



CENTRO DE INVESTIGACIONES
BIOLÓGICAS DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DIETÉTICA DE MICROALGAS
MEDIANTE EL ESTUDIO DEL BALANCE ENERGÉTICO DE *Artemia*
franciscana.

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

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

P r e s e n t a

María Concepción Lora Vilchis

La Paz, B. C. S., mayo de 2004

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi madre la Sra. Clementina Alejandra Vilchis González por todo su amor

A mis hijos Luis Erantzcani, Alberto Mauiztic y Elti Alejandro a quienes amo profundamente

A mi esposo José Luis por su gran apoyo y por todo su amor.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por los proyectos institucionales PAC38, PAC2, AC1.4.

La sustentante de este trabajo agradece el apoyo otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT-142663).

Para la realización de este trabajo de investigación se contó con la ayuda de muchas personas, entre ellas mi director el Dr. Domenico Voltolina por su constante apoyo durante la realización del trabajo, por todas sus enseñanzas, sus regaños y sus alientos, a los investigadores del departamento de Acuicultura del CICESE-Ensenada por las facilidades prestadas de espacio, material y equipo; así como de la atención prestada: Dra. Beatriz Cordero E., Dr. Fernando Díaz H. y Dra. Pilar Sánchez S., a Norberto Flores A. por la ayuda técnica prestada en diferentes ocasiones; a los compañeros M. en C. Pablo Piña V. y Víctor Jesús Núñez M. de la UAS- Mazatlán por su auxilio técnico durante los experimentos realizados en el CICESE. Al Dr. Francisco Correa S. del IIO-UABC, por el apoyo en el suministro de material bibliográfico y reactivos empleados en la fijación de organismos, así como en el suministro de quistes de *Artemia*. Al Dr. Alejandro Maeda M. por todas las consultas y la información bibliográfica proporcionada, a Hortencia Obregón B. por su apoyo en el suministro de quistes y por sus comentarios sobre la identificación de los estadios larvales. A Martín Guerrero I. de la UAS, por su apoyo técnico en los experimentos realizados en la UAS. A los miembros de mi comité tutorial Dra. Beatriz Cordero E., Dr. Alfonso Maeda M., Humberto Villarreal C. y Roberto Civera C. por sus críticas observaciones que hicieron más comprensible este trabajo. Al Dr. Mario Nieves S. por su asesoría en estadística y a Ira Fogel por sus correcciones en el inglés.

Agradezco el interés y el apoyo fuera de lo académico a Dra. Beatriz Cordero E., Dra. Bertha Arredondo V., M. en C. Rosalía Servín V., Dra. Carmen Blazquez M. y Biol. Minerva Cerro Z. por su confianza y aliento.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|---|-----|
| Conformación de comités | i |
| Dedicatoria | ii |
| Agradecimientos | iii |
| Resumen..... | 1 |
| Abstract..... | 3 |
| Capítulo 1. Introducción general | 5 |
| Calidad dietética de las microalgas | 6 |
| Balance energético | 10 |
| Organización de este trabajo | 13 |
| Hipótesis y objetivos | 14 |
| Capítulo 2. Experimentos de crecimiento..... | 16 |
| Primer experimento: selección de la concentración óptima de <i>Chaetoceros muelleri</i> para el crecimiento de <i>Artemia franciscana</i> durante tres períodos de desarrollo posembrionario..... | 16 |
| Introducción | 16 |
| Objetivos | 17 |
| Materiales y métodos | 18 |
| Cultivo de microalgas | 18 |
| Análisis químico de la biomasa microalgal | 19 |
| Obtención de nauplios | 19 |
| Cultivo de <i>Artemia franciscana</i> | 20 |
| Alimentación de <i>A. franciscana</i> con diferentes raciones de <i>C. muelleri</i> .. | 21 |
| Tasa de ingestión de <i>A. franciscana</i> | 21 |
| Análisis de resultados | 22 |
| Resultados y discusión | 23 |
| Características de <i>Chaetoceros muelleri</i> | 23 |
| Efecto de la concentración sobre el crecimiento de <i>Artemia franciscana</i> | 24 |
| Tasa de ingestión de <i>A. franciscana</i> | 26 |

| | |
|---|----|
| Segundo experimento. evaluación de la calidad nutricia de la microalga | |
| <i>Chlorella capsulata</i> para <i>Artemia franciscana</i> | 29 |
| Introducción | 29 |
| Objetivo | 30 |
| Materiales y métodos | 30 |
| Resultados y discusión | 32 |
| Tercer experimento: evaluación de la calidad nutricia de las microalgas | |
| <i>Nannochloropsis oculata</i> e <i>Isochrysis</i> sp. para <i>Artemia franciscana</i> | 38 |
| Introducción | 38 |
| Objetivo | 39 |
| Materiales y métodos | 39 |
| Resultados y discusión | 40 |
| Cuarto experimento: evaluación de la calidad nutricia de las microalgas | |
| <i>Nannochloropsis oculata</i> e <i>Isochrysis</i> sp. para <i>Artemia franciscana</i> | 46 |
| Introducción | 46 |
| Objetivo | 46 |
| Materiales y métodos | 46 |
| Resultados y discusión | 47 |
| Discusión general de los experimentos de crecimiento | 53 |
| Capítulo 3. Experimentos de ecofisiología. | 55 |
| Introducción | 55 |
| Primer experimento: Evaluación de la calidad nutricia de las microalgas | |
| <i>Nannochloropsis oculata</i> , <i>Isochrysis</i> sp. y <i>Chaetoceros muelleri</i> mediante | |
| la determinación del crecimiento estimado | 58 |
| Objetivos | 58 |
| Materiales y métodos | 58 |
| Tasa de ingestión..... | 58 |
| Eficiencia de absorción | 59 |
| Tasa respiratoria | 60 |
| Sistema abierto-cerrado | 60 |

| | |
|--|----|
| Tasa de excreción amoniacal | 61 |
| Análisis de resultados | 61 |
| Resultados y discusión | 61 |
| Tasa de ingestión | 62 |
| Eficiencia de absorción | 63 |
| Tasa respiratoria | 64 |
| Tasa de excreción amoniacal | 65 |
| Balance energético | 66 |
| Segundo experimento: Evaluación de la calidad nutricia de las microalgas <i>Nannochloropsis oculata</i> , <i>Isochrysis</i> sp. y <i>Chaetoceros muelleri</i> mediante la determinación del crecimiento estimado | 70 |
| Objetivos | 70 |
| Materiales y métodos | 70 |
| Tasa de ingestión | 70 |
| Tasa respiratoria y tasa de excreción amoniacal | 71 |
| Resultados y discusión | 73 |
| Tasa de ingestión | 75 |
| Eficiencia de absorción | 75 |
| Tasa respiratoria | 75 |
| Tasa de excreción amoniacal | 76 |
| Balance energético | 77 |
| Capítulo 4 Comparación de los experimentos de crecimiento y ecofisiológicos .. | 84 |
| Introducción | 84 |
| Objetivo | 85 |
| Resultados | 85 |
| Calidad de las dietas | 85 |
| Discusión | 90 |
| Conclusiones | 94 |
| Recomendaciones | 96 |
| Bibliografía | 97 |

| | |
|-----------------------------------|-----|
| Anexo 1. Primera publicación..... | 109 |
| Anexo 2. Segunda publicación..... | 115 |

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo 2. Experimentos de crecimiento de *A. franciscana*

Segundo experimento

Fig. 1. Longitud total de *Artemia franciscana*, alimentada con *Chlorella capsulata* (a) o con *Chaetoceros muelleri* (b) durante los primeros siete días de desarrollo posembriionario ($n = 3$). Raciones equivalentes a 1.7, 23.4 y 46.8 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ de peso orgánico 34

.... Fig. 2. Peso seco total de *Artemia franciscana*, alimentada con *Chlorella capsulata* (a) o con *Chaetoceros muelleri* (b) durante los primeros siete días de desarrollo posembriionario ($n = 3-4$). Raciones equivalentes a 1.7, 23.4 y 46.8 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ de peso orgánico..... 35

Fig. 3. Índice de desarrollo de *A. franciscana* alimentada durante los primeros siete días de desarrollo posembriionario con *Chlorella capsulata* (a, b y c) y con *Chaetoceros muelleri* (d, e, f) en tres raciones equivalentes. a y d = 11.7, b y e = 23.4, c y f = 46.8 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 37

Tercer experimento

Fig. 4. Longitud (a) e índice de desarrollo (b) de *Artemia franciscana* alimentada con *N. oculata*, *Isochrysis* sp. o *C. muelleri* 43

Cuarto experimento

Fig. 5. Supervivencia de *Artemia franciscana* alimentada con *Nannochloropsis oculata*, *Isochrysis* sp. y *Chaetoceros muelleri*..... 49

Fig. 6. Promedios de a) longitud, b) peso seco y c) peso orgánico de *Artemia franciscana*, alimentada durante los siete primeros días de desarrollo posembriionario con *Nannochloropsis oculata*, *Isochrysis* sp., y *C. muelleri* 50

Fig. 7. Contenido energético promedio de *Artemia franciscana* en $\text{J}\cdot\text{ind}^{-1}$ (a) y en $\text{kJ}\cdot\text{g}^{-1}$ (b) alimentada con *Nannochloropsis oculata*, *Chaetoceros muelleri* e *Isochrysis* sp. 52

Capítulo 3. Experimentos de ecofisiología

Primer experimento

Fig. 8. Balance energético de *A. franciscana* alimentada con: a) *Isochrysis* sp. o b) *Chaetoceros muelleri* a los 3 y 5 días de desarrollo posembrionario..... 68

Segundo experimento

.. Fig. 9. Balance energético de *A. franciscana* alimentada con a) *Nannochloropsis oculata*, b) *Isochrysis* sp. y c) *Chaetoceros muelleri*, a los 1, 3, 5 y 7 días de desarrollo posembrionario. Valores obtenidos con *EA* determinada de acuerdo a Conover (1966) 82

ÍNDICE DE TABLAS

Capítulo 2. Experimentos de crecimiento

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Características de la microalga <i>Chaetoceros muelleri</i> | 23 |
| Tabla 2. Promedios de longitud, peso seco total y orgánico de <i>A. franciscana</i> cultivada por tres días con tres raciones de <i>C. muelleri</i> | 24 |
| Tabla 3. Promedios de longitud, peso seco total y orgánico de <i>A. franciscana</i> cultivada por cinco días con <i>C. muelleri</i> | 25 |
| Tabla 4. Promedios de longitud de <i>A. franciscana</i> cultivada por siete días con tres raciones de <i>C. muelleri</i> | 26 |
| Tabla 5. Tasas medias de ingestión de <i>A. franciscana</i> alimentada con <i>C. muelleri</i> en diferentes concentraciones durante los primeros siete días de desarrollo posembrionario | 28 |
| Tabla 6. Características de las microalgas <i>Chlorella capsulata</i> y <i>Chaetoceros muelleri</i> | 32 |
| Tabla 7. Características de las microalgas <i>Nannochloropsis oculata</i> , <i>Isochrysis</i> sp. y <i>Chaetoceros muelleri</i> | 41 |
| Tabla 8. Peso seco, orgánico y contenido energético de <i>A. franciscana</i> alimentada con <i>Nannochloropsis oculata</i> , <i>Isochrysis</i> sp. y <i>Chaetoceros muelleri</i> durante los cinco primeros días de desarrollo posembrionario..... | 45 |
| Tabla 9. Características de las microalgas <i>Nannochloropsis oculata</i> , <i>Isochrysis</i> sp. y <i>Chaetoceros muelleri</i> | 48 |
| Capítulo 3. Experimentos de ecofisiología | |
| Tabla 10. Pesos secos de <i>A. franciscana</i> alimentada con <i>Nannochloropsis oculata</i> , <i>Isochrysis</i> sp. y <i>Chaetoceros muelleri</i> durante los primeros 5 días de desarrollo posembrionario | 62 |
| Tabla 11. Tasa de ingestión de <i>A. franciscana</i> alimentada con <i>N. oculata</i> , <i>Isochrysis</i> sp. y <i>C. muelleri</i> , a los 3 y 5 días de desarrollo posembrionario | 63 |
| Tabla 12. Eficiencia de absorción de <i>A. franciscana</i> alimentada con <i>N. oculata</i> , <i>Isochrysis</i> sp. y <i>C. muelleri</i> , a los 3 y 5 días de desarrollo posembrionario | 64 |

| | |
|---|----|
| Tabla 13. Tasa respiratoria (en μg de $\text{O}_2 \cdot \text{ind}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) de <i>A. franciscana</i> alimentada con <i>N. oculata</i> , <i>Isochrysis</i> sp. y <i>C. muelleri</i> , a los 3 y 5 días de desarrollo posembrionario. | 65 |
| Tabla 14. Tasa de excreción amoniacal (en $10^{-2} \mu\text{g}$ de $\text{N-NH}_4^+ \cdot \text{org}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) de <i>A. franciscana</i> alimentada con <i>N. oculata</i> , <i>Isochrysis</i> sp. y <i>C. muelleri</i> , a los 3 y 5 días de desarrollo posembrionario..... | 65 |
| Tabla 15. Relación O:N de <i>A. franciscana</i> alimentada con <i>N. oculata</i> , <i>Isochrysis</i> sp. y <i>C. muelleri</i> , a los 3 y 5 días de desarrollo posembrionario. | 66 |
| Tabla 16. Balance energético individual de <i>A. franciscana</i> (en $10^{-2} \text{J} \cdot \text{ind}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) a los 3 y 5 días de desarrollo posembrionario alimentada con <i>N. oculata</i> , <i>Isochrysis</i> sp. y <i>C. muelleri</i> | 67 |
| Tabla 17. Balance energético de <i>A. franciscana</i> (en $10^{-2} \text{J} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) a los 3 y 5 días de desarrollo posembrionario alimentada con <i>N. oculata</i> , <i>Isochrysis</i> sp. y <i>C. muelleri</i> | 68 |
| Tabla 18. Pesos secos (en $\mu\text{g} \cdot \text{org}^{-1}$) de <i>A. franciscana</i> alimentada con <i>N. oculata</i> , <i>Isochrysis</i> sp. y <i>C. muelleri</i> durante los primeros 7 días de desarrollo posembrionario | 73 |
| Tabla 19. Tasas de ingestión (en $\mu\text{g} \cdot \text{org}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) de <i>A. franciscana</i> alimentada con <i>N. oculata</i> , <i>Isochrysis</i> sp. y <i>C. muelleri</i> , durante los 7 primeros días de desarrollo posembrionario | 74 |
| Tabla 20. Eficiencia de absorción de <i>A. franciscana</i> alimentada con <i>N. oculata</i> , <i>Isochrysis</i> sp. y <i>C. muelleri</i> , durante los 7 primeros días de desarrollo posembrionario | 75 |
| Tabla 21. Tasa respiratoria (en μg de $\text{O}_2 \cdot \text{ind}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) de <i>A. franciscana</i> alimentada con <i>N. oculata</i> , <i>Isochrysis</i> sp. y <i>C. muelleri</i> , durante los 7 primeros días de desarrollo posembrionario..... | 76 |
| Tabla 22. Tasa de producción de amonio (en $10^{-2} \mu\text{g}$ de $\text{N-NH}_4^+ \cdot \text{org}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) de <i>A. franciscana</i> alimentada con <i>N. oculata</i> , <i>Isochrysis</i> sp. y <i>C. muelleri</i> , durante los 7 primeros días de desarrollo posembrionario | 77 |

| | |
|---|----|
| Tabla 23. Relación O:N de <i>A. franciscana</i> alimentada con <i>N. oculata</i> , <i>Isochrysis</i> sp. y <i>C. muelleri</i> , durante los 7 primeros días de desarrollo posembrionario | 77 |
| Tabla 24. Balance energético individual de <i>A. franciscana</i> (en 10^{-2} J·ind ⁻¹ ·d ⁻¹) a los 1, 3, 5, y 7 días de desarrollo posembrionario alimentada con <i>N. oculata</i> , <i>Isochrysis</i> sp. y <i>Chaetoceros muelleri</i> | 78 |
| Tabla 25. Balance energético individual de <i>A. franciscana</i> (en 10^{-2} J·μg ⁻¹ ·d ⁻¹) a los 1, 3, 5, y 7 días de desarrollo posembrionario alimentada con <i>N. oculata</i> , <i>Isochrysis</i> sp. y <i>Chaetoceros muelleri</i> | 80 |
| Capítulo 4. Comparación de los experimentos de crecimiento y ecofisiológicos | |
| Tabla 26. Consumo promedio potencial (cp) y real (c) de alimento de <i>A. franciscana</i> (μg de peso seco total·ind ⁻¹ ·d ⁻¹) alimentada con tres microalgas, durante 7 días de desarrollo posembrionario..... | 86 |
| Tabla 27. Resumen de los resultados de las pruebas a corto y largo plazo del segundo experimento con <i>Artemia franciscana</i> alimentada con tres dietas. Balance energético | 88 |

Anexo 1. Primera publicación

| | |
|--|-----|
| Tabla 1. Pesos secos orgánicos y composición proximal de <i>C. muelleri</i> y <i>C. capsulata</i> | 113 |
| Tabla 2. Comparación de la supervivencia, longitud, índice de desarrollo y peso seco libre de cenizas de <i>A. franciscana</i> | 113 |
| Tabla 3. Alimento suministrado, ingestión total, incremento en peso orgánico, índice de conversión y eficiencia gruesa de crecimiento de <i>A. franciscana</i> | 113 |

Anexo 2. Segunda publicación

| | |
|---|-----|
| Tabla 1. Concentración de organismos y raciones diarias..... | 130 |
| Tabla 2. Características de las microalgas <i>Isochrysis</i> sp. y <i>C. muelleri</i> | 131 |
| Tabla 3. Índice de desarrollo, longitud, peso seco y peso orgánico de <i>A. franciscana</i> | 132 |
| Tabla 4. Composición proximal media de <i>A. franciscana</i> | 133 |

| | |
|--|-----|
| Tabla 5. Índice de conversión alimenticia individual instantáneo, tasa de crecimiento y tasa de producción individual de <i>A. franciscana</i> | 134 |
| Tabla 6. Índice de conversión alimenticia diaria promedio, tasa de crecimiento específica y tasa de producción individual | 135 |

Resumen

La evaluación de la calidad nutricia de diferentes dietas microalgales empleadas en acuicultura se ha realizado tradicionalmente mediante la comparación de algunos parámetros relacionados con el crecimiento, con la sobrevivencia o con la reproducción de los organismos alimentados con esas dietas, o calculando su balance energético a partir del consumo de alimento y de su actividad metabólica, pero existen pocos estudios comparativos sobre estas dos formas de acercamiento al mismo problema.

El objetivo de este trabajo fue la evaluación comparada de algunas dietas microalgales empleando el crustáceo braquiópodo *Artemia franciscana* como modelo biológico, comparando también el crecimiento calculado mediante el balance energético de este organismo durante los primeros 5 a 7 días de desarrollo posembriionario con el determinado mediante pruebas de cultivo de la misma duración.

Se usaron como dietas las microalgas *Chlorella capsulata*, *Chaetoceros muelleri*, *Isochrysis* sp. y *Nannochloropsis oculata* cultivadas en forma semicontinua, aunque la primera fue usada solamente en las pruebas de crecimiento. Ésto se midió diariamente en los experimentos de cultivo, mientras que la determinación del balance energético se realizó mediante experimentos en días alternos (1, 3, 5 y 7), determinando en todos los casos las tasas de ingestión, de consumo de oxígeno y de excreción nitrogenada, además de la eficiencia de absorción del alimento.

En las pruebas de cultivo, la sobrevivencia varió entre el 85 y el 90% con todas las dietas, con excepción de *Nannochloropsis oculata* (31-45%). De acuerdo a los datos del índice de desarrollo larvario, la calidad de las cuatro dietas se calificó como *C. muelleri* (L-16) > *Isochrysis* sp. (L-15) > *C. capsulata* (L-8) > *N. oculata* (L-4), y esta escala no se modificó usando los datos de incremento en talla y en peso, con pesos finales cercanos al 200% con *C. muelleri* en comparación con los obtenidos con *Isochrysis* sp. y cercanos o iguales a cero con las otras dos dietas.

Los resultados de los cálculos de balance energético permitieron establecer la misma escala de calidad para *C. muelleri*, *Isochrysis* sp. y *N. oculata*, por lo cual los dos tipos de evaluación pueden ser utilizados para establecer la dieta más adecuada para un organismo sujeto a cultivo.

Por otra parte, cuando el crecimiento observado se comparó con el estimado, se observó una notable discrepancia, la cual consistió en una sobreestimación del crecimiento en el caso de *N. oculata* y de *Isochrysis* sp., particularmente elevada en el caso de la primera, mientras que el crecimiento estimado fue un 20% inferior al real en el caso de *C. muelleri*. Esta discrepancia no puede ser atribuida al costo de las mudas, que no se utilizó en el cálculo del balance energético, debido que la mayor discrepancia negativa corresponde a la dieta con el menor crecimiento y el menor índice de desarrollo, además de que el valor de crecimiento estimado fue menor que el real, en el caso de los organismos alimentados con *C. muelleri*. Esto puede ser explicado solamente por una sobre- o subestimación de la absorción de alimento, mediante la metodología que la evalúa comparando la cantidad de sustancia orgánica ingerida, con la presente en las heces.

Abstract

Nutritional values of microalgal diets employed in aquaculture have traditionally been evaluated by comparing some biological parameters related to survival, growth, reproduction, and also comparing the energy budget of the organisms fed such diets calculated from food consumption and metabolic costs. There are few examples of comparative studies of these two different approaches to the problem.

One objective of this study was to evaluate four microalgal diets employing, as the test organism, the brine shrimp *Artemia franciscana* fed a diet of one of four microalgae, by comparing the growth rate calculated from the results of the energy budget with the results measured during the first 5-7 days of post-embryonic development with the same diets.

The diets were: *Chlorella capsulata* (used only in the growth experiments), *Chaetoceros muelleri*, *Isochrysis* sp., or *Nannochloropsis oculata*, which were grown in semi-continuous culture. Growth was measured daily during the growth experiments and the scope for growth or expected growth was calculated from the energy budget for days 1, 3, 5, and 7, using specimens grown with each experimental diet. Each experiment served to obtain food consumption rates, rates of oxygen consumption, and ammonia-nitrogen excretion, as well as food absorption efficiency with each diet.

In the growth experiments, survival was 85-90% with *C. muelleri*, *Isochrysis* sp., and *C. capsulata*, but only 31-45% with *N. oculata*. The larval development index was a better indicator of food quality than survival, and showed that the four diets can be ranked according to the larval stage reached with the respective diets, as: *C. muelleri* (L-16) > *Isochrysis* sp. (L-15) > *C. capsulata* (L-8) > *N. oculata* (L-4). Growth in size and weight gave the same ranking and showed that the final weight of the organisms fed *C. muelleri* is close to 200% of that obtained with *Isochrysis* sp. The other two diets gave weight increments one order of magnitude lower or close to zero.

Scope for growth gave the same ranking for the three diets used in the experiments, showing that both methods gave comparable results and may be used to define the most adequate diet for the subject organism. However, the results showed that the energy budget cannot be used to model scope for growth because of the wide discrepancies between real and scope for growth. For *N. oculata* and *Isochrysis* sp., the expected growth rate was higher than that measured in the growth experiments, and the discrepancy was particularly high with the first of these diets, whereas, with *C. muelleri*, the scope for growth was 20% lower than that measured in culture.

These differences cannot be ascribed to energy costs of molting, which were not used in the calculations of the energy budget, because the most important discrepancy was related to the diet producing the lowest growth and development. The difference between energy budget calculations and real growth was evident even for the *C. muelleri* diet, which gave the best results. Back-calculations showed that food absorption efficiency may be the source of these discrepancies.

Capítulo 1

Introducción general

En el campo de producción de alimentos, la acuicultura es el área que ha presentado el mayor crecimiento durante las dos últimas décadas. En efecto, aún cuando entre 1980 y 1997 la contribución de los organismos acuáticos al total del consumo *per capita* de proteínas animales aumentó del 14 al 16% del total de las calorías ingeridas, este incremento se debe al mayor consumo de organismos acuáticos cultivados, cuya producción aumentó desde el 12% del total de los desembarques pesqueros registrados a nivel mundial en 1984, a cerca de 28% en 1997 (De Silva, 2000).

Este porcentaje aumentó hasta poco más del 32% en 2000 (FAO, 2003), que se traduce en una producción total de casi 45,700,000 t, de las cuales aproximadamente el 70% corresponden a China y es importante señalar que, aún sin considerar este país, la participación de los países de bajo ingreso y con déficit alimentario se ha duplicado en la última década, para alcanzar una producción de casi 7,800,000 t.

Este importante incremento en la producción acuícola se debe en parte a los mayores conocimientos científicos sobre las especies de interés para la acuicultura, en especial en lo que se refiere a sus exigencias dietéticas y de calidad del ambiente en el cual se están cultivando. Se explica además por los avances técnicos y científicos que han permitido cerrar en cautiverio el ciclo biológico de la mayoría de las especies objeto de cultivo, gracias a estos avances, en la actualidad se mantienen en ambientes adecuados bancos de reproductores seleccionados, lo que hace posible obtener larvas y juveniles de mejor calidad, además de poder programar su producción durante los períodos más convenientes para su siembra (De Silva, 2000).

Las larvas de la mayoría de las especies acuáticas de interés para la acuicultura son planctónicas y planctófagas a la vez y en condiciones naturales se alimentan principalmente de fitoplancton, por lo cual los laboratorios que cultivan

estas larvas en sistemas intensivos o superintensivos, necesitan mantener un área separada, dedicada exclusivamente a la producción de microalgas.

Según las estimaciones reportadas por Duerr *et al.* (1998), el costo de producción de las microalgas cultivadas en todo el mundo en 1993 para el apoyo de la industria de bivalvos y de camarones fue de 34 millones de dólares, que se agregan a los costos generales de operación de las áreas de cultivos larvarios. Ésto ha impulsado varias investigaciones sobre la posibilidad de utilizar dietas alternativas, como microalgas preservadas (Laing *et al.*, 1990; Cordero-Esquivel *et al.*, 1993; McCausland *et al.*, 1999), levaduras (Epifanio, 1979), alimentos micropelletizadas preparados con ingredientes inertes (Langdon y Waldock, 1981; Langdon, 1982; Laing, 1987) y hasta harinas de cereales (Albentosa *et al.*, 1999).

Aunque varias de estas dietas alternativas resultaron adecuadas, ninguna puede dar resultados suficientemente confiables, que sugieran que es posible sustituir en su totalidad a las microalgas vivas, y en efecto la tendencia en 1998 indicaba que los alimentos vivos continuarían siendo el alimento base primario en las prácticas acuiculturales (Duerr *et al.*, 1998; Hoff y Snell, 1999). Esta tendencia no parece haberse modificado en los últimos años, por lo cual el cultivo y el uso de microalgas como alimento primario representan todavía el cuello de botella para el éxito de este sector especializado de la acuicultura.

Además, es necesario considerar que entre las especies de zooplancton más comúnmente empleadas como alimento vivo para los estadios zooplanctófagos de peces y de crustáceos, se encuentran rotíferos (*Brachionus*), copépodos (*Tigriopus*), cladóceros (*Daphnia*) y branquiópodos (*Artemia*), para los cuales el alimento microalgal también constituye la fuente dietética única o principal.

Calidad dietética de las microalgas

El valor nutritivo de un alimento microalgal depende de sus características morfológicas, de su composición bioquímica y de los requerimientos nutricios específicos del organismo que lo utiliza; entre las primeras, las especies seleccionadas deben tener dimensiones adecuadas para que puedan ser

ingeridas por las larvas a las cuales se suministran como alimento. El intervalo de tamaños de la mayoría de las especies de microalgas empleadas en acuicultura está comprendido entre 2 y 20 μm , el cual se considera el más apropiado para la mayoría de los organismos filtradores (Brown *et al.*, 1989; Coutteau, 1996).

Aparte de las dimensiones de la célula, una característica que debe considerarse es la morfología celular; por ejemplo, las larvas veliger de algunos moluscos no ingieren diatomeas del género *Chaetoceros* durante la fase inicial de su desarrollo, posiblemente porque estas microalgas se caracterizan por la presencia de setas, las cuales aumentan su tamaño celular y en consecuencia las hacen menos ingeribles (Lora-Vilchis y Maeda-Martínez, 1997).

Otro factor importante es el tipo y la naturaleza de la pared celular. Los moluscos digieren más fácilmente microalgas como *Isochrysis* y *Monochrysis* (*Pavlova*), que no tienen una pared protectora, mientras que los rotíferos que poseen un aparato triturador, pueden ser alimentados con clorofitas, las cuales poseen paredes compuestas de celulosa y en algunos casos también de esporopolenina (*Chlorella* y *Scenedesmus* entre otras). Otra característica deseable es la movilidad, que permite que las células se mantengan en suspensión y que por lo tanto estén disponibles para sus consumidores.

Una vez que una microalga es ingerida y digerida, su valor nutritivo depende de su contenido de macronutrientes (proteínas, lípidos y carbohidratos), además de su perfil de aminoácidos, ácidos grasos y otros compuestos esenciales (Webb y Chu, 1982; Brown *et al.*, 1997).

A pesar de los avances en el conocimiento de la composición de las microalgas, aún no es posible determinar el valor dietético de un alimento microalgal para una determinada especie objetivo, basándose solamente en su composición bioquímica, ya que éste depende de los requerimientos específicos del consumidor (O'Connor *et al.*, 2000). En efecto, aunque en forma empírica se acepta que algunas microalgas son mejores que otras para algunas especies, la falta de conocimiento acerca del valor nutritivo de un alimento microalgal, así como de los requerimientos específicos de los consumidores, son los principales

problemas para la selección de la especie de microalga a utilizarse para cada determinado organismo (De Pauw y Persoone, 1988).

Según Becker (1981, 1994), aproximadamente el 90-95 % del peso seco de una célula microalgal consiste de minerales y de los componentes orgánicos primarios (proteínas, lípidos y carbohidratos). Los ácidos nucleicos representan entre 4 y 6% y los pigmentos primarios y accesorios, además de vitaminas y compuestos orgánicos sencillos, conforman el resto de la biomasa. Estas proporciones pueden variar ampliamente en diferentes especies y aún en la misma, cuando ésta es cultivada con técnicas y sustratos diferentes y bajo condiciones ambientales diversas. Además, aunque se reconoce que la composición de las microalgas es importante, no existe una relación clara entre su contenido de nutrientes primarios y su calidad como alimento, la cual no parece depender exclusivamente de los principales componentes orgánicos, sino de la disponibilidad de compuestos dietéticos esenciales, como de su contenido en algunos ácidos grasos (Coutteau, 1996; Voltolina y López-Elías, 2002).

