



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

Evaluación de Microalgas endémicas para el cultivo y enriquecimiento de presas vivas y su aplicación en la primera alimentación de *Seriola rivoliana*.

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctora en Ciencias

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

P r e s e n t a

Itzel Cruz Cruz

La Paz, Baja California Sur, junio de 2019

Acta de liberación

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12:00 horas del día 03 del Mes de mayo del 2019, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Evaluación de microalgas endémicas para el cultivo y enriquecimiento de presas vivas y su aplicación en la primera alimentación de *Seriola rivoliana*"


Presentada por el alumno:


Itzel Cruz Cruz


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


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


LA COMISIÓN REVISORA

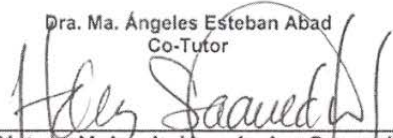

Dra. Mineva Concepción Maldonado García
Co-Director de Tesis


Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle
Co-Director de Tesis


Dr. Marco Antonio Cadena Roa
Co-Tutor


Dr. Juan Carlos Pérez Urbiola
Co-Tutor


Dra. Ma. Ángeles Esteban Abad
Co-Tutor


Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos

Conformación de Comités

Comité Tutorial

Dra. Minerva Concepción Maldonado García
Co-Directora
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle
Co-Director
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.

Dr. Marco Antonio Cadena Roa
Co-Tutor
Universidad Autónoma de Baja California Sur

Dr. Juan Carlos Pérez Urbiola
Co-Tutor
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.

Dra. María Ángeles Esteban Abad
Co-Tutora
Universidad de Murcia

Comité Revisor de Tesis

Dra. Minerva Concepción Maldonado García
Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle
Dr. Marco Antonio Cadena Roa
Dr. Juan Carlos Pérez Urbiola
Dra. Ma. Ángeles Esteban Abad

Jurado de Exámen

Dra. Minerva Concepción Maldonado García
Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle
Dr. Marco Antonio Cadena Roa
Dr. Juan Carlos Pérez Urbiola
Dra. Ma. Ángeles Esteban Abad

Suplentes

Dr. Deneb Maldonado García
Dra. Laura Teresa Guzmán Villanueva

Resumen

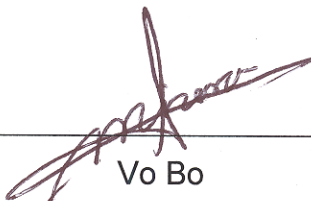
México es uno de los países líderes de América Latina y del Caribe en producción de especies marinas por acuicultura y se proyecta que mantenga un crecimiento del 42.6% en esta actividad para el 2030 (FAO,2018), dicho crecimiento va de la mano con la diversificación de especies sujetas a explotación. Las microalgas en la acuicultura conforman la base de la alimentación de diversas especies de moluscos, crustáceos y peces, para estos últimos el cultivo de zooplancton como rotíferos y *Artemia* para ser utilizados como presas vivas requiere de grandes cantidades de microalgas. Usualmente para el mantenimiento de cepas y escalamiento de microalgas en granjas acuícolas ubicadas en zonas tropicales como en nuestro país es necesario áreas refrigeradas y luz artificial que resulta en altos costos, por lo que la utilización de microalgas endémicas puede presentar ventajas ya que se encuentran adaptadas a las condiciones climáticas de la zona.

Por lo tanto, tomando en cuenta lo anteriormente mencionado, el objetivo de este trabajo fue evaluar el potencial de las cepas de tres especies de microalgas aisladas de la Bahía de La Paz, Baja California Sur, México para el cultivo y enriquecimiento del rotífero *Brachionus plicatilis* y *Artemia franciscana* y su aplicación en la primera alimentación del jurel *S. rivoliana*. Las cepas corresponden a los géneros: *Schizochytrium* sp. (clave interna: LPU-1), *Chaetoceros* sp. (LPU-2) y *Chaetoceros* sp. (LPU-3) las cuales fueron cultivadas a temperatura ambiente 32 ± 2 °C hasta la fase exponencial, al finalizar se registró la densidad celular, se calculó la tasa de crecimiento y se determinaron proteínas totales, lípidos totales, carbohidratos y perfil de ácidos grasos. El experimento de alimentación de *B. plicatilis* con las cepas de microalgas LPU-1, LPU-2 y LPU-3, se realizó a temperatura ambiente 32 ± 2 °C, los tratamientos se establecieron de manera monoalgal y en mezclas, *Chaetoceros* sp. (LPU-2), *Chaetoceros* sp. (LPU-3), *Chaetoceros* sp. (LPU-1) /*Chaetoceros* sp. (LPU-3), *Schizochytrium* sp. (LPU-1), *Schizochytrium* sp. (LPU-1) /*Chaetoceros* sp. (LPU-2). En el bioensayo de *A. franciscana* fueron probados dos tratamientos monoalgales *Chaetoceros* sp. (LPU-2) y *Schizochytrium* sp. (LPU-1). Al finalizar los bioensayos se obtuvo la biomasa de *A. franciscana* y *B. plicatilis* para determinar proteínas totales, lípidos totales, carbohidratos y perfil de ácidos grasos. Para el cultivo larvario de jurel se probaron dos enriquecedores para rotíferos uno comercial Ori Green (Skretting) como control y la cepa *Chaetoceros* sp. (LPU-2) como enriquecedor experimental, se registró la supervivencia al finalizar el ensayo.

Referente a la densidad celular de la cepas registramos 4.19×10^6 cel mL⁻¹ para *Chaetoceros* sp. (LPU-3), 2.86×10^6 cel mL⁻¹ para *Chaetoceros* sp. (LPU-2), y $.041 \times 10^6$ cel mL⁻¹ para *Schizochytrium* sp. (LPU-1). En el caso de los rotíferos la densidad poblacional más alta se obtuvo con la cepa *Chaetoceros* sp. (LPU-2) con 118 ind mL⁻¹. El análisis de ácidos grasos tanto en microalgas y rotíferos muestra que hubo una buena asimilación de las 3 cepas de microalgas. En cuanto a los

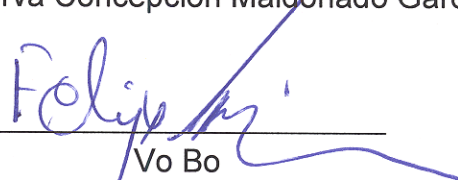
resultados con *A. franciscana* el mejor tratamiento para crecimiento y reproducción fue el de *Chaetoceros* sp. (LPU-2), relativo al contenido de ácidos grasos poliinsaturados este fue significativamente más alto en los cultivos alimentados con *Schizochytrium* sp. (LPU-1). Relativo al cultivo larvario se obtuvo una supervivencia del 35% con el enriquecedor experimental y un 32.5 % para el control. De acuerdo con nuestros resultados las cepas probadas muestran ser aptas para el cultivo y ser utilizadas para mejorar el contenido de ácidos grasos mono y poliinsaturados de presas vivas.

Palabras clave: microalgas endémicas, rotíferos, *Artemia*, ácidos grasos, *Seriola rivoliana*.



Vo Bo

Dra. Minerva Concepción Maldonado García



Vo Bo

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle

Summary

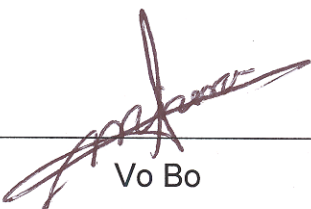
México is one of the leading countries in Latin America and the Caribbean in production of marine species by aquaculture and is projected to maintain a 42.6% growth in this activity by 2030 (FAO, 2018), this growth goes hand in hand with the diversification of species subject to exploitation. Microalgae are the basis of the feeding of various species of fish, mollusks and crustaceans, for their scaling and maintenance in farms located in tropical areas like in our country is necessary refrigerated areas and artificial light that results in high costs, so the use of endemic microalgae can present advantages since they are adapted to the climatic conditions of the area. Therefore, the objective of this work was to evaluate the potential of 3 strains of microalgae isolated from Bahía de La Paz, Baja California Sur, México for the cultivation and enrichment of the rotifer *Brachionus plicatilis* and *Artemia franciscana* and their application in the first feeding of the longfin yellowtail *S. rivoliana*. The strains correspond to the genera: *Schizochytrium* sp. (internal key: LPU-1), *Chaetoceros* sp. (LPU-2) and *Chaetoceros* sp. (LPU-3) which were grown at room temperature 32 ± 2 °C until the exponential phase, at the end cell density was recorded, the growth rate was calculated and total proteins, total lipids, carbohydrates and fatty acid profile were determined.

The feeding experiment of *B. plicatilis* with the microalgae strains LPU-1, LPU-2 and LPU-3, was carried out at room temperature 32 ± 2 °C, the treatments were established in a monoalgal manner and mixtures, *Chaetoceros* sp. (LPU-2), *Chaetoceros* sp. (LPU-3), *Chaetoceros* sp. (LPU-1) / *Chaetoceros* sp. (LPU-3), *Schizochytrium* sp. (LPU-1), *Schizochytrium* sp. (LPU-1) / *Chaetoceros* sp. (LPU-2). In the bioassay of *A. franciscana* two monoalgal treatments *Chaetoceros* sp. (LPU-2) and *Schizochytrium* sp. (LPU-1). At the end of the bioassays, the biomass of *A. franciscana* and *B. plicatilis* was obtained to determine total proteins, total lipids, carbohydrates and fatty acid profile. For the larval culture of longfin yellowtail two enrichments for rotifers were tested, one commercial Ori Green (Skretting) as control and the strain *Chaetoceros* sp. (LPU-2) as an experimental enrichment, the survival at the end of the trial was recorded.

Regarding the cell density of the strains, we recorded 4.19×10^6 cel mL⁻¹ for *Chaetoceros* sp. (LPU-3), 2.86×10^6 cel mL⁻¹ for *Chaetoceros* sp. (LPU-2), and $.041 \times 10^6$ cel mL⁻¹ for *Schizochytrium* sp. (LPU-1) In the case of rotifers, the highest population density was obtained with the strain *Chaetoceros* sp. (LPU-2) with 118 ind mL⁻¹. The analysis of fatty acids in both microalgae and rotifers shows that there was a good assimilation of the 3 strains of microalgae. As regards the results with *A. franciscana*, the best treatment for growth and reproduction was that of *Chaetoceros* sp. (LPU-2), relative to the content of polyunsaturated fatty acids, which was significantly higher in the cultures fed with *Schizochytrium* sp. (LPU-1) In relation to the larval culture, a survival of 35% was obtained with the experimental enrichment and 32.5% for the control according to our results, the

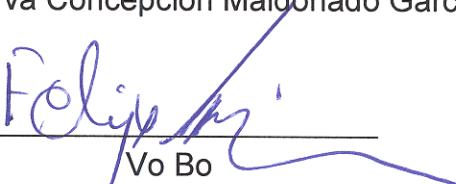
tested strains show to be suitable for the culture and be used to improve the monounsaturated and polyunsaturated fatty acids content of live prey.

Keywords: endemic microalgae, rotifer, *Artemia*, fatty acids, *Seriola rivoliana*



Vo Bo

Dra. Minerva Concepción Maldonado García



Vo Bo

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle

Dedicatoria

A lo largo de mi vida he sido afortunada en tener una familia maravillosa, mi esposo, mis padres, hermanas, tíos, primos, y sobrinos todos han estado para mí como apoyo y les agradezco infinitamente, este trabajo no sería igual sin ustedes.

Una dedicatoria muy especial para mi amada hija Ainhua porque también has sido parte de este doctorado trayendo a mi fuerza, templanza y seguridad.

Y también para mi yo de la infancia porque te atreviste a soñar y hoy puedo decirte
¡Lo hemos logrado!

Agradecimientos

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. por permitirme ser parte de su programa de doctorado y las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada número 246468.

A mis Co-directores de tesis, Dra. Minerva Concepción Maldonado García y al Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle, por dirigir esta tesis y todo el apoyo brindado.

A mi comité tutorial, Dr. Marco Cadena Roa por recibirme en su laboratorio y otorgarme todas las facilidades para la realización de los bioensayos, Dr. Juan Carlos Pérez Urbiola y Dra. María Ángeles Esteban Abad por sus aportaciones y consejos.

A los técnicos del CIBNOR, M. en C. Rene Rodolfo Rebollar Prudente, M. en C. Roberto Hernández Herrera, Lic. Francisco Javier Encarnación Ramírez, Dr. Marcos Fabián Quiñones Arreola, Jorge León Sandoval Soto, M. en C. Roxana Bertha Inohuye Rivera, Dra. Laura Carreón Palau e Ing Salvador Anwart Meza Jiménez, por su valiosa asesoría y ayuda.

A los técnicos de la Unidad Pichilingue, Elizabeth Bravo y Oscar Cano, por su invaluable ayuda en la realización de los bioensayos.

A los doctores José Antonio Godínez Estrada y Juan Manuel Pacheco Vega por su valiosa asesoría académica y aportaciones.

A él Dr. Deneb Maldonado García, catedrático CONACYT comisionado al CIBNOR por su asesoría académica en el análisis de resultados en mi posgrado y en la revisión de esta tesis.

Al personal de posgrado, Lic. Osvelia Ibarra por todo el apoyo otorgado, Tania Nuñez e Ing. Horacio Sandoval Gómez, por las facilidades otorgadas.

A mis compañeros y amigos por su gran cariño y apoyo, Eliza, Milton, Andressa, Edgar, Marcela, Mónica, Celene, Oswaldo, Roberto, Paola y Francisco.

Contenido

Resumen.....	i
Summary.....	iii
Dedicatoria.....	v
Agradecimientos.....	vi
Contenido.....	vii
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas.....	xi
Abreviaturas.....	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Microalgas	3
2.1.1 Generalidades	3
2.1.2 Microalgas como alimento y enriquecedor de presas vivas	5
2.1.3 Cepas de microalgas	7
2.1.3.1 Cepas <i>Chaetoceros</i> sp. (LPU-2) y <i>Chaetoceros</i> sp. (LPU-3)	7
2.1.3.2 Cepa <i>Schizochytrium</i> sp. LPU-1	10
2.2 Rotíferos.....	11
2.3 <i>Artemia</i>	13
2.4 Requerimientos nutricionales para larvas de peces.....	16
2.5 Biología del jurel <i>S. rivoliana</i>	17
2.5.1 Cultivo del género <i>Seriola</i>	19
2.5.2 Larvarios de <i>Seriola</i> spp.....	19
3. JUSTIFICACIÓN.....	22
4. HIPÓTESIS.....	24
5. OBJETIVOS.....	25
5.1 Objetivo general	25
5.2 Objetivos específicos	25
6. MATERIAL Y MÉTODOS	26
6.1 Agua de cultivo.....	26
6.2 Objetivo 1, Cultivo de microalgas.....	26
6.3 Objetivo 2, Cultivo de rotíferos	27
6.4 Objetivo 3, Cultivo de <i>Artemia</i>	28
6.5 Análisis bioquímicos.....	28
6.5.1 Lípidos totales	28
6.5.2 Proteínas totales	29
6.5.3 Carbohidratos.....	29
6.5.4 Ácidos grasos.....	30
6.6 Objetivo 4 Cultivo larvario de <i>S. rivoliana</i>	31
6.6.1 Cultivo de microalgas	31
6.6.2 Cultivo de rotíferos	31
6.6.2.1 Bioensayo de enriquecimiento de rotíferos	32

6.6.3 Larvario de jurel	32
6.7 Análisis estadístico.....	34
7. RESULTADOS	35
7.1 Objetivo 1, Cultivo de microalgas.....	35
7.1.1 Valor nutricional de las microalgas.....	36
7.2 Objetivo 2, Cultivo de rotíferos.....	37
7.2.1 Valor nutricional de rotíferos	41
7.3 Objetivo 3, Cultivo de <i>Artemia</i>	42
7.3.1 Valor nutricional de <i>Artemia</i>	44
7.4 Objetivo 4, Cultivo larvario de <i>S. rivoliana</i>	45
7.4.1 Enriquecimiento rotíferos	46
8. DISCUSIÓN	47
8.1 Objetivo 1	47
8.2 Objetivo 2.....	49
8.3 Objetivo 3.....	52
8.4 Objetivo 4.....	53
9. CONCLUSIONES	55
10. LITERATURA CITADA.....	56
11. ANEXOS.....	69

Lista de figuras

Figura 1. Esquema general de la utilización de microalgas en la piscicultura marina.....	6
Figura 2. Puntos de recolección de muestras para la obtención de cepas de microalgas.....	7
Figura 3. Fotografía de las cepas <i>Chaetoceros</i> sp. LPU-2 y LPU-3.....	8
Figura 4. Fotografía de la cepa <i>Schizochytrium</i> sp. LPU-1.....	11
Figura 5. Fotografía representativa de hembras adultas de rotíferos <i>Brachionus plicatilis</i>	12
Figura 6. Juvenil de <i>Artemia franciscana</i>	14
Figura 7. Distribución mundial de <i>S. rivoliana</i>	18
Figura 8. Huevos fertilizados de jurel <i>S. rivoliana</i>	20
Figura 9. Larva de <i>S. rivoliana</i> , 1 día después de la eclosión, el saco vitelino representa una gran proporción de la totalidad del cuerpo, los ojos están sin pigmentar, y el ano se encuentra cerrado, en esta etapa no existe alimentación exógena.....	20
Figura 10. Vista lateral y aérea del sistema experimental utilizado en el larvario de <i>S. rivoliana</i>	33
Figura 11. Densidad celular (cel mL^{-1}) de 3 cepas de microalgas, LPU-1: <i>Schizochytrium</i> sp., LPU:2 <i>Chaetoceros</i> sp. y LPU:3 <i>Chaetoceros</i> sp.....	35
Figura 12. Tasa de crecimiento (G d^{-1}) de 3 cepas de microalgas, LPU-1: <i>Schizochytrium</i> sp., LPU:2 <i>Chaetoceros</i> sp. y LPU:3 <i>Chaetoceros</i> sp.....	36
Figura 13. Densidad poblacional (ind mL^{-1}) de <i>B. plicatilis</i> alimentados con la cepa <i>Chaetoceros</i> sp. LPU-3.....	38
Figura 14. Densidad poblacional (ind mL^{-1}) de <i>B. plicatilis</i> alimentados con la cepa <i>Chaetoceros</i> sp. LPU-2.....	39
Figura 15. Densidad poblacional (ind mL^{-1}) de <i>B. plicatilis</i> alimentados con la mezcla de cepas <i>Chaetoceros</i> sp. LPU-2/ <i>Chaetoceros</i> sp. LPU-3.....	39
Figura 16. Densidad poblacional (ind mL^{-1}) de <i>B. plicatilis</i> alimentados con la cepa <i>Schizochytrium</i> sp. LPU-1.....	40
Figura 17. Densidad poblacional (ind mL^{-1}) de <i>B. plicatilis</i> alimentados con la mezcla de cepas <i>Schizochytrium</i> sp. LPU-1/ <i>Chaetoceros</i> sp. LPU-2.....	40
Figura 18. Longitud final media de cultivos de <i>Artemia</i> alimentadas con las cepas de microalgas <i>Schizochytrium</i> sp. LPU-1 y <i>Chaetoceros</i> sp. LPU-2.....	43
Figura 19. Imagen demostrativa de juveniles de <i>Artemia</i> en el día siete de cultivo alimentados con dos diferentes cepas de microalgas: a) <i>Chaetoceros</i> sp. LPU-2 y b) <i>Schizochytrium</i> sp. LPU-1.....	44

Lista de tablas

Tabla I. Especies y características de las microalgas más utilizadas en la piscicultura marina.....	4
Tabla II. Lista alfabética de las especies del género <i>Chaetoceros</i> reportadas para el Golfo de California.....	9
Tabla III. Crecimiento de <i>Artemia</i> reportado con diferentes especies de microalgas.....	15
Tabla IV. Tratamientos aplicados en el bioensayo de cultivo de rotíferos con microalgas endémicas.....	27
Tabla V. Análisis bioquímico y de ácidos grasos (%) de: <i>Schizochytrium</i> sp. (LPU-1), <i>Chaetoceros</i> sp. LPU-2 y <i>Chaetoceros</i> sp. LPU-3.....	37
Tabla VI. Tasa de consumo diario y de crecimiento poblacional de rotíferos <i>B. plicatilis</i> alimentados con diferentes microalgas (tratamientos).....	41
Tabla VII. Análisis bioquímico y de ácidos grasos (%) de rotíferos <i>B. plicatilis</i> alimentados con 5 tratamientos de microalgas.....	42
Tabla VIII. Análisis bioquímico y de ácidos grasos de <i>Artemia</i> cultivadas con 2 dietas. <i>Schizochytrium</i> sp. LPU-1 y <i>Chaetoceros</i> sp. LPU-2.....	45
Tabla IX. Parámetros fisicoquímicos de bioensayo con larvas de jurel.....	46
Tabla X. Análisis bioquímico de rotíferos enriquecidos.....	46

Abreviaturas

ω -3: Omega tres

°C: Grados centígrados

μ L: Microlitros

μ m: Micrómetro

ALA: Ácido linoleico

ARA: Ácido araquidónico

C₆H₁₂: Hexano

CO₂: Monóxido de carbono

cel: Células

CIBNOR: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Cm: Centímetros

CONAPESCA: Comisión Nacional de Pesca y Acuicultura

DHA: Ácido docosahexaenoico

EPA: Ácido eicosapentaenoico

FAME: Ácidos grasos metil esterificados

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

g: Gramos

H₂SO₄: Ácido sulfúrico

HCL:CH₃OH: Ácido clorhídrico metanólico

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia

Ind: Individuos

kg: Kilogramos

L: Litros

m: Metros

mg: Miligramos

mm: Milímetros

nm: Nanómetros

sp.: Especie

TCA Ácido tricloroacético

UABCS: Universidad Autónoma de Baja California Sur

1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura sigue creciendo más rápido que otros sectores de producción de alimentos registrando un crecimiento anual medio del 5,8% durante el período 2000-2016. La producción acuícola mundial en 2016 fue de 80,0 millones de toneladas entre peces, crustáceos, moluscos y otros animales acuáticos y 30,1 millones de toneladas de plantas acuáticas, así como 37 900 toneladas de productos no alimentarios (FAO, 2018). En relación con el cultivo de microalgas en 2016 la FAO (2018) registró 89 000 toneladas que habían sido cultivadas en 11 países en 2016; los géneros y especies reportados son *Spirulina* spp., *Chlorella* spp., *Haematococcus pluvialis* y *Nannochloropsis* spp., en una escala que va desde la producción de traspatio hasta la comercial a gran escala; esta actividad se ha consolidado en muchos países para la elaboración de complementos alimenticios humanos y otros usos.

