

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
Licenciatura en Biotecnología en Acuicultura



“Efecto del enriquecimiento de alimento vivo en el perfil de aminoácidos y ácidos grasos de rotífero (*Brachionus plicatilis*)”

TESIS

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE

LICENCIADO BIOTECNOLOGÍA EN ACUACULTURA

PRESENTA

Edgar Alexis López Lucero

Ensenada, Baja California, México, junio del 2022



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS



TESIS

“Efecto del enriquecimiento de alimento vivo en el perfil de aminoácidos y ácidos grasos de rotífero (*Brachionus plicatilis*)”

Presentada por:

EDGAR ALEXIS LÓPEZ LUCERO

Aprobada por el comité:



Dr. FERNANDO BARRETO CURIEL

Presidente del Jurado



Dr. MARIO ALBERTO GALAVIZ ESPINOZA

Sinodal Propietario



M. en C. ROSARIO JARA MONTAÑEZ

Sinodal Propietario



M en C. ÁNGEL RAÚL HERRERA GUTIERREZ

Sinodal Propietario

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO.

junio de 2022

RESUMEN de tesis para obtener el grado de Licenciado en Biotecnología en Acuicultura que presenta **Edgar Alexis López Lucero** como requisito parcial para su titulación en la Facultad de Ciencias Marinas. Ensenada, Baja California, México. Junio 2022

“Efecto del enriquecimiento de alimento vivo en el perfil de aminoácidos y ácidos grasos de rotífero (*Brachionus plicatilis*)”

Resumen aprobado por:

Dr. Fernando Barreto Curiel

El alimento vivo (fitoplancton y zooplancton) forman parte indispensable para crianza y supervivencia en el cultivo de peces, moluscos y crustáceos. Especialmente, el rotífero (*Brachionus plicatilis*), el cual es uno de los más utilizados como alimento en larvas de peces, debido a que cuenta con características específicas, tal como, su tamaño microscópico (100-300 μ) y su acelerada reproducción. Por otro lado, también presenta desventajas, las cuales se ven reflejadas en la composición bioquímica-nutricional del organismo. Debido a esto, el objetivo de este trabajo fue realizar el enriquecimiento del rotífero con diferentes fuentes alimenticias y determinar el efecto significativo en los análisis proximales (proteínas, lípidos, extracto libre de nitrógeno, cenizas y humedad) y su perfil de aminoácidos y ácidos grasos. Los rotíferos se alimentaron con cuatro mezclas de dietas comerciales, conocidas como enriquecedores (Rotigrow Plus + levadura de pan; ORI-ONE; Rotigrow OneStep y Rotigrow Plus + levadura de pan + enriquecimiento). La unidad experimental consistió en cuatro tanques cilíndricos de 100 litros de volumen, llevado a cabo por el método de batch o bloqueo por tiempo, cuya densidad inicial fue de 25 millones de organismos (250 rot/ml) por tanque y la ración diaria fue suministrada con base en lo descrito por el fabricante del enriquecedor. Los resultados obtenidos en los análisis proximales indicaron que la dieta de Rotigrow + levadura de pan tienen una mayor cantidad de proteína cruda (60.22%), sin embargo, respecto a los lípidos totales la dieta ORI-ONE presentó un mayor contenido lipídico de 14.23%. En el caso del perfil de ácidos grasos, la dieta ORI-ONE presentó un mayor porcentaje de PUFAs, alrededor del 48%, observando un enriquecimiento en los ácidos grasos C18:2n6, C18:3n3, C2:4n6, C22:6n3 (18.1, 6.0, 2.3, y 11.9 % respectivamente), no obstante, para el EPA (C20:5n3) el tratamiento de Rotigrow Plus + levadura de pan + enriquecimiento fue el que presentó una mayor concentración (4.4%). Respecto al perfil aminoacídico, Rotigrow + levadura de pan mostró el mayor contenido de aminoácidos esenciales (28.5%) y no esenciales (31.8%) respecto al porcentaje de proteína, mayor que el resto de las dietas. Con los resultados obtenidos se concluye que el tratamiento Rotigrow Plus +levadura de pan, es el enriquecedor que obtiene un mayor contenido de proteína cruda y aminoácidos. Por otro lado, la dieta ORI-ONE resulta benéfico para la deposición de los ácidos grasos esenciales ARA, EPA y DHA en rotífero. Debido a esto, se recomienda seguir haciendo experimentos en donde se realicen mezclas en diferentes proporciones de los enriquecedores y obtener el perfil nutricional deseado.

Abstract:

Live food (phytoplankton and zooplankton) is indispensable for the development and survival of fish, mollusks, and crustaceans in aquaculture. Rotifers (*Brachionus plicatilis*) are particularly important, as they are widely used to feed the fish larva due to their size (100-300 μ) and rapid growth rate. Some disadvantages of using rotifers for feed are directly related to the organism's biochemical-nutritional properties. With this in mind, the objective of this work was to enrich the with different supplements and detect any significant effects through proximal analysis (protein, lipids, nitrogen-free extracts, and ash), amino acid profiling, and fatty acids. Four different commercial feed mixtures to enrich were given (Rotigrow Plus + bread yeast; ORI-ONE; Rotigrow OneStep, and Rotigrow Plus + bread yeast + enriching agent). The experimentation units used comprised four 100L cylindrical tanks with an initial density of 25 million organisms (250 rot/ml) per tank; daily feedings are administered based on the manufacturer's suggested dosage. The proximal analysis showed that the Rotigrow + bread yeast mixture contained a higher raw protein content (60.22%), while ORI-ONE showed the highest lipid content at 14.23%. The fatty acid found in the ORI-ONE diet was the highest among the different diets at 48%, with enrichment identified of the C18:2n6, C18:3n3, C2:4n6, C22:6n3 (18.1, 6.0, 2.3, y 11.9 % respectively), non the less EPA (C20:5n3) showed a greater concentration (4.4%) with the Rotigrow Plus + bread yeast mixture. Rotigrow + bred yeast also showed the highest amounts of essential and non-essential amino acids (28.5% and 31.8%, respectively) and the most protein percentage out of all the diets. The Rotigrow + bread yeast diet contains high amounts of raw protein and amino acids. The ORI-ONE diet benefits the deposition of essential fatty acids ARA, EPA, and DHA in rotifers. These results suggest the need to further experimentation with different ratios of enriching compounds to obtain a more desirable nutritional profile.