En experimentos de alimentación de *Crassostrea gigas*, los mejores resultados de crecimiento se obtuvieron con altos niveles de ácidos grasos esenciales 22:6n-3 y 20:5n-3 ya sea presentes en las células o adicionados a las microalgas (Langdon y Waldock, 1981). Por otra parte, estos niveles pueden variar según la especie y las condiciones ambientales de cada cultivo y además la respuesta del organismo objetivo puede ser no lineal (D'Souza y Loneragan, 1999; D'Souza y Kelly, 2000), por lo cual el uso de dietas monoalgales como alimento puede ser limitante para el buen desarrollo de un determinado organismo, debido a la falta o al exceso de uno o más de los nutrientes clave.

Por el motivo anterior, varios autores han sugerido que el suministro de dietas plurialgales es la mejor forma de evitar este problema, debido a que con éstas aumenta la probabilidad de compensar la falta de algún compuesto esencial en una especie, el cual puede estar presente en las otras (Webb y Chu, 1982, Brown *et al.*, 1989,1997).

A pesar de esto, el uso de dietas mixtas no está muy difundido en los laboratorios comerciales, en vista de que el cultivo de más de una especie implica costos operativos adicionales, por lo cual se considera que es económicamente más eficiente utilizar la dieta monoalgal que, de acuerdo a las experiencias del operador, es susceptible de dar el mejor resultado en términos de supervivencia y de crecimiento larvario (Lora-Vilchis *et al.*, 2004a).

Por otra parte, tanto el crecimiento como la composición de una determinada especie microalgal depende de diferentes factores, como luz, temperatura, concentración de nutrientes, pH, salinidad, manejo, agitación, aporte de CO₂, tamaño del inóculo y la fase de crecimiento del cultivo entre otros (Abalde *et al.*, 1995). De esta forma la misma especie puede tener diferente composición y por lo tanto diferente valor nutricional, lo cual a su vez, puede afectar de diferente manera el crecimiento, el desarrollo, la condición fisiológica y la supervivencia de los organismos que la consumen.

La calidad nutricional de un determinado alimento para una especie determinada puede ser evaluada en forma directa, con base en su efecto sobre el crecimiento y la supervivencia o, en el caso de organismos adultos, sobre algunos parámetros reproductivos como pueden ser por ejemplo, el número de huevos o de larvas viables producidas en cada desove (Fábregas *et al.*, 1998). Una desventaja de esta estrategia es que estas respuestas pueden ser modificadas por diferentes variables ambientales, que por lo tanto deberían ser controladas durante todo el período de prueba, lo cual implica un estricto control de temperatura, salinidad, calidad de agua y manejo del cultivo, entre otros. Además, los resultados de esta forma de evaluación de la calidad de una dieta pueden tardar varios días, cuando se evalúan parámetros de crecimiento, e incluso algunas semanas cuando se trata de concluir sobre parámetros reproductivos.

La medición de las respuestas fisiológicas de un organismo sometido a diferentes condiciones ambientales, es una forma de evaluar su capacidad de adaptación (Widdows, 1985). Estas respuestas no son específicas, ya que expresan el efecto de la suma de estímulos ambientales y resultan de la

integración de procesos bioquímicos a nivel celular, tisular y somático. Son altamente sensibles a los cambios del ambiente externo y por lo tanto son capaces de reflejar su efecto al nivel de individuo, antes de que se manifiesten cambios en la estructura de la población o de la comunidad.

En vista de que el alimento puede considerarse un factor ambiental, la medición sistemática de las respuestas fisiológicas al suministro de una determinada especie de microalga puede ser una forma rápida de valoración de su calidad dietética. Existen variables que lo cuantifican examinando cambios de la capacidad adaptativa de un organismo en términos de su condición fisiológica, o que la evalúan por su función o su eficiencia funcional. Entre las primeras están diferentes índices de condición, que se calculan a partir de la relación entre pesos o volúmenes del organismo y algunas de sus partes, y pueden reflejar su estado fisiológico, nutricio o reproductivo, y la proporción O:N, la cual representa el balance entre los procesos catabólicos basados en diferentes sustratos. Esta se calcula a partir de la cantidad de oxígeno consumido y de la excreción de compuestos nitrogenados, expresadas en equivalentes atómicos. Entre las segundas, el marco para el crecimiento (“scope for growth”), productividad o crecimiento esperado es un indicador de la energía disponible para el crecimiento y la reproducción, mientras que la eficiencia de crecimiento es un índice de la capacidad de transformación del alimento en tejidos corporales. Estas cuatro respuestas se han usado ampliamente como indicadores de estrés (Widdows, 1985), o sea del efecto que causan los cambios ambientales sobre el organismo.

Balance energético

La materia viva posee la propiedad de producir nueva materia durante el crecimiento y la reproducción. Esta es el resultado de la diferencia entre la materia y la energía que entran y las que salen de un sistema biológico determinado. Estos flujos hacia y desde el organismo pueden variar en función de uno o más de los diferentes factores ambientales, entre los cuales puede incluirse el alimento. Las relaciones entre las entradas y salidas de materia o energía se describen mediante las ecuaciones de balance energético propuestas por Winberg (1960):

$$I - F = A \quad \text{y} \quad A = R + U + P$$

Rearreglando:

$$P = A - (R + U)$$

Donde: I es la energía ingerida, F es la energía perdida como materia fecal, A es la fracción de energía absorbida del material ingerido por el organismo, R es la energía metabólica medida como consumo de oxígeno, U es la energía gastada en la excreción de productos nitrogenados, y P es la energía disponible para el crecimiento, que también se conoce como crecimiento potencial o marco de crecimiento. La tasa de absorción A depende de la eficiencia de absorción (EA) del alimento ingerido y puede describirse mediante la siguiente expresión

$$A = EA \cdot I$$

Todas estas se representan como variables tasas, ya que se cuantifican en función del tiempo y generalmente se expresan en unidades energéticas por unidad de biomasa (ej. Joules·día⁻¹·g⁻¹ de peso seco). La primera ley de la termodinámica o de la conservación de la energía está implícita en esta ecuación, ya que la suma de las entradas de energía debe corresponder con la suma de las salidas, y de la cantidad retenida en forma de nuevo tejido o de nuevas reservas.

La ecuación de balance energético resultante representa la integración de procesos fisiológicos básicos, como la ingestión y la absorción de alimento, la respiración y la excreción y, en vista de que el balance determina el crecimiento potencial de un organismo, un resultado positivo significa que existe energía disponible para la productividad (P) o crecimiento esperado, que puede reflejarse en un crecimiento somático o de tejido reproductivo, mientras que uno negativo implica que el organismo está haciendo uso de las reservas acumuladas en forma de carbohidratos, lípidos y proteínas.

Varios autores han señalado que los componentes del balance energético de los organismos son afectados por el tipo de dieta (Pechenick y Fisher, 1979; Navarro, 1983; Meadland y Beamish, 1985; Chakraborty *et al.*, 1992; Rosas y Sánchez, 1996; Navarro *et al.*, 2000; Thor, 2000). Ésto significa que es posible evaluar la calidad del alimento que se suministra a un organismo mediante la determinación del valor de P calculado a partir de los otros parámetros fisiológicos

de la ecuación de balance energético, los cuales a su vez no son indicadores directos de calidad.

Para poder emplear el crecimiento esperado como un indicador fisiológico de adecuación ambiental, primero deberá demostrarse una relación entre el crecimiento real y el crecimiento esperado. Esta relación en teoría debe existir pero debe demostrarse en la práctica. Los estudios que muestran esta correspondencia son escasos (Beiras et al. 1994; Riisgard y Randlov, 1981) ya que la gran mayoría de los trabajos sobre balance energético miden algunas variables y generalmente calculan la productividad o crecimiento esperado por la diferencia con las otras variables en la ecuación de balance energético (Thompson y Bayne, 1972; Navarro y Winter, 1982; Bayne y Newel, 1983 y Hawkins y Bayne, 1990; Ropert y Gouilletquer, 2000; Stead *et al.*, 2003; Wong *et al.* 2003).

Artemia franciscana es un crustáceo de la clase Branchiopoda, que tiene un amplio uso en acuicultura como alimento para crustáceos y peces. Se considera un filtrador obligado, continuo y no selectivo, por lo menos en lo que se refiere a la naturaleza de las partículas en suspensión, aunque en realidad si parece haber una selección por tamaño (Gelabert y De la Cruz, 1990). Existen varios factores que pueden modificar sus tasas de filtración, ingestión y asimilación y en particular las primeras dos pueden variar con la edad, ya que su sistema filtrante se modifica para hacerse progresivamente más eficiente durante el desarrollo posembriionario (Schrehardt, 1987). Debido a su baja selectividad, puede ser alimentada con todas las microalgas que tienen un tamaño adecuado, incluyendo las que se emplean comúnmente en acuicultura y además su biología ha sido estudiada extensivamente y es relativamente bien conocida (Lavens y Sorgeloos, 1996). Una ventaja adicional, es que sus embriones resistentes (quistes) se pueden conseguir con facilidad en el comercio, lo cual hace posible llevar a cabo varios experimentos en tiempos y en lugares diversos, utilizando organismos con el mismo origen y calidad.

Organización de este trabajo

En este trabajo se pretende evaluar la calidad de alimentos microalgales en una especie seleccionada como modelo biológico evaluando la productividad o crecimiento esperado inducido con esos alimentos.

Las especies microalgales que se seleccionaron como alimento vivo para los experimentos de cultivo de *Artemia* fueron la diatomea *Chaetoceros muelleri* (CHM-1), la haptofita *Isochrysis* sp. (CCMP 1324), conocidas en acuicultura como de buena calidad y la eustigmatofita *Nannochloropsis oculata* (CCMP 525) y la clorofita *Chlorella capsulata* (UTEX/LB2074), consideradas como de mala calidad al menos en el cultivo de decápodos y moluscos. El organismo de prueba o sensor biológico que se seleccionó fue *Artemia franciscana*.

La determinación de la productividad o crecimiento esperado de *A. franciscana* se realizó mediante dos estrategias:

- en forma directa a partir del crecimiento medido mediante pruebas de cultivo
- en forma indirecta por cálculo a partir de los parámetros ecofisiológicos de la ecuación de balance energético

El objetivo de emplear las dos metodologías fue comparar el crecimiento estimado con el obtenido en pruebas de cultivo, para verificar si el primero puede tomarse como una variable confiable para la evaluación de la calidad nutricia de los alimentos microalgales y si pudiera ser utilizado para estimar un crecimiento real. Es importante señalar que en muy pocos estudios sobre balance energético se presentan ambas evaluaciones.

Hipótesis de trabajo y objetivos

Hipótesis

La calidad de un alimento microalgal puede ser evaluada mediante la productividad o crecimiento esperado de un organismo de prueba como es *Artemia franciscana*.

Objetivo general

Determinar la calidad nutricia de diferentes microalgas mediante la determinación de la productividad o crecimiento esperado del camarón de salmuera *Artemia franciscana*

Objetivos particulares

1.- Encontrar las condiciones más adecuadas de alimentación para el cultivo de *A. franciscana* empleando como alimento diferentes raciones de la microalga *C. muelleri* durante los primeros siete días de desarrollo posembriónico.

2.- Evaluar la calidad nutricia de cuatro dietas monoalgales preseleccionadas *Chlorella capsulata*, *Isochrysis* sp., *Nannochloropsis oculata* y *Chaetoceros muelleri*, para *A. franciscana* mediante la cuantificación del consumo de alimento y de la eficiencia de su utilización en términos de crecimiento en talla, peso y supervivencia durante los primeros cinco a siete días posembriónico.

3.- Cuantificar la tasa de ingestión individual y específica diaria de *A. franciscana* empleando como alimento las dietas monoalgales *Isochrysis* sp., *C. muelleri* y *Nannochloropsis oculata*:

4.- Calcular la fracción de energía absorbida o tasa de absorción individual y específica diaria de *A. franciscana* empleando como alimento las dietas monoalgales *Isochrysis* sp., *C. muelleri* y *Nannochloropsis oculata*.

5.- Calcular el gasto energético individual y específico diario por respiración y por excreción nitrogenada de *A. franciscana* empleando como alimento las dietas monoalgales *Isochrysis* sp., *C. muelleri* y *Nannochloropsis oculata*:

6.- Calcular la productividad o crecimiento esperado diario de *A. franciscana* inducida por estas tres dietas, utilizando la ecuación de balance energético.

7.- Comparar la productividad o crecimiento de *A. franciscana* obtenida con los experimentos de crecimiento contra la esperada a partir del cálculo de su balance energético.

Capítulo 2

Experimentos de crecimiento

Primer experimento: selección de la concentración óptima de *Chaetoceros muelleri* para el crecimiento de *Artemia franciscana* durante tres períodos de desarrollo posembrionario.

Introducción

El crecimiento de un organismo depende de factores tanto intrínsecos como extrínsecos, los primeros están determinados por el metabolismo que además depende de la fase de desarrollo, son influidos por los segundos. Los dos principales factores extrínsecos que influyen en el crecimiento son la temperatura y el alimento. A temperatura controlada, el crecimiento depende principalmente de la cantidad pero también de la calidad del alimento que se suministre.

El camarón de salmuera *Artemia franciscana* es un organismo filtrador no selectivo, lo cual indica que, siempre y cuando esté dentro de un intervalo de tamaño adecuado, el alimento particulado que se le suministre será filtrado e ingerido. Bajo condiciones controladas, el suministro de alimento se puede hacer de varias formas, entre otras disminuyendo la concentración de organismos en paralelo con su desarrollo para mantener constante el aporte de alimento, o incrementando la ración suministrada mientras la concentración de organismos permanece constante. Cuando se pretende evaluar el crecimiento de un organismo con relación a su dieta, es fundamental que el suministro del alimento sea adecuado a sus necesidades.

La diatomea *Chaetoceros muelleri* que se conoce más comúnmente como CHGRA (*Chaetoceros gracilis*), es reconocida como una de las dietas más completas y eficientes para fines de acuicultura. Es la más popular para el cultivo de larvas de peneidos en el noroeste de México, y probablemente a nivel mundial (López-Elías *et al.*, 2003). Se ha utilizado con éxito para la cría de larvas de bivalvos (Brown *et al.*, 1997; Lora-Vilchis y Doktor, 2001; Lora-Vilchis *et al.*, 2004 a,

b) y como dieta de maduración para sus reproductores (Saucedo-Lastra, 2001). Naegel (1999) y De Micco y Hubbard (2001) la consideraron entre las dietas vivas más apropiadas para el cultivo de *A. franciscana*.

Las características químicas de una microalga que en gran medida determinan su calidad nutricia, pueden variar dependiendo de diversos factores entre los cuales se encuentran los parámetros de cultivo, la metodología de cultivo, y la fase de cultivo. Es posible mantener aproximadamente constantes las características de composición y concentración de la biomasa mediante la técnica de cultivos semicontinuos (Fábregas *et al.*, 1996, 1998). Esta forma de cultivo, además de mantener las características de composición química y concentración constantes, requiere de menor espacio y menos mano de obra en comparación con la técnica de cultivos terminales escalados, que es la tradicional en los sistemas de producción masiva para fines comerciales (López-Elías y Voltolina, 1993; Trujillo-Valle y Voltolina, 1994). Con esta técnica parte del cultivo se cosecha diariamente generalmente al final de la fase exponencial, y este volumen es restituido por medio de cultivo fresco (Abalde, *et al.* 1995).

Objetivos

General

-Encontrar las condiciones más adecuadas de alimentación para el cultivo de *A. franciscana* empleando como alimento diferentes concentraciones de la microalga *C. muelleri* durante los primeros siete días de desarrollo posembriionario.

Particulares

-Determinar el efecto de diferentes raciones de *C. muelleri* sobre el crecimiento de *Artemia franciscana*

-Medir la tasa de filtración y el crecimiento de *A. franciscana* durante los primeros siete días después de la eclosión empleando diferentes concentraciones de *C. muelleri*.

Materiales y métodos

Cultivo de microalgas

Los cultivos de *Chaetoceros muelleri* fueron iniciados a partir de un inóculo de proporcionado por el laboratorio de microalgas del CICESE-Ensenada, en el cual esta especie se mantiene con clave CHM-1.

Los recipientes de cultivo empleados fueron garrafones de 18 L, mantenidos con un volumen de 15 L de medio f/2 preparado con una doble concentración de silicatos (Guillard, 1972). La temperatura de cultivo fue de $22 \pm 1^\circ\text{C}$, la salinidad fue de 34 a 36 UPS con iluminación continua de $100\text{-}120 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ mediante 6 lámparas de luz fluorescente de 75 W y la agitación se mantuvo por burbujeo con aire filtrado hasta $1 \mu\text{m}$ y adicionado con un flujo ligero de CO_2 , con el fin de mantener el pH controlado en 8 ± 0.5 . La concentración de las microalgas se verificó diariamente al momento de la cosecha mediante conteos directos con una cámara de Neubauer y, aunque los conteos se realizaron inmediatamente después del muestreo, las muestras se fijaron con lugol para facilitar el conteo y para una eventual comprobación posterior de los resultados. El porcentaje de dilución diario en este experimento fue del 50%, lo cual equivale a 1 duplicación celular·día⁻¹.

Una vez que los conteos diarios demostraron que las variaciones de la concentración celular media no superaban el 10 % por lo menos durante cuatro días, se procedió a emplearlos como alimento. Diariamente se revisaron muestras de estos cultivos al microscopio para detectar posibles contaminaciones principalmente por protozoarios.

En días alternos, se obtuvieron muestras de cada cultivo para determinar el contenido orgánico y la composición química en proteínas carbohidratos y lípidos de la biomasa.

El volumen celular de la microalga fue calculado con base en las dimensiones de la especie, cuyas células tienen una forma cilíndrica. El contenido de carbono (en $\text{pg}\cdot\text{cel}^{-1}$) se calculó con las expresiones propuestas por Menden-Deuer y Lessard (2000) para diatomeas: $\log C = -0.541 + 0.811 \log V$, donde C = contenido de carbono y V = volumen celular en μm^3 .

Análisis químico de la biomasa microalgal

La composición química microalgal se refirió al peso seco de la biomasa celular, y se determinó filtrando por triplicado un volumen de 10–12 mL de cultivo con una concentración celular conocida (aproximadamente 3-3.5 mg de peso seco) que es la cantidad de biomasa que la membrana GF/C de 25 mm de diámetro permitió filtrar con facilidad. Estas muestras se lavaron con 2-3 mL de formato de amonio al 3%, con el fin de sustituir la sal marina. Las membranas empleadas se lavaron previamente con agua destilada, se calcinaron por cuatro horas y se pesaron en una balanza analítica (0.01mg) hasta alcanzar un peso seco constante.

Estas muestras se secaron a 65°C hasta obtener peso constante, con lo cual se eliminó el formato de amonio que se evapora a 54 °C y posteriormente se incineraron en una mufla a 450 °C durante 14 h y se pesaron para obtener el peso seco de las cenizas y calcular por diferencia el peso seco de la materia orgánica presente en cada muestra (Sorokin, 1973).

Al mismo tiempo, se tomaron muestras por triplicado para la determinación de la composición química de la biomasa microalgal. Los métodos empleados fueron el descrito por Lowry *et al.* (1951) para proteínas, el de Dubois *et al.* (1956) para carbohidratos y los lípidos se evaluaron según Pande *et al.* (1963), previa extracción con la técnica de Bligh y Dyer (1959).

El contenido energético del alimento microalgal se calculó utilizando las constantes de equivalencia energética de cada componente orgánico, que son 23.65, 17.16 y 39.56 KJ·g⁻¹ para proteínas, carbohidratos y lípidos, respectivamente (Gnaiger, 1983).

Obtención de nauplios

Los nauplios de *A. franciscana* se obtuvieron por eclosión de quistes comerciales (INVE Aquaculture, Bélgica, Argenteamia BP1207N), según la técnica descrita por Van Stappen (1996) y Merchie (1996). Esta consiste en tratamiento de los quistes, previamente hidratados durante dos horas en agua destilada a 28 °C, con una solución comercial de hipoclorito de sodio al 6% (Cloralex) durante 3-4 min (15 mL·g⁻¹ de quistes) hasta cuando ocurra el cambio de coloración a rojo naranja.

En ese momento los quistes se lavan con agua corriente y con una solución de tiosulfato de sodio al 1%. Los quistes así tratados se incubaron en garrafones invertidos y con el fondo horadado para el suministro de aireación continua, en 15 L de agua marina filtrada a 1 μm , a 28 ± 1 °C y con iluminación continua mediante focos fluorescentes.

En estas condiciones y después de este pretratamiento, la eclosión ocurrió después de 12 a 14 h, al final de las cuales los nauplios se cosecharon aprovechando su fototropismo positivo durante 90 min por sifoneo con una manguera de 4 mm (D.I.). Los nauplios que eclosionaron y fotomigraron durante los primeros 90 min se eliminaron para homogeneizar la población de organismos a utilizarse en los experimentos en cuanto a su tamaño y etapa de desarrollo.

Cultivo de *Artemia franciscana*

Estos nauplios recién eclosionados se distribuyeron en garrafones de plástico invertidos de 18 L empleados como cámaras de incubación, en un volumen de 15 L de agua marina filtrada (1 μm) y se mantuvieron a 28 ± 1 °C, con una salinidad de 36 UPS, con aireación continua y en la oscuridad. Los nauplios permanecieron sin alimento, a una densidad de 25 organismos·mL⁻¹ durante las primeras 24 h, después de las cuales se encontraban en la fase de metanauplio I. A este punto, los organismos se distribuyeron en nueve recipientes de cultivo similares al anterior en igual volumen de agua marina filtrada, pero a una concentración de 1 organismo·mL⁻¹ y a una temperatura de 24 ± 1 °C.

Diariamente se hizo un recambio de agua eliminando las heces y el alimento sobrante por sifoneo a través de un tamiz con luz de malla de 150-250 μm según la fase de cultivo, y reponiendo el agua eliminada con agua filtrada a la misma temperatura de cultivo, de manera que los organismos siempre quedaran en suspensión. Diariamente se suministró alimento fresco y se usaron como testigo cuatro recipientes adicionales con microalgas y sin organismos, con el fin de detectar posibles cambios en la disponibilidad de alimento.

El efecto de cada ración sobre el crecimiento, fue evaluado mediante la medición diaria de la longitud y del peso seco total y orgánico de los organismos.

Para la determinación del peso seco, se concentraron muestras de un número conocido de organismos en una membrana GF/C, que fueron tratadas como en el caso de las microalgas. Para la determinación de longitud, en muestras de 20 organismos de cada recipiente de cultivo fueron fijadas según las indicaciones de Correa-Sandoval y Bückle-Ramírez (1993) y posteriormente fueron medidos con una regleta semimicrométrica en un estereomicroscopio.

Alimentación de *A. franciscana* con diferentes raciones de *C. muelleri*

Este experimento se llevó a cabo en tres fases sucesivas: la primera duró solo tres días, empleando tres concentraciones de *C. muelleri* que fueron $100 \cdot 10^3$, $300 \cdot 10^3$ y $600 \cdot 10^3$ cel·mL⁻¹, para seleccionar la que produjera mayor crecimiento de los organismos. La segunda fase duró cinco días. En los primeros tres se suministró la concentración seleccionada en la primera fase y durante los días 4º y 5º se suministraron otras tres concentraciones de alimento que fueron $300 \cdot 10^3$, $600 \cdot 10^3$ y $900 \cdot 10^3$ cel·mL⁻¹. En la tercera fase que duró 7 días, se emplearon las concentraciones que, de acuerdo a las dos experiencias anteriores, dieron los mejores resultados y para los días 6º y 7º se suministraron tres concentraciones más elevadas de alimento que fueron $600 \cdot 10^3$, $900 \cdot 10^3$ y $1200 \cdot 10^3$ cel·mL⁻¹ para nuevamente seleccionar la que produjera el mejor crecimiento en este período de 6-7 días.

En cada caso, las raciones se suministraron diariamente después del recambio matutino de agua y por la tarde se hizo un reajuste de concentraciones (18:00 h) para mantener la concentración deseada. En todos los casos, se emplearon tres repeticiones y los conteos de células se hicieron mediante cámara de Neubauer.

Tasa de ingestión de *A. franciscana*

La tasa de ingestión de alimento (*I*) de los organismos filtradores se define como la cantidad de alimento ingerido por un organismo por unidad de tiempo (Paffenhofer, 1971). Esta tasa se determinó mediante la expresión, modificada de Albentosa *et al.* (1997):

$$I = V [(C_i - (C_i * C_c)) - C_f] / nt$$

$$C_c = (C_{ci} - C_{cf}) / C_{ci}$$

Donde I = células·org⁻¹·h⁻¹, C_i y C_f = concentraciones inicial y final en el medio en células·mL⁻¹ durante el período t que es la duración del experimento en horas, V es el volumen del medio, C_c es la corrección por variación en el control, C_{ci} y C_{cf} son las concentraciones al inicio y al final en el recipiente control y n es el número de organismos. Estos valores se expresaron también en unidades de peso de acuerdo con los valores equivalentes de peso seco de este alimento.

Para la determinación de la tasa de ingestión, se realizaron experimentos diarios en cámaras de incubación de 125 mL, a la misma temperatura y salinidad de los experimentos de alimentación, con un suministro continuo de aire desde el fondo de la cámara para mantener en suspensión el alimento y aportar el oxígeno necesario. Los recipientes se colocaron en un baño termostático y los organismos se adicionaron en una concentración de 1-2 org·mL⁻¹ según su tamaño, en un volumen total de 100 mL de agua marina filtrada (1µm). El alimento se suministró en la misma concentración que la usada en los recipientes de cultivo y las cámaras fueron mantenidas en la oscuridad. Los organismos permanecieron en estas condiciones durante 5-12 h. Los experimentos se hicieron con cinco repeticiones, empleando además dos controles sin organismos para cada ración, con el fin de corregir los posibles cambios en la concentración de microalgas.

A las 0, 3, 5 o 12 h se obtuvieron muestras de 10 mL del medio de incubación a través de un tamiz de 30 µm, las cuales fueron fijadas con lugol y posteriormente se determinó la concentración celular mediante conteos en cámara de Neubauer.

Análisis de resultados

Como principales variables de respuesta se utilizaron los datos diarios de talla y de peso. Estos fueron comparados mediante pruebas de ANOVA de una vía cuando los datos fueron normales y homoscedásticos. Cuando alguna de estas condiciones no se cumplió, se utilizó la prueba equivalente no paramétrica de Kruskal–Wallis y cuando se encontraron diferencias significativas se realizaron las

pruebas de comparaciones múltiples de Tukey o de Dunn (Zar, 1999). En todas las pruebas se utilizó un nivel de significancia de $\alpha=0.05$.

Los resultados de la tasa de ingestión se transformaron en biomasa seca ingerida por individuo y por día, que se reporta en porcentaje del peso seco del organismo.

Resultados y discusión

Características de *Chaetoceros muelleri*

La concentración media de los cultivos semicontinuos microalgales se mantuvo entre $4\text{-}5 \cdot 10^6 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$. El peso seco total fue $58.5 \text{ pg} \cdot \text{cel}^{-1}$, con un 63.5 % de contenido orgánico. El contenido de lípidos fue superior en 28% al de las proteínas, que son en general la fracción orgánica dominante de las microalgas (Tabla 1). Esto pudiera indicar que a pesar de la tasa de dilución relativamente elevada, los cultivos se encontraban en una fase avanzada de crecimiento desacelerado.

Tabla 1. Características de la microalga *Chaetoceros muelleri*. Valores promedio \pm EE. $n = 4$ para los análisis químicos y el peso. $n = 160$ para las dimensiones. PS = peso seco total, EE = error estándar.

| Características | |
|---|------------------|
| Dimensiones (μm) | 6.5 x 5.5 |
| Peso seco total ($\text{pg} \cdot \text{cel}^{-1}$) | 58.5 ± 2.6 |
| Peso seco orgánico ($\text{pg} \cdot \text{cel}^{-1}$) | 37.1 ± 1.7 |
| Volumen celular ($\mu\text{m}^3 \cdot \text{cel}^{-1}$) | 127.6 ± 10.2 |
| Contenido de carbono ($\text{pg} \cdot \text{cel}^{-1}$) | 14.7 ± 1.1 |
| Proteínas ($\text{pg} \cdot \text{cel}^{-1}$) | 14.1 ± 3.3 |
| Carbohidratos ($\text{pg} \cdot \text{cel}^{-1}$) | 4.1 ± 0.6 |
| Lípidos ($\text{pg} \cdot \text{cel}^{-1}$) | 18.9 ± 2.4 |
| Contenido energético ($\text{J} \cdot \text{mg}^{-1}\text{PS}$) | 15.5 |

Efecto de la concentración sobre el crecimiento de *Artemia franciscana*

Durante las primeras 48 h, los crecimientos en talla fueron similares con todas las raciones suministradas, mientras que las longitudes finales indican un efecto de la cantidad de alimento, con diferencias significativas en los tres casos.

A pesar de las diferencias en longitud, las pruebas de análisis de varianza no indicaron diferencias significativas entre los valores de peso seco total y orgánico durante los primeros tres días (Tabla 2), lo cual parece indicar que en esa fase de desarrollo se suministró una cantidad de alimento superior a la necesaria, aún con la menor concentración. También es posible que los organismos todavía contaran con un suministro energético procedente de residuos de vitelo, en vista de que estas pruebas se realizaron a una temperatura de 24 °C.