En México la CONAPESCA (2013) reporta una producción nacional de algas y microalgas clasificadas como Egraria, *Spirulina* spp., *Eucheuma* spp., *Gelidium* spp., *Gigartinas* spp., Lechuguilla y algas pardas de 7842 toneladas provenientes de los estados de Baja California y Baja California Sur, lo que nos indica que el abanico de especies sujetas a explotación comercial es limitado. Para el caso particular de las microalgas marinas estas no figuran en la producción nacional, siendo que son de vital importancia en los criaderos de organismos acuáticos principalmente en las primeras etapas de desarrollo de crustáceos, peces y moluscos.

En este sentido es necesario realizar investigación para la diversificación de microalgas marinas con aplicación biotecnológica ya sea como alimento o materia prima para productos de alto valor comercial, como lo son los pigmentos y aceites.

Primeramente para este proyecto de tesis se trabajó con dos cepas del género *Chaetoceros* y una del género *Schizochytrium* aisladas de la Bahía de La Paz como posibles candidatas para el cultivo de rotíferos *Brachionus plicatilis* y *Artemia*, el objetivo fue determinar si las microalgas favorecen el crecimiento y mejoran el valor nutricional de las presas vivas (rotíferos y *Artemia*), cuantificando el contenido de lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos grasos. Con los resultados obtenidos en los bioensayos con presas vivas, se realizó el enriquecimiento de *B. plicatilis* con la cepa de *Chaetoceros* sp. (LPU-2), y se utilizó como alimento durante la ontogenia temprana del jurel *Seriola rivoliana*.

2. ANTECEDENTES

2.1 Microalgas

2.1.1 Generalidades

Las microalgas son un grupo enorme y diverso de microorganismos que comprende a eucariotas, fotoautótrofos, protistas y cianobacterias procariotas (algas verde-azules), estos microorganismos contribuyen a la mitad de la actividad fotosintética global y están presentes en prácticamente todos los nichos eufóticos (Anderson, 1996). Debido a esta diversidad las microalgas son clasificadas dependiendo de la composición de su pared celular, el tipo de clorofila, pigmentos accesorios, entre otras características (Carpenter, 1977; Hoff y Snell, 2001). Las tres clases más importantes de microalgas en términos de abundancia son las algas verdes (Chlorophyceae), las algas doradas (Chrysophyceae) y las diatomeas (Bacillariophyceae).

Además de ser el origen de la cadena alimenticia para más del 70% de la biomasa del mundo las microalgas contienen compuestos únicos y de gran valor que no se encuentran usualmente en plantas terrestres (Balduyck, 2015); entre los compuestos más importantes se encuentran polímeros, péptidos, ácidos grasos, carotenoides, toxinas y esteroides, estos compuestos tienen distintas aplicaciones en las que se incluyen la nutrición humana y animal, cosmética, farmacéutica, captura de CO₂, producción de bioenergía y remoción de nutrientes en las aguas de desecho (Domínguez, 2013).

En relación con la nutrición animal las microalgas son la base de la alimentación en los cultivos de moluscos, crustáceos y peces. A partir de la década de los 60, cientos de microalgas han sido probadas como alimento, pero probablemente menos de 20 especies han tenido un amplio uso en la acuicultura (Tabla I) (Brown, 2002; Duert *et al.*, 2001; Marshall *et al.*, 2010).

Tabla I. Especies y características de las microalgas más utilizadas en la acuicultura marina. Modificada de Hemaiswarya *et al.* (2011).

Alga/Género	Temperatura óptima	Morfología	Usos
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	25°C	24-29µm x 4-5 µm	Empleada en el enriquecimiento de zooplancton, (<i>Artemia</i>)
<i>Nannochloropsis oculata</i>	20-22°C	Pequeña alga verde de 2-3µm	Utilizada en el cultivo de rotíferos y en la larvicultura de peces (agua verde) con lo que se aumenta de la incidencia de alimentación mediante la mejora de contraste visual y dispersión de la luz.
<i>Pavlova lutheri</i>	18 °C	Flagelado dorado- marrón, de 4-6 µm	Se usa para aumentar los niveles de DHA / EPA en reproductores, su composición de esteroides la hace ser muy popular en criaderos de peces de agua fría (bacalao) para el enriquecimiento de rotíferos.
<i>Skeletonema costatum</i>	18°C	>20µm	Se utiliza en el enriquecimiento de zooplancton, y se aplica en los tanques, mejorando la incidencia de alimentación mediante la mejora de contraste visual.
<i>Dunaliella</i>	16°C	Flagelado verde de diámetro 17.8µm	Usada para incrementar los niveles de vitaminas y también para la coloración.
<i>Chlorella</i>	25°C	5µm	Empleadas en el enriquecimiento de zooplancton, como rotíferos y <i>Artemia</i> .
<i>Tetraselmis suecica</i>	18°C	Flagelado verde de 18.4µm	Se utiliza en conjunción con <i>Nannochloropsis</i> para la producción de rotíferos, posee buen tamaño para alimentar <i>Artemia</i> .
<i>Isochrysis galbana</i>	20°C	Flagelado dorado- marrón de 10.2µm	Empleada en el enriquecimiento de zooplancton (<i>Artemia</i>).
<i>Thalassiosira weissflogii</i>	10-20°C	Diatomea de diámetro inicial 23-26 µm	Considerada como la mejor microalga para alimentar copépodos y artemias.
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	18-22°C	Diatomea dorada-marrón de 6-8µm	Para el enriquecimiento de zooplancton: rotíferos y <i>Artemia</i>

2.1.2 Microalgas como alimento y enriquecedor de presas vivas

Para que una especie de microalga sea considerada apta como alimento esta debe de poseer un número de atributos claves como lo son: el tamaño y forma de la célula, una fácil ingestión y digestión, la composición bioquímica y la ausencia de toxinas (Brown, 2002). La calidad nutricional de las microalgas depende principalmente de los constituyentes bioquímicos que las componen, por lo tanto, no es de sorprender que los porcentajes de proteínas, carbohidratos y lípidos han sido ampliamente estudiados (Brown, 2002; Helm y Bourne, 2006; Knauer y Southgate, 1999; Ponis *et al.*, 2006).

Cuando existe una elevada disponibilidad de microalgas de alta calidad, estas pueden ser usadas como una excelente fuente de alimento, e incrementar el contenido de lípidos en zooplancton (ej. rotíferos) (Duert *et al.*, 2001).

Se ha documentado que la combinación de diferentes especies de microalgas como dieta provee un balance nutricional y mejora el crecimiento animal comparado con una dieta compuesta de una sola especie de microalga (Spolaore *et al.*, 2006). Con el propósito de ser usada en acuicultura, una cepa microalgal debe de cumplir ciertos criterios, como lo es, facilidad en su cultivo, ausencia de toxicidad, alto valor nutricional con el correcto tamaño de célula y forma para que dichos nutrientes sean disponibles (Patil *et al.*, 2007; Raja *et al.*, 2004) el contenido de proteínas y vitaminas es el principal factor para determinar el valor nutricional de una microalga, así como también el contenido de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (PUFA, por sus siglas en inglés) es de relevancia cuando hablamos de nutrición de organismos marinos.

Los PUFAs derivados de microalgas (ej. Ácido docosahexaenoico (DHA), ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido α -linoleico (ALA) y ácido araquidónico (ARA) son conocidos por ser esenciales para varias larvas (Sargent *et al.*, 1997). El contenido de ácidos grasos muestra diferencias sistemáticas de acuerdo a su grupo taxonómico, aunque hay ejemplos de diferencias significativas entre

microalgas de la misma clase. La mayoría de las especies de microalgas posee un porcentaje moderado a alto (7-34%) de EPA. LAS *Prymnesiofitas* (*Pavlova* sp., *Isochrysis* sp. y *Cryptomonas* sp.) son relativamente ricas en DHA (0.2-11%) mientras que *Eustigmatofitas*, *Nannochloropsis* spp. y diatomeas poseen el porcentaje más alto de AA (0-4%). *Clorofitas*, como *Dunaliella* sp. y *Chlorella* sp. son deficientes en DHA y ARA, aunque algunas especies tienen pequeñas cantidades (3.2%) de EPA (Brown, 2002).

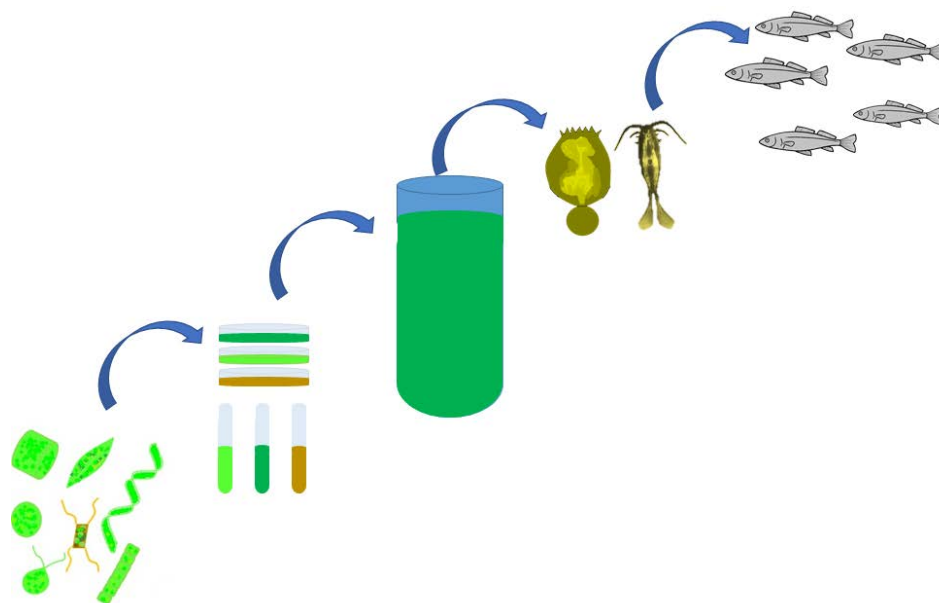


Figura 1. Esquema general de la utilización de microalgas en la piscicultura marina. Las especies provienen de aislados del medio marino, para después ser cultivadas, y ofrecidas como fuente de nutrientes para el alimento vivo, y que estos a su vez, los traspasen a los peces.

Los géneros de microalgas más frecuentemente usados son *Chlorella*, *Tetraselmis*, *Isochrysis*, *Chaetoceros*, *Skeletonema* y *Thalassiosira*, entre otros (Tabla I), dos de las especies evaluadas en este estudio son diatomeas que pertenecen al género *Chaetoceros* y una más al género *Schizochytrium*.

2.1.3 Cepas de microalgas

Las cepas *Schizochytrium* sp. (LPU-1), *Chaetoceros* sp. (LPU-2) y *Chaetoceros* sp. (LPU-3) evaluadas en este estudio y que forman parte de la colección del Laboratorio de Microalgas de la Universidad Autónoma de Baja California Sur (UABCS) provienen de muestras colectadas en tres puntos de la Bahía de La Paz, Baja California Sur, México en las áreas indicadas en la figura 2, posterior a la colecta de muestras estas fueron procesadas para el aislamiento de las cepas empleándose las técnicas de micropipeta, estriado en agar, aspersión directa en agar y diluciones seriadas.



Figura 2. Puntos de recolección de muestras para la obtención de cepas de microalgas.

2.1.3.1 Cepas *Chaetoceros* sp. (LPU-2) y *Chaetoceros* sp. (LPU-3)

Las microalgas del género *Chaetoceros* son diatomeas pardo-doradas con un exoesqueleto silíceo o frústula. Las diatomeas pueden ser unicelulares, asociadas en cadenas o embebidas en masas mucilaginosas. Poseen la capacidad de habitar cualquier ambiente acuático o semiacuático que esté expuesto a la luz. Su talla varía entre 2 a 2,000 μm . Sus cloroplastos presentan lamelas con tres tilacoides, tienen clorofilas a, c_1 y c_2 así como el carotenoide pardo-dorado,

fucoxantina. Almacenan crisolaminarina y aceites. Las diatomeas se reproducen preferentemente de manera asexual por fisión binaria, en la que después de llevar a cabo varios procesos, como lo son: la mitosis, la citoquinesis y la formación de la hipoteca en cada valva, se lleva a cabo la bipartición. Este proceso involucra, en la mayoría de los casos, una reducción sucesiva de tamaño en una de las células hijas en cada división. Otras pueden mantener un tamaño constante debido a la plasticidad de su pared celular o a la de su cingulo; aunque, algunas pueden abandonar su frústula y regenerar una más grande. Sin embargo, la restitución de su tamaño se obtiene por reproducción sexual (Hasle *et al.*, 1996).

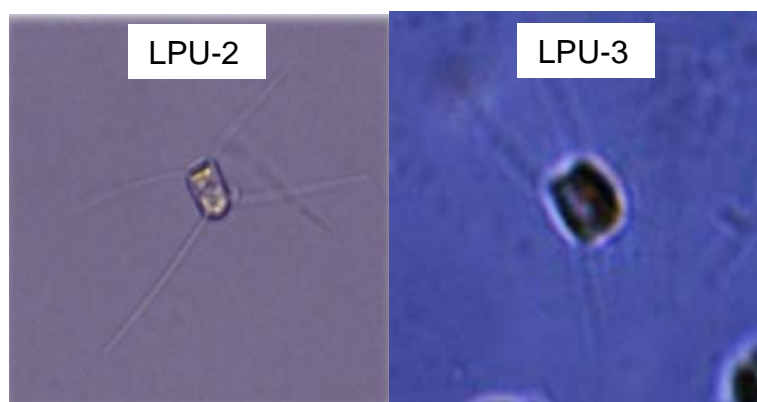


Figura 3. Fotografías de las cepas *Chaetoceros* sp. LPU-2 y LPU-3.

En el Golfo de California se han llevado a cabo diversos estudios ecológicos relacionados con las diatomeas marinas, debido a que este grupo de microalgas juega un papel importante en la trama trófica y como productores primarios. Moreno *et al.* (1996) reportaron 418 taxa (especies, variedades y formas) (Tabla II), de los cuales 50 especies corresponden al género *Chaetoceros*, la mayoría de las especies reportadas no son sujetas de explotación, por lo que existe un alto potencial para el aprovechamiento de ellas ya que se ha reportado que son fuente rica de PUFAs como EPA y DHA (Lora-Vilchis y Voltolina, 2003).

Tabla II. Lista alfabética de las especies del género *Chaetoceros* reportadas para el Golfo de California. Se indica la especie, el autor y el año de publicación de cada especie. Modificado de Moreno *et al.* (1996).

Especie	Autor y año de publicación
<i>Chaetoceros affinis</i>	Lauder 1864.
<i>Chaetoceros affinis</i> var. <i>circinalis</i> (Meunier)	Hustedt 1930.
<i>Chaetoceros affinis</i> var. <i>willei</i> (Gran)	Hustedt 1930.
<i>Chaetoceros atlanticus</i> var. <i>atlanticus</i> .	Cleve 1873
<i>Chaetoceros atlanticus</i> var. <i>neapolitana</i> (Schröder)	Hustedt 1930.
<i>Chaetoceros atlanticus</i> f. <i>audax</i> (Schütt)	Gran 1904.
<i>Chaetoceros bermejensis</i>	Hernández-Becerril 1991.
<i>Chaetoceros brevis</i>	Schütt 1895.
<i>Chaetoceros cinctus</i>	Gran 1897.
<i>Chaetoceros coarctatus</i>	Lauder 1864.
<i>Chaetoceros compressus</i>	Lauder 1864.
<i>Chaetoceros concavicornis</i>	Mangin 1917.
<i>Chaetoceros constrictus</i>	Gran 1897.
<i>Chaetoceros convolutus</i>	Castracane 1886.
<i>Chaetoceros costatus</i>	Pavillard 1911.
<i>Chaetoceros curvisetus</i>	Cleve 1889.
<i>Chaetoceros danicus</i>	Cleve 1889.
<i>Chaetoceros debilis</i>	Cleve 1894.
<i>Chaetoceros debilis</i> f. <i>decipiens</i> .	Cleve 1873
<i>Chaetoceros densus</i> (Cleve)	Cleve 1901.
<i>Chaetoceros diadema</i> (Ehrenberg)	Gran 1897.
<i>Chaetoceros dictyota</i>	Ehrenberg 1844.
<i>Chaetoceros didymus</i> var. <i>didymus</i> .	Ehrenberg 1845
<i>Chaetoceros didymus</i> var. <i>protuberans</i> (Lauder)	Gran y Yendo 1914.
<i>Chaetoceros difficilis</i>	Cleve 1900.
<i>Chaetoceros diversus</i>	Cleve 1873.
<i>Chaetoceros diversus</i> morfotipo <i>laevis</i> (Leuduger-Fortmorel)	Moreno-Ruiz <i>et al.</i> , 1993.
<i>Chaetoceros eibonii</i>	Grunow <i>in</i> Van Heurck 1882.
<i>Chaetoceros gracilis</i>	Schütt 1895.
<i>Chaetoceros holsaticus</i>	Schütt 1895.
<i>Chaetoceros lacinosus</i>	Schütt 1895.
<i>Chaetoceros lorenzianus</i> f. <i>lorenzianus</i>	Grunow 1863.
<i>Chaetoceros lorenzianus</i> f. <i>forceps</i>	Meunier 1913.
<i>Chaetoceros messanensis</i>	Castracane 1875.
<i>Chaetoceros pelagicus</i>	Cleve 1873.

Especie	Autor y año de publicación
<i>Chaetoceros pendulus</i>	Karsten 1905.
<i>Chaetoceros perpusillus</i>	Cleve 1897.
<i>Chaetoceros peruvianus</i> f. <i>peruvianus</i>	Brightwell 1856
<i>Chaetoceros pseudocurvisetus</i>	Mangin 1910.
<i>Chaetoceros radicans</i>	Schütt 1895.
<i>Chaetoceros rectus</i>	Hernández-Becerril 1992.
<i>Chaetoceros rostratus</i>	Lauder 1864.
<i>Chaetoceros seiracanthus</i>	Gran 1897.
<i>Chaetoceros simplex</i>	Ostenfeld 1901.
<i>Chaetoceros socialis</i>	Lauder 1864.
<i>Chaetoceros teres</i>	Cleve 1896.
<i>Chaetoceros tetrastichon</i>	Cleve 1897.
<i>Chaetoceros tortissimus</i>	Gram 1900.
<i>Chaetoceros vanheurckii</i>	Gran 1900.
<i>Chaetoceros vistulae</i>	Apstein 1909.
<i>Chaetoceros wighamii</i>	Brightwell 1856

2.1.3.2 Cepa *Schizochytrium* sp. LPU-1

Schizochytrium es un microorganismo esférico unicelular, que se caracteriza por la presencia de una red de ectoplasma; este ectoplasma puede presentarse en diversos estadios como zoospora biflagelada, aplanospora y células ameboides. El rango de tamaño es de 10-20 μm , además la célula madura puede dividirse por fisión binaria o formar diadas, tétradas y clusters. Cada célula de *Schizochytrium* puede desarrollar dentro de ella un esporangio que produce varias zoosporas (Hakim, 2012; Kamlangdee y Fan, 2003).

Schizochytrium es otro de los microorganismos que ha tomado gran importancia a nivel industrial para ser usado como suplemento alimenticio ya que puede llegar a presentar hasta un 37% de DHA y un 16% de EPA, estos han sido objeto de estudios debido a los efectos benéficos observados en el tratamiento contra la arterioesclerosis, cáncer y artritis reumatoide (Hakim, 2012), además ha cobrado importante interés en la alimentación animal principalmente en la acuicultura donde está siendo utilizado como potencial reemplazo de aceite de pescado (Sarker *et al.*, 2016).

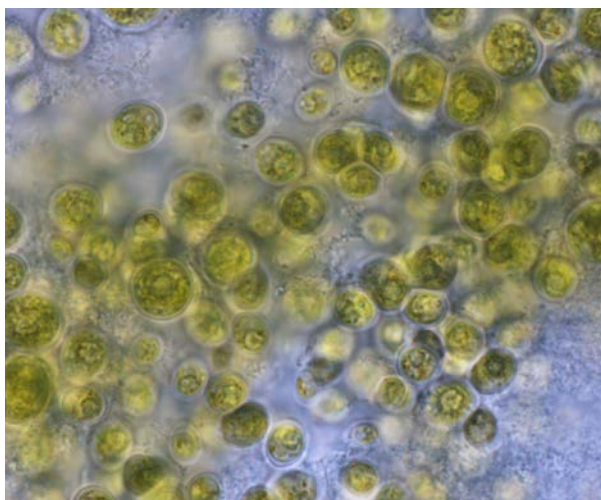


Figura 4. Fotografía de la cepa *Schizochytrium* sp. LPU-1. Tomada de Hernández-Rubio (2015).

2.2 Rotíferos

El rotífero eurihalino *Brachionus plicatilis*, es un organismo cíclico partenogenético, que aparece normalmente en lagos de agua salada y lagunas costeras. Dado su corto tiempo de generación y su fácil cultivo en condiciones controladas, *B. plicatilis* es ampliamente utilizado como alimento vivo para larvas de peces, camarones y cangrejos (Lubzens *et al.*, 2001).

