



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

Programa de Estudios de Posgrado

**VARIACIÓN EN EL CONTENIDO DE ÁCIDOS GRASOS  
DEL COPÉPODO CALANOIDE *Pseudodiaptomus euryhalinus*  
(JOHNSON, 1939) ALIMENTADO CON LAS MICROALGAS  
*Chaetoceros calcitrans* E *Isochrysis galbana*.**

## **TESIS**

Que para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias**

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

Presenta

**Ricardo Ernesto Flores Santana**

La Paz, Baja California Sur, Agosto de 2008

## ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12 horas del día 20 del Mes de Agosto del 2008, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

**Variación en el contenido de ácidos grasos del copépodo calanoide *Pseudodiaptomus euryhalinus* (Johnson, 1939) alimentado con las microalgas *Chaetoceros calcitrans* e *Isochrysis galbana*.**

Presentada por el alumno:

**Ricardo Ernesto Flores Santana**

---

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN ACUICULTURA

---

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

### LA COMISION REVISORA

---

**Dr. Arturo Muhlia Melo**

---

**Dra. Concepción Lora Vilchis**

---

**cDr. Juan Carlos Pérez Urbiola**

---

**M. en C. Ricardo Palomares García**

---

**DRA. THELMA ROSA CASTELLANOS CERVANTES,  
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

## **COMITÉ TUTORIAL Y REVISOR**

Dr. Arturo Muhlia Melo

Director de tesis

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., La Paz, B.C.S.

Dra. Concepción Lora Vilchis

Co-Tutor

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., La Paz, B.C.S.

cDr. Juan Carlos Pérez Urbiola

Co-Tutor

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., La Paz, B.C.S.

M. en C. Ricardo Palomares García

Co-Tutor

Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, IPN, La Paz, B.C.S.

## **MIEMBROS DEL JURADO DE LA DEFENSA DE TESIS**

Dr. Arturo Muhlia Melo

cDr. Juan Carlos Pérez Urbiola

M. en C. Ricardo Palomares García

Dra. Celia Vázquez (Suplente)

## RESUMEN

El efecto de tres dietas basadas en las microalgas *Chaetoceros calcitrans* e *Isochrysis galbana* sobre el comportamiento poblacional, la composición bioquímica y la concentración de ácidos grasos del copépodo calanoide *Pseudodiaptomus euryhalinus* en cultivos a temperatura de  $26 \pm 2$  °C y  $35 \pm 1$  UPS de salinidad, fue investigado. Dietas unialgales de las microalgas *C. calcitrans* (Tratamiento 1), *I. galbana* (Tratamiento 2) y una mezcla en partes iguales de ambas (Tratamiento 3) fueron suministradas durante 27 días a los copépodos en tanques de 88 l. Cada 24 horas se tomaron muestras para determinar el número total de organismos en los intervalos de talla siguientes: 50 a 100  $\mu\text{m}$ , 100 a 200  $\mu\text{m}$ , 200 a 300  $\mu\text{m}$  y 300  $\mu\text{m}$  o más. Los muestreos poblacionales mostraron una tendencia consistente a una mayor producción de copépodos en el T3, con un promedio de  $1136 \pm 406$  cop/día, seguido del T1 con  $893 \pm 290$  cop/día y del T2 con  $785 \pm 327$  cop/día. El contenido de carbohidratos y proteínas totales en los copépodos incrementó en forma gradual en todos los tratamientos en relación con la talla excepto en los organismos del cuarto intervalo de talla (300  $\mu\text{m}$  o más) en los que se invirtió. Esto coincide con el periodo de reproducción de los copépodos y la formación de los sacos ovígeros en las hembras. El análisis de ácidos grasos realizado a las microalgas mostró diferencias muy marcadas entre ambas, indicando que *Isochrysis galbana* tiene una concentración significativamente superior de los ácidos grasos linoleico (LA), linolénico (LNA) y docosahexaenoico (DHA) respecto a *C. calcitrans* y esta a su vez es superior en los ácidos grasos araquidónico (ARA) y eicosapentaenoico (EPA). Estas diferencias fueron proporcionales en los copépodos alimentados con los tres tratamientos, sugiriendo una marcada tendencia a asimilar los ácidos grasos en su forma libre y a tener una baja o nula síntesis de ácidos grasos esenciales a partir de sus precursores metabólicos.

**Palabras clave:** Copépodo calanoide, composición bioquímica, ácidos grasos esenciales.

---

Vo.Bo. Dr. Arturo Muhlia Melo

(Director de tesis)

## ABSTRACT

The effect of three diets based in *Chaetoceros calcitrans* & *Isochrysis galbana* microalgae over the population behavior, biochemical composition and fatty acid concentration of the calanoid copepod *Pseudodiaptomus euryhalinus* grown at  $26 \pm 2$  °C &  $35 \pm 1$  UPS was evaluated. Unialgal diets of *C. calcitrans* (Treatment 1), *I. galbana* (Treatment 2) and a balanced mixture of both (Treatment 3) were provided for 27 days to the copepods in 88 l tanks. Samples were taken every 24 hours to determine the total number of organisms in the four size intervals: 50 to 100  $\mu\text{m}$ , 100 to 200  $\mu\text{m}$ , 200 to 300  $\mu\text{m}$  y 300  $\mu\text{m}$  or more. Population monitoring showed a consistent tendency to a higher copepod production in T3, with an average production of  $1136 \pm 406$  cop/day, followed by T1 with  $893 \pm 290$  cop/day and T2 at last with  $785 \pm 327$  cop/day. The total carbohydrate and lipid contents in copepods increased gradually in every size interval and in all treatments, except for the fourth size interval (300  $\mu\text{m}$  or more) where this tendency reverted. This is coincident with the beginning of the mating age in copepods and the formation of egg-sacs in female copepods. Fatty acid analysis delivered in both microalgae showed marked differences, indicating that *I. galbana* has a significantly higher concentration of linoleic acid (LA), linolenic acid (LNA) and docosahexaenoic acid (DHA) compared to *C. calcitrans*, which is superior in arachidonic acid (ARA) and eicosapentaenoic acid (EPA). These differences were proportional between copepods fed the three diets, suggesting a marked tendency towards fatty acid assimilation in its free form and a low or none essential fatty acid synthesis from their metabolic precursors.

**Key words:** Calanoid copepods, biochemical composition, essential fatty acids.

---

Dr. Arturo Muhlia Melo

## DEDICATORIA

*A mi familia*

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT, por la beca otorgada para realizar esta tesis y a las autoridades del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., en particular a la Dirección de Posgrado del centro.

A mi director de tesis: Dr. Arturo Muhlia, quien me dio todo su apoyo y amistad, y estuvo pendiente de lo que hiciera falta en mi vida académica y personal, muchas gracias doc por hacer esto posible.

A mi comité tutorial:

A la Dra. Cony Lora por su gran profesionalismo, amistad y el inmenso apoyo para culminar el trabajo de laboratorio analítico y escrito de tesis.

Al cDr. Juan Carlos Pérez, sin cuya asesoría en el diseño experimental, mantenimiento de los cultivos y logística dentro del laboratorio húmedo no hubiera sido posible la realización de esta tesis, y sobre todo, por brindarme siempre su ayuda incondicional bajo cualquier circunstancia. Muchísimas gracias por todo Juan, eres mi ejemplo a seguir.

Al M. en C. Ricardo Palomares, quien identificó los copéodos al inicio de los estudios y siempre estuvo pendiente de la realización del trabajo de tesis hasta el final.

Al personal de los laboratorios analíticos de CIBNOR, con quienes tuve el privilegio de trabajar.

A Laura Carreon, Jorge del Angel y Trini (Biotecnología de Microalgas), Armando Monge (Ecofisiología de Organismos Acuáticos), Cynthia, Adriana y Julián (Lab. de Microalgas), Roberto y Diana Carreño (Bioquímica Fisiológica), Carmen, Alma y Eulalia (Histología e Histoquímica), a Jorge Angulo (Lab. Húmedo de Bioensayos), a Paco y Erick (Pigmentos), a Horacio Sandoval y Manuel Melero (Lab. de Cómputo de Posgrado), a Ana María Talamantes, Tony y Susana (Biblioteca).

Y mil millones de gracias a Itzel Alejandra Sánchez Tapia por maltratar a mis copéodos... (mentirita) quiero decir, por cuidarlos diligentemente cuando yo no pude. Esta tesis no sería lo mismo sin tu ayuda y amistad, Gracias amiga!.

A mis padres, quienes una vez más fueron mi ejemplo, inspiración y fortaleza, y sobre todo por dejarme partir buscando un sueño cuando supieron que era mi momento.

A mis hermanos Delia y Pepe, que han sabido ser mis hermanos, amigos, compinches, confidentes y hasta dudosas buenas influencias..., pero sobre todo porque nunca me dejaron solo cuando más los necesité. Los quiero gorditos y hoy este logro es de los tres.

A mi tía chilo, por querer taanto a este su sobrino mushin y a Odilí, a quien nunca olvidaré.

A mi grandiosa familia, porque siempre han estado a mi lado en cada paso que he dado y ahora comparten esta alegría conmigo.

A mi flaquita: Laura, te quiero mucho linda, y gracias por darme tanta felicidad, es una bendición tenerte en mi vida (y gracias a Itzel que lo hizo posible).

A Martha y Leonardo, grandes maestros y amigos que supieron ganarse mi cariño.

A la manita (Sandra) por su gran corazón y por tener la puerta de su casa abierta cuando más hizo falta, a Luisillo, Alejandra Vázquez, Zoraida Mora y claro, a Christian y al Beto, compañeros del karate, pachangas, y de lo que saliera. A Iván, por tanto cariño y confianza.

A la gran cantidad de amigos que han tocado mi vida. Mis compañeros de generación: Luzali, Laura, Perla, Mara, AnaBelia, Érika, Lucía, Verónica, Crisalejandra, Pedro, Fercho, Mauricio, Mario, Oscar (el doc), Jorge, Hugo, Keni, Yossef, Jose Pablo, Bonji, Rigo y Christian. A Max Ostendorf, cuate como pocos.

A mis amigos de Nicaragua, pero muy en especial a mi prix Christopher, a quien nunca le faltó una palabra de aliento para mí en los momentos oportunos y a quien le debo una doble mención... (él sabe porqué), a mi querida Aurita, con quien no pude estar en los buenos y malos tiempos, a Marlon, un amigo invariablemente incondicional sin importar hacia donde sople el viento, a Mayela por estar tan cerca cuando yo me sentía más lejos, a Dora Luz, la mejor prima que un primo pudiera desear (y mi favorita), a mis chicas del Calasanz: Karlita, Débora, Brenda y Claudia, a los cuates Oscar, Hugo y Carlos “el black”, a Meche (tan cerca de mi corazón y tan lejos de Nicaragua), Verita y Cony (las pierdo de vista, pero olvidarlas jamás), Sergio, Gustavo, Sumaya y a Lídice, quien no deja de sorprenderme.

Y a Verito.

## INDICE GENERAL

<b>I. Introducción</b> .....	1
<b>I.2. Antecedentes</b> .....	5
<b>I.3. Planteamiento del problema</b> .....	7
<b>I.4. Hipótesis</b> .....	8
<b>I.5. Objetivo general</b> .....	9
<b>I.5.1. Objetivos particulares</b> .....	9
<b>II. Materiales y métodos</b> .....	10
<b>II.1. Cultivo de microalgas</b> .....	10
<b>II.2. Cultivo de copépodos</b> .....	11
<b>II.3. Diseño experimental</b> .....	11
<b>II.4. Muestreo poblacional</b> .....	12
<b>II.5. Procesamiento y análisis de las muestras</b> .....	12
<b>II.5.1. Biomasa y análisis proximales</b> .....	13
<b>II.5.2. Ácidos grasos</b> .....	13
<b>II.6. Procesamiento y análisis de resultados</b> .....	15
<b>III. Resultados</b> .....	16
<b>III.1. Muestreos poblacionales de copépodos</b> .....	16
<b>III.2. Composición bioquímica</b> .....	20
<b>III.2.1. Proteínas, Carbohidratos y Lípidos Totales</b> .....	20
<b>III.2.1.1. Microalgas</b> .....	20
<b>III.2.1.2. Copépodos</b> .....	21
<b>III.2.2. Ácidos grasos</b> .....	25
<b>III.2.2.1. Microalgas</b> .....	25
<b>III.2.2.2. Copépodos</b> .....	27
<b>IV. Discusión</b> .....	33
<b>VI. Bibliografía</b> .....	44

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Variación en el número promedio de copépodos <i>Pseudodiaptomus euryhalinus</i> de todas las tallas producidos durante el período de muestreo en cada uno de los tres tratamientos evaluados. <i>Chaetoceros calcitrans</i> (Tratamiento 1 = T1), <i>Isochrysis galbana</i> (Tratamiento 2 = T2) y la mezcla de estas dos microalgas en partes iguales (Tratamiento 3 = T3). .....	16
<b>Figura 2.</b> Variación en el número promedio de copépodos <i>Pseudodiaptomus euryhalinus</i> comprendidos en el intervalo de talla de 50-100µm para cada uno de los tres tratamientos evaluados (T1, T2 y T3). .....	17
<b>Figura 3.</b> Variación en el número promedio de copépodos <i>Pseudodiaptomus euryhalinus</i> comprendidos en el intervalo de talla de 100-200µm para cada uno de los tres tratamientos evaluados (T1, T2 y T3). .....	18
<b>Figura 4.</b> Variación en el número promedio de copépodos <i>Pseudodiaptomus euryhalinus</i> comprendidos en el intervalo de talla de 200-300µm para cada uno de los tres tratamientos evaluados (T1, T2 y T3). .....	18
<b>Figura 5.</b> Variación en el número promedio de copépodos <i>Pseudodiaptomus euryhalinus</i> comprendidos en el intervalo de talla de 300µm o más para cada uno de los tres tratamientos evaluados (T1, T2 y T3). .....	19
<b>Figura 6.</b> Comparación de la composición de los ácidos grasos mayores de las microalgas <i>Chaetoceros calcitrans</i> (CH) e <i>Isochrysis galbana</i> (IS). Valores expresados en porcentaje respecto al total de ácidos grasos y su respectiva desviación estándar. Las letras diferentes indican presencia de diferencias significativas entre tratamientos. n=4. n: número de réplicas. ....	30
<b>Figura 7.</b> Comparación de la composición de los ácidos grasos mayores de copépodos <i>Pseudodiaptomus euryhalinus</i> alimentados con tres dietas (T1, T2 y T3) y comprendidos en cada intervalo de talla. Valores expresados en porcentaje respecto al total de ácidos grasos y su respectiva desviación estándar. Las letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA de una vía, $\alpha = 0.05$ ). n=4. n: número de réplicas. ....	32

## INDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Valores medios y desviación estándar del peso seco total y orgánico unitario (PSU y POU, en  $\text{pg}\cdot\text{cél}^{-1}$ ) y de los contenidos de proteínas, carbohidratos y lípidos (P, C y L, en % de POU) evaluados en los cultivos de *Chaetoceros calcitrans* (CH) e *Isochrysis galbana* (IS). Las letras iguales indican ausencia de diferencias significativas y las letras diferentes indican presencia de diferencias significativas (Prueba t para muestras independientes,  $\alpha=0.05$ ). Datos expresados como promedio de las réplicas y su desviación estándar entre paréntesis, n=4. n: número de réplicas.....20

**Tabla 2.** Valores medios y desviación estándar de los pesos secos y pesos orgánicos unitarios (PSU y POU, en  $\mu\text{g}/\text{org}$ ) de *Pseudodiaptomus euryhalinus* retenidos en las mallas de 50, 100, 200 y 300 $\mu\text{m}$  con las diferentes dietas T1, T2 y T3. Las letras iguales indican ausencia de diferencias significativas y las letras diferentes indican presencia de diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA de una vía,  $\alpha=0.05$ ). Datos expresados como promedio de las réplicas y su desviación estándar entre paréntesis, n=4. n: número de réplicas.....22

**Tabla 3.** Composición de proteínas (P), carbohidratos (C) y lípidos (L) del copépodo *Pseudodiaptomus euryhalinus* alimentado con tres dietas T1, T2 y T3. Se reportan los valores encontrados para los organismos retenidos en las mallas de 50, 100, 200 y 300 $\mu\text{m}$  para cada tratamiento. Las letras iguales indican ausencia de diferencias significativas y las letras diferentes indican presencia de diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA de una vía,  $\alpha=0.05$ ). Datos expresados como promedio de las réplicas y su desviación estándar entre paréntesis, n=4. n: número de réplicas. ....24

**Tabla 4.** Valores medios de los porcentajes de ácidos grasos relativos al total de ácidos grasos, para las microalgas *Chaetoceros calcitrans* e *Isochrysis galbana*, empleadas como dietas para *Pseudodiaptomus euryhalinus*. Espacios en blanco indican ausencia del ácido graso correspondiente para esa microalga. Las letras iguales indican ausencia de diferencias significativas y las letras diferentes indican presencia de diferencias significativas respectivamente (Prueba t-Student para muestras independientes,  $\alpha=0.05$ ). Datos expresados como promedio de las réplicas, la desviación estándar fue omitida para dar claridad a los datos. n=4. n: número de réplicas.....26

**Tabla 5.** Valores medios de los porcentajes de ácidos grasos relativos al total de ácidos grasos, para los organismos de *Pseudodiaptomus euryhalinus* retenidos en las mallas de 50, 100, 200 y 300 $\mu\text{m}$  alimentados con las tres dietas T1, T2 y T3. Espacios en blanco indican ausencia del ácido graso correspondiente. Las letras iguales indican ausencia de diferencias significativas y las letras diferentes indican presencia de diferencias significativas respectivamente entre tratamientos (ANOVA de una vía,  $\alpha=0.05$ ). Datos expresados como promedio de las réplicas, la desviación estándar fue omitida para dar claridad a los datos. n=4. n: número de réplicas.....28

## **I. Introducción**

En el año 2004, la producción mundial de la pesca y la acuicultura suministró alrededor de 106 millones de toneladas de pescado para consumo humano, lo que equivale a un suministro per cápita aparente de 16.6 kg, que es el más alto registrado en la historia. De este total, la acuicultura representó el 43% (FAO, 2006).