Tabla 2. Media \pm error estándar ($n=3$) de la longitud y peso seco total y orgánico de *A. franciscana* cultivada durante los tres primeros días de desarrollo posembriionario con tres raciones de *C. muelleri*. Letras iguales indican valores homogéneos para el mismo día (análisis de varianza de una vía, $\alpha=0.05$ y prueba de Tukey).

| | Edad (días) | Concentración $\cdot 10^3$ cel \cdot mL $^{-1}$ | | |
|--|----------------|---|------------------|------------------|
| | | 100 | 300 | 600 |
| Longitud (mm) | 1 | 0.72 \pm 0.01a | 0.73 \pm 0.01a | 0.73 \pm 0.01a |
| | 2 | 0.92 \pm 0.01a | 0.91 \pm 0.01a | 0.93 \pm 0.01a |
| | 3 | 1.13 \pm 0.01a | 1.22 \pm 0.02b | 1.28 \pm 0.01c |
| Peso seco (μ g \cdot org $^{-1}$) | 1 | 5.9 \pm 0.4a | 5.9 \pm 0.4a | 5.9 \pm 0.4a |
| | 2 | 6.9 \pm 0.5a | 9.5 \pm 2.3a | 9.0 \pm 1.2a |
| | 3 | 11.3 \pm 1.7a | 10.9 \pm 2.8a | 13.6 \pm 1.4a |
| Peso orgánico (μ g \cdot org $^{-1}$) | 1 | 3.2 \pm 0.1a | 3.2 \pm 0.1a | 3.2 \pm 0.1a |
| | 2 | 3.3 \pm 0.3a | 4.4 \pm 0.8a | 4.4 \pm 0.8a |
| | 3 | 5.3 \pm 0.6a | 6.0 \pm 1.0a | 8.0 \pm 1.2a |

Por otra parte, a estas edades el incremento en longitud fue más sensible a la cantidad de alimento suministrado, y se notó una tendencia del peso a aumentar a raciones mayores, por lo cual se seleccionó la concentración intermedia ($300 \cdot 10^3$ cel·mL⁻¹) para la segunda fase de este experimento a estas edades.

Los resultados de la siguiente fase (Tabla 3) muestran una mayor longitud fue en organismos alimentados con la mayor concentración y no se encontraron diferencias entre las dos menores. Las mismas diferencias se encontraron también para los datos finales de peso, por lo cual durante los días 4 y 5 de la última prueba *C. muelleri* se suministraron $900 \cdot 10^3$ cel·mL⁻¹.

Tabla 3. Media \pm error estándar ($n=3$) de la longitud, peso seco total y orgánico de *A. franciscana* cultivada durante los días 4 y 5 de desarrollo posembrionario con *C. muelleri*. Letras iguales indican datos homogéneos para el mismo día (análisis de varianza de una vía, $\alpha=0.05$ y prueba de Tukey). La longitud, el peso seco y el orgánico al día 3 fueron 1.2 ± 0.0 mm, 11.9 ± 1.2 y 8.0 ± 0.9 $\mu\text{g} \cdot \text{org}^{-1}$.

| | Edad (días) | Concentración $\cdot 10^3$ cel·mL ⁻¹ | | |
|--|----------------|---|--------------------|--------------------|
| | | 300 | 600 | 900 |
| Longitud (mm) | 4 | 1.52 \pm 0.00 b | 1.63 \pm 0.02 b | 1.22 \pm 0.01 a |
| | 5 | 1.81 \pm 0.01 a | 1.87 \pm 0.01 a | 2.10 \pm 0.01 b |
| Peso seco ($\mu\text{g} \cdot \text{org}^{-1}$) | 4 | 16.72 \pm 3.40 a | 13.73 \pm 2.06 a | 19.64 \pm 2.18 a |
| | 5 | 19.85 \pm 0.70 a | 24.93 \pm 3.82 a | 31.85 \pm 3.42 b |
| Peso orgánico ($\mu\text{g} \cdot \text{org}^{-1}$) | 4 | 9.82 \pm 3.91 a | 10.15 \pm 0.94 a | 13.50 \pm 1.02 a |
| | 5 | 11.54 \pm 0.35 a | 14.94 \pm 2.31 a | 21.03 \pm 1.83 b |

Los resultados de longitud registrados en la tercera fase (Tabla 4) indicaron que el crecimiento de *A. franciscana* fue significativamente menor a la concentración más baja y no se encontraron diferencias significativas entre las tallas finales de los organismos alimentados durante el sexto y el séptimo día con

$900 \cdot 10^3$ y $1200 \cdot 10^3$ cel·mL⁻¹. Para esta prueba, no se cuenta con datos finales de peso que puedan corroborar este resultado.

Tabla 4. Media \pm error estándar ($n = 3$) de la longitud de *Artemia franciscana* alimentada con tres raciones de *Chaetoceros muelleri* durante los días 6 a 7 de desarrollo posembrionario. Letras iguales indican datos homogéneos para el mismo día (análisis de varianza de una vía, $\alpha=0.05$ y prueba de Tukey). La longitud al 5° día fue de 1.68 ± 0.04 mm.

| | Edad (días) | Concentración·10 ³ cel·mL ⁻¹ | | |
|----------|----------------|--|-------------------|-------------------|
| | | 600 | 900 | 1200 |
| Longitud | 6 | 1.83 \pm 0.06a | 1.90 \pm 0.07a | 1.85 \pm 0.01a |
| (mm) | 7 | 2.58 \pm 0.06 a | 2.81 \pm 0.08 b | 2.85 \pm 0.06 b |

De acuerdo a los resultados de estas pruebas las concentraciones más adecuadas resultaron ser $300 \cdot 10^3$ cel·mL⁻¹ para los primeros tres días, $900 \cdot 10^3$ cel·mL⁻¹ durante el 4° y el 5° día y $1,200 \cdot 10^3$ cel·mL⁻¹ para el periodo del 6 al 7° día. Estas raciones permitieron un crecimiento comparable al previamente reportado para periodos similares de crecimiento de *A. franciscana* con *Dunaliella salina* (Sick, 1976), o con otras dietas que se han definido como adecuadas para el cultivo de *Artemia* (Lavens y Sorgeloos, 1991), incluso cuando el cultivo tiene fines de producción (Naegel, 1999).

Estos valores corroboran que esta microalga es un alimento de buena calidad para *A. franciscana*, lo que queda confirmado por la supervivencia que se encontró en las tres fases de este experimento, la cual varió entre 89 y 100% sin diferencia significativa entre los diferentes tratamientos.

Tasa de ingestión de *A. franciscana*

Las tasas de ingestión de *A. franciscana* variaron de manera directamente proporcional con la ración suministrada (Tabla 5), en forma similar a lo reportado por Reeve (1963 a, b) y coinciden con los datos de su trabajo sobre *Artemia salina* alimentada con *Phaeodactylum tricornutum*, con *Dunaliella tertiolecta* y con

Chlorella stigmatophora. En ambos casos se muestra una correspondencia con respecto a la etapa de desarrollo.

Este comportamiento de ingestión proporcional a la concentración de alimento disponible parece ser general y ha sido encontrado en muchas especies de filtradores entre ellos algunos moluscos (Beiras *et al.*, 1994; Riisgard, 2001). Por otra parte este comportamiento se presenta generalmente solamente hasta alcanzar una concentración crítica, por arriba de la cual la ingestión permanece constante, esto se ha observado en *Daphnia magna* (McMahon y Rigler, 1963) y en el copépodo *Calanus pacificus* (Frost, 1972).

Si la actividad de filtración de *A. franciscana* siguiera este mismo patrón, los resultados de las experiencias realizadas en este trabajo, indican que esa concentración no fue alcanzada, en vista de que durante los primeros seis días, la cantidad de alimento ingerida diariamente por un organismo fue cercana y en algunos casos incluso mayor que su propia biomasa, pero durante el séptimo día la ingestión disminuyó en forma notoria, entre el 53 y el 61% del peso individual.

Esta disminución fue posiblemente debida a la relación alométrica metabolismo:biomasa que es una característica bien conocida para todos los seres vivos (Kleiber, 1932; Schmidt-Nielsen, 1997; Randall *et al.*, 2001), además de un probable incremento en la eficiencia de asimilación, que algunos investigadores han reportado a partir de la fase de desarrollo MN IV de *A. franciscana* (Evjemo y Olsen, 1999; Evjemo *et al.*, 2000).

Tabla 5. Tasas medias de ingestión de *A. franciscana* (\pm Error estándar) alimentada con *C. muelleri* suministrada en diferentes concentraciones durante los primeros siete días de desarrollo posembriionario. Se muestra además la biomasa en relación al peso seco del organismo ($n = 3$).

| | 2º día | | | 3º día | | |
|--|---|------------------|-------------------|---|------------------|-------------------|
| | Concentración $\cdot 10^3$ cel \cdot mL $^{-1}$ | | | Concentración $\cdot 10^3$ cel \cdot mL $^{-1}$ | | |
| | 100 | 300 | 600 | 100 | 300 | 600 |
| Ingestión | | | | | | |
| (10^3 cel \cdot org $^{-1} \cdot$ h $^{-1}$) | 5.23 (1.3) | 5.57 (0.92) | 7.63 (2.30) | 3.49 (1.20) | 6.28 (1.82) | 9.53 (2.12) |
| (μ g PS \cdot org $^{-1} \cdot$ d $^{-1}$) | 7.34 (1.62) | 7.82 (1.15) | 10.71 (3.22) | 4.89 (1.68) | 8.81 (2.45) | 13.38 (2.95) |
| % de PS del organismo | 106.40 (22.48) | 82.30 (11.20) | 119.00 (34.20) | 43.40 (14.20) | 80.90 (22.03) | 98.4 (20.24) |
| | 4º día | | | 5º día | | |
| | Concentración $\cdot 10^3$ cel \cdot mL $^{-1}$ | | | Concentración $\cdot 10^3$ cel \cdot mL $^{-1}$ | | |
| C | 300 | 600 | 900 | 300 | 600 | 900 |
| (10^3 cel \cdot org $^{-1} \cdot$ h $^{-1}$) | 9.91 (2.10) | 8.68 (3.01) | 22.76 (4.92) | 11.76 (1.96) | 18.25 (4.20) | 30.28 (4.87) |
| (μ g PS \cdot org $^{-1} \cdot$ d $^{-1}$) | 13.91 (2.91) | 12.19 (4.22) | 31.96 (6.52) | 16.51 (2.70) | 25.62 (5.89) | 42.51 (7.21) |
| % de PS del organismo | 83.3 (16.24) | 89.0 (30.81) | 163.0 (33.25) | 83.38 (14.20) | 102.9 (20.31) | 133.70 (22.73) |
| | 6º día | | | 7º día | | |
| | Concentración $\cdot 10^3$ cel \cdot mL $^{-1}$ | | | Concentración $\cdot 10^3$ cel \cdot mL $^{-1}$ | | |
| C | 600 | 900 | 1200 | 600 | 900 | 1200 |
| (10^3 cel \cdot org $^{-1} \cdot$ h $^{-1}$) | 24.43 (3.20) | 25.48 (2.90) | 44.17 (7.23) | 16.03 (2.32) | 27.52 (4.31) | 45.41 (5.74) |
| (μ g PS \cdot org $^{-1} \cdot$ d $^{-1}$) | 34.30 (4.41) | 35.77 (3.86) | 62.01 (10.15) | 22.50 (3.79) | 38.63 (6.00) | 63.76 (7.90) |
| % de PS del organismo | 108.3 (13.92) | 89.4 (10.20) | 103.4 (14.80) | 60.8 (10.20) | 52.9 (8.22) | 61.3 (8.00) |

Segundo experimento: evaluación de la calidad nutricia de la microalga *Chlorella capsulata* para *Artemia franciscana***Introducción**

Las clorofíceas del género *Chlorella* se utilizan especialmente para el cultivo de algunos invertebrados dulceacuícolas como rotíferos y cladóceros, pero no son mencionadas con frecuencia para la alimentación de organismos marinos (Coutteau, 1996), aunque es necesario mencionar que se encuentran todavía en literatura algunas referencias sobre el uso de una especie marina de *Chlorella* para el cultivo masivo de *Brachionus plicatilis*, la cual fue identificada posteriormente como la eustigmatofita *Nannochloropsis oculata* (Fulks y Main, 1991). En particular, *C. capsulata* fue evaluada positivamente por James y Abu-Rezeq (1988) para el cultivo de *Brachionus plicatilis*. En el caso de *Chlorella* para el cultivo de *Artemia*, destacan las opiniones contrastantes de Sick (1976) y de Sotolongo (1988): el primero encontró que *Chlorella* no es una dieta adecuada para este organismo, mientras que el segundo reportó buenos resultados con una dieta basada en 1.1×10^6 cel·mL⁻¹ de *Chlorella* sp.

Esta microalga se seleccionó en este trabajo como un alimento de prueba para determinar su calidad para *Artemia franciscana*, empleando como control a la diatomea *Chaetoceros muelleri* en vista de que el éxito de una dieta para un organismo se puede relacionar con alguno de sus parámetros de viabilidad o crecimiento, que pueden ser desde los más generales tales como la supervivencia, hasta los específicos como son el crecimiento en talla o en peso y la velocidad de su desarrollo, que deben ser comparados con una referencia conocida, es decir con los efectos de otros alimentos y para este fin se requiere del suministro de una equivalencia de estas dietas, que puede ser medida en forma sencilla en números de células si las dietas tuvieran igual volumen o cuando esto no ocurre, el suministro puede ser medido en una cantidad equivalente en energía o de biomasa orgánica (Albentosa et al. 1996).

Otras maneras de suministro incluyen una equivalencia en el contenido de carbono, el suministro para una tasa de ingestión máxima (Sick, 1976) y el empleo

de una fracción del peso corporal del organismo y si se conoce la relación entre el crecimiento medido por el peso en función del tiempo, se puede calcular la ración de acuerdo con esto en forma anticipada (Owen et al. 1998). En esta experiencia se optó por utilizar raciones equivalentes en biomasa orgánica y tomar como punto de comparación el crecimiento inducido por *C. muelleri*, previamente demostrado como alimento de buena calidad para este organismo.

Objetivo

Evaluar la calidad nutricia de la microalga *Chlorella capsulata* para *Artemia franciscana*, empleando como dieta control a *Chaetoceros muelleri*, mediante la cuantificación del consumo de alimento y de la eficiencia de su utilización en términos de crecimiento en talla, peso, supervivencia y desarrollo durante los primeros siete días poseclosión.

Materiales y métodos

La microalga *Chlorella capsulata* (UTEX/LB2074), fue suministrada por el cepario de microalgas del CIBNOR. Para la microalga *C. muelleri* el origen, la técnica y las condiciones de cultivo fueron las mismas indicadas en el primer experimento. Con el fin de aumentar la producción de *Chlorella capsulata* se modificó la tasa de dilución diaria y la temperatura se incrementó, pero todos los demás factores de cultivo excepto la adición de silicatos, se mantuvieron iguales a los de *Chaetoceros muelleri*. El porcentaje de dilución diaria se mantuvo en 37% y la temperatura del medio de cada recipiente se mantuvo en 27 ± 1 °C con un calentador Ebbo-Jagger de 40 W. El volumen de *Chlorella capsulata* se calculó considerándola un ovoide a partir de sus dimensiones, el contenido de carbono se calculó con base en la relación propuesta por Menden-Deuer y Lessard (2000) para no diatomeas

$$\log C = -1.026 + 1.088 \log V$$

Donde C = contenido de carbono en $\text{pg}\cdot\text{cel}^{-1}$ y V = volumen celular en μm^3 .

La producción, cosecha de los nauplios y las condiciones de cultivo fueron muy similares a los que se utilizaron en el primer experimento. Los cambios principales que en esta experiencia se efectuaron fueron:

- la temperatura de cultivo de los organismos se mantuvo en 28 ± 0.5 °C
- la concentración inicial de nauplios de $1.7\text{-}2.0$ organismos $\cdot\text{mL}^{-1}$

-las raciones empleadas 0.3 , 0.6 y $1.2 \cdot 10^6$ cel·mL⁻¹·d⁻¹ de *C. muelleri* y 0.75 , 1.5 y $3.0 \cdot 10^6$ cel·mL⁻¹·d⁻¹ de *C. capsulata*.

En ambos casos estas raciones son equivalentes a 11.7 , 23.4 y 46.8 mg·l⁻¹·d⁻¹ de materia orgánica seca, que corresponden respectivamente al 42.5 , 85 y 170% de la ración que Evjemo y Olsen (1999) encontraron adecuada para obtener la máxima tasa de crecimiento de *A. franciscana*.

Antes del recambio diario de agua, se obtuvieron muestras de cada acuario con el fin de evaluar:

-el consumo de alimento según la expresión mencionada en el primer experimento

-las fases de desarrollo y los respectivos porcentajes de instar presentes para el cálculo del índice de desarrollo

-el crecimiento en talla y peso de los organismos sometidos a los seis tratamientos

-la supervivencia

La fase de desarrollo fue determinada en los organismos muestreados para determinación de su longitud, usando como base la escala de Schrehardt (1987). En esta escala la fase instar 1 corresponde al estadio de nauplio, las de instar 2 – 5 a metanauplio I - IV, las instar 6 - 12 equivalen a postmetanauplio I – VII y las de instar 13 - 19 a postlarva I - VII. Con estos datos se calculó el índice de desarrollo (*ID*) según Villegas y Kanazawa (1979), utilizando la ecuación:

$$ID = N^{-1} \sum A$$

Donde *A* es el valor numérico equivalente a la fase instar de cada organismo y *N* es el número de organismos presentes en la muestra.

Al final se calculó el factor de conversión alimenticia o *FCA*, como la proporción entre la cantidad de alimento suministrado y el incremento en biomasa, así como la eficiencia de crecimiento (*K₁*) (Grodzinski et al. 1975), que es la proporción entre el incremento en biomasa y el peso del alimento ingerido, expresada en porcentaje. En ambos casos, estos indicadores se calcularon con base en los pesos secos orgánicos individuales, tanto de suministro e ingestión, como de los organismos.

Resultados y discusión

La concentración media de los cultivos microalgales se mantuvo entre 8-10 y $4\text{-}5 \cdot 10^6$ cél·mL⁻¹ para *Chlorella capsulata* y *Chaetoceros muelleri*. Las microalgas usadas en este experimento tienen diferente tamaño, y por consecuencia diferente volumen y peso individual. La composición química también fue diferente, en especial debido al alto contenido de carbohidratos de *C. capsulata* (27.6% en comparación con 13.5% de *C. muelleri*). Por otra parte, el contenido energético de la biomasa orgánica resultó similar, entre 28.8 y 30.4 J·mg⁻¹, equivalentes a 19.5 y 17.0 J·mg⁻¹ de peso seco total de *C. muelleri* y de *C. capsulata*, respectivamente (Tabla 6).

Tabla 6. Características de las microalgas *Chlorella capsulata* y *Chaetoceros muelleri*. Valores promedio \pm error estándar, $n = 8$ para los análisis químicos y el peso. $n = 160$ para las dimensiones. PS = peso seco total.

| Características | <i>Chlorella capsulata</i> | <i>Chaetoceros muelleri</i> |
|--|----------------------------|-----------------------------|
| Dimensiones (μm) | 4.4 x 3.2 | 6.6 x 5.2 |
| Peso seco total ($\text{pg} \cdot \text{cel}^{-1}$) | 29.7 \pm 3.3 | 58.5 \pm 2.6 |
| Peso seco orgánico ($\text{pg} \cdot \text{cel}^{-1}$) | 15.2 \pm 1.2 | 40.0 \pm 2.6 |
| Volumen celular ($\mu\text{m}^3 \cdot \text{cel}^{-1}$) | 41.7 \pm 5.8 | 137.0 \pm 9.3 |
| Contenido de carbono ($\text{pg} \cdot \text{cel}^{-1}$) | 5.6 \pm 0.9 | 15.0 \pm 0.8 |
| Proteínas ($\text{pg} \cdot \text{cel}^{-1}$) | 4.8 \pm 0.4 | 15.9 \pm 0.6 |
| Carbohidratos ($\text{pg} \cdot \text{cel}^{-1}$) | 4.2 \pm 0.4 | 5.4 \pm 0.4 |
| Lípidos ($\text{pg} \cdot \text{cel}^{-1}$) | 6.3 \pm 0.6 | 18.7 \pm 1.0 |
| Contenido energético (J· mg ⁻¹ PS) | 17.0 | 19.5 |

Una vez corregidas con los datos de mortalidad por muestreo, las supervivencias medias calculadas globalmente al final del experimento, fueron del 99% para los organismos alimentados con *C. muelleri* y del 95% con *C. capsulata*, y la prueba de análisis de varianza de dos vías no encontró diferencias significativas entre raciones o entre dietas ($P > 0.05$). Esto indica que en todos los casos la cantidad de alimento suministrada fue suficiente para el mantenimiento de los organismos.

Por otra parte, el crecimiento de los organismos alimentados con *Chlorella capsulata* fue notablemente inferior, tanto en longitud (Fig. 1) como en peso seco total (Fig. 2). Además se notaron también diferencias relacionadas con las raciones, que se hicieron evidentes en diferentes días dependiendo de la microalga y de la cantidad suministrada. Diferencias similares se observaron también comparando el incremento progresivo en peso orgánico individual y en el índice de desarrollo.

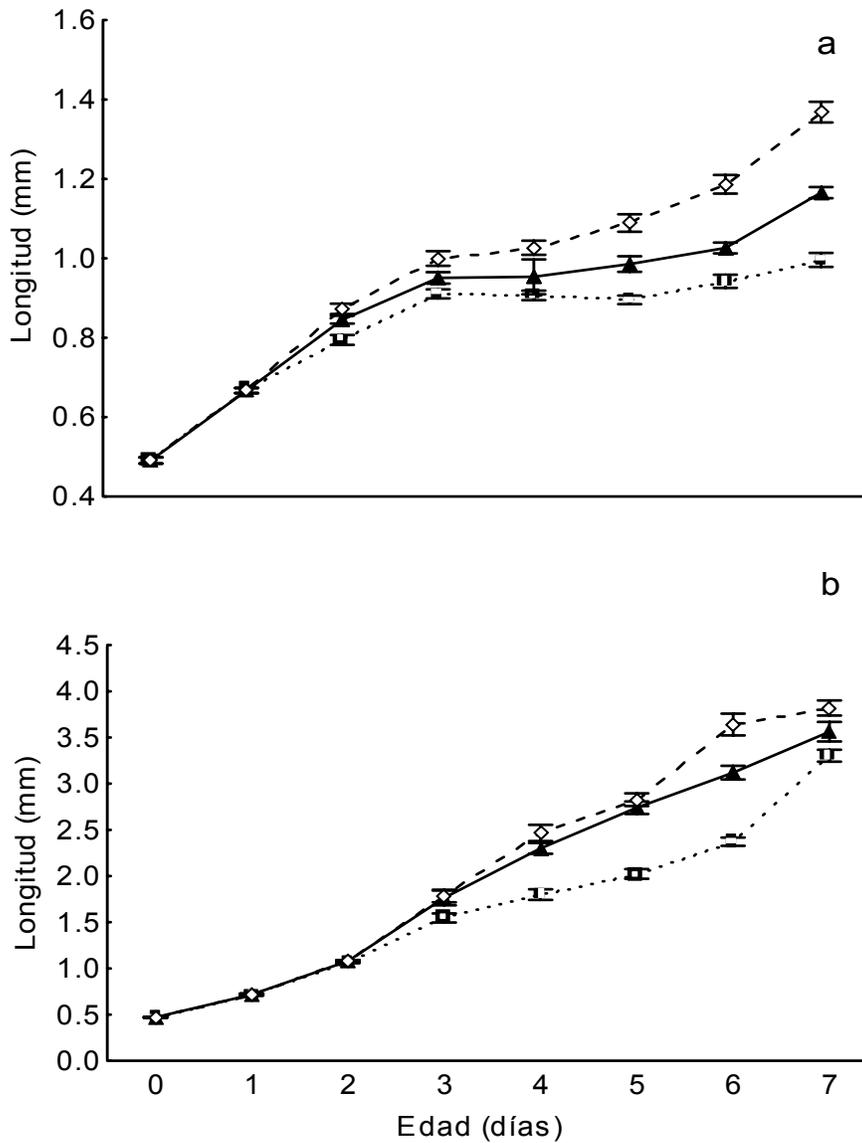


Figura 1. Longitud total de *Artemia franciscana*, alimentada con *Chlorella capsulata* (a) y con *Chaetoceros muelleri* (b) durante los primeros siete días de desarrollo posembrionario ($n = 3$). Raciones equivalentes a 1.7 (□), 23.4 (▲) y 46.8 (◇) $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ de peso orgánico. Promedio y barras de error estándar. Nótese la diferencia en la escala de longitud.

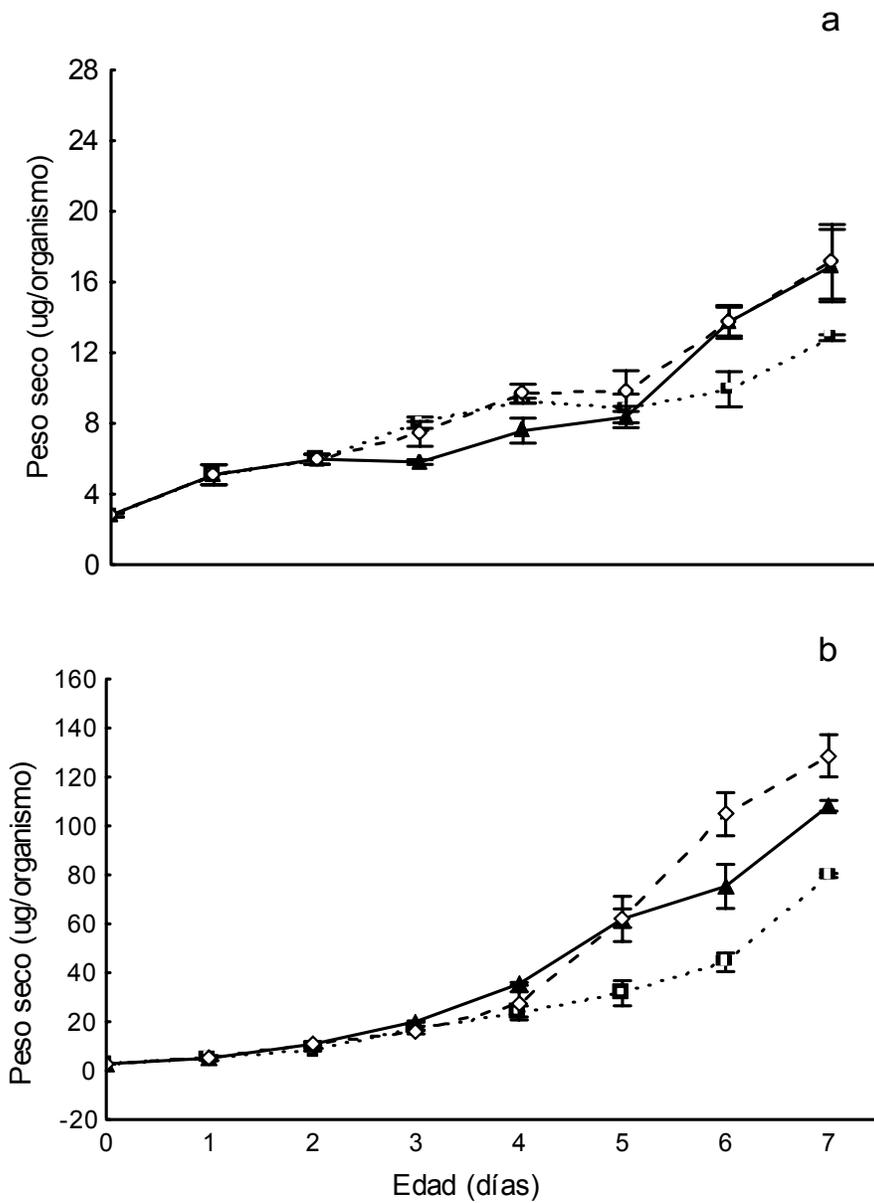


Figura 2. Peso seco total de *Artemia franciscana*, alimentada con *Chlorella capsulata* (a) o con *Chaetoceros muelleri* (b) durante los primeros siete días de desarrollo posembrionario ($n = 3-4$). Raciones equivalentes a 1.7 (□), 23.4 (▲) y 46.8 (◇) $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ de peso orgánico. Promedio y barras de error estándar. Nótese la diferencia de la escala de peso.

Las primeras diferencias en talla y en índice de desarrollo se notaron al final del tercer día de cultivo, por lo cual los valores de este día, junto con los datos finales al séptimo día, se seleccionaron para la comparación estadística de los resultados.

Estas pruebas indicaron que la alimentación de *A. franciscana* con la microalga *C. muelleri* indujo un crecimiento significativo mayor tanto en peso como en longitud, y que con ambas dietas las mayores raciones produjeron los mayores incrementos en talla y en peso orgánico individual. Además, se observaron diferencias importantes en la tasa de desarrollo, principalmente relacionadas con el tipo de alimento microalgal. Al final del período de experimentación se encontró que los valores medios de longitud y del índice de desarrollo fueron aproximadamente del doble con la dieta de *C. muelleri* y el peso orgánico fue casi de siete veces mayor. También se encontró una relación con la ración diaria, en este caso solo *para* los cultivos que recibieron *C. muelleri* (Fig. 3).

El consumo de alimento fue similar con las raciones correspondientes de cada dieta, y varió entre el 79 y el 97% de la cantidad suministrada.