Diversos estudios han revelado que *B. plicatilis* es un complejo de al menos tres especies simpátricas hermanas *B. plicatilis stricto sensu*, *B. rotundiformis* y *B. ibericus* (Ciros-Pérez *et al.*, 2001; Ortells *et al.*, 2003), entre ellas *B. plicatilis sensu stricto*, se utiliza como presas vivas en acuicultura (Øie *et al.*, 2011), y se considera de alta importancia en la larvicultura de peces marinos (Dehasque *et al.*, 1998), esto se debe a que son organismos filtradores y pueden acumular en su sistema digestivo nutrientes que son necesarios para las larvas de peces; además se les puede cultivar con una gran variedad de alimentos.



Figura 5. Fotografía representativa de hembras adultas de rotíferos *Brachionus plicatilis*, la de la izquierda presenta un quiste.

Las microalgas de los géneros *Chlorella*, *Nannochloropsis*, y *Tetraselmis*, se han utilizado a menudo, como alimento exclusivo en el cultivo *B. plicatilis* (Lubzens *et al.*, 1997) a largo plazo y corto plazo (enriquecimiento), y se ha diversificado con más especies *Chaetoceros muelleri*, *Isochrysis galbana*, *Dunalliella salina*, *Pavlova* sp. (Ortega-Salas *et al.*, 2013; Rehberg-Haas *et al.*, 2015).

Alimentos como las algas deshidratadas y los formulados también se utilizan en el cultivo de *B. plicatilis*. Sin embargo, estas fuentes son inadecuadas para el mantenimiento de los cultivos de rotíferos a largo plazo (Lubzens *et al.*, 1989, 2001), lo anterior se puede deber a que los desechos de los alimentos inertes (alimento no consumido) favorecen la proliferación de microorganismos perjudiciales.

Actualmente se trabaja en buscar nuevas fuentes de alimentación usando microalgas congeladas, microalgas floculadas, cepas locales, detritus de macroalgas (Hee-Bae y Bum-Hur, 2011; Rojo-Cebreros *et al.*, 2016; Seychelles *et al.*, 2009; Yin *et al.*, 2013) con el fin de abastecer las necesidades de acuerdo a la región y tipo de cultivo.

A nivel comercial el enriquecimiento de los rotíferos se efectúa mediante emulsiones ricas en lípidos, que ayudan a incrementar el contenido de PUFAs, la problemática con este tipo de enriquecedores son las condiciones higiénicas del agua de cultivo después de suministrar los rotíferos, ya que estos transportan residuos de las emulsiones que se quedan adheridas a la pared del cuerpo, lo que

contribuye a la aparición de microorganismos indeseados, además de intervenir en el intercambio gaseoso tanque/ambiente, lo que repercute negativamente en el desempeño de las larvas principalmente cuando la larva necesita tomar aire del ambiente para llenar la vejiga natatoria.

2.3 *Artemia*

Artemia franciscana es un crustáceo de la clase Branchiopoda, habita en cuerpos de agua hipersalinos y se considera un filtrador obligado, continuo y no selectivo (Gelabert y De la Cruz, 1990) debido a estas características biológicas *Artemia* puede ser alimentada con una variedad de alimentos como microalgas, microencapsulados y productos de desecho de la industria (Lavens y Sorgeloos, 1991) y probablemente es el zooplancton más importante y de más uso en la acuicultura, debido a que los quistes son fácilmente adquiridos y eclosionados (Treece, 2000) además de su versatilidad como fuente de alimento en los cultivos de larvas de ambientes marinos por ejemplo, como nauplio recién eclosionado es usado en la alimentación de peces marinos de interés comercial como *Lates calcarifer*, *Seriola lalandi*, *Gadus morhua* (Fehér *et al.*, 2013; Rocha *et al.*, 2017; Woolley *et al.*, 2012) y en estado juvenil y adulto se utiliza en los cultivos de algunos crustáceos y cefalópodos como la langosta *Homarus americanus*, el langostino *Macrobrachium americanum*, el pulpo *Octopus vulgaris* (Conklin, 1995; Iglesias *et al.*, 2007; Méndez-Martínez *et al.*, 2018; Seixas *et al.* 2008; Tlustý *et al.*, 2005) por mencionar algunos. Uno de los factores que destaca el valor nutricional de *Artemia*, radica en la composición de ácidos grasos insaturados de cadena larga de la serie ω -3, Malpica *et al.* (2004) y que puede variar de acuerdo a la etapa de su ciclo de vida, así como también influye la fuente de alimentación.

En cuanto a los alimentos utilizados para su cultivo, las microalgas empleadas y recomendadas para la alimentación de *Artemia*, son: *Tetraselmis suecica*, *Dunaliella salina* y *Chlorella vulgaris* de las algas verdes y *Chaetoceros* sp. e *Isochrysis* sp. de las algas pardas (Castro *et al.*, 2001), en la tabla III se presenta a más detalle las especies de microalgas utilizadas en diversos trabajos de

investigación. 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 (Lavens y Sorgeloos, 1996).

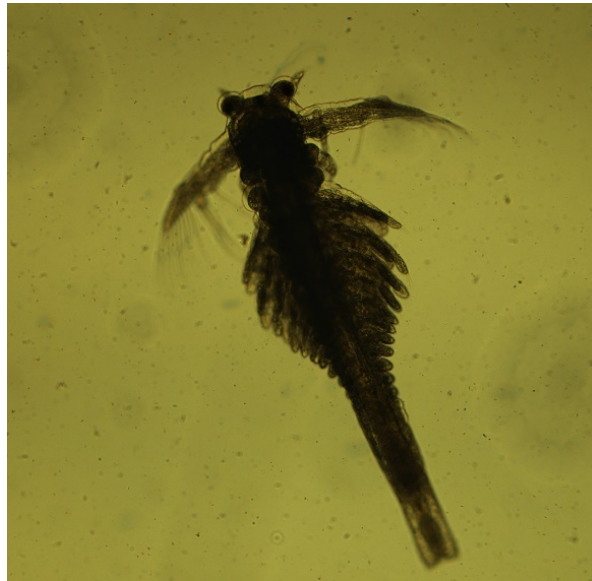


Figura 6. Juvenil de *Artemia franciscana*.

Tabla III. Crecimiento de *Artemia* reportado con diferentes especies de microalgas. Modificado de Seixas *et al.*, (2008).

Autores	Especies de microalgas usadas para alimentar <i>Artemia</i> sp.	Método de cultivo y concentración de nutrientes	Temperatura y días de cultivo	Mejor dieta a base de microalgas	Longitud de <i>Artemia</i> sp.
Sick (1976)	Cinco especies probadas: <i>Chlamydomonas sphagnicola</i> , <i>Dunaliella viridis</i> , <i>Chlorella conductrix</i> , <i>Platymonas elliptica</i> , <i>Nitzschia closterium</i>	Cultivo batch, cosecha a las 120 h de iniciado el cultivo	25 °C 16 días	<i>C. sphagnicola</i> <i>D. viridis</i>	1.8 mm (día 6) 8.9 mm (día 16) 2.9 mm (día 6) 5.7 mm (día 16)
Abreu-Grobois <i>et al.</i> (1991)	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Cultivo batch, cosecha no más allá del día 5	28 °C 14 días		10.0 mm (día 14)
Gamallo (1992)	Seis especies probadas: <i>Tetraselmis suecica</i> , <i>Phaeodactylum tricornutum</i> , <i>Dunaliella tertiolecta</i> , <i>Isochrysis galbana</i> Parke, <i>Nannochloris atomus</i> , <i>Nitzschia acicularis</i>	Cultivo batch Medio ALGAL 2 mM N L ⁻¹	25 °C 23 días	<i>T. suecica</i> <i>D. tertiolecta</i>	4.6 mm (día 8) 4.4 mm (día 8)
Fábregas <i>et al.</i> (1996)	<i>Tetraselmis suecica</i>	Cultivo semicontinuo con una tasa de recambio diario del 50% Medio ALGAL 8 mmol N L ⁻¹	25 °C 19 días		8.3 mm (día 19)
Evjemo y Olsen (1999)	<i>Isochrysis galbana</i> T-ISO	Cultivo semicontinuo Medio F/2	26-28 °C 12 días		3.3 mm (día 6) 5.9 mm (día 12)
García-Ulloa <i>et al.</i> (1999)	<i>Tetraselmis suecica</i> , <i>Chaetoceros calcitrans</i> , <i>Spirulina</i> sp. (seca)	Cultivo semicontinuo, cosecha diaria de un volumen parcial Medio F/2	25.5± 2.5°C 10 días	<i>T. suecica</i> <i>Spirulina</i> sp. (seca)	2.1 mm (día 6) 4.9 mm (día 10) 3.2 mm (día 6) 4.7 mm (día 10)
Naegel (1999)	<i>Chaetoceros</i> sp.	No reportado	25.0± 0.2°C 11 días		2.0 mm (día 6) 4.6 mm (día 11)
Thinh <i>et al.</i> (1999)	Trece especies de microalgas del trópico australiano (bénticas y planctónicas)	Cultivo batch, cosecha en la fase logarítmica Medio F	25 °C 7 días	<i>Cryptomonas</i> sp. <i>Chaetoceros</i> sp. <i>Tetraselmis</i> sp. <i>Cryptomonas</i> sp. <i>Chaetoceros</i> sp.	0.92 (día 1) 0.89 (día 1) 0.88 (día 1) 6.5 mm (día 7) 5.5 mm (día 7)
Godínez <i>et al.</i> (2004)	<i>Tetraselmis suecica</i> <i>Chaetoceros muelleri</i>	Cultivo semicontinuo, cosecha diaria de un volumen parcial Medio F/2	25±1 °C 10 días	<i>T. suecica</i> <i>C. muelleri</i>	4.5 mm (día 10) 3.7 mm (día 10)
Lora-Vilchis <i>et al.</i> (2004)	<i>Chaetoceros muelleri</i> , <i>Isochrysis galbana</i> T-ISO	Cultivo semicontinuo con una tasa de recambio diario del 25% Medio F	27.5± 0.5°C 7 días	<i>C. muelleri</i> <i>I. galbana</i> T-ISO	6.0 mm (día 7) 4.2 mm (día 7)
Marques <i>et al.</i> (2004)	<i>Dunaliella tertiolecta</i> (dos cepas: 19/6B; 19/27) <i>Tetraselmis suecica</i> (dos cepas: 66/4; 66/22a)	Cultivo batch, cosecha a la mitad de la fase exponencial y estacionaria de crecimiento. Medio Walne	28 °C 6 días	<i>T. suecica</i> 66/4 <i>T. suecica</i> 66/22A <i>D. tertiolecta</i> 19/6B	3.5 mm (día 6) 4.0 mm (día 6) 3.2 mm (día 6)
Seixas <i>et al.</i> (2008).	<i>Tetraselmis suecica</i> , <i>Rhodomonas lens</i> , <i>Nannochloropsis gaditana</i> , <i>Isochrysis galbana</i> Parke	Cultivo semicontinuo con una tasa de recambio diario del 30% Nutrientes saturados (2 ó 4 mM N L ⁻¹)	26.5± 0.5°C 5 y 8 días	<i>R. lens</i>	3.6 mm (día 5) 4.9 mm (día 8)
Pacheco-Vega <i>et al.</i> (2015)	<i>Chaetoceros muelleri</i> , <i>Schizochytrium</i> sp., <i>Grammatophora</i> sp., <i>Navicula</i> sp., <i>Rhabdonema</i> sp., <i>Nitzschia</i> sp.	Cultivo batch Medio F/2	Entre 18.6 y 31.9 °C 12 días	<i>Schizochytrium</i> sp.	4.75 mm (día 12)

2.4 Requerimientos nutricionales para larvas de peces

La eficacia de la suplementación nutricional del alimento vivo para las larvas de peces ha sido un desafío en el cultivo de peces marinos (Palmtag *et al.*, 2006). El adecuado suministro nutricional es crítico para el desarrollo embrionario y metamorfosis de los peces (Watanabe y Kiron, 1994). Antes de la primera alimentación, el saco vitelino es la principal fuente de nutrientes para las larvas de peces (Sarasquete *et al.*, 1996), todas estas reservas se derivan de los reproductores. La primera alimentación es un periodo crítico para las larvas, por el riesgo potencial de morir de inanición cuando el alimento no está disponible (Watanabe y Kiron, 1994). Por tanto, la calidad y cantidad del alimento rige el éxito del cultivo larval.

Los PUFAs como el EPA, DHA y ARA, juegan un papel muy importante en el crecimiento, supervivencia y resistencia al stress en la mayoría de larvas de peces marinos (Bell y Sargent, 2003; Faulk y Holt, 2003; Watanabe, 1993).

Los requerimientos para EPA, DHA y ARA en peces marinos han sido cuantificados en diversos trabajos, (Bell y Sargent, 2003; Faulk *et al.*, 2005; Hamre *et al.*, 2002), enfocados principalmente en las especies de explotación comercial.

El contenido de DHA juega un papel importante en la estructura y funciones de la membrana neural (Copeman *et al.*, 2002), el requerimiento de este ácido graso varía entre las especies de peces. Más y más evidencia sugiere que la proporción de DHA/EPA puede ser utilizada como un índice para determinar los niveles óptimos de ambos ácidos grasos, para el crecimiento y desarrollo en las larvas (Koven *et al.*, 1993; Tocher *et al.*, 1997). La abundancia de DHA y EPA en la membrana celular se utiliza como la principal fuente de energía para absorber vitaminas liposolubles (A, D, E, y K) y como precursores para hormonas prostaglandinas (Sargent *et al.*, 1999a, b), las cuales juegan un papel importante en la respuesta inflamatoria.

La escasez o exceso de EPA y DHA en la dieta puede afectar la supervivencia y favorecer la aparición de malformaciones en las larvas (Sargent *et al.*, 1999b). Debido a la baja actividad de las enzimas esenciales (Bell y Sargent, 2003), la

mayoría de las larvas de peces marinos, pierden la capacidad para convertir ácidos grasos de cadena corta a ácidos grasos de cadena larga, y llevar a cabo las actividades fisiológicas cotidianas.

En la acuicultura se han desarrollado protocolos de alimentación para que las larvas obtengan los nutrientes adecuados, a través de microalgas, rotíferos, copépodos, artemias y alimento artificial.

Por ejemplo, un protocolo para jurel *S. rivoliana*, incluye rotíferos enriquecidos *Brachionus plicatilis* desde el cuarto día después de la eclosión (DAH por sus siglas en inglés) ($10-15$ rotíferos mL^{-1}) y de nauplios de *Artemia* enriquecidos a partir del 12 DAH, alternando con los rotíferos, posterior a la etapa de alimentación con presas vivas, se ofrece alimento inerte de manera gradual hasta que ya no es necesario el alimento vivo, a esta fase se le conoce como destete, que puede comenzar a los 20 DAH e incluso antes, dependiendo del estado fisiológico de las larvas.

2.5 Biología del jurel *S. rivoliana*

El jurel es un carángido pelágico de amplia distribución, agrupado en el género *Seriola*, estos peces son muy apreciados en la cocina japonesa, china, coreana y europea en donde se consume crudo como “sashimi” y “sushi”, o marinado “teriyaki”. Las especies de este género se encuentran en todos los mares templados y subtropicales del mundo (Fig. 7) a profundidades entre 20 a 70 m, alcanzando tallas máximas de 180 cm y 80 kg de peso.

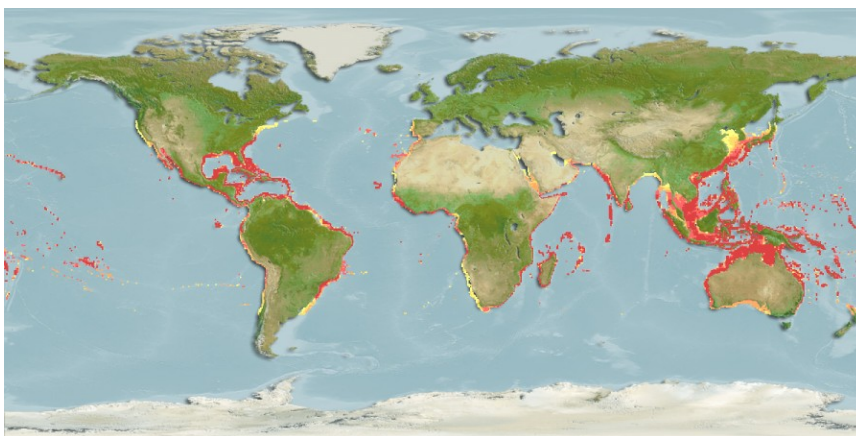


Figura 7. Distribución mundial de *Seriola rivoliana*. Fuente: FishBase. www.aquamaps.org

Los peces del género *Seriola* son carnívoros depredadores, su dieta se compone principalmente de peces (Barreiros *et al.*, 2003), y en menor medida moluscos, crustáceos y equinodermos. Ya que estas especies presentan una buena tasa de crecimiento en cautiverio, el cultivo de jurel en Japón constituye una de las empresas de acuicultura más exitosa, superando en mucho la producción acuícola de otras especies y de la misma pesquería de las poblaciones (Cardona-Pascual, 1993; FAO, 2000), dichas explotaciones dependen del suministro de juveniles del medio natural.

En México la captura de *S. dorsalis*, *S. rivoliana* y *S. lalandi* (comúnmente llamados medregal, jurel de castilla, jurel de aleta amarilla), se lleva principalmente en Baja California y Baja California Sur, aportando el 64 % de la pesca de estas especies (Rodríguez de la Cruz *et al.*, 1994).

El jurel *S. rivoliana* se caracteriza por tener un cuerpo alargado, levemente comprimido y moderadamente alto. La coloración del pez es bastante variable, posee dorso marrón o aceitunado; flancos y vientre más claros; en adultos es visible una franja oscura vertical en la nuca y una franja lateral oscura, que se extiende hacia atrás y hacia arriba a partir del ojo (Espinoza *et al.*, 2009).

Actualmente en el CIBNOR se están estudiando diversos temas con la especie *S. rivoliana* como: la maduración en cautiverio, estrategia reproductiva, calidad bioquímica de huevos y larvas, cultivos larvarios, producción de juveniles y

sanidad con el fin de fortalecer el conocimiento de la biotecnología de esta especie para fines acuícolas.

2.5.1 Cultivo del género *Seriola*

Dentro del género *Seriola* existen 47 especies (FAO, 2002), de las cuales las más producidas y pescadas a nivel mundial son: *Seriola quinqueradiata*, *Seriola dumerili* y *Seriola lalandi*. El jurel *Seriola rivoliana* se considera actualmente como una de las especies emergentes más importantes de peces marinos para cultivo en Japón, Australia y Estados Unidos. En México esta especie ha despertado interés para ser cultivada; como en toda nueva especie que se desea producir en piscicultura marina, la obtención de juveniles para engorda continúa siendo una grave problemática para el desarrollo del cultivo.

Para las especies *S. quinqueradiata*, *S. dumerili* y *S. lalandi*, se han desarrollado protocolos para la reproducción y cría de larvas (Benetti, 2000; Nakada, 2002; Papandroulakis *et al.*, 2005; Poortenaar *et al.*, 2001), pero para *S. rivoliana* no existe un protocolo de reproducción, en términos de condiciones de cultivo, maduración y uso de hormonas, además, los estudios de cría de larvas de esta especie son escasos y limitados a algunos informes en Ecuador (Benetti, 1997; Blacio *et al.*, 2003), Hawaii (Laidley *et al.*, 2004) e Islas Canarias (Roo *et al.*, 2014). Por todo lo anterior se requiere ampliar el conocimiento en cuanto al cultivo larvario del jurel.

2.5.2 Larvarios de *Seriola* spp.

Las larvas de *Seriola* sp. presentan rápido crecimiento en comparación con otras especies, por ejemplo, espáridos como el sargo y la dorada. Los huevos son relativamente grandes, poseen un diámetro de 1,1 mm, y las larvas en la primera alimentación tienen una longitud de 4,5 mm (Kolkovski, sin publicar).

Para el caso particular de *S. rivoliana*, los huevos miden entre 0.97-1.1 mm huevos y 3.4 mm para las larvas a 1 día después de la eclosión (Figs. 8 y 9).

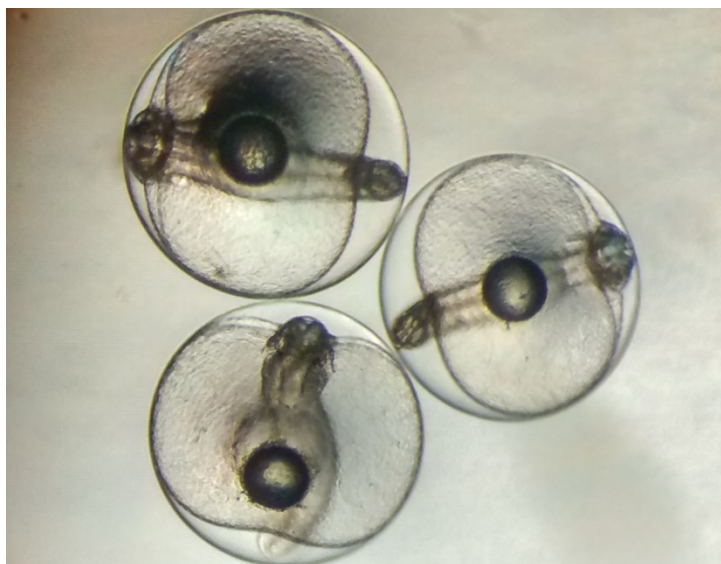


Figura 8. Huevos fertilizados de jurel *S. rivoliana*.

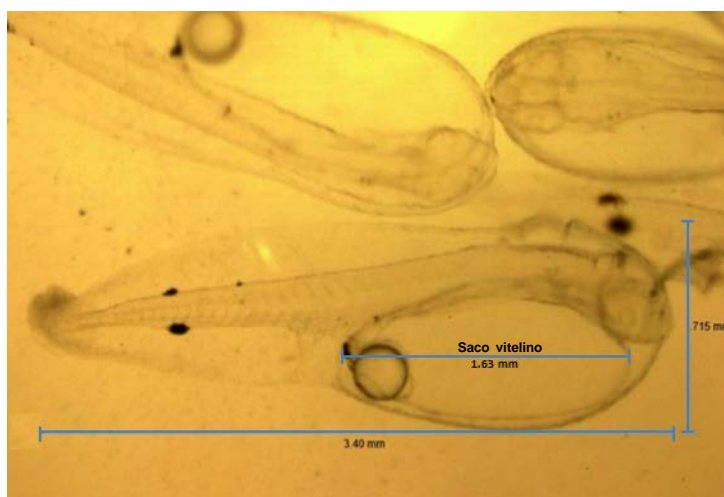


Figura 9. Larva de *S. rivoliana*, un día después de la eclosión. El saco vitelino representa una gran proporción de la totalidad del cuerpo, los ojos están sin pigmentar, y el ano se encuentra cerrado, en esta etapa no existe alimentación exógena.