La acuicultura, pese a ser una actividad más sofisticada y costosa que la pesca, es el área de más rápido desarrollo en el campo de la producción alimenticia en la actualidad, inclusive mayor que cualquier otro sector de producción de alimentos de origen animal. Su tasa de crecimiento fue de 8.8 % al año desde 1970, mientras que la pesca de captura ha crecido solamente a razón de 1.2% y los sistemas de producción de carne de cría en tierra un 2.8%. Esto se explica por la alta calidad dietética de los alimentos de origen acuático y por su disponibilidad limitada (FAO, 2006).

Este rápido desarrollo de la acuicultura ha estimulado el desarrollo de nuevas tecnologías en varias áreas relacionadas con la domesticación de organismos acuícolas de interés comercial, el mejoramiento genético, el control y prevención de enfermedades, el manejo del ambiente de cultivo y la nutrición (Kraul, 1989; Lazo, 2000).

Este desarrollo tan acelerado, con una tasa anual de crecimiento promedio mundial cercana al 10%, se explica en gran parte por el hecho que se ha conseguido cerrar el ciclo biológico de la mayoría de las especies que se cultivan comercialmente, permitiendo la disponibilidad de semilla, alevines o postlarvas prácticamente a lo largo de todo el año, la cual ha brindado varios beneficios a los productores.

Estos beneficios incluyen independencia de las impredecibles fluctuaciones de las poblaciones naturales de estos importantes insumos, accesibilidad a especies no autóctonas, mejoramiento a través de selección artificial, control de fechas de siembra, preservación del ecosistema, protección de las pesquerías naturales y, en especial, la posibilidad de controlar la calidad inicial de reproductores y larvas, lo que permite mejorar la supervivencia de los organismos en cultivo (Martínez-Córdova, 1993).

El cultivo de organismos marinos es una actividad que ha despertado gran interés en los últimos años y los organismos que se cultivan con mayor frecuencia incluyen diversas especies de crustáceos, moluscos y peces marinos. El cultivo de peces marinos en

particular, ha aumentado en las últimas décadas y se ha presentado como una opción novedosa en la acuicultura marina, la cual se ha desarrollado a nivel experimental desde hace más de 50 años y a nivel comercial desde hace unos 30.

Los países que han logrado los mayores avances han sido Japón, Francia, España, Noruega y Canadá (Tucker, 1998). Sin embargo, la fragilidad de los estadios larvarios de la mayoría de las especies estudiadas ha sido, y aun es en muchas especies el cuello de botella para el desarrollo de esta actividad (Støttrup, 2000), lo que ha dificultado establecer tecnologías de cultivo eficientes y económicamente viables a nivel comercial.

En la actualidad, los cultivos de larvas de peces marinos se han hecho más intensivos; mediante el incremento de densidades de cultivo y el grado de tecnificación de las instalaciones se ha eficientado el proceso de producción. Sin embargo, esta eficiencia en la producción lleva un riesgo implícito: el confinamiento de los organismos en espacios cada vez más reducidos incrementa el grado de estrés por alta densidad de cultivo y puede ocasionar, entre otros factores, un deterioro del sistema inmune de los peces, reducción del apetito, competencia por espacio y alimento, dispersión de tallas, canibalismo y una mayor mortalidad (Shepherd & Bromage, 1992).

En particular, el estadio larvario en peces marinos se caracteriza por su gran fragilidad y, dependiendo de la especie de que se trate, hasta el cambio más ligero en las variables de cultivo tales como salinidad, temperatura, concentración de oxígeno, fotoperíodo, intensidad de luz, así como las variaciones en otros elementos inherentes al mantenimiento rutinario del cultivo, como limpieza por sifoneo, recambio de agua mediante flujo, aireación por burbujeo, ruido y, en general, actividad humana, pueden ser causa suficiente para ocasionar una mortalidad masiva en el cultivo larvario (Shepherd & Bromage, 1992). Según Prieto *et al.* (2006), la susceptibilidad de las larvas a verse afectadas (o morir) por causa de una o más de estas variables está íntimamente relacionada con su estado nutricional.

Si las larvas son obtenidas desde su origen a partir de desoves realizados en el laboratorio, éstas son menos susceptibles a estrés por manejo y aceptan mejor el alimento balanceado desde la fase de prealevín hasta el estadio de adulto (Tucker, 1998). Sin embargo, son pocas las especies de las que se tiene un alto grado de avance en lo que respecta a sus

metodologías de cultivo, por lo que en la mayoría de los casos el suministro de dietas balanceadas resulta insuficiente para cubrir los requerimientos nutricios de los peces durante la fase larvaria; además, ninguna dieta balanceada ha demostrado ser tan atractiva para las larvas o nutricionalmente completa como el alimento vivo (Lazo, 2000).

El interés en el uso del alimento vivo para cultivos larvarios radica en que éste provee en cantidad y proporción la mayoría de los elementos nutritivos que promueven una adecuada madurez gonadal y reproducción más eficiente en organismos adultos, así como mejores supervivencias y un mayor crecimiento en organismos en etapa larvaria; además, el alimento vivo ha mostrado una mejor aceptación por parte de las larvas, lo cual ha sido un problema recurrente en las dietas artificiales.

La importancia práctica del alimento vivo, representado principalmente por el fitoplancton (microalgas) y el zooplancton, radica en que son mejor consumidos por ser el alimento que tienen disponible en el medio natural la mayoría de bivalvos, crustáceos y peces en estadios tempranos de desarrollo (Lazo, 2000). Por este motivo, se han realizado estudios detallados sobre el valor nutricio de un gran número de especies de microalgas, tanto para larvas de bivalvos (Lavens & Sorgeloos, 1999) como para sus juveniles y reproductores de peces (Hamre, 2006; Lavens & Sorgeloos, 1999), y para algunas especies de zooplancton (Aman & Altaff, 2004; Araújo & Souza, 2005; Hopp & Maier, 2005).

Se han probado una diversidad de dietas vivas para el cultivo de peces marinos, entre las que destacan los rotíferos, las artemias y los copépodos (Lavens y Sorgeloos, 1999; Lazo, 2000). Estos últimos han mostrado buenos resultados al suministrarlos como alimento vivo, pero la falta de información sobre su cultivo ha hecho que su uso en acuicultura sea esporádico (Støttrup, 2000).

Se ha comprobado que el buen resultado obtenido al emplear artemias, rotíferos y organismos vivos como alimento en larvicultura está relacionado directamente con la presencia de ciertos componentes bioquímicos considerados esenciales, entre los que destacan ciertos ácidos grasos de cadena larga (FAO, 2006; Kraul, 1989; Tucker, 1998)

En vista de que por definición no pueden ser sintetizados, los ácidos grasos esenciales presentes en la dieta determinan su presencia y concentración en el consumidor. La importancia de estos compuestos para los copépodos y para las larvas de peces que se

alimentan de éstos es conocida, pero no se encontraron referencias directas para los copépodos calanoides del Golfo de California, los cuales presentan un gran potencial para su uso en acuicultura al usarlos de forma independiente o conjunta con otras especies de zooplancton como artemias o rotíferos, que en casos particulares han dado problemas por tener una disponibilidad limitada y fluctuante, un pobre perfil de ácidos grasos y dificultades de cultivo. (Payne & Rippingale, 2001; Schipp, 2006; Støttrup, 2000).

## I.2. Antecedentes

Diversos estudios han demostrado la viabilidad de los copépodos como alimento vivo para larvas de peces y crustáceos. Al suministrar dietas en las que se incluyen copépodos como alimento vivo se ha visto un mayor porcentaje de supervivencia y crecimiento que en aquellas donde sólo se proporcionan nauplios de *Artemia* o rotíferos. Esto se debe a diversas características que convierten al copépodo en un alimento superior, entre las que destaca su digestibilidad, tamaño reducido, pues algunas especies de copépodo ha mostrado ser lo suficientemente pequeñas para ser consumidas por las larvas de peces, que en condiciones óptimas necesitan un alimento que sea 0.4 a 0.6 veces el ancho de la boca (Knights, 1983; Dabrowski y Bardega, 1984), algunos son fuentes naturales de antioxidantes tales como astaxantina y vitaminas (Van-Nieuwerburgh, 2004; Lotocka & Styczinska-Juerwickz, 2001; McKinnon *et.al.* 2003), movimiento natatorio adecuado que se ha sugerido como un estímulo para la inducción de la conducta predatoria de las larvas de peces (McKinnon *et.al.* 2003; Sargent *et.al.* 1999; Støttrup, 2000), composición nutricional superior (Drillet *et.al.*, 2006 Evjemo, *et.al.*, 2003; Schipp, 2006), pues se ha reportado que estos organismos son ricos en lípidos, aminoácidos y ácidos grasos esenciales.

Estas características propias de los copépodos pueden llegar a promover una mayor supervivencia larvaria (Shields *et al.*, 1999), altas tasas de crecimiento (Støttrup & Norsker, 1997), mejor pigmentación (Spenelli, 1979; Støttrup *et al.*, 1998), un mejor desarrollo del sistema digestivo (Luizi *et al.*, 1999) y servir como una fuente exógena de enzimas (Munilla-Moran *et al.*, 1990).

Los copépodos representan el grupo más grande y diverso de crustáceos. Se les encuentra habitando aguas oceánicas y continentales a diversas profundidades, desde aguas superficiales hasta substratos subacuáticos, cuevas, cenotes, hábitats semiterrestres, plantas e incluso en relaciones simbióticas o parasitarias con otros organismos. Actualmente se conocen alrededor de 14000 especies, 2300 géneros y 210 familias, cifras probablemente subestimadas.

En vista de las ventajas que proveen los copépodos al ser usados como alimento vivo, numerosos estudios se han enfocado a estudiar una diversidad de especies con el fin de desarrollar tecnologías de cultivo eficientes.

Entre los componentes de las dietas, se reconoce que existen varios compuestos esenciales, que por definición son los nutrimentos que deben ser necesariamente adquiridos con el alimento, ya que no pueden ser sintetizados por el organismo consumidor. Entre éstos se encuentran las vitaminas, algunos aminoácidos y varios ácidos grasos insaturados de cadena larga (Kleppel, 1993; Lazo, 2000).

De acuerdo a la literatura sobre los requerimientos de ácidos grasos de los estadios larvarios de peces, los más importantes son los poliinsaturados de cadena larga C20 y C22: n3 y n6 (Sargent *et al.* 1997). En particular, su crecimiento es estimulado por el ácido docosahexaenoico C22:6 n3 (DHA) y esta respuesta se incrementa cuando la dieta larvaria contiene también el ácido eicosapentaenoico (EPA) C20:5 n-3 (Sargent *et al.* 1997). Además, el ácido araquidónico (ARA) C20:4 n-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).

La microalga *Isochrysis* sp. se considera entre las mejores fuentes de DHA, pero tiene un bajo contenido de EPA y no contiene ARA. Por el contrario, *C. muelleri* es pobre en DHA, pero es rico en EPA y en ARA (Pernet *et. al.*, 2003; Renaud *et. al.*, 2002).

### **I.3. Planteamiento del problema**

Es generalmente aceptado que, en la piscicultura marina, los estadios larvarios presentan el mayor cuello de botella en el desarrollo de la industria y, más específicamente, la nutrición es considerada uno de las variables más importantes en la investigación de los estadios larvarios de las especies marinas susceptibles de cultivo.

En México se han realizado esfuerzos importantes para desarrollar el cultivo de diversas especies de peces marinos y, al igual que en investigaciones similares realizadas en otras partes del mundo, se han empleado copépodos como alimento vivo durante la fase larvaria, mostrando que los copépodos son una alternativa viable para usarse como dieta para peces marinos durante esta etapa crítica de desarrollo (Kraul, 2006; Schipp; 2006; Støttrup, 2006; Støttrup & Norsker, 1997; Sipaubá *et.al.*, 2001; Støttrup *et.al.*, 1998).

Una especie que ha sido estudiada en Baja California Sur para evaluar la viabilidad de su uso en piscicultura marina es el copépodo calanoide *Pseudodiaptomus euryhalinus* (Johnson, 1939), demostrando buenos resultados en las larvas de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Alfonso, 1999; Contreras-Olguín *et.al.*, 1997) y pargo amarillo *Lutjanus argentiventris* (Muhlia-Melo, 2008), sin embargo aún se sabe muy poco sobre el valor nutritivo de este organismo y de su alimento (Payán-Aguirre, 1994; Osorio-Galindo, 1998).

Dado que el valor nutricional de los copépodos usados como alimento vivo en acuicultura puede verse afectado en función del alimento que se le suministre, sería importante verificar si la composición bioquímica y por lo tanto el valor dietético de *Pseudodiaptomus euryhalinus* puede cambiar si se cultiva con dos especies de microalgas con diferentes contenidos de ácidos grasos esenciales.

#### **I.4. Hipótesis**

La composición bioquímica de la dieta se refleja en la composición del organismo que la consume, por lo tanto: al alimentar al copépodo *Pseudodiaptomus euryhalinus* con las microalgas *Chaetoceros calcitrans* e *Isochrysis galbana*, la composición bioquímica en proteínas, carbohidratos, lípidos totales y el contenido de ácidos grasos de este organismo se modificará en relación con la de la dieta que se le suministre.

## **I.5. Objetivo general**

Evaluar el valor nutricional, expresado en la composición de proteínas, carbohidratos y lípidos totales y el contenido de ácidos grasos, de cuatro etapas de crecimiento del copépodo calanoide *Pseudodiaptomus euryhalinus*, alimentado con las microalgas *Chaetoceros calcitrans* e *Isochrysis galbana* en dos dietas monoalgales y una mixta en condiciones de laboratorio.

### **I.5.1. Objetivos particulares**

- Determinar la composición de proteínas, carbohidratos y lípidos totales y el contenido de ácidos grasos de las microalgas *Chaetoceros calcitrans* e *Isochrysis galbana*.
- Determinar la composición de proteínas, carbohidratos y lípidos totales y el contenido de ácidos grasos del copépodo *Pseudodiaptomus euryhalinus* alimentado con las microalgas *Chaetoceros calcitrans* e *Isochrysis galbana* en dos dietas monoalgales y una mixta.
- Establecer las diferencias en la composición nutricional de cuatro etapas de desarrollo del copépodo *Pseudodiaptomus euryhalinus* alimentado con las tres dietas microalgales.

## **II. Materiales y métodos**

Todos los experimentos se llevaron a cabo en las instalaciones del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), ubicado en La Paz, BCS.

El cultivo de microalgas se realizó en el laboratorio de microalgas del CIBNOR, y los cultivos de copépodos en la Sala Húmeda de Bioensayos del edificio O, en la misma institución. Ambas salas cuentan con líneas de distribución de aire comprimido, de agua dulce y de agua de mar, equipos de aire acondicionado para el control de la temperatura y con los recipientes, insumos y reactivos necesarios para la producción de alimento vivo y el mantenimiento de los cultivos experimentales. La metodología de cultivo se describe con detalle a continuación.

### **II.1. Cultivo de microalgas**

Se utilizaron dos especies de microalgas seleccionadas como dietas básicas para los cultivos de copépodos, las cuales se obtuvieron de la colección de microalgas del CIBNOR. Éstas fueron la diatomea céntrica unicelular *Chaetoceros calcitrans* y la Prymnesiophyceae flagelada *Isochrysis galbana*.

Para las dos especies los cultivos fueron de tipo “batch” (estático), se realizaron cosechas totales cuando las microalgas se encontraban en la fase de crecimiento exponencial. Se mantuvieron de tres a cuatro series de cultivos en bolsas de plástico transparente de 30 a 40 litros; el medio de cultivo se preparó con base en la formulación original para el medio F (Guillard y Ryther, 1962), pero se adicionó una concentración de metasilicatos doble de la especificada en el caso de la diatomea *Chaetoceros calcitrans* y este nutriente fue omitido para *Isochrysis galbana*. Se hizo una siembra y una cosecha escalonada, de modo que siempre se alimentó con microalgas de calidad similar en concentración y composición bioquímica.

La producción diaria de microalgas se estimó mediante conteos directos al microscopio en cámara de Neubauer, los cuales sirvieron para calcular las raciones de alimento para los copépodos, de acuerdo al peso orgánico de cada microalga.

## **II.2. Cultivo de copépodos**

Los copépodos que se utilizaron como progenitores, fueron colectados en los estanques supralitorales del CIBNOR mediante arrastre con una malla de plancton de 150  $\mu\text{m}$  durante el mes de Enero de 2006. La muestra colectada se llevó a la sala húmeda de bioensayos donde se extrajeron varias parejas de adultos de *Pseudodiaptomus euryhalinus* con la ayuda de un microscopio estereoscópico y una pipeta Pasteur. Los organismos separados se colocaron en un matraz Erlenmeyer con capacidad de 1000 mL con agua de mar filtrada a 2  $\mu\text{m}$  a temperatura de 28° C, salinidad de 35 UPS y aireación constante por burbujeo. Los cultivos se desdoblaron progresivamente hasta llevarlos a tanques cilíndricos de fibra de vidrio y con fondo plano, con un volumen útil de 88 litros. Para mantener una calidad de agua adecuada en los cultivos, se hicieron recambios totales de agua cada dos días y sifoneo para eliminar las heces. Diariamente se adicionó una cantidad de alimento ad libitum a los organismos de cada acuario en los tres tratamientos, suministrado en una porción única cada 24 horas. Los recambios se hicieron mediante un sistema de flujo, empleando agua filtrada a 5  $\mu\text{m}$ , se aplicó aireación a cada tanque y la temperatura se mantuvo controlada mediante un equipo de aire acondicionado. Se tomaron muestras de los copépodos para los análisis bioquímicos y para hacer el seguimiento del comportamiento poblacional.

