



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

EVALUACIÓN DEL ENRIQUECIMIENTO DEL ROTÍFERO *Brachionus*
plicatilis

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestra en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Acuicultura)

Presenta

Yenith Paola Anaya López

La Paz, Baja California Sur, Septiembre de 2019

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 13:00 horas del día 17 del Mes de Septiembre del 2019, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Evaluación del enriquecimiento del rotífero *Brachionus plicatilis*"

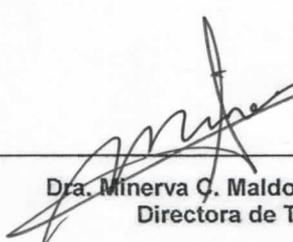
Presentada por el alumno:

Yenith Paola Anaya López

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **Acuicultura**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

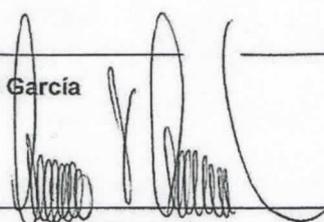
LA COMISIÓN REVISORA



Dra. Minerva C. Maldonado García
Directora de Tesis



Dr. Dariel Tovar Ramírez
Co-Tutor



Dr. Marco Cadena Roa
Co-Tutor



Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos

Comité tutorial

Dra. Minerva C. Maldonado García, Directora de tesis.

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR)

Dr. Dariel Tovar Ramírez, Cotutor

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR)

Dr. Marco Cadena Roa, Cotutor.

Universidad Autónoma de Baja California Sur (UABCS)

Comité revisor de tesis

Dra. Minerva Maldonado García

Dr. Dariel Tovar Ramírez

Dr. Marco Cadena Roa

Jurado de examen de grado

Dra. Minerva Maldonado García

Dr. Dariel Tovar Ramírez

Dr. Marco Cadena Roa

Suplente

Dr. Deneb Maldonado García

Resumen

Los rotíferos son los organismos más usados como alimento para las primeras etapas larvarias en la acuicultura. Se han desarrollado e implementado con éxito, gran variedad de técnicas para lograr masificar el cultivo de estos organismos, y por consiguiente, mejorar la producción acuícola. Sin embargo, el rotífero por sí solo, contiene un inadecuado contenido nutricional que impide el correcto desarrollo de las larvas. Por lo tanto, se hace necesario potenciar su valor nutritivo de acuerdo a los requerimientos de cada especie, mediante dietas de enriquecimiento, ya sea con microalgas, levaduras, aceites u otras dietas formuladas. De acuerdo a lo anterior, el objetivo es evaluar el efecto del tiempo en el enriquecimiento del rotífero *Brachionus plicatilis* con mezclas de microalgas nativas, tradicionales y un enriquecedor comercial, Ori-Green.

Para esto, se escaló un cultivo de *B. plicatilis* y se evaluaron enriquecimientos con diferentes tiempos (1, 2, 4, 8, 12 y 24 horas) y tres diferentes dietas: 1) mezcla de microalgas nativas: *Schizochytrium sp.* (LPU1) y *Chaetoceros sp.* (LPU3); 2) mezcla de microalgas tradicionales: *Chaetoceros muelleri* y *C. calcitrans*; 3) Enriquecedor comercial Ori-Green (Skretting®). Cada experimento se llevó a cabo por triplicado, se realizaron análisis bromatológicos de todos los tratamientos y perfiles de ácidos grasos por cromatografía de gases. Finalmente, se realizaron pruebas estadísticas de homogeneidad, análisis de varianza y pruebas post hoc para comprobar si existían diferencias significativas entre los tratamientos y tiempos.

Se encontró que la mayor concentración de carbohidratos se obtuvo con la mezcla de microalgas tradicionales a un tiempo de 8 horas ($228.3 \text{ mg/g} \pm 4.1$), en cuanto a lípidos totales, el tratamiento con el enriquecedor Ori-Green a 24 horas presentó la mejor concentración con $266 \text{ mg/g} \pm 1.7$ y la dieta de microalgas nativas obtuvo la mayor cantidad de proteínas totales a 4 horas de enriquecimiento ($624.56 \text{ mg/g} \pm 0.7$). Se halló una tendencia de crecimiento positivo para la cinética del ácido graso DHA en el tratamiento con Ori-Green durante las primeras 8 horas y posteriormente se mantuvo constante (11%), por el contrario, el EPA para el mismo tratamiento mostró una tendencia de crecimiento negativo y el tratamiento con microalgas tradicionales mostró los mejores resultados con un 16% de EPA. Finalmente, el ARA, fue observado en una mayor proporción en los rotíferos enriquecidos con microalgas nativas en los tiempos de 1 y 2 horas de enriquecimiento, con aproximadamente 3.64% de los lípidos totales.

Palabras claves: rotífero, enriquecimiento, microalga nativa, ácido graso, Ori-Green.

Vo.Bo.



Dra. Minerva C. Maldonado García
Directora de Tesis

Summary

Rotifers are the most commonly used organisms as food for the first larval stages in aquaculture. A wide variety of techniques have been developed and implemented successfully to achieve mass growth of these organisms, and to achieve, improve aquaculture production. However, the rotifer by itself, contains low quantities of nutritional content that prevents the correct development of the larvae. Therefore, it is necessary to enhance its nutritional value according to the requirements of each species, through enrichment diets, either with microalgae, yeasts, oils or other formulated diets. According to this, the objective of the present study is to evaluate the effect of time on the enrichment of the rotifer, *Brachionus plicatilis*, with mixtures of native, traditional microalgae and a commercial enrichment, Ori-Green.

For this, a culture of *B. plicatilis* was scaled and enrichments were evaluated with different times (1, 2, 4, 8, 12 and 24 hours) and three different diets: 1) mixture of native microalgae: *Schizochytrium sp.* (LPU1) and *Chaetoceros sp.* (LPU3); 2) mixture of traditional microalgae: *Chaetoceros muelleri* and *C. calcitrans*; 3) Ori-Green commercial enrichment (Skretting®). Each experiment was carried out in triplicate, bromatological analyzes of all treatments and fatty acid profiles were performed by gas chromatography. Finally, statistical tests of homogeneity, analysis of variance and post hoc tests were analyzed to verify if there are significant differences between treatments and times.

It was found that the highest concentration of total carbohydrates was obtained with the mixture of traditional microalgae at a time of 8 hours ($228.3 \text{ mg/g} \pm 4.1$), in terms of total lipids, the treatment with the Ori-Green enrichment at 24 hours better concentration with $266 \text{ mg/g} \pm 1.7$ and the native microalgae diet obtained the highest amount of total proteins at 4 hours of enrichment ($624.56 \text{ mg/g} \pm 0.7$). A positive growth trend was found for the kinetics of DHA fatty acid in the treatment with Ori-Green during the first 8 hours and subsequently remained constant (11%), on the contrary, the EPA for the same treatment affected a tendency of Negative growth and traditional microalgae treatment tested the best results with 16% EPA. Finally, the ARA was seen in a greater proportion in rotifers enriched with native microalgae at times of 1 and 2 hours of enrichment, with approximately 3.64% of total lipids.

Keywords: rotifer, enrichment, native microalgae, fatty acids, Ori-Green.

Vo.Bo.



Dra. Minerva C. Maldonado García
Directora de Tesis

Dedicatoria

“A mi hermosa familia por su amoroso, constante e incondicional apoyo”.

Agradecimientos

Al CIBNOR como institución receptora de los estudios de Posgrado y al CONACyT por la beca número 864662 otorgada, que hizo posible la realización de mis estudios.

A mi directora de tesis, Dra. Minerva C. Maldonado García por toda la ayuda transmitida no solo académica si no personal, gracias por su buena disponibilidad y apoyo.

A mi comité tutorial, al Dr. Dariel Tovar Ramírez, por todo el apoyo y la guía en la elaboración de los experimentos. Al Dr. Marco Cadena Roa por toda ayuda en la proporción de las microalgas nativas usadas en los experimentos, que son parte fundamente de esta tesis.

Al área de posgrados, a la Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra, Lic. Leticia González Rubio Vera, Lic. Osvelia Ibarra Morales, Tania Verónica Núñez Valdez por todo el apoyo administrativo y de manera particular al Lic. Horacio Sandoval Gómez por todo el apoyo técnico informático brindado.

Al Dr. Deneb Maldonado García, catedrático CONACYT, por su asesoría académica y por la revisión exhaustiva de esta tesis.

A los trabajadores del área reproductiva y larvaria de la empresa Kampachi Farms, México, Javier Moch Martínez, José Raymundo Castro Collins, Rafael Chávez Arellano y Mauricio Moreno Alva, por su constante ayuda y asesoría.

Al Laboratorio de Alimento Vivo: a la Dra. María Concepción Lora Vilchis, a los técnicos Gabriela Mendoza Carrión, Ing. Pesq. Julián Alfonso Garzón Fabela, Ing. B.Q. Adriana Greene Yee y a Lic. Marte Felix Virgen.

Al M. en C. Mario Osuna García, Técnico Titular del CIBNOR por el apoyo y orientación brindados para el cultivo de rotíferos y el desarrollo de la experimentación del presente estudio.

A los técnicos del Laboratorio de Aclimatación Pablo Monsalvo Spencer y Gabriel Robles Villegas por su constante y amable ayuda durante el montaje y la realización de los experimentos sobre alimentación de larvas de peces de *Seriola rivoliana*.

A los integrantes del Laboratorio de Metabolismo de Lípidos, la Dra. Elena Palacios Metchenov, Técnico Olivia Arjona López y Libertad Jiménez Bárcenas, por todo su apoyo y dirección durante el procesamiento de las muestras para el perfil de ácidos grasos de las microalgas nativas.

A los técnicos M.C., Roxana Bertha Inohuye Rivera, Francisco Javier Encarnación Ramírez, Biól. Mar. Jorge León Sandoval Soto, B.Q. Roberto Hernández Herrera y Marco Fabián Quiñonez Arreola, por todo el apoyo durante el proceso de la realización de los experimentos en general y de análisis de resultados.

Al Dr. Edouard Kraffe de la Universidad de Bretaña Occidental en Brest, por su cálida recepción y dirección en su laboratorio LipidOcean, en Brest, Francia. Y al Dr. Antoine Bideau por su amable enseñanza sobre las técnicas para el procesamiento de muestras para obtener el perfil de ácidos grasos, a pesar de nuestra barrera lingüística.

A los técnicos Aldo Joaquín Vargas Mendieta y Gerardo García Hernández del Departamento de Divulgación.

A mis amigos de la Paz y compañeros de maestría que hicieron de esta etapa de mi vida un recuerdo memorable, una etapa que llevaré en el corazón, por todas las risas compartidas y hacerme sentir en casa y bien recibida.

Último, pero no menos importante, a mi compañero de vida Bernardo A. Barbosa Romo, por su energía vibrante, su amor y apoyo constante e incondicional, durante todo este largo y variable proceso, incluso desde antes de emprender esta aventura juntos.

Tabla de Contenido

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1. Cultivos de rotíferos en la acuicultura	4
2.2. Cultivos y usos de microalgas en acuicultura	6
2.3. Uso de dietas formuladas en la acuicultura	9
2.4. Tiempos de enriquecimiento	10
3. JUSTIFICACIÓN	12
4. HIPÓTESIS	13
5. OBJETIVOS	14
5.1. Objetivo general.....	14
5.2. Objetivos particulares.....	14
6. MATERIAL Y MÉTODOS	15
6.1 Área de trabajo.....	15
6.2 Cultivo de microalgas.....	15
6.3 Proceso de desinfección	15
6.4 Escalamiento	16
6.5 Conteo y medición	16
6.6 Tratamientos	16
6.6.1 Microalgas tradicionales y nativas	17
6.6.2 Alimentos balanceados	17
6.7 Análisis bioquímicos	18
6.8 Análisis estadísticos	19
7. RESULTADOS	21
8. DISCUSIÓN	36
9. CONCLUSIONES	47
11. LITERATURA CITADA	488

Lista de figuras

- Figura 1.** Cinética de las concentraciones de carbohidratos totales (mg/g) del rotífero *B. plicatilis* enriquecido durante los tiempos 0, 1, 2, 4, 8, 12 y 24 horas de los tratamientos analizados22
- Figura 2.** Cinética de las concentraciones de lípidos totales (mg/g) del rotífero *B. plicatilis* enriquecido durante los tiempos 0, 1, 2, 4, 8, 12 y 24 horas de los tratamientos analizados23
- Figura 3.** Cinética de las concentraciones de proteínas totales (mg/g) del rotífero *B. plicatilis* enriquecido durante los tiempos 0, 1, 2, 4, 8, 12 y 24 horas de los tratamientos analizados24
- Figura 4.** Cinética del perfil de ácidos grasos saturados (SFA) del rotífero *B. plicatilis* enriquecido con los tratamientos a diferentes tiempos25
- Figura 5.** Cinética del perfil de ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) del rotífero *B. plicatilis* enriquecido con los tratamientos a diferentes tiempos.....26
- Figura 6.** Cinética del perfil de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) y ácidos grasos altamente insaturados del tratamiento con microalgas nativas (HUFA) del rotífero *B. plicatilis* enriquecido a diferentes tiempos27
- Figura 7.** Cinética del perfil de ácidos grasos de la familia Omega 3 en el rotífero *B. plicatilis* enriquecido con los tratamientos a diferentes tiempos28
- Figura 8.** Cinética del perfil de ácidos grasos de la familia Omega 6 en el rotífero *B. plicatilis* enriquecido con los tratamientos a diferentes tiempos29
- Figura 9.** Cinéticas de las concentraciones (%) de DHA en el rotífero *B. plicatilis* enriquecido con los tratamientos a diferentes tiempos30

- Figura 10.** Cinéticas de las concentraciones (%) de EPA en el rotífero *B. plicatilis* enriquecido con los tratamientos a diferentes tiempos31
- Figura 11.** Cinéticas de las concentraciones (%) de ARA en el rotífero *B. plicatilis* enriquecido con los tratamientos a diferentes tiempos32

Lista de Tablas

- Tabla 1.** Analisis proximal de *B. plicatilis* con los tratamientos de enriquecimientos mono específicos y mixtos de microalgas tradicionales *Chaetoceros calcitrans* y *C. muelleri* y el tratamiento control con el enriquecedor Ori-Green a un tiempo de 3 horas21
- Tabla 2.** Porcentajes de los ácidos grasos: palmitoleico (16:1n-7), oleico (18:1n-9), linoleico (18:2n-6), y docosapentaenoico (22:5n-3) para el rotífero *B. plicatilis* enriquecido con microalgas nativas (MN), microalgas tradicionales (MT) y Ori-Green (OG)34
- Tabla 3.** Análisis proximal y perfil de ácidos grasos del alimento comercial Ori-One de la marca Skretting® en el rotífero *B. plicatilis* alimentados durante 72 y 24 horas35

1. INTRODUCCIÓN

La fase larvaria en peces, como en otros organismos de interés acuícola, representa una etapa crítica tanto en la industria, como en la naturaleza, debido a las altas tasas de mortalidad que se presentan en esta etapa del desarrollo. Se han encontrado tasas variables que van desde el 5% al 93% de supervivencia (Baskerville-Bridges & Kling, 2000; Brinkmeyer & Holt, 1998; Hamlin & Kling, 2001; Hamza *et al.*, 2012; Olsen *et al.*, 1999; Palazzi *et al.*, 2006; Puvanendran & Brown, 2002; Tamaru *et al.*, 1994; Yúfera *et al.*, 2005), y este número depende de cada especie, la calidad de la descendencia y el alto aporte nutricional de la primera alimentación de las larvas, siendo éste, uno de los factores más importantes (Yúfera & Darias, 2007).

Es bien conocido por la comunidad científica y los acuicultores, que los peces marinos necesitan ácidos grasos altamente insaturados (n-3 PUFA y HUFA) para su correcto desarrollo morfológico en etapas larvarias y juveniles, además de mantener las funciones fisiológicas (Craig & Helfrich, 2009; Glencross, 2009; Zuo *et al.*, 2012). Sin embargo, no solo los lípidos y ácidos grasos son esenciales en la nutrición de peces, sino también las proteínas (son usados por los peces para el crecimiento si los niveles adecuados de grasas y carbohidratos están siendo suministrados correctamente en la dieta. De lo contrario, la proteína será usada para energía y soporte vital en lugar de crecimiento) y carbohidratos (se almacenan como glucógeno para satisfacer las demandas de energía) (Craig & Helfrich, 2009). Adicionalmente, una correcta nutrición de los peces mantiene la salud y en algunos casos podría mejorar la resistencia a enfermedades causadas por parásitos (Halver & Hardy, 2002; Zuo *et al.*, 2012).

Por estas razones, el estudio de la alimentación en larvas de peces ha avanzado a grandes pasos siguiendo la creciente expansión de la acuicultura durante los últimos 50 años (Halver & Hardy, 2002; Fao, 2012). Existe una gran diversidad de dietas que son utilizadas en la larvicultura, dependiendo de los requerimientos específicos de cada especie de pez. Sin embargo, dentro de los ingredientes más usados, se encuentran los alimentos vivos. Se han usado organismos pertenecientes al zooplancton y al fitoplancton como los rotíferos,

copépodos, *Artemia* y microalgas, respectivamente (Bae & Hur, 2011; Dhert *et al.*, 2001; Mæhre *et al.*, 2013; Sargent *et al.*, 1999; Shields *et al.*, 1999; Wikfors, 2004), en combinaciones con alimentos balanceados y que en distintas proporciones, suministran lípidos, ácidos grasos, proteínas y carbohidratos permitiendo el correcto desarrollo y aporte nutricional esencial de los animales.

Los rotíferos son los más usados como alimento para las primeras etapas larvarias en la acuicultura (Kotani *et al.*, 2009). Se han desarrollado e implementado con éxito, gran variedad de técnicas para lograr masificar el cultivo de estos organismos, y por consiguiente, mejorar la larvicultura. Sin embargo, el rotífero por sí solo, contiene un inadecuado contenido nutricional que impide el correcto desarrollo de las larvas. Por lo tanto, se hace necesario potenciar el valor nutritivo de los rotíferos de acuerdo a los requerimientos de cada especie, mediante procesos de enriquecimiento, ya sea con microalgas, levaduras, aceites u otras dietas formuladas (Kotani *et al.*, 2009; Watanabe *et al.*, 1983). Dentro de los rotíferos más usados para la alimentación de larvas, se encuentra la especie *Brachionus plicatilis*, debido a su pequeño tamaño (50 a 300 μm), su forma y color. Adicionalmente presentan baja motilidad, son una de las presas predilectas de las larvas en la naturaleza y se puede cultivar a altas densidades para cumplir con las elevadas demandas alimenticias en sistemas cerrados de cultivos larvarios (Bae & Hur, 2011; Mæhre *et al.*, 2013).