Generalmente, existen dos picos de mortalidad durante el proceso de la producción de juveniles de *Seriola* sp. La primera es conocida como “periodo crítico” presentándose altas mortalidades desde la eclosión hasta la primera alimentación, el otro es causado por el canibalismo en las etapas juveniles (Sakakura y Tsukamoto *et al.*, 1999; Yamazaki *et al.*, 2002). Las problemáticas

anteriores están directamente relacionadas con los requerimientos nutricionales de la especie, ya que, al no cubrirlos, desencadena la muerte o el canibalismo.

3. JUSTIFICACIÓN

En el cultivo de peces marinos, uno de los factores limitantes es la obtención y producción de alimentos que cubran todos los requerimientos para las especies de interés a cultivar y que a su vez resulten costeables a nivel comercial. El alimento vivo como el fitoplacton (microalgas) y el zooplancton (rotíferos, *Artemia*, etc) es esencial durante el desarrollo larvario de los peces. En la actualidad la investigación orientada hacia los microorganismos como fuente de alimentación es de gran importancia y está en pleno desarrollo. Debido el interés que existe por la acuicultura en Latinoamérica, el Caribe, y principalmente en México, dirigido principalmente a las especies de importancia comercial de peces, moluscos y crustáceos en condiciones controladas para la producción y alta supervivencia de semillas en sistemas de cultivo semi-intensivo e intensivo, se hace necesario el conocer las diferentes alternativas de producción de alimento vivo a gran escala, ya que es difícil sustituir el alimento natural, pues las dietas artificiales generalmente provocan altas mortalidades por deficiencias nutricionales cuando no están balanceadas. Por otra parte, en la última década se ha tratado de sustituir los alimentos vivos por dietas microencapsuladas o por técnicas que permitan el almacenamiento por congelado o liofilización por tiempo indefinido de estos alimentos y en términos generales no resuelven el problema real que es la demanda constante de alimento vivo y resultan incosteables.

En México, principalmente en la región Noroeste del País, el cultivo de peces marinos va en aumento, así como el interés de las empresas locales en producir mayor cantidad de alimento vivo que aporte un valor nutricional a la larva y que además facilite la producción masiva en el exterior, en una zona tropical con temperaturas fluctuantes con rangos de hasta 16 °C en 12 horas, por lo que se consideraron las microalgas endémicas como alternativa, *Schizochytrium* LPU-1, *Chaetoceros* sp. LPU-2, y *Chaetoceros* sp. LPU-3, estas especies han sido seleccionadas en base a su aporte nutricional y a las facilidades que permiten su producción masiva, así como sus características biológicas, que

permiten el establecimiento de su cultivo, para su escalamiento en granjas ubicadas en zonas tropicales como en nuestro país es necesario áreas refrigeradas y luz artificial que resulta en altos costos, por lo que la utilización de microalgas endémicas puede presentar ventajas ya que se encuentran adaptadas a las condiciones climáticas de la zona. Por lo antes expuesto se llevó a cabo la determinación del valor nutricional de tres cepas de microalgas endémicas de La Bahía de La Paz, B.C.S., México para ser utilizadas como alimento de presas vivas e incrementar su contenido de nutrientes, para poder alimentar las larvas de *Seriola rivoliana*, la cual es una especie regional de importancia comercial.

4. HIPÓTESIS

Si los géneros *Chaetoceros* y *Schizochytrium* han sido utilizados en la acuicultura debido a su composición bioquímica rica en nutrientes, entonces las cepas de microalgas *Schizochytrium* LPU-1, *Chaetoceros* sp. LPU-2 y *Chaetoceros* sp. LPU-3 podrán ser utilizadas en el cultivo de rotíferos y *Artemia*, modificar su valor nutricional y hacerlo apto para ser usado como presas vivas para la alimentación de larvas de jurel.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar las cepas de microalgas endémicas *Schizochytrium* LPU-1, *Chaetoceros* sp. LPU-2, y *Chaetoceros* sp. LPU-3 para el cultivo y enriquecimiento de presas vivas y su aplicación en la primera alimentación de *Seriola rivoliana*.

5.2 Objetivos específicos

- 1) Determinar el contenido de proteínas, lípidos, carbohidratos, ácidos grasos y tasa de crecimiento de las cepas *Schizochytrium* LPU-1, *Chaetoceros* sp. LPU-2, y *Chaetoceros* sp. LPU-3.
- 2) Evaluar el cultivo de rotíferos *B. plicatilis* alimentados con las cepas *Schizochytrium* LPU-1, *Chaetoceros* sp. LPU-2, y *Chaetoceros* sp. LPU-3 en función del crecimiento poblacional, contenido de proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos grasos.
- 3) Evaluar el cultivo de *A. franciscana* alimentados con las cepas *Schizochytrium* LPU-1 y *Chaetoceros* sp. LPU-2 en función del aumento de longitud, contenido de proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos grasos.
- 4) Evaluar el enriquecimiento de rotíferos con la cepa *Chaetoceros* sp. LPU-2 en la larvicultura de *S. rivoliana* y su influencia en parámetros zootécnicos.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Agua de cultivo

Para los cultivos de microalgas, rotíferos y *Artemia* se utilizó agua de mar filtrada (5.0 y 1.0 μm) y posteriormente fue transferida a un sistema de recirculación que constaba de un reservorio de 3000 L provisto de un sistema de desinfección por luz ultravioleta, y se transfería conforme a la demanda a un reservorio de 400 L, dónde se le adicionaba una solución de hipoclorito de sodio comercial a razón de 1 mL L⁻¹ de agua de mar. La neutralización del hipoclorito de sodio se realizó con Tiosulfato de sodio a una razón de .05 g m L⁻¹, la neutralización era corroborada con la prueba colorimétrica de Ortotolidina.

6.2 Objetivo 1, Cultivo de microalgas

Los cultivos se iniciaron en matraz Erlenmeyer de 125 mL (90 mL de agua de mar complementada con 0.3 mL de medio F/2, y 10 mL de inóculo) y después se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 1 L (900 mL de agua de mar complementada con 3 mL de medio F/2, y 100 mL de inóculo), en todas las transferencias se esterilizó el agua y medio F/2 en autoclave a una presión de 1.02 kg cm⁻² por 20 min. Después de 5 días los cultivos en matraz Erlenmeyer de 1 L fueron inoculados en garrafones de polietileno de 19 L, previamente sanitizados y llenados con agua de mar desinfectada con hipoclorito de sodio.

A lo largo de siete días de cultivo en garrafón se realizaron conteos por triplicado del número de células mL⁻¹ para cada cultivo de microalgas con una Cámara de Neubauer, con estos datos se estimó la tasa de crecimiento con la siguiente ecuación:

$$\mu = (\ln(N_1) - \ln(N_0)) / (t_1 - t_0) \quad (1)$$

Dónde N_1 y N_0 son las densidades celulares (cel mL⁻¹) al inicio y final de la etapa exponencial, respectivamente, medidas a los tiempos t_1 y t_0 .

6.3 Objetivo 2, Cultivo de rotíferos

El sistema experimental consistió en 15 garrafones de polietileno de 19 L, provisto con 4 lámparas fluorescentes, la irradiancia se ajustó a 1000 lux durante 24 h, el aire se pasó por filtros de 5µm y 1µm antes de entrar al sistema experimental. Los tratamientos se aplicaron como se indica a continuación en la tabla IV.

Tabla IV. Tratamientos aplicados en el bioensayo de cultivo de rotíferos con microalgas endémicas.

Número de tratamiento	Forma de aplicación de los tratamientos Monoalgal o en mezcla
T1	<i>Chaetoceros</i> sp. LPU-3
T2	<i>Chaetoceros</i> sp. LPU-2
T3	<i>Chaetoceros</i> sp. LPU-2/ <i>Chaetoceros</i> sp. LPU-3
T4	<i>Schizochytrium</i> sp. LPU-1
T5	<i>Schizochytrium</i> sp. LPU-1 / <i>Chaetoceros</i> sp. LPU-2

Cada tratamiento se aplicó por triplicado durante 8 días. La densidad inicial de alimento fue de 80,000 cel mL⁻¹ por rotífero y se incrementó diariamente, conforme la población de rotíferos aumentaba. La densidad inicial de rotíferos partió de 2 organismos mL, diariamente se realizaron conteos por triplicado con 1 mL de muestra en una cámara de zooplancton Sedgwick-Rafter. Para calcular la tasa de crecimiento poblacional se utilizó la ecuación de Theilacker (1971).

$$G = (\ln N_t - \ln N_0)/t \quad (2)$$

Dónde N_0 es la densidad inicial de rotíferos, N_t es la concentración de individuos al tiempo t y t es el periodo de cultivo en días. Diariamente se estimó el consumo de alimento de rotíferos mediante la siguiente ecuación:

$$FI = (N_0 - N_1)N_t \quad (3)$$

Dónde N_0 corresponde al número total de células inicial en el cultivo de rotíferos, N_1 es el número total de células después de 24 horas en el cultivo de rotíferos y N_t

es el número total diario de rotíferos en el cultivo. Al finalizar el experimento se concentró la biomasa total para cada una de las 3 repeticiones y se congelaron a -22 °C, para su posterior procesamiento.

6.4 Objetivo 3, Cultivo de *Artemia*

El bioensayo se llevó a cabo por triplicado para cada tratamiento establecidos como: *Schizochytrium* sp. LPU-1 y *Chaetoceros* sp. LPU-2 durante 9 días, el sistema experimental consistió en garrafones de polietileno de 19 L provisto de iluminación ajustada a 1000 lux, el aire suministrado se pasó por filtros de 5µm y 1µm, en cada unidad experimental se iniciaron los cultivos con 1000 nauplios en un volumen de 10 L, diariamente se realizaba la toma de 30 organismos por tratamiento para registrar el aumento en longitud, la medición se realizó de acuerdo a Amat (1979), desde el margen anterior de la cabeza hasta la base de la furca caudal usando el programa Image-Pro Plus 6.0. La alimentación se ajustó a una densidad de 80,000 cel mL⁻¹. Al finalizar el experimento se concentró la biomasa total para cada una de las tres repeticiones y se congelaron a -22 °C para su posterior procesamiento.

6.5 Análisis bioquímicos

Las muestras de microalgas, rotíferos y *Artemia* se procesaron en el Laboratorio de Bioquímica Fisiológica del CIBNOR.

6.5.1 Lípidos totales

Se utilizó el método de la sulfofosfovainillina, el cual depende de la reacción de los lípidos con el ácido sulfúrico, ácido fosfórico y vainillina para formar un complejo rojo. La solución estándar es colesterol en etanol (Barnes y Blackstock, 1973). Para la determinación de lípidos totales, se tomaron 25 µL de la muestra y se colocaron en un tubo de vidrio, se agregaron 250 µL de ácido sulfúrico concentrado, se calentaron las muestras a 90 °C en baño maría por 10 minutos, posteriormente se enfriaron en baño de hielo y se agitaron para tomar 20 µL y se

pusieron en los pozos de una microplaca y se adicionó 200 μL de reactivo vainillina, se incubaron por 40 minutos y se leyó a 540 nm. Las lecturas para la determinación de lípidos totales se hicieron en un lector de microplacas Biorad 550.

6.5.2 Proteínas totales

Para la medición de proteínas se siguió el método de Bradford (1976), que se basa en la reacción de los grupos amino libres con el colorante azul de Coomassie en presencia de ácido fosfórico y metanol. El complejo formado por la proteína de la muestra y el colorante provoca un desplazamiento en la absorción máxima del colorante desde 465 a 595 nm. La absorción es proporcional a la concentración de proteína. Se pusieron 10 μL de extracto de cada muestra en tubos de vidrio y se agregó 1 mL de reactivo de Bradford; se dejó reaccionar durante cinco minutos y luego se tomaron 100 μL del producto de reacción y se pusieron en microplacas de ELISA para realizar su lectura en un espectrofotómetro de placas (Termo Multiskan spectrum) a 595 nm. Se utilizó una solución estándar con una concentración de 2 mg mL de albúmina bovina, la cual se diluyó en proporción 1:2 en solución salina hasta tener concentraciones, de 2.0, 1.0, 0.5, 0.25, 0.125 y 0.0625 mg mL⁻¹ de proteína y solución salina como blanco.

6.5.3 Carbohidratos

Se utilizó el método basado en Roe *et al.* (1949), se tomaron 50 μL de extracto de cada muestra y se les añadieron 50 μL de TCA al 20%. Se centrifugo a 12000 x g por 10 min a 5°C. Se tomaron 25 μL de sobrenadante y se colocaron en un tubo de vidrio, se le agregaron 250 μL de solución de antrona 0.1% diluida en H₂SO₄ al 72%. Se calentaron a baño maría a 90°C durante 5 minutos y enfriaron en baño de hielo. La lectura de absorbancia se realizó en un espectrofotómetro a 620 nm. Para la curva estándar se usó una solución estándar de carbohidratos (5 mg mL⁻¹), a partir de las cuales se prepararon diluciones en proporción 1:2, en 500 μL de TCA, quedando concentraciones de 5.0, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.15625, 0.078125 mg mL⁻¹ de carbohidratos.

6.5.4 Ácidos grasos

Las muestras previamente liofilizadas se procesaron para el análisis de ácidos grasos de acuerdo a la metodología Bligh y Dyer, para las microalgas mientras que para rotíferos y *Artemia* con la metodología Folch. Primeramente se pesaron 20 mg de cada muestra y se aplicó BHT (Butil hidroxitolueno) al 1% del contenido de lípidos totales para evitar la oxidación; posteriormente, las muestras fueron sonicadas por dos ciclos de 15 minutos en baño de hielo y se mantuvieron en refrigeración a 4°C por 24 horas protegidos de la luz. Después de 24 horas se extrajo el sobrenadante y se hicieron dos lavados a la biomasa residual con solución Folch, se agregó 1 mL de agua destilada para favorecer la formación de una fase lipídica y una acuosa, de la cual solo se recuperó la primera y posteriormente fue secada con nitrógeno gaseoso (N₂). Para la esterificación de los ácidos grasos, se adicionaron 2.5 mL de ácido clorhídrico metanólico HCl:CH₃OH (5%, v/v) y se derivatizaron por 2.5 horas a 85 °C (Sato y Murata, 1988). Los ácidos grasos metil esterificados (FAME) obtenidos de la derivatización, se extrajeron con 1 mL de hexano (C₆H₁₂) grado HPLC, repitiendo este paso dos veces para una mejor extracción. Una vez obtenido el hexano se lavó con 2 mL de agua destilada, 3 veces, después del tercer lavado se recuperó el hexano. Se secó el extracto de hexano que contiene los FAME con nitrógeno gaseoso.

Por último, se re-suspendió en un volumen conocido de hexano para hacer los cálculos posteriores de la concentración de los FAME en las muestras analizadas y se colocaron viales de 2 mL para su inyección en el cromatógrafo de gases Agilent Technologies 550, con columna capilar de sílice fundida empacada con 2-polietilenglicol como fase estacionaria de 30 m de longitud, 0.25 mm diámetro interno y 0.25 µm espesor de film (Supelco Omegamax™ 250). El gas transportador fue helio a un flujo de 0.9 mL min⁻¹, el volumen de inyección fue de 1 mL, la temperatura inicial fue de 50 °C y la final 22 °C, por un tiempo de 35 minutos. Los ácidos grasos presentes en las muestras fueron identificados por comparación de los espectros de masas con los espectros contenidos en la base de datos de

espectros de masas WIST/NBS. Esta identificación fue confirmada por: a) Interpretación de metil-ésteres de ácidos grasos conocidos a través de la búsqueda de iones como $M+31$, $M+43$, $M+74$ y, b) Comparación de los tiempos de retención de los picos en las muestras con los tiempos de retención de un patrón comercial de estándares de metil-ésteres de ácidos grasos poliinsaturados (Supelco 37 Component FAME MIX). El análisis de los datos se realizó mediante el software del equipo, siendo expresados los resultados como porcentaje de área de acuerdo al total de los ácidos grasos identificados.

6.6 Objetivo 4 Cultivo larvario de *S. rivoliana*

6.6.1 Cultivo de microalgas

Los cultivos se iniciaron en matraz Erlenmeyer de 125 mL (90 mL de agua de mar y medio F/2, y 10 mL de inóculo) y después se transfirió a matraz Erlenmeyer de 1 L (900 mL de agua de mar complementada con 3 mL de medio F/2, y 100 mL de inóculo), en todas las transferencias se esterilizó el agua y medio F/2 en autoclave a una presión de 1.02 kg cm^{-2} por 20 min. Después de 5 días los cultivos en matraz Erlenmeyer de 1L fueron inoculados en garrafones de polietileno de 19 L, previamente sanitizados y llenados con agua de mar desinfectada con hipoclorito de sodio comercial, a partir de este momento los cultivos se realizaron en a temperatura ambiente, posteriormente fueron escalados a un volumen de 400 L.

6.6.2 Cultivo de rotíferos

El sistema de producción masiva de rotíferos consistió en 3 tinas de 400 L con suministro de aire e iluminación, la alimentación se realizó diariamente con una mezcla de las microalgas *Grammatophora* sp., *Schizochytrium* sp. LPU-1 y *Chaetoceros* sp. LPU-2, cada 4 días se inició un nuevo cultivo con un inóculo de 10 millones de rotíferos.

6.6.2.1 Bioensayo de enriquecimiento de rotíferos

Previo a la aplicación de la microalga *Chaetoceros* sp. LPU-2 como enriquecedor se llevó a cabo un bioensayo de enriquecimiento con los rotíferos. Primeramente 9 millones de rotíferos fueron puestos en agua de mar (esterilizada con hipoclorito de sodio) por 2 horas para que vaciaran el tracto digestivo, al finalizar este procedimiento se obtuvieron 3 muestras con 1 millón de rotíferos cada una, los 6 millones de rotíferos sobrantes se dividieron en dos tratamientos (1 millón de rotíferos para cada una de las repeticiones): Ori Green (Skretting) y *Chaetoceros* sp. LPU-2: Ori Green (Skretting) y *Chaetoceros* sp. LPU-2, para el caso del primer enriquecedor se siguieron las instrucciones del fabricante para ser aplicado y para el enriquecimiento con microalgas utilizamos diez litros de microalga fresca a una concentración de 4.21×10^6 cel mL⁻¹, los tratamientos se aplicaron por triplicado durante 2.5 hrs, una vez transcurrido el tiempo establecido los rotíferos fueron tamizados, lavados con agua destilada y finalmente congelados a -60 °C hasta su procesamiento.

6.6.3 Larvario de jurel

El sistema experimental consistió en 4 tinas de 1800 L de fondo cónico habilitadas con un sistema de alimentación automático para el suministro de rotíferos enriquecidos (Fig. 10), dos tinas se utilizaron para probar la microalga *Chaetoceros* sp. LPU-2 como enriquecedor y dos tinas para el tratamiento control en este caso Ori Green (Skretting).

Antes de la siembra de los huevos el agua del sistema experimental fue filtrada y esterilizada con hipoclorito de sodio 0.2 mL L⁻¹ por 24 h y neutralizada con una solución de tiosulfato de sodio 0.05 gr mL⁻¹. Las tinas estuvieron provistas de luz artificial con lámparas led que ofrecen una irradiancia de 800 lux en la superficie del agua, el fotoperiodo se mantuvo en 24 horas de luz, el recambio de agua se inició al primer día después de la eclosión con una tasa de renovación del 50 % diario, la aireación se suministró mediante una manguera de microburbuja instalada al fondo de cada unidad experimental.