## **II.3. Diseño experimental**

Los cultivos se realizaron en 12 tanques cilíndricos de fibra de vidrio con capacidad útil de 88 litros c/u, con recambio total de agua filtrada a 5  $\mu\text{m}$  cada dos días mediante flujo continuo. Los copépodos se alimentaron ad libitum cada 24 horas con las dietas establecidas *Chaetoceros calcitrans*, *Isochrysis galbana* y la mezcla en partes iguales de estas dos microalgas (respecto a su biomasa orgánica); las raciones suministradas fueron calculadas de acuerdo a las tasas de consumo previamente determinadas. Diariamente se eliminó la materia orgánica que precipita al fondo de cada tanque mediante sifoneo.

En todas las repeticiones se realizó de forma homogénea el mantenimiento rutinario de los tanques, el suministro de alimento y las condiciones ambientales para los cultivos, esto para evitar posibles variaciones en los muestreos y en los análisis bioquímicos que fueran derivadas de modificaciones en otros factores ajenos a las dietas.

Los dietas o tratamientos suministrados como alimento para el copépodo *Pseudodiaptomus euryhalinus* fueron las siguientes:

*Chaetoceros calcitrans* (Tratamiento 1 = T1), *Isochrysis galbana* (Tratamiento 2 = T2) y la mezcla de estas dos microalgas en partes iguales (Tratamiento 3 = T3), con cuatro repeticiones de cada uno.

#### **II.4. Muestreo poblacional**

Para comprobar la estabilidad y eficacia del sistema de cultivo propuesto, así como la variación en la proporción de tallas entre los tratamientos se realizaron muestreos poblacionales cada 24 horas durante 27 días. Se tomaron muestras de 500ml por triplicado de cada tanque, de cada tratamiento, homogenizando previamente el cultivo y posteriormente se separaron los organismos mediante tamizado de las muestras en orden descendente de 300 $\mu$ , 200 $\mu$ , 100 $\mu$  y 50 $\mu$  de luz de malla. Se contó el número total de organismos retenidos en cada tamiz, con lo cual se determinaron las variaciones temporales en la proporción de tallas, la densidad de organismos en cada acuario, y en el momento en que se presentó la mayor densidad de organismos junto con la proporción más homogénea posible de tallas, se procedió a cosechar la totalidad de los organismos en cultivo, para utilizarlos en la evaluación del perfil nutricional por tratamientos.

#### **II.5. Procesamiento y análisis de las muestras**

Antes de realizar los muestreos poblacionales se estimó el peso seco total y el peso orgánico de los copépodos y microalgas mediante una técnica gravimétrica. Los copépodos de las cuatro tallas muestreados al final de los experimentos mediante los diferentes tamices, se enjuagaron con formiato de amonio para eliminar el exceso de sales, se colectaron con una espátula y se guardaron en tubos Eppendorf a -70 °C. Posteriormente las

muestras ultracongeladas se liofilizaron para usarlas en los análisis para estimar ácidos grasos y proteínas, carbohidratos y lípidos totales.

### **II.5.1. Biomasa y análisis proximales**

Para estos análisis, se filtraron volúmenes y concentraciones conocidos de cada cultivo (microalgas y copépodos), en quintuplicado en cada caso, separando los copépodos por tallas con tamices para cada tratamiento, de acuerdo a los intervalos de tamaño establecidos (50 $\mu$ m , 100 $\mu$ m , 200 $\mu$ m y 300 $\mu$ m).

Se usaron filtros de fibra de vidrio Whatman GF-C de 25 mm de diámetro para cuantificar la biomasa, tanto de microalgas como de copépodos. Los filtros fueron prelavados, calcinados a 450 °C durante un mínimo de 4 horas y pesados hasta obtener peso constante, comprobado con un mínimo de dos pesadas sucesivas a intervalos de 24 horas entre pesada y pesada, usando una balanza analítica.

Las muestras se secaron durante por lo menos 48 horas en una estufa convencional a 60-65 °C y se pesaron hasta verificar que el peso fuera constante, para luego incinerarlas a 450 °C durante 14-20 horas y así obtener el peso inorgánico de cada muestra y calcular por diferencia entre estos valores la cantidad de biomasa orgánica presente en los cultivos (Sorokin, 1973).

Para determinar la composición proximal de las muestras liofilizadas se emplearon las técnicas tradicionales de Bradford (1976) para proteínas, de Roe *et al.* (1961) para carbohidratos y de Bligh & Dyer (1959) para lípidos y después se verificaron las curvas de calibración usando soluciones de concentración conocida de albúmina de suero de bovino, de glucosa anhidra y de triglicéridos, respectivamente. Todos los resultados fueron estimados respecto al porcentaje de biomasa orgánica de las muestras liofilizadas.

### **II.5.2. Ácidos grasos**

Para el análisis de ácidos grasos de las microalgas y de los copépodos sometidos a los diferentes tratamientos, se emplearon 5 mg de biomasa liofilizada y se analizaron por

cuadruplicado. Se realizó una extracción de lípidos totales con una adaptación del método descrito por Bligh y Dyer (1959). Los lípidos en las muestras se extrajeron con una mezcla 2:1 de metanol-cloroformo y se dejaron incubando a 4°C durante 24 horas protegidos de la luz, para favorecer la extracción completa de los lípidos. Después se centrifugaron a 4000 rpm por 20 min a 10° C, se agregó agua destilada al extracto resultante y se centrifugó de nuevo (4000 rpm, 20 min, 10° C). Luego de recuperar la fracción lípido-cloroformo se evaporó la muestra con flujo continuo de gas nitrógeno y los lípidos sedimentados se resuspendieron en un volumen conocido de cloroformo para luego destinar una fracción de éstos a la cuantificación de lípidos totales usando el método de Marsh & Weinstein (1996). Con la muestra restante se realizó la derivatización de la fracción de lípidos neutros y polares sometiéndolos a metanólisis ácida adicionando una mezcla al 5% (v:v) de HCl:CH<sub>3</sub>OH. Después de 2.5 horas de este tratamiento en baño maría a 85°C (Sato y Murata, 1988), los metil-ésteres derivados de esta reacción se extrajeron con hexano grado plaguicida y 250 µL del extracto se colocaron en viales para ser analizados por cromatografía de gases.

La determinación de la concentración y la identificación de los ácidos grasos metil esterificados se realizó con un cromatógrafo de gases-masas Hewlett Packard G1800B equipado con un puerto de inyección y una columna capilar de sílice (omega wax TM 250 Supelco) cubierta en su interior por polietilenglicol, con una longitud de 60 m, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 µm de espesor de película. Se usó un flujo de 1.0 ml·min<sup>-1</sup> de Helio con grado de pureza de 99.99% como gas transportador. El método empleado se registró con la clave BPX70MOD, con temperatura inicial de 110° C por 3.3min, posterior incremento de 110° C a 165 °C a una tasa de 30 °C/min, donde permaneció por 2min, incremento de 165 °C a 210 °C a una tasa de 10 °C/min donde permaneció por 2min, y un tercer y último incremento de 210 °C a 240 °C a una tasa de 3 °C/min con permanencia de 10min. La temperatura del inyector y del detector fue de 250 °C en ambos casos y el volumen de inyección fue de 1 µl.

Los ácidos grasos presentes en la muestra se identificaron mediante la comparación de sus espectros de masas y tiempos de retención con los reportados para una lista conocida de 35 estándares y la comparación con las bases de datos NIST 2000, NIST 98 y NBK575K,

cargadas en el programa GCD Plus ChemStation, G1074B Version A.01.00. Posteriormente, con base en su concentración y en el volumen de extracto, se calculó el contenido de cada uno de estos compuestos en  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$  de biomasa y en porcentaje con respecto al contenido total de ácidos grasos.

## **II.6. Procesamiento y análisis de resultados**

Los datos porcentuales de proteínas carbohidratos, lípidos y ácidos grasos evaluados en todas las tallas y tratamientos fueron transformados a arcoseno mediante la fórmula  $x'=\arcsin(\sqrt{x}/100)$  para asegurar su normalidad mediante la reducción de la heterogeneidad de las varianzas (Zar, 1999).

Los pesos y los porcentajes de los tres componentes orgánicos (proteínas, carbohidratos y lípidos totales), así como los porcentajes de los ácidos grasos de los copépodos se compararon entre tratamientos mediante pruebas de ANOVA de una vía, después de verificar que se cumplieran los supuestos de normalidad y de homogeneidad de varianzas mediante las respectivas pruebas de Kolmogorov-Smirnov y de Levin. En caso de que estos supuestos no se cumplieran, se procedió a comparar las medias con la equivalente prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (Zar, 1999).

Para los datos de pesos, componentes orgánicos (proteínas, carbohidratos y lípidos totales) y ácidos grasos de las dos microalgas, así como para aquellas muestras de copépodos en las que solo existieran dos muestras para comparar, se encontraron las posibles diferencias significativas mediante una prueba t-Student para muestras independientes,  $\alpha=0.05$ , esto luego de verificar que se cumplieran los supuestos de normalidad e igualdad de varianzas mediante las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y de Levin.

Cuando las diferencias fueron significativas, las comparaciones de medias se realizaron entre las muestras y tratamientos mediante una prueba a posteriori de Tukey ( $P < 0.05$ ) (Zar, 1999).

### III. Resultados

#### III.1. Muestreos poblacionales de copéodos

Los resultados de las poblaciones de copéodos muestran que en todos los tratamientos los organismos tuvieron fluctuaciones características de las poblaciones de plancton, con periodos de duración semanal.

En la figura 1 se observa que la concentración promedio de organismos encontrada a lo largo del periodo de muestreo (27 días) fue similar entre los tres tratamientos, mostrando los menores valores en el T2 con  $785 \pm 327$  cop/día, un dato intermedio de  $893 \pm 290$  cop/día para el T1 y de  $1136 \pm 406$  cop/día para el T3.

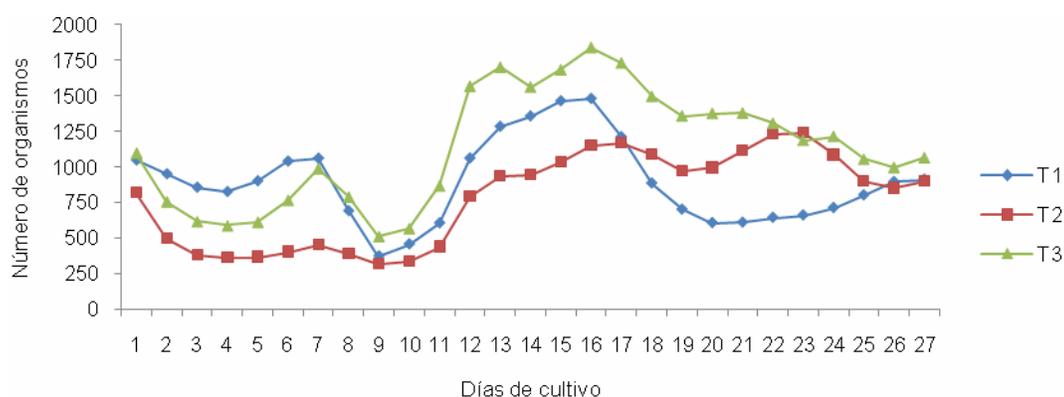


Figura 1. Variación en el número promedio de copéodos *Pseudodiaptomus euryhalinus* de todas las tallas producidos durante el período de muestreo en cada uno de los tres tratamientos evaluados. *Chaetoceros calcitrans* (Tratamiento 1 = T1), *Isochrysis galbana* (Tratamiento 2 = T2) y la mezcla de estas dos microalgas en partes iguales (Tratamiento 3 = T3).

Durante todo el período esta concentración varía de forma ciclica. Para T1 y T3 se pueden observar dos incrementos en la concentración de organismos, el primero ocurre casi al mismo tiempo entre los días 6 y 8 de muestreo y el segundo periodo bien marcado encuentra los mayores valores de concentración aproximadamente entre los días 12 y 18 para los mismos tratamientos. Sin embargo, éstos tratamientos, a partir del día 19 presentan un comportamiento distinto, el T1 aumenta y el T3 disminuye y ambos se estabilizan en un rango similar al final del periodo de muestreo. Con relación al tratamiento T2 la población

presenta un comportamiento de tres periodos, uno en el que se observa un bajo número de organismos hasta el día 10, el segundo periodo se inicia el día 11 de donde se incrementa paulatinamente hasta alcanzar un máximo los días 16 y 17, luego disminuye hasta el día 19 para iniciar el tercer periodo alcanzando un máximo los días 22 a 23.

Las figuras 2, 3, 4 y 5 muestran en detalle la variación en la concentración de organismos registrada diariamente en los intervalos de talla de 50-100, 100-200, 200-300 y 300 $\mu\text{m}$  o más respectivamente.

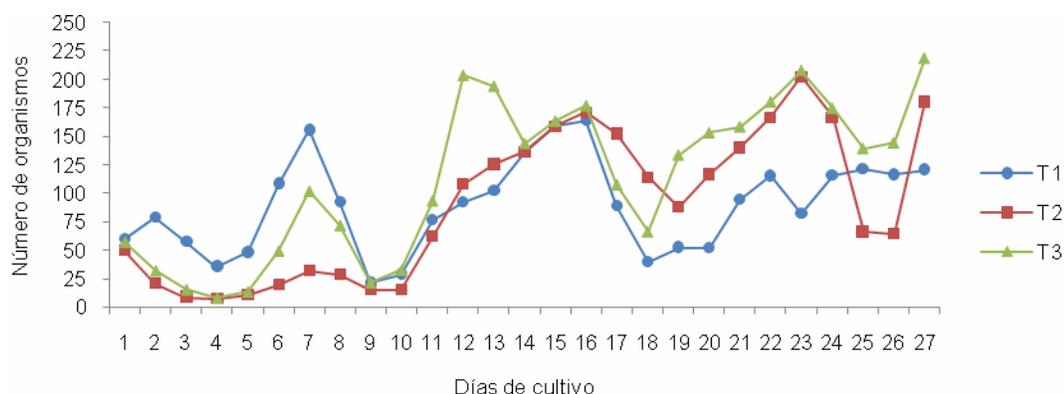


Figura 2. Variación en el número promedio de copépodos *Pseudodiaptomus euryhalinus* comprendidos en el intervalo de talla de 50-100 $\mu\text{m}$  para cada uno de los tres tratamientos evaluados (T1, T2 y T3).

En el intervalo de talla de 50-100 $\mu\text{m}$  (Figura 2) también se presenta un comportamiento ciclico de tres periodos. El primero con maximos el día 7, el segundo con máximos los días 15 y 16 a excepción del tratamiento T3 que presenta un pico anterior el día 12 y el tercer periodo con máximos el día 23 a excepción del tratamiento T1 que disminuyó. Se observa un predominio del tratamiento T3 a partir del segundo ciclo hasta el final del periodo de muestreo. En general se observa que los tratamientos T3 y T2 mantienen a partir del segundo ciclo los mejores niveles poblacionales.

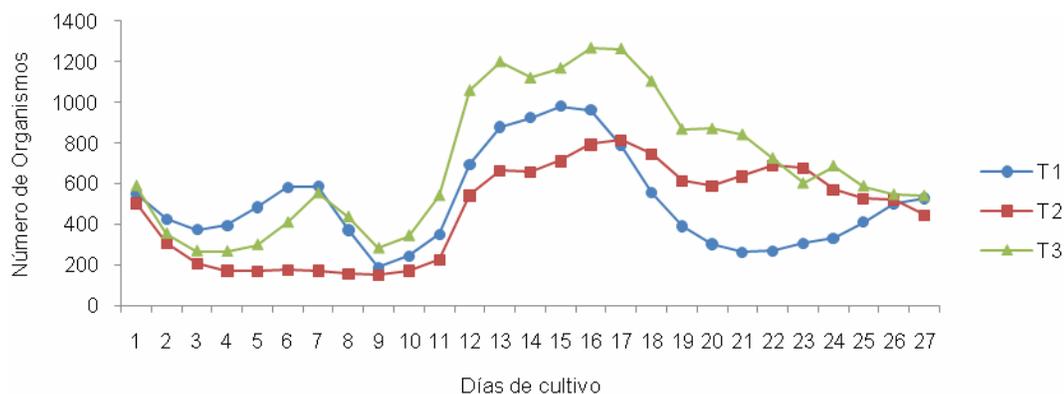


Figura 3. Variación en el número promedio de copéodos *Pseudodiaptomus euryhalinus* comprendidos en el intervalo de talla de 100-200µm para cada uno de los tres tratamientos evaluados (T1, T2 y T3).

En el intervalo de talla 100-200µm (Figura 3) se observó una mucho mayor producción de organismos respecto a los demás intervalos de talla en todos los tratamientos, con valores promedio de  $507 \pm 230$ (T1),  $466 \pm 233$ (T2) y  $697 \pm 333$  cop/día (T3).

También se observaron coincidencias con los otros tres intervalos en los incrementos del número de organismos entre los tratamientos, durante el día 7 para los tratamientos T1 y T3 y durante el transcurso de los días 15 al 17 para los tres tratamientos. Después del día 17 se observa un decremento con variaciones ligeras en cuanto al número de organismos de las poblaciones en todos los tratamientos hasta el final de los muestreos.

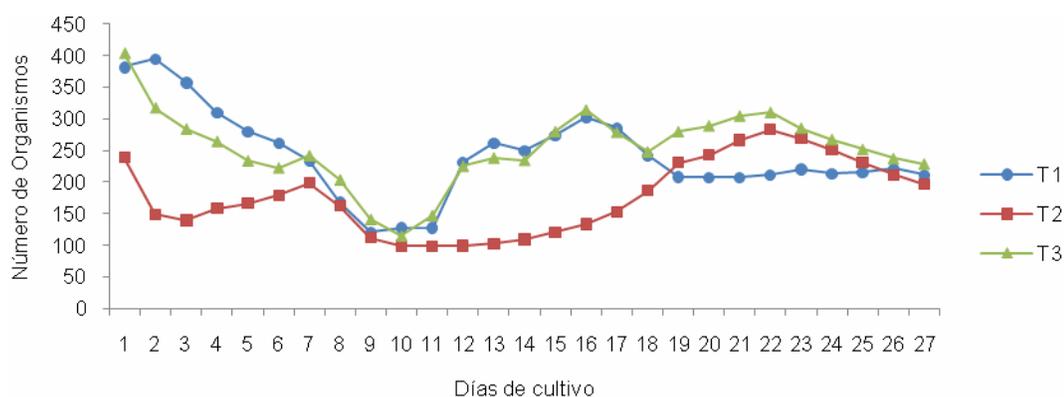


Figura 4. Variación en el número promedio de copéodos *Pseudodiaptomus euryhalinus* comprendidos en el intervalo de talla de 200-300µm para cada uno de los tres tratamientos evaluados (T1, T2 y T3).