Por otra parte, las microalgas han sido usadas ampliamente como alimentos vivos y enriquecedores de rotíferos, copépodos y *Artemia franciscana* en la producción acuícola. Algunos géneros de microalgas predilectas para su cultivo, son: *Chaetoceros*, *Nannochloris*, *Nannochloropsis* e *Isochrysis* (Bae & Hur, 2011; Brown *et al.*, 1997; Cho *et al.*, 2007; Yin *et al.*, 2013; Zitteli *et al.*, 1999), ya que contienen altos niveles de proteínas y ácidos grasos poliinsaturados de la familia Omega 3 y 6 (como DHA, EPA y ARA). Estos organismos fotosintéticos no causan grandes problemas de contaminación en el agua de los cultivos, contrario a otros enriquecedores como aceites de pescados, levaduras y dietas formuladas que obligan a hacer recambios de agua constantes (Hirayama & Funamoto, 1983).

Ahora, en cuanto al uso de los enriquecedores, se han realizado varios estudios para entender y potencializar su uso en los cultivos larvarios (Garcia *et al.*, 2008; Li & Olsen, 2015; Rodriguez *et al.*, 1989). Sin embargo, una pregunta controversial en la industria acuícola, es ¿cuál es el mejor tiempo de enriquecimiento de acuerdo a los alimentos (ya sean vivos o balanceados) que se está usado para obtener la mayor eficiencia nutricional de los cultivos larvarios? Debido a lo mencionado anteriormente, el propósito de este estudio, es evaluar el proceso de enriquecimiento del rotífero *Brachionus plicatilis* con dos cepas de microalgas del género *Chaetoceros* a diferentes tiempos y compararlo nutricionalmente con el aporte de un enriquecimiento con dietas formuladas comerciales.

2. ANTECEDENTES

2.1. Cultivos de rotíferos en la acuicultura

El desarrollo y la mejora de los cultivos anexos o alimento vivo dentro de la acuicultura han permitido el crecimiento de esta industria, especialmente en el éxito productivo de las etapas larvarias (Dhert *et al.*, 2001; Lubzens *et al.*, 2001). Un gran número de larvicultivos de peces son logrados usando como alimento el rotífero *Brachionus plicatilis*.

Este rotífero se provee como alimento durante las primeras semanas de vida, desde la eclosión de los huevos, en las industrias acuícolas. Por esta razón, es imperativo que el rotífero pueda suplir todos los nutrientes para el óptimo desarrollo de las larvas. Sin embargo, estos organismos carecen de un alto contenido nutricional, por lo tanto, deben ser enriquecidos (Dhert *et al.*, 2001; Hamre, 2016; Kotani *et al.*, 2009; Lubzens *et al.*, 2001). Esta situación es distinta en los ambientes naturales, donde las larvas se pueden alimentar de un amplio rango de organismos fito y zooplanctónicos, que logran cumplir todos sus requerimientos nutricionales para lograr un desarrollo óptimo.

Como consecuencia, la industria acuícola ha centrado gran parte de su atención, a optimizar el contenido bioquímico de estas especies. Como tal, el valor nutricional de los rotíferos puede variar de acuerdo a procesos fisiológicos como la reproducción, periodos de saciedad e inanición (Lubzens *et al.*, 2001; Yúfera *et al.*, 2005). Y aunque se han realizado gran cantidad de análisis proximales de *B. plicatilis*, no todos concuerdan en sus resultados, debido a las diferentes condiciones de su cultivo, procesos fisiológicos y parámetros fisicoquímicos que pueden alterar su composición (Lubzens *et al.*, 1989; Lubzens *et al.*, 2001). No obstante, se ha reportado que de su masa seca, el rotífero contiene de 28-63% de proteínas, de 9-28% en lípidos y 10.5 a 27% de carbohidratos (Lubzens *et al.*, 2001). También, varios autores han comprobado que la proporción de proteínas y ácidos grasos en la masa seca de los rotíferos, aumenta cuando éstos son alimentados con mezclas de microalgas o dietas formuladas (Cruz-Cruz *et al.*, 2019; Dhert *et al.*, 2001; Watanabe *et al.*, 1983). Hamre (2016) afirma que los niveles de proteínas en los rotíferos están determinados mayoritariamente por su genética y no por las dietas en sí o las condiciones

en que son cultivados. Lo contrario sucede con los niveles de lípidos totales en rotíferos que si sufren cambios por los factores mencionados y las concentraciones de ácidos grasos dependen enteramente de las dietas que se les proporcionan. Sin embargo, en general, los rotíferos contienen bajos niveles de ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA) (Dhert *et al.*, 2001) y en la literatura se ha sugerido que un ratio adecuado de DHA/EPA en la dieta de organismos marinos debe estar presente en una proporción de 1.8:1.

En cuanto al desarrollo tecnológico de los cultivos, crear nuevas técnicas de sistemas cerrados permitió el suministro continuo de rotíferos de alta calidad a densidades 10 veces más altas que en los cultivos discontinuos (Dhert *et al.*, 2001; Lubzens *et al.*, 2001). En 1964 se realizó el primer intento de cultivo de estos organismos por la Asociación Japonesa de Pesquerías Marinas (JSFFA, Estación Yashima), logrando así, obtener una densidad de 10-50 individuos por mL, en la actualidad es posible llegar a una producción masiva de 10.000 ind/mL. Esto ha sido posible mediante el uso de desproteinizadores, inyecciones continuas de oxígeno y filtros biológicos, debido a que uno de los cuellos de botella para la producción es la alta contaminación y mortalidades cuando se usan dietas formuladas o emulsiones oleosas. Otro gran problema que ha enfrentado la industria, es la dificultad para manipular y cosechar grandes poblaciones de rotíferos, aspecto indispensable para poder suplir las altas demandas de rotíferos cuando se tienen cultivos larvarios de organismos marinos.

Actualmente, se distinguen tres tipos de cultivos de rotíferos, cultivos discontinuos, semi-continuos y continuos. En los cultivos discontinuos, se siembra una pequeña cantidad de organismos en agua verde, una vez sean consumidas todas las microalgas del cultivo, la mayor parte de los rotíferos son cosechados y proporcionados como alimento a larvas de peces u otros. Una pequeña cantidad es conservada como inóculo para la siguiente producción. Generalmente, éste tipo de cultivo suele darse en un tiempo de 4-5 días y para alcanzar altas cantidades de individuos, es necesario tener varios tanques de cultivo. En cuanto a los cultivos semi-continuos, se cosecha periódicamente cierto volumen del cultivo, que es reemplazado con agua de mar con el fin de bajar las densidades de rotíferos y

permitir la formación de nuevos organismos mediante reproducción. Estos cultivos suelen llevarse a cabo en tanques de gran capacidad (hasta 300,000 L) y pueden durar hasta 2 semanas, si se extrae correcta y continuamente la fracción sólida del fondo de los tanques para evitar la contaminación. Finalmente, los cultivos de rotíferos continuos se basan en modelos quimiostáticos o turbidostáticos de microorganismos, lo que indican que parámetros fisicoquímicos como temperatura, pH, oxígeno disuelto y densidades de cultivo están totalmente controlados. Mediante este tipo de producción se pueden cosechar continuamente altas densidades de rotíferos de buena calidad nutricional (Dhert *et al.*, 2001; Lubzens *et al.*, 2001).

2.2. Cultivos y usos de microalgas en acuicultura

Cada gota de agua de la superficie del océano, contiene cientos de microorganismos microscópicos pertenecientes al fitoplancton. Las microalgas pertenecen a este grupo, son organismos fotosintéticos que, en el medio natural, representan la primera y principal fuente de alimento para gran cantidad de larvas de organismos de interés acuícola, como bivalvos, crustáceos y peces. Además son la base de la cadena alimenticia en ambientes acuáticos, por lo que han sido usadas ampliamente como presas vivas para el cultivo masivo de estos organismos en diferentes etapas del desarrollo (Brown *et al.*, 1997; Roy & Pal, 2015; Vivanco *et al.*, 2014).

Algunas de las características que las hacen de gran interés en la industria acuícola, son su pequeño tamaño (pueden ser de 2 a 200 μ m), sus altas tasas de crecimiento, presentan gran valor nutricional, alta digestibilidad y efecto antioxidante (Brown *et al.*, 1997; Roy & Pal, 2015). Sin embargo, no todas las especies de microalgas son aptas para su uso como alimento, por lo que es necesario conocer aspectos como, su composición bioquímica, carencia de toxicidad y alta digestibilidad, para así determinar su potencial utilización en la acuicultura.

Estos organismos presentan una amplia diversidad y actualmente se siguen describiendo y conociendo especies alrededor del mundo. Según la descripción de Graham y Wilcox (2000), las algas se clasifican en procariotas y eucariotas, y dentro de éstos, se encuentran

otras divisiones. La única división de las microalgas procariotas son las Cyanophytas, por el contrario, en las eucariotas, definieron 8 divisiones, que son: Glaucophyta, Rodophyta, Chlorophyta, Euglenophyta, Dynophyta, Apicomplexa, Cryptophyta y Heterokontophyta.

Algunos de las microalgas más usadas en la acuicultura son: *Isochrysis*, *Nannochloropsis*, *Chlorella*, *Spirulina*, *Chaetoceros*, *Dunaliella*, *Tetraselmis* y *Pavlova* (Becker, 1994)(Brown *et al.*, 1997; Jimenez-Valera & Sanchez-Saavedra, 2016; Pernet *et al.*, 2003; Regunathan & Wesley, 2006; Roy & Pal, 2015; Velasco *et al.*, 2016; Vivanco *et al.*, 2014). En muchos países, se han usado estos géneros, para el cultivo de larvas de ostras, vieiras, almejas, abulones, camarones, larvas de peces tanto marinos como dulceacuícolas y el cultivo de zooplancton, como rotíferos, *Artemia* y copépodos (Brown *et al.*, 1997; Hemaiswarya *et al.*, 2011; Roy & Pal, 2015; Vivanco *et al.*, 2014). Vivanco y colaboradores (2014) probaron tratamientos mono específicos y mixtos de microalgas tradicionales (*Isochrysis galbana* y *Chaetoceros calcitrans*), microalgas nativas de las costas de Chile (*Chlamydomona sp.* y una diatomea pennada) y dietas formuladas (pasta de la diatomea y un concentrado nutritivo) en el cultivo de larvas de la almeja *Mulinia edulis*. Ellos encontraron que la mayor tasa de supervivencia y crecimiento del cultivo larvario se obtuvo con la mezcla de microalgas tradicionales.

La amplia predilección por estas microalgas en la producción acuícola viene de su alto contenido de proteínas, carbohidratos y lípidos, además en menores cantidades, proporcionan pigmentos (esencial en el aporte de color en la carne de salmónidos), vitaminas y antioxidantes (Brown *et al.*, 1997; Hemaiswarya *et al.*, 2011; Jimenez-Valera & Sanchez-Saavedra, 2016; Renaud *et al.*, 1994; Roy & Pal, 2015; Wikfors, 2004). Jiménez-Valera y Sánchez-Saavedra (2016) realizaron un estudio donde aislaron 21 cepas de microalgas de zonas costeras de Baja California. Estudiaron su composición bioquímica y reportaron que las diatomeas contienen mayores porcentajes de ácidos grasos poliinsaturados de las familias $\omega 3$ y $\omega 6$ (23.4 a 60.7%), donde el EPA fue el ácido graso más abundante. En un estudio similar, Renaud y colaboradores (1994) encontraron que las clorofitas contienen rangos de proteína que van del 40-66.9% y las diatomeas estudiadas presentan mayores concentraciones de proteínas y lípidos, con menores concentraciones de

carbohidratos. En otro estudio realizado el presente año por Cruz-Cruz y colaboradores, se evaluó el potencial de 2 cepas de microalgas del género *Chaetoceros sp.*, y un protista del género *Schizochytrium sp.*, en el cultivo del rotífero *Brachionus plicatilis*. Estas cepas fueron aisladas de la Bahía de La Paz, en B.C.S., se evaluó su valor nutricional (contenido de proteínas, carbohidratos, lípidos y perfil de ácidos grasos) y se proporcionaron a los rotíferos en tratamientos monoespecíficos y en combinaciones, encontrando los mejores resultados de crecimiento poblacional, con una de las cepas del género *Chaetoceros sp.*, y la combinación de esta con el protista. Adicionalmente, encontraron que las cepas nutricionalmente, contenían altos valores de proteínas y lípidos (265 y 256 mg/g, respectivamente), en especial, el protista *Schizochytrium sp.*

El “agua verde” es otro uso de las algas en la acuicultura. Es una técnica donde se adicionan microalgas en el agua del cultivo de larvas de peces o camarones, para incrementar su supervivencia (Hargreaves, 2013; Neori, 2011; Tamaru *et al.*, 1994). Su nombre proviene de la alta densidad de organismos presentes en el agua que otorgan el color verde intenso. Una de las grandes ventajas en el uso de esta técnica, es la oxigenación del agua en los estanques, debido a la producción fotosintética de las algas (Hargreaves, 2013; Neori, 2011), además pueden servir como alimento natural para los primeros días de desarrollo de sus predadores. *Nannochloropsis sp.*, es una de las microalgas más usadas para esta técnica debido a su tamaño nanoscópico y se ha implementado con éxito en cultivos de larvas de *Seriola rivoliana* (Teles *et al.*, 2017), *Mugil cephalus* (Tamaru *et al.*, 1994), *Penaeus monodon* (Cremen *et al.*, 2007), *Gadus morhua* (Skiftesvik *et al.*, 2003), entre otros.

Unas de las ventajas que ofrece el cultivo de microalgas para el enriquecimiento de rotíferos además de proporcionar una alta calidad de nutrientes, es que en lugar de contaminar el agua de los cultivos, puede llegar a mejorar la calidad de ésta con el debido tratamiento (Roy & Pal, 2015), lo que disminuye los tiempos de recambio. Adicionalmente, es posible aplicar diferentes estrategias de cultivo para mejorar el contenido nutricional de estos organismos como la manipulación de la intensidad de la luz o la temperatura, permiten la modulación de la composición de los lípidos y la consiguiente optimización de

su rendimiento general y productividad. La influencia de la intensidad de la luz en el perfil lipídico de *Pavlova lutheri* mostró que los cultivos cultivados a baja intensidad de luz (9 W/m²) tenían una mayor fracción de EPA y DHA esterificados en clases polares (Guedes *et al.*, 2010).

A pesar de esto, el cultivo masivo de microalgas puede llegar a ser costoso, laborioso y por lo tanto, difícil de obtener suficientes cantidades para mantener los cultivos de rotíferos (Dhert *et al.*, 2001; Kotani *et al.*, 2009).

Esta necesidad se ha intentado suplir mediante la formulación de dietas balanceadas, aceites y uso de materiales más económicos como las levaduras. No obstante, estos métodos pueden ser más contaminantes y los rotíferos enriquecidos deben ser mantenidos a bajas temperaturas (para disminuir su metabolismo) y administrados en un corto periodo de tiempo a sus predadores, de lo contrario, perderán sus reservas rápidamente (Dhert *et al.*, 2001; Li & Olsen, 2015; Lubzens *et al.*, 2001).

2.3. Uso de dietas formuladas en la acuicultura

Desde hace unas décadas, el uso de dietas formuladas en la acuicultura ha ido incrementando de forma rápida, debido a sus múltiples ventajas. Una de ellas es su corto tiempo de acción, generalmente los rotíferos, son enriquecidos de 1-3 horas proporcionando así, altos niveles de proteínas y ácidos grasos esenciales. No obstante, uno de los mayores inconvenientes es la alta contaminación causada por las partículas restantes que no son consumidas provenientes de éstas dietas o aceites en los sistemas acuícolas, causando que sean necesarias mayores tasas de recambio y en algunos casos, mortalidades larvarias por contaminación. Actualmente, éste es uno de los enfoques primarios dentro de la investigación en la larvicultura.

Por otra parte, se han desarrollado dietas específicas para el enriquecimiento de lípidos (ácidos grasos esenciales como DHA, EPA y ARA), proteínas, vitaminas (una muy importante, la vitamina C o ácido ascórbico) (Dhert *et al.*, 2001; Lubzens *et al.*, 2001). Una de las dietas formuladas más utilizadas a nivel mundial, es el SELCO[®], que

proporciona aproximadamente 5.4, 4.4 y 15.6 mg/g de EPA, DHA y ácidos grasos HUFA (n-3). También se encuentran otras dietas complementarias como Proteína-SELCO, Súper-SELCO y Vitamina-SELCO. Por otra parte, Skretting® ha desarrollado durante los últimos años y se ha posicionado como uno de los líderes en alimentación acuícola a nivel mundial. Dos de sus productos más importantes en la larvicultura son Ori-One y Ori-Green; el primero un alimento en polvo basado en una selección de algas para una completa producción de rotíferos y éste ha sido desarrollado para lograr una incorporación y retención nutricional óptima, sin algún otro proceso añadido de enriquecimiento. Este producto contiene 56% de proteínas y 17% de lípidos, además asegura que proporciona 37 mg/g de HUFA (n-3) y un radio de DHA/EPA >5 (<http://www.proaqua.mx/skretting>). Ori-Green por su parte, es un enriquecedor en polvo compuesto por algas y proteínas ricas en ácidos grasos altamente insaturados (HUFA's) para un rápido enriquecimiento (1.5 y 3 horas) de presas vivas. Este alimento está compuesto en un 43% de proteínas y 30% lípidos, aporta 105 mg/g de HUFA (n-3) y un radio de DHA/EPA de 4 (<http://www.proaqua.mx/skretting>).

Hamre (2016) realizó una investigación para conocer los perfiles de nutrientes de diversas especies de *Brachionus* y dietas de rotíferos, dentro de las cuales evaluaron una levadura, dos especies de *Chlorella* una dieta de rotífero (nombre sin especificar), Ori-Green (Skretting, Noruega), Multigain (BIOMAR AS, Dinamarca) y Pimienta Roja (BERNAQUA, Bélgica). Para las 3 últimas dietas, encontraron que la concentración de proteínas es de 43, 12 y 17%, respectivamente. En cuanto al porcentaje de lípidos, Ori-Green contiene un 41%, Multigain 44% y Pimienta Roja 43%. Finalmente los porcentajes de ARA, EPA y DHA (porcentajes de ácidos grasos totales) fueron los siguientes: 1) Ori-Green, 1.5, 4.8 y 24.5, 2) Multigain 0.5, 1.4 y 33.7 y 3) Pimienta Roja 1.3, 2.5 y 28.6, respectivamente (Hamre, 2016).