Dedicatoria

A mis padres Esteban y Mayra por el apoyo y amor brindado, en especial a mi madre Mayra Guadalupe Lucero Romero por siempre estar a mi lado apoyándome en todos los sentidos, ya que sin ella no podría haber concluido esta etapa de mi vida. A mi hermana Mayra Guadalupe López Lucero, por hacer mis días mejores, por levantarme y ayudarme en mis peores días.

A mis tíos Mercedes y Jesús, por brindarme todo su apoyo de manera incondicional, forman y formaron parte muy importante en esta etapa de mi vida y por ello siempre le estaré agradecido.

A mis tíos Marco y Edith por apoyarme en todo momento y preocuparse por mí.

A mis primas Yohali y Romina por acompañarme en todo este camino.

A mis primos Miguel y Manuel por ser tan divertidos y por procurar que me encontrara bien.

Para una persona muy especial que ya no se encuentra con nosotros, sin embargo, me ayudó a entender la importancia de ser unidos familiarmente, hasta el cielo para mi primo Marco Antonio Lucero Mendoza.

A mis abuelos maternos Marcos y Manuela, por todo su apoyo, amor y consejos brindado durante toda mi vida y toda mi carrera.

A mis abuelos paternos Esteban y Rosadela, por el apoyo moral y consejos brindados.

A Jael Gabriela Arce Patrón, por acompañarme a lo largo de todo el camino y por ser paciente conmigo, por todo el amor y apoyo brindado.

A todos mis amigos y amigas, por estar en las buenas, en las malas y por confiar siempre en mí, especialmente a Manuel, Fernando, Jesús, David, Germán, Antonio, Ernesto, Saul, Valeria, Samantha y Noelia.

Agradecimientos

Al Dr. Conal David True y el M. en C. Julio César Segovia Salas, por facilitar la cepa de rotíferos, así como formar parte del experimento.

A la Dra. Lus Mercedes López Acuña y al Dr. Mario Alberto Galaviz Espinoza por facilitar todos los materiales e instalaciones necesarias para llevar a cabo el experimento, así como los análisis correspondientes.

A mi director de tesis, el Dr. Fernando Barreto Curiel por todo el apoyo brindado en mi formación, por orientarme y facilitarme el aprendizaje en la utilización de equipos para la realización de algunos análisis.

A mis sinodales la M. en C. Rosario Jara Montañez, el M. en C. Ángel Raúl Herrera Gutiérrez y al Dr. Mario Alberto Galaviz Espinoza por todo el apoyo brindado en mi formación y por los consejos brindados.

A la Lic. Samantha Victoria Cota por apoyarme y guiarme en la utilización de equipos en el laboratorio de nutrición de la Facultad de Ciencias Marinas, así como su apoyo en la realización de análisis proximales y por su apoyo moral durante los momentos difíciles.

Índice

I. Introducción.....	1
II. Antecedentes.....	4
III. Hipótesis.....	10
IV. Objetivo general.	11
IV.I. Objetivos específicos.....	11
V. Materiales y métodos.	12
V.I.I. Rotigrow Plus + levadura de pan.	13
V.I. II. ORI-ONE.	14
V.I.III. Rotigrow OneStep.	15
V.I. IV. Rotigrow Plus + levadura de pan + enriquecimiento.....	15
V. II. Colecta de muestras.....	16
V. III. Análisis proximales.....	16
V.III.I. Humedad.	17
V. III.II. Proteína cruda.....	17
V. III.III. Lípidos totales.....	18
V. III.IV. Cenizas.....	18
V.IV. Determinación de aminoácidos.....	19
V.V. Determinación de ácidos grasos.....	20
V.VI. Análisis estadístico.....	21
VI. Resultados y discusiones.	22
VII. Conclusiones.	29
VIII. Recomendaciones.	30
IX. Bibliografía.	31

Índice de tablas

Tabla 1. Efecto de la temperatura en el crecimiento y maduración de rotífero.....	5
<i>Tabla 2. Alimentos experimentales para larvas de Lutjanus peru y Lutjanus argentiventris.....</i>	<i>6</i>
Tabla 3. Composición bioquímica de Rotigrow Plus.....	13
<i>Tabla 4. Composición de ácidos grasos de importancia comercial de Rotigrow Plus.....</i>	<i>13</i>
Tabla 5. Composición bioquímica de ORI-ONE.....	14
Tabla 6. Composición proximal del rotífero (<i>Brachionus plicatilis</i>) enriquecidos con cuatro diferentes fuentes alimenticias por 3 días.....	22
Tabla 7. Contenido de aminoácidos en el rotífero <i>Brachionus plicatilis</i> alimentado con cuatro distintos enriquecedores durante 3 días.....	26
Tabla 8. Contenido de ácidos grasos en el rotífero <i>Brachionus plicatilis</i> alimentado con cuatro distintos enriquecedores durante 3 días.....	28

Índice de figuras

Figura 1. Producción mundial de la pesca de captura y la acuicultura. 1

Figura 2. Área de producción de alimento vivo en la UBP-FCM.
.....12

I. Introducción.

La acuicultura es considerada una de las actividades que pudiera lograr combatir la pobreza y disminuir los niveles de desnutrición en los países más pobres, gracias a su alto valor nutricional y a su continuo crecimiento (FAO, 2002).