El factor de conversión alimenticia fue 8-14 veces mayor en el caso de la dieta de *C. capsulata* mientras que la eficiencia de crecimiento resultó de 7-10 veces mayor para los organismos alimentados con *C. muelleri*. (Tabla 3, Anexo 1, p. 120. Lora-Vilchis y Voltolina, 2004)

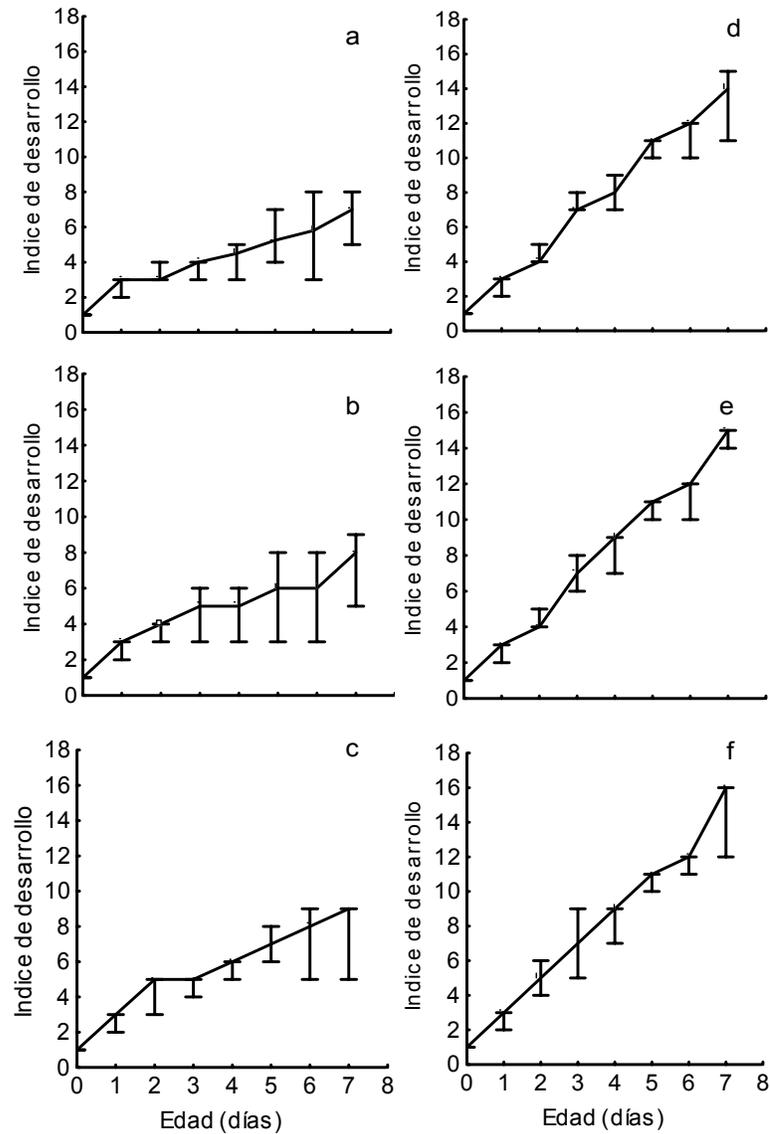


Figura 3. Índice de desarrollo de *A. franciscana* alimentada durante los primeros siete días de desarrollo posembrionario con *Chlorella capsulata* (a, b y c) y con *Chaetoceros muelleri* (d, e, f) en tres raciones equivalentes. a y d = 11.7, b y e = 23.4, c y f = 46.8 mg·L⁻¹·d⁻¹. Valores promedio y barras de máximos y mínimos.

Tercer experimento: evaluación de calidad nutricia de las microalgas *Nannochloropsis oculata* e *Isochrysis* sp. para *Artemia franciscana*

Introducción

La microalga *Isochrysis* sp., es conocida en acuicultura comercial como TISO, T-ISO o *Isochrysis* Tahiti, es la microalga con el mayor volumen de producción a nivel mundial en los laboratorios de producción de larvas y semilla de moluscos (Coutteau y Sorgeloos, 1992; Coutteau, 1996), aunque existen algunos cuestionamientos sobre su superioridad como dieta para la alimentación de juveniles de varias especies de bivalvos (Cordero-Esquivel y Voltolina, 1994; Lora-Vilchis *et al.*, 2004b). De acuerdo a los resultados de Evjemo y Olsen (1999), el crecimiento óptimo de *Artemia franciscana* se obtiene con una dieta basada en esta especie.

Nannochloropsis oculata es seguramente la microalga más ampliamente utilizada a nivel mundial para la alimentación de organismos filtradores, ya que esta especie es usada tradicionalmente en todos los laboratorios de producción de larvas de peces para el cultivo del rotífero *Brachionus plicatilis* (Fulks y Main, 1991; Dhert, 1996). No existen muchos antecedentes sobre otros usos de esta microalga para fines de acuicultura y en especial para *Artemia*, el único antecedente que se encontró fueron algunos resultados de crecimiento en longitud reportados por Tizol-Correa (1994), que la define como adecuada para la producción comercial de *A. franciscana*, aunque los datos de talla que reportó parecen indicar un crecimiento menor del que se reporta en general con otros tipos de dieta, este fue un aspecto que se consideró para su selección en el presente trabajo.

Evjemo y Olsen (1999) evaluaron las concentraciones de alimento y de organismos adecuadas para un crecimiento óptimo de *A. franciscana*, que incluyen el crecimiento hasta el 12o día de cultivo. Estos autores concluyen que la concentración mínima para el crecimiento óptimo de *A. franciscana* debe ser de 10 mg de C·L⁻¹ que equivalen a 27.5 mg de biomasa orgánica de *Isochrysis* sp., y que la tasa de crecimiento puede ser mantenida en su valor máximo con esta

ración, ajustando progresivamente la concentración de organismos de acuerdo a su edad.

En el presente trabajo se seleccionaron como dietas de prueba a las microalgas *Nannochloropsis oculata*, *Isochrysis* sp. empleando *Chaetoceros muelleri* como dieta control. Debido a que el crecimiento que Evjemo y Olsen (1999) reportaron para *A. franciscana* como óptimo empleando como dieta a *Isochrysis* sp. y que las condiciones en que realizaron sus experiencias fueron similares a las condiciones de laboratorio de esta experiencia, se decidió emplear la misma ración pero con una menor concentración inicial de organismos que se mantuvo constante durante toda la prueba. El suministro de las microalgas diferentes a *Isochrysis* sp. se calculó en cantidades equivalentes a la biomasa orgánica suministrada con *Isochrysis* sp..

El uso de *N. oculata* como dieta de pobre calidad en lugar de *C. capsulata* cuyo bajo valor dietético se comprobó en el segundo experimento, se debió a problemas de contaminación que no pudieron resolverse en tiempos útiles para este trabajo.

Objetivo

Evaluar la calidad nutricia de las microalgas *Isochrysis* sp. y *Nannochloropsis oculata* en dietas monoalgales preseleccionadas empleando *Chaetoceros muelleri* como control, mediante la cuantificación del consumo de alimento y de la eficiencia de su utilización en términos de crecimiento en talla, peso y supervivencia durante los primeros cinco días poseclusión.

Materiales y métodos

Los resultados que se presentan a continuación corresponden a los obtenidos con un solo experimento con la microalga *N. oculata* y con tres diferentes pruebas de alimentación con *Isochrysis* sp., los cuales se realizaron en el Departamento de Acuicultura del CICESE en Ensenada. En todos los casos los experimentos se llevaron a cabo con cuatro repeticiones y utilizando *C. muelleri* como dieta control. La haptofita *Isochrysis* sp. (CCMP 1324) y la eustigmatofita *Nannochloropsis oculata* (CCMP 525) fueron proporcionadas por el laboratorio de microalgas del CICESE- Ensenada y por el área de Fitotecnia del CIBNOR, S. C.

El cultivo de las tres microalgas, así como la eclosión de los quistes y el cultivo de *A. franciscana* se realizaron de acuerdo a las especificaciones del primer experimento, realizando solo algunos cambios:

- la tasa de dilución diaria en los cultivos microalgales fue del 25%, lo que equivale a 0.41 duplicaciones celulares diarias
- la concentración de organismos se mantuvo durante toda la experiencia en $1.7-2.0$ organismos·mL⁻¹ ajustando diariamente el volumen de los cultivos de acuerdo con los cambios de densidad debidos a la mortalidad natural y a la toma de las muestras para las determinaciones de peso y de longitud.
- la ración diaria se mantuvo en una biomasa equivalente e igual a 27.5 mg·L⁻¹ de peso seco orgánico
- el equivalente energético de las microalgas fue obtenido por calorimetría directa, mediante la obtención de muestras concentradas por centrifugación que fueron liofilizadas y prensadas en pastillas cuyo peso seco constante se determinó previamente, estas se quemaron en ambiente saturado de oxígeno en una bomba calorimétrica semimicro, Parr 1425.
- debido a la alta mortalidad que se registró en los cultivos con la dieta alternativa de peor calidad (*N. oculata*), la duración de los experimentos fue de cinco días; la talla, el peso y el contenido energético de los organismos fue evaluado solamente en los días 0, 3 y 5, por lo menos en el caso de los cultivos que dieron una suficiente cantidad de organismos y de biomasa.

Resultados y discusión

La concentración media de los cultivos semicontinuos de las tres microalgas se mantuvo cercana a $19, 10$ y $4.1 \cdot 10^6$ cél·mL⁻¹ para *N. oculata*, *Isochrysis* sp. y *C. muelleri*. De acuerdo a los datos de peso seco total, una célula de *Isochrysis* equivale a 2.6 células de *N. oculata* y una de *C. muelleri* equivale a la biomasa de 2.1 células de *Isochrysis* y 5.5 de *N. oculata*.

El contenido de sustancia orgánica de *N. oculata* y de *C. muelleri* fue similar, y representó entre el 77 y el 75% del peso seco total, en comparación con el 81% calculado para *Isochrysis* sp.. Los porcentajes de proteínas, lípidos y carbohidratos (con base en peso seco) fueron de 33-34, 23-22 y 11-12% para *N.*

oculata e *Isochrysis*, en comparación con 26, 34 y 7%, respectivamente, en el caso de *C. muelleri*.

A pesar de estas diferencias en composición, el contenido energético por unidad de peso seco total que se obtuvo por calorimetría directa fue similar para *N. oculata* y para *C. muelleri* y varió entre 16.6 y 16.4 J·mg⁻¹, que resultaron notablemente inferiores de los 23.4 J·mg⁻¹ que se obtuvieron en el caso de *Isochrysis* sp. (Tabla 7).

Tabla 7. Características de las microalgas *Nannochloropsis oculata*, *Isochrysis* sp. y *Chaetoceros muelleri*, Valores promedio ± EE, *n* = 4–6 para los análisis químicos y el peso. *n* = 160 para las dimensiones.

| Características | <i>N. oculata</i> | <i>Isochrysis</i> sp. | <i>C. muelleri</i> |
|--|-------------------|-----------------------|--------------------|
| Dimensiones (µm) | 2.5 | 5.0 x 3.0 | 6.6 x 5.2 |
| Peso seco total (pg · cel ⁻¹) | 8.2 ± 0.2 | 21.2 ± 0.6 | 44.9 ± 1.9 |
| Peso seco orgánico (pg · cel ⁻¹) | 6.3 ± 0.1 | 17.1 ± 0.4 | 34.8 ± 1.0 |
| Volumen celular (µm ³ · cel ⁻¹) | 8.18 ± 0.42 | 35.34 ± 5.50 | 140.16 ± 14.60 |
| Contenido de carbono (pg · cel ⁻¹) | 0.92 ± 0.03 | 4.55 ± 0.15 | 15.85 ± 0.67 |
| Proteínas (pg · cel ⁻¹) | 2.8 ± 0.5 | 6.8 ± 0.6 | 11.5 ± 1.5 |
| Carbohidratos (pg · cel ⁻¹) | 0.9 ± 0.2 | 2.6 ± 0.4 | 3.1 ± 0.5 |
| Lípidos (pg · cel ⁻¹) | 1.9 ± 0.3 | 4.8 ± 0.6 | 15.4 ± 2.3 |
| Contenido energético (J · mg ⁻¹ PS) | 16.4 ± 0.3 | 23.4 ± 0.7 | 16.6 ± 0.5 |

PS = peso seco, EE = error estándar.

La supervivencia media al final de 5 días de cultivo fue de 31.3, 88.4 y 92.1 % para *N. oculata*, *C. muelleri* e *Isochrysis* sp. y la respectiva prueba de análisis de varianza demostró que la única diferencia significativa era la mayor mortalidad en los cultivos alimentados con *N. oculata* (ANOVA de una vía, $\alpha=0.05$).

Esta baja supervivencia, que fue acompañada por una tasa de crecimiento notablemente menor, no permitió obtener muestras suficientes para la determinación del peso final de los organismos alimentados con *Nannochloropsis oculata* y determinó la corta duración de estos experimentos.

Los menores valores de longitud y el índice de desarrollo fueron para los organismos alimentados con *N. oculata* que no variaron a partir del día 3, aunque menos notorias, se registraron también diferencias entre las otras dos dietas, con las tallas mayores para los organismos alimentados con *C. muelleri* (Fig. 4).

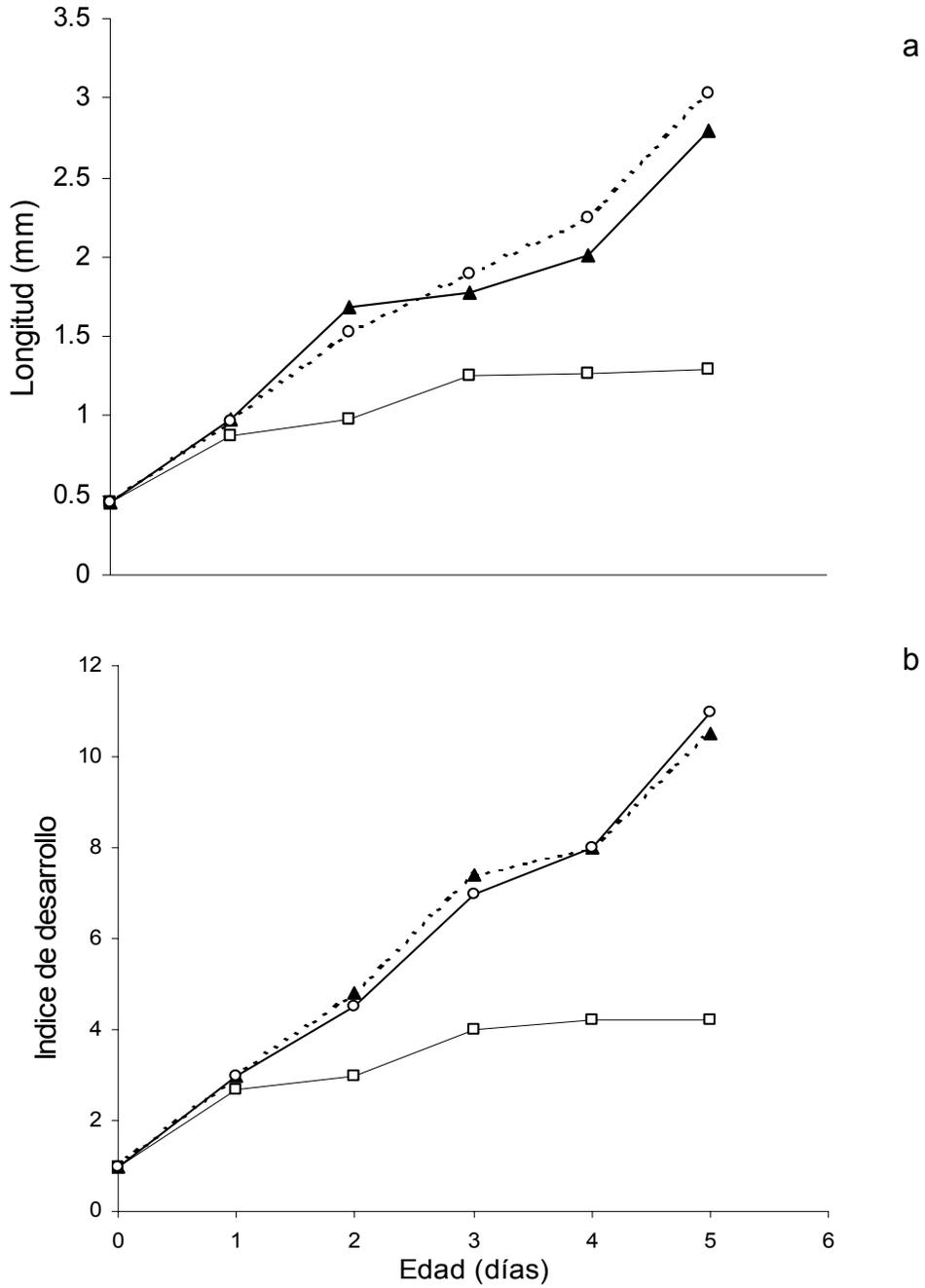


Figura 4. Longitud (a) e índice de desarrollo (b) de *Artemia franciscana* alimentada con *N. oculata* (cuadros), *Isochrysis sp.* (triángulos) o *C. muelleri* (círculos).

A pesar del incremento en longitud registrado al final del tercer día, los organismos alimentados con *N. oculata* no aumentaron su peso seco total con respecto al valor determinado para los nauplios inmediatamente después de la eclosión y en efecto su contenido orgánico resultó ser el 67% del inicial.

Comparando los datos recabados en este mismo día y en la fecha final para los ejemplares alimentados con las otras dos microalgas, también se encontraron diferencias significativas. En ambos casos los pesos resultaron entre 2.5 y 3 µg menores con *Isochrysis* sp. que con *C. muelleri*, tanto a los tres como a los cinco días de cultivo.

El contenido energético por unidad de biomasa de los organismos alimentados con *Isochrysis* sp. y *C. muelleri* resultó muy similar entre dietas y al compararlos con el inicial de los nauplios, que fue de $22.5 \text{ J}\cdot\text{mg}^{-1}$, se observó un descenso al tercer día, de casi $6.5 \text{ J}\cdot\text{mg}^{-1}$. Ésto probablemente corresponde a la cantidad de energía consumida para el desarrollo y el metabolismo activo durante el período transcurrido entre la eclosión y el primer período de alimentación, la cual puede alcanzar hasta el 30% del contenido energético de los nauplios inmediatamente después de la eclosión (Merchie, 1996), que coincide con el 28-29% calculado con los datos recabados en estas pruebas.

Por otra parte, considerando el incremento del contenido energético individual, la ganancia global fue de un 130 y un 220% con *Isochrysis* y con *C. muelleri* hasta el día 3 y del 260 y 180% entre esta fecha y el día 5, respectivamente; esto indica que, a pesar del gasto inicial, los organismos alimentados con estas dietas estaban obteniendo una cantidad de energía suficiente para satisfacer sus necesidades metabólicas y para canalizar el exceso hacia su desarrollo y crecimiento (Tabla 8).

Tabla 8. Media \pm error estándar del peso seco y del peso orgánico y contenido energético de *A. franciscana* alimentada con *Nannochloropsis oculata*, *Isochrysis* sp. y *Chaetoceros muelleri* durante los cinco primeros días de desarrollo posembrionario. $n = 3$ para la dieta de *N. oculata*, $n = 12$ y 11 para *C. muelleri* e *Isochrysis*. Letras diferentes indican diferencias significativas en la misma fecha (ANOVA de una vía y prueba de Tukey para el día 3; t de Student para el día 5; $\alpha=0.05$).

| Edad (días) | Dieta | | | | | |
|--|---|--------------------------|---|---|--------------------------|------------------------------|
| | <i>N.</i> <i>oculata</i> | <i>Isochrysis</i> sp. | <i>C.</i> <i>muelleri</i> | <i>N.</i> <i>oculata</i> | <i>Isochrysis</i> sp. | <i>C.</i> <i>muelleri</i> |
| | Peso seco ($\mu\text{g}\cdot\text{org}^{-1}$) | | | Peso orgánico ($\mu\text{g}\cdot\text{org}^{-1}$) | | |
| 0 | 2.6 | 2.6 | 2.6 | 2.4 | 2.4 | 2.4 |
| 3 | 2.7 \pm 0.5 a | 8.8 \pm 0.3 b | 11.7 \pm 0.3 c | 1.6 \pm 0.1a | 6.2 \pm 0.1 b | 8.9 \pm 0.2 c |
| 5 | -- | 22.5 \pm 0.8 a | 24.9 \pm 0.6 b | -- | 18.2 \pm 0.9 a | 20.6 \pm 0.5 b |
| Contenido energético ($\text{J}\cdot\text{mg}^{-1}$) | | | Contenido energético ($\text{J}\cdot\text{individuo}^{-1}$) | | | |
| 0 | 22.5 | 22.5 | 22.5 | 0.06 | 0.06 | 0.06 |
| 3 | -- | 16.2 \pm 0.1 a | 16.1 \pm 0.1 a | -- | 0.14 | 0.19 |
| 5 | -- | 22.0 \pm 0.1 a | 21.2 \pm 0.3 a | -- | 0.50 | 0.53 |

Cuarto experimento: evaluación de la calidad nutricia de las microalgas *Nannochloropsis oculata* e *Isochrysis* sp. para *Artemia franciscana*

Introducción

Las microalgas *Nannochloropsis oculata*, *Isochrysis* sp., y *C. muelleri* se volvieron a probar con el fin de corroborar y completar los resultados del tercer experimento, ya que la supervivencia de los organismos alimentados con la primera no fue suficiente para permitir la evaluación de su productividad o crecimiento esperado, el equivalente energético de su biomasa y además no se pudieron realizar todos los experimentos de ecofisiología previstos para los primeros siete días poseclosión.

Los resultados que se presentan a continuación corresponden a los obtenidos en un solo experimento con la microalga *N. oculata*, a dos con *Isochrysis* sp. y tres con *Chaetoceros muelleri*, ya que en todos los casos se usó esta última especie como dieta control. Estas experiencias se realizaron en el Laboratorio Interinstitucional de microalgas UAS-CIBNOR.

Objetivo

Evaluar la calidad nutricia de las microalgas *Isochrysis* sp. y *Nannochloropsis oculata* en dietas monoalgales, empleando *Chaetoceros muelleri* como dieta control, mediante la cuantificación del consumo de alimento y de la eficiencia de su utilización en términos de crecimiento en talla, peso y supervivencia y desarrollo durante los primeros siete días poseclosión.

Materiales y métodos

El cultivo de las microalgas, la obtención de nauplios y el cultivo de los organismos se realizaron de acuerdo a los procedimientos mencionados en el primer experimento, con una tasa de dilución diaria para los cultivos microalgales del 25 % igual a la aplicada en el tercer experimento. El contenido energético se determinó mediante calorimetría directa, como en el tercer experimento. Algunos cambios que se realizaron se describen a continuación:

-la concentración de los organismos se disminuyó diariamente y en forma progresiva iniciando con $2.47 \text{ org}\cdot\text{mL}^{-1}$ para lograr el séptimo día una densidad de $0.16 \text{ org}\cdot\text{mL}^{-1}$, dependiendo de la fase de desarrollo (Tabla 1 Anexo 2 p. 136, Lora Vilchis *et al.*, 2004)

-el alimento se suministró a partir del primer día de desarrollo en una sola ración diaria equivalente a $27.5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de peso seco orgánico; esta ración, que corresponde en promedio a $1.3\cdot 10^6 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ de *Isochrysis* sp., fue reportada como la más adecuada para la máxima tasa de crecimiento de *A. franciscana* bajo condiciones de cultivo similares (Evjemo y Olsen, 1999)

-las raciones de *N. oculata* y de *C. muelleri* fueron calculadas para dar biomazas orgánicas equivalentes e iguales a 1.1 y $6.3\cdot 10^6 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ respectivamente.

Resultados y discusión

Los resultados de esta experiencia en lo que respecta a las microalgas *Isochrysis* sp. y *C. muelleri* se presenta y discute en el anexo 2 (Anexo 2: Lora-Vilchis et al. 2004). En esta sección se presenta un resumen de los mismos.

Como en el tercer experimento, las principales diferencias en las características de las microalgas fueron el tamaño de las tres especies y el mayor contenido energético de *Isochrysis* sp. el cual, al igual del que se obtuvo para *N. oculata*, resultó similar a los datos obtenidos en el tercer experimento, mientras que, debido a su mayor contenido inorgánico, el de *C. muelleri* resultó cerca de un 15% inferior ($14 \text{ J}\cdot\text{mg}^{-1}$, en comparación con los 16.4 que se registraron en el tercer experimento).

A diferencia de los cultivos anteriores, los valores del contenido de proteínas fueron en todos los casos superiores a los de lípidos, lo cual sugiere que estos cultivos se estaban manteniendo en una fase de crecimiento cercana a la exponencial (Tabla 9).

Tabla 9. Características de las microalgas *Nannochloropsis oculata*, *Isochrysis* sp. y *Chaetoceros muelleri*. Valores promedio \pm error estándar, $n = 9$ para los pesos, $n = 4-6$ para la composición química y el contenido energético $n = 160$ para las dimensiones. PS = peso seco.

| Características | <i>N. oculata</i> | <i>Isochrysis</i> sp. | <i>C. muelleri</i> |
|--|-------------------|-----------------------|--------------------|
| Dimensiones (μm) | 2.0 | 5.4 x 4.8 | 6.0 x 5.0 |
| Peso seco total ($\text{pg} \cdot \text{cel}^{-1}$) | 6.2 \pm 0.7 | 24.2 \pm 0.5 | 45.5 \pm 2.6 |
| Peso seco orgánico ($\text{pg} \cdot \text{cel}^{-1}$) | 4.4 \pm 0.6 | 21.2 \pm 0.6 | 25.5 \pm 1.4 |
| Volumen celular ($\mu\text{m}^3 \cdot \text{cel}^{-1}$) | 4.2 \pm 0.8 | 69.2 \pm 4.5 | 115.8 \pm 9.7 |
| Contenido de carbono ($\text{pg} \cdot \text{cel}^{-1}$) | 0.44 \pm 0.90 | 9.46 \pm 0.80 | 15.4 \pm 0.80 |
| Proteínas ($\text{pg} \cdot \text{cel}^{-1}$) | 1.45 \pm 0.18 | 12.71 \pm 0.45 | 12.81 \pm 0.19 |
| Carbohidratos ($\text{pg} \cdot \text{cel}^{-1}$) | 0.34 \pm 0.01 | 2.72 \pm 0.17 | 3.32 \pm 0.53 |
| Lípidos ($\text{pg} \cdot \text{cel}^{-1}$) | 1.07 \pm 0.09 | 7.62 \pm 0.48 | 9.11 \pm 2.02 |
| Contenido energético ($\text{J} \cdot \text{mg}^{-1}$ PS) | 16.4 \pm 0.4 | 21.1 \pm 0.3 | 14.0 \pm 0.8 |

La supervivencia de los organismos alimentados con *N. oculata* fue superior a la registrada en el tercer experimento, con una mortalidad del 30% al final del quinto día y del 55% el último día de esta prueba, pero comparativamente con las otras dietas, estos organismos tuvieron los valores de supervivencia más bajos ($P < 0.05$). Para las otras dos microalgas, los porcentajes de supervivencia al final fueron superiores al 85-90% y la prueba de comparaciones múltiples no detectó diferencias significativas entre estas dos dietas (Fig. 5).

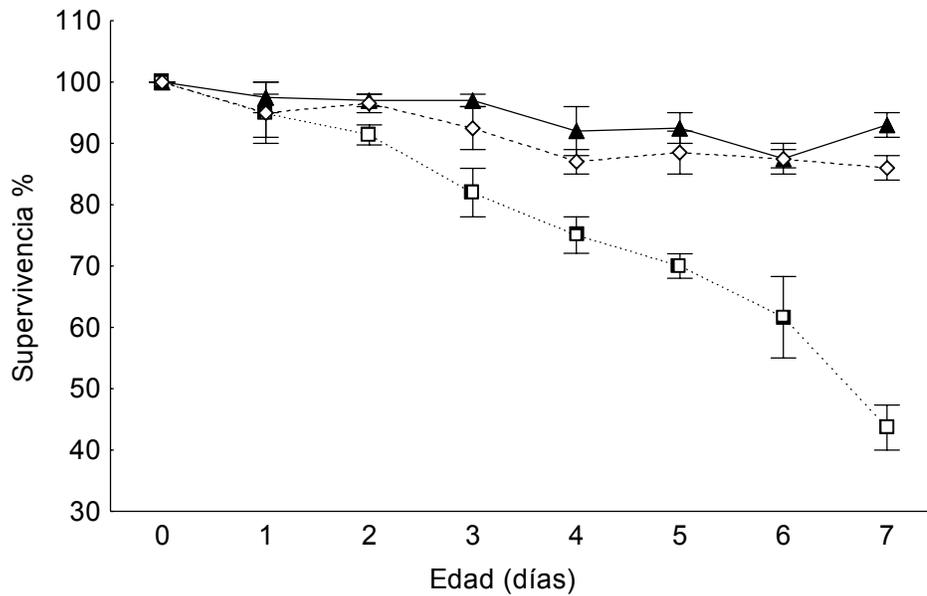


Figura 5. Supervivencia de *Artemia franciscana* alimentada con *Nannochloropsis oculata* (□), *Isochrysis* sp. (▲) y *Chaetoceros muelleri* (◇). $n = 4$ para *N. oculata*, $n = 12$ en los otros casos. Promedios y barras de error estándar.

El crecimiento en longitud y en peso seco total y orgánico mostró tendencias similares a las registradas en el tercer experimento. Después de siete días de cultivo, los organismos alimentados con *N. oculata* tenían una longitud total de aproximadamente 1 mm y pesos similares a los valores iniciales, demostrando que la totalidad de la energía ingerida y asimilada era canalizada prácticamente en forma exclusiva al gasto de mantenimiento.

En cuanto a longitud, la diferencia entre *Isochrysis* y *C. muelleri* fue más notoria que en las pruebas anteriores, con tallas que para el día 5 resultaron cercanas a 3 y 4 mm, en comparación con los 2.9 a 3.1 mm del tercer experimento. Esta diferencia se hizo todavía más importante en los dos últimos días, ya que las tallas finales fueron de 4 y de 6 mm para *Isochrysis* y *C. muelleri*, respectivamente, con tendencias y diferencias similares en los pesos secos total y orgánico individual (Fig. 6).