2.4. Tiempos de enriquecimiento

Se pueden diferenciar dos enfoques para el enriquecimiento de los rotíferos. Primero, el enriquecimiento a corto plazo, el cual suele ser menor a 8 horas y se usan vitaminas o

emulsiones. Es rápido y flexible, sin embargo, en algunos casos se obtienen rotíferos de baja calidad, se pierde una gran cantidad de organismos en las cosechas debido a las altas densidades y su mayor problema es que propicia la contaminación en los cultivos de peces, debido a residuos de las emulsiones usadas para el enriquecimiento. Por otro lado, se encuentran los enriquecimientos a largo plazo, donde se cultivan los rotíferos de acuerdo a una dieta de administración continua de los requerimientos esenciales, con una duración mayor a 24 horas. Logrando así, cambiar la composición química total del rotífero y no únicamente su tracto digestivo, de tal manera que, los nutrientes son más estables y su degradación es más lenta (Dhert *et al.*, 2001; De Wolf *et al.*, 1998; Park *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2009).

Li y Olsen (2015) llevaron a cabo un estudio en donde evaluaron el efecto de la composición dietética del DHA y de los ácidos grasos no altamente insaturados sobre la eficiencia del enriquecimiento del DHA en el fosfolípido del rotífero (*Brachionus Cayman*). Uno de sus objetivos era observar el efecto del tiempo (usando enriquecedores comerciales: Multigain y Selco) en el enriquecimiento sobre los niveles de DHA y la estabilidad del mismo, tomando muestras durante 24 horas, encontrando que los mayores niveles de DHA se encontraron a un tiempo de enriquecimiento de 24 horas permaneciendo estable durante al menos 24 horas más a 10°C en condiciones de abstinencia. También, Barclay y Zeller (1996) analizaron el enriquecimiento de rotíferos mediante el uso de un spray seco de *Schizochytrium sp.*, tras una duración de 8 y 24 horas, encontrando que los niveles de DHA, EPA y ARA eran tres veces mayores que el control en el enriquecimiento a 8 horas, adicionalmente en el enriquecimiento a 24 horas, las concentraciones de EPA y DHA aumentaron significativamente.

3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente las industrias acuícolas en Baja California Sur, usan dietas formuladas comerciales para el potenciamiento de rotíferos, copépodos y *Artemia* que posteriormente son suministrados a larvas de peces, con tiempos de enriquecimientos que van de 90-120 minutos. Actualmente, muy pocos estudios se han centrado en conocer la variación de las concentraciones de nutrientes a través del tiempo entre distintos tratamientos. Por lo tanto, es de gran importancia conocer si el aporte nutricional varía significativamente entre tiempos de enriquecimientos cortos y prolongados con el fin de maximizar la entrada de nutrientes a las larvas de peces.

Por otra parte, el estudio de microalgas nativas, para su uso en dietas para larvicultura impulsará a una diversificación e innovación de los cultivos anexos en México, basándose en sus propios recursos naturales. Esto sin dejar de lado que, en el medio natural, es alimento vivo consumido por los peces presentes en las costas mexicanas que permiten su constante y exitosa producción en la naturaleza. Además, un factor muy importante en la industria acuícola, recae en los costos de producción, ya que el mantenimiento de microalgas no nativas requiere de procesos a bajas temperaturas que incrementan los precios de su fabricación. Mediante el uso de microalgas nativas como fuente de alimento en la larvicultura, las condiciones del cultivo son menos estrictas en cuanto a la temperatura, logrando la producción de grandes volúmenes de microalgas nativas en exteriores, lo que conlleva a reducir grandes porcentajes de los costos de producción en esta área.

4. HIPÓTESIS

Si a un tiempo mayor de enriquecimiento en los rotíferos los nutrientes aumentan, entonces se espera encontrar que la composición bioquímica de los rotíferos enriquecidos con tiempos mayores de 8 horas y mezclas de microalgas, presenten un mayor contenido nutricional reflejado en el análisis proximal y el perfil de ácidos grasos, en comparación con los rotíferos enriquecidos en tiempos menores a 8 horas.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Evaluar el efecto del tiempo en el enriquecimiento de rotíferos *Brachionus plicatilis* con microalgas nativas, tradicionales y enriquecedores comerciales.

5.2. Objetivos particulares

- 5.2.1 Determinar el aporte de proteínas, lípidos y carbohidratos del rotífero *B. plicatilis* enriquecido en diferentes tiempos (0, 1, 2, 4, 8, 12, y 24 horas) con mezclas de microalgas nativas, tradicionales y el enriquecedor Ori-Green.
- 5.2.2 Determinar el perfil de ácidos grasos de rotíferos *B. plicatilis* enriquecidos en diferentes tiempos (0, 1, 2, 4, 8, 12, y 24 horas) con mezclas de microalgas nativas, tradicionales y el enriquecedor Ori-Green.
- 5.2.3 Evaluar la eficiencia nutricional (entendido como la mayor obtención de concentración de nutrientes con el menor uso de recursos) a distintos tiempos de un alimento balanceado (Ori-One) y un enriquecedor comercial (Ori-Green) en el cultivo del rotífero *Brachionus plicatilis*.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Área de trabajo

El experimento se llevó a cabo en el edificio O del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, en el laboratorio de cultivo de rotíferos.

6.2 Cultivo de microalgas

Las cepas de microalgas tradicionales usadas fueron provistas por el Laboratorio de Alimento Vivo del CIBNOR y las especies que se utilizaron para realizar este trabajo fueron: *Chaetoceros muelleri* y *Chaetoceros calcitrans*, con crecimiento en agua de mar natural enriquecida con F/2 (Guillard, 1975) y minerales de silicato a 22 ± 1 °C, con luz artificial constante de 2,500 lux.

Los cultivos de las especies de microalgas nativas, *Chaetoceros sp.* (LPU3) y *Schizochytrium sp.* (LPU1), se iniciaron en un matraz Erlenmeyer estéril de 125 ml que contenía 90 ml de agua de mar de cultivo con medio F/2 y 10 ml de inóculo de microalgas. El cultivo se transfirió luego a un matraz Erlenmeyer de 1 L que contenía 900 ml de agua de mar de cultivo con medio F/2 y 100 ml de inóculo de microalgas. El agua de mar del cultivo, junto con el medio F/2 se esterilizó por autoclave a una presión de 1.02 kg cm⁻² durante 20 min. Después de cinco días, el cultivo se inoculó en una carpa de polietileno de 19 L, previamente desinfectada y llena con agua de mar desinfectada enriquecida con F / 2 y minerales de silicato para la cepa *Chaetoceros sp.*, a 27 ± 1 °C, con luz artificial constante.

6.3 Proceso de desinfección

Para el cultivo de rotíferos se filtró agua de mar (a 5.0 y 1.0 µm), que luego fue depositada en tanques de 250 L. El agua fue recirculada durante 24 horas en este sistema, donde se añadió 1 ml de solución comercial de hipoclorito de sodio por 1 L de agua de mar y se dejó en reposo durante 24 horas. La neutralización posterior del hipoclorito de sodio se realizó con 0.05 g/ml de tiosulfato de sodio, procedimiento que se corroboró con la prueba de ortotoluidina colorimétrica (Ellms & Hauser, 1913).

6.4 Escalamiento

Para escalar el cultivo de rotíferos *Brachionus plicatilis*, se inocularon 200 rot/mL en un matraz Erlenmeyer estéril de 125 ml, suspendidos en 90 ml de agua de mar filtrada y desinfectada. El cultivo fue transferido luego a un matraz Erlenmeyer de 1 L con 900 ml de agua de mar. Para su escalamiento, el cultivo fue inoculado en un garrafón de polietileno de 19 L, previamente desinfectada y llenada con agua de mar desinfectada como se describió previamente. Posteriormente, el cultivo se sembró en los tanques de 250 L, con un volumen de 50 L y éste se aumentó progresivamente, hasta llegar a tener dos tanques con cultivos de rotíferos en un volumen de 200 L en una densidad máxima de 250-300 rot/mL. Los rotíferos durante su escalamiento y mantenimiento fueron alimentados con la microalga *Nannochloropsis sp.*

Los parámetros fisicoquímicos se midieron y mantuvieron de la siguiente manera: temperatura $24^{\circ}\text{C} \pm 0.5$, oxígeno disuelto $5.5-7 \pm 0.8$ mg/L, salinidad de $25-27 \pm 1$ UPS, pH 8 ± 0.2 , luz (1500 ± 200 Lux durante 24 horas) y aireación constante. Los estanques se rotaron y fueron limpiados semanalmente.

6.5 Conteo y medición

Las células de cada especie de microalgas y los rotíferos fueron contados diariamente usando cámara de Neubauer, y aplicando una dilución 1:50 y 1:10, respectivamente. Todos los conteos fueron realizados por triplicado y observados bajo un microscopio óptico.

6.6 Tratamientos

Todos los experimentos fueron llevados a cabo en cubetas de 20 L, con un volumen aproximado de 10 L y 1 millón de rotíferos por unidad experimental (luz y aireación constante). Los parámetros fisicoquímicos fueron los siguientes; temperatura $24^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, salinidad de $27-30 \pm 1$ UPS, pH 8 ± 0.2 y oxígeno disuelto de $5.5-7 \pm 0.8$ mg/L. Cada tratamiento se realizó por triplicado y de manera independiente.

Al iniciar los experimentos, los rotíferos fueron concentrados de los tanques de cultivo mediante el uso de un tamiz con luz de malla de 50 μm , lavados con agua de mar filtrada y

dejados en inanición por al menos 2 horas antes de iniciar los respectivos enriquecimientos, para asegurar que la ingesta de los nutrientes provenía de las dietas proporcionadas. Se tomaron muestras de rotíferos en inanición para llevar a cabo análisis bioquímicos y perfil de ácidos grasos (tiempo 0). Éstos fueron almacenados en un ultracongelador a -80°C hasta su análisis.

6.6.1 Microalgas tradicionales y nativas

Los enriquecimientos de *Brachionus plicatilis* con las microalgas tradicionales, *Chaetoceros muelleri* y *C. calcitrans*, se realizaron de forma mono específica (durante 3 horas) y en combinación (durante 1, 2, 4, 8, 12 y 24 horas) en las unidades experimentales como se mencionó anteriormente.

Por su parte, los enriquecimientos del rotífero con las microalgas nativas, *Schizochytrium sp.* (LPU1) y *Chaetoceros sp.* (LPU3) se llevaron a cabo en una mezcla de las dos especies durante 1, 2, 4, 8, 12 y 24 horas. Cruz-Cruz *et al.*, 2019 presentan el valor nutricional de los rotíferos enriquecidos con dietas mono específicas de estas microalgas nativas.

Cada hora durante las 24 horas de experimento, se monitorearon parámetros fisicoquímicos de cada cubeta con su respectivo tratamiento, manteniendo los valores de los parámetros ya mencionados. Para los tratamientos a 24 horas, se adicionaron 5 L de mezcla de microalgas pasadas las primeras 12 horas.

6.6.2 Alimentos balanceados

Se usaron dos alimentos balanceados comerciales de la marca Skretting®. Ori-One y Ori-Green, el primero es un alimento de uso continuo que ofrece una constante reproducción de los rotíferos y óptima incorporación nutricional sin un proceso de enriquecimiento adicional. El segundo es un concentrado de algas, fito-proteínas y aceites de origen marino ricos en ácidos grasos altamente insaturados (HUFA's) para el enriquecimiento de rotíferos en cultivos de larvas de peces.

Se realizaron seis tratamientos de enriquecimientos con Ori-Green durante los tiempos 1, 2, 4, 8, 12 y 24 horas en unidades experimentales con 1 millón de rotíferos para cada unidad.

De acuerdo a las recomendaciones del fabricante, se utilizaron 0.25 g del enriquecedor por cada millón de rotíferos, el cual se diluyó en 10 L de agua de mar filtrada, para cada tratamiento.

Adicionalmente, se realizaron 4 pruebas de tratamientos en unidades experimentales independientes, de la siguiente manera: 1) rotíferos alimentados 4 veces, cada 6 horas durante 24 horas con Ori-One, posteriormente fueron sometidos a un enriquecimiento durante 90 minutos con Ori-Green, 2) rotíferos enriquecidos directamente durante 90 minutos con Ori-Green, 3) rotíferos alimentados durante 72 horas con raciones cada 6 horas de Ori-One y 4) rotíferos alimentados por 24 horas con 4 raciones cada 6 horas con Ori-One. La preparación de Ori-One se realiza mediante la completa dilución de 0.5 g del concentrado en agua de mar filtrada por cada millón de rotíferos. Se realizaron 3 réplicas independientes de cada tratamiento y se monitorearon los parámetros fisicoquímicos previamente mencionados en cada alimentación para cada tratamiento.

Para la toma de muestras, terminado cada tiempo de enriquecimiento (con las microalgas y con los alimentos balanceados), se filtraron los rotíferos en tamices de 50 μm y se lavaron con agua destilada. Posteriormente se extrajo la mayor cantidad de agua posible de los rotíferos, hasta formar un sólido pastoso el cual se almacenó en tubos rotulados de microcentrífuga Eppendorf de 2 mL y se guardaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su posterior análisis.

6.7 Análisis bioquímicos

Para conocer la concentración de macronutrientes de los rotíferos, se realizaron los siguientes análisis bioquímicos usando la técnica de espectrofotometría en placa (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO): 1) cuantificación de proteínas, 2) composición de carbohidratos, 3) determinación de lípidos y 4) determinación del perfil de ácidos grasos totales. Para realizar estas técnicas, se llevaron a cabo con materia seca, posterior a la liofilización de la muestra de interés. La cuantificación de proteínas se realizó utilizando el método del ácido bicinconínico (BCA) según lo descrito por Brown *et al.*, (1989). La prueba de composición de carbohidratos se llevó a cabo como se describe en Roe *et al.*,

(1949), con antrona. La determinación de los lípidos totales se hizo según lo descrito por Barnes y Blackstock, (1973) con el método de vainillina.

Para determinar el perfil de ácidos grasos totales, el primer paso fue pesar 10 mg de cada muestra y se extrajeron todos los lípidos según lo descrito por Bligh y Dyer, (1959); Folch, (1957), agregando 3 mL de solución Folch (2 partes de cloroformo y 1 de etanol) y homogeneizando con un sonicador digital Branson 2800 por 5 minutos.

Una vez obtenidos los lípidos, se tomó 100 μ L de cada muestra se depositaron en tubos de vidrio de 6 mL y se adicionó 2,3 μ g de estándar interno (ácido graso 23:0), posteriormente se llevó la muestra a evaporación con nitrógeno. Para la transesterificación de ácidos grasos, se agregó 800 μ L de Metanol y ácido sulfúrico (H_2SO_4). Las muestras se llevaron a una placa de calentamiento a 100 °C durante 10 minutos y a continuación se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Los ácidos grasos esterificados con metilo (FAME) que se obtuvieron fueron extraídos con 800 μ L de hexano (C_6H_{12}) y 1.5 mL de agua saturada en hexano. Las muestras se centrifugaron a una velocidad de 1120 G durante 1 min, fueron lavadas 3 veces con agua saturada en hexano, repitiendo el procedimiento de centrifugación. Finalmente se llevaron a temperatura de -80 °C y una vez congelada el agua, se tomó la fracción lipídica y se almacenó en tubos color ámbar de 1 mL con membranas de aluminio.

El perfil de ácidos grasos se determinó con un cromatógrafo de gases Varian CP 3800 con una flama Ionizadora y dos columnas para separar FAME: ZB WAX (Front) (Ref. 7HG-G007-11 Phenomenex) y la columna ZB 5HT (Middle) (Ref. 7HG-G015-02 Phenomenex).

6.8 Análisis estadísticos

Para conocer si existen diferencias significativas entre los tratamientos se realizaron análisis estadísticos mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía (Prueba de Tukey) en el software SigmaPlot 11.0. Los valores estadísticos están indicados en los gráficos.

Para explicar los resultados de los tratamientos (apartados 6.6.), en el software SigmaPlot 11.0 se realizaron graficas que muestran la cinética de las concentraciones de cada uno de

los macronutrientes evaluados (proteínas, carbohidratos y lípidos) y perfil de ácidos grasos (eje Y) en cada tiempo de enriquecimiento evaluado (0, 1, 2, 4, 8, 12 y 24 horas) (eje X).

7. RESULTADOS

Para poder comparar la composición de los macronutrientes que tuvieron los rotíferos *B. plicatilis* al ser enriquecidos con tratamientos monoalgales de (*C. calcitrans* y *C. muelleri*) y un tratamiento mixto de las microalgas previamente mencionadas; se determinó la composición de carbohidratos totales (CHO), proteínas totales (PT) y lípidos totales (LT) cuando estos fueron enriquecidos a un tiempo de 3 horas, teniendo como control el enriquecimiento con el producto comercial Ori-Green; estos resultados se pueden observar en la Tabla 1.

La microalga *C. muelleri* presenta una mayor concentración de macronutrientes (100.93 mg/g de carbohidratos, 450.49 mg/g de proteínas y 143.13 mg/g de lípidos) con relación a *C. calcitrans*, sin embargo solo presentan diferencias significativas en las concentraciones de carbohidratos entre las dos especies. En cuanto al tratamiento mixto, no se encontraron variaciones significativas en cuanto a proteínas, lípidos y carbohidratos y los hallados en los tratamientos monoespecíficos. Para el enriquecedor Ori-Green, se encontró una mayor concentración de lípidos totales (158.52 mg/g) en comparación con el tratamiento mixto y el monoespecifico con *C. muelleri*.