Los huevos fertilizados se obtuvieron de jureles nacidos y mantenidos en cautiverio, de la planta piloto de Kampachi Farms, ubicada en las instalaciones del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, Baja California Sur; una vez recolectados los huevos, se separaron los flotantes y precipitados, posteriormente fueron sembrados a una densidad de 50 huevos L^{-1} . Para calcular el porcentaje de eclosión se colocaron 2 eclosionadores, uno por tratamiento, y en ellos fueron puestos 100 huevos fertilizados, una vez eclosionadas se contabilizó el número de larvas. Los rotíferos se enriquecieron con la metodología antes mencionada y fueron puestos en las unidades experimentales ajustando una densidad de 15 rotíferos mL^{-1} . Diariamente se registró la temperatura, oxígeno disuelto y pH de las unidades experimentales

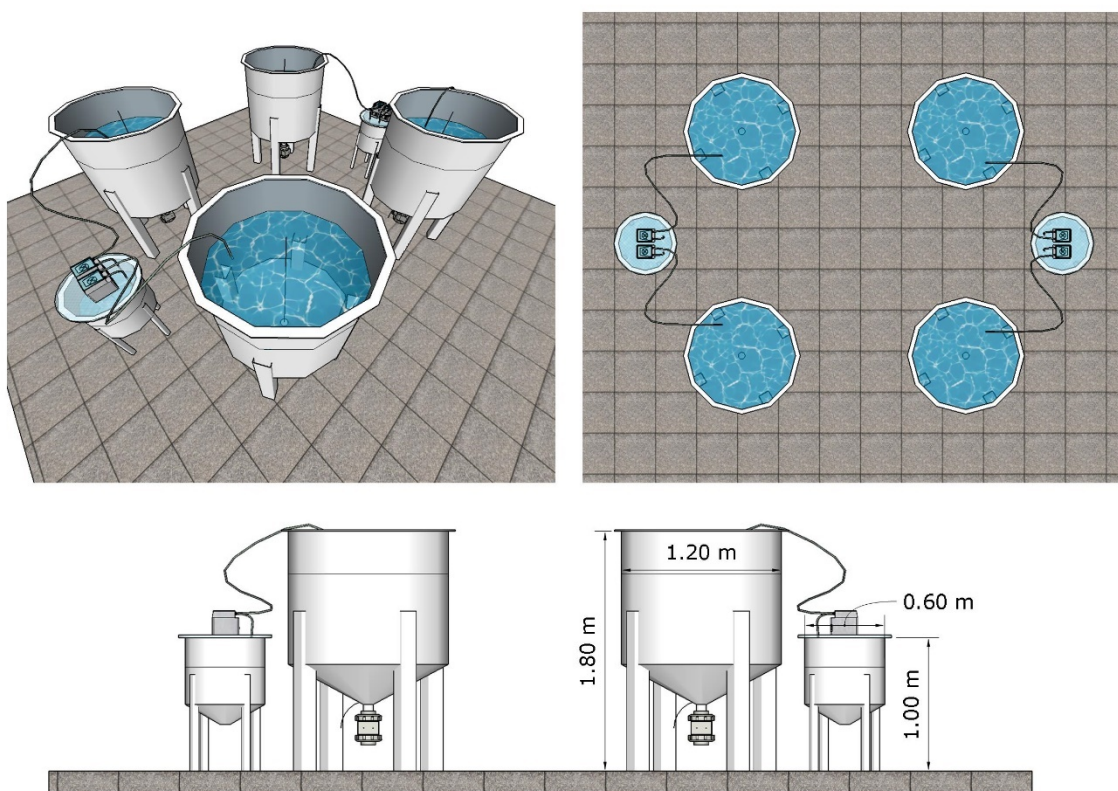


Figura 10. Vista lateral y aérea del sistema experimental utilizado en el larvario de *S. rivoliana*

Al finalizar el experimento al día 6 después de la eclosión se calculó el porcentaje de supervivencia final con la siguiente ecuación:

$$S = \frac{\text{Número de organismos final}}{\text{Número de organismos inicial}} * 100 \quad (4)$$

6.7 Análisis estadístico

A todos los datos obtenidos se les realizó una prueba de homogeneidad de varianzas y normalidad mediante las técnicas de Levine y Kolmogorov-Smirnov, respectivamente. En el caso de que los datos no fueran homocedásticos se aplicó la prueba por rangos Kruskal-Wallis a un nivel de significancia de 0.05. El programa utilizado fue Sigma Plot versión 11.0.

7. RESULTADOS

7.1 Objetivo 1, Cultivo de microalgas

La densidad celular (cel mL^{-1}) máxima registrada después de 7 días de cultivo para cada especie fue, para *Chaetoceros* sp. LPU-3 4.19×10^6 cel mL^{-1} , *Chaetoceros* sp. LPU-2, 2.86×10^6 cel mL^{-1} y *Schizochytrium* sp. LPU-1 $.041 \times 10^6$ cel mL^{-1} , el análisis estadístico indica que existe diferencias significativas entre las especies de *Chaetoceros* y *Schizochytrium* sp. LPU-1, la cinética de crecimiento se presenta en la figura 11. La tasa promedio de crecimiento se calculó para cada especie (Fig. 12), para el caso de *Chaetoceros* sp. LPU-3, 0.65, *Chaetoceros* sp. LPU-2, 0.57 y *Schizochytrium* sp. LPU-1 0.58.

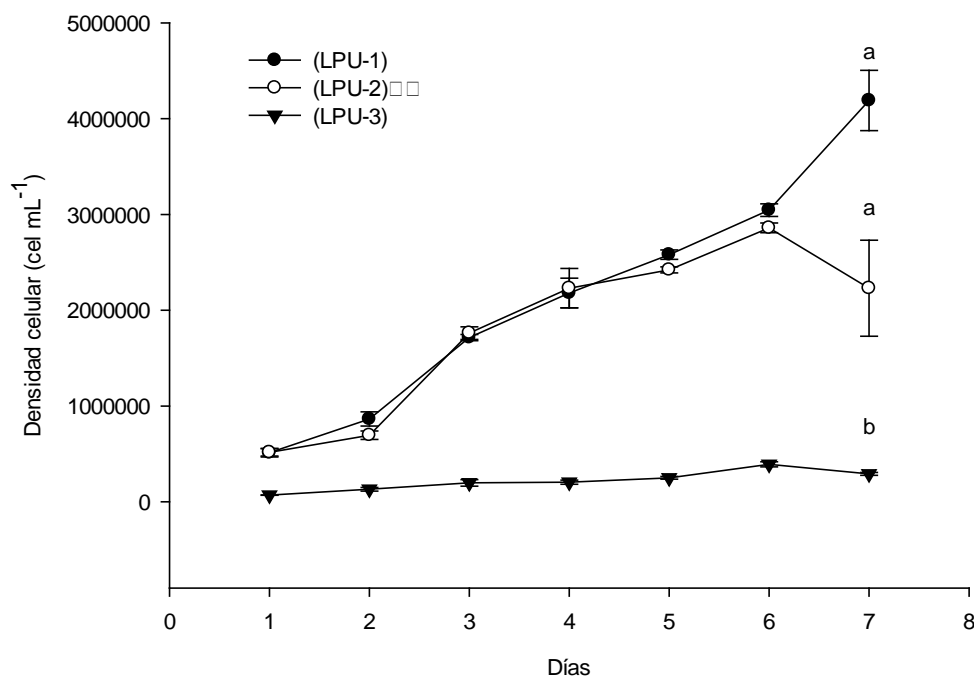


Figura 11. Densidad celular (cel mL^{-1}) de 3 cepas de microalgas, LPU-1: *Schizochytrium* sp., LPU:2 *Chaetoceros* sp. Y LPU:3 *Chaetoceros* sp. Las letras a y b indican diferencias significativas ($P \geq 0.05$).

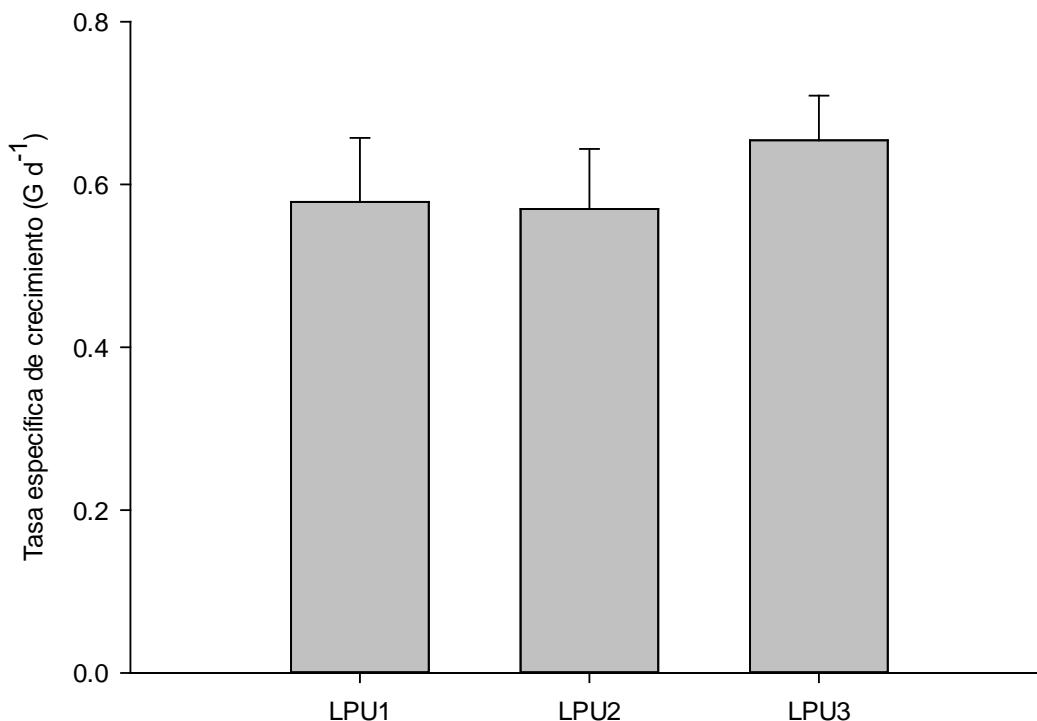


Figura 12. Tasa de crecimiento (G d⁻¹) de 3 cepas de microalgas, LPU-1: *Schizochytrium* sp., LPU:2 *Chaetoceros* sp. y LPU:3 *Chaetoceros* sp. G d⁻¹= número de divisiones en un día.

7.1.1 Valor nutricional de las microalgas

Chaetoceros sp. LPU-2 presentó un valor de 18.97 ± 0.3 mg g⁻¹ para carbohidratos totales el cual es significativamente ($P < 0.05$) más elevado en comparación a los obtenidos en *Schizochytrium* sp. LPU-1 y *Chaetoceros* sp. LPU-3. En relación a proteínas totales, el contenido más elevado ($P < 0.05$) se mostró en *Schizochytrium* sp. LPU-1 y *Chaetoceros* sp. LPU-2 con 265.19 ± 13.41 mg g⁻¹ y 252.41 ± 0.78 mg g⁻¹ respectivamente, y el valor más bajo se encontró en *Chaetoceros* sp. LPU-3. Relativo al contenido de lípidos, *Schizochytrium* sp. LPU-1 presentó la cantidad más elevada ($P < 0.05$) con 256.21 ± 1.31 mg g⁻¹, mientras que en *Chaetoceros* sp. LPU-2 y *Chaetoceros* sp. LPU-3 fueron de 100.28 ± 0.27 mg g⁻¹ y 100.16 ± 0.08 mg g⁻¹ respectivamente.

Los ácidos grasos fueron agrupados en tres categorías: saturados, monoinsaturados y poliinsaturados. *Chaetoceros* sp. LPU-3 presentó el valor más alto de ácidos grasos saturados ($P < 0.05$) mientras que *Chaetoceros* sp. LPU-2 presentó el mayor contenido de ácidos grasos poliinsaturados ($P < 0.05$) (Tabla V). El contenido de ácido linolénico (ALA) de *Schizochytrium* sp. LPU-1 y *Chaetoceros* sp. LPU-2 y LPU-3 no fueron significativamente diferentes ($P < 0.05$). Por otro lado, solo en *Chaetoceros* sp. (LPU-2 y LPU-3) cuantificamos ácido araquidónico (ARA) y ácido eicosapentaenoico (EPA); El ácido docosahexaenoico (DHA) no se detectó en ninguna de las cepas (Tabla V).

Tabla V. Análisis bioquímico y de ácidos grasos (%) para: *Schizochytrium* sp. LPU-1, *Chaetoceros* sp. LPU-2 y *Chaetoceros* sp. LPU-3. Los valores representan la media \pm error estándar.

Composición: bromatológica, ácidos grasos	<i>Schizochytrium</i> sp. (LPU-1)	<i>Chaetoceros</i> sp. (LPU-2)	<i>Chaetoceros</i> sp. (LPU-3)
CHO	20,01 \pm 0,33 ^b	24,10 \pm 0,30 ^a	18,97 \pm 0,30 ^b
PT	265,19 \pm 13,41 ^a	252,41 \pm 0,78 ^a	149,52 \pm 0,62 ^b
LT	256,21 \pm 1,31 ^a	100,28 \pm 0,27 ^b	100,16 \pm 0,08 ^b
Σ Saturados	37,14 \pm 2,90 ^c	55,13 \pm 2,11 ^b	82,08 \pm 2,09 ^a
Σ Monoinsaturados	48,81 \pm 3,16 ^a	29,79 \pm 0,61 ^b	11,93 \pm 0,30 ^c
18:3 (n-6)	3,28 \pm 0,07 ^b	9,72 \pm 1,47 ^a	0,51 \pm 0,07 ^b
18:3 (n-3)ALA	0,66 \pm 0,109	0,28 \pm 0,081	0,40 \pm 0,06
20:4 (n-6) ARA	0 ^b	0,87 \pm 0,091 ^a	0,67 \pm 0,01 ^a
20:5 (n-3) EPA	0	3,54 \pm 0,06	3,33 \pm 2,07
22:6 (n-3) DHA	0	0	0
Σ Poliinsaturados	14,05 \pm 0,26 ^b	15,08 \pm 1,51 ^a	5,99 \pm 1,79 ^c
Σ n-3	0,66 \pm 0,11	3,82 \pm 0,024	0,66 \pm 0,11
Σ n-6	3,28 \pm 0,07 ^b	10,71 \pm 1,56 ^a	3,28 \pm 0,70 ^b

Carbohidratos totales (CHO), Proteínas totales (PT) y Lípidos totales (LT) se encuentran en mg g^{-1} . Las letras a, b y c indican diferencias estadísticas ($P < 0.05$, ANOVA de una vía).

Chaetoceros sp. LPU-3, 0.87 ± 0.37 y la mezcla de ambas 0.87 ± 0.40 , el menor valor se obtuvo con la mezcla de *Schizochytrium* sp.(LPU-1) /*Chaetoceros* sp. LPU-2, 0.59 ± 0.24 , sin que existieran diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$). En las figuras 13-17, se puede observar la densidad poblacional que tuvieron los cultivos cuando el alimento solo fue provisto por una sola especie de microalga y mezclas de microalgas.

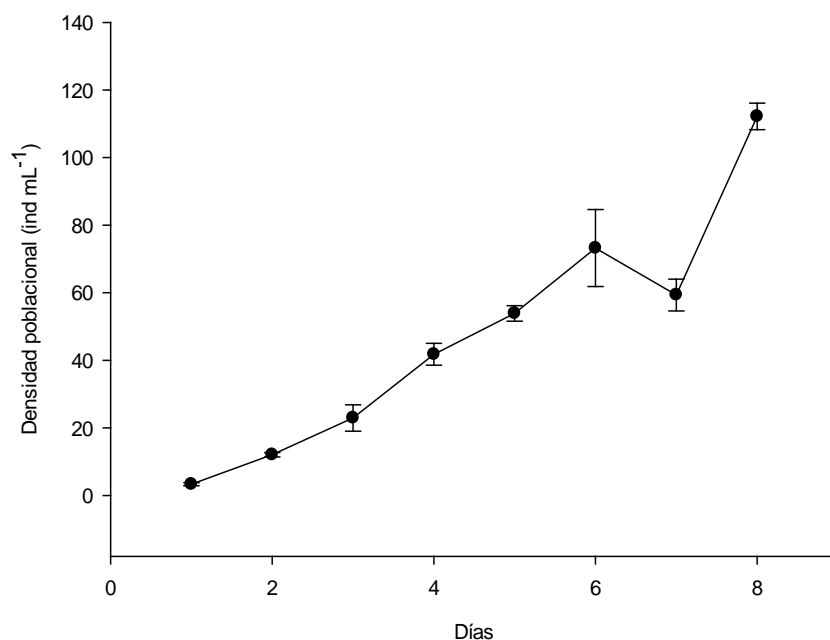


Figura 13. Densidad poblacional (ind mL⁻¹) de *B. plicatilis* alimentados con la cepa *Chaetoceros* sp. LPU-3.

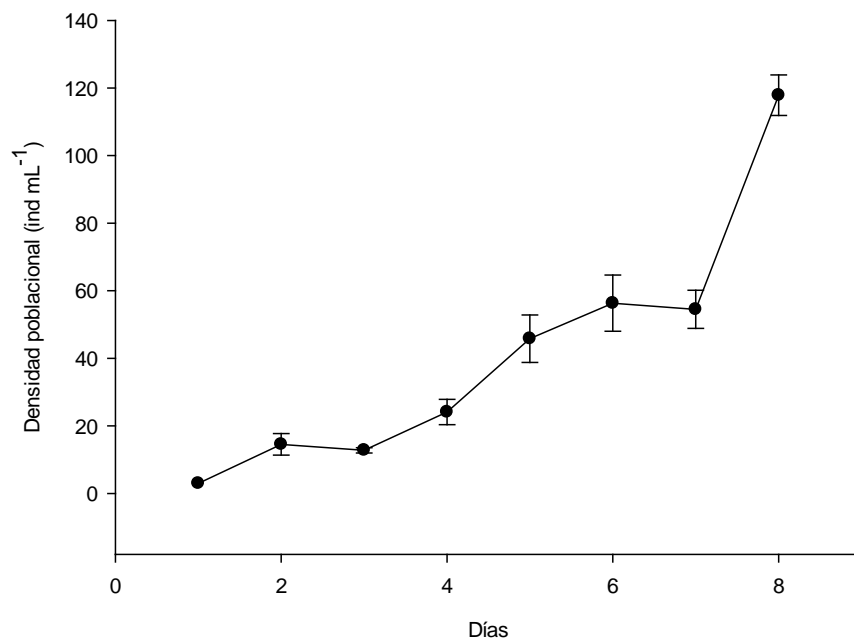


Figura 14. Densidad poblacional (ind mL⁻¹) de *B. plicatilis* alimentados con la cepa *Chaetoceros* sp. LPU-2.

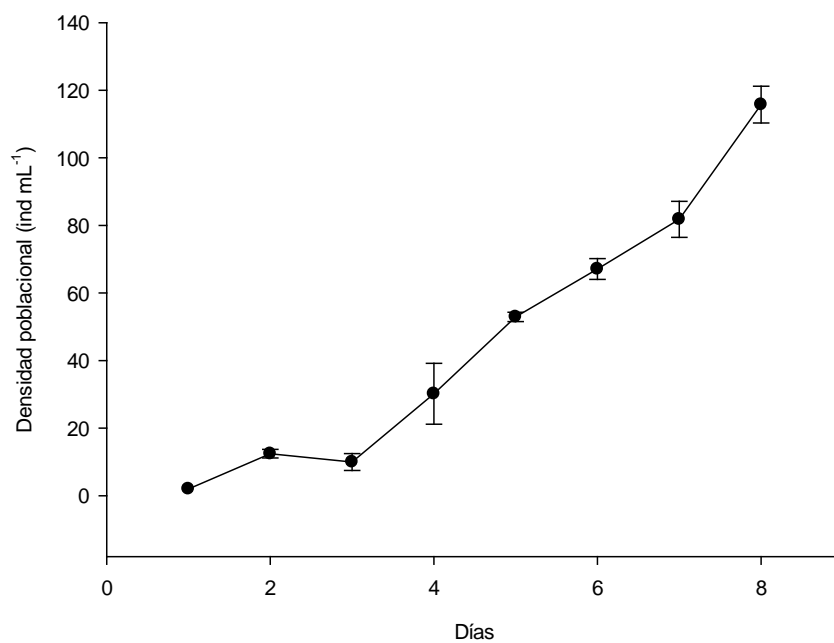


Figura 15. Densidad poblacional (ind mL⁻¹) de *B. plicatilis* alimentados con la mezcla de cepas *Chaetoceros* sp. LPU-2/*Chaetoceros* sp. LPU-3.

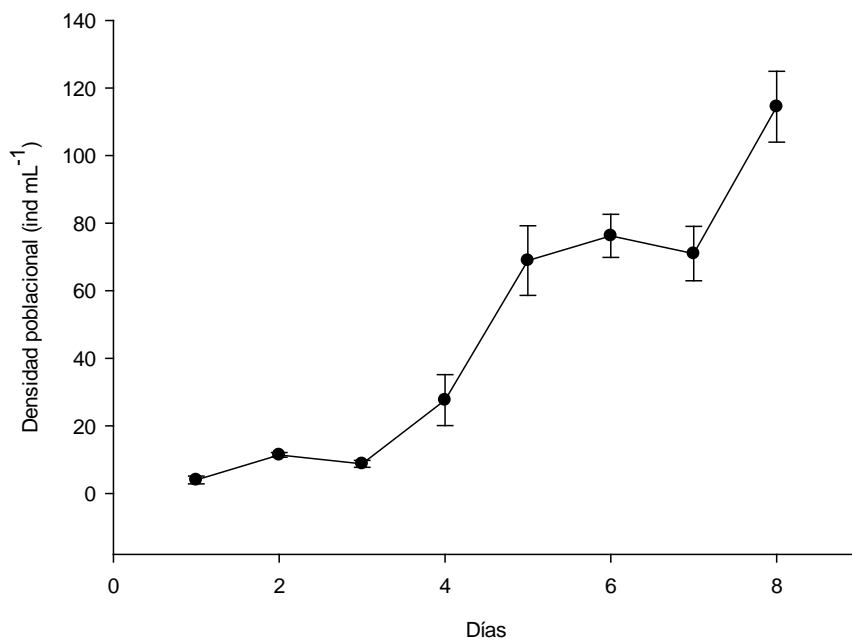


Figura 16. Densidad poblacional (ind mL⁻¹) de *B. plicatilis* alimentados con la cepa *Schizochytrium* sp. LPU-1.

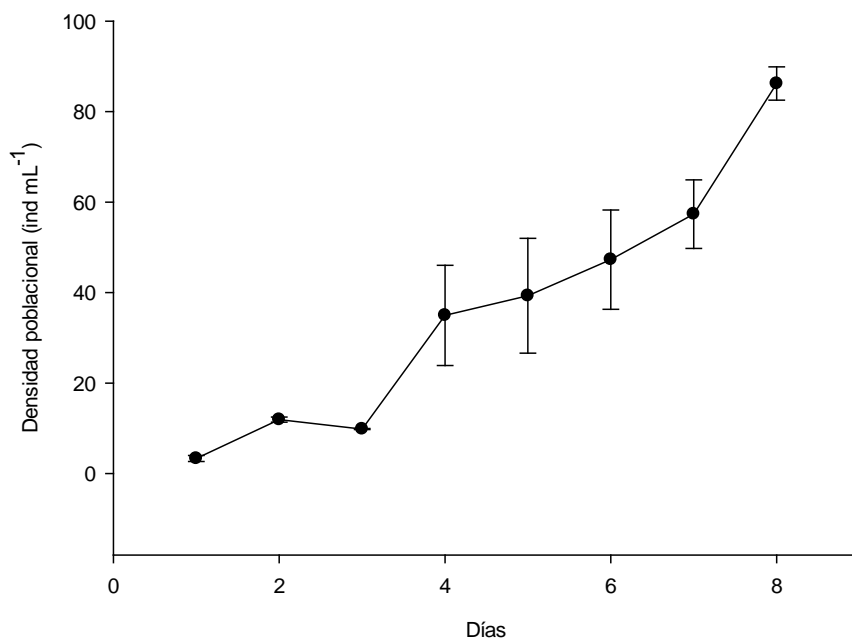


Figura 17. Densidad poblacional (ind mL⁻¹) de *B. plicatilis* alimentados con la mezcla de cepas *Schizochytrium* sp. LPU-1/*Chaetoceros* sp. LPU-2. Respecto a la densidad de los rotíferos (Figs. 13-17), en el tratamiento dónde se obtuvo la mayor densidad fue con *Chaetoceros* sp. LPU-2 con 118 rotíferos mL⁻¹

(Fig. 14). Los parámetros fisicoquímicos de los cultivos estuvieron dentro de los rangos aceptables, y son los siguientes: 32 ± 2 °C de temperatura, 4.72 ± 0.34 mg mL⁻¹ de oxígeno disuelto, 36.69 ± 0.23 salinidad y 1,000 lux. Los valores de la ingesta de alimentos y la concentración de alimentos por tratamiento se muestran en la tabla VI.