La figura 4 muestra un intervalo del número promedio de individuos considerablemente menor al de las tallas de 100 a 200 $\mu\text{m}$ . Se observa un comportamiento muy parecido entre las poblaciones de los tratamientos T1 y T3, los cuales inician y se mantienen con una concentración muy similar entre sí desde el primer día de los muestreos hasta el día 18, a partir de ese día se observa una divergencia muy marcada entre estos dos tratamientos, la cual se va reduciendo hacia el final del periodo de muestreo y termina con concentraciones muy similares entre los tres tratamientos, especialmente entre los días 25, 26 y 27. En este intervalo de talla se distinguen nuevamente tres despuntes en la producción de organismos, aunque en éstos no coinciden todos los tratamientos a la vez. El primer pico se encuentra en el día 7, el segundo pico entre los días 13 y 17 donde coinciden los tratamientos T1 y T3 y el tercer pico se observa entre los tratamientos T2 y T3 donde coinciden nuevamente durante el día 22.

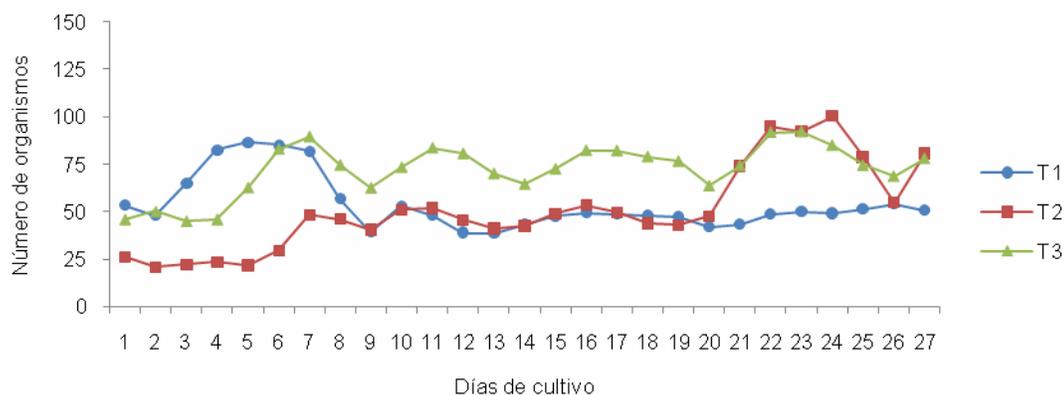


Figura 5. Variación en el número promedio de copépodos *Pseudodiaptomus euryhalinus* comprendidos en el intervalo de talla de 300 $\mu\text{m}$  o más para cada uno de los tres tratamientos evaluados (T1, T2 y T3).

En el caso de los copépodos adultos, la figura 5 muestra que el intervalo del número promedio de organismos disminuye considerablemente con respecto a los de tallas menores. A partir del día 7 se observa un predominio del tratamiento T3 sobre los otros dos tratamientos, sin embargo el tratamiento T2 presenta un incremento similar al del tratamiento T3 al final del periodo de muestreo entre el 21 y 26 días.

## III.2. Composición bioquímica

### III.2.1. Proteínas, Carbohidratos y Lípidos Totales

#### III.2.1.1. Microalgas

Las microalgas mostraron diferencias significativas entre sí en todos sus pesos, con valores de peso seco unitario de 45.55 y 23.54  $\text{pg}\cdot\text{cél}^{-1}$  y de peso orgánico unitario de 33.74  $\text{pg}\cdot\text{cél}^{-1}$  y de 21.63  $\text{pg}\cdot\text{cél}^{-1}$  para *C. calcitrans* e *I. galbana*, mostrando que las células de *C. calcitrans* tienen un mayor peso celular que *I. galbana*. (Tabla 1).

Tabla 1. Valores medio y desviación estándar entre paréntesis del peso seco total y orgánico unitario (PSU y POU, en  $\text{pg}\cdot\text{cél}^{-1}$ ) y contenido de proteínas, carbohidratos y lípidos (P, C y L, en % de POU) en los cultivos de *Chaetoceros calcitrans* (CH) e *Isochrysis galbana* (IS). Las letras iguales indican ausencia de diferencias significativas y las letras diferentes indican presencia de diferencias significativas (Prueba t para muestras independientes,  $\alpha=0.05$ ). n=4. n: número de réplicas.

	PSU $\text{pg}/\text{cel}$	POU $\text{pg}/\text{cel}$	P (%)	C (%)	L (%)
CH	45.55 <sup>a</sup>	33.74 <sup>a</sup>	23.45 <sup>a</sup>	3.54 <sup>a</sup>	15.75 <sup>a</sup>
	(2.43)	(2.98)	(1.75)	(0.42)	(2.99)
IS	23.54 <sup>b</sup>	21.63 <sup>b</sup>	31.82 <sup>b</sup>	4.55 <sup>a</sup>	35.71 <sup>b</sup>
	(0.73)	(0.40)	(6.49)	(0.64)	(2.51)

La composición proximal también mostró diferencias significativas entre las microalgas, pero sólo para los datos de proteínas y lípidos totales, mostrando que *I. galbana* presenta porcentajes mayores de proteínas y lípidos que *C. calcitrans*.

Los resultados de peso de microalgas muestran diferencias importantes entre las dos especies suministradas como alimento a *P. euryhalinus*, sin embargo, las raciones de alimento suministradas a los copépodos de los tres tratamientos fueron suministradas *ad libitum*, considerando la poca información que se ha generado hasta el momento sobre las estrategias alimenticias que presenta este organismo y el complejo comportamiento que se ha reportado para el grupo de copépodos calanoides, los cuales seleccionan su alimento en base al tamaño de partícula, estímulos visuales y químicos entre otros (Kleppel, 1993).

### III.2.1.2. Copépodos

#### PESO SECO Y PESO ORGÁNICO (Tabla 2)

*TALLA* 50-100 $\mu\text{m}$ : los mayores valores de peso se presentaron en el tratamiento T1 y los menores en el tratamiento T3. La fracción orgánica de los nauplios se encontró el mayor peso unitario en el tratamiento T2, el menor fue para el tratamiento T3. Los análisis estadísticos no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos T1 y T2, pero el Tratamiento T3 fue menor ( $P < 0.05$ ).

*TALLA* 100-200 $\mu\text{m}$ : Los mayores valores de peso se presentaron en el tratamiento T2 y los menores en el tratamiento T1. La fracción orgánica de los tres tratamientos mostraró la mismas tendencia que en el peso seco unitario y los análisis estadísticos mostraron que el tratamiento T2 fue el único diferente ( $P < 0.05$ ).

*TALLA* 200-300 $\mu\text{m}$ : se encontraron las mismas tendencias que en el intervalo de talla 100-200 $\mu\text{m}$ , donde los tratamientos T2 y T1 obtuvieron los valores mas alto y mas bajo respectivamente. A diferencia de los dos intervalos de talla anteriores, no se observó diferencia significativa entre los pesos de los tres tratamientos ( $P > 0.05$ ).

*TALLA* 300 $\mu\text{m}$  o más: se encontraron las mismas tendencias que en el primer intervalo de talla de 50-100 $\mu\text{m}$ , presentando los tratamientos T1 y T3 los valores mas alto y mas bajo respectivamente. Al igual que el intervalo de talla 200-300 $\mu\text{m}$ , no hubo diferencia significativa entre los pesos de los tres tratamientos ( $P > 0.05$ ).

Tabla 2. Valores medios y desviación estándar entre paréntesis de los pesos secos y pesos orgánicos unitarios (PSU y POU, en  $\mu\text{g}/\text{org}$ ) de *Pseudodiaptomus euryhalinus* retenidos en las mallas de 50, 100, 200 y 300 $\mu\text{m}$  con las diferentes dietas T1, T2 y T3. Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas y las letras diferentes indican presencia de diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA de una vía,  $\alpha=0.05$ ). n=4. n: número de réplicas.

	PSU $\mu\text{g}/\text{org}$			POU $\mu\text{g}/\text{org}$		
	T1	T2	T3	T1	T2	T3
<b>50</b>	1.03 <sup>b</sup> (0.30)	0.90 <sup>b</sup> (0.15)	0.26 <sup>a</sup> (0.07)	1.08 <sup>b</sup> (0.26)	1.09 <sup>b</sup> (0.20)	0.28 <sup>a</sup> (0.08)
<b>100</b>	0.33 <sup>a</sup> (0.02)	0.99 <sup>b</sup> (0.15)	0.60 <sup>a</sup> (0.12)	0.33 <sup>a</sup> (0.04)	1.00 <sup>b</sup> (0.13)	0.59 <sup>a</sup> (0.12)
<b>200</b>	2.07 <sup>a</sup> (0.21)	2.46 <sup>a</sup> (0.18)	2.30 <sup>a</sup> (0.18)	1.83 <sup>a</sup> (0.20)	2.17 <sup>a</sup> (0.15)	2.12 <sup>a</sup> (0.17)
<b>300</b>	7.33 <sup>a</sup> (2.08)	6.93 <sup>a</sup> (0.80)	6.78 <sup>a</sup> (0.39)	6.45 <sup>a</sup> (1.51)	6.26 <sup>a</sup> (0.97)	6.04 <sup>a</sup> (0.43)

#### COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA (Tabla 3)

**TALLA 50-100 $\mu\text{m}$ :** Los mayores porcentajes de lípidos (7.66%) y carbohidratos (4.03%) se encontraron en los copépodos alimentados con *C. calcitrans* (T1), los cuales también reportaron la concentración más baja de proteínas (29.16%). Los valores más altos de proteínas (43.11%) correspondieron con el tratamiento T3, en el cual también se presentaron los porcentajes más bajos de carbohidratos (2.98%) y lípidos (4.42%), con valores intermedios para el tratamiento T2. La concentración de proteínas de los copépodos alimentados con *C. calcitrans* (T1) fue significativamente menor respecto a las otras dos dietas, y los valores obtenidos para carbohidratos y lípidos los tratamientos T1 y T3 fueron significativamente diferentes entre sí, pero el T2 no mostró diferencias respecto a los otros dos tratamientos.

**TALLA 100-200 $\mu\text{m}$ :** Los mayores porcentajes de proteínas (46.83%) y lípidos (8.87%) se encontraron en los copépodos alimentados con *C. calcitrans* (T1) e *I. galbana* (T2), en cambio las concentraciones más bajas se encontraron en los copépodos alimentados con la

mezcla de las dos microalgas (T3). Este mismo tratamiento (T3) fue el que presentó el mayor contenido de carbohidratos (2.97%) contrapuesto con lo observado en el tratamiento T1, en el que se encontraron los valores más bajos (2.70%). No hubo diferencia significativa entre los tratamientos de ninguno de los grupos de macromoléculas.

*TALLA 200-300µm:* Los mayores porcentajes de proteínas (62.52%) se encontraron en los copépodos alimentados con la mezcla de las dos microalgas (T3), los cuales también reportaron los valores más bajos de lípidos (5.71%). En los copépodos alimentados con *I. galbana* (T2) se detectó la mayor concentración de lípidos (9.32%) y carbohidratos (2.94%), mientras que las más bajas se encontraron en los copépodos alimentados con la mezcla de las dos microalgas (T3). Los análisis estadísticos no mostraron diferencias significativas entre los tres tratamientos en cuanto a la concentración de proteínas y carbohidratos totales, pero en el caso de los lípidos totales el único tratamiento significativamente diferente respecto a los otros dos fue en el que se suministró la mezcla de las dos microalgas (T3).

*TALLA 300µm o más:* Los mayores porcentajes de proteínas (34.80%) se encontraron en los copépodos alimentados con *C. calcitrans* (T1), y pese a que los valores más bajos de proteínas (28.13%) se encontraron en los copépodos alimentados con *I. galbana* (T2), en este tratamiento también se observaron los mayores porcentajes tanto de carbohidratos (3.19%) como de lípidos (8.87%). Al igual que en el intervalo de talla anterior (200-300µm), no hubo diferencia significativa entre los tres tratamientos en la concentración de proteínas y carbohidratos totales, pero en el caso de los lípidos totales el único tratamiento diferente ( $P < 0.05$ ) respecto a los otros dos fue en el que se suministró la mezcla de las dos microalgas (T3).

Tabla 3. Composición de proteínas (P), carbohidratos (C) y lípidos (L) del copépodo *Pseudodiaptomus euryhalinus* alimentado con tres dietas T1, T2 y T3. Se reportan los valores encontrados para los organismos retenidos en las mallas de 50, 100, 200 y 300 $\mu$ m para cada tratamiento. Las letras iguales indican ausencia de diferencias significativas y las letras diferentes indican presencia de diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA de una vía,  $\alpha=0.05$ ). Datos expresados como promedio de las réplicas y su desviación estándar entre paréntesis, n=4. n: número de réplicas.

	P (%)			C (%)			L (%)		
	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3
<b>50</b>	29.16 <sup>a</sup> (3.43)	37.27 <sup>b</sup> (3.64)	43.11 <sup>b</sup> (4.34)	4.03 <sup>b</sup> (0.84)	3.43 <sup>ab</sup> (0.52)	2.98 <sup>a</sup> (0.07)	7.66 <sup>b</sup> (0.77)	6.57 <sup>ab</sup> (1.15)	4.42 <sup>a</sup> (1.93)
<b>100</b>	46.83 <sup>a</sup> (11.64)	44.93 <sup>a</sup> (9.70)	40.19 <sup>a</sup> (7.10)	2.70 <sup>a</sup> (0.49)	2.94 <sup>a</sup> (0.36)	2.97 <sup>a</sup> (0.25)	7.22 <sup>a</sup> (0.61)	8.87 <sup>a</sup> (1.04)	6.90 <sup>a</sup> (2.82)
<b>200</b>	37.80 <sup>a</sup> (14.99)	48.22 <sup>a</sup> (12.41)	62.52 <sup>a</sup> (12.11)	2.88 <sup>a</sup> (0.14)	2.94 <sup>a</sup> (0.22)	2.86 <sup>a</sup> (0.12)	9.00 <sup>b</sup> (0.69)	9.32 <sup>b</sup> (1.64)	5.71 <sup>a</sup> (0.90)
<b>300</b>	34.80 <sup>a</sup> (12.55)	28.13 <sup>a</sup> (5.67)	34.51 <sup>a</sup> (4.70)	2.64 <sup>a</sup> (0.11)	3.19 <sup>a</sup> (0.47)	2.78 <sup>a</sup> (0.32)	7.75 <sup>b</sup> (0.59)	8.87 <sup>b</sup> (1.24)	6.20 <sup>a</sup> (0.28)

## III.2.2. Ácidos grasos

### III.2.2.1. Microalgas

Las microalgas empleadas en este estudio fueron seleccionadas debido a sus marcadas diferencias en cuanto a tamaño, morfología, capacidad motriz, relación entre contenido orgánico e inorgánico, composición bioquímica y, en particular, su composición de ácidos grasos poliinsaturados mayores como el ácido araquidónico (20:4n-6, ARA), ácido eicosapentaenoico (20:5n-3, EPA) y ácido docosahexaenoico (22:6n-3, DHA).

En la tabla 4 se describe con detalle la composición de ácidos grasos, expresada como porcentaje del total de ácidos grasos, encontrados en las microalgas *Chaetoceros calcitrans* e *Isochrysis galbana*.

*C. calcitrans* se caracterizó por la predominancia de los ácidos grasos 14:0, 16:1n-7, 16:3 y 20:5n-3 (EPA), los cuales consituyeron el 76.15% de los ácidos grasos reportados, en cambio *I. galbana* presentó una composición sustancialmente diferente, mostrando una predominancia de los ácidos grasos 14:0, 18:1n-9c, 18:2n-6c, 18:3n-3, 18:4n-3 y 22:6n-3 (DHA) que juntos comprendieron el 80.58% del total de ácidos grasos.

La relación ARA/DHA presentó mayores valores en *C. calcitrans* (1.40) que en *I. galbana* (0.01) y esta tendencia se invirtió cuando se comparó la relación DHA/EPA, encontrándose valores de 0.10 y 60.23. La relación n-3/n-6 mostró mayores valores en *I. galbana* (4.68) que en *C. calcitrans* (3.29), y esta primera microalga, en términos generales, también fue superior en cuanto al contenido total de HUFA's, PUFA's y ácidos grasos de las series n-3 y n-6 (Tabla 4).

Tabla 4. Valores medios de los porcentajes de ácidos grasos relativos al total de ácidos grasos, para las microalgas *Chaetoceros calcitrans* e *Isochrysis galbana*, empleadas como dietas para *Pseudodiaptomus euryhalinus*. Espacios en blanco indican ausencia del ácido graso correspondiente para esa microalga. Las letras iguales indican ausencia de diferencias significativas y las letras diferentes indican presencia de diferencias significativas (Prueba t-Student para muestras independientes,  $\alpha=0.05$ ). La desviación estándar fue omitida para dar claridad a los datos. n=4. n: número de réplicas.