Tabla 1. Análisis proximal de los tratamientos de enriquecimientos mono específicos y mixtos de microalgas tradicionales *Chaetoceros calcitrans* y *C. muelleri* y el tratamiento control con el enriquecedor Ori-Green con un tiempo de enriquecimiento de 3 horas. Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.005$), las letras de superíndice indican los tratamientos que difieren entre sí. Carbohidratos totales (CHO), proteínas totales (PT) y lípidos totales (LT)

	<i>C. muelleri</i>	<i>C. calcitrans</i>	T. Mixto	Ori-Green
CHO	100.93±4.09 ^a	87.61±1.18 ^b	103.45±6.75 ^{ac}	104.90±11.27 ^{ab}
PT	450.49±43.11	407.55±7.26	423.58±4.82	403.88±16.21
LT	143.13±9.41 ^{ac}	104.68±6.44 ^{ab}	121.14±1.17 ^a	158.52±7.63 ^b

En las siguientes Figuras, se muestran las cinéticas de cada macronutriente evaluado (carbohidratos, lípidos y proteínas) para los tratamientos de microalgas tradicionales, nativas y el enriquecedor comercial, sometidos a los tiempos de enriquecimiento durante 24

horas. De esta manera se puede apreciar mejor el cambio en las concentraciones de los nutrientes a través del tiempo y la comparación entre tratamientos.

Se encontró que los niveles de carbohidratos totales en los tratamientos a diferentes tiempos, las mayores concentraciones obtenidas fueron con las microalgas tradicionales y en un periodo de tiempo entre 4 y 12 horas (222.83, 228.35 y 211.03 mg/g, respectivamente) (Figura 1). Por su parte, el enriquecedor Ori-Green obtuvo el segundo mejor desempeño en cuanto a concentraciones de carbohidratos, al tiempo de 1 hora con 185.93 mg/g, sin embargo, a partir de este tiempo, las concentraciones disminuyeron progresivamente. Finalmente, el tratamiento con microalgas nativas fue el que mostró las menores cantidades de carbohidratos en todos los tiempos analizados, una vez se iniciaron los enriquecimientos, el cambio de concentraciones en el tiempo tuvo un comportamiento de crecimiento negativo (hasta las 2 horas) que posteriormente, empezó a crecer llegando a una concentración de 34.94 mg/g a las 24 horas.

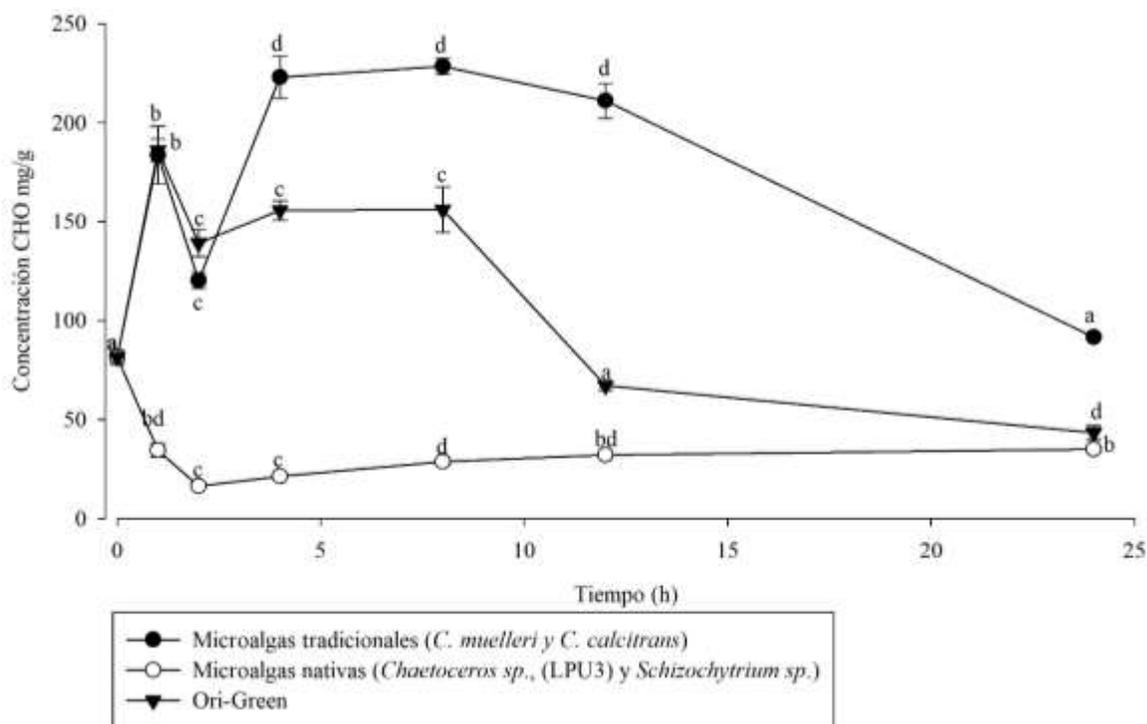


Fig 1. Cinética de las concentraciones de carbohidratos totales (mg/g) del rotífero *B. plicatilis* enriquecido durante los tiempos 0, 1, 2, 4, 8, 12 y 24 horas de los tratamientos

analizados. Se muestra la desviación estándar (barras sobre puntos). Las letras indican las diferencias significativas entre los tiempos de cada tratamiento ($p < 0.005$).

El comportamiento de los lípidos totales en los diferentes tratamientos fue muy variable, en el tratamiento con Ori-Green, se observó un movimiento ondulatorio a través del tiempo. La mayor concentración se obtuvo en el tratamiento del enriquecedor Ori-Green a las 24 horas con 266.07 mg/g y con diferencias significativas estadísticas respecto a los demás tiempos del tratamiento evaluado (Figura 2). La mayor concentración alcanzada por el tratamiento con microalgas tradicionales (*Chaetoceros calcitrans* y *C. muelleri*) fue a las 8 horas con 243.43 mg/g, sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre los tiempos 2, 4, 8, 12 y 24 horas del mismo tratamiento. El tratamiento con microalgas nativas (*Schizochytrium sp.* y *Chaetoceros sp.*, LPU-3), resultó en las menores concentraciones, el tiempo de enriquecimiento menos efectivo con este tratamiento fue a una hora con una concentración de 97.02 mg/g y el mejor tiempo fue a las 24 horas con 136.94 mg/g.

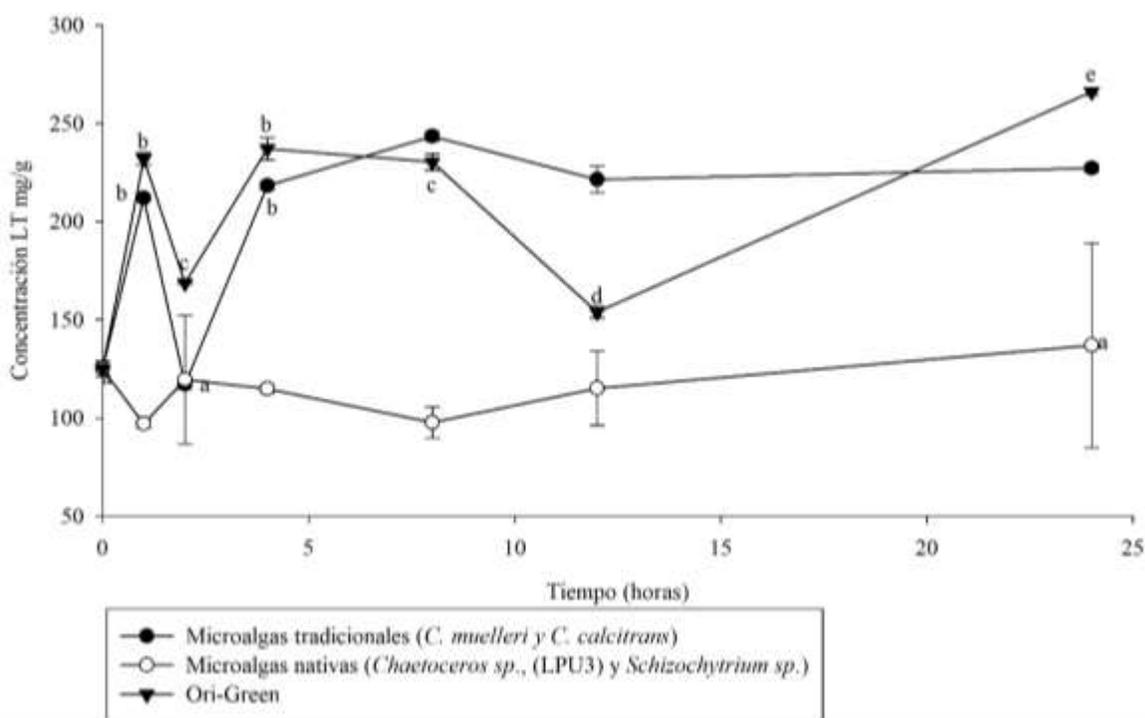


Fig 2. Cinética de las concentraciones de lípidos totales (mg/g) del rotífero *B. plicatilis* enriquecido durante los tiempos 0, 1, 2, 4, 8, 12 y 24 horas de los tratamientos analizados. Se muestra la desviación estándar (barras sobre los puntos). Las letras indican las diferencias significativas entre los tiempos de cada tratamiento ($p < 0.005$).

Finalmente, el cambio en las concentraciones de la cuantificación de proteínas totales se observa en la Figura 3. Se encontró con el tratamiento de microalgas nativas mayor concentración de proteínas totales a las 4 horas con 624.56 mg/g. El mejor tiempo de enriquecimiento con Ori-Green fue a 1 hora con 624.55 mg/g de proteínas totales; encontrando el mismo patrón cuando los rotíferos fueron enriquecidos con *C. muelleri* y *C. calcitrans* (microalgas tradicionales) en el mismo tiempo de enriquecimiento (502.89 mg/g).

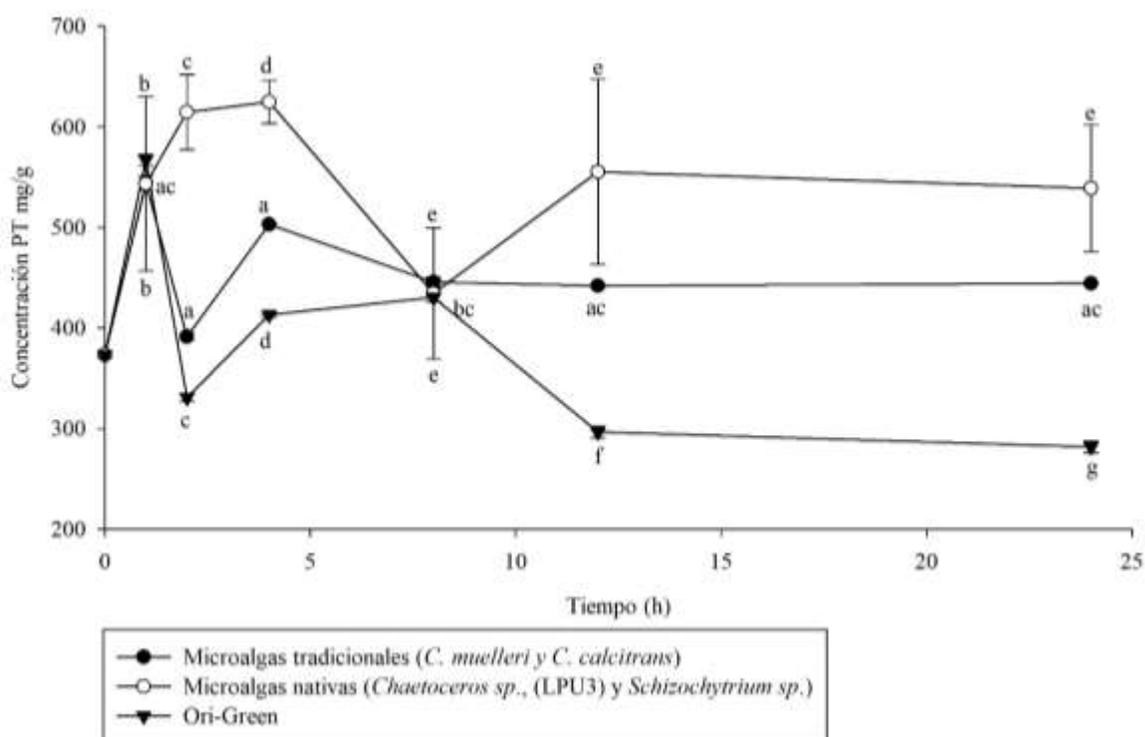


Fig 3. Cinética de las concentraciones de proteínas totales (mg/g) del rotífero *B. plicatilis* enriquecido durante los tiempos 0, 1, 2, 4, 8, 12 y 24 horas de los tratamientos analizados. Se muestra la desviación estándar (barras sobre los puntos). Las letras indican las diferencias significativas entre los tiempos de cada tratamiento ($p < 0.005$).

Posteriormente, determinamos la cantidad de los ácidos grasos saturados (SFA) (Figura 4), monoinsaturados (MUFA's) (Figura 5) y poliinsaturados (PUFA's) (Figura 6) de los rotíferos *B. plicatilis* enriquecidos en diferentes tiempos (0, 1, 2, 4, 8, 12, y 24 horas) con mezclas de microalgas nativas, tradicionales y el enriquecedor Ori-Green.

Los ácidos grasos saturados (SFA, por sus siglas en inglés) o sin dobles enlaces de los 3 tratamientos se muestran en la Figura 4. Los tres tratamientos presentan comportamientos y concentraciones similares a través del tiempo, la mayor concentración alcanzada fue con las microalgas tradicionales *C. muelleri* y *C. calcitrans* a las 24 horas con un porcentaje de 24.96. Se observó un incremento significativo en cuanto al porcentaje SFA en los rotíferos sin enriquecer (14.97%) y los rotíferos enriquecidos con los distintos tratamientos al cabo de 1 hora. El menor porcentaje registrado para los rotíferos post-enriquecimientos, fue con el tratamiento Ori-Green a las 8 horas (19.43%) y el mayor a 2 horas (22.82%). En cuanto al tratamiento las microalgas nativas, con un 21.74% el enriquecimiento tras 24 horas fue la menor concentración obtenida y la mayor se registró a las 4 horas (23.50%). Sin embargo, en los tratamientos no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, exceptuando el control (rotíferos sin enriquecer) y el tiempo 8 horas de los tratamientos con microalgas tradicionales y Ori-Green (Fig 4).

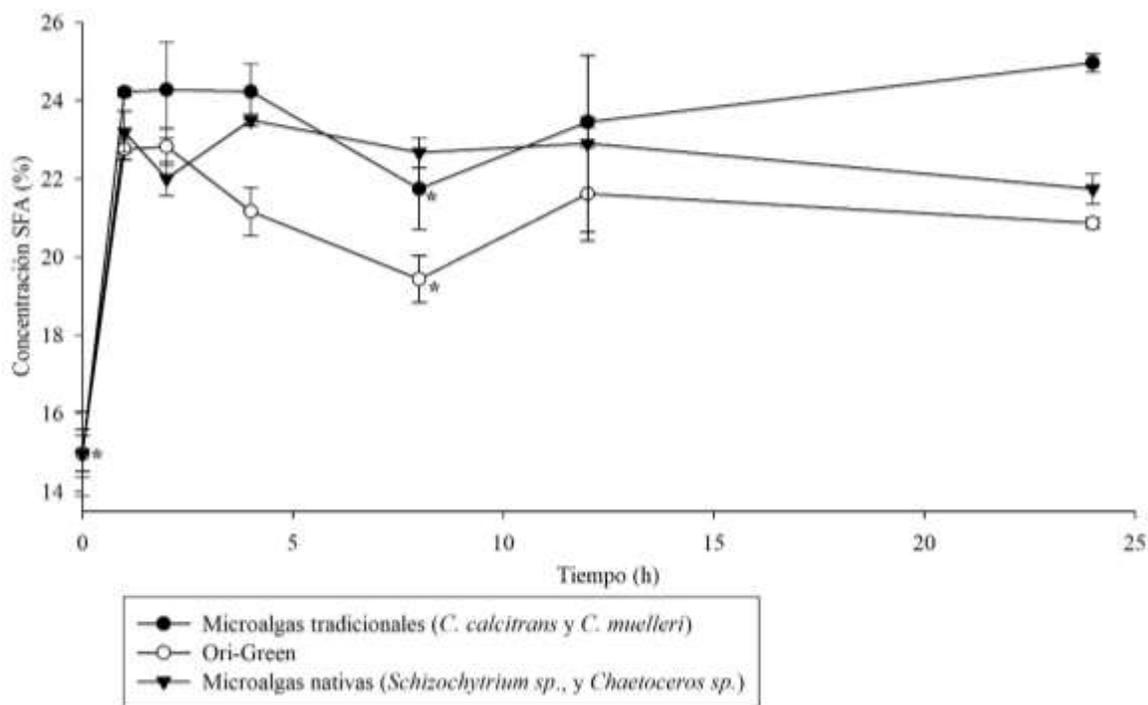


Fig 4. Cinética del perfil de ácidos grasos saturados (SFA) del rotífero *B. plicatilis* enriquecido con los tratamientos a diferentes tiempos. Se muestran las desviaciones estándar (barras sobre puntos) y las diferencias significativas (*) entre tiempos para cada tratamiento.

En relación con los ácidos grasos monoinsaturados (MUFA's) o con un doble enlace, se observó una tendencia similar para los tratamientos (Figura 5), a partir de las 2 horas de enriquecimiento, la concentración empezó a disminuir en los 3 tratamientos, a las 8 horas el bioensayo con microalgas nativas tuvo un crecimiento positivo que después disminuyó (12 h) y volvió a incrementar, resultando en la concentración más alta para MUFA entre los 3 tratamientos con un 35.31%. Por otra parte, tratamiento con el enriquecedor comercial presentó las menores concentraciones de MUFA pasadas las 4 horas de enriquecimiento y el mayor porcentaje alcanzado fue a las 2 horas con 30.04%. Por último, las microalgas tradicionales, aunque tuvieron una mayor concentración de ácidos grasos monoinsaturados durante las primeras 4 horas evaluadas, en comparación con los otros tratamientos, posteriormente presentaron una disminución a las 8 horas, que fue creciendo durante los 2 tiempos consecutivos (12 y 24 horas). Por una pequeña diferencia, la mayor concentración fue en el tiempo 1, con 32.49%.