Tabla VI. Tasa de consumo diario y de crecimiento poblacional de rotíferos *B. plicatilis* alimentados con diferentes microalgas (tratamientos).

Tratamientos	Concentración alimento (cel mL ⁻¹)	Consumo diario de microalgas (cel ind ⁻¹)	Tasa de crecimiento del cultivo G d ⁻¹
<i>Chaetoceros</i> sp. LPU-3	104895.83 ± 106105.46	145069 ± 87403.3	0.87 ± 0.37
<i>Chaetoceros</i> sp. LPU-2	84166.67 ± 83532.34	132500 ± 76280.7	.74 ± 0.35
<i>Chaetoceros</i> sp. LPU-3/ <i>Chaetoceros</i> sp. LPU-2 (1:1)	421145.83 ± 29879.01	50472 ± 625.5	0.87 ± 0.40
<i>Schizochytrium</i> sp. LPU-)	53562.50 ± 44034.06	48789.2 ± 15194.2	0.88 ± 0.43
<i>Schizochytrium</i> sp. (LPU-1./ <i>Chaetoceros</i> sp. (LPU-2 (1:5)	47187.50 ± 34031.59	59514 ± 3556.2	0.59 ± 0.24

7.2.1 Valor nutricional de rotíferos

La composición bromatológica y de ácidos grasos bajo los efectos de los tratamientos se muestra en la tabla VI. Posterior al ensayo de alimentación con las tres cepas de microalgas el contenido carbohidratos representó la cantidad más pequeña en relación con la de proteínas y lípidos. Los rotíferos alimentados en todos los tratamientos no mostraron diferencias significativas en el contenido de carbohidratos y proteínas (Tabla VII). Los lípidos totales cuantificados en los rotíferos alimentados con las mezclas de *Chaetoceros* sp. LPU-2/*Chaetoceros* sp. LPU-3 (T3) y *Schizochytrium* sp. LPU-1/*Chaetoceros* sp. LPU-2 (T5) 171.52 ± 3.83 mg g⁻¹ y 163.10 ± 5.80 mg g⁻¹ respectivamente (Tabla VII) fueron significativamente (P<0.05) más altos a los otros tratamientos.

En relación con el contenido de ácidos grasos de los rotíferos se observó un notable grado de similitud en la composición de los ácidos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados entre los tratamientos. En la mezcla de *Schizochytrium* sp. LPU-1/*Chaetoceros* sp. LPU-2 (T5) no se detectó DHA.

Tabla VII. Análisis bioquímico y de ácidos grasos (%) de rotíferos *B. plicatilis* cultivados con 5 tratamientos, T1: *Chaetoceros* LPU-3, T2: *Chaetoceros* sp. LPU-

2, T3: *Chaetoceros* sp. LPU-3/*Chaetoceros* sp. LPU-2, T4: *Schizochytrium* sp. LPU-1, T5: *Schizochytrium* sp. LPU-1/*Chaetoceros* sp. LPU-2.

Composición bromatológica y ácidos grasos	Composición de rotíferos por tratamiento				
	T1	T2	T3	T4	T5
CHO	33,29±1,11	50,34±0,95	38,14±2,96	30,66±2,20	32,95±2,80
PT	300,05±30,03	287,20±3,88	270,39±4,25	238,10±7,01	331,03±2,01
LT	133,51±6,06 ^b	98,69±2,65 ^c	171,52±3,83 ^a	54,77±0,80 ^d	163,10±5,80 ^a
ΣSaturados	36,16±1,34	36,70±1,25	34,75±0,42	38,05±2,16	33,12±2,96
ΣMonoinsaturados	35,06±0,79	36,58±1,68	37,54±5,22	38,37±4,17	36,28±2,02
18:3 (n-6)	3,12±0,06	2,75±0,14	3,34±2,07	4,26±1,15	4,63±1,02
18:3 (n-3) ALA	0,96±0,00	0,88±0,02	0,96±0,39	1,25±0,19	0,94±0,16
20:4 (n-6) ARA	6,09±0,29	5,41±0,63	7,08±2,07	5,96±1,78	1,09±0,21
20:5 (n-3) EPA	7,38±0,43	7,43±0,87	9,77±4,24	7,28±2,79	0,91±0,20
22:6 (n-3) DHA	4,94±0,42	4,73±0,61	6,42±2,60	4,36±1,52	0
ΣPoliinsaturados	28,79±0,60	26,72±2,20	27,72±5,63	23,58±5,22	30,60±4,98
Σn-3	13,25±0,85	13,02±1,50	11,42±6,45	8,73±4,12	1,91±0,36
Σn-6	9,22±0,35	8,37±0,73	10,42±0,00	9,35±1,35	5,91±1,23

Los valores representan la media ± error estándar. Carbohidratos totales (CHO), Proteínas totales (PT) y Lípidos totales (LT) se encuentran en mg g⁻¹. Las letras a, b, c y d indican diferencias estadísticas (P<0.05, ANOVA de una vía).

7.3 Objetivo 3, Cultivo de *Artemia*

La supervivencia después de 9 días de experimentación y descartando los muestreos diarios de 10 organismos por unidad experimental, se calculó en 81% para el tratamiento con *Schizochytrium* sp. LPU-1 y del 98% para el tratamiento con *Chaetoceros* sp. LPU-2. En ambos tratamientos también se pudo observar un aumento en la longitud de los organismos, siendo significativamente más alto (P<0.05) para el tratamiento de *Chaetoceros* sp. LPU-2, 6.03 mm contra 2.18 mm de longitud promedio en los cultivos alimentados con *Schizochytrium* sp. LPU-1 (Fig. 18), cabe mencionar que solo los organismos del tratamiento *Chaetoceros* sp. LPU-2 alcanzaron la madurez sexual que fue corroborada con la presencia de hembras con quistes.

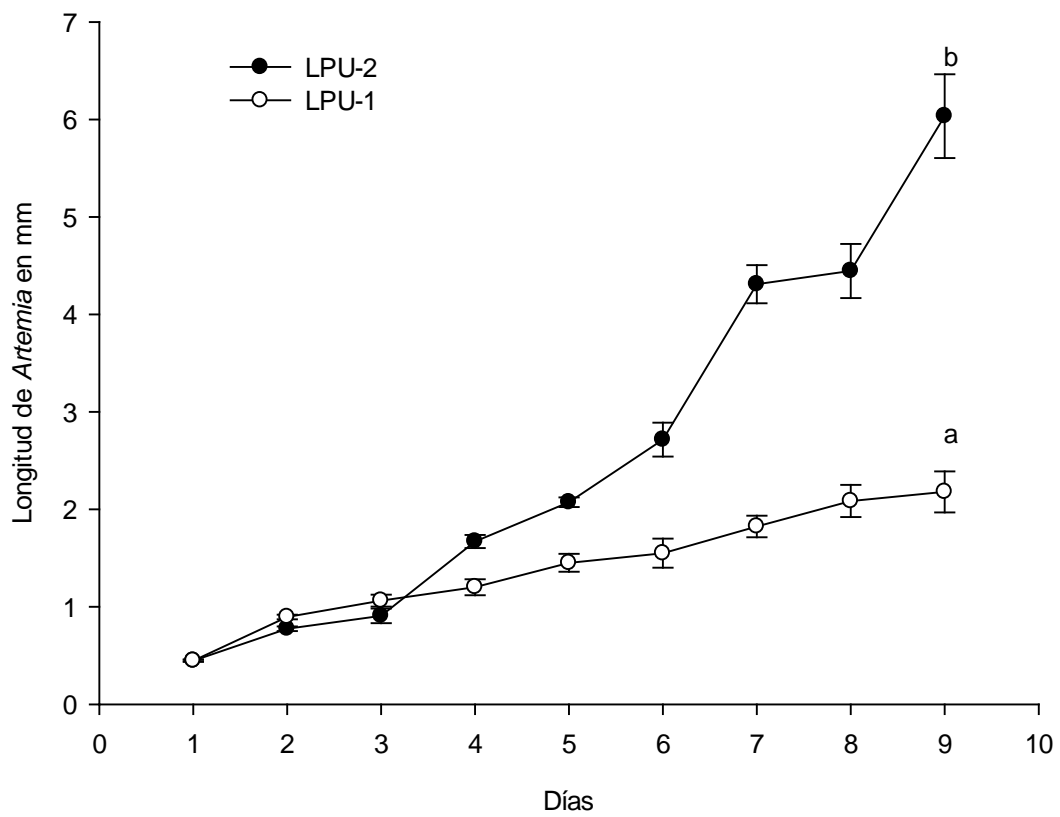


Figura 18. Longitud final media de cultivos de *Artemia* alimentadas con las cepas de microalgas *Schizochytrium* sp. LPU-1 y *Chaetoceros* sp. LPU-2. Las letras a y b indican diferencias significativas entre tratamientos.

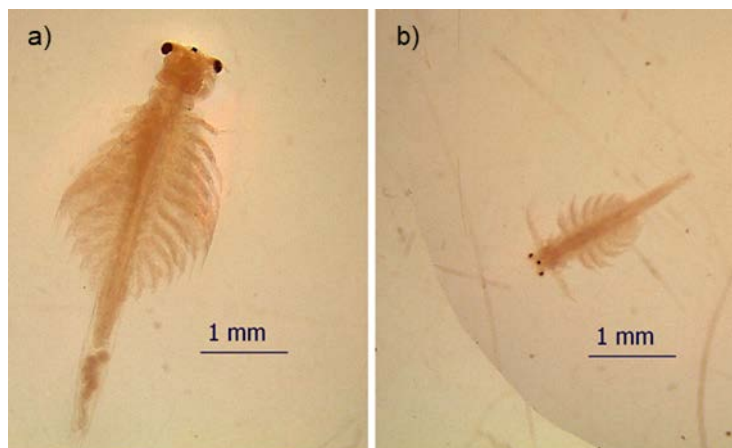


Figura 19. Imagen demostrativa de juveniles de *Artemia* en el día siete de cultivo alimentados con dos diferentes cepas de microalgas: a) *Chaetoceros* sp. LPU-2 y b) *Schizochytrium* sp. LPU-1.

7.3.1 Valor nutricional de *Artemia*

En relación con el contenido de carbohidratos y lípidos totales en *Artemia* estos fueron significativamente más altos en el tratamiento de *Chaetoceros* sp. LPU-2 (Tabla VII). Para el caso de los ácidos grasos fueron agrupados en saturados, monoinsaturados y poliinsaturados, en el grupo de poliinsaturados encontramos diferencias significativas siendo superior el tratamiento de *Schizochytrium* sp. LPU-1. La concentración de los ácidos grasos ARA, EPA Y DHA, se muestran también en la tabla VIII, solo para ARA encontramos diferencias significativas siendo superior el tratamiento de *Schizochytrium* sp. LPU-1.

Tabla VIII. Análisis bioquímico y ácidos grasos de *Artemia* cultivadas con 2 dietas. *Schizochytrium* sp. LPU-1 y *Chaetoceros* sp. LPU-2.

Composición bromatológica y ácidos grasos	Composición de <i>Artemia</i> por tratamiento	
CHO	36,93±1,7 ^b	62,58±0,7 ^a
PT	309,69±1,8 ^a	292,17±0,9 ^b
LT	112,34±1,9 ^b	212,28±1,8 ^a
∑Saturados	27,55±0,7	50,15±10,40
∑Monoinsaturados	44,84±0,39	41,14±8,62
20:4 (n-6) ARA	3,63±0,2 ^a	0,88±0,05 ^b
20:5 (n-3) EPA	0,20±0,14	2,08±1,22
22:6 (n-3) DHA	0,33±0,23	0,21±0,14
∑Poliinsaturados	27,61±0,37 ^a	8,71±1,79 ^b
∑n-3	4,63±0,6	3,17±1,01
∑n-6	5,23±0,21	2,18±0,03

Los valores para Carbohidratos totales (CHO), Proteínas totales (PT) y Lípidos totales (LT) se encuentran en mg/g. Las letras a y b indican diferencias estadísticas (P<0.05, ANOVA de una vía).

7.4 Objetivo 4, Cultivo larvario de *S. rivoliana*

Una vez transcurridas 24 hrs después de la siembra de huevos se contabilizaron las larvas registrándose un porcentaje de eclosión del 42%. La primera alimentación se realizó un día después de la siembra debido a que un elevado número de larvas ya había absorbido casi en su totalidad el saco vitelino y presentaban pigmentación en los ojos, lo que nos indicó que era necesario iniciar la alimentación con rotíferos enriquecidos. Los resultados de los parámetros de cultivo se presentan en la tabla IX. Después de alimentar a las larvas con rotíferos enriquecidos por 6 días se obtuvo una supervivencia del 32.5 % para el tratamiento de Ori Green y 35.1 % para el de *Chaetoceros* sp. LPU-2.

Tabla IX. Parámetros fisicoquímicos para los diferentes tratamientos.

Tratamientos	Temperatura (°C)	pH	Irradancia (lux)	Oxígeno disuelto (mg L ⁻¹)
Ori Green	27.21 ± 0.83	8.01 ± 0.21	800	4.58 ± 0.25
<i>Chaetoceros</i> sp. (LPU-2)	27.9 ± 0.66	7.94 ± 0.68	800	4.76 ± 0.36

7.4.1 Enriquecimiento rotíferos

En cuanto a los macronutrientes de los rotíferos antes y después del procedimiento de enriquecimiento se presentan en la Tabla X.

Tabla X. Análisis bioquímico de rotíferos enriquecidos.

	Antes de enriquecer	Ori Go	<i>Chaetoceros</i> sp LPU-2
CHO	13,95 ± 0,13	34,16 ± 0,04	108,12 ± 8,01
PT	370,42 ± 0,56	266,59 ± 2,21	319,30 ± 13,39
LT	165,77 ± 2,89	119,54 ± 0,18	250,26 ± 1,16

Los valores para Carbohidratos totales (CHO), Proteínas totales (PT) y Lípidos totales (LT) se encuentran en mg g⁻¹.

8. DISCUSIÓN

8.1 Objetivo 1

En este estudio se evaluaron dos especies de *Chaetoceros* aisladas en la Bahía de La Paz, ubicada en la costa del Pacífico Norte de México, en ambas cepas se determinó la tasa de crecimiento específica así como también la densidad celular máxima alcanzada al día 7 de cultivo durante la fase exponencial, obteniéndose una concentración máxima para *Chaetoceros* sp. LPU-3 de 4.19×10^6 cel mL⁻¹ y para *Chaetoceros* sp. LPU-2, 2.230×10^3 células mL⁻¹, estas densidades son cercanas a las reportadas por Pacheco-Vega *et al.* (2015) para *Chaetoceros muelleri* de 2.028×10^6 células mL⁻¹ y también por Martínez-Córdoba *et al.* (2012) reportaron una densidad máxima de *Ch. muelleri* 3.75×10^6 células mL⁻¹, lo que indica que estas diatomeas pueden proporcionar las cantidades necesarias para llevar a cabo la producción de rotíferos y *Artemia*.

Se ha encontrado que para algunas especies de microalgas (*Pavlova lutheri*, *Isochrysis* sp., *Nannochloropsis oculata* y *Chaetoceros* sp.), el contenido de triglicéridos es mayor en la fase de cultivo estacionaria, en la cual se incrementa la cantidad de ácidos grasos saturados y se produce una disminución en la proporción de los ácidos grasos poliinsaturados, manteniendo una mayor proporción relativa de éstos durante la fase exponencial (Ying y Kangsen, 2005).

La composición de las microalgas está influenciada por el medio de cultivo, la temperatura, así como por la intensidad de la luz (Thompson *et al.*, 1990) y los tiempos de cosecha (Brown *et al.*, 1997). En relación a la temperatura esta es considerada como uno de los factores determinantes en la síntesis de ácidos grasos producidos por las microalgas (Renaud *et al.*, 2002; Thompson *et al.*, 1992). La temperatura modifica la tasa fotosintética, la respiración y la permeabilidad de la membrana en el fitoplancton. En el caso de la permeabilidad de la membrana, al existir cambios de existe una respuesta de incrementar la de construcción de membranas cloroplasmáticas (Cohen *et al.*, 2000). Muchas especies de microalgas tienen la estrategia de incrementar la relación de ácidos grasos insaturados (polares) respecto a la cantidad de triglicéridos

(predominantemente saturados), cuando son expuestas a una disminución de la temperatura ambiental (Renaud *et al.*, 2002). Existe una relación inversa entre el porcentaje de ácidos grasos saturados y altamente insaturados, con respecto a la magnitud de la temperatura. Usualmente a menores temperaturas se genera un incremento de estos ácidos grasos (PUFA), esto ocurre como una respuesta fisiológica para mantener la permeabilidad de la membrana (Cohen *et al.*, 2000).

En laboratorios de producción de microalgas utilizadas en granjas de cultivo comercial de camarón en México, se ha visto que *C. muelleri* cultivada a 25 °C, incrementa el ácido graso 20:4 n-6, y en menor medida los 20:5 n-3 y 22:6 n-3 (Sáenz-Gaxiola, 2002).

Comúnmente, los cultivos de microalgas toleran temperaturas entre 16 y 27 °C, donde temperaturas por debajo de 16 °C disminuyen el crecimiento, mientras que una temperatura superior a 35 °C resulta ser letal para un gran número de especies. En este estudio se observó que la microalga *Schizochytrium* sp. LPU-1 utilizado de forma aislada no se recomienda para el cultivo de rotíferos, ya que a una temperatura de 35 °C, las células tienen la capacidad de unirse para formar grupos visibles que sedimentan y se pegan en las paredes del sistema experimental, esta floculación natural complica el fácil acceso de las células libres que pueden ser consumidas por los rotíferos, lo que provoca un aumento en la mortalidad del cultivo.

Por otro lado la baja concentración de *Schizochytrium* sp. LPU-1 (0.041×10^6 células mL⁻¹) que se obtuvo, puede deberse a las altas temperaturas durante la prueba que fue de 32 °C, algunos autores como Chatdumrong *et al.* (2007) y Estudillo-Castle *et al.* (2009), informan que a 25 °C es la temperatura óptima para *Schizochytrium limacinum* y *Schizochytrium mangrovei* respectivamente. Mehlitz (2009) reporta que la temperatura óptima para el cultivo de microalgas es generalmente entre 20 y 24 °C, sin embargo, estos pueden variar según el medio de cultivo, la especie y la cepa utilizada.

La intensidad y regímenes de exposición de luz en los cultivos de microalgas es otro factor crítico en la producción, ya que puede modificar la tasa de crecimiento,

la calidad bioquímica de las microalgas (Falkowski y Raven, 1997) y la fotosíntesis aumenta con el incremento de la intensidad de la luz, hasta alcanzar la tasa de crecimiento específica máxima para cada especie en el punto de saturación de luz (Park *et al.*, 2011) A partir de este punto, comienza la fotoinhibición, con resultados que son perjudiciales para la misma célula, generalmente en los cultivos de microalgas que tienden a exhibir fotoinhibición durante las principales horas del día, debido a la alta intensidad de luz (Martínez, 2008), si la microalga es nativa soportará cambios en la intensidad de luz de la región, en este estudio las microalgas se mantuvieron a 2500 lux, siendo la intensidad de luz para el Pacífico Norte en la región sur de Baja California de 1000 a 5500 lux, (Vázquez *et al.*, 2016).

Diversos estudios han demostrado el efecto de la luz en el contenido de PUFAs en algunas especies de microalgas utilizadas como alimento (*Chaetoceros muelleri*, *Isochrysis galbana*, *Phaedactylum tricornatum* y *Pavlova lutheri*, entre otras) (Carvalho y Malcata, 2005; Nikos e Ian, 2000; Tzovenis *et al.*, 2003). Además, al ser expuestos los cultivos de microalgas a luz ultravioleta (UV-B), se ha visto que modifican la concentración de HUFA en las microalgas. Su efecto dependerá de la especie de microalga y el tiempo de exposición a la radiación de luz UV-B (Ken y Tuu-jiyi, 1994). La intensidad de la luz visible, también pueden modificar los perfiles de ácidos grasos en microalgas, debido a son organismos fotosintéticos, por lo que las condiciones de luz (cantidad y composición espectral) son de importancia para un óptimo crecimiento, modificando las rutas de síntesis metabólicas (Mercado *et al.*, 2004; Tzovenis *et al.*, 2003).

8.2 Objetivo 2

El alimento vivo juega un papel muy importante en la producción de peces, crustáceos y moluscos, en el caso particular de algunos peces marinos, los rotíferos del género *Brachionus* spp., son la primera fuente de alimento exógeno durante el desarrollo larvario, por lo que, si el valor nutricional del rotífero es adecuado, así como su disponibilidad, podemos garantizar una nutrición exógena

adecuada para las etapas larvales. Los rotíferos son organismos filtradores no selectivos que consumen una amplia variedad de fuentes de alimentos (Hotos, 2002; Yin y Zhao, 2008), principalmente algas y diatomeas, varios autores consideran que ofrecen mejores resultados en términos de crecimiento y contribución de los ácidos grasos para los rotíferos (Barclay, 2013; Brown *et al.*, 1997; Torzillo y Vonshak, 2013). Las especies más utilizadas en el cultivo de rotíferos son las algas verdes de los géneros *Nannochloropsis*, *Nannochloris* y *Chlorella*, y se han utilizado en cultivos en masa al proporcionar una alta calidad nutricional al rotífero (Hee-Bae y Bum-Hur, 2011) así como también las diatomeas marinas como *Chaetoceros calcitrans* obteniéndose en los rotíferos buenas tasas de crecimiento poblacional (Ortega-Salas, 2013). El interés en mejorar la alimentación de los rotíferos para uso en acuicultura a un menor costo está aumentando, así como el uso de algas y diatomeas endémicas en la región del Pacífico Norte, área donde el cultivo de organismos latinos tiene especial relevancia económica y ambiental.