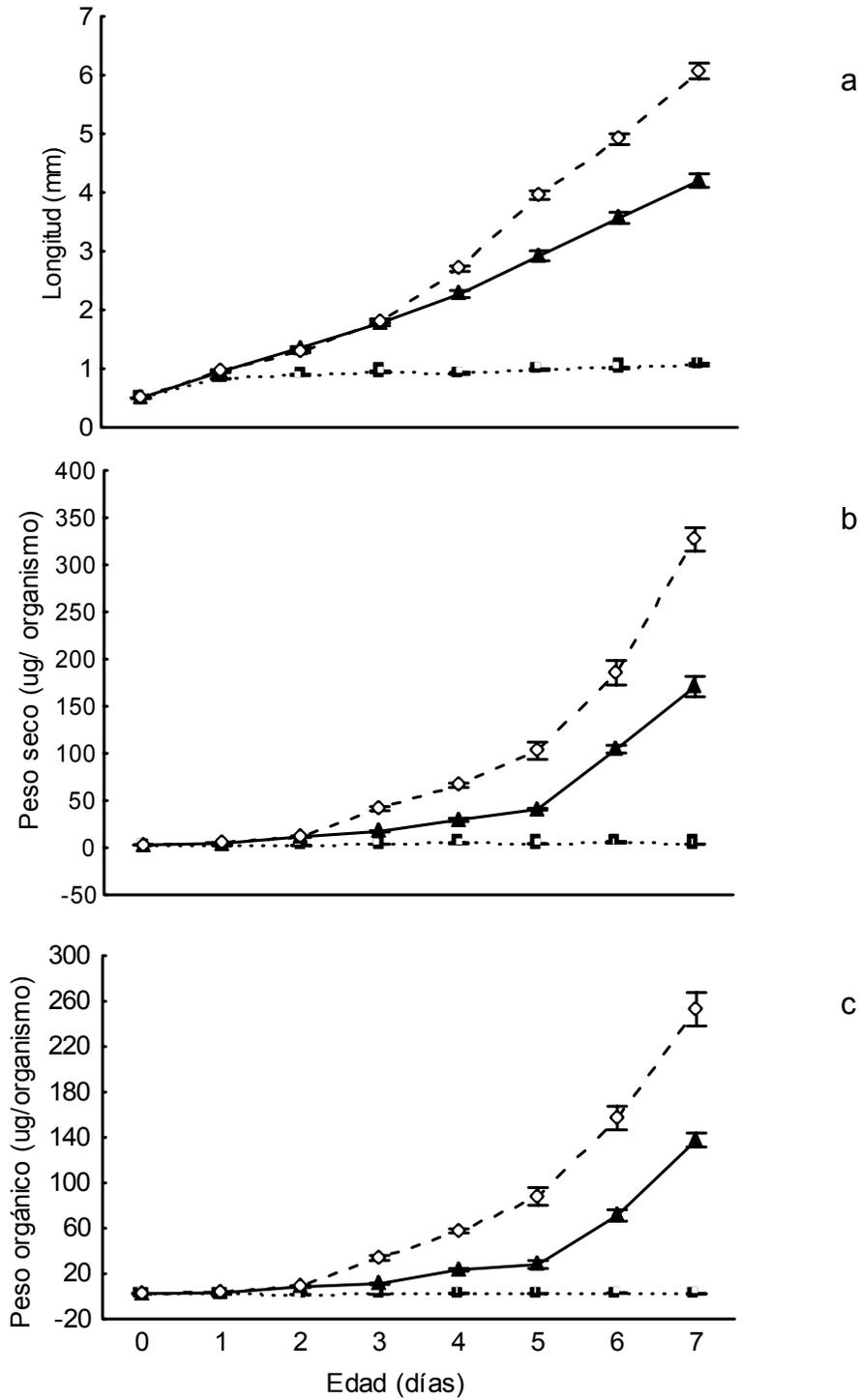


Figura 6. Promedios de a) longitud, b) peso seco y c) peso orgánico de *Artemia franciscana*, alimentada durante los siete primeros días de desarrollo posembriionario con *Nannochloropsis oculata* (□), *Isochrysis* sp. (▲) y *C. muelleri* (◇). Barras corresponden al error estándar

Estas diferencias iniciaron cuando los organismos alcanzaron y sobrepasaron los tres días de edad y se encontraban entre las fases instar L8 y L9 en que los toracópodos VI y VII terminan su diferenciación y se completan las setas filtrantes “emplumadas” (Schrehardt, 1987; Evjemo et al. 2000), que probablemente redundan en un incremento en la eficiencia de captación y concentración de las partículas suspendidas.

El contenido energético individual mostró la misma tendencia que el incremento en peso, con una clara separación entre dietas que continuó incrementando en el tiempo, de tal manera que después de siete días de cultivo el contenido energético de un individuo alimentado con *Isochrysis* sp. resultó ser equivalente al 60% de uno alimentado con *C. muelleri*.

Por otra parte, el contenido energético calculado por unidad de peso de los organismos alimentados con las diferentes dietas tendió a disminuir como en las pruebas anteriores, alcanzando los niveles más bajos al final del día 3 con la dieta de *N. oculata*, aunque estos organismos lograron una recuperación durante los días finales de estos experimentos (Fig. 7).

La microalga *N. oculata* es universalmente reconocida como un buen alimento para los rotíferos; hay solo un reporte respecto a su uso como dieta para *A. franciscana* por Tizol-Correa (1994). De acuerdo a los resultados de este trabajo, los tamaños que estos investigadores obtuvieron son mucho menores que los alcanzados en estas pruebas con la dieta de *Chaetoceros muelleri*.

En este caso, se comprobó que esta microalga no es una alternativa viable para la producción de biomasa de *A. franciscana*, pero por otra parte, esta especie fue la seleccionada para las pruebas de corto plazo, justamente por sus características de dieta de pobre calidad que fueron corroboradas en esta experiencia.

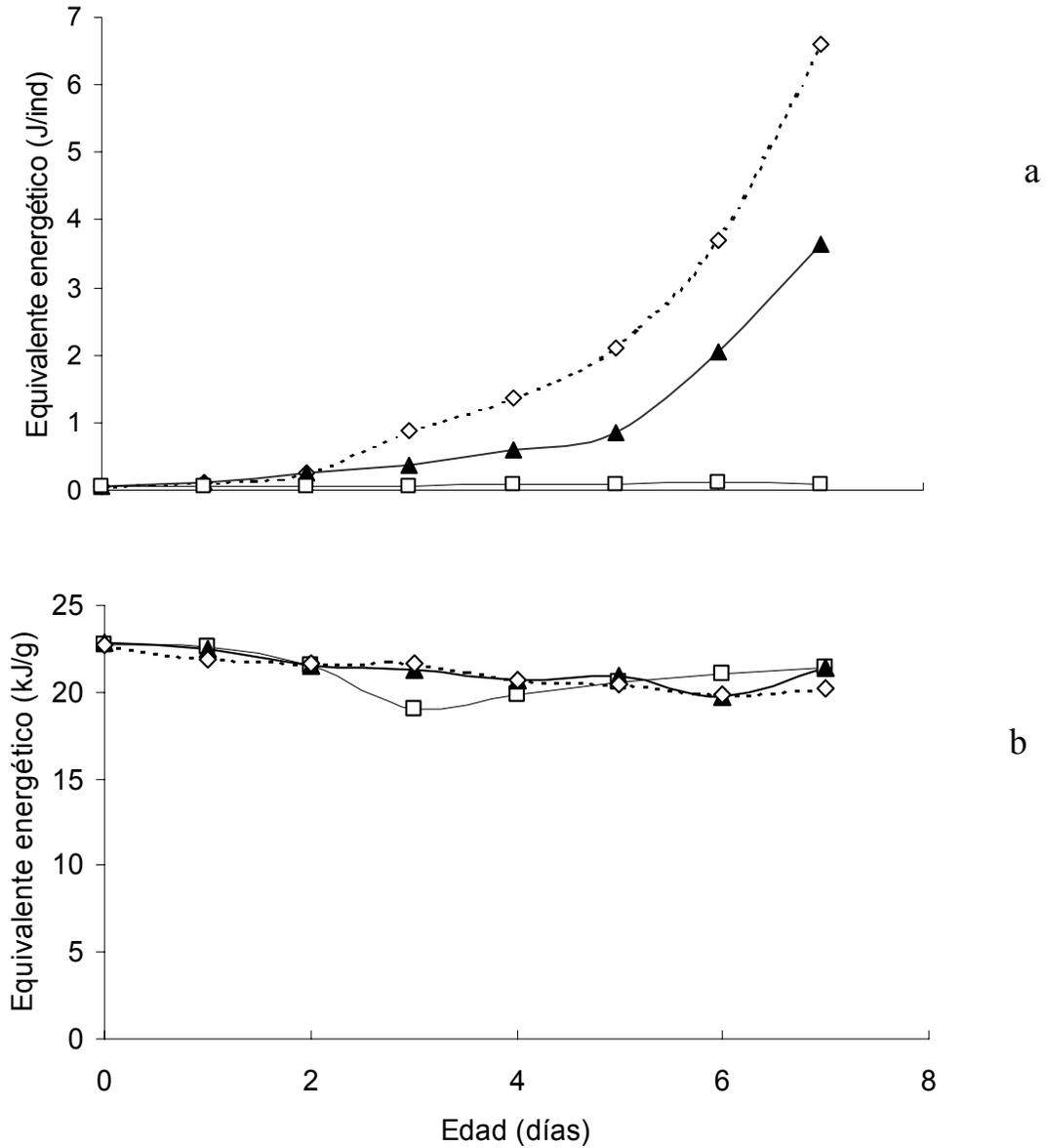


Figura 7. Contenido energético promedio de *Artemia franciscana* en $J \cdot ind^{-1}$ (a) y en $kJ \cdot g^{-1}$ (b) alimentada con *Nannochloropsis oculata* (□), *Chaetoceros muelleri* (◇) e *Isochrysis sp.* (▲).

Discusión general de los experimentos de crecimiento.

Aunque la composición de las microalgas utilizadas en los experimentos de crecimiento no es relevante para estas pruebas, se optó por reportarla en vista de que los experimentos se llevaron a cabo en diferentes laboratorios; a pesar de que en todos los casos las microalgas se mantuvieron en condiciones de temperatura e iluminación similares, la procedencia de la cepa original se verificó y se emplearon las mismas cepas en los diferentes laboratorios, se observaron diferencias en la composición química y en el contenido energético.

Estas pueden deberse a una diferente tasa de dilución en el caso de *C. muelleri* que fue del 50 % en el primero y segundo experimento respecto del tercero y cuarto en que se tuvo el 25%. En el caso de las microalgas *N. oculata*, *Isochrysis* sp. y *C. muelleri* que se cultivaron en dos laboratorios diferentes pero con la misma tasa de dilución y características de cultivo, las concentraciones alcanzadas en el tercer experimento fueron de cerca del doble de las registradas en el cuarto. Esto probablemente se debió a alguna diferencia en el mantenimiento de los cultivos o en la composición química del agua de mar. Estas diferencias son comunes en los laboratorios de producción que tienen la misma cepa microalgal, y probablemente esto pudiera redundar en una diferente calidad microalgal (López Elías *et al.*, 2003). Sin embargo a pesar de estas diferencias, se corroboró el efecto de estas microalgas en el crecimiento de *A. franciscana*.

Los resultados del primer experimento sirvieron para comprobar que la microalga *C. mulleri* era adecuada para ser empleada como dieta de referencia de buena calidad en los experimentos siguientes, además de mostrar la sensibilidad de los parámetros longitud y peso del organismo en las diferentes etapas de desarrollo a las raciones probadas.

En el segundo experimento *C. muelleri* resultó con una mejor calidad nutricia que *C. capsulata* y produjo mayores pesos y longitudes que en el primero lo que probablemente se debe a una mayor ración pues los organismos se mantuvieron a una concentración menor, además de que la temperatura fue 4°C más alta. Con una mayor temperatura las tasas de crecimiento se incrementaron, lo que

contribuyó a que las diferencias entre los efectos de las dietas se hicieran mas notorios.

La microalga *Isochrysis* sp. al final de los experimentos tercero y cuarto tuvo una calidad intermedia en comparación con las otras dietas, pero solo a partir del 3° o 4° día, lo que puede significar que antes de esta fase de desarrollo el organismo puede obtener sus requerimientos a partir de *Isochrysis* sp. o *C. muelleri*. La baja calidad nutritiva se observó a partir del primer día en el caso de *N. oculata* y hasta el tercero en el caso de *C. capsulata*, este efecto de *N. oculata* al primer día indicó que el organismo requiere de energía procedente del alimento desde incluso antes de esta fase de desarrollo al menos en estas condiciones de cultivo.

De los parámetros medidos, el orden de sensibilidad como indicadores de calidad nutricia sería peso, longitud, desarrollo y supervivencia. Éste último es aparentemente el menos sensible y solo parece ser afectado en forma notoria en el caso de dietas de muy mala calidad como fue el de *N. oculata*, la falta de diferencias en el caso de *C. capsulata* pudiera indicar que esta microalga tiene un valor dietético superior al de *N. oculata*.

Para el propósito del presente trabajo el peso seguido de la longitud fueron los mejores indicadores. En cuanto al desarrollo se puede colocar en un nivel intermedio de sensibilidad especialmente en el caso de *A. franciscana* y en general en el caso de los crustáceos ya que su desarrollo requiere de que el organismo incremente su longitud para poder mudar (Bliss, 1985).

Hasta este punto se pudo evaluar la productividad real de *A. franciscana* alimentada con las cuatro microalgas de prueba empleadas, en términos del incremento en peso en forma directa. Se conoció la calidad de estas cuatro microalgas sobre el crecimiento de este organismo. Las razones de esas diferentes calidades no se conocieron, se sugiere como posibilidad una pobre eficiencia de asimilación.

Capítulo 3

Experimentos de ecofisiología

Introducción

La medida de los parámetros fisiológicos, tales como la ingestión, respiración, excreción y su integración mediante la energética fisiológica, se ha empleado para obtener información acerca del proceso de crecimiento y de la forma en que los factores ambientales pueden afectarlo. La ecuación de balance energético desarrollada por Ivlev (1945) y Winberg (1956), permite calcular el crecimiento esperado (o crecimiento potencial = “scope for growth” = productividad) bajo condiciones específicas conocidas:

$$P = I - F - (R - U) = A - (R - U)$$

Donde I = tasa de ingestión, F = tasa de producción de heces, R = tasa respiratoria, U = tasa de excreción amoniacal, A = tasa de absorción.

La tasa de ingestión de alimento (I) de los organismos filtradores se define como la cantidad de partículas ingeridas por un organismo por unidad de tiempo (Paffenhofer, 1971). Existen muchas formas de medir esta variable, en general los sistemas empleados para tal fin pueden ser abiertos o cerrados. En el primer caso, el alimento entra y sale del recipiente de medición con un flujo conocido y en el segundo se adiciona al inicio del experimento. En cualquier caso la medición de las partículas retenidas o ingeridas por el organismo se determina por diferencia en la concentración, en función del tiempo.

La tasa de producción de materia fecal es la cantidad de material no absorbido por el sistema digestivo de un organismo por unidad de tiempo. Para la determinación de F se requiere medir toda la materia fecal que el organismo produce. En organismos acuáticos ésto se complica sobre todo cuando los organismos son pequeños, la materia fecal no es compacta, hay presencia de sustancias solubles, o existe materia orgánica producida por el organismo que es eliminada junto con la materia fecal. Para el cálculo del balance energético, la importancia de esta tasa es que la diferencia con la tasa de ingestión permite calcular la tasa de absorción es decir la cantidad de energía que se absorbe del alimento por unidad de tiempo. Por lo anterior, la medición de la absorción se ha

intentado indirectamente mediante el cálculo de la eficiencia de absorción (EA) esto es, de la fracción de alimento ingerido que es absorbido, o sea que entra al organismo procedente del sistema digestivo y la diferencia con la unidad es la fracción eliminada como materia fecal. El método propuesto por Conover (1966) permite evaluar la EA y se basa en comparar el contenido orgánico en el alimento suministrado y en la materia fecal relacionándolos mediante la expresión:

$$EA = \frac{F' - E'}{(1 - E')F'}$$

Donde F' = proporción entre peso orgánico y total del alimento y E' = misma proporción para la materia fecal. Con esta fracción se puede conocer la cantidad de materia o energía del alimento que es absorbido (A) ya que:

$$A = EA \cdot I$$

Esta manera de determinar la tasa de absorción A , elimina tener que coleccionar toda la materia fecal eliminando así los posibles errores antes mencionados y solo requiere de coleccionar una muestra representativa de esta materia fecal.

La energía absorbida puede ser canalizada por el organismo para las funciones que deba realizar para su metabolismo, que se cuantifican midiendo las tasas respiratorias y de excreción nitrogenada y la cantidad restante determina la tasa de crecimiento, que puede ser somático o gonádico dependiendo de la fase de desarrollo en que se encuentre. Como es obvio, la energía solo se puede considerar disponible para el crecimiento cuando la energía que entra al organismo (absorbida) es mayor de la que sale (respiración y excreción).

Hay varias formas de medir el metabolismo, éstas se clasifican en directas e indirectas (Randall *et al.*, 2001; Grodzinski *et al.*, 1975), las primeras consideran la medición del calor generado en las reacciones químicas celulares por calorimetría. Entre las indirectas más empleadas, está la medición de la tasa de consumo de oxígeno ya que las reacciones aeróbicas de producción de energía emplean a este elemento como aceptor final de electrones. Esta tasa también se conoce como tasa respiratoria (R). Cuando R se mide en organismos en reposo, con temperatura controlada y en ayuno, puede reflejar el gasto energético destinado al metabolismo basal o de mantenimiento, que es la energía que el organismo gasta

para existir; cuando se tiene al organismo en actividad máxima, podrá medirse el gasto metabólico activo. Los valores que se encuentran entre estos extremos se conocen como tasa metabólica rutinaria, la cual es un reflejo más cercano al gasto energético corriente del organismo.

La tasa de excreción nitrogenada (U) se refiere a la velocidad de producción de desechos procedentes del metabolismo de proteínas que, en los organismos acuáticos son principalmente amoniacales. Esta variable puede ser un indicador del combustible metabólico que el organismo esté empleando, y depende también de la composición proteínica de la dieta. La relación entre la tasa de consumo de oxígeno y la de producción de desechos nitrogenados expresada como mg átomo (en relación al peso atómico de cada elemento), se conoce como relación O:N y se ha empleado como un indicador fisiológico de estrés, para verificar que tan adecuado el organismo encuentra su medio ambiente, por lo cual se considera como un índice de adaptación. Mayzaud y Conover (1988) mencionan que valores en el intervalo de 3-16 son indicadores de un metabolismo proteínico preferente, mientras que los más altos entre 50 y 60, indican un uso tanto de proteínas como de lípidos.

Los sistemas que se emplean en la medición de la respiración y de la excreción nitrogenada pueden ser abiertos o cerrados, similares a los mencionados para la determinación de la tasa de ingestión.

La cantidad de alimento disponible, junto con la temperatura, son los principales factores ambientales que determinan la tasa de crecimiento, por lo que si se mantiene la temperatura controlada y solo se permiten variaciones en las características del alimento que determinan su calidad nutricia, entonces podrían ser el factor más importante que determine el crecimiento. De esta forma la calidad nutritiva podría considerarse como parte de los parámetros ambientales cuyo efecto puede ser valorado mediante el cálculo del balance energético expresado en términos del crecimiento esperado.

Primer experimento: Evaluación de la calidad nutricia de las microalgas *Nannochloropsis oculata*, *Isochrysis* sp. y *Chaetoceros muelleri* mediante la determinación del crecimiento estimado.

Objetivos

- Determinar las tasas de ingestión, de consumo de oxígeno, de excreción amoniacal, y la eficiencia de absorción durante los primeros cinco días de desarrollo posembriionario de *A. franciscana* alimentada con *N. oculata*, *Isochrysis* sp. o *C. muelleri*.
- Estimar la productividad o crecimiento esperado en *A. franciscana* alimentada con *N. oculata*, *Isochrysis* sp. o *C. muelleri* durante los primeros cinco días de desarrollo posembriionario a partir de los parámetros de la ecuación de balance energético

- Materiales y métodos

Los experimentos dirigidos a la determinación del balance energético de *A. franciscana* alimentada con *C. muelleri*, *Isochrysis* sp. y *N. oculata* se realizaron por primera vez en el Laboratorio de Ecofisiología del Departamento de Acuicultura del CICESE, en Ensenada.

Los alimentos y los organismos empleados en este experimento fueron parte de los cultivados en el tercer experimento del capítulo dos. La determinación de las variables ecofisiológicas se hizo a los 3 y 5 días de desarrollo posembriionario.

Tasa de ingestión

La tasa de ingestión de alimento (I) se determinó mediante la expresión, modificada de Albetosa *et al.* (1997):

$$I = V [(C_1 - (C_1 * C_c)) - C_2] / nt$$

$$C_c = (C_{c1} - C_{c2}) / C_{c1}$$

Donde $I = \text{células} \cdot \text{org}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, C_1 y C_2 = concentraciones inicial y final en el medio en $\text{células} \cdot \text{mL}^{-1}$ durante el período t que es la duración del experimento en horas, V es el volumen del medio, C_c es la corrección por variación en la concentración en el control, C_{c1} y C_{c2} son las concentraciones al inicio y al final en el recipiente control y n es el número de organismos. La transformación a

unidades de peso o de energía se hizo de acuerdo con los valores determinados previamente para cada tipo de alimento.

Estos experimentos de corta duración fueron realizados en matraces erlenmeyer de 125 mL empleados como cámaras de incubación, con suministro continuo de aire al fondo de la cámara para mantener en suspensión el alimento y aportar el oxígeno necesario. Los recipientes se ubicaron en un baño termostático a 27.5 ± 0.5 °C y los organismos se adicionaron en una concentración de $1-2 \text{ org} \cdot \text{mL}^{-1}$ según su tamaño, en un volumen total de 100 mL de agua marina filtrada ($1 \mu\text{m}$). El alimento se suministró en la misma ración que en los recipientes de cultivo ($27.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$). Los experimentos se hicieron con cinco repeticiones, empleando además dos controles sin organismos para cada dieta, con el fin de corregir los posibles cambios en la concentración de microalgas; las cámaras fueron mantenidas en la oscuridad. A las 0, 3 y 5 h se obtuvieron muestras de 3 mL a través de una malla de $30 \mu\text{m}$, las cuales fueron fijadas con lugol y posteriormente se determinó la concentración celular mediante conteos en cámara de Neubauer. Posteriormente los resultados fueron transformados a μg de peso seco $\text{org}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ y $\text{J} \mu\text{g}^{-1} \text{ d}^{-1}$, empleando los equivalentes energéticos obtenidos por calorimetría en el tercer experimento del capítulo 2 que fueron: 16.4, 23.4 y 16.6 J mg^{-1} de peso seco para *N. oculata*, *Isochrysis* sp. y *C. muelleri*.

Eficiencia de absorción

La eficiencia de absorción *EA* se determinó en experimentos de corto plazo empleando el método de Conover (1966). Los organismos que estaban en los cultivos con alimento se colocaron en recipientes de 3 L, con agua marina filtrada ($1 \mu\text{m}$) en los cuales permanecieron durante tres horas. Para la determinación de las fracciones orgánicas, se tomaron muestras del alimento y de la materia fecal que se concentraron en filtros de fibra de vidrio Wathman GF/C de peso seco conocido. Estas muestras fueron lavadas con formiato de amonio al 3%, para determinar posteriormente el peso seco y el orgánico o libre de cenizas de acuerdo al método de Sorokin (1973).

Tasa respiratoria

La tasa respiratoria o consumo de oxígeno (R) se determinó empleando un sistema que se denominó abierto-cerrado donde el valor de R se calculó por la diferencia entre las concentraciones de oxígeno inicial y final en las cámaras experimentales; para este cálculo se introdujo una corrección con las diferencias en cámaras controles sin organismos. El valor resultante se calculó en $\text{mg}\cdot\text{org}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ y en unidades energéticas $\text{J}\cdot\text{org}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, empleando la equivalencia energética de Gnaiger (1983) $1 \text{ mg O}_2 = 14.06 \text{ J}$.

Sistema abierto-cerrado

Este sistema constaba de un depósito de 200 L para el agua marina (previamente filtrada a $1 \mu\text{m}$) y de un baño de temperatura controlada ($28 \text{ }^\circ\text{C}$). Un difusor de aire mantenía la saturación de oxígeno ($5\text{-}6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) en el agua del depósito.

Se emplearon como cámaras respirométricas matraces erlenmeyer de $52.9 \pm 0.1 \text{ mL}$ que estaban provistos de tres conexiones; la primera estaba conectada a una válvula de una vía para la entrada de agua, la segunda protegida con una malla de $150 \mu\text{m}$ para evitar la salida de los organismos, permitió el flujo de salida. Una bomba peristáltica mantuvo el agua en recirculación entre el reservorio y las cámaras antes de colocar a los organismos durante 30 min para estabilizar la temperatura y el oxígeno disuelto, y 20 minutos adicionales después de su introducción, enseguida el flujo de agua fue cerrado.

Las muestras fueron tomadas entre 2.5 y 5 h después del cierre del flujo, con ayuda de la tercera manguera, que por el extremo hacia dentro de la cámara, tenía sujeto un globo, el cual se llenaba con agua al momento de la toma de muestra desplazando un igual volumen de agua de la cámara, que se colectaba como muestra para las determinaciones de oxígeno y de amonio. Los organismos fueron colocados en un número de 500 con tres días de edad y de 200 con cinco días, por cada cámara de incubación. La concentración de oxígeno disuelto se midió con un oxímetro (Orion, Mod. 862 A) provisto de un electrodo polarográfico. En cada experiencia se usaron ocho cámaras experimentales y un número igual de controles sin organismos.

Tasa de excreción amoniacal

La tasa de excreción amoniacal U se determinó en muestras tomadas inmediatamente después de medir la concentración de oxígeno en las cámaras respirométricas. El método de azul de indofenol (Rodier, 1978) fue el empleado para medir la concentración de nitrógeno amoniacal disuelto. Este método consiste en la detección de los iones amonio que al ser tratados por una solución de hipoclorito de sodio y de fenol en un medio alcalino y en presencia de nitroprusiato que actúa como catalizador, producen un compuesto colorido, el azul de indofenol, cuya concentración puede determinarse por colorimetría. Este método es muy sensible, de modo que incluso la preparación de las soluciones estándar debe realizarse en campana de extracción para evitar la posible contaminación de los reactivos, especialmente el fenólico.

Para esta determinación se requieren muestras de 10 mL a las que se adiciona 0.4 mL de una solución alcohólica de fenol al 10%, 0.4 mL de nitroprusiato al 0.5% y 1 mL de solución oxidante, formada por una mezcla 1:4 de hipoclorito de sodio comercial y de citrato de sodio al 20% (en solución de NaOH 1%). Después de la adición de estos reactivos las muestras se agitan y se dejan en reposo por 1h, después de la cual se lee la absorbancia a 640 nm.

Estas lecturas se interpolan en una curva de calibración que se realiza al mismo tiempo, a partir de soluciones estándar de cloruro de amonio y en un intervalo que incluye las probables concentraciones en las muestras. Los resultados se reportan en $\text{mg}\cdot\text{org}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ y en unidades energéticas $\text{J}\cdot\text{org}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, empleando la equivalencia energética de Elliot y Davison (1975) de $1 \text{ mg N-NH}_4^+ = 24.87 \text{ J}$.

Análisis de resultados

Los resultados fueron analizados mediante ANOVA de una vía y mediante una prueba de comparación de medias cuando hubo diferencias significativas.

Resultados y discusión

Debido que la dieta basada en *N. oculata* rebasó las expectativas de alimento de mala calidad, la supervivencia de los organismos fue muy baja y por lo

tanto los experimentos con organismos alimentados con esta especie finalizaron al tercer día de desarrollo, la EA no se pudo determinar como tampoco se pudieron determinar los equivalentes energéticos de *A. franciscana* alimentada con esta dieta. Las características de peso seco de los organismos empleados a los 3 y 5 días se presentan en la Tabla 10. Cabe recordar que la densidad a la que se cultivaron los organismos para estas pruebas se mantuvo entre 1.7-2.0 org·mL¹.

Tabla 10. Pesos secos promedio (\pm error estándar) (en $\mu\text{g}\cdot\text{org}^{-1}$) de *A. franciscana* alimentada con *N. oculata*, *Isochrysis* sp. y *C. muelleri* durante los primeros 5 días de desarrollo posembriionario. En letras los resultados de la pruebas de comparación entre dietas para organismos de la misma edad.

| Dieta | Edad (días) | |
|-----------------------|--------------|--------------|
| | 3 | 5 |
| <i>N. oculata</i> | 2.7 a (0.5) | - |
| <i>Isochrysis</i> sp. | 8.8 b (0.3) | 22.5 a (0.8) |
| <i>C. muelleri</i> | 11.7 c (0.3) | 24.9 b (0.6) |

Tasa de ingestión (I)

Los resultados obtenidos con estas pruebas indican la ingestión potencial de los organismos, calculada por diferencia entre los datos de concentración de alimento inicial y los registrados al final de cada prueba. Estos resultados muestran que la biomasa seca que un organismo puede ingerir en un día sería igual al 150, 300 y 213 % del peso seco individual con las dietas *N. oculata*, *Isochrysis* sp. y *C. muelleri* a los 3 días, y 187 y 245 % para los dos últimos alimentos a los 5 días (Tabla 11). A los 3 días se observó que comparativamente los organismos alimentados con *N. oculata* tienen una menor tasa de ingestión que los alimentados con las demás dietas ($P < 0.05$), mismas que no difieren entre sí. A los 5 días los organismos alimentados con *C. muelleri* tuvieron una tasa de ingestión casi 50% mayor que los alimentados con *Isochrysis* sp. lo que probablemente se deba a que tienen un peso seco 10% mayor.

Tabla 11. Tasas de ingestión promedio (\pm error estándar) (μg de peso seco- $\text{org}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) de *A. franciscana* alimentada con *N. oculata*, *Isochrysis* sp. y *C. muelleri*, a los 3 y 5 días de desarrollo posembrionario. En letras se presentan los resultados de las pruebas de comparación de medias entre dietas para individuos de la misma edad.

| Dieta | Edad (días) | |
|-----------------------|----------------|----------------|
| | 3 | 5 |
| <i>N. oculata</i> | 4.04 a (0.22) | - |
| <i>Isochrysis</i> sp. | 26.60 b (1.76) | 42.25 a (3.62) |
| <i>C. muelleri</i> | 25.00 b (2.05) | 61.17 b (7.99) |

Eficiencia de absorción (EA)

Los resultados de EA (Tabla 12) mostraron variaciones entre el 53 y el 73% para los organismos alimentados con *Isochrysis* sp. y entre el 74 y el 83% para los alimentados con *C. muelleri*, entre el tercero y quinto día, con una diferencia significativa entre dietas en la primera de las dos fechas. Estos valores corresponden con los reportados para la misma cepa de *Isochrysis* sp. por Evjemo *et al.* (2000), los cuales encontraron que la EA depende de la concentración de alimento disponible, ya que a bajas concentraciones de alimento la EA alcanza valores altos (60-80%), pero conforme la concentración aumenta la EA disminuye (35-56%).

Estos autores observaron también que hay una talla en la que se alcanzan los máximos valores casi a todas las concentraciones probadas, y esa es la que correspondería con las tallas de los organismos a los 5 días. Esta característica de la variación de EA con la disponibilidad de alimento parece estar ampliamente distribuida en diferentes especies. Una interpretación podría ser que cuando los organismos tienen poco alimento disponible, disminuyen sus tasas de filtración e ingestión y también las tasas de producción de materia fecal, incrementándose el tiempo de permanencia dentro del intestino, lo que permite una mayor digestión y absorción del alimento (Beiras *et al.*, 1994; Evjemo *et al.*, 2000).