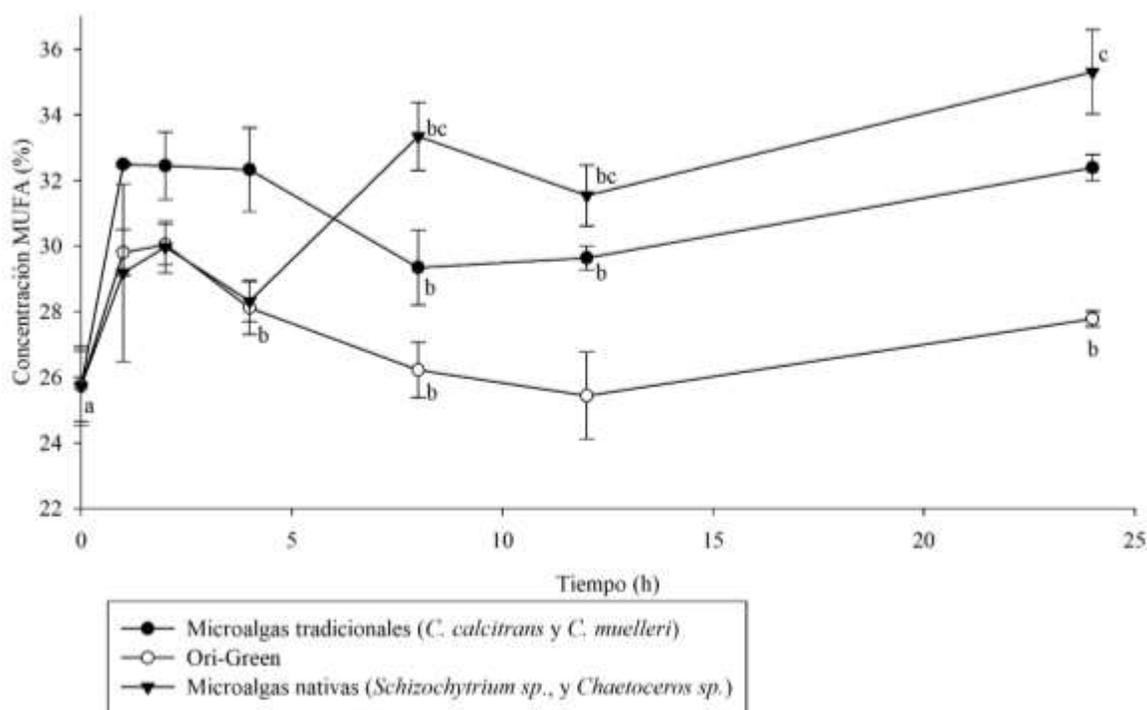


Fig 5. Cinética del perfil de ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) del rotífero *B. plicatilis* enriquecido con los tratamientos a diferentes tiempos. Se muestran las desviaciones estándar (barras sobre puntos) y las diferencias significativas (letras) entre tiempos para cada tratamiento ($p < 0.005$).

Finalmente, los resultados del análisis de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA's) se muestran en la Figura 6. Los tres tratamientos tuvieron concentraciones muy similares. Se observó la efectividad del enriquecimiento en comparación con los rotíferos control, evidenciado en un aumento significativo posterior a una hora de iniciados los enriquecimientos. La mayores concentraciones de PUFA's para cada tratamiento fueron las siguientes: Ori-Green con un tiempo de enriquecimiento de 8 horas y concentración de 51.28%; 45.68% a un tiempo de 8 horas para las microalgas tradicionales y el tiempo de enriquecimiento de 2 horas para sus homologas nativas con 48.01%. También se halló las concentraciones de HUFA's o ácidos grasos altamente insaturados para éste último tratamiento, donde la mayor concentración que se obtuvo fue al tiempo de 24 horas con 20.85% que difería significativamente de los demás tiempos evaluados en este bioensayo. Aquí se observó un crecimiento positivo continuo en la concentración de HUFA's a partir de la hora 4.

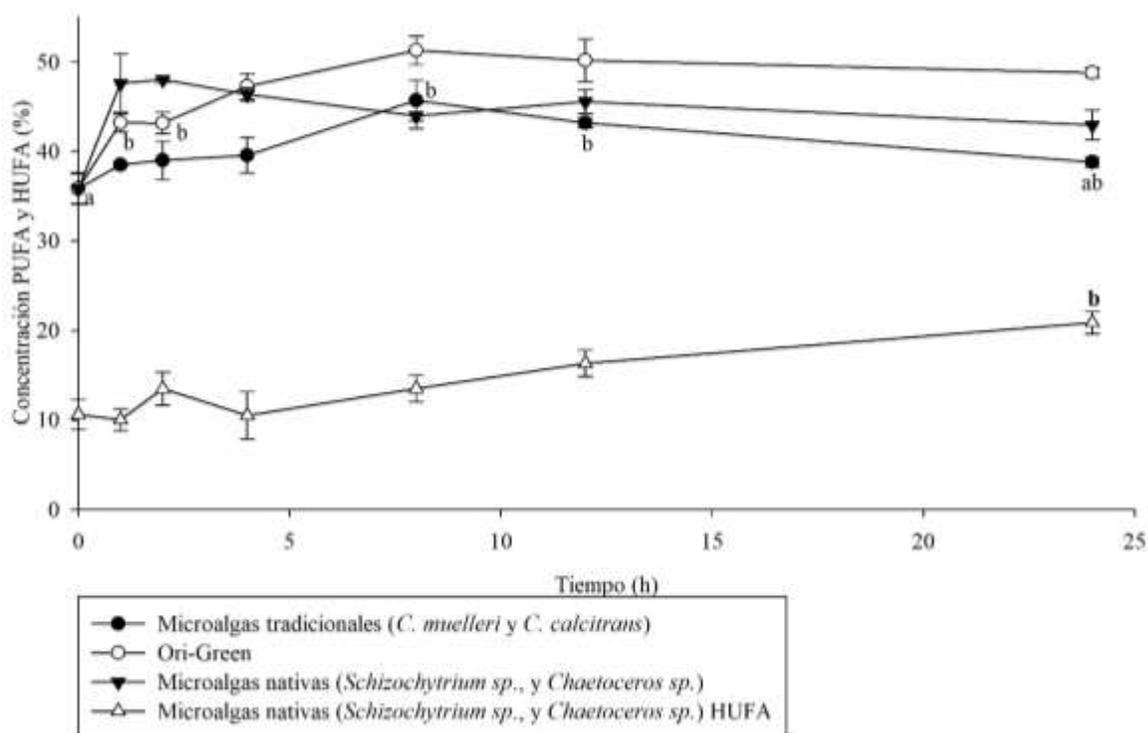


Fig 6. Cinética del perfil de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) y ácidos grasos altamente insaturados del tratamiento con microalgas nativas (HUFA) del rotífero *B. plicatilis* enriquecido a diferentes tiempos. Se muestran las desviaciones estándar (barras

sobre puntos) y las diferencias significativas (letras) entre tiempos para cada tratamiento ($p < 0.005$).

Algunos de los ácidos grasos más importantes dentro de la acuicultura se encuentran en las familias Omega 3 y 6 (Figuras 7 y 8, respectivamente), y éstas son nombradas así por que en cada caso, el primer doble enlace que se presenta en la cadena del ácido graso se encuentra ya sea en la posición 3 o 6. A continuación se mostrarán las gráficas que muestran el cambio de concentraciones en el tiempo para estas familias y sus representantes más importantes (Figuras 9, 10 y 11: DHA, EPA y ARA).

En cuanto a las concentraciones de ácidos grasos ω -3, el tratamiento con Ori-Green fue el que presentó mejores resultados en todos los tiempos evaluados y a las 12 horas se obtuvo el mayor porcentaje con 30.10%. Las microalgas tradicionales a este mismo tiempo horas concentraron 22.05% de ácidos grasos ω -3 y en el caso de microalgas tradicionales a las 24 horas se logró obtener 24.92% de los mismos.

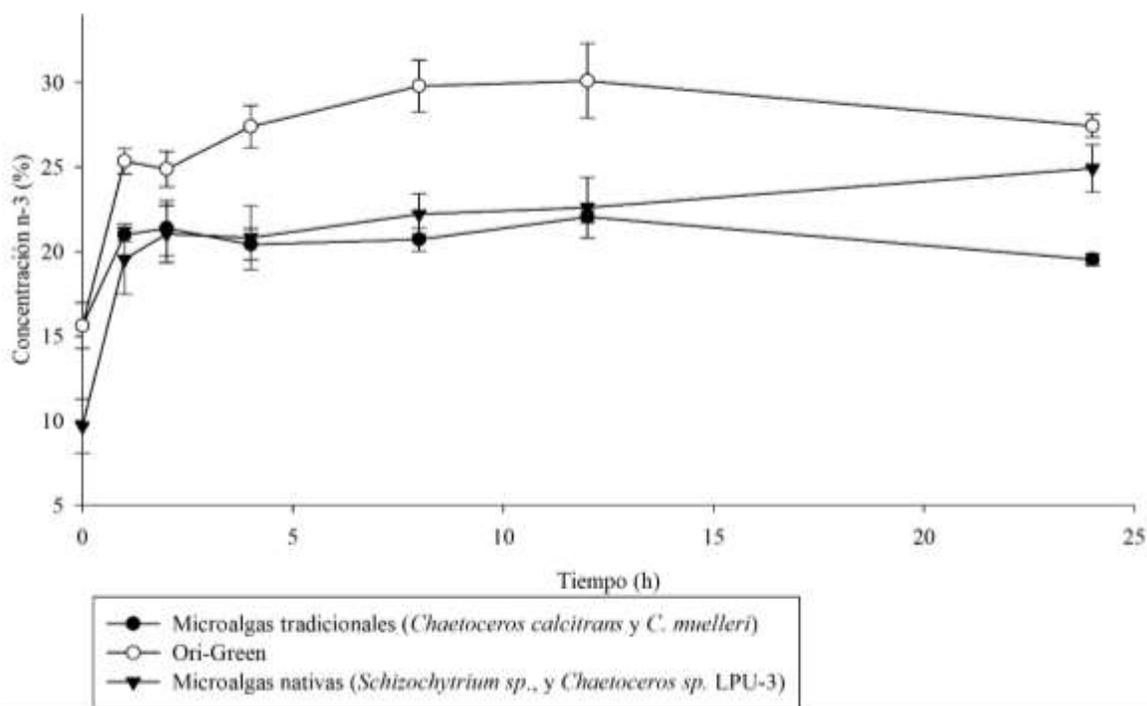


Fig 7. Cinética del perfil de ácidos grasos de la familia Omega 3 en el rotífero *B. plicatilis* enriquecido con los tratamientos a diferentes tiempos. Se muestran las desviaciones estándar y las diferencias significativas (letras) entre tiempos para cada tratamiento ($p < 0.005$).

Los ácidos grasos ω -6 (Figura 8), por su parte, mostraron que las microalgas nativas durante las primeras horas de enriquecimiento presentaron las mejores contracciones entre todos los tratamientos (28.17%), el tratamiento con Ori-Green procedio en cantidades de concentración y la mejor se registró a las 24 horas con 18.52%. Finalmente la mezcla de microalgas tradicionales (*C. calcitrans* y *C. muelleri*) fueron el tratamiento que arrojó menores resultados de ácidos grasos de familia ω -6, y el mayor pico se obtuvo pasadas 8 horas de enriquecimiento con 12.11%

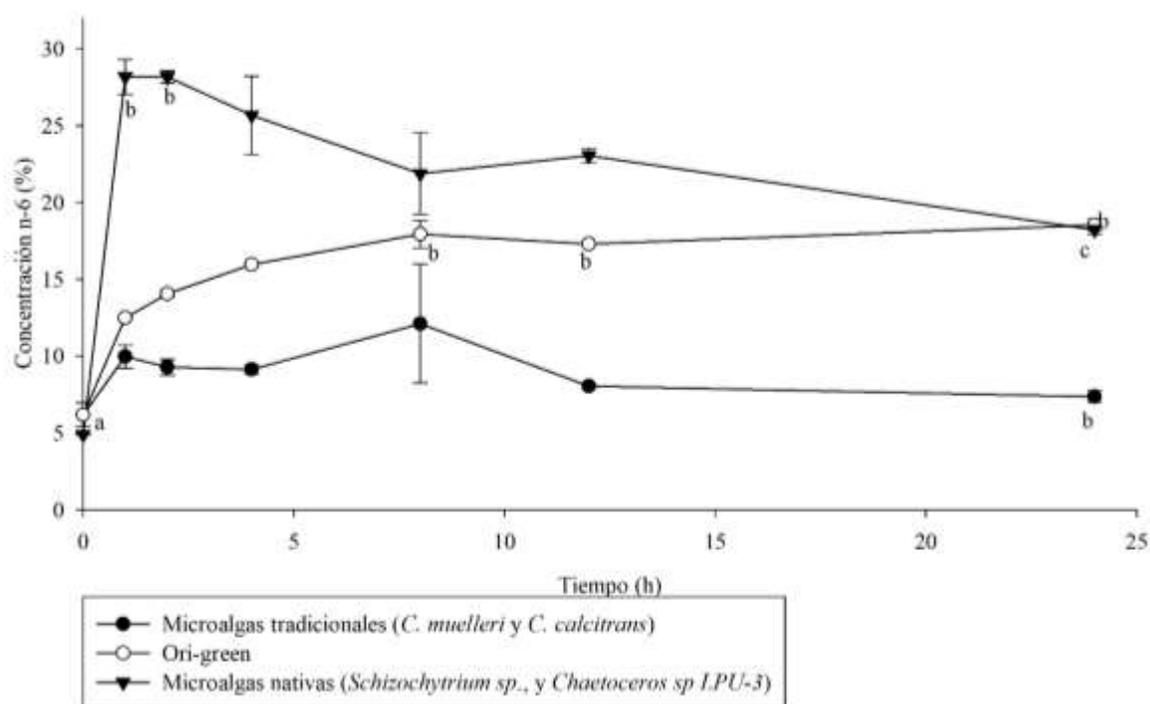


Fig 8. Cinética del perfil de ácidos grasos de la familia Omega 6 en el rotífero *B. plicatilis* enriquecido con los tratamientos a diferentes tiempos. Se muestran las desviaciones estándar y las diferencias significativas (letras) entre tiempos para cada tratamiento ($p < 0.005$).

En las siguientes gráficas (Figuras 9, 10 y 11), se puede observar el comportamiento de las concentraciones de DHA, EPA y ARA a través del tiempo, para cada uno de los tratamientos. El ácido docosahexaenoico o 22:6n-3 (DHA) resultante del bioensayo con Ori-Green fue el que mostró mejores resultados (Figura 9), que se diferenciaron

significativamente, en comparación con las microalgas tanto nativas como tradicionales, llegando a alcanzar 11.43% de la masa seca al tiempo de 8 horas y se mantuvo en 11.22% hasta el tiempo de 24 horas. Por otro lado, los tratamientos con microalgas presentaron concentraciones similares y comportamientos en su cinética, sin embargo las microalgas tradicionales mostraron fueron las que mostraron un menor aumento de DHA post enriquecimiento (1.55% mayor concentración alcanzada a las 12 horas). Las microalgas nativas alcanzaron la máxima concentración al tiempo de 2 horas con 3.14%. En todos los tratamientos se observó un crecimiento positivo en la concentración una vez se iniciaron los enriquecimientos.

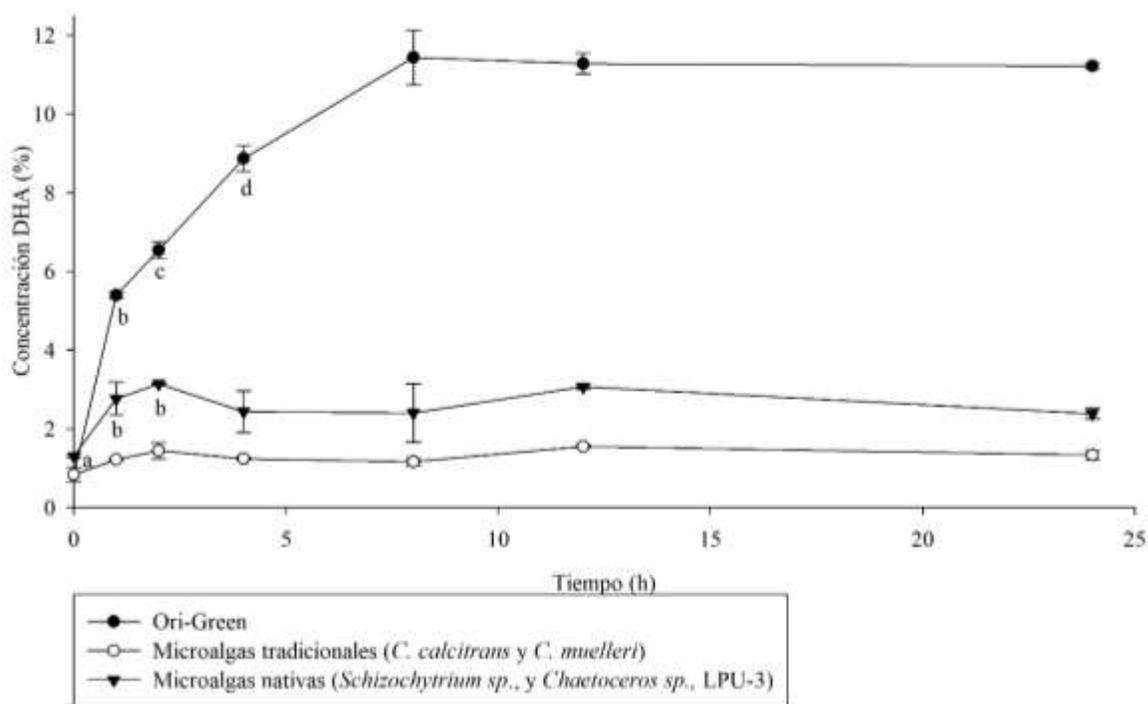


Fig 9. Cinéticas de las concentraciones (%) de DHA en el rotífero *B. plicatilis* enriquecido con los tratamientos a diferentes tiempos. Se muestran las desviaciones estándar y las diferencias significativas (letras) entre tiempos para cada tratamiento ($p < 0.005$).

Por su parte, se encontraron comportamientos interesantes en los resultados del ácido eicosapentaenoico o 20:5n-3. En la Figura 10, se puede evidenciar que los rotíferos enriquecidos con Ori-Green presentaron un cambio negativo en las concentraciones del

EPA después de una hora de iniciado el tratamiento, logrando una concentración máxima de 12.98% (1 hora) y mínima de 6.81% (24 horas). En cuanto al tratamiento con microalgas tradicionales, durante las primeras 4 horas, se evidenció una caída en los niveles de EPA, resultando en un enriquecimiento negativo de este ácido graso. Posteriormente se observó un aumento exponencial alcanzando 13.73% del peso seco a un tiempo de 24 horas, con diferencias estadísticas significativamente en relación a los demás tiempos evaluados dentro del tratamiento. Por último, las microalgas nativas lograron las mayores concentraciones de EPA una vez iniciado el tratamiento. La mayor concentración se obtuvo a las 12 horas con 16.61% y no se hallaron diferencias significativas entre los distintos tiempos del bioensayo, excepto con los rotíferos sin enriquecer (control negativo).