	<i>Chaetoceros calcitrans</i>	<i>Isochrysis galbana</i>
<b>14:0</b>	8.73 <sup>b</sup>	13.02 <sup>a</sup>
<b>14:0 iso</b>	-	0.31
<b>14:1</b>	-	0.19
<b>15:0</b>	0.45 <sup>a</sup>	0.32 <sup>a</sup>
<b>16:0</b>	3.73 <sup>b</sup>	7.60 <sup>a</sup>
<b>16:1 n9</b>	-	0.13
<b>16:1 n7</b>	30.27 <sup>a</sup>	3.82 <sup>b</sup>
<b>16:2 n6</b>	3.48 <sup>a</sup>	0.20 <sup>b</sup>
<b>16:2 n4</b>	3.93 <sup>a</sup>	0.45 <sup>b</sup>
<b>16:3</b>	10.09 <sup>a</sup>	0.19 <sup>b</sup>
<b>16:4</b>	0.97	-
<b>18:0</b>	0.55 <sup>a</sup>	0.14 <sup>b</sup>
<b>18:1 n9c</b>	0.63 <sup>b</sup>	8.00 <sup>a</sup>
<b>18:1 n7</b>	0.67 <sup>b</sup>	1.10 <sup>a</sup>
<b>18:2 n6c</b>	1.25 <sup>b</sup>	10.16 <sup>a</sup>
<b>18:3 n6</b>	0.64 <sup>a</sup>	0.59 <sup>a</sup>
<b>18:3 n3</b>	0.54 <sup>b</sup>	10.65 <sup>a</sup>
<b>18:4 n3</b>	-	19.19
<b>20:0</b>	-	0.12
<b>18:5</b>	-	0.99
<b>20:3 n6</b>	-	0.10
<b>20:4 n6</b>	3.86 <sup>a</sup>	0.11 <sup>b</sup>
<b>20:5 n3</b>	27.06 <sup>a</sup>	0.32 <sup>b</sup>
<b>22:3</b>	-	2.54
<b>24:0</b>	0.34	-
<b>22:6 n3</b>	2.75 <sup>b</sup>	19.55 <sup>a</sup>
$\Sigma$ Saturados	13.80	21.51
$\Sigma$ Monoinsaturados	31.57	13.23
$\Sigma$ PUFA	54.57	65.05
$\Sigma$ HUFA	34.65	40.17
$\Sigma$ n3	30.36	52.26
$\Sigma$ n6	9.22	11.16
(n-3)/(n-6)	3.29	4.68
ARA/DHA	1.40	0.01
DHA/EPA	0.10	60.23

### III.2.2.2. Copépodos

Los análisis de ácidos grasos realizados a los copépodos de los distintos intervalos de tallas y tratamientos mostraron considerables variaciones tanto en la concentración como en la diversidad de estos compuestos. Esto puede ser una causa directa de las marcadas diferencias en la composición bioquímica de las dietas, así como del complejo metabolismo de lípidos que pueden presentar estos copépodos a lo largo de su desarrollo.

En general, ciertos ácidos grasos destacaron por su mayor concentración respecto al total reportado entre las tallas y tratamientos. Esta tendencia se presentó en los ácidos grasos 14:0, 16:0, 16:1n-7, 16:0 tetrametil, 18:0, 18:1n-9c, 18:1n-7, 18:2n-6c, 18:3n-3, 18:4n-3, 20:4n-6, 20:5n-3, 22:3 y 22:6n-3, los cuales presentaron porcentajes entre el 2% y el 42%.

Los copépodos alimentados con la microalga *C. calcitrans* (T1) presentaron los valores más altos de los ácidos grasos 18:1n-7, 20:4n-6 (ARA), 20:5n-3 (EPA), los que fueron alimentados con *I. galbana* (T2) fueron más altos en 14:0, 16:0, 18:1n-9c, 18:3n-3, 18:4n-3 y 22:3 y los copépodos alimentados con la mezcla de las dos microalgas (T3) mostraron una mayor concentración de los ácidos grasos 18:0 y 22:6n-3(DHA) respecto a los otros dos tratamientos. Aunque los análisis estadísticos realizados entre tratamientos mostraron diferencias significativas entre las concentraciones de varios de los ácidos grasos mencionados anteriormente, las tendencias descritas se mantuvieron sin variaciones a lo largo del desarrollo del copépodo *P. euryhalinus*, en los cuatro intervalos de talla muestreados (Tabla 5).

Tabla 5. Valores medios de los porcentajes de ácidos grasos relativos al total de ácidos grasos, para los organismos de *Pseudodiptomus euryhalinus* retenidos en las mallas de 50, 100, 200 y 300 $\mu$ m alimentados con las tres dietas T1, T2 y T3. Espacios en blanco indican ausencia del ácido graso correspondiente. Las letras iguales indican ausencia de diferencias significativas y las letras diferentes indican presencia de diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA de una vía,  $\alpha=0.05$ ). La desviación estándar fue omitida para dar claridad a los datos. n=4. n: número de réplicas.

	50			100			200			300		
	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3
<b>12:0</b>	-	-	0.19	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>14:0</b>	4.45 <sup>a</sup>	5.29 <sup>a</sup>	4.64 <sup>a</sup>	6.20 <sup>b</sup>	8.74 <sup>c</sup>	5.16 <sup>a</sup>	7.89 <sup>b</sup>	9.59 <sup>c</sup>	6.33 <sup>a</sup>	6.78 <sup>a</sup>	8.35 <sup>b</sup>	6.68 <sup>a</sup>
<b>14:0 iso</b>	0.43 <sup>b</sup>	0.37 <sup>b</sup>	0.18 <sup>a</sup>	0.26 <sup>b</sup>	0.14 <sup>a</sup>	0.13 <sup>a</sup>	0.26 <sup>a</sup>	0.22 <sup>a</sup>	0.21 <sup>a</sup>	0.41 <sup>c</sup>	0.25 <sup>b</sup>	0.25 <sup>a</sup>
<b>14:0 anteiso</b>	0.12 <sup>a</sup>	-	0.08 <sup>a</sup>	0.08 <sup>a</sup>	0.06 <sup>a</sup>	0.08 <sup>a</sup>	-	-	0.07	0.10 <sup>a</sup>	0.08 <sup>a</sup>	0.08 <sup>a</sup>
<b>15:0</b>	0.39 <sup>a</sup>	0.73 <sup>b</sup>	0.39 <sup>a</sup>	0.34 <sup>a</sup>	0.37 <sup>a</sup>	0.28 <sup>a</sup>	0.41 <sup>a</sup>	0.44 <sup>b</sup>	0.36 <sup>a</sup>	0.42 <sup>a</sup>	0.50 <sup>a</sup>	0.43 <sup>a</sup>
<b>15:0 iso</b>	0.14 <sup>b</sup>	0.11 <sup>a</sup>	0.07 <sup>a</sup>	0.05	-	-	-	-	-	-	0.08 <sup>a</sup>	0.07 <sup>a</sup>
<b>16:0</b>	11.05 <sup>a</sup>	14.35 <sup>c</sup>	12.36 <sup>b</sup>	10.29 <sup>b</sup>	9.54 <sup>a</sup>	11.27 <sup>c</sup>	8.67 <sup>a</sup>	9.37 <sup>a</sup>	9.57 <sup>a</sup>	8.69 <sup>a</sup>	9.45 <sup>a</sup>	9.22 <sup>a</sup>
<b>16:1 n9</b>	0.53 <sup>a</sup>	0.41 <sup>a</sup>	0.52 <sup>a</sup>	0.47 <sup>b</sup>	0.26 <sup>a</sup>	0.54 <sup>b</sup>	0.43 <sup>ab</sup>	0.29 <sup>a</sup>	0.46 <sup>b</sup>	0.61 <sup>b</sup>	0.28 <sup>a</sup>	0.48 <sup>b</sup>
<b>16:1 n7</b>	6.50 <sup>c</sup>	3.38 <sup>b</sup>	2.19 <sup>a</sup>	6.13 <sup>b</sup>	8.65 <sup>c</sup>	3.67 <sup>a</sup>	15.63 <sup>b</sup>	8.96 <sup>a</sup>	8.19 <sup>a</sup>	13.47 <sup>b</sup>	8.68 <sup>a</sup>	9.89 <sup>a</sup>
<b>16:1 n5</b>	0.24 <sup>b</sup>	0.19 <sup>ab</sup>	0.12 <sup>a</sup>	0.19 <sup>ab</sup>	0.25 <sup>b</sup>	0.13 <sup>a</sup>	0.26 <sup>a</sup>	0.25 <sup>a</sup>	0.25 <sup>a</sup>	0.45 <sup>b</sup>	0.26 <sup>a</sup>	0.30 <sup>a</sup>
<b>16:0 iso</b>	0.34 <sup>b</sup>	0.32 <sup>b</sup>	0.23 <sup>a</sup>	0.25 <sup>b</sup>	0.13 <sup>a</sup>	0.18 <sup>a</sup>	0.23 <sup>a</sup>	0.20 <sup>a</sup>	0.28 <sup>a</sup>	0.41 <sup>b</sup>	0.25 <sup>a</sup>	0.36 <sup>ab</sup>
<b>16:0 anteiso</b>	-	0.25 <sup>b</sup>	0.15 <sup>a</sup>	0.45 <sup>b</sup>	0.64 <sup>c</sup>	0.24 <sup>a</sup>	1.03 <sup>c</sup>	0.66 <sup>b</sup>	0.47 <sup>a</sup>	0.85 <sup>b</sup>	0.62 <sup>a</sup>	0.49 <sup>a</sup>
<b>16:0 tetrametil</b>	1.76 <sup>a</sup>	2.46 <sup>b</sup>	1.40 <sup>a</sup>	2.19 <sup>b</sup>	3.52 <sup>c</sup>	1.89 <sup>a</sup>	3.99 <sup>c</sup>	3.41 <sup>b</sup>	3.03 <sup>a</sup>	3.01 <sup>a</sup>	2.75 <sup>a</sup>	2.88 <sup>a</sup>
<b>16:3 n3</b>	-	-	-	0.81 <sup>b</sup>	1.15 <sup>c</sup>	0.38 <sup>a</sup>	1.82 <sup>c</sup>	1.26 <sup>b</sup>	0.80 <sup>a</sup>	1.33 <sup>b</sup>	1.18 <sup>b</sup>	0.80 <sup>a</sup>
<b>16:4</b>	-	-	-	-	-	-	0.19 <sup>b</sup>	0.28 <sup>c</sup>	0.10 <sup>a</sup>	0.13 <sup>b</sup>	0.24 <sup>c</sup>	0.09 <sup>a</sup>
<b>18:0</b>	5.54 <sup>a</sup>	6.21 <sup>b</sup>	6.31 <sup>b</sup>	4.21 <sup>b</sup>	2.76 <sup>a</sup>	5.39 <sup>c</sup>	4.45 <sup>b</sup>	2.71 <sup>a</sup>	4.78 <sup>b</sup>	3.23 <sup>a</sup>	3.01 <sup>a</sup>	3.87 <sup>b</sup>
<b>18:1 n9t</b>	0.22 <sup>a</sup>	0.66 <sup>b</sup>	0.15 <sup>a</sup>	0.18 <sup>a</sup>	0.17 <sup>a</sup>	0.25 <sup>a</sup>	0.21 <sup>a</sup>	0.21 <sup>a</sup>	0.60 <sup>a</sup>	0.24 <sup>a</sup>	1.13 <sup>a</sup>	0.33 <sup>a</sup>
<b>18:1 n9c</b>	1.09 <sup>a</sup>	3.12 <sup>c</sup>	1.84 <sup>b</sup>	1.40 <sup>a</sup>	2.37 <sup>b</sup>	1.26 <sup>a</sup>	1.15 <sup>a</sup>	2.98 <sup>b</sup>	1.66 <sup>a</sup>	0.94 <sup>a</sup>	3.00 <sup>c</sup>	1.53 <sup>b</sup>
<b>18:1 n7</b>	3.29 <sup>c</sup>	2.02 <sup>b</sup>	1.76 <sup>a</sup>	2.21 <sup>b</sup>	1.46 <sup>a</sup>	1.60 <sup>a</sup>	2.35 <sup>c</sup>	1.49 <sup>a</sup>	1.87 <sup>b</sup>	3.17 <sup>c</sup>	1.72 <sup>a</sup>	2.40 <sup>b</sup>
<b>18:2 n6c</b>	1.12 <sup>a</sup>	1.57 <sup>b</sup>	1.00 <sup>a</sup>	1.41 <sup>b</sup>	2.13 <sup>c</sup>	1.11 <sup>a</sup>	1.59 <sup>a</sup>	2.46 <sup>b</sup>	1.51 <sup>a</sup>	1.45 <sup>a</sup>	2.28 <sup>c</sup>	1.57 <sup>b</sup>
<b>18:3 n6</b>	0.25 <sup>b</sup>	-	0.17 <sup>a</sup>	0.38 <sup>ab</sup>	0.51 <sup>b</sup>	0.25 <sup>a</sup>	0.43 <sup>b</sup>	0.56 <sup>b</sup>	0.35 <sup>a</sup>	0.42 <sup>a</sup>	0.51 <sup>b</sup>	0.38 <sup>a</sup>
<b>18:3 n3</b>	0.64 <sup>a</sup>	1.50 <sup>c</sup>	0.76 <sup>b</sup>	1.25 <sup>b</sup>	3.02 <sup>c</sup>	1.06 <sup>a</sup>	0.49 <sup>a</sup>	3.70 <sup>c</sup>	1.29 <sup>b</sup>	0.48 <sup>a</sup>	3.02 <sup>c</sup>	1.23 <sup>b</sup>
<b>18:4 n3</b>	0.88 <sup>a</sup>	1.57 <sup>b</sup>	0.75 <sup>a</sup>	1.96 <sup>b</sup>	5.36 <sup>c</sup>	1.37 <sup>a</sup>	0.99 <sup>a</sup>	6.86 <sup>c</sup>	1.95 <sup>b</sup>	0.83 <sup>a</sup>	4.64 <sup>c</sup>	1.71 <sup>b</sup>
<b>20:0</b>	0.44 <sup>a</sup>	0.85 <sup>b</sup>	0.32 <sup>a</sup>	0.23 <sup>ab</sup>	0.18 <sup>a</sup>	0.31 <sup>b</sup>	0.61 <sup>a</sup>	0.22 <sup>a</sup>	0.44 <sup>a</sup>	0.21 <sup>a</sup>	0.24 <sup>a</sup>	0.26 <sup>a</sup>
<b>20:1</b>	0.26 <sup>b</sup>	-	0.11 <sup>a</sup>	0.20 <sup>b</sup>	0.10 <sup>a</sup>	0.11 <sup>a</sup>	0.24 <sup>b</sup>	-	0.15 <sup>a</sup>	0.27 <sup>b</sup>	0.16 <sup>a</sup>	0.16 <sup>a</sup>
<b>20:2 n9</b>	0.31 <sup>a</sup>	0.32 <sup>a</sup>	0.24 <sup>a</sup>	0.33 <sup>b</sup>	0.30 <sup>ab</sup>	0.26 <sup>a</sup>	0.26 <sup>a</sup>	0.33 <sup>b</sup>	0.27 <sup>a</sup>	0.36 <sup>a</sup>	0.44 <sup>a</sup>	0.37 <sup>a</sup>
<b>21:0</b>	0.30 <sup>a</sup>	0.58 <sup>b</sup>	0.48 <sup>b</sup>	0.29 <sup>a</sup>	0.55 <sup>b</sup>	0.45 <sup>b</sup>	-	0.56	-	-	0.67 <sup>b</sup>	0.30 <sup>a</sup>

Tabla 5. (Continuación)