Tabla 12. Eficiencia de absorción promedio (\pm error estándar) de *A. franciscana* alimentada con *N. oculata*, *Isochrysis* sp. y *C. muelleri*, a los 3 y 5 días de desarrollo posembrionario. En letras se presentan los resultados de las pruebas de comparación entre dietas para individuos de la misma edad.

| Dieta | Edad (días) | |
|-----------------------|---------------|---------------|
| | 3 | 5 |
| <i>N. oculata</i> | - | - |
| <i>Isochrysis</i> sp. | 0.53 a (0.06) | 0.73 a (0.08) |
| <i>C. muelleri</i> | 0.74 b (0.06) | 0.83 a (0.06) |

Tasa respiratoria (*R*)

Reflejando las diferencias en el crecimiento individual con los tres regímenes de alimentación, la tasa de consumo de oxígeno individual fue notablemente inferior para el día 3 que para el día 5 y la menor tasa respiratoria se encontró en los organismos alimentados con *N. oculata*, respecto al registrado en esa fecha con las otras dietas y sin diferencia entre éstas.

En organismos de cinco días de edad, las tasas respiratorias en los organismos alimentados con *Isochrysis* sp. y *C. muelleri*, no mostraron diferencia, a pesar de que estos organismos tenían pesos diferentes (Tabla 13). Ésto probablemente es el resultado de la relación inversa que existe en general, entre las tasas metabólicas y el peso y la edad de los organismos (Schmidt-Nielsen, 1979).

Tabla 13. Tasa respiratoria promedio (\pm error estándar) (en μg de $\text{O}_2 \cdot \text{ind}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) de *A. franciscana* alimentada con *N. oculata*, *Isochrysis* sp. y *C. muelleri*, a los 3 y 5 días de desarrollo posembrionario. En letras se presentan los resultados de la comparación entre dietas para organismos de la misma edad.

| Dieta | Edad (días) | |
|-----------------------|---------------|---------------|
| | 3 | 5 |
| <i>N. oculata</i> | 0.36 a (0.05) | - |
| <i>Isochrysis</i> sp. | 1.33 b (0.14) | 3.90 a (0.44) |
| <i>C. muelleri</i> | 1.44 b (0.13) | 3.41 a (0.63) |

Tasa de excreción amoniacal (*U*)

A pesar del mayor peso de los individuos alimentados con *C. muelleri*, no se registraron diferencias entre las tres dietas, con una excreción diaria de entre 0.8 a 1.4 μg de $\text{N-NH}_4^+ \cdot \text{ind}^{-1}$ en la prueba del tercer día, y de 3.9 a 4.1 μg en el experimento realizado con organismos de 5 días (Tabla 14).

Tabla 14. Promedio (\pm error estándar) de la tasa de excreción amoniacal (en 10^{-2} μg de $\text{N-NH}_4^+ \cdot \text{org}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) de *A. franciscana* alimentada con tres dietas microalgales, a los 3 y 5 días de desarrollo posembrionario. En letras se presentan los resultados de las pruebas de comparación entre dietas para organismos de la misma edad.

| Dieta | Edad (días) | |
|-----------------------|---------------|---------------|
| | 3 | 5 |
| <i>N. oculata</i> | 0.79 a (0.21) | - |
| <i>Isochrysis</i> sp. | 1.42 a (0.22) | 3.88 a (0.44) |
| <i>C. muelleri</i> | 1.08 a (0.11) | 4.05 a (0.56) |

Con los resultados del consumo de oxígeno y del nitrógeno amoniacal producido, fue posible calcular la relación O:N que permite evaluar desde el punto de vista metabólico el o los sustratos que el organismo estaba empleando. Esta relación para los organismos alimentados con *N. oculata* fue la menor y, según Mayzaud y Conover (1988), ésto indica un mayor empleo de proteínas que de lípidos como combustible, mientras los valores más altos en los organismos

alimentados con *Isochrysis* sp. y *C. muelleri* indican el uso mixto de lípidos y proteínas.

Tabla 15. Relación O:N de *A. franciscana* alimentada con tres dietas microalgales, a los 3 y 5 días de desarrollo posembrionario.

| Dieta | Edad (días) | |
|-----------------------|-------------|-------|
| | 3 | 5 |
| <i>N. oculata</i> | 39.87 | - |
| <i>Isochrysis</i> sp. | 81.95 | 87.95 |
| <i>C. muelleri</i> | 116.67 | 73.67 |

Balance energético

Con los datos de ingestión y los de la eficiencia de absorción, se calculó la cantidad de energía absorbida a la cual se restaron los equivalentes calóricos de las actividades metabólicas, para obtener como resultado final la cantidad de energía disponible para el crecimiento, en el caso de los organismos alimentados con *Isochrysis* sp. y *C. muelleri*. Por los motivos ya mencionados, este cálculo no fue posible con *N. oculata*. Se calculó también el balance normalizado por unidad de biomasa el cual, eliminando el efecto debido a los diferentes pesos individuales, debería permitir una mejor comparación de las tasas metabólicas de los individuos alimentados con las diferentes dietas.

El balance energético individual mostró que la energía que un organismo absorbió en el día 3, resultó similar cuando *A. franciscana* se alimentó con *Isochrysis* sp. o *C. muelleri*. En el día 5, la cantidad de energía disponible o absorbida aumentó a más del 200% con respecto al tercer día, nuevamente sin diferencias evidentes entre *Isochrysis* y *C. muelleri*. Se puede observar que la cantidad que un individuo puede destinar al crecimiento potencial es de más del doble a los 5 días, que naturalmente tiene relación con el peso del organismo el cual también es de más del doble. La eficiencia de crecimiento K_1 indica un mayor aprovechamiento de la energía que proviene de *C. muelleri*, pero la eficiencia de

crecimiento neta K_2 no muestra la misma tendencia ya que como se vió la absorción y la productividad fueron muy similares con ambas dietas.

Tabla 16. Balance energético individual de *A. franciscana* a los 3 y 5 días de desarrollo postembrionario alimentada con *N. oculata*, *Isochrysis* sp. y *Chaetoceros muelleri*. Resultados promedio (EE) (en $10^{-2} \text{ J} \cdot \text{ind}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) de las tasas de ingestión (I), respiración (R), excreción (U), Tasa de producción (P) y eficiencias de crecimiento gruesa (K_1) y neta (K_2) calculadas con los datos medios.

| Edad días | Dieta | I | A | R | U | P | K_1 | K_2 |
|-----------|-----------------------|------------------|------------------|----------------|------------------|-------|-------|-------|
| 3 | <i>N. oculata</i> | 21.80 (6.65) | - | 0.51 (0.07) | 0.020 (0.005) | - | - | - |
| | <i>Isochrysis</i> sp. | 61.37 (5.15) | 33.51 (11.20) | 1.88 (0.19) | 0.035 (0.006) | 31.59 | 0.51 | 0.94 |
| | <i>C. muelleri</i> | 42.52 (3.94) | 32.01 (0.10) | 2.03 (0.19) | 0.270 (0.003) | 29.71 | 0.70 | 0.92 |
| 5 | <i>Isochrysis</i> sp. | 99.52 (9.61) | 72.26 (12.10) | 5.49 (0.63) | 0.097 (0.011) | 66.67 | 0.67 | 0.92 |
| | <i>C. muelleri</i> | 91.59 (14.52) | 75.84 (26.87) | 4.71 (0.32) | 0.101 (0.014) | 71.03 | 0.78 | 0.94 |

Considerando los mismos valores normalizados por unidad de peso, los datos de los días 3 y 5 parecen indicar una mayor efectividad de *Isochrysis* sp., que está posiblemente relacionado con el peso de los organismos ya que éstos son diferentes en los dos días: los alimentados con *C. muelleri* tuvieron los mayores pesos en las dos edades.

Con ambas dietas, los valores más altos se alcanzaron al día 3. Esto muestra la tendencia a una disminución en la cantidad de energía disponible para el crecimiento debida a la menor absorción calculada por unidad de biomasa conforme los organismos crecen (Tabla 17).

Tabla 17. Balance energético de *A. franciscana* a los 3 y 5 días de desarrollo posembriionario, alimentada con tres microalgas durante los primeros 5 días de desarrollo postembriionario. Los datos se presentan en $10^{-2} \text{ J} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$.

| Edad días | Dieta | <i>I</i> | <i>A</i> | <i>R</i> | <i>U</i> | <i>P</i> |
|-----------|--------------------|----------------|----------------|------------------|-------------------|----------|
| 3 | <i>N. oculata</i> | 2.45 (0.15) | - | 0.189 (0.030) | 0.007 (0.002) | - |
| | <i>Isochrysis</i> | 7.70 (0.47) | 4.17 (1.07) | 0.237 (0.025) | 0.005 (0.0007) | 3.93 |
| | <i>C. muelleri</i> | 4.48 (0.42) | 3.32 (0.83) | 0.208 (0.023) | 0.003 (0.0003) | 3.11 |
| 5 | <i>Isochrysis</i> | 4.65 (0.39) | 3.40 (0.42) | 0.233 (0.020) | 0.003 (0.0003) | 3.16 |
| | <i>C. muelleri</i> | 3.55 (0.51) | 2.95 (0.94) | 0.202 (0.013) | 0.004 (0.0003) | 2.74 |

El balance energético expresado como porcentaje de la energía absorbida se presenta en la Fig. 8. Se observa que la fracción que el organismo destina para su mantenimiento es menor del 10%, con un correspondiente más del 90% disponible para el crecimiento, independientemente de la edad o de la microalga que se suministre.

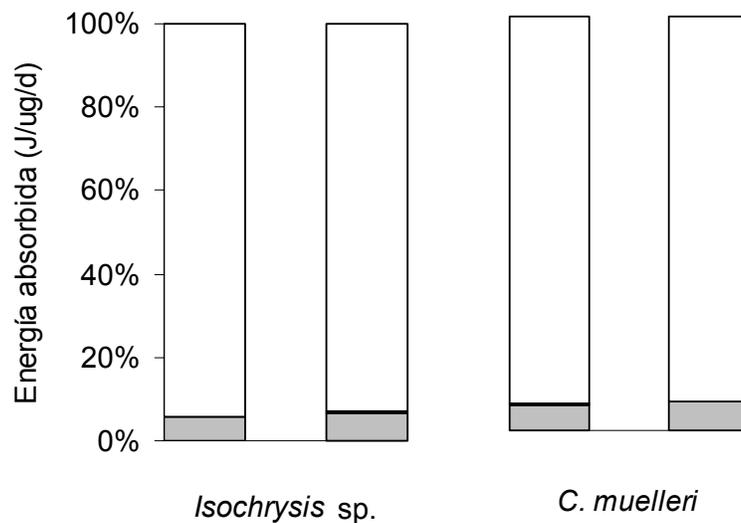


Figura 8. Balance energético de *A. franciscana* alimentada con a) *Isochrysis sp.* o b) *Chaetoceros muelleri*, a los 3 y 5 días de desarrollo posembriionario. En gris los porcentajes de respiración = R, en negro los de excreción amoniacal = U, en blanco los de productividad o crecimiento estimado = P.

En esta experiencia el tercer objetivo de evaluar la calidad nutricia de las microalgas con base a la productividad esperada se cumplió solamente con dos de las dietas, ya que este cálculo no fue posible en el caso de *N. oculata*. Entre las otras dos, la diferencia entre la productividad inducida por estas dietas indica que *C. muelleri* tiene mayor calidad nutricia para *A. franciscana*.

Segundo experimento: Evaluación de la calidad nutricia de las microalgas *Nannochloropsis oculata*, *Isochrysis* sp. y *Chaetoceros muelleri* mediante la determinación del crecimiento estimado

Objetivos

- Determinar las tasas de ingestión, de consumo de oxígeno, de excreción amoniacal y la eficiencia de absorción, durante los primeros siete días de desarrollo posembrionario de *A. franciscana* alimentada con *N. oculata*, *Isochrysis* sp. o *C. muelleri*.
- Estimar la productividad o crecimiento esperado en *A. franciscana* alimentada con *N. oculata*, *Isochrysis* sp. o *C. muelleri* durante los primeros siete días de desarrollo posembrionario a partir de los parámetros de la ecuación de balance energético

Materiales y métodos.

Este segundo experimento fue realizado en el Laboratorio Interinstitucional UAS-CIBNOR, en Mazatlán. Los organismos empleados en esta experiencia pertenecieron a los mismos cultivos que los empleados en el cuarto experimento del capítulo dos, de modo que las técnicas de cultivo de microalgas y de organismos fueron las mismas. Las metodologías para la determinación de los parámetros ecofisiológicos fueron las mismas para la eficiencia de absorción y para la tasa de ingestión que las empleadas en el primer experimento de este capítulo; las diferencias se indican a continuación en las secciones correspondientes

Tasa de ingestión

Las experiencias se realizaron en días alternos hasta los siete primeros días iniciales de desarrollo. Las concentraciones de organismos en estas cámaras estuvieron en el intervalo de $0.25-1.5 \text{ org}\cdot\text{mL}^{-1}$, dependiendo del tamaño, y se emplearon las mismas raciones ($27.5 \text{ mg de biomasa orgánica}\cdot\text{L}^{-1}$) suministradas a los recipientes de cultivo. Con las concentraciones de alimento determinadas a las 3 y 5 h se calculó la tasa de ingestión mediante la expresión propuesta por Albentosa *et al.* (1997).

Después del segundo día se observó que el alimento suministrado a los cultivos de largo plazo fue consumido por completo, lo cual permitió calcular la tasa de ingestión real a partir de ese día, mientras que para los días anteriores se utilizó la información recabada en las pruebas a corto plazo.

Tasa respiratoria y tasa de excreción amoniacal.

Para la determinación de estas variables se empleó un sistema de tipo cerrado, en el cual se midieron simultáneamente la concentración de oxígeno disuelto y la de nitrógeno amoniacal.

Este sistema constaba de un baño termostático a 28 ± 0.3 °C en el cual se colocaron las cámaras respirométricas, que en este caso fueron matraces de 125 mL, adicionadas con una mosca de agitación y protegidas de la luz, con agua marina filtrada (1 μm), previamente saturada de oxígeno mediante una hora de burbujeo con aire filtrado y con la temperatura del cultivo (28°C). Después de adicionar los organismos en una concentración de $0.5\text{-}1.5 \text{ org}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$, dependiendo del tamaño, las cámaras fueron selladas cuidando de no dejar burbujas. Los organismos permanecieron así por 3-4 h y al final se midió la concentración de oxígeno mediante un oxímetro con electrodo polarográfico (Orion, 862A). En cada experiencia se emplearon ocho repeticiones y un número igual de controles sin organismos.

En este experimento se decidió emplear el método de difusión-contrafujo para la determinación del nitrógeno amoniacal. Este método tiene su fundamento en la alteración de la coloración (absorbancia) del indicador azul de bromotimol (BBT), que se propicia en una celda a la cual se hacen llegar mediante una bomba peristáltica dos flujos que van en sentido contrario y están separados por una membrana semipermeable de teflón; uno de ellos es una solución de BBT al 0.04% ajustada a pH de 7.1 y el otro es una solución 0.1 N de NaOH. La muestra se inyecta al flujo de NaOH y el amonio que contiene se gasifica a amoniaco por la alta concentración de álcali, difundiendo a través de la membrana semipermeable hacia el compartimiento del BBT. Ésto produce un cambio en la coloración, que es proporcional a la concentración del amoniaco y se detecta cuando este flujo pasa por un espectrofotómetro conectado al instrumento.

Con respecto al diseño inicial, el sistema se modificó para la captura de las lecturas del espectrofotómetro en una computadora, la cual presenta un registro en pantalla de las lecturas del espectrofotómetro. Estos datos se interpolan mediante una curva de calibración con soluciones de cloruro de amonio de concentración conocida, en un intervalo que incluye las concentraciones de las muestras.

Este método tiene algunas ventajas sobre el método tradicional:

- Ambos métodos son colorimétricos. Con el tradicional (azul de indofenol) se detectan indistintamente amonio iónico y molecular mientras que con el de difusión (contraflujo), la especie iónica se transforma por gasificación en amoniaco. De acuerdo a los autores (Hunter y Uglow, 1993), aunque no aumenta el nivel de precisión con respecto al anterior ($\bar{X} \pm 10\%$), los límites de detección son entre uno y dos órdenes de magnitud inferiores, por lo cual es posible utilizar concentraciones de organismos menores y menores tiempos de incubación
- requiere de pequeños volúmenes de muestra (1.5 mL para cada lectura)
- requiere de pequeños volúmenes de reactivos, uno de los cuales (el colorante indicador BBT) se puede reciclar
- las muestras no requieren de procesamiento previo, lo cual simplifica la operación de muestreo y pueden ser conservadas en refrigeración sin riesgos de modificación de la concentración de amonio
- la modificación que se adoptó tiene además la ventaja de poder capturar los datos en una computadora para su posterior revisión
- el tiempo de cada determinación es de 2.5 min, que es útil cuando se procesa un número elevado de muestras

Antes de decidir por su utilización, los dos métodos se intercalibraron utilizando las mismas concentraciones de cloruro de amonio. Contrariamente a las indicaciones de Hunter y Uglow (1993), se encontraron niveles de detección similares, e iguales a $5 \mu\text{M}$ ($0.07 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de nitrógeno amoniacal) y también resultaron iguales las rectas de regresión entre valores esperados (estándar) y lecturas, aunque el coeficiente de determinación fue mayor con el método de

difusión-contraflujo con respecto al método tradicional (0.998 y 0.987, respectivamente), que fue el motivo principal para su elección.

Resultados y discusión

El diseño experimental requería el uso de organismos de diferente edad; cultivados con las dietas evaluadas. En vista de las diferencias en crecimiento, los pesos secos individuales de los organismos usados en estos experimentos fueron constantemente menores en el caso de los cultivados con *N. oculata* y además, con la excepción del día 1, los alimentados con *C. muelleri* tuvieron pesos individuales mayores que con *Isochrysis* sp. (Tabla 18).

Tabla 18. Pesos secos promedio (\pm error estándar) (en $\mu\text{g}\cdot\text{org}^{-1}$) de *A. franciscana* alimentada con *N. oculata*, *Isochrysis* sp. y *C. muelleri* durante los primeros 7 días de desarrollo posembriionario. En letras los resultados de la pruebas de comparación entre organismos de la misma edad.

| Dieta | Edad (días) | | | |
|-----------------------|-------------|--------------|----------------|----------------|
| | 1 | 3 | 5 | 7 |
| <i>N. oculata</i> | 2.4 a (0.3) | 3.6 a (0.3) | 4.0 a (0.3) | 3.6 a (0.3) |
| <i>Isochrysis</i> sp. | 4.5 b (0.2) | 17.3 b (0.9) | 40.7 b (1.4) | 171.0 b (13.2) |
| <i>C. muelleri</i> | 4.9 b (0.2) | 41.3 c (2.7) | 102.6 c (11.2) | 327.0 c (17.7) |

Tasa de ingestión (I)

Los resultados mostraron diferencias entre las dietas. En el caso de *N. oculata*, la tasa de ingestión inicial fue equivalente al 270% del peso seco de los organismos y disminuyó gradualmente hasta un mínimo para los organismos de 5 días, que se mantuvo hasta el final de la experiencia, cuando los valores fueron 60% inferiores de la registrada el primer día y equivalentes al 75 % del peso seco individual. En el caso de las otras dietas, la tasa de ingestión aumentó con una tendencia de tipo exponencial, similar a la que representa el incremento en peso de los organismos, que es consistente con la relación entre las tasas metabólicas individuales y el aumento en masa corporal en función del tiempo (Schmidt-Nielsen, 1972). Esta relación puede ser representada con las ecuaciones $Y =$

$4.67 \cdot e^{0.614 \cdot t}$ para *Isochrysis* sp. y $Y = 12.99 \cdot e^{0.585 \cdot t}$ en el caso de *C. muelleri* (donde Y = ingestión y t = tiempo). Ésto implica una menor ingestión inicial en el primer caso, con una menor tendencia a disminuir con el paso del tiempo en el segundo, que es consistente con las diferencias en crecimiento que se hicieron notar con estas dos dietas.

Estos resultados representan la ingestión potencial de acuerdo con la cual *A. franciscana* podría ingerir una cantidad de alimento equivalente a entre tres (al 1º día) y dos veces al día (al 7º día) su propia biomasa, en el caso de que el alimento fuera *Isochrysis* sp., mientras que para los alimentados con *C. muelleri* la ingestión inicial representaría una cantidad de más de seis veces mayor a su propio peso, con porcentajes progresivamente menores en paralelo con el paso del tiempo, hasta poco más del 200% del peso de un organismo (Tabla 19).

Tabla 19. Tasas de ingestión promedio (\pm error estándar) (en $\mu\text{g}\cdot\text{org}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) de *A. franciscana* alimentada con *N. oculata*, *Isochrysis* sp. y *C. muelleri*, durante los 7 primeros días de desarrollo posembriionario. En letras se presentan los resultados de las pruebas de comparación entre dietas para individuos de la misma edad.

| Dieta | Edad (días) | | | |
|-----------------------|----------------|------------------|------------------|-------------------|
| | 1 | 3 | 5 | 7 |
| <i>N. oculata</i> | 6.46 a (1.34) | 5.42 a (0.59) | 2.67 a (1.09) | 2.68 a (0.92) |
| <i>Isochrysis</i> sp. | 14.71 b (1.39) | 42.95 b (4.83) | 108.19 b (16.45) | 394.48 b (49.91) |
| <i>C. muelleri</i> | 33.04 c (4.26) | 128.31 c (23.53) | 207.18 c (32.57) | 788.63 c (252.53) |

Debido a que en las determinaciones del consumo de alimento en los recipientes de cultivo se encontró que excepto en el primer día los organismos alimentados con *Isochrysis* sp. y *C. muelleri*, consumieron toda la ración, estos datos de consumo real (I') fueron los empleados en lugar de los de consumo potencial en el cálculo de la absorción y de la productividad en el balance energético, excepto en el caso de los primeros días en que se emplearon los datos de consumo potencial.

Eficiencia de absorción (EA)

Las eficiencias de absorción de *A. franciscana* alimentada con *N. oculata* resultaron elevadas, variando entre el 64 y el 71 o 76% hasta la última fecha, cuando ésta disminuyó hasta el 38%. Con *Isochrysis*, fue del 39 y del 34% el primero y el último día y superó el 50% en las pruebas intermedias con un valor máximo al tercer día, mientras que con *C. muelleri* se mantuvo en todos los casos entre el 50 y el 75-76%.

Los resultados de las pruebas de análisis de varianza y de comparaciones múltiples indican que durante el tercer día la eficiencia fue significativamente inferior para *N. oculata*, en comparación con las otras dos dietas, mientras que en la última fecha fue mayor en el caso de *C. muelleri* (Tabla 21). Por otra parte, considerando los valores medios calculados globalmente con todos los datos, las eficiencias de absorción resultaron ser similares con 0.62 ± 0.11 , 0.51 ± 0.13 y 0.64 ± 0.10 para *N. oculata*, *Isochrysis* sp. y *C. muelleri*, respectivamente.

Tabla 20. Eficiencia de absorción promedio (\pm error estándar) de *A. franciscana* alimentada con *N. oculata*, *Isochrysis* sp. y *C. muelleri*, durante los 7 primeros días de desarrollo posembrionario. En letras se presentan los resultados de las pruebas de comparación entre dietas para individuos de la misma edad.

| Dieta | Edad (días) | | | |
|-----------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | 1 | 3 | 5 | 7 |
| <i>N. oculata</i> | 0.76 a (0.05) | 0.64 a (0.01) | 0.71 a (0.05) | 0.38 a (0.08) |
| <i>Isochrysis</i> sp. | 0.39 a (0.01) | 0.76 b (0.01) | 0.53 a (0.11) | 0.34 a (0.04) |
| <i>C. muelleri</i> | 0.50 a (0.18) | 0.76 b (0.06) | 0.75 a (0.01) | 0.53 b (0.03) |

Tasa respiratoria (R)

La tasa respiratoria individual de *A. franciscana* alimentada con *N. oculata*, fue constantemente menor que con las otras dietas y se mantuvo aproximadamente constante, variando entre 0.6 y 0.9 $\mu\text{g O}_2 \cdot \text{ind}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$.

Con las otras microalgas, el consumo de oxígeno aumentó con la edad de los organismos y fue casi el 50% mayor en los alimentados con *C. muelleri*, al 3º día y

el 76% al 5° ($P < 0.05$), cuando el peso individual de *A. franciscana* alimentada con *Isochrysis* sp. era aproximadamente un 60% inferior.

Finalmente, en las pruebas realizadas con organismos de 7 días de edad, la tasa respiratoria fue similar con *Isochrysis* sp. y con *C. muelleri*, a pesar de que los especímenes que se alimentaron con la segunda de estas microalgas tenían pesos individuales de 171 μg y 327 μg , respectivamente (Tabla 21).

Tabla 21. Tasa respiratoria promedio (\pm error estándar) (en μg de $\text{O}_2 \cdot \text{ind}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) de *A. franciscana* alimentada con *N. oculata*, *Isochrysis* sp. y *C. muelleri*, durante los 7 primeros días de desarrollo posembriionario. En letras se presentan los resultados de la comparación entre dietas para organismos de la misma edad.

| Dieta | Edad (días) | | | |
|-----------------------|---------------|---------------|----------------|----------------|
| | 1 | 3 | 5 | 7 |
| <i>N. oculata</i> | 0.86 a (0.09) | 0.62 a (0.12) | 0.97 a (0.28) | 0.84 a (0.06) |
| <i>Isochrysis</i> sp. | 1.39 b (0.07) | 3.98 b (0.25) | 8.17 b (0.80) | 30.89 b (1.32) |
| <i>C. muelleri</i> | 1.33 b (0.09) | 6.11 c(0.14) | 14.41 c (1.13) | 31.73 b (2.54) |

Tasa de excreción amoniaca (U)

Los resultados de la producción de amonio individual en los organismos alimentados con *N. oculata* demuestran incrementos graduales, a pesar de que el peso individual se mantuvo aproximadamente constante, variando desde 5.2 hasta 19.3 μg de $\text{N-NH}_4^+ \cdot \text{ind}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ entre la primera y la última prueba.

El primer día, a pesar de los pesos similares y de la mayor ingestión de *C. muelleri*, la producción de amonio de los organismos alimentados con esta dieta fue significativamente menor que con *Isochrysis* sp. e igual a los alimentados con *N. oculata*. En las dos pruebas siguientes (3° y 5° días), tanto los pesos como las tasas de ingestión fueron mayores con *C. muelleri*, pero la producción de amonio fue similar a la registrada con *Isochrysis*. Finalmente, en la última prueba la excreción de los organismos alimentados con la segunda de estas dietas fue aproximadamente el doble de la registrada para los alimentados con *C. muelleri*, los cuales a su vez tenían un peso individual cercano al 200% de los cultivados con *Isochrysis* sp. (Tabla 22).

Tabla 22. Tasa de producción de amonio promedio (\pm error estándar) (en $10^{-2} \mu\text{g}$ de $\text{N-NH}_4^+ \cdot \text{org}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) de *A. franciscana* alimentada con *N. oculata*, *Isochrysis* sp. y *C. muelleri*, durante los 7 primeros días de desarrollo posembrionario. En letras se presentan los resultados de las pruebas de comparación entre dietas para organismos de la misma edad.

| Dieta | Edad (días) | | | |
|-----------------------|---------------|----------------|----------------|------------------|
| | 1 | 3 | 5 | 7 |
| <i>N. oculata</i> | 5.16 a (0.34) | 10.65 a (1.13) | 18.95 a (2.01) | 19.27 a (2.91) |
| <i>Isochrysis</i> sp. | 9.67 b (0.54) | 27.16 b (0.70) | 49.29 b (0.68) | 151.70 c (11.30) |
| <i>C. muelleri</i> | 5.82 a (0.31) | 23.79 b (1.24) | 49.77 b (2.13) | 81.20 b (7.76) |

La relación O:N calculada con los resultados de respiración y excreción indica que en caso de *N. oculata* existe una dependencia total de las proteínas como sustrato metabólico a partir del 3º día. En el caso de las otras dietas los valores no superan el intervalo O:N de 50-60 que indicaría un uso mixto de lípidos y de proteínas (Mayzaud y Conover, 1988) sino que se encuentran entre los 12 y 34, que sugiere una mayor dependencia de proteínas que de lípidos y que probablemente refleja la composición de la dieta de los organismos (Tabla 23).

Tabla 23. Relación O:N de *A. franciscana* alimentada con *N. oculata*, *Isochrysis* sp. y *C. muelleri*, durante los 7 primeros días de desarrollo posembrionario.

| Dieta | Edad (días) | | | |
|-----------------------|-------------|-------|-------|-------|
| | 1 | 3 | 5 | 7 |
| <i>N. oculata</i> | 14.58 | 5.09 | 4.48 | 3.81 |
| <i>Isochrysis</i> sp. | 12.58 | 12.82 | 14.50 | 17.82 |
| <i>C. muelleri</i> | 19.99 | 22.47 | 25.33 | 34.20 |

Balance energético

Con los datos anteriores y tomando las tasas de ingestión real, y de la absorción calculada a partir de esta, se calculó el crecimiento estimado o

productividad individual mediante la ecuación de balance energético (Tabla 24). También se calculó el balance con los datos normalizados por unidad de biomasa seca para tratar de comparar los datos sin considerar las diferencias en el peso individual (Tabla 25).