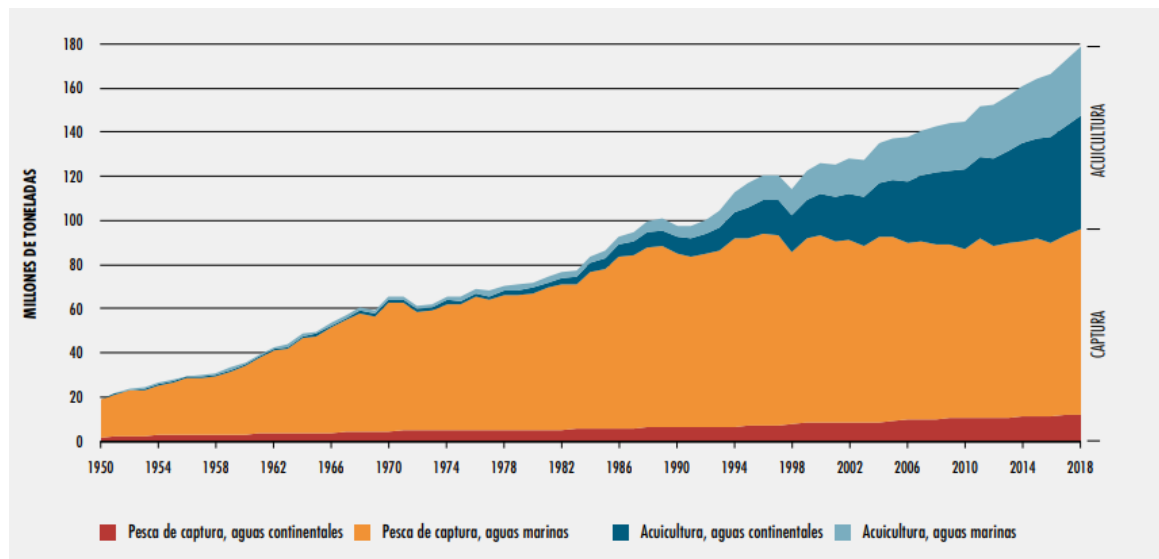


Figura 1. Producción mundial de la pesca de captura y la acuicultura.

Fuente: FAO (SOFIA), 2020.

En los últimos años esta actividad ha mostrado un crecimiento constante (del 5.3% en el periodo 2001-2018) y hoy en día se puede precisar el alcance de 114.5 millones de toneladas de peso vivo para el 2018, mismo que contribuyó con 263,600 millones de USD (FAO, 2020). Por otro lado, la pesca en 2018 alcanzó una producción máxima nunca registrada de 96.4 millones de toneladas (FAO, 2020), sin embargo, según la FAO la pesca ya ha alcanzado su potencial máximo de capturas, debido a que el 80% de las poblaciones de peces de las que se tiene información ya están explotadas o sobreexplotadas (Naciones Unidas, 2010). De

esta manera se puede notar que la producción de acuicultura ha superado a lo reportado en la pesca (Figura. 1) (FAO, 2020).

Bajo la demanda de producir una proteína de alta calidad y ha bajo costo, la acuicultura enfrenta diversas limitaciones con respecto a los alimentos formulados, así como también, en los alimentos vivos en las primeras etapas de crianza o alevinaje, mismas que disminuyen de manera drástica el crecimiento exponencial de los cultivos de organismos acuícolas (Camacho-Grageda *et al.*, 2008). De manera particular, el alimento vivo (fitoplancton y zooplancton) es un elemento esencial para la producción y alta supervivencia en el desarrollo larvario de peces, moluscos y crustáceos (Torrentera y Tacon, 1989). El alimento vivo se considera hoy en día como un alimento “esencial”, superando al alimento inerte en las primeras etapas de alimentación (Prieto, 2006), debido a que la mayoría de las larvas de peces son depredadores visuales, lo que genera un nado más veloz y el desarrollo de peces más fuertes y activos (Luna-Figueroa *et al.*, 2018). Además, el alimento vivo se puede distribuir en todo el tanque, de manera que cohabitan con sus depredadores hasta ser consumidos (Luna-Figueroa *et al.*, 2018).

Cabe mencionar, que este tipo de alimentos fomentan el crecimiento, la fecundidad, supervivencia, brillo corporal, resistencia a enfermedades, pigmentación, longevidad y se ha observado que no afecta de manera significativa la calidad del agua (Luna-Figueroa *et al.*, 2018). También se ha demostrado que el alimento vivo es mejor que el inerte por tres hipótesis: 1) Induce en los peces estímulos visuales y químicos, es decir, propicia la identificación de potenciales presas; 2) Las enzimas presentes en este alimento vivo promueven una mejor digestión del alimento. 3) La

digestibilidad del alimento vivo es mejor que el inerte, lo que se ve reflejado en la digestibilidad de proteínas (Luna-Figueroa *et al.*, 2018; Burbano *et al.*, 2020).

El alimento vivo en la acuicultura es conocido como el conjunto de organismos planctónicos que forman parte de la dieta esencial de los estadios larvarios de crustáceos, post-larvas de peces y distintas fases de desarrollo de los moluscos. En el alimento, podemos encontrar diversos tipos de zooplancton del cual resaltan organismos como cladóceros, copépodos, artemias y rotíferos; por otro lado, dentro del fitoplancton destacan variados grupos de microalgas, principalmente diatomeas y clorofitas (Prieto, 2006). La importancia de este alimento radica en el contenido esencial de macro y micro nutrientes necesarios para el correcto desarrollo de las larvas, de manera específica; los aminoácidos y ácidos grasos esenciales (Luna-Figueroa *et al.*, 2018), tal como; la histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina en aminoácidos (AAS) (Wax, 2019) y dentro de los omega-3 a eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA), dentro de los omega-6 ácido gammalinolénico (GLA) y al ácido araquidónico (AA) (Aires *et al.*, 2005; Guinot *et al.*, 2013).

En cuanto a las desventajas del alimento vivo, se puede mencionar que no posee un balance correcto de nutrientes para el óptimo desarrollo de los peces, lo cual, se ve reflejado en los valores nutricionales de las proteínas, carbohidratos, lípidos, vitaminas y minerales. Una de las soluciones para estos casos es enriquecer el alimento vivo con emulsiones de lípidos n-3, ricos en ácidos grasos altamente insaturados (HUFA), para incrementar o al menos preservar su nivel nutritivo (Luna-Figueroa *et al.*, 2018).