	50			100			200			300		
	T1	T2	T3									
<b>20:3 n6</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.12 <sup>a</sup>	0.08 <sup>a</sup>
<b>20:4 n6</b>	2.79 <sup>c</sup>	1.29 <sup>a</sup>	1.81 <sup>b</sup>	2.77 <sup>c</sup>	1.53 <sup>a</sup>	1.97 <sup>b</sup>	3.06 <sup>c</sup>	1.37 <sup>a</sup>	2.40 <sup>b</sup>	3.84 <sup>c</sup>	1.43 <sup>a</sup>	2.83 <sup>b</sup>
<b>22:0</b>	0.90 <sup>b</sup>	0.71 <sup>a</sup>	0.90 <sup>b</sup>	0.77 <sup>c</sup>	0.43 <sup>a</sup>	0.69 <sup>b</sup>	0.44 <sup>b</sup>	0.32 <sup>a</sup>	0.49 <sup>b</sup>	0.56 <sup>b</sup>	0.36 <sup>a</sup>	0.53 <sup>b</sup>
<b>20:5 n3</b>	19.44 <sup>c</sup>	9.51 <sup>a</sup>	12.27 <sup>b</sup>	16.94 <sup>c</sup>	11.36 <sup>a</sup>	13.02 <sup>b</sup>	18.09 <sup>c</sup>	9.30 <sup>a</sup>	15.34 <sup>b</sup>	21.78 <sup>c</sup>	12.07 <sup>a</sup>	16.46 <sup>b</sup>
<b>22:1 n9</b>	0.82 <sup>b</sup>	-	0.35 <sup>a</sup>	0.82 <sup>c</sup>	0.27 <sup>a</sup>	0.41 <sup>b</sup>	0.80 <sup>c</sup>	0.19 <sup>a</sup>	0.44 <sup>b</sup>	1.09 <sup>c</sup>	0.20 <sup>a</sup>	0.53 <sup>b</sup>
<b>22:1 n7</b>	0.19 <sup>a</sup>	-	0.08 <sup>a</sup>	0.21 <sup>b</sup>	-	0.10 <sup>a</sup>	0.28 <sup>b</sup>	-	0.15 <sup>a</sup>	0.34 <sup>b</sup>	-	0.19 <sup>a</sup>
<b>23:0</b>	0.23 <sup>a</sup>	0.58 <sup>c</sup>	0.51 <sup>b</sup>	0.27 <sup>a</sup>	0.41 <sup>b</sup>	0.47 <sup>b</sup>	-	0.33 <sup>b</sup>	0.26 <sup>a</sup>	-	0.27 <sup>a</sup>	0.23 <sup>a</sup>
<b>23:4</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.29 <sup>a</sup>	0.26 <sup>a</sup>
<b>22:4</b>	0.47 <sup>a</sup>	0.20 <sup>a</sup>	0.26 <sup>a</sup>	0.46 <sup>b</sup>	0.41 <sup>b</sup>	0.27 <sup>a</sup>	0.37 <sup>a</sup>	0.36 <sup>a</sup>	0.31 <sup>a</sup>	0.44	-	-
<b>22:4</b>	0.30 <sup>b</sup>	-	0.12 <sup>a</sup>	0.27 <sup>b</sup>	-	0.10 <sup>a</sup>	0.20 <sup>a</sup>	-	0.15 <sup>a</sup>	0.42 <sup>c</sup>	0.10 <sup>a</sup>	0.23 <sup>b</sup>
<b>22:3</b>	1.49 <sup>a</sup>	2.06 <sup>b</sup>	1.82 <sup>b</sup>	1.62 <sup>a</sup>	1.90 <sup>b</sup>	1.84 <sup>ab</sup>	0.62 <sup>a</sup>	2.12 <sup>c</sup>	1.44 <sup>b</sup>	0.95 <sup>a</sup>	2.10 <sup>c</sup>	1.43 <sup>b</sup>
<b>24:0</b>	1.40 <sup>c</sup>	0.76 <sup>a</sup>	1.28 <sup>b</sup>	1.38 <sup>b</sup>	0.49 <sup>a</sup>	1.16 <sup>b</sup>	0.87 <sup>b</sup>	0.29 <sup>a</sup>	0.87 <sup>b</sup>	1.03 <sup>c</sup>	0.26 <sup>a</sup>	0.82 <sup>b</sup>
<b>22:5</b>	1.81 <sup>b</sup>	-	0.44 <sup>a</sup>	1.23 <sup>c</sup>	0.21 <sup>a</sup>	0.34 <sup>b</sup>	1.04 <sup>c</sup>	0.22 <sup>a</sup>	0.43 <sup>b</sup>	1.72 <sup>c</sup>	0.34 <sup>a</sup>	0.67 <sup>b</sup>
<b>24:1</b>	1.07 <sup>a</sup>	1.48 <sup>b</sup>	1.73 <sup>c</sup>	1.25 <sup>a</sup>	1.22 <sup>a</sup>	1.59 <sup>b</sup>	0.78 <sup>a</sup>	1.28 <sup>b</sup>	1.49 <sup>c</sup>	0.97 <sup>a</sup>	1.53 <sup>b</sup>	1.55 <sup>b</sup>
<b>22:6 n3</b>	28.79 <sup>a</sup>	37.13 <sup>b</sup>	42.00 <sup>c</sup>	30.24 <sup>a</sup>	29.18 <sup>a</sup>	40.68 <sup>b</sup>	19.87 <sup>a</sup>	27.20 <sup>b</sup>	31.25 <sup>c</sup>	18.60 <sup>a</sup>	27.11 <sup>b</sup>	28.04 <sup>b</sup>
∑ Saturados	27.50	33.58	29.50	27.27	27.97	27.68	28.85	28.32	27.15	25.70	27.13	26.48
∑ Monoinsaturados	14.22	11.26	8.85	13.06	14.75	9.67	22.13	15.66	15.25	21.55	16.98	17.38
∑ PUFA	58.29	55.15	61.65	59.67	57.07	62.64	49.02	56.02	57.60	52.74	55.89	56.14
∑ HUFA	54.48	49.70	57.65	53.87	48.06	57.74	43.81	45.59	51.93	47.76	46.23	50.27
∑n3	49.75	49.71	55.78	51.20	50.08	56.50	41.26	48.32	50.64	43.03	48.03	48.25
∑n6	4.16	2.87	2.98	4.55	4.16	3.33	5.08	4.39	4.26	5.70	4.35	4.86
(n-3)/(n-6)	11.97	17.33	18.69	11.24	12.03	16.97	8.13	11.01	11.89	7.55	11.05	9.93
ARA/DHA	0.10	0.03	0.04	0.09	0.05	0.05	0.15	0.05	0.08	0.21	0.05	0.10
DHA/EPA	1.48	3.90	3.42	1.79	2.57	3.13	1.10	2.93	2.04	0.85	2.25	1.70

El contenido de los ácidos grasos metil esterificados mayores encontrados en las microalgas se observa en la figura 6. Los niveles de ácidos linoleico (18:2n6c, LA) y linolénico (18:3n-3, LNA) fueron de 10.16% y 10.65%, significativamente mayores en la flagelada *I. galbana*, que en la diatomea *C. calcitrans*, con valores más bajos de 1.25% y 0.54% para cada ácido graso. Esta tendencia se invirtió en los ácidos grasos araquidónico (20:4n-6, ARA) y eicosapentaenoico (20:5n-3, EPA), donde *C. calcitrans* mostró mayores valores de 3.86 y 27.06% que los encontrados en *I. galbana* 0.11 y 0.32% para ARA y EPA respectivamente y en la concentración de ácido docosahexaenoico (22:6n-3, DHA) *I. galbana* (19.55%) sobresalió nuevamente sobre *C. calcitrans* (2.75%) (Figura 6).

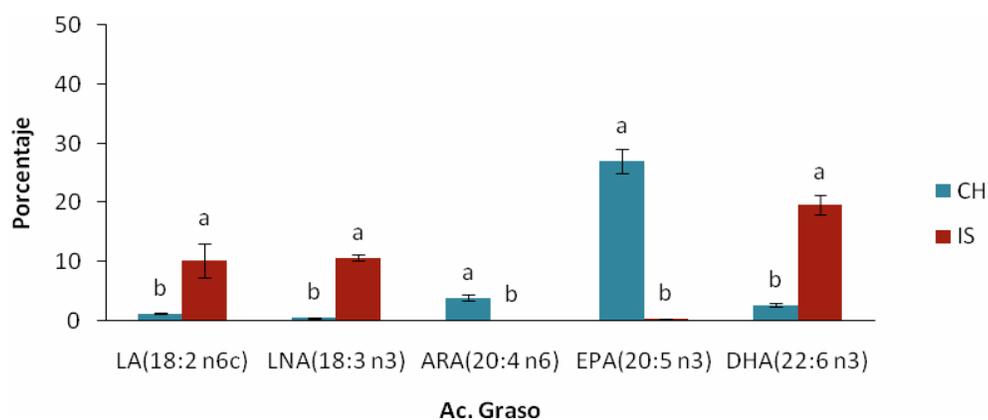


Figura 6. Comparación de la composición de los ácidos grasos mayores de las microalgas *Chaetoceros calcitrans* (CH) e *Isochrysis galbana* (IS). Valores expresados en porcentaje respecto al total de ácidos grasos y su respectiva desviación estándar. Las letras diferentes indican presencia de diferencias significativas entre tratamientos. n=4. n: número de réplicas.

En la figura 7 se compara la concentración media porcentual de los ácidos grasos mayores encontrados en el copépodo *P. euryhalinus* en cada intervalo de talla muestreado. Se puede observar una tendencia a la predominancia de los ácidos grasos EPA y DHA en todas las tallas, lo cual refleja notablemente la composición de ácidos grasos de las microalgas *C. calcitrans* e *I. galbana* que se emplearon como dietas. De igual forma, al comparar los tratamientos dentro de cada talla, se observa que la composición de ácidos grasos de los copépodos varió proporcionalmente a la concentración de ácidos grasos aportados por cada microalga.

En todos los casos los ácidos grasos dominantes en los copépodos fueron el EPA y el DHA, los cuales destacaron sobre los ácidos grasos LA, LNA y ARA, que mostraron tendencias a una concentración más baja respecto a los primeros en todos los intervalos de talla, así como diferencias significativas entre los tratamientos.

Al comparar las concentraciones de ácidos grasos mayores entre los tratamientos agrupados dentro de cada talla se observó que, en casi todos los casos, los tratamientos mostraron diferencias significativas entre sí, a excepción de las tallas 50-100 $\mu\text{m}$  y 100-200 $\mu\text{m}$  donde las concentraciones de LA no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos T1 y T3. Una tendencia similar se encontró al comparar las concentraciones de DHA entre los tratamientos de las tallas 100-200 $\mu\text{m}$  y 300 $\mu\text{m}$  o más, donde no se observó diferencia entre los tratamientos T1 y T2 para la talla 100-200 $\mu\text{m}$  y entre los tratamientos T2 y T3 para la talla 300 $\mu\text{m}$  o más.

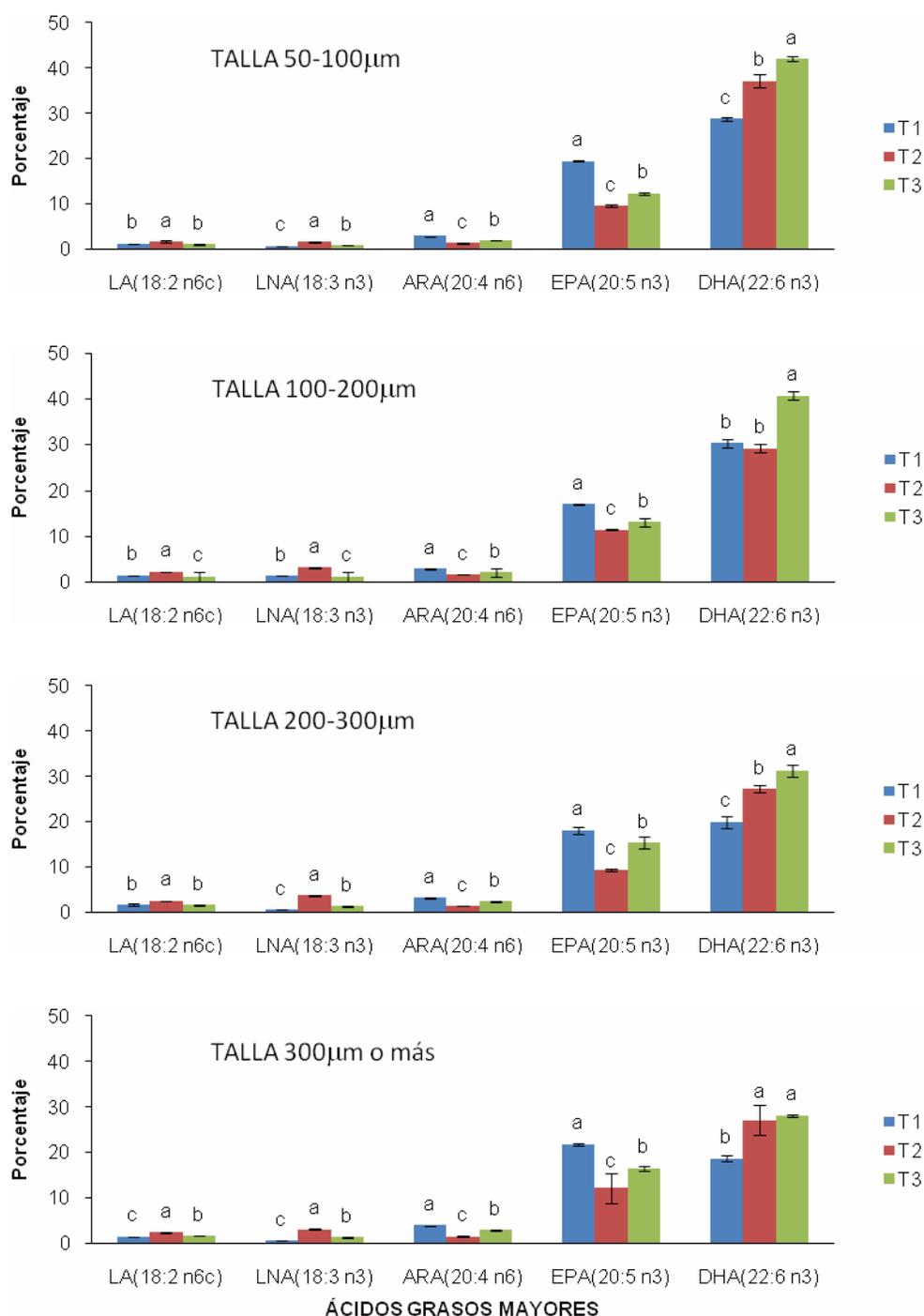


Figura 7. Comparación de la composición de los ácidos grasos mayores de copépodos *Pseudodiaptomus euryhalinus* alimentados con tres dietas (T1, T2 y T3) y comprendidos en cada intervalo de talla. Valores expresados en porcentaje respecto al total de ácidos grasos y su respectiva desviación estándar. Las letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA de una vía,  $\alpha = 0.05$ ). n=4. n: número de réplicas.

#### IV. Discusión

Es un fenómeno común en la naturaleza y en los procesos de dinámica trófica que la materia y la energía viajan a través de mecanismos heterogéneos (p.ej. el catabolismo y el anabolismo). Esta diversidad es característica de las dietas animales, cuyas estrategias alimenticias han ido evolucionando a través del tiempo para volverse cada vez más eficientes y asegurar la permanencia de las poblaciones mediante la optimización de la ganancia nutricional de los organismos que las conforman (Kleppel, 1993).

El principal objetivo de la alimentación es obtener la energía y los compuestos necesarios para el correcto desempeño del organismo y, gracias a esto, garantizar la supervivencia y reproducción del mismo permitiendo la continuidad de la especie. Para alcanzar este fin las dietas de los copépodos tienden a ser diversas, incrementando las posibilidades de cubrir sus necesidades nutricionales y reflejando la complejidad de las cadenas tróficas en los ecosistemas marinos (Kleppel, 1993). Los organismos requieren el alimento en cantidad y calidad adecuadas a cada estadio de desarrollo y si alguna de estas características no corresponde con sus necesidades, sus efectos se manifestarán en su crecimiento, supervivencia y reproducción. Hay muchos factores que determinan la calidad del alimento de diferente manera, el tamaño, la textura, la toxicidad, tienen influencia sobre la eficiencia de ingestión, mientras que los factores de composición bioquímica y los que afectan la eficiencia de asimilación, determinan el valor nutritivo lo que se refleja en la eficiencia de crecimiento del organismo (Libourel-Houde y Roman, 1987).

En el presente trabajo se estudió el efecto de las microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Isochrysis galbana* y la mezcla de ambas empleadas como dietas en el crecimiento y desarrollo individual y poblacional y en la composición bioquímica y de ácidos grasos del copépodo calanoide *Pseudodiaptomus euryhalinus*. Este organismo se encuentra en la Bahía de La Paz de donde fue aislado; su cultivo en el laboratorio demostró que es factible el mantenerlo con las dietas empleadas y también que pueden tener crecimientos controlados predecibles. En general los copépodos han demostrado ser mejores alimentos vivos para larvas de peces, en comparación con otros alimentos vivos tales como *Artemia* y rotíferos (Cheng-Sheng *et al.* 2005; Marcus, 2005) y específicamente los nauplios pelágicos de los copépodos calanoides (Bell *et.al.*, 2003, Drillet *et.al.*, 2006), son mas adecuados

como alimento de la mayoría de las larvas de peces marinos que los nauplios epibentónicos de los copépodos harpacticoides, además es generalmente aceptado que, dentro de la cadena alimenticia, los copépodos constituyen la mayor parte del alimento de las larvas de peces marinos, y que éstos cuentan con los requerimientos nutricios que las larvas necesitan (Evjemo *et. al.*, 2003).

La producción sostenida de estos organismos ha demostrado ser difícil, sin embargo ha habido algunos buenos resultados en el cultivo intensivo, con sistemas continuos automatizados que emplean menos espacio (Payne y Rippingale, 2001).

Se ha considerado que la presencia de los ácidos grasos esenciales en los organismos permite un buen desarrollo; en el caso de los copépodos (y otros organismos usados como alimento vivo) una composición rica en estos compuestos esenciales, promueve de forma importante el normal desarrollo de las larvas de peces marinos (Støttrup, 2000), por lo que su estudio representa el primer paso para evaluar su potencial nutritivo como alimento vivo en acuicultura de peces.

Además de los nutrientes mayores existen los denominados micronutrientes, que incluyen pigmentos, vitaminas, minerales y elementos traza. Estos han sido poco estudiados en larvas y juveniles de peces marinos (van der Meeren *et. al.*, 2007), lo que probablemente ha provocado un bajo interés en su estudio para copépodos calanoides.

Las proteínas son compuestos que cumplen diversas funciones en los seres vivos, éstas pueden ser estructurales (formando parte de membranas y tejidos musculares) o catalíticas (acelerando reacciones por medio de enzimas). Las proteínas resultan de la unión de aminoácidos clasificados en esenciales o no esenciales, dependiendo de la capacidad de los organismos para sintetizarlos y contribuyen activamente en la formación de tejidos para efectuar reposición de fibras dañadas o en el crecimiento.

Los trabajos sobre componentes bioquímicos en microalgas muestran resultados diversos de acuerdo a la especie, condiciones de cultivo y fase de crecimiento en que se encuentren y en el caso de proteínas se han reportado valores más altos de estos compuestos respecto a las otras macromoléculas (Pernet *et.al.*, 2003; Phaterpekar *et.al.*, 2000; Renaud *et.al.*, 2002) especialmente durante la fase de crecimiento exponencial.

Renaud *et.al.*, (2002), Sánchez-Saavedra & Voltolina (2006) y Abalde *et.al.*, (1999) reportaron valores de proteínas en cultivos de *Chaetoceros* sp. de 57.1%, 38.4% y 33% respectivamente, datos fueron mayores que los encontrados en el presente trabajo, que mostró una concentración de 23.45% para *C. calcitrans*.

Una tendencia similar se observó en cultivos del género *Isochrysis* en los trabajos realizados por Renaud *et.al.*, (2002), Valenzuela, (2002) y Whyte, (1987) con porcentajes de proteína de 50.8%, 45.31% y 33.44%, similares en este último caso a los del presente trabajo (31.82%).

Los carbohidratos tienen como función principal ser una fuente energética de rápido uso en los organismos (Krogdahl *et.al.* 2005), los valores que se han obtenido son similares a los obtenidos en otros trabajos (Aman & Altaff, 2004; Kleppel, 1993; van der Meeren. *et.al.*, 2008).