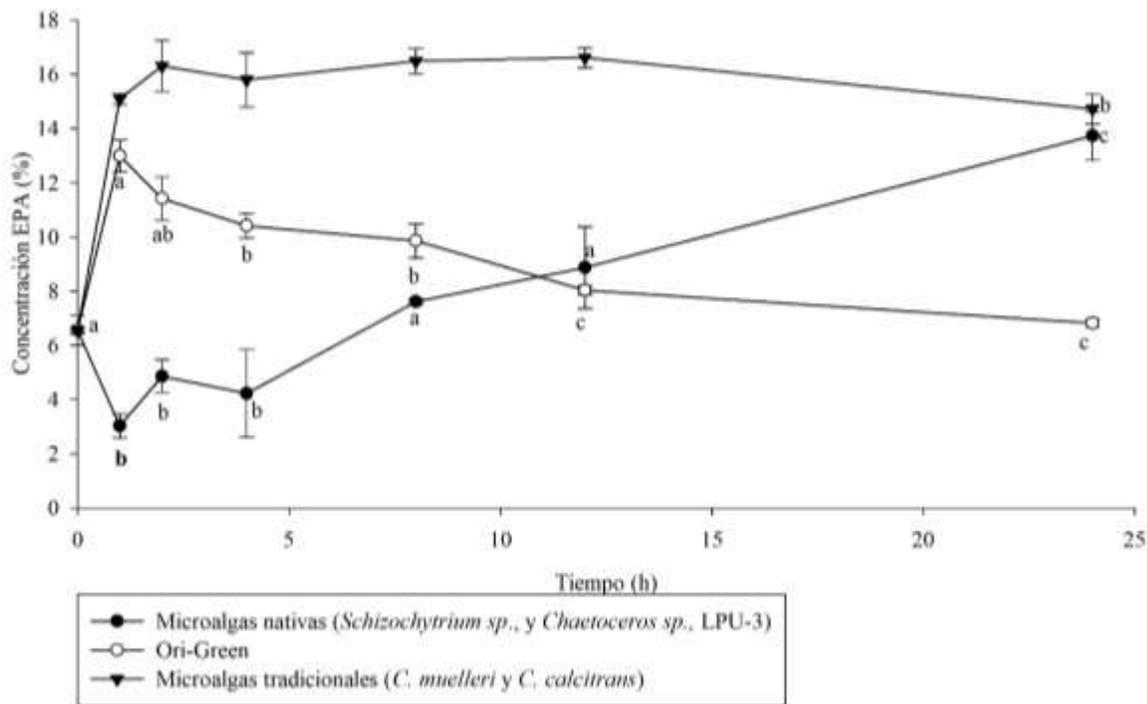


Fig 10. Cinéticas de las concentraciones (%) de EPA en el rotífero *B. plicatilis* enriquecido con los tratamientos a diferentes tiempos. Se muestran las desviaciones estándar y las diferencias significativas (letras) entre tiempos para cada tratamiento ($p < 0.005$).

Los enriquecimientos de los 3 tratamientos usados en relación al ácido araquidónico mostraron un resultado positivo y con diferencias estadísticas significativas respecto a los rotíferos sin enriquecer (Figura 11). Las mejores concentraciones se lograron en las

primeras 2 horas para los 3 tratamientos, posteriormente, la cantidad de ARA disminuyó con el paso del tiempo. Las microalgas nativas lograron la mejor concentración al tiempo de 2 horas (3.64%), seguido de las microalgas tradicionales con 3.44% (tiempo, 1 hora) y finalmente Ori-Green fue el tratamiento que tuvo las menores concentraciones y la mejor concentración fue de 3.09% sobre el peso seco de los rotíferos durante la primera hora de enriquecimiento.

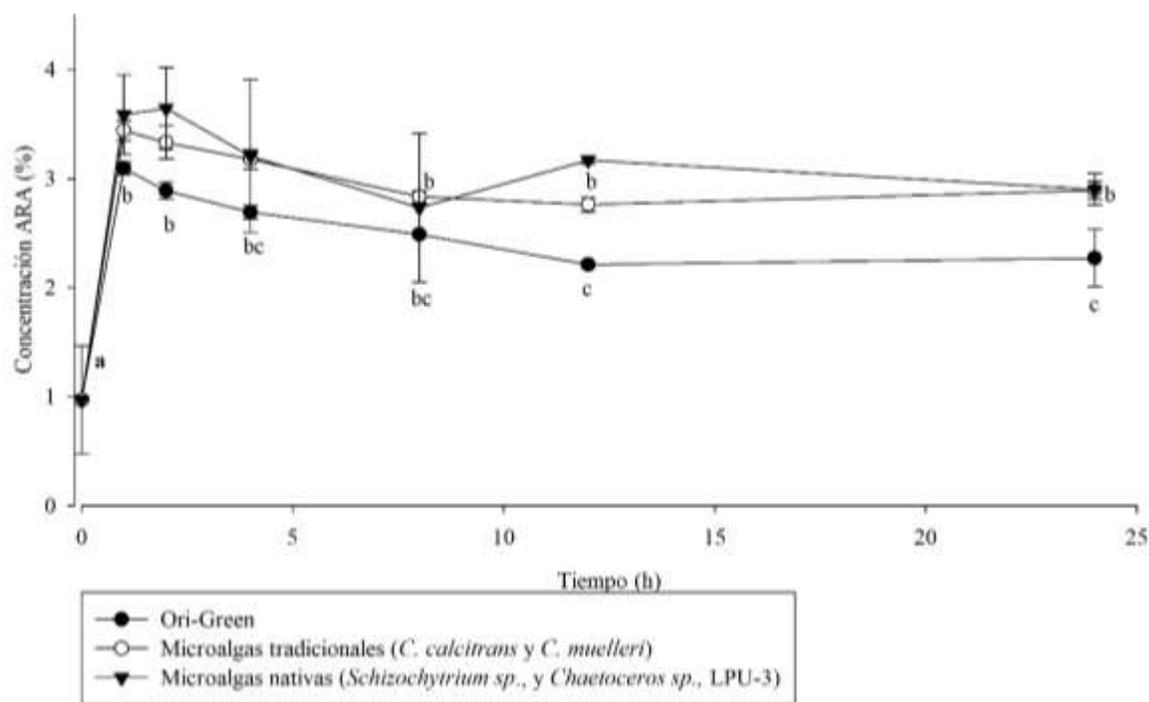


Fig 11. Cinéticas de las concentraciones (%) de ARA en el rotífero *B. plicatilis* enriquecido con los tratamientos a diferentes tiempos. Se muestran las desviaciones estándar y las diferencias significativas (letras) entre tiempos para cada tratamiento ($p < 0.005$).

En la Tabla 2 se muestran otros ácidos grasos de interés acuícola como lo son el ácido linoleico (18:2n-6), el ácido palmitoleico (16:1n-7), el ácido oleico (18:1n-9) y el ácido docosapentaenoico (22:5n-3), quienes mostraron las más altas concentraciones después de los ácidos grasos esenciales anteriormente descritos (DHA, EPA y ARA). El ácido palmitoleico en los tratamientos en los tratamientos de microalgas nativas y Ori-Green mostró una disminución en la concentración una vez empezados los enriquecimientos y con respecto a los rotíferos sin enriquecer. En el caso de las microalgas tradicionales si se

observó un crecimiento en la concentración de éste ácido graso y a las 4 horas se obtuvo 21.34%, aproximadamente 3% arriba de la concentración que presentan rotíferos sin un previo enriquecimiento. En la cinética del ácido oleico se presentó lo contrario al palmitoleico; los tratamientos con microalgas nativas y Ori-Green mostraron un aumento en la concentración a partir de la primera hora de enriquecimiento y en las microalgas tradicionales, disminuyó. El mayor porcentaje fue de 9.92 para microalgas nativas y 9.54 para microalgas tradicionales.

El ácido linoleico presentó un comportamiento similar al oleico. Las microalgas nativas aumentaron significativamente las concentraciones del ácido graso, pasando de un 3.12% en rotíferos sin enriquecer a un 21.50% durante la primera hora de enriquecimiento. En las microalgas tradicionales los porcentajes disminuyeron y el menor valor que se obtuvo fue durante la primera hora con 1.13%. En cuanto al Ori-Green, la concentración se elevó al iniciar el tratamiento y a las 24 horas se registró 12.54% del total de lípidos del peso seco de los rotíferos evaluados.

Finalmente, el DPA (por sus siglas en inglés) o ácido docosapentaenoico aumentó significativamente en algunos de los tiempos evaluados con Ori-Green, registrando una concentración de 6.31% y 5.10% a las 12 y 24 horas, respectivamente. Por su parte, en las microalgas nativas y tradicionales, los niveles de DPA disminuyeron en relación con el contenido de los rotíferos control.

Tabla 2. Porcentajes de los ácidos grasos: palmitoleico (16:1n-7), oleico (18:1n-9), linoleico (18:2n-6), y docosapentaenoico (22:5n-3) para el rotífero *B. plicatilis* enriquecido con microalgas nativas (MN), microalgas tradicionales (MT) y Ori-Green (OG). Se muestran las desviaciones estándar (\pm).

		0	1	2	4	8	12	24
16:1n-7	MN	18.61 \pm 0.0	3.78 \pm 0.1	4.89 \pm 0.4	4.95 \pm 1.0	7.30 \pm 0.3	7.28 \pm 0.9	10.82 \pm 0.2
	MT	18.61 \pm 1.2	19.77 \pm 0.1	20.19 \pm 0.6	21.34 \pm 0.4	19.98 \pm 0.9	18.86 \pm 0.2	20.55 \pm 0.3
	OG	18.61 \pm 1.2	14.77 \pm 0.1	13.66 \pm 0.3	11.80 \pm 0.2	9.73 \pm 0.6	8.10 \pm 0.4	8.56 \pm 0.0
18:1n-9	MN	3.13 \pm 0.0	9.92 \pm 0.2	9.38 \pm 0.0	9.44 \pm 0.4	9.12 \pm 0.0	8.53 \pm 0.2	7.22 \pm 0.5
	MT	3.13 \pm 0.1	2.71 \pm 0.1	2.44 \pm 0.1	2.00 \pm 0.1	1.55 \pm 0.0	1.85 \pm 0.0	1.58 \pm 0.6
	OG	3.13 \pm 0.1	5.42 \pm 0.2	6.42 \pm 0.1	7.37 \pm 0.3	8.18 \pm 0.8	8.90 \pm 0.5	9.54 \pm 0.2
18:2n-6	MN	3.12 \pm 0.0	21.50 \pm 0.7	20.13 \pm 1.5	19.70 \pm 1.6	16.57 \pm 1.5	16.72 \pm 0.4	12.54 \pm 0.1
	MT	3.12 \pm 0.2	1.13 \pm 0.0	2.57 \pm 0.1	2.16 \pm 0.0	1.89 \pm 0.0	1.55 \pm 0.0	1.55 \pm 0.4
	OG	3.12 \pm 0.2	6.41 \pm 0.1	8.32 \pm 0.0	10.41 \pm 0.1	12.47 \pm 1.0	12.64 \pm 0.5	12.84 \pm 0.2
22:5n-3	MN	3.23 \pm 1.4	0.27 \pm 0.0	0.34 \pm 0.0	0.28 \pm 0.1	0.49 \pm 0.0	0.72 \pm 0.1	1.25 \pm 0.1
	MT	3.23 \pm 0.1	3.01 \pm 0.2	2.27 \pm 0.4	1.95 \pm 0.1	1.87 \pm 0.1	2.57 \pm 0.0	2.25 \pm 0.1
	OG	3.23 \pm 0.1	4.13 \pm 0.2	3.59 \pm 0.1	4.02 \pm 0.6	3.94 \pm 1.3	6.31 \pm 1.9	5.10 \pm 0.4

En los análisis realizados al alimento balanceado Ori-One a 72 y 24 horas se encontró una mayor concentración tanto de proteínas (591.84 mg/g) y lípidos totales (96.23 mg/g) en el tratamiento a 24 horas (Tabla 3). En cuanto a los ácidos grasos saturados (SFA) y monoinsaturados (MUFA), las mayores proporciones se encontraron en el tratamiento a 72 horas, sin embargo, lo contrario se encontró en los niveles de PUFA y HUFA donde fueron mayores a 24 horas.

El ratio de ácidos grasos n-3 y n-6 para los tratamientos de 72 y 24 horas fueron 1.238 y 1.722, respectivamente. Y a su vez la proporción de DHA/EPA fue de 1.14 y 2.98 para los tiempos mencionados. Las concentraciones de ácido linoleico, palmítico, oleico y docosapentaenoico se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Análisis proximal y perfil de ácidos grasos del alimento comercial Ori-One de la marca Skretting® en el rotífero *B. plicatilis* alimentados durante 72 y 24 horas. Concentraciones de CHO, PT y LT se dan en mg/g, concentraciones del perfil de ácidos grasos se muestran en porcentaje (%).

	Ori-One 72 h	Ori-One 24 h
CHO	36.831 ±2.944	85.650±6.510
PT	525.848±5.198	591.846±4.054
LT	93.862±1.917	96.253±2.892
ΣSFA	21.751±0.216	17.403±0.404
ΣMUFA	28.266±0.913	21.677±0.221
ΣPUFA	49.983±1.129	60.920±0.183
ΣHUFA	24.396±0.022	31.540±0.102
(n-3)/(n-6)	1.238±0.019	1.722±0.121
22:6/20:5	1.141±0.178	2.980±0.163
20:4/20:5	0.502±0.004	0.420±0.004
16:0	11.591±0.321	11.108±0.260
18:2n-6	14.859±0.859	16.049±0.084
20:4n-6	3.998±0.175	2.615±0.024
22:6n-3	9.046±0.940	18.542±1.037
20:5n-3	7.960±0.419	6.222±0.008

8. DISCUSIÓN

Los resultados bromatológicos del valor nutricional de los rotíferos con los tratamientos monoespecíficos de microalgas tradicionales (Tabla 1), resultaron en valores similares de concentraciones de lípidos en relación con el estudio realizado por Cruz-Cruz y colaboradores (2019). Los rotíferos enriquecidos con la microalga *C. muelleri* presentaron la mayor concentración de lípidos (143.13 mg/g) y de acuerdo al estudio de Cruz-Cruz *et al.*, (2019), los rotíferos alimentados con *Chaetoceros sp.*, (LPU-3) contenían 133.51 mg/g, esto es concordante ya que son diatomeas del mismo género y son ampliamente conocidas en la acuicultura por su alto contenido lípido en relación con otras especies (Brown *et al.*, 1997; Hemaiswarya *et al.*, 2011; Pernet *et al.*, 2003; Roy & Pal, 2015). Adicionalmente, Velasco y colaboradores (2016) encontraron que los porcentajes de proteínas, lípidos y carbohidratos para *C. muelleri* eran de 59%, 31% y 10% y de 40.3%, 23% y 37% para *C. calcitrans*.

En cuanto al enriquecimiento de rotíferos con Ori-Green, éste proporcionó una concentración total de 158.52 mg/g de lípidos totales y 403.88 mg/g de proteínas totales. En el estudio publicado por Mæhre *et al.*, (2013) encontraron concentraciones en rotíferos enriquecidos de 121 mg/g de lípidos totales y 373 mg/g de proteínas, valores similares a los hallados en este trabajo. También realizaron comparaciones con el enriquecedor Multigain que obtuvo valores de 133 y 348 mg/g para lípidos y proteínas, respectivamente. Sin embargo, sus enriquecimientos fueron llevados a cabo en un tiempo de 2 horas y por esta razón puede que sus resultados sean menores en comparación con los nuestros, indicando así la importancia del tiempo en la variación de las concentraciones halladas en los rotíferos enriquecidos.

Las cinéticas de los macronutrientes (proteínas, lípidos y carbohidratos) obtenidos con cada uno de los tratamientos (Figuras 1, 2 y 3), demuestran que las mayores concentraciones son logradas en un rango de 4-12 horas. Sin embargo, para cada macronutriente se obtuvieron los máximos valores con distintos tratamientos. En las cinéticas de carbohidratos totales, la mayor concentración fue lograda a un tiempo de 8 horas con 228.35 mg/g con el tratamiento de mezclas microalgas tradicionales del género *Chaetoceros*. Aunque algunos

autores discuten que los carbohidratos son un componente minoritario en la cadena alimenticia marina (Whyte & Nagata, 1990), bajas concentraciones de este nutriente en alimentos para peces marinos y otros organismos, podrían afectar la síntesis proteica y crecimiento del animal, ya que la proteína proporcionada en la dieta sería usada para satisfacer las demandas energéticas del organismo. Un estudio clásico sobre el entendimiento de las propiedades nutricionales de las microalgas para la maricultura realizado por Brown *et al.*, (1997) muestran como algas pertenecientes a las diatomeas, en general suelen contener un porcentaje de carbohidratos totales que va de un 5-10% de su peso seco y este valor varía dependiendo de las condiciones de cultivo. Sin embargo, este grupo de microalgas almacenan más reservas energéticas en forma de carbohidratos.

Los resultados obtenidos para carbohidratos totales con las microalgas nativas son concordantes con el estudio de Cruz-Cruz y colaboradores (2019), ya que los análisis bromatológicos de éstas, muestran muy bajas concentraciones de este nutriente. La mayor concentración alcanzada por el rotífero *Brachionus plicatilis*, enriquecido en el presente estudio con el tratamiento de la mezcla de microalgas nativas fue a las 24 horas con 35.24 mg/g y Cruz-Cruz (*et al.*, 2019), encontraron que a un tiempo de enriquecimiento de dos horas, los rotíferos en tratamientos monoespecíficos con las microalgas *Chaetoceros sp.*, (LPU-3) y *Schizochytrium sp.*, (LPU-1) resultaron en concentraciones de 33.29 y 0.66 mg/g, respectivamente.

Es notoria la efectividad de los enriquecimientos con Ori-Green y las microalgas tradicionales en cuanto al contenido lipídico. Se puede observar el aumento significativo con dos tratamientos durante la primera hora de enriquecimiento, en comparación con los rotíferos sin enriquecer (tiempo 0). Posterior a esa hora, el patrón de las concentraciones de los lípidos totales para cada tratamiento fue muy variable. Aunque el enriquecedor comercial (Ori-Green) resultó en la mayor concentración (tiempo de 24 horas) los lípidos proporcionados por las microalgas tradicionales fueron muy estables a través del tiempo, después de las 4 horas de enriquecimiento y no presentaron diferencias significativas respecto a Ori-Green en la mayoría de los casos.