Tabla 24. Balance energético individual de *A. franciscana* alimentada con *N. oculata*, *Isochrysis* sp. y *C. muelleri*. Resultados promedio (\pm error estándar) (en 10^{-2} J·ind $^{-1}$ ·d $^{-1}$) de las tasas de ingestión (I), respiración (R), excreción (U). La tasa de producción (P) y las eficiencias de crecimiento gruesa (K_1) y neta (K_2) se calcularon con los valores medios de las tasas anteriores.

| Edad días | Dieta | I' | A | R | U | P | K_1 | K_2 |
|------------|-----------------------|---------------------|--------------------|-----------------|------------------|--------|-------|-------|
| UAS-CIBNOR | | | | | | | | |
| 1 | <i>N. oculata</i> | 10.59 (1.27) | 8.05 (0.97) | 1.22 (0.12) | 0.128 (0.009) | 6.75 | 0.63 | 0.83 |
| | <i>Isochrysis</i> sp. | 31.07 (2.94) | 12.12 (1.14) | 1.95 (0.11) | 0.240 (0.013) | 9.93 | 0.32 | 0.82 |
| | <i>C. muelleri</i> | 47.30 (6.09) | 23.65 (3.07) | 1.88 (0.63) | 0.150 (0.009) | 21.62 | 0.46 | 0.91 |
| 3 | <i>N. oculata</i> | 8.88 (0.96) | 5.63 (0.62) | 0.87 (0.17) | 0.270 (0.028) | 4.50 | 0.51 | 0.80 |
| | <i>Isochrysis</i> sp. | 74.42 (10.19) | 56.56 (6.70) | 5.58 (0.36) | 0.670 (0.017) | 50.31 | 0.68 | 0.89 |
| | <i>C. muelleri</i> | 77.19 (33.67) | 58.66 (25.75) | 8.60 (3.25) | 0.600 (0.031) | 49.46 | 0.64 | 0.84 |
| 5 | <i>N. oculata</i> | 4.39 (1.78) | 3.12 (1.27) | 1.37 (0.39) | 0.470 (0.050) | 1.28 | 0.29 | 0.41 |
| | <i>Isochrysis</i> sp. | 150.53 (34.73) | 79.78 (15.88) | 11.49 (1.12) | 1.230 (0.168) | 67.06 | 0.45 | 0.84 |
| | <i>C. muelleri</i> | 156.12 (46.62) | 117.09 (35.13) | 20.26 (7.66) | 1.240 (0.053) | 95.59 | 0.61 | 0.82 |
| 7 | <i>N. oculata</i> | 4.40 (1.51) | 1.67 (0.57) | 1.19 (0.09) | 0.480 (0.072) | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | <i>Isochrysis</i> sp. | 413.99 (105.41) | 140.76 (38.95) | 43.40 (1.80) | 6.780 (0.330) | 90.58 | 0.22 | 0.64 |
| | <i>C. muelleri</i> | 429.333 (361.49) | 227.54 (191.20) | 44.61 (16.8) | 1.950 (0.158) | 180.98 | 0.42 | 0.79 |

En los organismos alimentados con *N. oculata*, la cantidad de energía que puede destinarse al crecimiento (crecimiento esperado) fue en constante decremento hasta el 7º día, en el cual se obtuvo un valor de cero, lo que implica que la dieta no suministraba los requerimientos necesarios a estos organismos.

Respecto a las otras dietas, esta estimación se incrementó desde 9.9 hasta 90.6 $\text{J}\cdot\text{ind}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ con *Isochrysis* sp. y finalmente, comprobando su superioridad como dieta para *A. franciscana*, la estimación con *C. muelleri* resultó aproximadamente del doble que con *Isochrysis* sp.

Utilizando los valores calculados en las cuatro fechas e interpolando estos datos para obtener los relativos a los días 2, 4 y 6, el total teórico de energía acumulada por un organismo en los primeros siete días poseclosión debería ser 0.205, 7.35 y 15.23 $\text{J}\cdot\text{ind}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ con *N. oculata*, *Isochrysis* sp. y *C. muelleri*, respectivamente.

Considerando los mismos valores normalizados por unidad de peso, los datos de los días 3 y 5 parecen indicar una mayor efectividad de *Isochrysis* sp. Además, tanto con *N. oculata* como con *C. muelleri* se puede notar la misma tendencia a una disminución desde los altos valores registrados durante el primer día a datos progresivamente menores hasta el experimento final en el caso de *N. oculata* y hasta el día 5 poseclosion con *C. muelleri*, con resultados similares para esta fecha y los del séptimo día. Esto muy probablemente no refleja mas que la diferente ración que en relación al peso tienen los organismos con las diferentes dietas o sea que es un artefacto del diseño experimental.

Con *Isochrysis*, los valores más altos fueron para el día 3, a partir del cual disminuyeron en forma continua desde 2.9 hasta $0.52 \cdot 10^{-2} \text{J}\cdot\mu\text{g}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$, que indica una relación inversa entre la tasa metabólica y el peso corporal (Tabla 25).

Tabla 25. Balance energético individual de *A. franciscana* alimentada con *N. oculata*, *Isochrysis* sp. y *Chaetoceros muelleri* durante los primeros siete días de desarrollo posembrionario. Resultados promedio (\pm error estándar) (en 10^{-2} J· μg^{-1} ·d $^{-1}$) de las tasas de ingestión real (I'), absorción (A) respiración (R), excreción (U) y tasa de producción (P) calculada. Los valores de la ingestión del primer día corresponden con los de ingestión potencial.

| Edad días | Dieta | I' | A | R | U | P |
|------------|--------------------|----------------|----------------|------------------|-------------------|------|
| UAS-CIBNOR | | | | | | |
| 1 | <i>N. oculata</i> | 4.43 (0.52) | 3.36 (0.40) | 0.509 (0.051) | 0.054 (0.003) | 2.80 |
| | <i>Isochrysis</i> | 6.94 (0.66) | 2.70 (0.25) | 0.437 (0.025) | 0.075 (0.004) | 2.19 |
| | <i>C. muelleri</i> | 9.72 (1.25) | 4.90 (0.63) | 0.380 (0.030) | 0.029 (0.002) | 4.50 |
| 3 | <i>N. oculata</i> | 2.44 (0.26) | 1.56 (0.17) | 0.232 (0.046) | 0.071 (0.008) | 1.26 |
| | <i>Isochrysis</i> | 4.30 (0.59) | 3.27 (0.44) | 0.323 (0.021) | 0.060 (0.002) | 2.89 |
| | <i>C. muelleri</i> | 1.86 (0.82) | 1.41 (0.62) | 0.210 (0.004) | 0.014 (0.0007) | 1.19 |
| 5 | <i>N. oculata</i> | 1.10 (0.44) | 0.78 (0.32) | 0.340 (0.098) | 0.116 (0.012) | 0.32 |
| | <i>Isochrysis</i> | 3.70 (0.85) | 1.95 (0.45) | 0.282 (0.028) | 0.046 (0.006) | 1.63 |
| | <i>C. muelleri</i> | 1.51 (0.45) | 1.13 (0.34) | 0.200 (0.020) | 0.012 (0.0005) | 0.92 |
| 7 | <i>N. oculata</i> | 1.22 (0.42) | 0.47 (0.16) | 0.330 (0.025) | 0.133 (0.020) | 0.01 |
| | <i>Isochrysis</i> | 2.42 (0.62) | 0.82 (0.23) | 0.250 (0.012) | 0.049 (0.002) | 0.52 |
| | <i>C. muelleri</i> | 1.31 (0.98) | 0.70 (0.58) | 0.140 (0.010) | 0.006 (0.0006) | 0.55 |

El balance energético expresado como porcentaje de la energía asimilada, se presenta en la Fig. 9, en la cual se nota que solamente en el caso de *N. oculata* se observaron cambios notorios en la distribución de la energía absorbida; en este caso el porcentaje que estos organismos destinaron a la respiración y a la eliminación de desechos nitrogenados se incrementó en forma exponencial, reduciéndose en la misma forma la cantidad destinada a la productividad.

Con las otras dietas, la fracción de energía absorbida que gastó un organismo para su metabolismo (respiración y excreción) varió entre aproximadamente el 10 y 30 % con *Isochrysis* sp., independientemente de la edad, y fue constantemente menor al 20% con *C. muelleri* lo que indica, como en la prueba anterior, que aproximadamente el 70 – 90% de la energía absorbida por esta especie puede ser destinada al crecimiento individual, si la calidad de la dieta es compatible con las necesidades de su metabolismo (Fig. 9).

Los resultados del balance energético en los dos experimentos coinciden en señalar que la microalga *C. muelleri* fue el mejor alimento de los tres empleados para *A. franciscana*, mientras que *N. oculata* fue el peor, con un efecto intermedio de *Isochrysis* sp..

Excluyendo los valores de los organismos alimentados con *N. oculata*, en ambas experiencias se observó que los organismos invierten porcentajes bajos en promedio de 20.94 ± 6.17 y 18.45 ± 1.50 para su respiración y excreción y por lo tanto pueden destinar una mayor proporción de la energía absorbida a la productividad o crecimiento potencial o sea de alrededor de 81.05 ± 7.13 y 85.03 ± 3.05 % en el caso de *Isochrysis* sp. y de *C. muelleri* respectivamente en los períodos ensayados. Esto en principio pareciera indicar que el valor de productividad o crecimiento potencial es un muy buen indicador de la calidad nutritiva.

En el segundo experimento, los valores de *I*, *A*, *R* y *U* fueron mayores que en el primero. Esto se debió a la diferencia en los pesos de los organismos, que está relacionado con el diferente diseño experimental, ya que el suministro de mayores raciones individuales en los cultivos del segundo experimento tuvo como resultado mayores cantidades de alimento ingerido, asimilado y utilizado.

Las diferencias de un orden de magnitud en los resultados de excreción amoniacal entre los dos experimentos, no parecen deberse a los métodos empleados en el análisis de desechos nitrogenados, ya que estos fueron calibrados antes de las determinaciones en cada experimento.

La única posible explicación fue la forma en que se tomó la muestra en el segundo experimento. Las cámaras de incubación fueron agitadas antes de

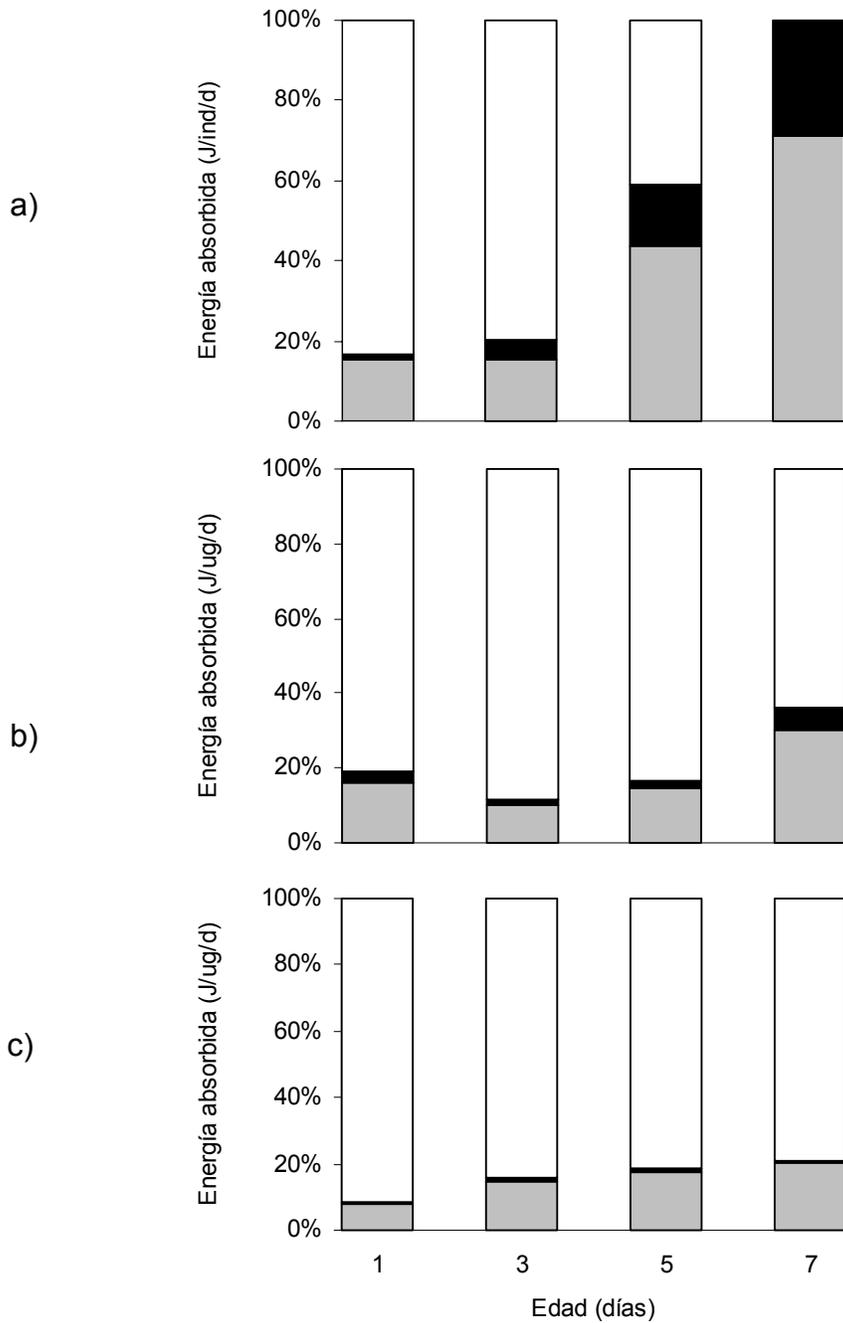


Figura 9. Balance energético de *A. franciscana* alimentada con a) *Nannochloropsis oculata*, b) *Isochrysis* sp. y c) *Chaetoceros muelleri*, a los 1, 3, 5 y 7 días de desarrollo postembrionario. Valores calculados con *EA* determinada de acuerdo a Conover (1966). En gris los porcentajes de respiración = *R*; en negro los de excreción amoniacal = *U*; en blanco los de productividad = *P*.

tomar la muestra mediante un agitador magnético, que pudo solubilizar parte de la materia fecal favoreciendo la actividad de amonificación bacteriana y alterar la concentración de desechos nitrogenados disueltos. A pesar de este mayor gasto, el balance energético no se vio alterado en forma importante, debido a su escasa importancia en comparación con otros tipos de gasto.

Capítulo 4

Comparación de los experimentos de crecimiento y ecofisiológicos

Introducción

El cálculo del crecimiento esperado, realizado a partir de los datos recabados en experimentos dirigidos a verificar el balance energético en pruebas de corto plazo, debería dar en teoría resultados similares a los que se obtienen en cultivos de largo plazo, bajo el supuesto que en ambos casos se mantienen las mismas condiciones ambientales.

Aparte de la obvia ventaja del primer tipo de experimentos, que han sido utilizados por varios autores para medir y comparar en tiempos breves la calidad de una o más dietas (Cho y Bureau, 1999; Villarreal Colmenares, 1999), la coincidencia entre los datos de crecimiento real y potencial ofrecería también la posibilidad de elaborar modelos predictivos con el fin de evaluar el rendimiento de un sistema de producción, tanto en términos biológicos como económicos, facilitando de esta manera el proceso de toma de decisiones (Rosas Vázquez, 1999; González Becerril, 2002).

Por otra parte, no existen muchos ejemplos de estudios comparativos de estas dos formas de evaluación de la calidad de diferentes dietas, o del efecto de otras variables ambientales sobre el crecimiento de los organismos en cultivo (Riisgard y Randlov, 1981; Beiras *et al.*, 1994), que son los objetivos de esta parte del presente estudio, en la cual se examina la congruencia de los resultados de las dos formas de evaluar la calidad de tres de las microalgas usadas en este trabajo y se comparan el crecimiento potencial y real, utilizando con esta finalidad los resultados de la segunda serie de experimentos, para la cual se cuenta con los datos completos para las tres dietas y los dos tipos de prueba.

Objetivos

Verificar si los datos de crecimiento real y los cálculos del balance energético coinciden en indicar la calidad dietética de las tres microalgas para *Artemia franciscana*.

Comparar el crecimiento de *A. franciscana* determinado en cultivos de siete días, con el calculado mediante los experimentos ecofisiológicos.

Resultados

Calidad de las dietas

Debido al suministro de la misma cantidad de alimento en una sola ración en los dos tipos de experimentos, era de esperar que las pruebas en las cuales se evaluó la tasa potencial de consumo de alimento dieran valores superiores al consumo real, y que además la sobreestimación resultara diferente con las tres dietas, en vista de las diferencias en talla y en peso de los organismos experimentales.

En efecto, con excepción del día 1, al final del cual el consumo estimado coincidió con la cantidad de microalgas sobrantes, se encontraron diferencias importantes entre consumos potenciales y reales.

Los datos de los experimentos de corto plazo se utilizaron para calcular el consumo potencial diario de los días 1, 3, 5 y 7 y los valores así recabados se utilizaron para el cálculo del consumo global durante los siete días de cultivo, que resultó similar al determinado en los acuarios solamente en el caso de los organismos alimentados con *N. oculata*, mientras que el consumo real de *Isochrysis* sp. representó cerca del 59% del potencial y el porcentaje resultó ser todavía inferior (47%) en el caso de *C. muelleri* (Tabla 26) por lo cual, considerando que esta diferencia hubiera causado una fuerte discrepancia entre tasas de crecimiento real y potencial, se utilizaron en ambos casos los datos de consumo diario determinados en las pruebas de cultivo a largo plazo.

Tabla 26. Consumo promedio potencial (cp) y real (c) de alimento de *A. franciscana* (μg de peso seco total $\cdot\text{ind}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) alimentada con tres microalgas, durante 7 días de desarrollo posembrionario. Los datos de cp para los días 2, 4 y 6 se calcularon por interpolación. Σ = consumo total en 7 días de cultivo.

| Edad | <i>N. oculata</i> | | <i>Isochrysis</i> sp. | | <i>C. muelleri</i> | |
|----------|-------------------|-------|-----------------------|--------|--------------------|--------|
| | cp | c | cp | c | cp | c |
| 1 | 6.46 | 6.46 | 14.71 | 14.71 | 33.04 | 33.04 |
| 2 | 5.94 | 6.63 | 28.83 | 27.00 | 80.68 | 81.00 |
| 3 | 5.42 | 6.80 | 42.95 | 35.27 | 128.31 | 55.14 |
| 4 | 4.05 | 5.26 | 75.57 | 52.31 | 167.75 | 81.80 |
| 5 | 2.67 | 3.73 | 108.19 | 71.34 | 207.18 | 111.52 |
| 6 | 2.68 | 3.02 | 251.34 | 142.68 | 497.91 | 223.04 |
| 7 | 2.68 | 2.68 | 394.48 | 196.20 | 788.63 | 306.70 |
| Σ | 29.90 | 34.58 | 916.07 | 539.51 | 1,903.50 | 892.24 |

Con estos valores, corregidos por la eficiencia de absorción medida con el método tradicional, se obtuvo la cantidad de energía asimilada en los días 1, 3, 5 y 7 y finalmente, utilizando las tasas de respiración y de excreción, se calculó el crecimiento potencial para esos días, obteniendo posteriormente por interpolación los valores faltantes (días 2, 4 y 6) que se sumaron a los anteriores para obtener los totales de energía ingerida y asimilada y el crecimiento potencial de *A. franciscana* durante los primeros siete días de desarrollo posembrionario.

En el caso de los experimentos de cultivo, se utilizaron los valores de incremento diario individual de contenido energético obtenidos por combustión directa se calculó la productividad o crecimiento potencial (P') para los mismos días en los cuales se llevaron a cabo las pruebas de corto plazo, a los cuales se sumaron los consumos energéticos debidos a respiración y excreción, obteniendo de esta manera la tasa de absorción diaria real (A') de *A. franciscana* con cada una de las tres dietas y la eficiencia de utilización del alimento ingerido (EUt), de acuerdo a las ecuaciones:

$$A' = P' + R + U$$

$$EUt = (P' + R + U) \cdot I'^{-1}$$

Como en el caso anterior, los valores así calculados se usaron para obtener por interpolación los datos de los días faltantes, los cuales se sumaron a los datos experimentales para obtener los totales de energía absorbida y el crecimiento real, que permitió comparar los valores potenciales y reales con el fin de lograr los dos objetivos planteados para esta parte del trabajo.

En el caso del primero, sobre la calidad de las tres dietas, ambos métodos permiten establecer la misma escala de calidad nutricia de las tres microalgas, con *C. muelleri* > *Isochrysis* sp. > *N. oculata*. La absorción y el crecimiento potencial con *N. oculata* representaron entre el 7 y el 6% de los calculados con *Isochrysis* y éstos a su vez fueron el 70 y el 65% de los estimados con *C. muelleri*. Estos porcentajes por otra parte fueron menores en todos los casos cuando se usaron los valores reales, y la mayor discrepancia fue en el caso del crecimiento con *N. oculata*, que fue solamente el 0.2% del valor que se obtuvo en las pruebas a largo plazo con *Isochrysis* sp. Con *Isochrysis* sp. el contenido calórico final resultó cercano al 45% de lo que se verificó con *C. muelleri*, que es notablemente inferior al 65% calculado con los valores totales de crecimiento potencial (Tabla 27).

Tabla 27. Resumen de los resultados de las pruebas a corto y largo plazo del segundo experimento con *Artemia franciscana* alimentada con tres dietas. Tasas de: ingestión real (I'), de asimilación (A), y de productividad o crecimiento esperado (P) y tasas observadas en 24 horas, de crecimiento (P'). A' = tasa de absorción calculada con I' y P' , corregida por respiración y excreción. EA : eficiencia de absorción de acuerdo a Conover (1966). E_{Ut} : eficiencia de utilización de alimento. Las tasas se dan en $10^{-2} \text{ J} \cdot \text{ind}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. Eficiencias calculadas en fracciones de I' . Σ = totales para siete días, calculados interpolando los valores de los días 2, 4 y 6.

| Dieta | Edad días | I' | A | A' | P | P' | EA | E_{Ut} |
|-----------------------|-----------|----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|------|----------|
| <i>N. oculata</i> | 1 | 10.59 | 8.05 | 1.23 | 6.70 | -0.97 | 0.76 | 0.12 |
| | 3 | 11.15 | 5.63 | 3.75 | 4.50 | 2.61 | 0.64 | 0.43 |
| | 5 | 6.12 | 3.12 | 1.84 | 1.28 | -0.78 | 0.71 | 0.42 |
| | 7 | 4.40 | 1.67 | 1.67 | 0.00 | -0.97 | 0.38 | 0.38 |
| | Σ | 56.71 | 35.30 | 19.14 | 21.61 | 0.75 | | |
| <i>Isochrysis sp.</i> | 1 | 31.04 | 12.12 | 5.54 | 9.93 | 3.35 | 0.39 | 0.18 |
| | 3 | 74.42 | 56.56 | 18.61 | 50.31 | 12.36 | 0.76 | 0.25 |
| | 5 | 150.53 | 79.78 | 37.13 | 67.06 | 24.91 | 0.53 | 0.25 |
| | 7 | 413.99 | 140.76 | 209.95 | 90.58 | 159.77 | 0.34 | 0.51 |
| | Σ | 1138.37 | 502.00 | 435.71 | 385.50 | 319.22 | | |
| <i>C. muelleri</i> | 1 | 46.25 | 23.65 | 6.62 | 21.62 | 4.59 | 0.50 | 0.14 |
| | 3 | 77.19 | 58.66 | 73.33 | 49.46 | 64.13 | 0.76 | 0.95 |
| | 5 | 156.12 | 117.09 | 95.23 | 95.59 | 73.73 | 0.75 | 0.61 |
| | 7 | 429.33 | 227.54 | 334.87 | 180.98 | 288.32 | 0.53 | 0.78 |
| | Σ | 1249.14 | 728.27 | 849.45 | 594.00 | 715.09 | | |

Estas diferencias entre los porcentajes de crecimiento calculados con respecto a los valores obtenidos con los dos tipos de prueba, son el resultado de fuertes discrepancias en varias de las tasas medidas o calculadas con los resultados de los experimentos de corto y de largo plazo. Así por ejemplo, la absorción de energía obtenida mediante el método de Conover (1966) fue constantemente mayor a la real en el caso de *N. oculata*; al final de siete días la energía total absorbida por *A. franciscana* alimentada con esta microalga representó el 54% de la evaluada con las pruebas de corto plazo, de tal manera que los costos metabólicos debidos a respiración y excreción causaron un balance energético negativo en tres de las cuatro fechas, con un crecimiento global que representó solamente el 3% del potencial.

En el caso de *Isochrysis*, existe una diferencia notoria con respecto a la especie anterior, ya que la absorción de energía y el crecimiento del séptimo día de los experimentos de cultivo resultaron superiores a los potenciales, con un incremento global de contenido energético cercano al 80% del calculado usando los valores de campo de crecimiento.

Resultados similares se obtuvieron con los datos de los días 3 y 7 de los cultivos de *A. franciscana* alimentada con *C. muelleri*, con una diferencia especialmente elevada durante el séptimo día, de tal manera que en este caso el crecimiento real superó en un 20% el valor que se calculó con las pruebas de corto plazo.

Discusión

El alimento es uno de los factores ambientales de mayor importancia para el crecimiento de los organismos, y la calidad nutricia de diferentes dietas puede ser medida mediante pruebas de largo o de corto plazo, en el primer caso observando su efecto sobre el crecimiento, que es la respuesta integrada de los procesos de ingestión, digestión y metabolismo global y en el segundo verificando mediante pruebas de corta duración los ingresos y egresos de energía, con el fin de calcular la cantidad disponible para el crecimiento, desarrollo y reproducción. Estos principios básicos han sido universalmente aceptados desde cuando las leyes de la termodinámica se iniciaron a utilizar en biología, tanto para poder modelar el crecimiento de los organismos, como para estudiar el efecto de las variables ambientales que lo pueden modificar (Ivlev, 1939; Russel-Hunter, 1970).

Mediante este estudio se comprobó que es posible calificar diferentes tipos de dieta con los dos métodos, con resultados similares, que en este caso indicaron que *N. oculata* es suficiente para el metabolismo activo de *A. franciscana*, pero que el crecimiento de este organismo se vería seriamente limitado (crecimiento potencial), o puede resultar negativo (crecimiento real), lo que fue comprobado por los porcentajes elevados de mortalidad.

El uso de *Isochrysis* sp. como dieta dio resultados similares a los obtenidos por Evjemo y Olsen (1999) y se confirmó que esta microalga es un alimento adecuado para esta especie; por otra parte se verificó con los dos tipos de prueba que *C. muelleri* tiene una calidad nutricia mayor, lo cual confirma que mediante pruebas de corto plazo es posible calificar y eventualmente mejorar una dieta, verificando a la vez los requerimientos nutricios de la especie que se está estudiando (Cho y Bureau, 1999).

Por otra parte, de acuerdo a los resultados de la comparación de los dos tipos de acercamiento, si la productividad real se compara en forma cuantitativa con la estimada, existe la posibilidad de que los modelos de crecimiento resultantes difieran notablemente, y que los valores de crecimiento calculados puedan estimar o sobreestimar los datos reales.

Una posibilidad de sobreestimación que se consideró es que el crecimiento esperado, calculado con la ecuación de balance energético, incluye toda la energía destinada al crecimiento somático, mientras que el valor real es el incremento real diario en peso y en contenido energético individual. En el primer caso, no se contemplaron por lo tanto los costos relacionados con las mudas y la formación de nuevas estructuras, que caracterizan el cambio entre una etapa instar y la siguiente.

Por otra parte, el desarrollo posembrionario de *Artemia* es de tipo anamórfico, implicando un proceso continuo de cambios morfológicos y estructurales entre las etapas instar sucesivas (Gassé, 1954; Gardiner, 1978), por lo cual el costo metabólico de estos cambios debería reflejarse en gran parte en los datos de respiración y excreción, y el contenido energético de las exuvias, de acuerdo a la mayoría de la literatura sobre crustáceos, se estiman entre el 2% y el 4% (John, 1982; Dawirs, 1983).

De acuerdo a las pruebas de cultivo, *A. franciscana* alimentada con *Isochrysis* sp. y con *C. muelleri* se encontraba en el séptimo día entre las etapas instar 15 y 16, mientras que con *N. oculata* el valor medio de 4 indica un número de mudas considerablemente inferior. Aunque ésta pudiera ser la explicación de los menores valores de productividad real en comparación con la potencial en el caso de los organismos alimentados con *N. oculata* e *Isochrysis* sp., ésto no explica la diferencia que se encontró con *C. muelleri* para el cálculo del crecimiento mediante la ecuación de balance energético.

Otra posible fuente de error que se consideró se refiere al supuesto implícito en el cálculo de la eficiencia de asimilación con el método de Conover (1966), de acuerdo al cual la materia inorgánica contenida en el alimento no sería utilizada por organismos del zooplancton.

Por otra parte, este método fue validado por Sick (1976), mediante una comparación de la eficiencia de absorción calculada con la técnica de proporciones y colectando cuantitativamente todas las heces de *Artemia salina* y además los datos que se recabaron en este estudio coinciden con los reportados para *A. franciscana* por Evjemo *et al.* (2000), los cuales evaluaron la eficiencia de absorción

mediante marcaje con C^{14} de *Isochrysis* sp., por lo cual es poco probable que el uso de esta técnica haya modificado los resultados de las pruebas de corto plazo.

La tasa de alimentación de los crustáceos filtradores depende de su talla y de la disponibilidad de alimento (Suschenya, 1970). Éste se proporcionó en raciones individuales diarias iguales, aunque los pesos resultaron diferentes con las tres dietas, lo que pudiera ser parte de la explicación por el mayor crecimiento real de *A. franciscana* alimentada con *C. muelleri*. De acuerdo a los datos de ingestión, el consumo diario de *N. oculata* fue constantemente similar al potencial, mientras que con *Isochrysis* sp. disminuyó progresivamente entre los días 3 y 7, desde el 80 hasta el 50% de su potencial de ingestión. Por otra parte, con *C. muelleri* estos porcentajes fueron cercanos o inferiores al 50% a partir del día 3, que implica un probable aumento del tiempo de retención en el sistema digestivo y un incremento de la eficiencia de asimilación en paralelo con la progresiva disminución de la disponibilidad de alimento (Navarro y Winter, 1982; Beiras y Pérez-Camacho, 1994; Elliot, 1976), que explicaría los altos valores de la eficiencia de absorción calculada por retrocálculo (EUt) para el día 7, en los cultivos con *Isochrysis* sp., y a partir del tercer día para *A. franciscana* alimentada con *C. muelleri*.

Por otra parte, ésto no explica la diferencia entre los crecimientos iniciales, que se notó tanto en el experimento en el cual el alimento se suministró en raciones individuales constantes, como cuando las raciones se modificaron de acuerdo a la edad de los organismos.