En relación al valor nutricional de los rotíferos al ser cultivado con los diferentes tratamientos, se observó que la mezcla de *Schizochytrium* sp. LPU-1/*Chaetoceros* sp. LPU-2 concedió el valor más alto de proteína total y la mezcla de *Chaetoceros* sp. LPU-2/*Chaetoceros* sp. LPU-3 representó el mayor contenido de lípidos. Este resultado nos lleva a comprender que las dos microalgas mezcladas pueden tener una mayor contribución de macronutrientes al rotífero que cuando están aisladas. Pacheco-Vega *et al.* (2015), observaron que *Schizochytrium* sp., tiene una mayor cantidad de ácidos grasos monoinsaturados y saturados, y no contiene DHA ni EPA.

En el estudio se observó la misma similitud en términos de la deficiencia de DHA y EPA, sin embargo, al analizar el T4: *Schizochytrium* sp. LPU-1, hubo una concentración de 7.28% de EPA y 4.36% de DHA, lo que sugiere que el rotífero tiene la capacidad de transformar el ácido linolénico en EPA y DHA. En cuanto al efecto de la composición de las microalgas *Chaetoceros* sp. LPU-2 y *Chaetoceros* sp. LPU-3 en los rotíferos cultivados, podemos decir que el contenido de proteínas

es mayor, 300.2 mg g⁻¹ y 287.20 mg g⁻¹, a lo que se informa para la microalga *Nannochloropsis* sp. 63.24 mg g⁻¹ (Yin *et al.*, 2013), lo que indica que es posible obtener una mayor cantidad de proteína mezclando las algas *Chaetoceros* sp., que utilizar solo una microalga como en el caso de *Schizochytrium* sp. LPU-1.

Por otro lado, se observó que la mezcla de *Schizochytrium* sp. LPU-1/*Chaetoceros* sp. LPU-2 obtenido para el valor más alto de proteína total y la mezcla de *Chaetoceros* sp. LPU-2/*Chaetoceros* sp. LPU-3 representó el mayor contenido de lípidos. Este resultado nos lleva a entender que las dos microalgas mezcladas pueden tener una mayor contribución de macronutrientes al rotífero que cuando están aisladas. Pacheco-Vega *et al.* (2015), observaron que *Schizochytrium* sp., Tiene una mayor cantidad de ácidos grasos monoinsaturados y saturados, y no contiene DHA ni EPA.

Referente a los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) en todos los tratamientos se cuantificaron cantidades significativas de ácido araquidónico ARA (Tabla VII), el cual desempeña un papel muy importante en la producción de eicosanoides (Sargent *et al.*, 1999b), algunos estudios han concluido que se favorece la supervivencia y el crecimiento de larvas de peces marinos cuando el contenido de ARA en el alimento vivo (por ejemplo, *B. plicatilis* y *Artemia nauplii*) es alto. (García *et al.*, 2008; Koven *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2006). En relación con el EPA también se encontraron altas concentraciones en los rotíferos, es importante mencionar que en los tratamientos que involucran *Schizochytrium* sp. LPU-1 también se detectó EPA, por lo que podemos decir que *B. plicatilis* es capaz de producir EPA a partir de ácido linolénico (ALA) a través del alargamiento y desaturación de PUFA de 18 carbonos a PUFA de 20 y 22 carbonos, lo cual es consistente con la hipótesis de Yin *et al.*, 2013, ellos alimentaron rotíferos con la alga *Ulva pertusa* que no es rica en EPA pero si contiene altas cantidades de ALA y esto a su vez llevó a altos niveles de EPA.

Los resultados de los tratamientos T1-T4 fueron particularmente altos para el contenido de DHA, partiendo que las cepas de microalgas resultaron ser

deficientes en este ácido graso, podemos inferir que los rotíferos fueron capaces de seguir la ruta metabólica LNA \rightarrow 20: 3n-3 \rightarrow 20: 4n-3 \rightarrow EPA \rightarrow DPA, y 24: 5n-3 \rightarrow 24: 6n-3 a 22: 6n-3 (DHA) al igual que otras especies (Berje y Barnathan, 2005; Sprecher *et al.*, 1995) y que esta puede ser la razón del alto contenido de DHA.

Es importante considerar el uso de la combinación de especies de microalgas regionales en áreas tropicales y subtropicales para alimentar a los rotíferos para asegurar el menor esfuerzo y costo posible

8.3 Objetivo 3

La mayor parte de la literatura especializada refiere que *Artemia* es un organismo filtrador continuo, no selectivo, que se alimenta de partículas menores a 50 μm (Browne *et al.*, 1991), por lo que el tamaño de las cepas, *Schizochytrium* sp. LPU-1 y *Chaetoceros* sp. LPU-2 3-5 μm y 9-11 μm respectivamente no representó una condicionante para el desarrollo de nauplio a adulto. En este trabajo reportamos una talla más grande en *Artemia* alimentada con *Chaetoceros* sp. LPU-2. *Artemia* es un crustáceo euritérmico, pero generalmente prefiere ambientes relativamente cálidos. Puede sobrevivir a más de 40 $^{\circ}\text{C}$ (Vinatea 1999) por lo que los cultivos que realizaron en este trabajo a temperatura ambiente (32 ± 2 $^{\circ}\text{C}$) no constituyó un factor adverso para el crecimiento y asimilación de los nutrientes durante el desarrollo de *Artemia*. En este estudio se evaluó el cultivo de *Artemia* por 9 días, el tratamiento con la microalga *Chaetoceros* sp. LPU-2 alcanzó una longitud media de 6.03 mm además de llegar a la madurez sexual, misma que se determinó al observar hembras con quistes, los anteriores resultados indican que *A. franciscana* alimentada con *Chaetoceros* sp. LPU-2 necesita menor tiempo para completar su desarrollo a adulto a lo reportado por Castro-Barrera (2003), ella establece una longitud de 10 mm para los adultos de *Artemia*, mientras que Treece (2000) reporta que *Artemia* alcanza su madurez sexual dos semanas después de la eclosión.

Referente a ácidos grasos esenciales, las microalgas no afectaron negativamente a la composición de *Artemia*, a pesar de no ser ricas en PUFAs, pero si contienen ácidos grasos de cadena corta, que pueden servir como material para que los rotíferos sinteticen *de novo* PUFAs de la serie ω -3, lo anterior se sustenta en lo reportado por otros estudios con crustáceos e indican capacidad para la producción endógena de PUFAs como el Branchiopodo *Daphnia pulex*, que mostró un mayor contenido de PUFAs en respuesta a la exposición a baja temperatura (Schlechtriem, 2006), y *Artemia*, con una capacidad aparente para interconvertir ácidos grasos de la serie ω -6 a ω -3 (Ito, 1996; Schauer, 1985), la tasa de síntesis no es tan alta y por esta razón se sugiere realizar un enriquecimiento previo, antes de alimentar las larvas.

8.4 Objetivo 4

Como muchas otras especies de peces marinos en su etapa larvaria el jurel *S. rivoliana* requiere consumir presas vivas para su alimentación. El rotífero *B. plicatilis* es ampliamente utilizado a nivel experimental y comercial como primer alimento de *S. rivoliana* (Mesa-Rodriguez *et al.*, 2014; Roo *et al.*, 2014; Teles *et al.*, 2017). Los jureles en general son consideradas especies de rápido crecimiento llegando a alcanzar 3.5 cm al día 40 después de la eclosión (Papandroulakis *et al.*, 2005) por lo cual es necesario alimentarlos con altos niveles de lípidos y proteínas ya que de esto dependerá que tengan un adecuado desarrollo. Durante el desarrollo del pez, la fase larvaria se inicia al momento de la eclosión, donde depende nutricionalmente de las reservas presentes en el saco vitelino. La finalización de la nutrición a expensas del vitelo (endógena) y el inicio de la alimentación exógena son cruciales para su desarrollo (Rivera y Botero, 2009). en este sentido el enriquecimiento de rotíferos llevado a cabo con algas (monoalgal y en mezclas) así como también con productos comerciales ejemplo, ayudan a cubrir los requerimientos nutricionales de las larvas, en este trabajo probamos la cepa *Chaetoceros* sp LPU-2 como enriquecedor, otorgándole a *B. plicatilis* un contenido total de lípidos de 250,26 mg g⁻¹ lo cual es cercano a lo obtenido por

Watanabe *et al.* (2016) con una mezcla de *Nannochloropsis oculata* y *Tetraselmis chuii*, 353,81 mg g⁻¹ , y superior a los 8,37 mg g⁻¹ reportado por Ma y Qin (2014) con una mezcla de *Nannochloropsis* sp. y *T-Isochrysis* (2:1).

En relación a los parámetros fisicoquímicos estos pueden afectar la supervivencia y crecimiento de las larvas, siendo la temperatura, iluminación, flujo de agua, corrientes, oxígeno disuelto, amonio, salinidad, pH, etc., considerados los más importantes (Merchie *et al.*, 1996). En este trabajo cobra especial relevancia la temperatura del agua que fue en promedio 27.5 °C la cual es más alta que en anteriores trabajos para *S. rivoliana*, siendo 24.71°C la máxima temperatura reportada para cultivos larvarios de esta especie (Mesa-Rodriguez *et al.*, 2014; Roo *et al.*, 2014; Teles *et al.*, 2017) lo que repercutió directamente en el desarrollo de la larva ya que a las 24 h después de la eclosión se encontraban preparadas para la primera alimentación.

9. CONCLUSIONES

-En este estudio, podemos demostrar que el uso de especies de microalgas del Pacífico Norte, *Schizochytrium* sp. LPU-1, *Chaetoceros* sp. LPU-2 y *Chaetoceros* sp. LPU-3 son viables para el cultivo de rotíferos.

-Las cepas *Schizochytrium* sp. LPU-1, *Chaetoceros* sp. LPU-2 y *Chaetoceros* sp. LPU-3 administradas ya sea en forma monoalgal o en mezclas mejoran el valor nutricional de *B. plicatilis*.

-La diatomea *Chaetoceros* sp. LPU-2 es una excelente monodieta que optimiza el crecimiento de *A. franciscana*, así como también mejora el contenido nutricional de adultos de *Artemia*.

- El proceso de enriquecimiento magnifica el contenido de macronutrientes en *B. plicatilis*.

- El uso de microalgas endémicas como *Schizochytrium* sp. LPU-1, *Chaetoceros* sp. LPU-2 y *Chaetoceros* sp. LPU-3, son una alternativa económica para realizar cultivos masivos al exterior en zonas tropicales.

10. LITERATURA CITADA

Abreu-Grobois, F. A., R. Briseño-Dueñas, M. A. Herrera, M.L. Malagón. 1991. A model for growth of *Artemia franciscana* cultures based on food ration-dependent gross growth efficiencies. *Hydrobiologia* 212:27-37.

Amat-Domenech F. 1979. Diferenciación y distribución de las poblaciones de *Artemia* (Crustáceo: Branquiópodo) de España. Tesis Doctoral. Barcelona, España, 251 p.

Andersen, R. A., 1996. In: Hunter-Cevera, J.C., Belt, A. (eds.), *Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry*. Academic Press, San Diego, pp. 29-64.

Atalah, E., C. M. Hernández-Cruz, M. S. Izquierdo, G. Rosenlund, M. J. Caballero, A. Valencia, L. Robaina. 2007. Two microalgae *Cryptocodinium cohnii* and *Phaeodactylum tricorutum* as alternative source of essential fatty acids in starter feeds for seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 270:178–185.

Balduyck, L., K. Goiris, C. Bruneel, K. Muylaert, I. Foubert. 2015. Stability of Valuable Components during Wet and Dry Storage. En: Kim, S.-K (ed.). *Handbook of Marine Microalgae, Biotechnology Advances*. Editorial Elsevier. Primera Edición. Londres, Reino Unido. pp 81-91.

Barclay, K. W. 2013. Strategies for bioprospecting microalgae for potential commercial applications. En: Richmond, A. y Q. Hu (eds.). *Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology*. Blackwell Publishing Ltd., pp. 69-79.

Barnes, H. y J. Blackstock. 1973. Estimation of lipids in marine animal tissues: detailed investigation of the sulphophosphovanillin method for total lipids. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 12: 103-118.

Barreiros, J. P., Morato, T., Santos, R. S. y De Borja, A.E. 2003. Interannual changes in the diet of the almaco jack, *Seriola rivoliana* (Perciformes: Carangidae) from The Azores. *Cybium* 27(1):37-40.

Benetti D. D.1997. Spawning and larval husbandry of flounder (*Paralichthys woolmani*) and Pacific yellowtail (*Seriola mazatlana*), new candidate species for aquaculture. *Aquaculture* 155: 307–318.

Benetti D. D. 2000. Aquaculture of Pelagic Marine Fish: I. Yellowtail amberjacks (*S. quinquerradiata*, *S. lalandi*, *S. dumerili* and *S. mazatlana*). *Global Aquaculture Advocate* 4, 20.

Bell J. G., J. R. Sargent. 2003. Arachidonic acid in aquaculture feeds: current status and future opportunities. *Aquaculture* 218:491–499.

Berge, J. P. y G. Barnathan. 2005. Fatty acids from lipids of marine organisms; molecular biodiversity, roles as biomarkers, biologically active compounds, and economical aspects. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 96: 49-125.

Blacio E., J. Darquea, S. Rodríguez. 2003. Avances en cultivo de huayaípe, *Seriola rivoliana* (Valeciennes 1833) En las instalaciones del Cenaim. *El mundo acuícola* 9: 21–24.

Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.

Brown, M., R., Jeffrey, S.W., Volkman J.K. y G.A. Dunstan. 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, 151: 315-331.

Brown, M. R. 2002. Nutritional value and use of microalgae in aquaculture. En: Cruz-Suárez LE, D Ricque-Marie, M Tapia-Salazar, MG Gaxiola-Cortés y N Simoes (eds). *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de -Nutrición Acuícola*, Cancún, pp. 281-292.

Cardona-Pascual, L. 1993. Otras especies de peces con interés en acuicultura. 467-476. En Castelló-Orvay F. (ed.) *Acuicultura Marina: Fundamentos biológicas y tecnologías de la producción*. Universidad de Barcelona 739 pp.

Carpenter, P. L. 1977. *Microbiology*. Cuarta edición. Thompson Learning. 500 p.

Carvalho, A. P. y Malcata, F. X. 2005. Optimization of ω -3 fatty acid production by microalgae: crossover effects of CO₂ and light intensity under batch and continuous cultivation modes. *Mar. Biotechnol.* 7(4): 381-388.

Castro B. T, J. Castro, G. Castro, R. De Lara. 2001. Técnicas de cultivo de especies planctónicas e invertebrados útiles para la acuicultura, Div. CBS.UAM. Xochimilco.

Cho, S. H., Hur, S.B. y Jo, J. Y. 2001. Effect of enriched live feeds on survival and growth rates in larval Korean rockfish, *Sebastes schlegeli* Hilgendorf. *Aquac. Res.* 32:199-208.

Ciros-Pérez, J., Gómez, A., Serra, M., 2001. On the taxonomy of three sympatric species of the *Brachionus plicatilis* (rotifer) complex from Spain, with the description of *B. ibericus* n. sp. *J. Plankton Res.* 23, 1311–1328.

Cohen, Z., Khozin-Goldberg, I., D. Adlerstein, I. y Bigogno, C. 2000. The role of triacylglycerol as a reservoir of polyunsaturated fatty acids for the rapid production of chloroplastic lipids in certain microalgae. *Biochem. Soc. Trans.* 28(6): 740-743.

Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca (CONAPESCA). 2013. Anuario Estadístico de Acuacultura y Pesca 2013. Impreso en México. 299 p.

Conklin, D. E., 1995. Digestive physiology and nutrition. En: Factor, J.R. (Ed.), *Biology of the Lobster *Homarus americanus**. Academic Press, San Diego, California. pp. 441–458.

Copeman L. A., Parrish C.C., Brown J.A. y Harel M. 2002. Effects of docosahexaenoic, eicosapentaenoic, and arachidonic acids on the early growth, survival, lipid composition and pigmentation of yellowtail flounder (*Limanda ferruginea*): a live food enrichment experiment. *Aquaculture* 210, 285–304.

Dehasque, M., De Wolf, T., Candreva, P., Coutteau, P., Sorgeloos, P., 1998. Control of bacterial input through the live food in marine fish hatcheries. En: Grizel, H., Kestemont, P. Ž Eds., *Aquaculture and Water: Fish Culture, Shellfish Culture and Water Usage. Abstracts of Contributions Presented at the International Conference Aquaculture Europe '98, Bordeaux, France, October 7–10*. Eur. Aqua. Soc., Oostende, pp. 66–67.

Dominguez, H. 2013. *Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals*. Elsevier.

Duert, F., Rombaut, G, Sauntika, G. y Sorgeloos, P. 2001. Advancement of rotifer culture and manipulation techniques in Europe. *Aquaculture* 200:129-146.

Espinoza, N., Escala, E. y Blacio, E. 2009. Estudio de la factibilidad técnica y económica del cultivo de huayaipe (*Seriola rivoliana*) en piscinas con y sin geomembranas. Guayaquil, Ecuador CENAIM-ESPOL.

Evjemo, J. O., Y. Olsen. 1999. Effect of food concentration on the growth and production rate of *Artemia franciscana* feeding on algae (T.iso). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 242:273-296.

Falkowski, P. G. y Raven, J. A. 1997. *Aquatic Photosynthesis*. Blackwell, Oxford. 375 pp.

FAO. 2000. *FAO yearbook. Fisheries Statistics: capture production 2000*. FAO Series No. 60. Rome Italy, FAO:

FAO. 2018. *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos*. Roma 224 pp.

Fábregas, J., A. Otero, E. Morales, B. Cordero, M. Patiño. 1996. *Tetraselmis suecica* cultured in different nutrient concentrations varies in nutritional value to *Artemia*. *Aquaculture*. 143:197-204.

Faulk C.K. y Holt G.J. (2003) Lipid nutrition and feeding of Cobia *Rachycentron canadum* larvae. *J. World Aquacult. Soc.* 34:368–378.

Faulk C.K., G.J. Holt, D.A. Davis. 2005. Evaluation of fatty acid enrichment of live food for yellowtail snapper *Ocyurus chrysurus* larvae. *J. World Aquacult. Soc.* 36: 271–281.

Fehér M., E. Baranyai, E. Simon, P. Bársony, I. Szűcs, J. Posta, L. Stündl. 2013. The interactive effect of cobalt enrichment in *Artemia* on the survival and larval growth of barramundi, *Lates calcarifer*. *Aquaculture*. 414-415:92-99.

Folch J., M. Lees, G.H.S. Stanley. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. of Biol. Chem.* 226:497–509.

Gamallo, Y. 1992. Cultivo de *Artemia* sp. con microalgas marinas: crecimiento, supervivencia, reproducción y composición bioquímica. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela, España. 180 pp.

García, A. S., C. C. Parrish y J. A. Brown. 2008. A comparison among differently enriched rotifers (*Brachionus plicatilis*) and their effect on Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae early growth, survival and lipid composition. *Aquacult. Nutr.* 14:14-30.

García-Ulloa, G. M., J. Gamboa, J. L. Zavala, T. Ogura, P. Lavens. 1999. Influence of different diets on length and biomass production of brine shrimp *Artemia franciscana* (Kellog, 1906). *Bul. Mar. Coast. Res.* 28:7-18.

Gelabert, R., A. De la Cruz. 1990. La selección del tamaño de partículas alimenticias por *Artemia* (Brachiopoda). *Rev. Invest. Mar.* 9:63-69.

Godínez, D. E., M. Carmen-Gallo, R. Gelabert, A. Díaz, J. Gamboa, V. Landa, R. Godínez. 2004. Crecimiento larvario de *Artemia franciscana* (Kellog, 1906) alimentada con dos especies de microalgas vivas. *Zootec. Trop.* 22,:265-275.

Hakim A. R. 2012. The potencial of heterotrophic microalgae (*Schizochytrium* sp.) as a source of DHA. *Squalen.* 7:29-38.

Hamre K., I. Opstad, M. Espe, J. Solbakken, G. I. Hemre, K. Pittman. 2002. Nutrient composition and metamorphosis success of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*, L.) larvae fed natural zooplankton or *Artemia*. *Aquacult. Nutr.* 8:139-148.

Hasle, G. R., E. E. Syvertsen, K. A. Steidinger, K. Tangen. 1996. Identifying Marine Diatoms and Dinoflagellates. Academic Press. Harcourt Brace y Company. San Diego, California. 613 p.

Hee-Bae, J., S. Bum-Hur. 2011. Selection of Suitable Species of *Chlorella*, *Nannochloris* and *Nannochloropsis* in High-and Low-Temperature Seasons for Mass Culture of the Rotifer *Brachionus plicatilis*. J. Fish. Aquat. Sci. 14:323-332.

Helm, M. y N. Bourne. 2006. Cultivo de bivalvos en criadero. Un manual práctico. FAO Documento Técnico de Pesca 471:1-198.

Hemaiswarya, S., R. Raja, R. Ravi-Kumar, V. Ganesan, C. Anbazhagan. 2011. Microalgae: a sustainable feed source for aquaculture. World J. Microb. Biot 27:1737-1746.

Hernández-Rubio, J. S. 2015. Inmunoestimulación por alimentos artificiales adicionados con microalgas marinas sobre postlarvas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis (Maestría en Ciencias marinas y Costeras). La paz, Baja California Sur, México. Universidad Autónoma de Baja California Sur. 64 p.