García y colaboradores (2008) realizaron un estudio de enriquecimiento de rotíferos con tres tratamientos durante 24 horas, observaron que los rotíferos alimentados con el enriquecedor comercial AlgaMac 2000® contenían 204.3 mg/g de lípidos totales de su masa seca. En comparación con el presente estudio, a 24 horas los rotíferos tratados con Ori-Green y el tratamiento de la mezcla de microalgas tradicionales acumularon 266.07 y 227.24 mg/g de los lípidos totales sobre la masa seca de estos organismos, un valor representativamente alto en contraste con el trabajo en mención. Esto es concordante con lo esperado, ya que el enriquecedor Ori-Green (Skretting®) es un producto pensado en aumentar significativamente el contenido lipídico de los organismos, en especial los ácidos grasos altamente insaturados (HUFA's), que posteriormente alimentarán larvas de peces, (Skretting®).

Maehre y colaboradores (2013), compararon el contenido de nutrientes de enriquecedores comerciales como Multigain y Ori-Green y los rotíferos enriquecidos (durante 2 horas) con estos productos comerciales. El contenido lipídico neto de estos dos enriquecedores fue de 389 y 269 mg/g, respectivamente y los rotíferos sin enriquecer (control) resultaron con una concentración de 107 mg/g. Sin embargo los rotíferos enriquecidos con estos tratamientos, presentaron concentraciones de 133 y 121 mg/g, al menos la mitad de la concentración que proporciona cada uno de los enriquecedores y en contraste con el control no hubo diferencia significativa. Una tendencia similar se aprecia en la Figura 2, donde hay una disminución drástica de las concentraciones de lípidos totales después de la primera hora de enriquecimiento para los tratamientos con Ori-Green y la mezcla de microalgas tradicionales (*C. muelleri* y *C. calcitrans*). No obstante, pasado este tiempo, los niveles de lípidos totales incrementan de nuevo, llegando a alcanzar los valores máximos en cada tratamiento a través de las 24 horas analizadas.

De esto, es importante resaltar dos cosas: 1) la importancia del estudio de la variación de concentraciones de nutrientes respecto al cambio en el tiempo y el tratamiento que se proporciona y, 2) se sugiere que la disminución en la concentración de nutrientes puede ser ocasionado debido a que el rotífero está metabolizando el alimento enriquecedor (factor

intrínseco del organismo), o sucedió una oxidación espontánea en la muestra de los ácidos grasos por el agua presente en la muestra (factor extrínseco).

Por último, dentro de los macronutrientes analizados, las proteínas totales de los rotíferos enriquecidos con los diferentes tratamientos, arrojaron resultados interesantes e importantes para este estudio. Al igual que en las cinéticas de los lípidos y carbohidratos totales se observó una disminución en la concentración de éste nutriente al tiempo de enriquecimiento de dos horas para los tratamientos con Ori-Green y la mezcla de microalgas tradicionales. Todo lo contrario se observa en el tratamiento con las microalgas nativas que además presentó el aporte proteico más alto en un tiempo de 4 horas (Figura 3). Es importante recalcar que el aumento observado en las concentraciones de este tratamiento en el tiempo de 12 horas, es debido a la re administración de alimento, y aunque fue aplicado en todos los 3 tratamientos, en el único que se observa un aumento significativo fue en el de microalgas nativas (*Schizochytrium sp.*, y *Chaetoceros sp.*, LPU-3). Una posible explicación para este caso, sería que los rotíferos asimilaron de manera más eficiente los nutrientes de las algas nativas y éstas indujeron la síntesis proteica, en comparación con los otros dos tratamientos, a pesar de haber presentado composición proximal igual, en relación a las proteínas (Tabla 1).

En el estudio de Cruz-Cruz y colaboradores (2019), los rotíferos enriquecidos con la microalga *Chaetoceros sp.*, (LPU-3) concentraron 300.05 mg/g y 238.10 mg/g con las microalgas *Schizochytrium sp.*, (LPU-1) de manera independiente. La concentración más alta que se registró en el presente estudio, fue a las 4 horas sobrepasando los 600 mg/g de proteínas totales sobre el peso seco de los rotíferos analizados. Barclay & Zeller (1996) encontraron que *Schizochytrium sp.* (spray seco), contenían aproximadamente un 40% de su peso seco en proteínas totales y aunque no se puede realizar una comparación directa debido a los cambios en las unidades de ambos estudios, queda evidenciado el alto contenido de proteínas totales de esta especie de microalga.

Por otra parte, muchos estudios han comprobado que ligeras variaciones en las condiciones de cultivo (en parámetros fisicoquímicos o en dieta) inducen un estado de estrés en las microalgas que pueden llegar a potenciar o inhibir la producción de algunos compuestos

bioquímicos y/o acumulación de metabolitos secundarios (Bae & Hur, 2011; Guedes *et al.*, 2010; Hemaiswarya *et al.*, 2011; Lemus *et al.*, 2006; Pernet *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 1997; Flores, 2008;). Tejas-Álvarez (2017) menciona que ante un estímulo de estrés como el aumento de la intensidad luminosa o el cambio en las longitudes de onda, las microalgas presentan una disminución en sus niveles de carbohidratos y aumentan sus niveles de proteínas, debido a que en la fase luminosa, la maquinaria fotosintética de las microalgas absorbe la luz, se libera O₂ mediante una molécula de agua y se produce NAHDP y ATP. Posteriormente, en la fase oscura, usando esta energía producida, se reduce el CO₂ para formar carbohidratos. Este aumento en el contenido de proteínas, puede estar relacionado al proceso de fotoprotección, concordante con un aumento del proceso de transcripción y traducción.

El perfil de ácidos grasos (Figuras 4, 5 y 6) evidenció la efectividad de cualquier de los enriquecimientos analizados, ya que se observaron aumentos estadísticamente significativos en la composición de ácidos grasos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) y poliinsaturados (PUFA) de los rotíferos alimentados con cada tratamiento, en relación con los rotíferos sin enriquecer (control, tiempo=0).

Empezando con los rotíferos enriquecidos con el tratamiento de microalgas tradicionales (mezcla de *C. muelleri* y *C. calcitrans*), éstos presentaron concentraciones máximas de 25% de SFA (tiempo de enriquecimiento de 24 h), 32.7% de MUFA (tiempo de 1 h) y 45.7% de PUFA (tiempo de 8 horas). En el 2006, Lemus y colaboradores encontraron que las concentraciones de ácidos grasos saturados en un cultivo discontinuo de la microalga *C. muelleri* fue de 47.50%, de 34.80% para ácidos grasos monoinsaturados y 17.70% para poliinsaturados. También, en la tesis de maestría de Flores-Santana (2008), al evaluar el perfil de ácidos grasos de *C. calcitrans*, encontraron porcentajes de 13.80 para SFA, 31.57 para MUFA, 54.57 para PUFA y 34.65 para HUFA. Estos estudios sobre el perfil de ácidos grasos de las microalgas, muestran que los rotíferos aunque si asimilan un cierto porcentaje de ácidos grasos para el mantenimiento de sus funciones vitales, están transfiriendo la mayor proporción de nutrientes que contienen las microalgas usadas en el tratamiento.

Por su parte, las máximas concentraciones de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados para los rotíferos alimentados con las microalgas nativas durante diferentes tiempos fueron 23.50%, 35.31% y 48.02%, respectivamente. En el estudio de Cruz-Cruz (*et al.*, 2019) los rotíferos enriquecidos con la microalga nativa *Schizochytrium sp.*, presentaron porcentajes de 38.05 para ácidos grasos saturados, 38.37 para monoinsaturados y 23.58 para poliinsaturados. Por su parte, el tratamiento de microalga nativa *Chaetoceros sp.*, (LPU-3) aplicado a los rotíferos dio resultados de 36.16, 35.06 y 28.79% para SFA, MUFA y PUFA, respectivamente. En este estudio se observó una mayor insaturación de ácidos grasos en los rotíferos con el tratamiento de microalgas nativas, formándose una mayor cantidad de ácidos grasos de cadena larga y disminuyendo los ácidos grasos sin dobles enlaces (o saturados) en los rotíferos, en comparación con los resultados hallados por Cruz-Cruz. Esto es beneficioso debido a que los ácidos grasos más importantes en las dietas de organismos acuáticos, son los PUFA y HUFA, como se ha mencionado previamente. Es posible que los rotíferos posean algún mecanismo de desaturación y elongación de ácidos grasos de cadena corta para finalmente convertirlos en PUFA's, y este fenómeno también se ha presentado y sugerido en estudios por otros autores (Cruz-Cruz *et al.*, 2019; Srivastava *et al.*, 2006), sin embargo, aún no ha sido comprobado.

Finalmente, las mayores concentraciones registradas de SFA, MUFA y PUFA a distintos tiempos para los rotíferos enriquecidos con Ori-Green fueron de 22.8, 30.0 y 51.3%, respectivamente. Este tratamiento fue el que presentó una mayor concentración de ácidos grasos poliinsaturados dentro de los tres tratamientos evaluados, sin embargo la diferencia en comparación con los rotíferos tratados con la mezcla de microalgas tradicionales fue solo de 4% aproximadamente. Maehre y colaboradores (2013) evidenciaron valores de 517.6 mg/g para los ácidos grasos poliinsaturados con el medio de enriquecimiento Ori-Green y los rotíferos alimentados con éste producto presentaron concentraciones de 336.8 mg/g (PUFA), equivalente a una disminución del 35% de PUFA's, en este caso.

Los ácidos grasos de las familias Omega 3 y 6 son esenciales en las dietas de organismos marinos debido a que éstos no poseen la maquinaria enzimática necesaria para la síntesis de ácidos grasos de cadenas largas. En las gráficas 7 y 8 es posible evidenciar el crecimiento

positivo en la concentración de estos ácidos grasos en cada uno de los tratamientos evaluados, por lo tanto, es posible afirmar que las concentraciones de ácidos grasos como DHA, EPA (pertenecientes a la familia Omega 3) y ARA (de la familia Omega 6), aumentaron significativamente con los tratamientos evaluados. Park y colaboradores (2006), reportan concentraciones muy variables de ácidos grasos n-3 y n-6 en rotíferos enriquecidos a un tiempo de 24 horas y con 4 tratamientos distintos. Uno de ellos es un spray seco de células de *Schizochytrium sp.*, y la sumatoria de los ácidos grasos n-3 resultó en un 22.2% del total del perfil de ácidos grasos. Este resultado es muy similar al encontrado en los rotíferos enriquecidos con la mezcla de microalgas nativas, donde aproximadamente se obtuvo una concentración de 20% al mismo tiempo que el de 24 horas. Sin embargo, este tratamiento presentó su mayor concentración en el tiempo de enriquecimiento de una hora, donde llegó a concentrar 28.2% de ácidos grasos n-3. Es posible que para los tiempos de enriquecimientos posteriores, se produjera una oxidación de los ácidos grasos de esta familia y por lo tanto, ocasionó las disminuciones observadas en sus concentraciones.

Tanto los ácidos grasos de la familia n-3 y n-6 son precursores de moléculas que participan en la composición membranas, la señalización de receptores y la expresión génica. Ácidos grasos de la familia de omegas 6 son importantes reguladores de las funciones celulares con efectos inflamatorios, aterogénicos y protrombóticos. Por su parte, los ácidos grasos n-3 antagonizan los efectos proinflamatorios de los ácidos grasos n-6 (Park *et al.*, 2006). Adicionalmente, el contenido de PUFA n-3/n-6 de las membranas celulares, influyen en la función de la misma y en otros procesos celulares como la apoptosis y la supervivencia de la célula. Debido a esto, es importante mantener cierta proporción constante entre las dos familias de ácidos grasos (Glencross, 2009).

De acuerdo a la literatura, los estados larvarios de peces tienen requerimientos específicos de los ácidos grasos. Dentro de ellos, los más importantes son los poliinsaturados de cadena larga C20 y C22: n-3 y n-6 (Sargent *et al.*, 1999). En particular, el crecimiento de las larvas es estimulado por el DHA o C22:6-3 y esta respuesta se incrementa cuando la dieta larvaria contiene también el EPA (C20:5-3) (Sargent *et al.*, 1999). Además, el ácido araquidónico

(ARA o C20:4-6) también es importante, ya que su presencia en la dieta de peces marinos facilita los procesos de pigmentación y es precursor de eicosanoides (Bell *et al.*, 2003)

Los rotíferos del tratamiento con el enriquecedor Ori-Green concentraron la mayor proporción de DHA y la diferencia fue significativamente mayor entre tiempos y tratamientos. La mayor concentración se registró al tiempo de 8 horas con 11.44% para Ori-Green. Los rotíferos con los tratamientos de mezclas de microalgas tradicionales y nativas mantuvieron sus proporciones de éste ácido graso en 1-1.5% y 2-3%, respectivamente. El DHA juega un rol importante en los fosfolípidos de los tejidos neurales en vertebrados, donde las deficiencias pueden causar problemas en el desarrollo visual del organismo y así disminuir la eficiencia de caza, y por consiguiente el crecimiento y desarrollo de la larva como lo describe Zuo (*et al.*, 2012). Maehre (*et al.*, 2013) reportan concentraciones de DHA en rotíferos enriquecidos con Ori-Green, de 394.2 mg/g y Kotani (*et al.*, 2009) mediante un enriquecimiento a rotíferos con el producto DHA-Protein Selco, lograron concentraciones de 8.52 mg/g sobre el peso seco (tiempo de enriquecimiento, 24 horas).

Jiménez-Valera y Sánchez-Saavedra reportaron altos contenidos de EPA en diatomeas que iban hasta un 39% del peso seco de las microalgas y 3.2% de ARA, este último es similar a los hallados en los rotíferos enriquecidos con los tratamientos analizados. Por otra parte, en el estudio realizado por Hernández-Alarcón (2016), se encontró una concentración máxima de 7.88% para EPA y 5.11% para ARA en rotíferos enriquecidos del género *Brachionus rotundiformis*.

El ácido palmitoleico es importante en las dietas de organismos marinos, incluso dentro de las dietas de animales terrestres, debido a que a partir de este ácido graso, es posible sintetizar ácidos grasos monoinsaturados por medio del mecanismo de desaturación (Glencross, 2009). Además, juega un papel importante en la composición de la membrana lipídica (Jiménez-Valera & Sánchez-Saavedra, 2016). Se pudo observar que los rotíferos tratados con microalgas tradicionales y Ori-Green, poseían cantidades importantes de este ácido graso (Tabla 2). En el caso de las microalgas nativas la mayor concentración se registró a las 24 horas, donde posiblemente fue alcanzada esta concentración mediante el mecanismo de desaturación previamente mencionado.

Tanto el ácido oleico (18:1n-9) como el linoleico (18:2n-6) fueron mayoritariamente concentrados por los rotíferos alimentados con la mezcla de las microalgas nativas. Esto es concordante con los resultados obtenidos para el análisis bromatológico de las microalgas nativas en el estudio de Cruz-Cruz y colaboradores (2019): El ácido linoleico, por su parte, es considerado un ácido graso esencial en la industria de peces marinos, ya que, aunque la mayoría de peces dulceacuícolas tienen la capacidad de sintetizar ácidos grasos de cadenas más largas, como el DHA y EPA, a partir de éste ácido (ALA), los peces marinos no poseen la maquinaria enzimática para llevar a cabo esta elongación. Algunos autores aseveran que la proporción de ácido linoleico y linolenico es muy importante ya que determina la proporción final en los tejidos de DHA: EPA:ARA (Sargent *et al.*, 1999).

Por otro lado, el ácido docosapentaenoico o DPA (22:5n-3) es un ácido graso, también importante dentro de las dietas de peces marinos, ya que es bien conocido que algunos organismos siguen la ruta metabólica LNA→20:3n-3→20:4n-3→EPA→DPA, y 24:5n-3→24:6n-3 a 22:6n-3 (DHA), y de esta manera algunos autores justifican el aumento de las concentraciones de DHA en estudios de enriquecimientos de rotíferos. El DPA en este estudio, fue uno de los ácidos grasos más importantes en concentración (Tabla 2) después del DHA, EPA y ARA, y, para los rotíferos tratados con Ori-Green, se presentaron las mayores concentraciones. De esta manera, es posible sugerir que dichas concentraciones de DHA, pudieron llegar a alcanzarse mediante esta vía metabólica.

Es bien sabido que los rotíferos tienen una rápida tasa de llenado de sus intestinos; pueden llenar sus tractos en un máximo de tiempo de 35 minutos (Baer *et al.*, 2008). Se tiende a pensar que un enriquecimiento a corto plazo (1-3 horas) debería ser suficiente para potenciar el valor nutricional de los rotíferos. Sin embargo, el tracto intestinal de los rotíferos es solo una pequeña parte del volumen total del organismo, por lo que es necesario realizar tiempos de enriquecimiento mayores para que el rotífero pueda cambiar la composición bioquímica de sus tejidos. Se ha evidenciado mediante este estudio que las mejores concentraciones de nutrientes se dieron en un lapso de tiempo de 4-12 horas, y en algunos casos, a 24 horas. Algunos autores discuten que tiempos de enriquecimientos de 8, 16 y 24 horas (Park *et al.*, 2006; García *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2009; Maehre *et al.*,

2013) pueden llegar a ser opciones más eficaces para mejorar la transferencia de nutrientes desde rotíferos hasta larvas de peces u otros organismos marinos.

Finalmente, en la Tabla 3 se pudo evidenciar que no es necesaria la aplicación del alimento Ori-One a los cultivos de rotíferos durante 3 días, según las recomendaciones del fabricante, ya que se obtienen las mismas cantidades de nutrientes y en algunos casos, mayores (proteínas, lípidos y ácidos grasos poliinsaturados), cuando se alimentan los rotíferos durante 24 horas con Ori-One. De esta manera es posible disminuir los costos de producción sobre el cultivo de rotíferos, ya que las cantidades a administrar son menores y en un tercio del tiempo sugerido. Por otro lado, a un tiempo de 24 horas, los rotíferos alimentados con Ori-Green presentaron un mejor perfil nutricional (análisis bromatológico y perfil de ácidos grasos), en comparación con el obtenido para los rotíferos alimentados con Ori-One. Sin embargo, es necesario realizar futuras pruebas en rotíferos alimentados con la combinación de ambos productos para conocer si se produce una potenciación en los nutrientes como se podría esperar.

9. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados encontrados en el presente trabajo, se concluye que la hipótesis es parcialmente aceptada, debido a que se encontraron en la mayoría de los casos, las máximas concentraciones de nutrientes entre los tiempos de enriquecimientos de 4 y 12 horas, y, esto se vio reflejado en los análisis proximales y los perfiles de ácidos grasos de los rotíferos alimentados con cada uno de los tres tratamientos.

Los mejores resultados para lípidos, proteínas, carbohidratos totales y el perfil de ácidos grasos, se obtuvieron en el rotífero *Brachionus plicatilis*, incubado entre 4 y 12 horas.

La mezcla de microalgas nativas (*Schizochytrium sp.*, LPU-1 y *Chaetoceros sp.*, LPU-3), microalgas tradicionales (*C. muelleri* y *C. calcitrans*) y el enriquecedor comercial Ori-Green mostraron las mayores concentraciones para proteínas, carbohidratos y lípidos, respectivamente.

El tratamiento con Ori-Green resultó en una mayor concentración de ácidos grasos de las familias Omega 3, además de DHA y PUFA's, sin embargo el tratamiento con microalgas tradicionales presentó la mayor proporción de ácidos grasos saturados, EPA. La mezcla de microalgas nativas mostró los mejores resultados en cuanto a los ácidos grasos monoinsaturados, omega 6 y ARA.

No se encontraron diferencias significativas entre la alimentación de rotíferos con Ori-One a 24 y 72 horas.

Las microalgas nativas son una excelente opción para ser usadas como alimento de cultivos anexos, ya sean rotíferos o *Artemia*. Mediante este estudio fue posible comprobar a grandes rasgos, que las dos cepas de microalgas endémicas del Pacífico Norte poseen características nutricionales importantes para su uso en la acuicultura, sin dejar de lado que su cultivo representa mayores ventajas en cuanto al costo y la facilidad de producción.

10. RECOMENDACIONES

Se recomienda estudiar el valor nutricional de mezclas de microalgas nativas y microalgas tradicionales usadas en la acuicultura, para conocer si es posible mejorar los perfiles bioquímicos hallados en el presente estudio.

Por otra parte, es necesario que se realice un estudio en el rotífero *Brachionus plicatilis* para conocer si posee algún mecanismo de desaturación y elongación de ácidos grasos. Una opción metodológica puede ser el uso de isotopos radiactivos de Carbono 14.

Además, es necesario realizar a futuro un estudio completo, acerca del costo/beneficio que tendría el uso de mezclas de microalgas (tanto nativas como de uso comercial) en empresas acuícolas de la región y su eficiencia en cultivos larvarios de peces u otros organismos acuícolas marinos.

Finalmente, se recomienda ampliamente al productor, de acuerdo a los resultados obtenidos, la disminución del tiempo de alimentación de rotíferos con el producto comercial Ori-One, por las razones previamente mencionadas.

11. LITERATURA CITADA

- Bae, J.-H., S. B. Hur. 2011. Selection of Suitable Species of *Chlorella*, *Nannochloris*, and *Nannochloropsis* in High- and Low-Temperature Seasons for Mass Culture of the Rotifer *Brachionus plicatilis*. *Fish. Aquat. Sci.* 14(4):323–332.
- Baer, A., C. Langdon, S. Mills, C. Schulz, K. Hamre. 2008. Particle size preference, gut filling and evacuation rates of the rotifer *Brachionus* “*Cayman*” using polystyrene latex beads. *Aquac.* 282:75–82.
- Barclay, W., S. Zeller. 1996. Nutritional Enhancement of n-3 and n-6 Fatty Acids in Rotifers and *Artemia* Nauplii by Feeding Spray-dried *Schizochytrium sp.* *J W Aquac. Soc.* 27(3):314-322.
- Barnes, H., J. Blackstock. 1973. Estimation of lipids in marine animal tissues: detailed investigation of the sulphophosphovanillin method for total lipids. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 12:103-118.
- Baskerville-Bridges, B., L. J. Kling. 2000. Larval culture of Atlantic cod (*Gadus morhua*) at high stocking densities. *Aquac.* 18(1–2):61–69.
- Bell, J.G., L. A. McEvoy, A. Estevez, R. J. Shields, J. R. Sargent. 2003. Optimizing lipid nutrition in first-feeding flatfish larvae. *Aquac.* 227:211 –220
- Bligh, E.G., W. J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 346(37):911-917.
- Brinkmeyer, R. L., G. J. Holt. 1998. Highly unsaturated fatty acids in diets for red drum (*Sciaenops ocellatus*) larvae. *Aquac.* 161(1–4):253–268.
- Brown, R., K. Jarvis, K. Hyland. 1989. Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances. *Anal. Biochem.* 180:136-139.
- Brown, M. R., S. W. Jeffrey, J. K. Volkman, G. A. Dunstan. 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquac.* 151(1–4):315–331.
- Cho, S. H., S. C. Ji, S. B. Hur, J. Bae, I. S. Park, Y. C. Song. 2007. Optimum temperature and salinity conditions for growth of green algae *Chlorella ellipsoidea* and *Nannochloris oculata*. *Fish. Sci.* 73(5):1050–1056.
- Craig, S., L. A. Helfrich. 2009. Understanding Fish Nutrition, Feeds, and Feeding. *Virg. Coop. Ext.* 420:1–4.
- Cremen, M. C. M., M. R. Martinez-Goss, V. L. Corre, R. V. Azanza. 2007. Phytoplankton bloom in commercial shrimp ponds using green-water technology. *J. Appl. Phyc.* 19(6):615–624.

- Cruz-cruz, I., M. Maldonado-García, R. Rebollar-prudente, J. A. Estrada-Godinez, J. M. Pacheco-Vega, M. Cadena-Roa. 2019. Nutritional value and population growth of *Brachionus plicatilis* fed with endemic microalgae from North Pacific. *Lat. Ame. J. Aqua. Res.* 5(1):1–18.
- De-Wolf, T., P. Candreva, M. Dehasque, P. Coutteau. 1998. Intensification of rotifer batch culture using an artificial diet. *Eur. Aqua. Soc., Spec. Publ.* 26:68–69
- Dhert, P., G. Rombaut, G. Suantika, & Sorgeloos, P. 2001. Advancement of rotifer culture and manipulation techniques in Europe. *Aquac.* 200(1–2):129–146.
- Ellms, J. W., S. J. Hauser. 1913. Ortho-Toluidine as a reagent for the colorimetric estimation of small quantities of free chlorine. *Ind. Eng. Chem.* 5(11):915-917.
- Fao, 2012. The state of world fisheries and aquaculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome. En <http://www.fao.org/docrep/016/i2727e/i2727e00.htm>. Consultado el 13 de abril del 2018.
- Ferreira, M., P. Coutinho, P. Seixas, J. Fabregas, A. Otero. 2009 Enriching rotifers with “premium” microalgae. *Nannochloropsis gaditana*. *Mar. Biotech.* 11:585–595.
- Flores-Santana, R. 2008. Variación en el contenido de ácidos grasos del copépodo calanoide *Pseudodiaptomus euryhalinus* (Johnson, 1939) alimentado con las microalgas *Chaetoceros calcitrans* e *Isochrysis galbana*. Maestro en Ciencias. La Paz, B.C.S, México. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.
- Folch, J., M. Lees, G. H. S. Stanley. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226:497–509.
- Garcia, A. S., C. C. Parrish, J. A. Brown. 2008. A comparison among differently enriched rotifers (*Brachionus plicatilis*) and their effect on Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae early growth, survival and lipid composition. *Aquac. Nut.* 14(1):14–30.
- Glencross, B. D. 2009. Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture species. *Rev. Aquac.* 1(2):71–124.
- Graham, L.E., L. W. Wilcox. 2000. *Algae, Introduction to the Algae*. Prentice-Hall Inc., Upper Saddle River. 11-14.
- Guedes, A. C., L. A. Meireles, H. M. Amaro, F. X. Malcata. 2010. Changes in lipid class and fatty acid composition of cultures of *Pavlova lutheri*, in response to light intensity. *J. Ame. O. Chem. Soc.* 87(7):791–801.
- Guillard, R. R. L. 1975. Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. En: Smith, W. L., M. H. Chanley (eds.). *Cultures of marine invertebrate animals*.

Plenum Press, New York, U.S.A. 338p.

- Halver, J., E. Hardy. 2002. Fish Nutrition. Academic Press, San Diego, pp. 331–421.
- Hamlin, H. J., L. J. Kling. 2001. The culture and early weaning of larval haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) using a microparticulate diet. *Aquac.* 201(1–2):61–72.
- Hamre, K. 2016. Nutrient profiles of rotifers (*Brachionus sp.*) and rotifer diets from four different marine fish hatcheries. *Aquac.* 450:136–142.
- Hamza, N., P. Kestemont, I. B. Khemis, M. Mhetli, C. Cahu. 2012. Effect of different sources and levels of dietary phospholipids on performances and fatty acid composition of pikeperch (*Sander lucioperca*) larvae. *Aquac. Nut.* 18(3):249–257.
- Hargreaves, J. 2013. Biofloc Production Systems for Aquaculture. *Sou. Reg. Aquac. Cen.* 45(03):1–12.
- Hemaiswarya, S., R. Raja, R. R. Kumar, V. Ganesan, C. Anbazhagan. 2011. Microalgae: A sustainable feed source for aquaculture. *W. J. Mic. Biotech.* 27(8):1737–1746.
- Hernandez-Alarcon, I. 2016. Efecto de la dieta en la composición de ácidos grasos del alimento vivo utilizado en la crianza larvaria de peces marinos. Maestría en Ciencias. La Paz, B.C.S, México. Instituto Politecnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas.
- Hirayama, K., H. Funamoto. 1983. Supplementary effect of several nutrients on nutritive deficiency of baker's yeast for population growth of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Nip. Sui. Gak.* 49(4):505–510.
- <http://www.proaqua.mx/skretting-alimento-ori-one-bolsa-de-1-5-kg/#>. Fecha de último acceso: julio 22 del 2019, 14:57. © 2019 ProAqua México | Provedora de Insumos Acuícolas, S.A. de C.V.
- Jimenez-Valera, S., M. Sanchez-Saavedra. 2016. Growth and fatty acid profiles of microalgae species isolated from the Baja California Peninsula, Mexico. *Lat. Ame. J. Aqua. Res.* 44(4):689–702.
- Kotani, T., T. Genka, H. Fushimi, M. Hayashi, K. Dierckens, P. Sorgeloos. 2009. Effect of cultivation methods on nutritional enrichment of euryhaline rotifer *Brachionus plicatilis*. *Fish. Sci.* 75(4):975–984.
- Lemus, N., T. Urbano, B. Arredondo-Vega, M. Guevara, A. Vásquez, L. Carreón-Palau, N. Vallejo. 2006. Crecimiento y perfil bioquímico de *Chaetoceros muelleri* cultivada en sistemas discontinuos y semicontinuos. *Cien. Mar.* 32(3):597–603.
- Li, K., Y. Olsen. 2015. Effect of enrichment time and dietary DHA and non-highly

- unsaturated fatty acid composition on the efficiency of DHA enrichment in phospholipid of rotifer (*Brachionus Cayman*). *Aquac.* 446:310–317.
- Lubzens, E., A. Tandler, G. Minkoff. 1989. Rotifers as food in aquaculture. *Hyd.* 186–187(1):387–400.
- Lubzens, E., O. Zamora, Y. Barr. 2001. Biotechnology and aquaculture of rotifers. *Hyd.* 446–447:337–353.
- Mæhre, H. K., K. Hamre, E. O. Elvevoll. 2013. Nutrient evaluation of rotifers and zooplankton: Feed for marine fish larvae. *Aquac. Nut.* 19(3):301–311.
- Neori, A. 2011. “Green water” microalgae: The leading sector in world aquaculture. *J. App. Phy.* 23(1):143–149.
- Olsen, Y., J. O. Evjemo, A. Olsen. 1999. Status of the cultivation technology for production of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) juveniles in Norway/Europe. *Aquac.* 176(1–2):3–13.
- Palazzi, R., J. Richard, G. Bozzato, L. Zanella. 2006. Larval and juvenile rearing of common sole (*Solea solea* L.) in the Northern Adriatic (Italy). *Aquac.* 255(1-4):495–506.
- Park, H.G., V. Puvanendran, A. Kellett, C. C. Parrish, J. A. Brown. 2006. Effect of enriched rotifers on growth, survival, and composition of larval Atlantic cod (*Gadus morhua*). *J. Mar. Sci.* 63:285–295.
- Pernet, F., R. Tremblay, E. Demers, M. Roussy. 2003. Variation of lipid class and fatty acid composition of *Chaetoceros muelleri* and *Isochrysis* sp. grown in a semicontinuous system. *Aquac.* 221(1–4):393–406.
- Puvanendran, V., J. A. Brown. 2002. Foraging, growth and survival of Atlantic cod larvae reared in different light intensities and photoperiods. *Aquac.* 214(1–4):131–151.
- Regunathan, C., S. G. Wesley. 2006. Pigment deficiency correction in shrimp broodstock using *Spirulina* as a carotenoid source. *Aquac. Nut.* 12(6):425–432.
- Renaud, S. M., D. L. Parry, L. V. Thinh. 1994. Microalgae for use in tropical aquaculture I: Gross chemical and fatty acid composition of twelve species of microalgae from the Northern Territory, Australia. *J. App. Phyc.* 6(3):337–345.
- Rodriguez-Rainuzzo, J., Y. Olsen, G. Rosenlund. 1989. The effect of enrichment diets on the fatty acid composition of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Aquac.* 79(1–4):157–161.

- Roe, J.H., J. H. Epstein, N. P. Goldstein. 1949. A photometric method for the determination of inulin in plasma and urine. *J. Biol. Chem.* 178:839-845.
- Roy, S. S., R. Pal. 2015. Microalgae in Aquaculture: A Review with Special References to Nutritional Value and Fish Dietetics. *Proc. Zoo. Soc.* 68(1):1-8.
- Sargent, J., G. Bell, L. McEvoy, D. Tocher, A. Estevez. 1999. Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquac.* 177(1-4):191-199.
- Shields, R. J., J. G. Bell, F. S. Luizi, B. Gara, N. R. Bromage, J. R. Sargent. 1999. Natural copepods are superior to enriched *Artemia* nauplii as feed for Halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus*) in terms of survival, pigmentation and retinal morphology: Relation to dietary essential fatty acids. *J. Nut.* 129(6):1186-1194.
- Skiftesvik, B., H. I. Browman, J. F. St-Pierre. 2003. Life in green water: the effect of microalgae on the behaviour of Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae. *B. F. B.* Jan:97-103.
- Srivastava, A., K. Hamre, J. Stoss, R. Chakrabarti, S. K. Tonheim. 2006. Protein content and amino acid composition of the live feed rotifer (*Brachionus plicatilis*): With emphasis on the water soluble fraction. *Aquac.* 254(1-4):534-543.
- Tamaru, C. S., R. Murashige, C. S. Lee. 1994. The paradox of using background phytoplankton during the larval culture of striped mullet, *Mugil cephalus* L. *Aquac.* 119(2-3):167-174.
- Tejas-Alvares, H. 2017. Modificación del contenido bioquímico (carbohidratos, lípidos, proteínas) y del perfil de ácidos grasos, en dos especies de microalgas, mediante el empleo de luz monocromática producida con ledes en fotobiorreactores de flujo semi-continuo. Maestría en Ciencias. La Paz, B.C.S., México. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.
- Teles, A., J. Salas-Leiva, C. A. Alvarez-González, E. Gisbert, L. Ibarra-Castro, J. C. Perez-Urbiola, D. Tovar-Ramírez. 2017. Histological study of the gastrointestinal tract in longfin yellowtail (*Seriola rivoliana*) larvae. *F. Phys. Biochem.* 43(6):1613-1628.
- Velasco, L. A., S. Carrera, J. Barros. 2016. Isolation, culture and evaluation of *Chaetoceros muelleri* from the Caribbean as food for the native scallops, *Argopecten nucleus* and *Nodipecten nodosus*. *Lat. Ame. J. Aqua. Res.* 44(3):557-568.
- Vivanco, G., D. Oliva, A. Abarca. 2014. Efecto de dietas en base a microalgas tradicionales, nativas y dietas artificiales sobre el crecimiento y supervivencia en larvas velígeras de la almeja taquilla, *Mulinia edulis*. *Rev. Biol. Mar. Ocea.* 49(2):339-349.
- Watanabe, T., T. Tamiya, A. Oka, M. Hirata, C. Kitajima, S. Fujita. 1983. Improvement of

- Dietary Value of Live Foods for Fish Larvae by Feeding Them on ω 3 Highly Unsaturated Fatty Acids and Fat-soluble Vitamins. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 49(3):471–479.
- Whyte, J. N. C., W. D. Nagata. 1990. Carbohydrate and fatty acid composition of the rotifer, *Brachionus plicatilis*, fed monospecific diets of yeast or phytoplankton. *Aquac.* 89(3–4):263–272.
- Wikfors, G. H. 2004. Live Feeds in Marine Aquaculture. *J. Phyc.* 40(5):999–1000.
- Yin, X. W., W. W. Min, H. J. Lin, W. Chen. 2013. Population dynamics, protein content, and lipid composition of *Brachionus plicatilis* fed artificial macroalgal detritus and *Nannochloropsis* sp. diets. *Aquac.* 380–383:62–69.
- Yúfera, M., M. Darias. 2007. The onset of exogenous feeding in marine fish larvae. *Aquac.* 268 (1–4):53–63.
- Yúfera, M., C. Fernández-Díaz, E. Pascual. 2005. Food microparticles for larval fish prepared by internal gelation. *Aquac.* 248(1–4):253–262.
- Zitteli, G. C., F. Lavista, A. Bastianini, L. Rodolfi, M. Vincenzini, M. R. Tredici. 1999. Production of eicosapentaenoic acid by *Nannochloropsis* sp., cultures in outdoor tubular photobioreactors. *J. Biotech.* 70:299–312.
- Zuo, R., Q. Ai, K. Mai, W. Xu, J. Wang, H. Xu, Y. Zhang. 2012. Effects of dietary docosahexaenoic to eicosapentaenoic acid ratio (DHA/EPA) on growth, nonspecific immunity, expression of some immune related genes and disease resistance of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) following natural infestation of parasites (*Cryptocaryon irritans*). *Aquac.* 334–337:101–109.