II. Antecedentes.

El alimento vivo es ampliamente utilizado en las primeras etapas de vida de los organismos acuáticos, tal como, las larvas de peces, crustáceos y moluscos (Wikfors y Ohno, 2001), ya que presenta una digestibilidad mayor que los alimentos inertes. Esto es debido a que los organismos acuáticos, carecen de un sistema digestivo completo, presentando mínimas o nulas actividades de enzimas digestivas (Kassim et al., 2014). El alimento vivo contiene aporte de nutrientes esenciales para los organismos en desarrollo. Por ende, el enriquecer el alimento vivo se ha estudiado desde los principios de la acuicultura, ayudando así, a mitigar los déficits nutricionales de las larvas con algún incremento en nutrientes específicos, tal como ácidos grasos o aminoácidos. Esto ha tenido gran impacto en la supervivencia y en la disminución de malformaciones larvales (Luna-Figueroa *et al.*, 2018).

Nandy *et al.*, (1976) enriquecieron el cultivo de *Brachionus mulleri*, utilizando como enriquecedor una torta de *Bassia latifolia*, misma que contenía urea, superfosfato, sulfato de amonio y harina de hueso. Los autores manejaron una densidad inicial de inoculación de 20 rotíferos por mililitro y alcanzaron una producción final de $7,750 \pm 250$ rotíferos por mililitro en tres semanas. Por otro lado, los autores afirman que el desarrollo masivo del cultivo de rotíferos es una metodología eficiente para obtener elevada sobrevivencia de larvas de peces.

Otra de las características ampliamente estudiadas en los alimentos vivos, son los efectos de la temperatura en sus diferentes etapas de desarrollo, observando diferencias significativas en los días de cultivo. En la Tabla 1, se resume el efecto de la temperatura respecto al desarrollo del rotífero (Lavens y

Sorgeloos,1996). Por tal motivo, la temperatura juega un papel muy importante en las variables biológicas obtenidas en los organismos vivos.

Tabla 1. Efecto de la temperatura en el crecimiento y maduración de rotífero.

Temperatura °C	15°C	20°C	25°C
Tiempo de desarrollo embrionario (días)	1.3	1	0.6
Tiempo para que las hembras jóvenes desoven por primera vez (días)	3	1.9	1.3
Intervalo entre dos desoves (horas)	7	5.3	4
Tiempo de vida (días)	15	10	7
Número de huevos puestos por una hembra durante su vida	23	23	20

Fuente: Lavens y Sorgeloos,1996.

Hoy en día existe una amplia información de las diferentes formas de cultivo y alimentación de rotíferos, dónde su principal objetivo es incrementar las producciones masivas de dicho organismo. En éste mismo sentido, Ismiño (2002), realizó el cultivo de rotíferos en artes de madera de 1000 – 9000 litros, al aire libre y realizó un aumento continuo del volumen de agua en un periodo de 16 días. La microalga *Scenedesmus quadricauda* fue utilizada como alimento y se utilizó la harina de pescado como fertilizante. Este cultivo alcanzó una densidad máxima de 5,592 rot/ml.

Rivas (2014), realizó diferentes pruebas de alimentación de larvas de pargo amarillo (*Lutjanus argentiventris*) y huachinango del Pacífico (*Lutjanus peru*) con distintos alimentos vivos y enriquecidos en las primeras etapas de alimentación. De manera general, los copépodos se cultivaron en tanques de 250 litros y fueron alimentados con una densidad de 1,000 células por mililitro de la microalga *Nannochloropsis oculata* y *Navicula sp.* Por otro lado, los rotíferos se cultivaron en columnas de 250 litros y fueron alimentados con *Nannochloropsis oculata* y en otra con *Navicula sp.* a una densidad de 1,000 células por mililitro. Para el rotífero

enriquecido, se mantuvo en un volumen de 20 litros y se alimentó basados en lo descrito por Nghia y *et al.*, (2007); tomando en cuenta el volumen y densidad de rotíferos, se suministró diariamente 0.026 gramos de cada una de las cinco emulsiones para el enriquecimiento de rotífero y artemia (emulsión 0/-: elaborada con coco, libre de HUFA, consiste principalmente en ácidos grasos saturados; emulsión 50/0.6: contiene un 50% de n-3 HUFA con una relación DHA/EPA de 0.6; emulsión 30/0.6: 30% n-3 HUFA con una relación DHA/EPA de 0.6; emulsión 30/4: 30% n-3 HUFA con una relación DHA/EPA de 4; y emulsión 30/4/ARA: una mezcla de 75% de la emulsión 30/4 y 25% de una emulsión que contiene 40% ARA). En cuanto a los tratamientos experimentales Rivas (2014), los llevó a cabo durante cinco días después de la apertura bucal, utilizando seis alimentos distintos, seis réplicas para cada tratamiento. La primera alimentación consistió en rotíferos (*B. plicatilis*) y nauplios de copépodos (*P. euryhalinus*) no mayores a 100 μm , se mantuvo una densidad de 15 individuos por mililitro a partir de las 48 hpe (horas post eclosión). Dichos tratamientos pueden observarse en la Tabla 2.

Tabla 2. Alimentos experimentales para larvas de *Lutjanus peru* y *Lutjanus argentiventris*.

Tratamiento	Presa <80 μm	Alimento
Rot + msp 1	<i>Brachionus plicatilis</i>	<i>Navicula sp.</i>
Cop +msp 1	<i>Pseudodiaptomus euryhalinus</i>	<i>Navicula sp.</i>
Rot + Nanno	<i>Brachionus plicatilis</i>	<i>Nannochloropsis oculata</i>
Rot + ICE 0	<i>Brachionus plicatilis</i>	<i>Nannochloropsis oculata</i> + Emulsión de AGS (libre de HUFA) (Nghia, 2008).
Rot + ICE 20	<i>Brachionus plicatilis</i>	<i>Nannochloropsis oculata</i> + Emulsión al 20% de n-3 HUFA total (relación de 0.73 DHA/EPA)

		(Boersma y Stelzer, 2000).
Rot + ICE 50	<i>Brachionus plicatilis</i>	<i>Nannochloropsis oculata</i> + Emulsión al 50% de n-3 HUFA total (relación de 0.84 DHA/EPA) (Han <i>et al.</i> , 2005).