Hoff, H. H., T. W. Snell. 2001. Plancton Culture Manual. Quinta edición. Florida Aqua Farms, Inc. Dade City, Florida. 183 p.

Hotos, G.N. 2002. Selectivity of the rotifer *Brachionus plicatilis* fed mixtures of algae species with various cell volumes and cell densities. Aquac. Res. 33:949–957.

Iglesias, J., Sánchez, J., Bersanob, J., Carrasco, J., Dhont, J., Fuentes, L., Linares, F., Muñoz, J., Okumura, S., Roo, J., van derMeeren, T., Vidal, E., Villanueva, R., 2007. Rearing of *Octopus vulgaris* paralarvae: present status, bottlenecks and trends. Aquaculture 266:1-15.

Ito, M. K.; K. L. Simpson. 1996. The biosynthesis of omega 3 fatty acids from 18:2 omega 6 in *Artemia* spp. Comp. Biochem. Physiol. 115: 69-76.

Kamlangdee N., K. W. Fan. 2003. Polyunsaturated fatty acids production by *Schizochytrium* sp. isolated from mangrove. J. Sci.Tech. 25:643-650.

Ken, S., C. Tuu-ji. 1994. Reduction in omega-3 fatty acids by UV-B irradiation in microalgae. J. Appl Phycol. 6:415-421.

Knauer, J., P. Southgate. 1999. A review of the nutritional requirements of bivalves and the development of alternative and artificial diets for bivalve aquaculture. Rev. Fish Sci. 7:241-280.

Koven W. M., A. Tandler, D. Sklan, G. W. Kissil. 1993. The association of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in the main phospholipids of different age *Sparus aurata* larvae with growth. *Aquaculture* 116:71-82.

Koven, W., Y. Barr, S. Lutzky, I. Ben-Atia I, R. Weiss, M. Harel, P. Behrens, A. Tandler. 2001. The effect of dietary arachidonic acid (20:4n-6) on growth, survival and resistance to handling stress in gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture*. 193:107-122.

Laidley C. W., R.J. Shields, A.O. Ostrowski. 2004. Progress in amberjack culture at the Oceanic Institute in Hawaii. *Global Aquaculture Advocate* 7:42-43.

Lavens, P., P. Sorgeloos. 1991. Production of *Artemia* in culture tanks. En: Browne, R.A.; P. Sorgeloos y C.N.A. Trotman (Eds). *Artemia biology*. CRC press. Boca Ratón, Florida, USA. pp 317- 350.

Lavens, P., Sorgeloos, P. 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Fishery Technical Papers. 361, 265 pp.

Lora-Vilchis, M. C., D. Voltolina. 2003. Growth and Survival of *Artemia franciscana* (Kellogg) Fed with *Chaetoceros muelleri* Lemmerman and *Chlorella capsulata* Guillard. *Rev. Invest. Mar.* 24(3):241-246.

Lora-Vilchis, M. C., B. Cordero-Esquivel, D. Voltolina-Lobina. 2004. Growth of *Artemia franciscana* fed with *Isochrysis* sp. and *Chaetoceros muelleri* during its early life stages. *Aquac. Res.* 35:1086-1091.

Lubzens, E., A. Tandler, G. Minkoff. 1989. Rotifers as food in aquaculture. *Hydrobiologia.* 358:13-20.

Lubzens, E., G. Minkoff, Y. Barr, O. Zmora. 1997. Mariculture in Israel-past achievements and future directions in raising rotifers as food for marine fish larvae. *Hydrobiologia.* 446:337-353.

Lubzens, E., O. Zmora, Y. Barr. 2001. Biotechnology and aquaculture of rotifers. *Hydrobiologia.* 186:387-400.

Ma, Z., J. G. Qin. 2014. Replacement of fresh algae with commercial formulas to enrich rotifers in larval rearing of yellowtail kingfish *Seriola lalandi* (Valenciennes, 1833). *Aquac. Res.* 45:949-960.

Makridis, P., C. Moreira, R. Alves-Costa, P. Rodrigues, M. T. Dinis. 2009. Use of microalgae bioencapsulated in *Artemia* during the weaning of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup). *Aquaculture.* 292:153-157.

Malpica, A., T. Castro, H. Sandoval, J. Castro, R. De Lara, G. Castro. 2004. Composición del contenido de ácidos grasos en tres poblaciones mexicanas de *Artemia franciscana* de aguas epicontinentales. *Rev. Biol. Trop.* 52:297-300.

Marques, A., J. Dhont, P. Sorgeloos, P. Bossier. 2004. Evaluation of different yeast cell wall mutants and microalgae strains as feed for gnotobiotically grown brine shrimp *Artemia franciscana*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 312:115-136.

Marshall, R., S. Mckinley, C. Pearce. 2010. Effects of nutrition on larval growth and survival in bivalves. *Rev. Aquacult.* 2:33-55.

Martínez, L. 2008. Eliminación de CO₂ con microalgas autóctonas. Tesis Doctoral, Instituto de Recursos Naturales, Universidad de León, León, 226 pp.

Martínez-Córdova, L. R., A. Campaña-Torres, M. Martínez-Porchas, J. A. López-Elías, C. O. García-Sifuentes. 2012. Effect of alternative mediums on production microalgae *Chaetoceros muelleri* as food in culture of the copepod *Acartia* sp. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 40:169-176.

Mehlitz, T. H. 2009. Temperature Influence and Heat Management Requirements of Microalgae Cultivation in Photobioreactors. Tesis de Maestría. California Polytechnic State University. San Luis Obispo. 148pp.

Méndez-Martínez, Y., M. U. García-Guerrero, M. C. Lora-Vilchis, L. R. Martínez-Córdova, F. G. Arcos-Ortega, J. J. Alpuche, E. Cortés-Jacinto. 2018. Nutritional effect of *Artemia* nauplii enriched with *Tetraselmis suecica* and *Chaetoceros calcitrans* microalgae on growth and survival on the river prawn *Macrobrachium americanum* larvae. *Aquacult. Int.* 26:1001-1015.

Mercado, J. M., M.P. Sánchez-Saavedra, J. Gabriel Correa-Reyes, L. Lubián, Olimpio Montero y Félix L. Figueroa. 2004. Blue light effect on light absorption characteristics and photosynthesis of five benthic diatom species. *Aquatic Bot.* 78:265-277.

Merchie, G., P. Lavens, P. Storch, U. Übel, H. Nelis H.1996. Influence of dietary vitamin C dosage on rodaballo (*Scophthalmus maximus*) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) nursery stages. *Comp. Biochem. Physiol.* 114:123-133.

Mesa-Rodríguez, A., C. M. Hernández-Cruz, J. A. Socorro, H. Fernández-Palacios, M. S. Izquierdo, J. Roo. 2014. Skeletal development and mineralization pattern of the vertebral column, dorsal, anal and caudal fin complex in *Seriola Rivoliana* (Valenciennes, 1833) larvae. *J. Aquac. Res. Development.* 5:266.

Moreno, J. L., S. Licea, S., H. Santoyo. 1996. Diatomeas del Golfo de California. La Paz, B.C.S. México: Universidad Autónoma de Baja California Sur, SEP-FOMES; PROMARCO. 272 p.

Nakada M. 2002. Yellowtail culture development and solutions for the future. *Rev. Fish Sci.*10:559–575.

Naegel, L. 1999. Controlled production of *Artemia* biomass using an inert commercial diet, compared with the microalgae *Chaetoceros*. *Aquac. Eng.* 21:49-59.

Nikos, L., A. L. Ian. 2000. The nutritional value of algae grown under different culture conditions for *Mytilus edulis* L. larvae. *Aquaculture*. 182:301-315.

Øie, G., K. I.Reitan, J. O. Evjemo, J. Støttrup, Y. Olsen, Y. 2011. Live feeds, En: Holt, G.J. (ed.). *Larval Fish Nutrition* Primera edición. John Wiley & Sons. pp 307–334.

Ortega-Salas, A., C. Reyes, H. Reyes-Bustamante. 2013. Population and cyst production of the rotifer *Brachionus plicatilis* (Monogonta:Brachionidae) fed with different diets. *Cuadernos de Investigación UNED* 5:2.

Ortells, R., A. Gómez, M. Serra. 2003. Coexistence of cryptic rotifer species, ecological and genetic characterization of *Brachionus plicatilis*. *Freshwater Biology* 48:2194-2202.

Pacheco-Vega, J. M., M. A. Cadena-Roa, F. Ascencio-Valle, C. Rángel-Davalos, M. Rojas-Contreras. 2015. Assessment of endemic microalgae as potencial food for *Artemia franciscana* culture. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 43(1): 23-32.

Park, H. G., V. Puvanendran, A. Kellett, C.C. Parrish y J.A. Brown. 2006. Effect of enriched rotifers on growth, survival, and composition of larval Atlantic cod (*Gadus morhua*). *ICES J. Mar. Sci.* 63:285-295.

Park, J., R. Craggs y A. Shilton. 2011. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Biores. Technol.* 102:35-42.

Patil, V., T. Kallqvist, E. Olsen, G. Vogt, H. R. Gislerød. 2007. Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed. *Aquacult. Int.* 15:1-9.

Papandroulakis N., C. Mylonas, E. Maingot, P. Divanach. 2005. First results of greater amberjack (*S. dumerili*) larval rearing in mesocosm. *Aquaculture*. 250:155-161.

Ponis, E., I. Probert, B. Véron, M. Mathieu, R. Robert. 2006. New microalgae for the Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Aquaculture* 253: 618-627.

Poortenaar C. W., S.H. Hooker, N. Sharp. 2001. Assessment of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi lalandi*) reproductive physiology, as a basis for aquaculture development. *Aquaculture*. 201:271-286.

Raja, R., C. Anbazhagan, D. Lakshmi, R. Rengasamy. 2004. Nutritional studies on *Dunaliella salina* (Volvocales, Chlorophyta) under laboratory conditions. *Seaweed Res. Util.* 26:127-146.

Rehberg-Haas, S., S. Meyer, S. Lippemeier, C. Schulz. 2015. A comparison among different *Pavlova* sp. products for cultivation of *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture*. 435:424-430.

Renaud, S., T. Luong-Van, G. Lambrinidis, D. Parry. 2002. Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture*. 211:195-214.

Rivera, C. M., Z. M. Botero. 2009. Alimento vivo enriquecido con ácidos grasos para el desarrollo larvario de peces. *Rev Colomb Cienc Pecu.* 22:607-618

Rocha, G. S, T. Katan, C. C. Parrish, A. K. Gamperl. 2017. Effects of wild zooplankton versus enriched rotifers and *Artemia* on the biochemical composition of Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae. *Aquaculture*. 479:100-113.

Rodríguez -De la Cruz, M.C., M. R. Palacios-Fest, R. Cruz-Santabalbina, C.I. Diaz- Pulido. 1994. Atlas pesquero de México. SEPESCA, INP (ed). México. 234 p.

Roe, J. H., J. H. Epstein, N. P. Golstein. 1949. A photometric method for determination of inulin in plasm and urine. *J. Biol. Chem.* 178:839-845.

Rojo-Cebreros, A. H., M. E. Morales-Plascencia, L. Ibarra-Castro, J. M. Martínez-Brown, M.A. Medina-Jasso. 2016. Floculación de *Nannochloropsis* sp. inducida por hidróxido de sodio: eficiencia de floculación, efecto sobre la viabilidad microalgal y su uso como alimento para rotíferos. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 44(4):662-670.

Roo, J., H. Fernández-Palacios, C. M. Hernández-Cruz, A. Mesa-Rodríguez, D. Schuchardt, M. Izquierdo. 2014. First results of spawning and larval rearing of longfin yellowtail *Seriola rivoliana* as a fast-growing candidate for European marine finfish aquaculture diversification. *Aquac. Res.* 45:689-700.

Palmtag, M.R., C.K. Faulk, G.J. Holt. 2006. Highly unsaturated fatty acid composition of rotifers (*Brachionus plicatilis*) and *Artemia* fed various enrichments. J. World Aquacult. Soc. 37:126-131.

Saenz-Gaxiola, L. M. 2002. Efecto de la temperatura e intensidad de luz sobre la composición de ácidos grasos de tres microalgas marinas utilizadas comúnmente para la alimentación de larvas de camarón *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada. Ensenada Baja California. México. 92 pp.

Sakura, Y. y K. Tsukamoto. 1999. Ontogeny of aggressive behaviour in schools of yellowtail *Seriola quinqueradiata*. Environ. Biol. Fish. 56:231-242.

Sarasquete C., M. L. Gonzalez de Canales, J. M. Arellano, J. A. Munoz-Cueto, L. Ribeiro, M. T. Dinis. 1996. Histochemical aspects of the yolk-sac and digestive tract of larvae of the Senegal sole, *Solea senegalensis* (Kaup, 1858). Histol. Histopathol. 11:881-888

Sargent J., Bell G., McEvoy L., Tocher D. y Estevez A. 1999a. Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. Aquaculture 177:191-199.

Sargent J., L. McEvoy, A. Estevez, G. Bell, M. Bell, J. Henderson, D. Tocher. 1999b. Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. Aquaculture. 179:217-229.

Sargent, J., L. McEvoy, J. Bell. 1997. Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. Aquaculture. 155:117-128.

Sarker P. K, A. R. Kapuscinski, A. J. Lanois, E. D. Livesey, K. P. Bernhard, M. L. Coley. 2016. Towards Sustainable Aquafeeds: Complete Substitution of Fish Oil with Marine Microalga *Schizochytrium* sp. Improves Growth and Fatty Acid Deposition in Juvenile Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). Plos One. 11(6): e0156684.

Sato, N. y N. Murata. 1988. Membrane lipids. Method. Enzymol.167: 251-259.

Schauer, P. S., K. L. Simpson. 1985. Bioaccumulation and bioconversion of dietary labeled fatty acid in *Artemia* and winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 42:1430–1438.

Schlechtriem, C., M. T. Arts, I. D. Zellmer. 2006. Effect of temperature on the fatty acid composition and temporal trajectories of fatty acids in fasting *Daphnia pulex* (Crustacea, Cladocera). Lipids. 41:397–400.

Seixas, P., M. Rey-Méndez, L. M. P. Valente, A. Otero. 2008. Producing juvenile *Artemia* as prey for *Octopus vulgaris* paralarvae with different microalgal species of controlled biochemical composition. *Aquaculture*. 283:83-91.

Seychelles, L. H., C. Audet, R. Trembley, R. Fournier, F. Pernet. 2009. Essential fatty acid enrichment of cultured rotifers (*Brachionus plicatilis*, Muller) using frozen-concentrated microalgae. *Aquacult. Nutr.* 15:431-439.

Sick, L.V. 1976. Nutritional effect of five species of marine algae on the growth, development, and survival of the brine shrimp *Artemia salina*. *Mar. Biol.* 35:69-78.

Spolaore, P., C. Joannis-Cassan, E. Duran, A. Isambert. 2006. Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* 101:87-96.

Sprecher, H., D. L. Luthria, B. S. Mohammed y S.P. Baykousheva. 1995. Re-evaluation of the pathways for the biosynthesis of polyunsaturated fatty acids. *J. Lipid Res.* 36: 2471-2477.

Teles, A., J. Salas-Leiva, C. A. Alvarez-González, E. Gisbert, L. Ibarra-Castro, J. C. Pérez Urbiola, D. Tovar-Ramírez. 2017. Histological study of the gastrointestinal tract in longfin yellowtail (*Seriola rivoliana*) larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 43:1613-1628.

Theilacker, G. H. 1971. Mass culture of the rotifer *Brachionus plicatilis* and its evaluation as food for larval anchovies. *Mar. Biol.* 10:183-188.

Theilacker, G. H. 1986. Starvation-induced mortality of sea-caught jack mackerel, *Trachurus symmetricus*, determined with histological and morphological methods. *Fish. Bull.* 84:1-17.

Thompson, P. A., M. Guo, P. J. Harrison. 1992. Effects of variation of temperature: I. On the biochemical composition of eight species of marine phytoplankton. *J. Phycol.* 28:481-488.

Thompson, P. A., P. J. Harrison, J. N. C. Whyte. 1990. Influence of irradiance on the fatty acid composition of phytoplankton. *J. Phycol.* 26: 278-288.

Thinh, L. V., S. M. Renaud, D. L. Parry. 1999. Evaluation of recently isolated Australian tropical microalgae for the enrichment of the dietary value of brine shrimp, *Artemia* nauplii. *Aquaculture*. 170:161-173.

Trusty, M. F., D.R. Fiore, J. S. Goldstein. 2005. Use of formulated diets as replacement for *Artemia* in the rearing of juvenile American lobsters (*Homarus americanus*). *Aquaculture*. 250:781-795.

Tocher, D. R., G. Mourente, J. R. Sargent. 1997. The use of silages prepared from fish neural tissues as enrichers for rotifers (*Brachionus plicatilis*) and *Artemia* in the nutrition of larval marine fish. *Aquaculture*. 148: 213-231.

Torzillo, G y A. Vonshak. 2013. Environmental stress physiology with reference to mass cultures. En: A. Richmond y Q. Hu. (eds.). *Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology*. Blackwell Publishing Ltd. pp. 90-113.

Treece, G. D. 2000. Brine Shrimp Culture. En: Stickney, R. R., W. Griffin, R. Hardy, S. K. Johnson, M. Rudy, G. Treece, G. Wedemeyer G (eds.). *Encyclopedia of Aquaculture*. John Wiley and Sons, New York. pp. 1037-1044.

Tzovenis, I., N. De Pauw, P. Sorgelos. 2003. Optimization of T-ISO biomass production rich in essential fatty acids. II Effect of different light regimes on growth and biomass production. *Aquaculture*. 216:203-222.

Vázquez -Pérez, R. N., F. Hernández-Uribe, M. M. Villegas-Aguilera, R. Martínez-Murillo, K. E. López-García, C. E. Pérez-Barragán y B.O. Arredondo Vega. 2016. Evaluación del contenido de proteínas de la biomasa de *Spirulina* (*Arthrospira*) *máxima* cultivada en condiciones ambientales en Bioreactores. *Invest. Des. Cienc. Technol. Alim.* 1(1):333-337.

Vinatea A. L. 1999. Manual de producción de *Artemia* (quistes y biomasa) en módulos de cultivo. CYTED. Proyecto II-A/2. UAM, Xochimilco, Div. CBS. 47 pp.

Watanabe T. 1993. Importance of docosahexaenoic acid in marine larval fish. *J. World Aquacult. Soc.* 24:152-161.

Watanabe T., V. Kiron. 1994. Prospects in larval fish dietetics. *Aquaculture*. 124: 223-251.

Watanabe, W. O., Md. S. Alama, A. D. Ostrowskia, F. A. Montgomery, J. E. Gabela, J. A. Morris Jr., P. J. Seatonca. 2016. Live prey enrichment and artificial microdiets for larviculture of Atlantic red porgy *Pagrus pagrus*. *Aquacult. Rep.* 3:93-107

Woolley, L. D., G. J. Partridge, J. G. Qin. 2012. Mortality reduction in yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) larval rearing by optimising *Artemia* feeding regimes. *Aquaculture*. 344-349:161-167.

Yamazaki, H., S. Shiozawa, H. Fujimoto. 2002. Present status of seeding production of yellowtail at Japan Sea Farming Association. *Suisanzoshoku* 50:503-506. (en japonés).

Yin, X. W., W. Zhao. 2008. Studies on life history characteristics of *Brachionus plicatilis* O. F. Müller (Rotifera) in relation to temperature, salinity and food algae. *Aquat. Ecol.* 42:165-176.

Yin, X. W., W. W. Min, H. J. Lin, W. Chen. 2013. Population dynamics, protein content, and lipid composition of *Brachionus plicatilis* fed artificial microalgal detritus and *Nannochloropsis* sp. diets. *Aquaculture.* 380-383:62-69.

Ying, L., M. Kangsen. 2005. Effect of growth phase on the fatty acid compositions of four species of marine diatoms. *J. Ocean. U. China.* 4(2):157-162.

11. ANEXOS

1. Método para la siembra de las cepas de microalgas

1) Llenar matraces de 125 mL hasta 100 mL con agua marina y agregar .1 mL de soluciones primarias de, vitaminas, macronutrientes, micronutrientes y silicatos (F/2), poner tapón de algodón y capuchón de aluminio, esterilizar por 20 minutos a una presión de 15 psi.

2) Para la siembra, aflojar los tapones de los matraces de la cepa y el medio, flamear apertura del matraz cepa y por decantación agregar 25 mL de al medio, flamear ambos matraces y cerrar.

2. Metodología para el escalamiento de cultivos de microalgas

1) Llenar matraces de 1000 mL hasta 900 mL con agua marina y agregar 1 mL de soluciones primarias de, vitaminas, macronutrientes, micronutrientes y silicatos (F/2), poner varilla de vidrio, tapón de algodón y capuchón de aluminio, esterilizar por 20 minutos a una presión de 15 psi.

1) Para la siembra, aflojar los tapones de los matraces de la cepa y el medio, flamear apertura del matraz cepa y por decantación agregar 100 mL de al medio, flamear ambos matraces y cerrar.

3) Conectar la varilla a una fuente de aire, sanitizar la manguera previamente, ajustar la presión a un burbujeo suave.

4) Dos días posteriores a la siembra, preparar garrafones de 19 L, llenar totalmente e introducir manguera para aireación, agregar por cada litro de agua 1 mL de hipoclorito de sodio comercial, después de 24 horas, neutralizar con Tiosulfato de sodio a una razón de 0.05 g mL^{-1} de hipoclorito de sodio y agitar vigorosamente.

5) Una vez neutralizado el cloro, se agrega 900 mL del matraz por garrafón, se conecta a la aireación.

6) Tres días posteriores a la siembra en garrafón, preparar columnas de 400 L, llenarlas hasta 380 L, y agregar por cada litro de agua 1 mL de hipoclorito de sodio comercial, después de 24 horas, neutralizar con Tiosulfato de sodio a una razón de 0.05 g mL^{-1} de hipoclorito de sodio y conectar a la aireación.