En cultivos de *Chaetoceros* realizados en un laboratorio de Bahía de Kino, Sonora, López-Elías *et. al.* (2004) reportaron que en cultivos realizados en bolsas de 500 litros se presentaban fluctuaciones en la proteínas de 29.4-49%, carbohidratos de 2.8-6.3% y lípidos de 5.7-10.6%. Estos datos resultaron muy similares a los encontrados en el presente trabajo para microalgas del mismo género, las cuales fueron cultivadas también en bolsas bajo un sistema tipo batch en el que las microalgas se encontraban en la fase exponencial al momento de tomar la muestra para realizar los análisis bioquímicos.

Los lípidos, se pueden dividir en simples y complejos; los primeros son fundamentalmente lípidos de reserva energética y en fitoplancton como en zooplancton incluyen las ceras, diacilglicéridos, monoacilglicéridos, triacilglicéridos y esteroides. Los lípidos complejos o polares forman parte de la estructura de las membranas celulares, e incluyen los glicerofosfolípidos y esfingolípidos. Otra función también de estos compuestos es la reguladora en el caso de los esteroides. Los ácidos grasos que también son lípidos, en algunos casos además pueden funcionar como precursores de eicosanoides (prostaglandinas, leucotrienos o tromboxanos), que son sustancias parácrinas con efecto parecido a las hormonas, pues regulan procesos de inflamación, vasodilatación, vasoconstricción y coagulación (Carreón-Palau, 2007).

Usando como criterio los resultados obtenidos en el crecimiento y reproducción del copépodo calanoide *Gladioferens imparipes* alimentado con cuatro dietas monoalgales, Rippingale & Payne (2001), encontraron que las dos mejores especies para su cultivo en orden de importancia eran *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros gracilis*, y que una de las posibles causas era la mejor digestibilidad de estas microalgas y su adecuada composición de ácidos grasos esenciales HUFA's. Existen otras referencias del valor alimenticio de estas microalgas, medido en términos de crecimiento larvario de bivalvos y crustáceos (Phatarpekar *et. al.*, 2000, Aman & Altaff, 2004, Isiordia *et. al.*, 2006, Rivero-Rodríguez *et. al.*, 2007), que han demostrado que especies del género *Chaetoceros* y del género *Isochrysis* son de los mejores alimentos (Sánchez-Saavedra & Voltolina, 2006, Prieto *et. al.* 2006, Silva, 1999, Koski *et. al.* 2006, Liu & Lin, 2001), además de que estas microalgas son de fácil cultivo lo que también es muy importante de considerar cuando se piensa en una aplicación a nivel de laboratorios de producción. En el caso del copépodo calanoide *Pseudodiaptomus euryhalinus* estas referencias se tomaron como base para su empleo como dietas, y los resultados han corroborado su buena calidad.

Los resultados del peso de las microalgas empleadas mostraron diferencias importantes, sin embargo, las raciones de alimento suministradas a los copépodos en los tres tratamientos fueron suministradas *ad libitum*, considerando la poca información que se ha generado hasta el momento sobre las estrategias alimenticias que presenta este organismo y el complejo comportamiento que se ha reportado para el grupo de copépodos calanoides, los cuales tienden a seleccionar su alimento en base al tamaño de partícula, estímulos visuales y estímulos químicos entre otros (Kleppel, 1993) lo que en algunos casos explica en parte el que sean carnívoros (Lonsdale *et al.* 1979).

Según lo sugerido por Kleppel (1993), la composición química (nutricional) de los copépodos es particularmente variable, pues llegan a presentar coeficientes de variación muy altos, especialmente en el caso de los lípidos totales (89%) respecto a proteínas (54%) y carbohidratos (36%) en el medio ambiente a lo largo del año. Esto probablemente está relacionado con el que los nutrientes mayores interactúan activamente entre sí, como ocurre en ciertos lípidos que facilitan el metabolismo de proteínas (Roman, 1984), lo cual cobra mayor importancia durante eventos como los cambios estacionales, la edad y la

respuesta fisiológica inmediata como respuesta a variaciones medioambientales. De este modo, las estrategias para el uso de los nutrientes deben ocuparse de dos funciones primordiales e íntimamente relacionadas entre sí: optimizar la adquisición de nutrientes escasos pero importantes y satisfacer las necesidades nutricionales y fisiológicas inmediatas del organismo.

De acuerdo con Roman, (1991), la mayor utilización de lípidos y carbohidratos por parte de los copépodos en desarrollo coincide con un incremento en las concentraciones de proteínas, lo cual explicaría que los aumentos en la concentración de proteínas para cada tratamiento fueron coincidentes con una disminución en los valores de carbohidratos y lípidos. Este aumento en la concentración de proteínas estaría destinado a su uso para el crecimiento y la disminución observada en los niveles de lípidos y carbohidratos del presente estudio sería coincidente con su uso en forma de energía para el mantenimiento del organismo durante los periodos marcados de crecimiento.

Los copépodos alimentados con la mezcla de microalgas (T3) mostraron una tendencia más marcada a tener mayores concentraciones de proteínas respecto a lípidos y carbohidratos, que los copépodos alimentados con los otros dos tratamientos (T1 y T2). Esto respalda la idea de que la mejor composición nutricional ocasionada por la mezcla de microalgas permite al copépodo destinar una mayor concentración de proteínas a su crecimiento.

Al comparar los resultados de dietas monoalgales y mixtas sobre la tasa de desarrollo del copépodo calanoide *Acartia sinjiensis*, Knuckey *et.al.* (2005) encontraron que las dietas mixtas promovían mayores tasas de desarrollo en los copépodos que las dietas monoalgales, probablemente debido a que las dietas mixtas pueden complementar las deficiencias nutricionales que tengan las microalgas entre sí, pero es notorio que en dicho estudio al suministrar *Isochrysis* sp. (T.ISO) como única dieta, ésta promovió una menor tasa de desarrollo de *A. sinjiensis*, pero los copépodos alimentados con esta microalga mostraron una mejor condición física, así como reservas lipídicas mayores y más fácilmente distinguibles que los copépodos alimentados con *Rhodomonas*, lo cual es un índice de los buenos resultados con el empleo de esta microalga como dieta única para los copépodos.

Roman (1991) observó que durante el desarrollo del copépodo calanoide *Acartia tonsa*, especialmente en los estadios tempranos de desarrollo, el carbono es consumido en forma de proteínas a una tasa muy alta, pero las hembras adultas lo asimilan a tasas más elevadas que los copepoditos inmaduros. Esto coincide con las menores concentraciones de proteínas observadas en los nauplios y los organismos adultos de los tratamientos T1 y T2, los cuales mostraron menores valores de proteínas respecto a los copepoditos del intervalo de talla 100-200 $\mu$ m.

En cuanto a la concentración de lípidos encontrada en los copéodos *P. euryhalinus*, se observó que los valores promedio obtenidos entre todas las tallas (7.95%,T1; 8.40%,T2; 5.81%,T3) fueron inferiores a los encontrados por otros autores para copéodos calanoides con dietas microalgales similares, en los que se encontraron concentraciones variables de lípidos entre 24.7% y 25.4% (Kleppel, 1993, Aman & Altaff, 2004), sin embargo, es de resaltar que el análisis detallado de los ácidos grasos encontrados entre estos estudios mostró similitudes en las proporciones de los ácidos grasos reportados en el presente trabajo.

Evjemo *et. al.* (2003) encontraron que el copépodo *Calanus finmarchicus* obtenido del medio silvestre presenta un incremento constante en su nivel de lípidos totales a lo largo de su desarrollo, mostrando valores de 11.9% en el estadio de nauplio I, 13.2% en copepodito II, 14.3% en copepodito III, 23.2% en los estadios de copepodito IV y V y 24.7 en copéodos adultos. Esto nos indica diferencias sustanciales respecto a los datos obtenidos en el presente estudio, donde los valores de lípidos totales de *P. euryhalinus* fueron más bajos y menos constantes en todas las tallas (Tabla 3) que los encontrados por Evjemo *et.al.* (2003). Sin embargo, el origen silvestre de *Calanus finmarchicus* podría explicar su mayor estabilidad y concentración de lípidos totales, debido a que en el medio natural tiene una mayor probabilidad de encontrar y consumir una amplia variedad de microalgas que le provean de una nutrición más completa, además de estar exento de los factores de estrés asociados a un cultivo controlado.

Dadas las marcadas diferencias observadas en estudios previos entre organismos silvestres y de cultivo respecto a su composición bioquímica (van der Meeren *et. al.*, 2008), no sería extraño encontrar diferencias entre los datos encontradas en el presente estudio y posibles

estudios futuros sobre perfil nutricional de copépodos silvestres de la especie *Pseudodiaptomus euryhalinus*.

Mientras los copépodos que se alimentan del bentos, como los harpacticoides, tienen la capacidad de sintetizar HUFA's a través de la elongación de ácidos grasos poliinsaturados de cadena corta (Nanton & Castell, 1999), los predadores del fitoplancton deben obtener este tipo de ácidos grasos esenciales directamente de su dieta (Evjemo *et. al.*, 2003, Støttrup, 2000).

Sargent *et. al.*, 1997 reporta que una relación DHA:EPA de 2:1 es deseable en las dietas larvarias para garantizar el buen desarrollo de estructuras asociadas al sistema nervioso y el crecimiento larvario, por lo cual resulta esencial estudiar la proporción de dicho compuesto en copépodos usados como alimento vivo y en las dietas microalgales que promuevan esta condición en los mismos. En el presente estudio se encontró que la relación DHA/EPA (Tabla 5) sólo fue inferior a lo recomendado por Sargent *et.al.* (1997) en todos los copépodos alimentados con *C. calcitrans* (T1) y en los organismos adultos alimentados con la mezcla de microalgas (T3). Pese a esto, el mismo autor menciona que los requerimientos en la proporción de estos ácidos grasos es muy variable y la proporción que se suministre a las larvas dependerá de los requerimientos particulares de cada especie.

*I. galbana* ha sido reportada por Rivero-Rodríguez *et.al.* (2007), Payne & Rippingale (2000) y Renaud *et.al.* (2002) como una fuente rica en DHA (26.8%, 16.2% y 6.6%), pero deficiente en EPA (0.9%, 0.3% y 0.6 ), mientras que para *C. calcitrans* estos mismos autores encontraron una mayor concentración de EPA (26.3% y 25.2%) y una menor de DHA(2.3% y 2.4%), lo cual corresponde con los datos encontrados en el presente estudio (Tabla 4). Estas características junto con un mayor contenido de PUFAs de 16 carbonos especialmente de 16:1n-7 para las diatomeas (Thompson et al. 1992) y de PUFAs de 18 carbonos en el caso de las especies flageladas (Viso y Marty, 1993)

Se ha relacionado positivamente el efecto de la composición nutricia de los copépodos con la nutrición de las larvas de peces marinos haciendo especial énfasis en la composición de lípidos y en el contenido y proporción de de los ácidos grasos poliinsaturados docosahexaenoico (DHA), eicosapentaenoico (EPA) y araquidónico (ARA) (Bell, *et.al.*, 2003, Schipp, 2006, Støttrup, 2000).

La mayor parte de los trabajos recientes sobre alimentación de copépodos se han enfocado en la composición de los lípidos y ácidos grasos (Kleppel, 1993, McKinnon *et.al.*, 2003, Nanton & Castell, 1999, Prieto *et.al.*, 2006, Sargent *et.al.*, 1997, Støttrup, 2000, van der Meeren *et.al.*, 2008). Diversos estudios realizados sobre los ácidos grasos han señalado que seis de éstos (16:0, 16:1, 18:1, 18:2n-6, 18:3n-3 y 20:5n3), son considerados por la acuicultura como esenciales para peces y crustáceos (Brodtkorb *et.al.*, 1997, Malpica *et.al.*, 2004, Støttrup, 2000).

Las larvas de peces marinos requieren alimentos con altos niveles de ácidos grasos esenciales como el DHA, EPA y ARA, y por lo tanto los copépodos producidos en cautiverio como alimento vivo deberían contener altos niveles de éstos ácidos grasos esenciales de cadena larga. De acuerdo a Støttrup (2006) y Sargent *et.al.* (1999), los copépodos calanoides de cultivo deben tener estos ácidos grasos en sus dietas de microalgas debido a que carecen de la enzima necesaria para convertir EPA a DHA y pueden no tener las enzimas necesarias para desaturar o elongar cadenas de ácidos grasos que son indispensables en la conversión de ácido linoleico (18:2n-6) hacia ARA y ácido alfa-linolénico (18:3n-3) hacia EPA y ARA. Por otro lado, estos mismos autores han reportado que, a diferencia de los copépodos calanoides, los copépodos harpacticoides como *Tisbe holothuriae* sí cuentan con las enzimas  $\Delta$ -5 y  $\Delta$ -6 desaturasa y elongasa necesarias para la bioconversión de ácidos grasos de cadena corta n-3 hacia EPA y DHA (Støttrup, 2006; Sargent *et.al.*, 1999).

La baja concentración de *C. calcitrans* en los ácidos grasos linoleico (18:2n-6) y alfa-linolénico (18:3n-3) de 1.25% (LA) y 0.54% (LNA) comparadas con *I. galbana*, de 10.16% y 10.65% respectivamente (Figura 6), se observaron relacionadas con los valores encontrados en los copépodos alimentados con estas microalgas en todos los intervalos de talla (Figura 7). Los copépodos alimentados con *C. calcitrans*, mostraron un alto porcentaje de ARA y EPA. En todas las tallas analizadas, lo que llama la atención es el alto contenido de DHA que se observó en todas las tallas ya que este ácido graso fue suministrado en baja concentración, lo que se puede inferir es que este ac. graso pueda ser selectivamente retenido por los organismos ya que el alimento se suministra constantemente y en cantidades ad libitum, esto puede representar su relativa gran importancia para esta especie.

Los copépodos alimentados con *I. galbana*, que tuvieron un mayor suministro de ácido linoleico (LA) y alfa-linolénico (LNA) respecto de los alimentados con el T1, no mostraron niveles altos de dichos ácidos, mientras que en el caso de ARA y EPA, se observó lo opuesto, altos valores, lo que no se explica a partir de lo suministrado. Podría pensarse en una regulación para el mantenimiento de todos estos compuestos en el organismo, los mecanismos probables podrían ser el capturar o eliminar selectivamente estos compuestos. Otra posibilidad en el caso del EPA que prácticamente no se ha suministrado a los copépodos del T2 es la posibilidad de una retroconversión metabólica a partir del DHA, lo que ya se ha reportado en otros crustáceos como *Artemia* (Navarro *et al.*, 1999).

En cuanto al aporte de DHA, la microalga con mayor contenido de éste (*I. galbana*, T2) mostró un elevado enriquecimiento de este ácido graso en los copépodos, pero no tan alto como el observado por la mezcla de las dos microalgas (T3), que resultó mayor en los copépodos de todos los intervalos de talla.

Se ha sugerido por Pernet *et al.* (2003) que la composición bioquímica de *Chaetoceros muelleri* e *Isochrysis* sp. puede llegar a mostrar variaciones que representan una fuerte influencia en el éxito de cultivo de los organismos que las consuman. Estas variaciones se pueden presentar debido a inconsistencias en el control de los parámetros de cultivo ocasionados a su vez por fenómenos climáticos o errores humanos no previstos. Todos estos cambios pueden afectar la composición bioquímica de los copépodos que consumen estas microalgas, incluso en condiciones controladas de laboratorio. Es por esto que resulta difícil asegurar que los datos encontrados en la presente tesis se comporten de forma idéntica en el futuro, pero sin duda la descripción de estos resultados provee de una referencia valiosa para seleccionar en el futuro mejores y más eficientes dietas para usarse en el cultivo de larvas de peces marinos.

## V. Conclusiones

- 1) Los resultados mostraron que los tres tratamientos son adecuadas para ser usados como alimento de copépodos, sin embargo se puede establecer que el mejor de los tres fue el que incluía la mezcla de las dos microalgas (T3) debido al enriquecimiento conjunto de las dos microalgas sobre el copépodo.
- 2) El mayor número de copépodos encontrado en el intervalo de talla de 100-200 $\mu$ m indica que esta especie de copépodo puede usarse de forma más eficiente como alimento en peces u otros organismos que tengan una demanda de alimento vivo de esta talla en particular.
- 3) Aunque en los tres grupos de copépodos analizados se obtuvieron buenos resultados debido a una relación DHA/EPA que iguala o excede la proporción 2:1 de estos compuestos recomendada para dietas larvarias de peces marinos, esto no descarta la posibilidad de probar como dietas a otras especies de microalgas oleosas, como *Phaeodactylum tricornutum* y *Pavlova lutherii*, que mejoren el valor nutritivo de los copépodos al usarlos como alimento vivo en larvicultura.
- 4) La composición de ácidos grasos esenciales mayores en las condiciones experimentales se mantiene estable y predecible a lo largo del desarrollo del copépodo en los tres tratamientos evaluados.
- 5) La producción sistemática del copépodo *Pseudodiaptomus euryhalinus* de acuerdo a los resultados de este trabajo muestra un proceso de reclutamiento poblacional cíclico de aproximadamente 7 días.
- 6) El sistema de cultivo empleado para mantener al copépodo *Pseudodiaptomus euryhalinus* resulta adecuado para garantizar una producción estable y continua de copépodos con una composición de ácidos grasos esenciales adecuada para alimentar larvas de peces marinos.

