 0.1	29598 ± 6399	813.0 ± 289.1	65.2 ± 12.2
<i>Mezcla 4</i>	650	2.7 ± 0.1	9574 ± 6714	149.4 ± 104.0	12.8 ± 5.9
	1500	2.8 ± 0.2	15263 ± 6942	276.1 ± 145.9	19.2 ± 3.4
	2000	3.3 ± 0.1	22629 ± 9573	483.7 ± 139.4	38.7 ± 9.5

Tabla XII. Alimentación de *P. crassirostris* en base a las dietas pluri-algales.

Dieta	Ración	Microalga	Aclaramiento ml H⁻¹ hr⁻¹	Ingestión cel cel. H⁻¹ hr⁻¹	Ingestión C ng C H⁻¹ hr⁻¹	RD %
Mezcla 1						
	500		2.07	5512	78.8	7.3
		<i>Iso</i>	1.08	2606	31.20	2.50
		<i>Cha</i>	0.56	2830	43.50	4.01
		<i>Tet</i>	0.44	76	4.08	0.82
	1000		1.96	10367	151.28	14.14
		<i>Iso</i>	1.21	4658	55.89	4.48
		<i>Cha</i>	0.05	5512	84.89	8.61
		<i>Tet</i>	0.70	197	10.50	1.06
	1500		2.69	16959	256.60	19.71
		<i>Iso</i>	1.28	9084	109.00	8.73
		<i>Cha</i>	0.27	7184	110.60	8.01
		<i>Tet</i>	1.14	691	37.00	2.97
Mezcla 2						
	800		6.1	5274	303.3	24.3
		<i>Iso</i>	5.59	2810	33.72	2.70
		<i>Het</i>	0.49	2463	269.60	21.57
	1600		4.51	20427	892.00	80.76
		<i>Iso</i>	3.72	12585	138.40	12.09
		<i>Het</i>	0.78	7842	753.60	68.67
	2400		4.84	38893	1505.94	120.50
		<i>Iso</i>	4.13	28228	338.74	27.12
		<i>Het</i>	0.71	10665	1167.20	93.38
Mezcla 3						
	600		6.0	8984	201.5	15.1
		<i>Iso</i>	3.48	4020	51.00	3.86
		<i>Cha</i>	2.29	4495	86.50	7.02
		<i>Het</i>	0.23	468	64.00	4.19
	1200		6.36	26771	646.18	51.89
		<i>Iso</i>	3.49	12926	155.10	12.42
		<i>Cha</i>	2.14	10891	167.71	13.60
		<i>Het</i>	0.74	2955	323.37	25.87
	1800		6.81	29598	812.87	65.21
		<i>Iso</i>	4.00	16090	193.00	15.46
		<i>Cha</i>	2.08	9128	140.57	11.40
		<i>Het</i>	0.73	4379	479.30	38.35
Mezcla 4						
	650		2.7	9575	149.5	12.8
		<i>Iso</i>	2.59	9220	110.64	8.86
		<i>Het</i>	0.12	355	38.84	3.99
	1300		2.87	15263	276.15	19.92
		<i>Iso</i>	2.73	14309	171.70	13.75
		<i>Het</i>	0.14	954	104.45	6.17
	1950		3.31	22630	483.70	38.72
		<i>Iso</i>	3.09	20452	245.40	19.65
		<i>Het</i>	0.22	2177	238.30	19.06

Tabla XII. Producción de huevos en hembras de *P. crassirostris* en base a las distintas dietas y raciones.

<i>Dieta</i>	<i>Ración</i> μg C L	<i>Puesta</i> h H ⁻¹ d ⁻¹	<i>Eclosión</i> %	<i>Carbono puesta</i> ng C H ⁻¹ d ⁻¹	<i>Esfuerzo reproductivo</i> ng C H ⁻¹ d ⁻¹	<i>Porcentaje corporal</i> %
<i>I. galbana</i>	500	7.6 ± 2.8	82.2 ± 4.7	149.5 ± 45.0	120.4 ± 55.9	12.0 ± 4.5
	1000	10.3 ± 4.2	89.9 ± 3.0	202.1 ± 82.7	162.6 ± 66.6	16.2 ± 6.6
	1500	10.1 ± 3.0	98.5 ± 0.6	196.6 ± 58.7	158.34 ± 47.3	15.83 ± 4.7
<i>C. calcitrans</i>	500	8.8 ± 4.5	95.3 ± 1.6	171.4 ± 86.3	138.0 ± 69.5	13.8 ± 6.9
	1000	13.9 ± 5.3	98.3 ± 0.9	271.6 ± 102.2	218.7 ± 82.3	21.8 ± 8.2
	1500	13.3 ± 5.4	94.5 ± 1.9	259.0 ± 104.8	208.6 ± 84.4	20.8 ± 8.4
<i>H. niei</i>	1100	10.7 ± 4.7	73.7 ± 4.3	208.0 ± 90.2	16.5 ± 72.6	16.7 ± 7.2
	2200	13.2 ± 4.9	88.3 ± 2.6	258.1 ± 95.3	200.9 ± 76.8	20.0 ± 7.6
	3300	13.5 ± 4.0	83.9 ± 2.9	263.1 ± 76.9	211.9 ± 61.9	21.1 ± 6.1
<i>T. suecica</i>	500	9.6 ± 4.0	90.7 ± 3.2	186.8 ± 76.6	150.4 ± 61.7	15.0 ± 6.1
	1000	10.2 ± 4.6	91.7 ± 3.0	206.1 ± 84.4	166.0 ± 67.9	16.0 ± 6.7
	1500	15.6 ± 4.6	92.0 ± 2.0	304.6 ± 89.1	245.3 ± 71.8	24.5 ± 7.1
<i>Mezcla 1</i>	500	8.5 ± 3.8	87.0 ± 4.0	167.0 ± 73.7	134.5 ± 59.4	13.4 ± 5.9
	1000	8.4 ± 4.6	88.6 ± 3.4	163.4 ± 88.2	131.6 ± 71.0	13.16 ± 7.1
	1500	11.9 ± 4.6	87.3 ± 2.9	232.7 ± 88.6	187.4 ± 71.3	18.7 ± 7.1
<i>Mezcla 2</i>	800	21.8 ± 4.6	89.9 ± 2.0	423.9 ± 88.8	341.4 ± 71.5	34.1 ± 7.1
	1600	23.5 ± 5.1	88.8 ± 2.5	456.9 ± 98.5	368.0 ± 79.3	36.8 ± 7.9
	2400	20.2 ± 4.5	88.6 ± 1.9	394.1 ± 87.2	317.3 ± 70.2	31.7 ± 7.0
<i>Mezcla 3</i>	600	13.3 ± 4.3	92.5 ± 2.7	260.4 ± 83.6	209.7 ± 67.4	20.9 ± 6.7
	1200	13.6 ± 4.7	90.8 ± 2.6	264.4 ± 90.7	212.9 ± 73.0	21.3 ± 7.3
	1800	13.6 ± 4.0	90.2 ± 2.7	264.8 ± 61.5	213.3 ± 49.5	21.3 ± 4.9
<i>Mezcla 4</i>	650	13.9 ± 5.8	97.5 ± 2.6	271.6 ± 111.2	218.7 ± 89.5	21.8 ± 8.9
	1500	14.0 ± 4.0	92.7 ± 2.7	254.1 ± 81.8	219.2 ± 65.9	21.9 ± 6.5
	2000	14.4 ± 5.2	97.3 ± 2.7	280.5 ± 100.5	225.9 ± 80.9	22.6 ± 8.0