Rivas (2014), concluyó que la composición bioquímica del alimento, no se ve reflejada en la composición larval, especialmente tratándose de alimentos enriquecidos, posiblemente por oxidación o descuido del protocolo de enriquecimiento, causante de que sus propiedades se vean alteradas. Además, favoreció la supervivencia, sin embargo, no se observaron mayores tasas de crecimiento en el cultivo.

Por otro lado, Hamre et al. (2008) realizaron pruebas de alimentación con el bacalao del Atlántico, "*Gadus morhua*" utilizando al rotífero enriquecido, *Branchionus "Cayman"*. Los tres tratamientos de rotífero iniciaron en una dieta base de levadura de pan y una mezcla de vitaminas. Posteriormente, una porción de rotíferos fue cosechada, enjuagada y transferida a un tanque de 500L, para proceder al enriquecimiento de los dos tratamientos restantes, el control y el enriquecido con yodo y selenio. De manera particular para ambos tratamientos se alimentó con una mezcla de microalgas 4:1 de *Pavlova sp.* e *Isochrysis sp.* y posteriormente el tratamiento control fue enriquecido con un 80% Multigain (Danafeed, DK-8700 Horsens, Dinamarca) y 20% Omegalec (Aker Biomarine ASA, 0115 Oslo, Noruega) a una concentración total de 1 g L⁻¹ y los rotíferos enriquecidos con yodo y selenio, recibieron 7 mg L⁻¹ de selenio de sodio y 400 mg L⁻¹ de yoduro de sodio. El tiempo

de enriquecimiento fue de 1.5 horas y la densidad de rotíferos fue de 3500-4500 ind mL⁻¹. Al final del experimento los autores observaron en el tratamiento enriquecido con yodo y selenio mostró un incremento en la tasa de crecimiento de rotíferos y así como también, una mayor supervivencia (30%) en las larvas de peces, esto posiblemente a que uno o ambos de estos nutrientes son deficientes en los rotíferos alimentados con la dieta control.

De igual manera, Waqalevu et al. (2019) cultivaron rotíferos, mismos que fueron alimentados con *Chlorella vulgaris* (de agua dulce) concentrada (Chlorella Industry Co. Ltd., Tokio, Japón). Se llevaron a cabo dos tipos de enriquecimiento, uno de *C. vulgaris* enriquecido con DHA y otro tratamiento con *C. vulgaris* enriquecido con DHA y aceite de emulsión de huevos de salmón (MarineTech Co., Ltd., Japón). De manera general, lo autores concluyeron que ambas dietas enriquecidas fueron nutricionalmente efectivas. Sin embargo, el tratamiento DHA+Aceite de salmón, mostró un mayor contenido de HUFAs mostrando un incremento en el ácido graso en EPA.

García et al. (2008) realizó un experimento donde se evaluó la influencia del alimento vivo (*Brachionus plicatilis* y *Artemia sp.*), el cual se enriqueció con la microalga *Pavlova sp.* para alimentar larvas de bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*), donde obtuvo como resultado un mayor crecimiento y sobrevivencia, respecto a los alimentos comerciales. De manera general, existen diferentes métodos diseñados para incrementar el valor nutricional y calidad del rotífero. En las últimas décadas se han utilizado microalga, levadura de pan, emulsiones de aceite marino y dietas comerciales (Morizane, 1991; Lubzens, 1987; Copeman, Parrish, Brown, & Harel, 2002; Cavalin & Weirich, 2009). Estos enriquecedores

van de la mano con el tiempo de incorporación o de enriquecimiento que se debe mantener el rotífero, por lo que en promedio se ha estimado que el tiempo oscila entre las 8 y 24 horas, obteniendo así la máxima incorporación nutricional (Klaoudatos, Iakovopoulos, & Klaoudatos, 2004).

De manera particular, en el laboratorio de producción de peces marinos de Unidad de Biotecnología en Piscicultura (UBP) de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), campus Ensenada, se presentan problemas morfológicos en los alevines de la "totoaba" (*Totoaba macdonaldi*), tal como, malformaciones del opérculo y displacia de cadera. Por tal motivo, el objetivo del trabajo fue el caracterizar los distintos alimentos que serán ofrecidos a los alevines de totoaba y así, obtener un alimento con la finalidad de evitar altas mortalidades y malformaciones en larvas del pez totoaba en particular.

III. Hipótesis.

Si la composición bioquímica del rotífero puede variar respecto a la fuente de alimentación que se ofrezca, entonces, podremos elucidar el cambio nutricional en el perfil de aminoácidos y ácidos grasos en los cuatro diferentes tratamientos.

IV. Objetivo general.

Conocer el efecto del enriquecimiento de alimento vivo en el perfil de aminoácidos y ácidos grasos de *Brachionus plicatilis*.

IV.I. Objetivos específicos.

- 1.- Determinar el contenido proximal (proteínas, lípidos, cenizas y extracto libre de nitrógeno) en *Brachionus plicatilis* alimentados con los cuatro diferentes enriquecedores.
- 2.- Determinar la composición aminoacídica en *Brachionus plicatilis* alimentados con los cuatro diferentes enriquecedores al final del tiempo experimental.
- 3.- Obtener la caracterización de los ácidos grasos en *Brachionus plicatilis* enriquecidos con los cuatro tratamientos.

V. Materiales y métodos.

El bioensayo se llevó a cabo en el área de alimento vivo de la Unidad vieja de Biotecnología en Piscicultura (UBP-E20) de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), campus Ensenada. El sistema de cultivo se conformó por cuatro tanques de forma cilíndrica de fibra de vidrio y un volumen de 100 litros (Fig. 1). Cada tanque se acondicionó con airlift para poder realizar la recirculación del agua a través de la malla de limpieza y una bolsa de biomedica, para asegurar la calidad de agua.

El método que se utilizó para el cultivo fue el método de batch, el cual consistió en realizar la siembra de 25 millones de rotíferos (*Brachionus plicatilis*) con una densidad de 250 rot/ml diariamente. Cada tercer día se terminó un ciclo, por lo tanto, se resembró el tanque.