## Recomendaciones

- 1) Es necesario hacer un análisis detallado de la composición de aminoácidos presentes en el copépodo, particularmente de los aminoácidos esenciales que son asimilados a través de las dietas, y que pueden quedar disponibles para los organismos que consuman al copépodo, así como un análisis de los lípidos polares y no polares que pueden encontrarse en este organismo.
- 2) Sería importante hacer un análisis de factibilidad económica para un cultivo intensivo piloto de *Pseudodiaptomus euryhalinus*, además de un cepario para copépodos calanoides con el cual se tenga una disponibilidad constante de organismos de alta calidad, alimentados con dietas preferentemente mixtas de acuerdo con los resultados obtenidos en esta tesis, empleando especies de microalgas que se complementen entre sí.
- 3) Plantear un diseño experimental en el que se pueda evaluar la viabilidad económica y el efecto de las dietas microalgales en los copépodos en términos de crecimiento en longitud, tiempo de generación, tasa de consumo de microalgas y tasa de producción de huevos en los adultos. Así como su factibilidad al suministrarlos como alimento vivo para larvas de peces marinos nativos del Golfo de California.
- 4) Evaluar los cambios morfológicos de *Pseudodiaptomus euryhalinus* empleando un microscopio compuesto y después mediante microscopía electrónica para identificar con precisión las fases de desarrollo que este organismo presenta a lo largo de su vida, así como las posibles deformidades que pudieran presentarse debido a una nutrición deficiente o, en su defecto, las características físicas deseables que estarían presentes en el copépodo al alimentarlo con dietas nutricionalmente completas.
- 5) Corroborar los datos presentados en esta tesis mediante técnicas analíticas diferentes para evaluar concentración de carbohidratos, lípidos y proteínas, para determinar la sensibilidad de las técnicas empleadas en este trabajo.

## VI. Bibliografía

- Abalde, J., Cid, A., Fidalgo, P., Torres, E. y Herrero, C. 1994. Microalgas: cultivo y aplicaciones. Universidad de La Coruña. Xunta de Galicia. 210 pp.
- Aman S. & Altaff K, 2004. Biochemical Profile of *Heliodiaptomus viduus*, *Sinodiaptomus* (*Rhinediaptomus*) *indicus*, and *Mesocyclops aspericornis* and their Dietary Evaluation for Postlarvae of *Macrobrachium rosenbergii*. *Zoological Studies* 43(2): 267-275
- Alfonso, 1999. Optimización del proceso de producción de semilla de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Percoidei:Serranidae) en sistemas de circulación cerrada. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN. 108pp.
- Araújo-Castro C.M.V. & Souza-Santos L.P., 2005. Are the diatoms *Navicula* sp. and *Thalassiosira fluviatilis* suitable to be fed to the benthic harpacticoid copepod *Tisbe biminiensis*? *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 327 58–69.
- Bell, J.G., McEvoy, L.A., Estevez, A., Shields, R.J. & Sargent, J.R., 2003, Optimising lipid nutrition in first-feeding flatfish larvae. *Aquaculture* 227, 211 –220
- Bligh, E.G. y Dyer, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917.
- Brodtkorb, T., 1997. Effects of dietary levels of 20:5n-3 and 22:6n-3 on tissue lipid composition in juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar*, with emphasis on brain and eye. *Aquac. Nutric.* 3:175-187.
- Carreón-Palau, L, R, Del Angel-Rodríguez, J. A, Arjona-López, M.O. 2007. Determinación de ácidos grasos por cromatografía de gases-espectrometría de masas. En: Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. Arredondo-Vega, B.O., Voltolina, D. (Eds.). Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La Paz, B.C.S., México. 81-97.

- Cheng-Sheng, Lee, O'Bryen, Patricia J., Marcus, Nancy H. 2005. Copepods in Aquaculture. Blackwell Publishing. 269pp.
- Contreras-Olguín, M., R.A. Rueda-Jasso; E. Matus-Nivón; J.L., Ortíz-Galindo; S. Dumas & Osorio-Galindo. 1997. Crianza de larvas y juveniles de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*. V Congreso Nacional de Ictiología. Facultad de Ciencias del Mar. Universidad Autónoma de Sinaloa. Mazatlán, Sinaloa. Febrero de 1997. P.99.
- Dabrowski, K. and R. Bardega, 1984. Mouth size and predicted food size preferences of larvae of three cyprinid fish species. *Aquaculture*, 40:41–46
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. y Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350-356.
- Evjemo, J. Reitan, K. I., Olsen, Y. 2003. Copepods as live food organisms in the larval rearing of halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.) with special emphasis on the nutritional value. *Aquaculture*, 227:191-210.
- FAO. 2006. El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura:2006. FAO Documentos Técnicos de Pesca N° 500. Roma.
- Hamre, K., 2006. Nutrition in cod (*Gadus morhua*) larvae and juveniles. *ICES Journal of Marine Science*, 63: 267-274.
- Hopp U. & Maier G. (2005) Survival and development of five species of cyclopoid copepods in relation to food supply: experiments with algal food in a flow-through system. *Freshwater Biology*, 50, 1454–1463
- Hunter, J.R. 1984. Synopsis of culture methods for marine fish larvae. Pp. 24 – 27 In: H.G. Moser; W.J. Cohen; M.P. Fahay; A.W. Kendall, Jr. y S.L. Richardson (Eds.). *Ontogeny and Systematics of Fishes. Am. Assoc. Ichthyol. Herpetol. Spec. Pub. 1.*
- Isiordia-Pérez E., Puello-Cruz A. D' Abramo L, González-Vega H. 2006. Evaluación de la actividad enzimática y contenido de proteína en larvas de camarón blanco

- Litopenaeus vannamei* alimentadas con diferentes dietas. Revista Electrónica de Veterinaria. VII 4:1-13.
- James, C.M. y A.M. Al-Khars. 1984. Studies on the production of planktonic copepods for aquaculture. *Annu. Res. Rep. Inst. Sci. Res. Kuwait*: 45-48.
- Johnson, M. W.1939. *Pseudodiaptomus (Pseudodiaptallous) euryhalinus* a new subgenus and species of copepoda, with preliminary notes on its ecology. *Trans. Am. Microsc. Soc.* 58(3): 349-355.
- Kitajima C., T. Arakawa, F. Oowa, S. Fujita, O. Imada, T. Watanabe, Y. Yone, 1980a. Dietary value for red sea bream larvae of rotifer *Brachionus plicatilis* cultured with a new type of yeast. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 46(1), 43–46.
- Kitajima C., T. Arakawa, F. Oowa, S. Fujita, O. Imada, T. Watanabe, 1980b. Dietary value of rotifer *Brachionus plicatilis* cultured with bakers yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 46(1), 47–50.
- Kleppel G. S., 1993. On the diets of calanoid copepods. Review. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* Vol. 199: 183 – 195.
- Knights, B. 1983. Food particle-size preferences and feeding behavior in warm water aquaculture of European eel, *Anguilla anguilla* (L). *Aquaculture*, 30:173– 190
- Kraul, S. 1989. Production of live prey for marine fish larvae. *Advances in Tropical Aquaculture, Tahiti. AQUACOP IFREMER. Actes de Colloque 9*, 595-607.
- Krogdahl Å., Hemre G.-I. And Mommsen T.P. 2005. Carbohydrates in fish nutrition: digestion and absorption in postlarval stages. *Aquaculture Nutrition*, 11; 103-122.
- Lavens, P. y Sorgeloos, P. 1999. Manual on the production and use of live food for aquaculture. *FAO Fish. Tech. Papers*. 361, 256 pp
- Libourel Houde, S. E. y Roman, M. R. 1987. Effects of food quality on the functional ingestion response of the copepod *Acartia tonsa*. *Marine Ecology Progress Series* 40: 69- 77.

- Lazo, J., 2000. Conocimiento actual y nuevas perspectivas en el desarrollo de dietas para larvas de peces marinos. In: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R., (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán, México.
- Lonsdale, D. J., Heinle, D. R., Siegfried, C. 1979. Carnivorous Feeding Behavior of the Adult Calanoid Copepod *Acartia Tonsa*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 36 (3): 235-248.
- López-Eliás, J. A., Voltolina, D., Nieves-Soto, M. y Figueroa-Ortiz, L. 2004. Producción y Composición de Microalgas en Laboratorios Comerciales del Noroeste de México. In: Cruz Suárez, L.E., Ricque Marie, D., Nieto López, M.G., Villarreal, D., Scholz, U. y González, M. Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 16-19 Noviembre, 2004. Hermosillo, Sonora, México.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- Luizi, F. S., Gara, B., Shields, R. J. and Bromage, N. R. (1999). Further description of the development of the digestive organs in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) larvae, with notes on differential absorption of copepod and Artemia prey. Aquaculture, 176, 101–116.
- Marcus, N.H. 2005. Calanoid Copepods, Resting Eggs, and Aquaculture. In: C.S. Lee, P. J. O'Bryen and N. H. Marcus (Eds.) Copepods in Aquaculture, Blackwell Publishing, Oxford, UK, pp. 3-8.
- Martínez Córdova, L. R. 1993. Camaronicultura. Bases técnicas y científicas para el cultivo de camarones peneidos. A. G. T. Editor, S.A. México, D.F. 233 pp.
- Mezo-Villalobos, Sofia. 2005. Evaluación de la producción y de la carga bacteriana en cultivos del copépodo calanoide tropical *Pseudodiaptomus euryhalinus* alimentado

- con diferentes microalgas. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Autónoma de Sinaloa, México. 40pp.
- Muhlia-Melo A.F., 2008. Tecnología de cultivo larvario de pargo amarillo (*Lutjanus argentiventris*) por medio de desoves naturales en estanquería supralitoral y por desoves bajo condiciones controladas de laboratorio. Informe de avance segunda etapa. Proyecto SAGARPA-CONACYT #164. 14 pp.
- Næss, T. (1996). Benthic resting eggs of calanoid copepods in Norwegian enclosures used in mariculture: abundance, species composition and hatching. *Hydrobiology*. 320, 161-168.
- Nanton, D.A. & Castell, J.D., 1997. Mass culture of the Harpacticoid Copepod, *Tisbe* sp., ICES CM Marine Fish Culture Committee, 10 pp.
- Nanton D.A. & Castell J.D., 1999. The effects of temperature and dietary fatty acids on the fatty acid composition of harpacticoid copepods, for use as live food for marine fish larvae. *Aquaculture* 175, 167-181.
- Navarro, J.C., R.J. Henderson, L.A. McEvoy, M.V. Bell, & F. Amat. 1999. Lipid conversions during enrichment of *Artemia*. *Aquaculture* 174: 155–166.
- Omori, M. 1973. Cultivation of marine copepods. *Bull. Plank. Soc. Jap.* 29(1): 3-11.
- Osorio-Galindo, M. 1998. *Efecto de la temperatura y la salinidad en parámetros poblacionales de Pseudodiaptomus euryhalinus Johnson (CRUSTACEA: COPEPODA: CALANOIDEA) en condiciones controladas*. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN. México, 68pp.
- Palomares-García, J.R, E. Suárez-Morales y S. Hernández-Trujillo. 1998. *Catálogo de los copépodos (Crustacea) Pelágicos del Pacífico Mexicano*. CICIMAR-IPN, México. 352pp.
- Payán-Aguirre, J.C. 1994. Aspectos biológico-poblacionales de *Pseudodiaptomus euryhalinus* (COPEPODA: CALANOIDEA) para su utilización en acuicultura. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN. México. 63pp.

- Payne, M.F. and Rippingale, R.J. 2000. Evaluation of diets for culture of the calanoid copepod *Gladioferens imparipes*. *Aquaculture* 187:85-96.
- Payne, M.F. and Rippingale, R.J. 2001. Intensive cultivation of the calanoid copepod *Gladioferens imparipes*. *Aquaculture* 201:329-342.
- Pernet F, Tremblay R, Demers E, Roussy M (2003) Variation of lipid class and fatty acid composition of *Chaetoceros muelleri* and *Isochrysis* sp. grown in a semicontinuous system. *Aquaculture* 221:393–406
- Phatarpekar P.V., Sreepada R.A, Pednekar C., Achuthankutty C.T. (2000). A comparative study on growth performance and biochemical composition of mixed culture of *Isochrysis galbana* and *Chaetoceros calcitrans* with monocultures. *Aquaculture* 181:141-155.
- Prieto, M., Castaño, F., Sierra, J., Logato, P., Botero, J. (2006) Alimento vivo en la larvicultura de peces marinos: copépodos y mesocosmos. *Rev. MVZ Córdoba* 11 Supl (1), 30-36 pp.
- Renaud SM, Thinh LV, Lambrinidis G, Parry DL. 2002. Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture* 211, 195–214.
- Rhodes, A. and L. Boyd. 2005. Formulated feeds for harpacticoid copepods: Implications for population growth and fatty acid composition. In: C.S. Lee, P. J. O'Bryen and N. H. Marcus (Eds.) *Copepods in Aquaculture*, Blackwell Publishing, Oxford, UK, pp. 61-73.
- Rippingale, R. J. & Payne M. F. 2001. Intensive Cultivation of a Calanoid Copepod *Gladioferens imparipes*, A Guide to Procedures. Department of Environmental Biology, Curtin University of Technology, Perth, Australia.
- Rivero-Rodríguez S., Beaumont A. R., Lora-Vilchis M. C. 2007. The effect of microalgal diets on growth, biochemical composition, and fatty acid profile of *Crassostrea corteziensis* (Hartlein) juveniles. *Aquaculture*. 263:199-210.

- Roman, M. R., 1984. Utilization of detritus by the copepod *Acartia tonsa*. Limnol. Oceanogr. 29:949-959.
- Sánchez-Saavedra, M.P., Voltolina, D. 2006. The growth rate and the biomass production and composition of *Chaetoceros* sp. grown with different light sources. Aquacult. Eng. 35:161-165.
- Sargent, J.R., McEnvoy, L.A., Bell, J.G., 1997. Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. Aquaculture. 155:117-127.
- Sargent, J., Bell, G., McEnvoy, L., Tocher, D., Estevez A., 1999a. Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. Aquaculture. 177,191-199. TODAVIA SIN CITAR
- Sargent, J., McEnvoy, L., Estevez, A., Bell, G., Bell, M., Henderson, J., Tocher, D., 1999b. Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. Aquaculture. 179, 217-229. TODAVIA SIN CITAR.
- Schipp, G. 2006. The Use of Calanoid Copepods in Semi-Intensive, Tropical Marine Fish Larviculture. En: Editores: L. Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Salazar, Martha G. Nieto López, David A. Villareal Cavazos, Ana C. Puello Cruz y Armando García Ortega. Avances en Nutrición Acuícola VIII. VIII Symposium Internacional de Nutrición Acuícola. 15-17 Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, Méx. ISBN 970-694-333-5.
- Shepherd, J. & Bromage, N., 1992. Intensive Fish Farming. Blackwell Scientific Publications. Great Britain. 404 pp.
- Shields, R.J., Bell, J.G., Luizi, F.S., Gara, B., Bromage, N.R., and Sargent, J.R. 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. Journal of Nutrition 129:1186-1194.
- Sorgeloos, P.; M. Dehasque; P. Dhert y P. Lavens. 1996. Larviculture of marine finfish: the current status. INFOFISH International 4(94): 49-54.

- Sorokin, C. 1973. Dry weight, packed cell volume and optical density. 321-343. En: Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurement. Stein, J. (Ed.). Cambridge University Press, Cambridge and New York.
- Spenelli, J. (1979). Preparation of salmonid diets containing zooplankton and their effect on organoleptic properties of pen-reared salmonids. In: Proceedings of the world symposium on finfish nutrition and fishfeed technology, Hamburg 20–23 June 1978. Berlin. 2, 383–392.
- Støttrup, J. G., Shields, R., Gillespie, M., Gara, M. B., Sargent, J. R., Bell, J. G., Henderson, R. J., Tocher, D. R., Sutherland, R., Næss, T., Mangor Jensen, A. Naas, K., van der Meeren, T., Harboe, T., Sanchez, F. J., Sorgeloos, P., Dhert, P. and Fitzgerald, R. 1998. The production and use of copepods in larval rearing of halibut, turbot and cod. Bull Aquacul. Assoc. Canada 98-4, 41–45.
- Støttrup, J.G. 2000. The elusive copepods: their production and suitability in marine aquaculture. Aquaculture Research. 31, 703-711.
- Støttrup, J.G. 2006. Review on the Status and Progres in Rearing Copepods for Marine Larviculture. Advantages and Disadvantages. Among Calanoid, Harpacticoid and Cyclopoid Copepods. En: Editores: L. Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Salazar, Martha G. Nieto López, David A. Villarreal Cavazos, Ana C. Puello Cruz y Armando García Ortega. Avances en Nutrición Acuícola VIII. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 15-17 Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León.
- Støttrup, J.G. and H. Nosker. 1997. Production and use of copepods in marine fish larviculture. Aquaculture 155: 231-247.
- Støttrup, J.G. and McEvoy, L.A. 2003. Live Feeds in Marine Aquaculture. Ames, Iowa, USA: Iowa State Press. 336 pp.
- Theilacker, G.H. y A.S. Kimball. 1984. Comparative quality of rotifers and copepods as food for larval fishes. Cal. Coop. Ocean. Fish. Invest. Rep. 25:80-86.
- Tucker, J.W. 1998. Marine fish culture. Kluwer Academic Publishers, p 750.

- Toledo, J.D., Golez M.S., and A Ohno. 2005. Studies on the Use of Copepods in the Semi-intensive Seed Production of Grouper *Epinephelus coioides*. In: C.S. Lee, P. J. O'Bryen and N. H. Marcus (Eds.) Copepods in Aquaculture, Blackwell Publishing, Oxford, UK, pp. 169-182.
- van der Meeren, T., Olsen, R. E., Hamre, K., Fyhn, H.J., 2008. Biochemical composition of copepods for evaluation of feed quality in production of juvenile marine fish. *Aquaculture* 274:375-397.
- Van Nieuwerburgh, L. 2004. Experimental Studies on the Regulation of Pigment Dynamics in Phytoplankton and Copepods by Dissolved Inorganic Nutrients. Acta Universitatis Upsaliensis. *Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology* 968. 34 pp.
- Viso, A. C. and Marty, J. C. 1993. Fatty acids from 28 marine microalgae. *Phytochemistry* 34:1521-1533.
- Whyte, 1987. J.N.C. Whyte, Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture* 60 (1987), pp. 231–241.
- Zar, J. 1999. Biostatistical analysis. Prentice Hall, Inc., Englewood Cliffs, N.J. USA.