De acuerdo a ambos experimentos, se encontró un mayor crecimiento, en talla, en peso o en ambos, a partir del segundo o del tercer día, a pesar del hecho que las raciones de los días anteriores fueron similares en todos los casos, lo cual implica que las tres dietas, a pesar de ser aproximadamente isocalóricas, poseen características intrínsecas diferentes, que no están relacionadas con su digestibilidad, la cual en promedio resultó similar para las tres dietas.

De acuerdo a toda la literatura sobre las características de los nauplios de *A. franciscana* del Gran Lago Salado, su contenido del ácido graso DHA es inferior a los límites de detección, mientras que el ácido EPA es relativamente abundante (Van Stappen, 1996; Evjemo *et al.*, 2001). Bajo las condiciones de cultivo usadas en

este trabajo, *Isochrysis* tiene un contenido de DHA mayor que *C. muelleri*, que explicaría el mayor índice de desarrollo inicial con esta dieta, pero existen pruebas que *Artemia* moviliza el DHA y otros ácidos grasos para hacer frente a su alta demanda de EPA, que es más abundante en *C. muelleri* (Lora Vilchis *et al.*, 2004), que es la explicación más probable de la mayor efectividad de esta microalga a partir del segundo o tercer día poseclosión.

Conclusiones

Este trabajo se realizó bajo las hipótesis de que la calidad dietética de diferentes microalgas para *Artemia franciscana* puede ser definida mediante el cálculo del balance energético obtenido con experimentos de corto plazo, con resultados similares a los que se pueden lograr mediante experimento de cultivo de mayor duración, y que además el crecimiento calculado a partir del balance energético corresponde con el verificado experimentalmente en los cultivos.

La primera de estas hipótesis fue comprobada con dos experimentos con las microalgas *Nannochloropsis oculata*, *Isochrysis* sp. y *Chaetoceros muelleri*, suministradas en un caso en raciones isocalóricas diarias individuales constantes y por lo tanto progresivamente limitantes en paralelo con el crecimiento de los organismos, y en el segundo en raciones progresivamente crecientes de acuerdo a su edad, ya que en ambos casos el balance energético y el crecimiento individual permitieron definir que *C. muelleri* es superior a *Isochrysis* sp. y que *N. oculata* no es una dieta adecuada para *A. franciscana*.

La segunda hipótesis no fue comprobada, ya que el crecimiento esperado con *N. oculata* resultó aproximadamente el 3% del verificado en los cultivos y que además el balance energético resultó positivo para organismos de 1, 3 y 5 días de edad y fue igual a cero para los de 7 días, mientras que los experimentos de cultivo señalaron balances negativos en tres de estas fechas, que resultaron en una alta mortalidad.

Con *Isochrysis* sp. el crecimiento real resultó ser el 80% del calculado, que pudiera ser explicado por el hecho que el costo de las exuvias no fue utilizado para el cálculo del balance energético, aunque esto no explicaría y más bien aumentaría la diferencia en el caso de *A. franciscana* alimentada con *C. muelleri*, cuyo crecimiento en cultivos de 7 días resultó ser el 120% del calculado mediante el balance energético.

Aparte de la calidad dietética intrínseca de las tres microalgas, que está relacionada con su composición y no se refleja en su contenido energético, la explicación más probable de estas discrepancias es que las raciones se calcularon con base en la edad de los organismos y no de acuerdo a su peso; causando una

subestimación de la eficiencia de absorción, que fue medida en condiciones de alimento no limitante. Ésto fue comprobado por retrocálculo a partir del crecimiento diario y de la cantidad de alimento ingerido, por lo menos durante el último día de cultivo con *Isochrysis* sp. y durante los días 3 y 7 en el caso de *C. muelleri*.

Recomendaciones

De acuerdo a Evjemo y Olsen (1999), la tasa de crecimiento de *A. franciscana* calculada con la fórmula tradicional $K = (\ln W_t / W_0) \cdot t^{-1}$, después de 7 días de cultivo con raciones no limitantes de *Isochrysis* sp. es 0.59, que es similar a la calculada para el segundo experimento, la cual es a su vez inferior al valor de 0.69 calculado para los cultivos con *C. muelleri* y es posible que esta pueda ser mejorada tanto aumentando la ración diaria, como con diferentes estrategias de alimentación que permitan optimizar la absorción del alimento, manteniendo constante su concentración en un nivel que debería ser definido experimentalmente, considerando además el incremento en peso individual.

Con una estrategia similar, Ramírez *et al.* (1999) lograron mayores supervivencias y crecimientos de larvas de peneidos y mejoraron la alimentación de bivalvos eliminando la producción de pseudoheces. Una vez calibrado, este mismo sistema pudiera servir para definir el máximo potencial de crecimiento de *A. franciscana*, que serviría como un estándar con el cual sería posible cuantificar el efecto tanto de diferentes alimentos, como de cualquier otra variable ambiental.

El diseño experimental de este trabajo fue adoptado en vista de la necesidad de comparar el crecimiento real con el calculado para cada una de las dietas, causando fuertes diferencias en los pesos individuales de los organismos y una probable debilitación general por lo menos en el caso de los alimentados con *N. oculata* que se reflejó en la mortalidad progresivamente creciente y en el incremento en sus costos metabólicos diarios.

Un diseño alternativo a utilizarse para experimentos de corto plazo pudiera consistir en mantener durante por lo menos dos a tres días los organismos con una dieta estándar, que en este caso pudiera ser la que se encontró tener la calidad superior y que pudiera ser además estandarizada ulteriormente con el sistema que se mencionó, de tal manera que cualquier cambio en las tasas metabólicas consideradas podría ser cuantificado en términos de porcentaje, permitiendo así establecer una escala de calidad tanto de las dietas, como de otras variables susceptibles de modificar el éxito de los cultivos.

Bibliografía

- Abalde, J., Cid, A., Fidalgo, P., Torres, E. y Herrero, C. 1995. Microalgas: cultivo y aplicaciones. Universidad de La Coruña. Xunta de Galicia. 210 pp.
- Albentosa, M., Fernández-Reiriz, M.J., Pérez-Camacho, A. y Labarta, U. 1999. Growth performance and biochemical composition of *Ruditapes decussatus* (L.) spat fed on microalgal and wheatgerm flour diets. *Aquaculture*. 232: 23-37.
- Albentosa, M., Pérez-Camacho, A., Labarta, U. y Fernández-Reiriz, M.J. 1997. Evaluation of freeze dried microalgal diets for the seed culture of *Ruditapes decussatus* using physiological and biochemical parameters. *Aquaculture*. 154: 315-321.
- Bayne, B. L. y Newell, R. C. 1983. Physiological energetics of marine mollusks. In Saleuddin, ASM, Wilbur KM (eds) *The mollusca*. Academic Press, New York.
- Becker, E.W. 1981. Algae mass cultivation. Production and utilization. *Processes in Biochemistry*, Aug./Sept. 1981: 10-14.
- Becker, E.W. 1994. *Microalgae: biotechnology and microbiology*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Beiras, R. y Pérez Camacho, A. 1993. Influence of food concentration on energy balance and growth performance of *Venerupis pullastra* seed reared in an open-flow system. *Aquaculture* 116:353-565.
- Beiras, R., Pérez Camacho, A. y Albentosa, M. 1994. Comparison of the scope for growth with the growth performance of *Ostrea edulis* seed reared at different food concentrations in an open-flow system. *Marine Biology* 119:227-233.
- Bligh, E.G. y Dyer, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 37: 911-917.
- Bliss, D. 1985. *The biology of crustacea*. Academic Press, Sn. Diego, USA.
- Brown, M.R., Jeffrey, S.W. y Garland, C.D. 1989. Nutritional aspects of microalgae used in mariculture; a literature review. CSIRO Marine Laboratories, Report 205.

-
- Brown, M.R., Jeffrey, S.W., Volkman J.K. y Dunstan, C.A. 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*. 151: 315-331.
- Chakraborty, S C., Ross, L.G. y Ross, B. 1992. The effect of dietary protein level and ration level on excretion of ammonia in common carp, *Cyprinus carpio*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 103A (4): 801-808.
- Cho, C. Y. y Bureau, D.P. 1999. Bioenergética en la formulación de dietas y estándares de alimentación para la acuicultura del samón: principios, métodos y aplicaciones. 33-64. En: Avances en Nutrición Acuícola III. Cruz Suárez, L.E., Rique Marie, D. y Mendoza Alfaro, R. (eds.). Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México.
- Conover, R.J. 1966. Assimilation of organic matter by zooplankton. *Limnology and Oceanography*. 11: 338-345.
- Cordero-Esquivel, B. y Voltolina, D. 1994. Growth of *Mytilus galloprovincialis* fed with four microalgae and two feeding regimes. *Journal of the world aquaculture society* 25(3):471-476.
- Cordero-Esquivel, B., Voltolina, D. y Correa-Sandoval, F. 1993. The biochemical composition of two diatoms after different preservation techniques. *Comparative Biochemical and Physiology*. 105B (2): 369-373.
- Correa-Sandoval, F. y Bückle-Ramírez, L.F. 1993. Morfología y biometría de cinco poblaciones de *Artemia franciscana* (Anostraca: Artemiidae). *Revista de Biología Tropical*. 41: 103-111.
- Coutteau, P. 1996. Microalgae. En: Coutteau, P. y Sorgeloos, P. (eds.). *Manual on the production and use of live food for aquaculture*. FAO Fishery Technical Papers. 361: 7-48.
- Coutteau, P. y Sorgeloos, P. 1992. The use of algal substitutes and the requirement for live algae in the hatchery and nursery rearing of bivalve molluscs. *Journal of Shellfish Research*. 11: 249-256.
- Dawirs, R. R. 1983. Respiration, energy balance and developmental pattern in growing and starving larvae of *Carcinus maenus* L. (Decapodae, Portunidae). *Journal of Experimental Marine Ecology* 69:105-128.

-
- De Micco, E. y Hubbard, R. 2001. Plankton alternatives to *Artemia* for growth of marine shrimp *Litopenaeus vannamei* larvae. En: Aquaculture 2001. World Aquaculture Society. Baton Rouge, LA. p. 180.
- De Pauw, N. y Persoone, G. 1988. Microalgae for aquaculture. En: Micro-algal Biotechnology. Borowitzka, M. y Bortowitzka, L.J. (Eds.). Cambridge University Press, Cambridge. U. K. pp. 197-221.
- De Silva, S.S. 2000. A global perspective of aquaculture in the third millennium. En: Conference on aquaculture in the third millennium. Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific and The Food and Agriculture Organization of the United Nations, NACAP-FAO Febrero 2000. Bangkok. pp. 51-59.
- Dhert, P. 1996. Rotifers. En: Manual on the production and use of live food for aquaculture. Lavens, P. y Sorgeloos, P. (Eds.). FAO Fishery Technical Papers. 361: 49-78.
- D'Souza, F.M.L. y Loneragan, N.R. 1999. Effects of monospecific and mixed-algae diets on survival, development and fatty acid composition of penaeid prawn (*Penaeus* sp.) larvae. Marine Biology. 133: 621-633.
- D'Souza, F.M.L. y Kelly, G.J. 2000. Effects of a diet of a nitrogen-limited alga (*Tetraselmis suecica*) on growth, survival and biochemical composition of tiger prawn (*Penaeus semisulcatus*) larvae. Aquaculture. 181: 311-329.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.D., Rebers, P.A. y Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry. 28: 350-356.
- Duerr, E.O., Molnar, A. y Sato, V. 1998. Cultured microalgae as aquaculture feeds. Journal of Marine Biotechnology. 7: 65-70.
- Elliot, J.M. y Davison, W. 1975. Energy equivalents of oxygen consumption in animal energetics. Oecologia. 19: 195-201.
- Elliot, J. M. 1976. Energy losses in the waste products of brown trout (*Salmo trutta* L.). Journal of Animal Ecology 45: 561-580.
- Epifanio, C.E. 1979. Comparison of yeast and algal diets for bivalve molluscs. Aquaculture. 16: 187-192.

-
- Evjemo, J.O. y Olsen, Y. 1999. Effect of food concentration on the growth and production rate of *Artemia franciscana* feeding on algae (T. iso). Journal of experimental marine biology and ecology. 242: 273-296.
- Evjemo, J.O. Vadstein, O. y Olsen, Y. 2000. Feeding and assimilation kinetics of *Artemia franciscana* fed *Isochrysis* sp. (clone T. Iso). Marine Biology. 136: 1099-1109.
- FAO. 2003. Review of the state of world aquaculture. FAO Fishery Circular 886 (FIRI/C886.Rev2). 95 pp.
- Fábregas, J., Otero, A., Morales, E.D., Cordero, B. y Patiño, M. 1996. *Tetraselmis suecica* cultured in different nutrient concentrations varies in nutritional value to *Artemia*. Aquaculture. 143: 197-204.
- Fábregas, J., Otero, A., Morales, E.D., Arredondo-Vega, B.O. y Patiño, M. 1998. Modification of the nutritive value of *Phaeodactylum tricornutum* for *Artemia* sp. in semicontinuous cultures. Aquaculture. 169: 167-176.
- Foster, J. A. y Wolfe, A. F. 1986. Electrón microscopic study of the ceca, intestine and associated peritrophic membrane of the brine shrimp, *Artemia*. Proceedings of the Pennsylvania Academy of Science 60:29-32.
- Frost, B. W. 1972. Effects of size and concentration of food particles on the feeding behavior of the marine planktonic copepod *Calanus pacificus*. Limnology and oceanography 17(6): 805-815.
- Fulks, W. y Main, K.L. (Eds.). 1991. Rotifer and microalgae culture systems. Argent Laboratories Press. Redmond, WA.
- Gardiner, M. S. 1978. Biología de los invertebrados. Ediciones Omega. Barcelona. 940 pp.
- Gassé, P. P. 1954. Traité de Zoologie. Anatomie, systématique, biologie. Masson et Cie. Editeurs. Paris.
- Gelabert, R. y De la Cruz, A. 1990. La selección del tamaño de partículas alimenticias por *Artemia* (Brachiopoda). Revista de Investigaciones Marinas. 9: 63-69.

-
- Gnaiger, E. 1983. Calculation on energetic and biochemical equivalents of respiratory oxygen consumption. En: Polarographic oxygen sensors. Gnaiger, E. y Forstner, H. (eds.). Springer, Berlin. pp. 337-345.
- González Becerril, A. 2002. Modelación bioeconómica de un sistema de producción de camarón *Litopenaeus stillostris* en Escuinapa Sinaloa México. Tesis de Doctorado en Ciencias. Universidad de Colima, Posgrado Interinstitucional en Ciencias Pecuarias. Tecomán, Colima, México. 100 pp.
- González, M. L., López, D. A., Pérez, M. C. y Castro, J. M. 2002. Effect of temperature on the scope for growth in juvenile scallops *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Aquaculture International* 10:339-348.
- Grodzinski, W., Klekowski, R. Z. and Duncan, A. 1975. Methods for Ecological Bioenergetics. IBP Handbook No. 24. Blackwell Scientific. USA.
- Guillard, R.R.L. 1972. Culture of the phytoplankton for feeding marine invertebrates. En: Culture of marine invertebrate animals. Smith, W.L. y Chanley, M.H. (eds.). Plenum, New York, pp. 29-60.
- Hawkins, A. J. S. y Bayne, B. L. 1990. Physiological interrelations, and the regulation of production. In: Gosling, E. (Ed) The mussel *Mytilus*: ecology, [hysiology, genetics and culture. Elsevier, Amsterdam
- Hoff, F.H. y Snell, T.W. 1999. Plankton culture manual. 5ª Ed. Florida Aqua Farms, Inc. 33418 Old Saint Joe Rd., Dade City. Florida. pp. 160.
- Hunter, D.A. y Uglow, R.F. 1993. A technique for the measurement of total ammonia in small volumes of seawater and haemolymph. *Ophelia*. 37(1): 31-40.
- Ivlev, V.S. 1939. Transformation of energy by aquatic animals. *Int. Rev. ges. Hydrobiol. Hydrogr.* 38:449-458.
- Ivlev, V. S. 1945. The biological productivity of waters. *Uspsovrem Biol.* 19: 98-120. (en ruso) [traducción *Journal of Fish Research Canadian* 23:1727-1759 (1966)]
- James, C.M. y Abu-Rezeq, T.S. 1988. Effect of different cell densities of *Chlorella capsulata* and a marine *Chlorella* sp. for feeding the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture*. 69: 43-56.

-
- Johns, D. M. 1982. Physiological studies on *Cancer irroratus* larvae. III. Effects on temperature and salinity on the partitioning of energy resources during development. *Marine Ecology Progressive Series* 8:75-85.
- Kleiber, M. 1932. Body size and metabolism. *Hilgardia* 6: 315-355.
- Laing, I. 1987. The use of artificial diets in rearing bivalve spats. *Aquaculture*. 65: 243-249.
- Laing, I., Child, A.R. y Janke, A. 1990. Nutritional value of dried algae diets for larvae of Manila clam (*Tapes philippinarum*). *Journal of the Marine Biological Association U.K.* 70: 1-12.
- Langdon, C.J. y Waldock, M.J. 1981. The effect of algal and artificial diets on the growth and the fatty acid composition of *Crassostrea gigas* spat. *Journal of the Marine Biological Association U.K.* 61: 431-448.
- Langdon, C.J. 1982. New techniques and their application to studies of bivalve nutrition. En: Pruder, G., Langdon, C. y Conklin, D. (eds.). *Biochemical and physiological approaches to shellfish nutrition*. World Mariculture Society. Baton Rouge, LA, USA. pp. 305-320.
- Lavens, P. y Sorgeloos, P. 1991. Production of *Artemia* in culture tanks. En: Browne, R.A., Sorgeloos, P. y Trotman, C.N.A. (eds.). *Artemia biology*. CRC Press, Boca Raton, FL, U. S. A. 317-351 pp.
- Lavens, P. y Sorgeloos, P. 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture. *FAO Fishery Technical Papers*. 361, 265 pp.
- López-Elías, J.A. y Voltolina, D. 1993. Cultivos semicontinuos de cuatro especies de microalgas con un medio no convencional. *Ciencias Marinas, México*. 19: 169-180.
- López-Elías, J.A., Voltolina, D., Chavira-Ortega, C.O., Rodríguez-Rodríguez, B.B., Sáenz-Gaxiola, L.M., Cordero-Esquivel, B. y Nieves, M. 2003. Mass production of microalgae in six commercial shrimp hatcheries of the Mexican northwest. *Aquacultural Engineering*. 29: 155-164.
- Lora-Vilchis, M.C. y Doktor, N. 2001. Evaluation of seven algal diets for spat of the pacific scallop *Argopecten ventricosus*. *Journal of the World Aquaculture Society*. 32: 228-235.

-
- Lora-Vilchis, M.C. y Maeda-Martínez, A.N. 1997. Ingestion and digestion index of catarina scallop *Argopecten ventricosus-circularis*, Sowerby II, 1842, veliger larvae with ten microalgae species. *Aquaculture Research*. 28: 905-910.
- Lora-Vilchis, M.C., Robles-Mungaray, M., Doktor, N. y Voltolina, D. 2004a. Nutritive value of four microalgae for *Lyropecten subnodosus* (Sowerby, 1833). *Journal of the World Aquaculture Society* 35(1): (en prensa).
- Lora-Vilchis, M.C., Ruiz-Velasco Cruz, E., Reynoso-Granados, T. y Voltolina, D. 2004b. Evaluation of five microalgae diets for pen shell *Atrina maura* (Sowerby, 1835) juveniles. *Journal of the World Aquaculture Society*. 35(1): (en prensa).
- Lora-Vilchis, M. C. y Voltolina, D. 2004. Growth and survival of *Artemia franciscana* (Kellogg) fed with *Chaetoceros muelleri* Lemmerman and *Chlorella capsulata* Guillard. *Rev. Investigaciones Marinas*. 24(3): (Aceptada).
- Lora-Vilchis, M.C., Cordero-Esquivel, B. y Voltolina, D. 2004. Growth of *Artemia franciscana* fed with *Isochrysis* sp. and *Chaetoceros muelleri* during its early life stages. *Aquaculture Research*. En prensa.
- Lowry, O.H., Rosebrough, H.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193: 265-275.
- Lucas, A. 1993. Bioenergetique des animaux aquatiques. Masson et cie., Paris 179 pp.
- Mayzaud, P. y Conover, R. J. 1988. O:N atomic ratio as a tool to describe zooplankton metabolism. *Marine Ecology Progress Series* 45: 289-302.
- McCausland, M.A., Brown, M.R., Barret, S.M., Diemar, J.A. y Heasman, M.P. 1999. Evaluation of live microalgae and microalgal pastes as supplementary food for juvenile Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*. 174: 323-342.
- McMahon, J. W. y Rigler, F. H. 1963. Mechanisms regulating the feeding behavior of *Daphnia magna* Straus. *Canadian Journal Zoology* 41:603-611.
- Meadland, T.E. y Beamish, F.W.H. 1985. The influence of diet and fish density on apparent heat increment in rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Aquaculture*. 47: 1-10.

- Menden-Deuer, S. y Lessard, E.J. 2000. Carbon to volume relationships for dinoflagellates, diatoms and other protist plankton. *Limnology and Oceanography*. 45: 569-579.
- Merchie, G. 1996. *Artemia*: use of nauplii and meta-nauplii. En: Lavens, P. y Sorgeloos, P. (eds.). Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Fishery Technical Paper. 361. 137-163.
- Naegel, L.C.A. 1999. Controlled production of *Artemia* biomass using an inert commercial diet, compared with the microalgae *Chaetoceros* sp. *Aquacultural Engineering*. 21: 49-59.
- Navarro, J. 1983. Oferta alimenticia natural y su efecto sobre los procesos fisiológicos del bivalvo *Mytilus chilensis* en la bahía de Yaldad, Chile (Sur de Chile). *Memorias de la Asociación Latinoamericana de Acuicultura*. 5(2): 175-187.
- Navarro, J., Leiva, G.E., Martínez, G. y Aguilera, C. 2000. Interactive effects of diet and temperature on the scope for growth of the scallop *Argopecten purpuratus* during reproductive conditioning. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 247: 67-83.
- Navarro, J. M. y Winter, J. E. 1982. Ingestión rate, assimilation efficiency and energy balance in *Mytilus chilensis* in relation to body size and different algal concentrations. *Marine Biology* 67:255-266.
- O'Connor, W.A., Heasman, M.P. y O'Connor, S.J. 2000. Algal diets for broodstock maintenance of the doughboy scallop *Mimachlamys asperrima* (Lamarck). *Aquaculture Research* 31(8-9) : 627-635.
- Owen, S. F., Houlihan, D. F., Rennie, M. J. van Weerd, J. H. 1998. Bioenergetics and nitrogen balance in the European eel (*Anguilla anguilla*) fed at high and low ration levels. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 55:2365-2375.
- Pande, S.V., Parvin, R.K. y Venkitasubramanian, T.A. 1963. Microdetermination of lipids and serum total fatty acids. *Analytical Biochemistry*. 6: 415-423.
- Paffenhofer, G. A. 1971. Grazing and ingestion rates of nauplii copepodids and adults of the marine planktonic copepods *Calanus helgolandiculs*. *Marine Biology* 11: 286-298.

-
- Pechenick, J.A. y Fisher, N.S. 1979. Feeding, assimilation, and growth of mud snail larvae, *Nassarius obsoletus* (Say), on three different algal diets. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 38: 57-80.
- Ramírez, J.L., Avila, S. e Ibarra, A.M. 1999. Optimization of forage in two food-filtering organisms with the use of a continuous, low food concentration, agricultural drip system. *Aquaculture Eng.* 20:175-189.
- Randall, D., Burggren, W. y French, K. 2001. *Eckert Animal Physiology Mechanisms and adaptations*. 5a ed. W. H. Freeman and Company. New York.
- Reeve, M. R. 1963a. The filter feeding of *Artemia* in pure cultures of plant cells. *Journal of Experimental Biology*. 40; 195-205.
- Reeve, M. R. 1963b. Growth efficiency in *Artemia* under laboratory conditions. *Biological Bulletin*. 125: 133-145.
- Riisgard, H. U. 2001. Physiological regulation versus autonomous filtration in filter-feeding bivalves: starting points for progress. *Ophelia* 54(3): 193-209.
- Riisgard, H. U. y Randlov 1981. Energy budgets, growth and filtration rates in *Mytilus edulis* at different algal concentrations. *Marine Biology* 61: 227-234.
- Riisgard, H. U. 2001.
- Rodier, J. 1978. *Análisis de las aguas: aguas naturales, aguas residuales, agua de mar*. Omega. Barcelona. España.
- Ropert, M. y Gouletquer P. 2000. Comparative physiological energetics of two suspension feeders: Polychaete annelid *Lanice conchilega* (Pallas 1766) and Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg 1795). *Aquaculture* 181 (1-2):171-189.
- Rosas, C. y Sánchez, A. 1996. Effect of dietary protein level on apparent heat increment and post-prandial nitrogen excretion of *Penaeus setiferus*, *P. schmitti*, *P. duorarum*, and *P. notialis* postlarvae. *Journal of the World Aquaculture Society*. 27: 92-102.
- Rosas Vázquez, C. 1999. Bioenergética de camarones peneidos: una forma de comprender los mecanismos fisiológicos involucrados en la nutrición. 81-97. En: *Avances en Nutrición Acuícola III*. Cruz Suárez, L.E., Rique Marie, D. y

-
- Mendoza Alfaro, R. (eds.). Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México.
- Russell-Hunter, W.D. 1970. Aquatic productivity. MacMillan, London. 306 pp.
- Saucedo-Lastra, P. 2001. Investigación aplicada al acondicionamiento gonadal y reproducción de la madreperla de calafia *Pinctada mazatlanica* (Hanley 1856) en laboratorio. Tesis de Doctorado en Ciencias. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. La Paz, BCS, México. 181 pp.
- Schmidt-Nielsen, K. 1972. How animals work. Cambridge: Cambridge University Press.
- Schmidt-Nielsen, K. 1997. Animal physiology. Adaptation and environment. Cambridge University Press, Cambridge, U.K. 560 pp.
- Schrehardt, A. 1987. A scanning electron-microscope study of the post-embryonic development of *Artemia*. En: Sorgeloos, P., Bengston, D.A., Declair, W. y Jaspers, E. (Eds.). Artemia Research and its applications. Vol. 1. Morphology, genetics, strain characterization, toxicology. Universa Press, Wetteren, Belgium. 380 pp.
- Sheehan, D. y Hrapchak, B. 1980. Teory and practice of histotechnology. Battle, Ohio. 163-174 pp.
- Sick, L.V. 1976. Nutritional effect of five species of marine algae on the growth, development and survival of the brine shrimp *Artemia salina*. Marine Biology. 35: 69-78.
- Sorokin, C. 1973. Dry weight, packed cell volume and optical density: En: Stein, J. (ed.). Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurement. Cambridge University Press, Cambridge and New York. pp. 321-343.
- Sotolongo, M.E. 1988. The evaluation of various diets for optimal growth and survival of different life stages of *Artemia*. 73-78. En: General Aquaculture Course. Kanagawa International Fisheries Centre. JICA. Kanagawa, Japan.
- Stead R. A.; Thompson, R. J. y Jaramillo, J. R. 2003. Absorption efficiency, ingestion rate, gut passage time and scope for growth in suspension- and

- deposit-feeding *Yoldia hyperborea*. Marine Ecology Progress Series 252: 159-172.
- Suschenya, L. M. 1970. Food rations, metabolism and growth of crustaceans. En: Steele J. H. (Ed.) Marine food chains. Oliver and Boyd, Edinburg, U. K. 127-141 pp.
- Thompson, R. J. y Bayne, B. L. 1972. Some relationships between growth, metabolism and food in the mussel *Mytilus edulis*. Marine Biology 27:317-326.
- Thor, P. 2000. Relationship between specific dynamic action and protein deposition in calanoid copepods. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 245: 171-182.
- Tizol-Correa, R. 1994. Evaluación de diferentes densidades de la microalga *Nannochloropsis oculata* como alimento para *Artemia*. Anales del Instituto de Investigaciones Marinas de Punta Betin. 23: 199-203.
- Trujillo-Valle, M.L. y Voltolina, D. 1994. Cultivos de microalgas para la acuicultura. Serie Científica, Área de Ciencias del Mar. Universidad Autónoma de Baja California Sur, México 2(1): 73-86.
- Van Stappen, G. 1996. *Artemia*: use of cysts. En: Lavens, P. y Sorgeloos, P. (eds.). Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Fishery Technical Paper. 361: 107-123.
- Villareal Colmenares, H. 1999. Evaluación del potencial de cultivo de la langosta de agua dulce australiana *Cherax tenuimanus* en función de su eficiencia bioenergética. 65-80. En: Avances en Nutrición Acuícola III. Cruz Suárez, L.E., Rique Marie, D. y Mendoza Alfaro, R. (eds.). Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México.
- Villegas, C.T. y Kanazawa, A. 1979. Relationship between diet composition and growth of zoeal and mysis stages of *Penaeus japonicus* (Bate). Fishery Research Journal of the Philippines. 4(2): 32-40.
- Voltolina, D. y López-Elías, J.A. 2002. Cultivos de apoyo para la acuicultura. Tendencias e innovaciones. En: Martínez-Córdova, L.R. (ed.).

-
- Camaronicultura. Avances y tendencias. AGT editor, S.A. México, D.F. pp. 23-41.
- Webb, K.L. y Chu, F.L.E. 1982. Phytoplankton as a food source for bivalve larvae. En: Pruder, G., Langdon, C. y Conklin, D. (eds.). Biochemical and Physiological Approaches to Shellfish Nutrition. World Mariculture Society Special Publication. 2: 272-291.
- Widdows, J. 1985. Physiological measurements. En: Bayne, B. L. (ed.). The effects of stress and pollution on marine animals. Praeger Publishers, New York. pp. 3-45, 161-178.
- Winberg, G.G. 1960. Rate of metabolism and food requirements of fishes. Fishery Research Board of Canada. Translation Series. 194: 1-253.
- Wong, W. H. y Cheung, S. G. 2001. Feeding rates and scope for growth of green mussels, *Perna viridis* (L) and their relationship with food availability in Kat O, Hong Kong. Aquaculture 193:123-137.
- Wong, W. H. y Cheung, S. G. 2003. Seasonal variation in the feeding physiology and scope for growth of green mussels, *Perna viridis* in estuarine Ma Wan, Hong Kong. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 83(3):543-552
- Zar, J. 1999. Biostatistical analysis. Prentice Hall, Inc., Englewood Cliffs, N.J. USA.