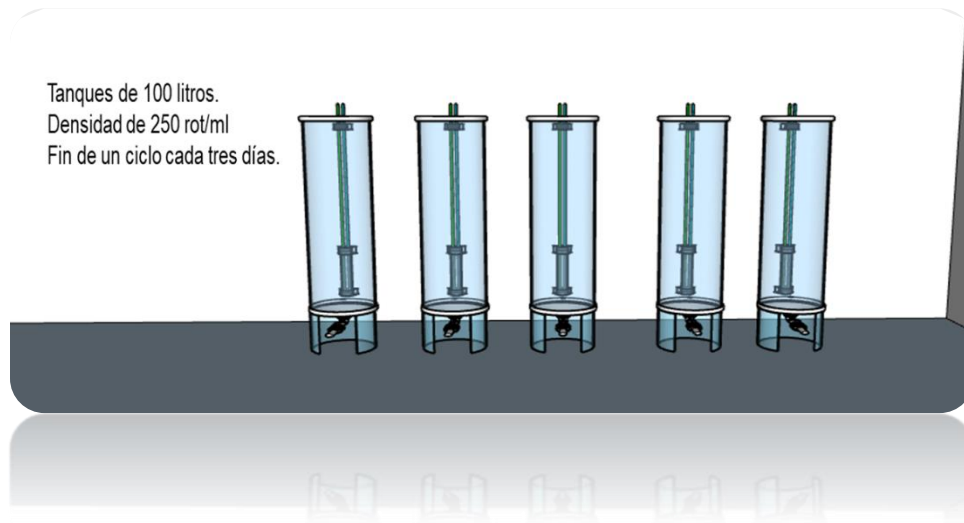


Figura 2. Área de producción de alimento vivo en la UBP-FCM.

En cuanto al alimento diario, se utilizaron cuatro alimentos distintos, y se realizaron diversas pruebas, como se describe a continuación.

V.I.I. Rotigrow Plus + levadura de pan.

Esta dieta se formuló por un homogenizado de pasta de microalgas y levadura de pan. La pasta de microalgas (Rotigrow) fue obtenida de manera comercial de Reed mariculture. Sus contenidos nutricionales se muestran en la Tabla 3 y los ácidos grasos en la Tabla 4. Por otro lado, la levadura de pan fue de la marca saf-instant. Los organismos fueron alimentados con base en el número de organismos, por lo que, se le agregó 0.9 ml de pasta por millón de rotíferos y 0.6 gr de levadura por millón de rotíferos. La preparación de la dieta consistió en licuar la levadura con agua potable por 10 minutos utilizando de una licuadora para cocina, después se agregó pasta y se colocó en un contenedor para ser transferido al cultivo, utilizando una bomba peristáltica y dosificando el alimento en 24h.

Tabla 3. Composición bioquímica de Rotigrow Plus.

Proteína	55.7%
Lípido	19.5%
Carbohidrato	19.0%
Ceniza	5.8%

Fuente: Reed Mariculture, 2019. https://reedmariculture.com/products/rotigrow-plus#tab_tech

Tabla 4. Composición de ácidos grasos de importancia comercial de Rotigrow. Los contenidos se muestran en mg/g.

12:0	Ácido láurico	3.0	18:3n6	GLA	2.9
14:0	Ácido mirístico	11.4	18:3n3	ALA	0.4
16:0	Ácido palmítico	24.4	18:4n3	SDA	5.4
16:1n7	Ácido palmitoleico	11.7	20:3n6	DGLA	0.2
16:2n4	Hexadecadienoico	3.4	20:4n6	ARA	2.1
18:0	Ácido esteárico	1.4	20:5n3	EPA	18.1

18:1n9	Ácido oleico	11.8	22:5n3	DPA(n-3)	2.1
18:2n6	LA	10.9	22:6n3	DHA	41.9

Fuente: Reed Mariculture, 2019. https://reedmariculture.com/products/rotigrow-plus#tab_tech

V.I. II. ORI-ONE.

La dieta estuvo constituida por un homogenizado de microalgas, dicho producto tiene el nombre de ORI-ONE de la marca Skretting. La alimentación de los rotíferos se llevó a cabo con base en las instrucciones del proveedor, es decir, el día 0 se alimentó con 0.45 gramos por millón de rotíferos, día 1 y 2 se alimentó con 0.4 gramos por millón de rotíferos.

La preparación del alimento se basó en licuar por 10 minutos el ORI-ONE con agua potable y, se dio un tiempo de hidratación de 5 minutos seguido de un proceso de licuado por 10 minutos. Posteriormente se colocó en un contenedor para ser bombeado hacia el cultivo por medio de una bomba peristáltica. Este proceso se llevó a cabo durante todo el ciclo.

En la Tabla 5 se muestra el contenido nutricional del enriquecedor ORI-ONE.

Tabla 5. Composición bioquímica de ORI-ONE.

Humedad	Proteínas	Lípidos	n-3 HUFA	DHA/EPA
5%	56%	17%	37 mg/g	>5

Fuente: ProAqua, 2021.

V.I.III. Rotigrow OneStep.

La pasta de microalgas OneStep, fue obtenida de la empresa Reed mariculture. De manera particular, se le agregó 1.2 ml de pasta por millón de rotíferos. La preparación del alimento se realizó homogenizando la pasta con agua potable. Después, se colocó en un contenedor para ser bombeado hacia el cultivo por medio de una bomba peristáltica. Este proceso se realizó diariamente durante todo el ciclo del cultivo.

Según Reed mariculture (2019) los rotíferos enriquecidos con Rotigrow OneStep presentan la siguiente composición: 70% de proteína, 12% de lípidos, 25% DHA (% ácidos grasos), 7% EPA (% de ácidos grasos) y 2% ARA (% de ácidos grasos) (Reed mariculture, 2019).

V.I. IV. Rotigrow Plus + levadura de pan + enriquecimiento.

La dieta estuvo constituida por un homogenizado de una pasta de microalgas y levadura de pan, posteriormente a los rotíferos se le agregó un enriquecedor. La pasta de microalgas (Rotigrow Plus) es un producto de Reed mariculture, la levadura de la marca saf-instant, el enriquecedor (N-Rich High PRO) es un producto de Reed mariculture. Los organismos en el cultivo se alimentaron con base en el número de organismos, se le agregaron 0.9 ml de pasta por millón de rotíferos y 0.6 gramos de levadura de pan por millón de rotíferos. En la etapa del enriquecimiento se utilizaron 0.4 ml/litro de N-Rich High PRO. La preparación de la dieta consistió en mezclar la levadura con agua potable por 10 minutos, después se agregó la pasta y se colocó en un contenedor para ser bombeado hacia el cultivo por medio de una bomba peristáltica.

Este proceso se realizó diariamente durante todo el ciclo de cultivo. Luego se cosecharon los rotíferos utilizando un cosechador de PVC y una malla de 80 μm , y se sembraron en un tanque de polietileno de 100 litros para iniciar el enriquecimiento.

El enriquecimiento de rotíferos tuvo una duración de 6 horas, con una densidad no más de 1000 rotíferos/ml.

V. II. Colecta de muestras.

En todas las pruebas de las diversas dietas se siguió el mismo protocolo para la recolección de muestras.

Los rotíferos que se encontraban en los cuatro tanques cilíndricos se pasaron por el cosechador para eliminar toda la materia orgánica y se limpiaron los rotíferos de las impurezas por un periodo de 30 minutos por tanque cosechado. Posteriormente, se sacaron los rotíferos del cosechador y se concentraron en 7 litros, después se drenó toda el agua de mar por medio de un tamiz con una luz de malla de 80 μm , se enjuagaron los rotíferos con abundante agua destilada para eliminar todas las sales del agua de mar.

Por último, se concentraron los rotíferos sin agua para obtener una pasta y se guardaron en bolsas ziploc y se almacenaron en un ultracongelador a -80°C hasta su procesamiento.

V. III. Análisis proximales.

Se realizaron análisis proximales de los organismos al final del periodo de exposición o enriquecimiento. La cantidad de humedad, proteínas, lípidos y cenizas,

se expresaron en promedios. Por otro lado, el extracto libre de nitrógeno (NFE) se obtuvo por diferencia (Jobling, 2001). La composición bioquímica de los organismos se realizó por triplicado siguiendo las metodologías propuestas por la “Association of Official Analytical Chemists” (AOAC, 1995).

V.III.I. Humedad.

El contenido de humedad se calculó mediante el método gravimétrico, donde se colocaron en navetas de aluminio por triplicado, 2 g de cada una de las muestras experimentales (previamente pulverizadas). Posteriormente, se colocaron dentro de una estufa durante 4 horas a una temperatura de 100 °C. Después, las muestras se colocaron dentro de un desecador para su enfriamiento hasta alcanzar temperatura ambiente. Su peso seco fue registrado hasta que fue constante. El cálculo del porcentaje de humedad se realizó por diferencia de peso.

V. III.II. Proteína cruda.

Para obtener el porcentaje de proteína cruda en cada uno de los tratamientos de rotíferos enriquecidos, se utilizó el método de Micro-Kjeldahl. Para ello, en el proceso de digestión se utilizarán 2 g de Sulfato de potasio, 40 mg de sulfato cúprico con 50 mg de muestra (muestra previamente pulverizada) y 3 ml de ácido sulfúrico durante cuatro horas en un digestor. Una vez digeridas las muestras (mostrando un color azul cristalino), se aforaron a un volumen 25 ml en un matraz volumétrico de 25 ml y posteriormente se destilaron.

Respecto a la destilación, se utilizaron 10 ml de hidróxido de sodio al 40%, 5 ml de la muestra digerida con anterioridad y 10 ml agua destilada. 15 ml de ácido bórico al 4%, con una solución indicadora (Shiro tashiro). El resultado de la

destilación fue condensado y retenido en una cámara de reacción, donde se tituló manualmente con ácido clorhídrico al 0.0203 N. El porcentaje de proteínas en las muestras se obtuvo mediante un factor establecido de 6.25 de acuerdo a la AOAC (1995) para los rotíferos enriquecidos.

V. III.III. Lípidos totales.

Para determinar los lípidos totales, se pesó 0.1 gramos de muestra en un tubo de ensayo roscado, los cuales fueron previamente etiquetados. Una vez pesadas las muestras, comenzó la extracción, agregando 200 microlitros de agua destilada y se mezcló en vortex durante 30 segundos, posteriormente se agregó 6 ml de la solución de diclorometano-metanol, se agitó en vortex por 3 minutos y se dejó reposar de 6 a 12 horas. Después se llevó a cabo la fase de separación donde previamente se tuvieron etiquetados otros tubos con su respectiva jeringa (10 a 12 ml), filtros plásticos y papel whatman #4, una vez listo el material se filtraron todos los tubos para posteriormente agregar 1.5 ml de KCL al 1.76%. Posteriormente, para la fase de evaporación, se retiró la fase acuosa y se pesó un vial de 4 ml por cada tubo con muestra, de los cuales se registró el peso sin muestra. Por último, se tomaron 2 ml de muestra del tubo roscado y se colocó en su respectivo vial, dicha muestra se evaporó a 60°C en thermoblock, una vez que se evaporado el solvente se retiraron los viales y se colocaron en un desecador para que se enfriaran a temperatura ambiente, y así poder registrar su peso final.

V. III.IV. Cenizas.

El valor promedio del contenido de cenizas se calculó por gravimetría. Las muestras fueron pesadas alrededor de 1 g, posteriormente, se calcinaron las

muestras a 550 °C por un periodo cinco horas. Al término de las cinco horas se colocaron en un desecador y nuevamente se pesaron, a partir de la diferencia en el peso, se calculó el porcentaje de ceniza.

V.IV. Determinación de aminoácidos.

Para el análisis de Aminoácidos (AAs), se tomaron 100 mg de las muestras previamente desgrasadas y secas. Estas fueron hidrolizadas hasta AAs con 5 ml de una mezcla de HCl 6N con 0.06% de fenol en viales de vidrio de 25 mL. La hidrólisis se llevó a cabo incubando cada una de las muestras por 24 hrs a 110 °C. Después del tiempo de hidrólisis, las muestras se llevaron a un volumen final de 100 ml, donde se filtró con acrodiscos de 0.45 µm (P.N. 4426T), un volumen final de 1.5 ml en un vial previamente limpio, calcinado y de color ámbar. Las muestras fueron refrigeradas a -30 C hasta su procesamiento en el HPLC. La derivatización se realizó directamente en el HPLC Agilent (Mod. 1200 infinity series). De manera general, se tomaron 2.5 µl del buffer de fosfatos (Part Num. 5061-3339), seguido de 0.5 µl de muestra con relación 1:1:1 de OPA: FMOC (Ortoftaldehido: Fluorenylmethyloxycarbonyl), posteriormente fueron inyectadas en secuencia continua en el HPLC. Para la separación de los AAs se utilizó una columna C18 de fase reversa Zorbax eclipse AAA (4.5 X 150 mm 3.5µm, P.N. 963400-902), donde se empleó un volumen de inyección de 5 µL. Para la corrida, se utilizó un gradiente de buffer de fosfato de sodio al 40mM (Sigma aldrich, cat num. 71500-250g) y una mezcla de acetonitrilo al 45% Metanol 45% y agua grado HPLC 10%, a un flujo de 1mL/min. El sistema está acoplado a un detector de fluorescencia (1260 FLD series, Agilent technologies, USA) y un detector de DAD (1260 DAD-UV, Agilent technologies, USA), mismos que están configurados en dos longitudes de onda,

340/450 nm y 266/305 nm excitación/emisión y para el DAD, 380nm (OPA) y 262nm (FMOC). La curva de calibración se realizó utilizando una solución de AAs estándares (P.N. 061-3330) con concentraciones de 50 a 350 pmol. Y como último, estimó el área bajo la curva con el programa "OpenLAB" (Agilent Technologies 2000 copyright), obteniendo así el porcentaje de Aas, respecto al contenido de proteína en las muestras.

V.V. Determinación de ácidos grasos

De manera general la extracción de ácidos grasos se realizó por medio de una técnica descrita por Folch *et al.*(1957). Se incorporaron pequeñas modificaciones tales como agregar 0,01% de Butil-hidroxi-tolueno ó BHT (C₁₅H₂₄O) como solución antioxidante, trabajando a la menor temperatura posible y hacer la extracción de lípidos.

Para obtener los ácidos grasos, fueron separados, identificados y cuantificados en cromatografía de gases, donde se utilizó un cromatógrafo de gases AGILENT GC 7820A, equipado con un inyector Split/Splitless, un detector de ionización de flama (FID) y una columna capilar AGILENT 122-2361 DB-23 60 m x 0,25 mm con un diámetro interno de 15 mm. Los cálculos se efectuaron mediante el software GC Chemstation Data Analysis. La temperatura inicial de inyección fue de 50 °C por 1 min, después se llevó a 190 °C a una tasa de 25 °C/min y se mantuvo por 0 min, posteriormente se aumentó a 230 °C a una tasa de 6 °C/min y se utilizó Nitrógeno (N₂) como gas acarreador a 0.9 ml/min.

Los ácidos grasos fueron identificados por comparación con los tiempos de retención de los siguientes estándares: 37 Component FAME Mix (Supelco/Sigma-Aldrich®), GLC 87, GLC 96 (Nu-Chek Prep®), RM-2, RM-6 y GLC 90

(Supelco/Sigma-Aldrich®) y además se utilizaron PUFAs de aceites marinos (PUFA1 y 3, Supelco/Sigma-Aldrich®), como patrón de identificación. La composición de cada ácido graso se calculó de acuerdo al área correspondiente en el cromatograma respectivo. Se utilizó el ácido graso C19:0 como estándar interno.

V.VI. Análisis estadístico.

Todos los resultados obtenidos en este trabajo fueron procesados y comparados con el promedio obtenido por tratamiento en cada uno de los parámetros mostrado. La estadística fue únicamente descriptiva de acuerdo con los promedios obtenidos en cada tratamiento.

VI. Resultados y discusiones.

El contenido de proteína, lípidos, cenizas y ELN del rotífero enriquecido (*Brachionus plicatilis*) se muestra en la Tabla 6. De manera general, el tratamiento T1 mostró una mayor concentración de proteína cruda de 62.2% y la menor concentración fue observada en el tratamiento T2 (42.6%). Sin embargo, en este último tratamiento (T2) se presentó una mayor concentración de grasa cruda, 14.2% y la mínima concentración fue observada en el T3 (9.5%). En el contenido de cenizas se mostró desde 17.2 hasta 19.6%, observándose el mayor y menor contenido en el T4 y T1. Con lo que respecta al ELN se mostraron valores desde 11.3 y 24.8%, observándose la mayor concentración en el T3.

Tabla 6. Composición proximal del rotífero (*Brachionus plicatilis*) enriquecidos con cuatro diferentes fuentes alimenticias por 3 días.

Tratamiento	ID	Proteína cruda (%)	Lípidos (%)	Ceniza (%)	ELN (%)
Rotigrow plus + levadura de pan	T1	60.2	11.2	17.2	11.3
ORI-ONE	T2	42.6	14.2	18.6	24.6
One Step	T3	47.3	9.5	18.3	24.8
Rotigrow plus + levadura de pan + enriquecedor	T4	50.2	12.9	19.6	17.3

ELN= Extracto libre de nitrógeno = 100- (Proteína+ Lípidos+ Cenizas)

De manera particular, se conoce que el rotífero varía su contenido de proteína cruda de 42 hasta 60% (Øie y Olsen, 1997; Hamre, 2016; Duy Khoa *et al.*, 2021), siendo estas variaciones causadas por la calidad y cantidad de alimento proporcionado (Seiffert *et al.*, 2001). En este mismo sentido, existe una estrecha relación con las variables físico-químicas y composición espectral de luz en las que se producen las microalgas o enriquecedores para los rotíferos, impactado

drásticamente en la composición nutrimental del alimento vivo (Lehmuskero *et al.*, 2018). En los resultados de este experimento se observó el mayor contenido proteico en el tratamiento T1 (62.2%), por lo que se puede inferir que el enriquecedor “Rotigrow + levadura de pan”, es un promotor de síntesis proteica para el rotífero, ayudando así a incrementar el contenido de proteína cruda y por ende, a incrementar sus perfiles de aminoácidos tanto esenciales como no esenciales, impactando en una mayor supervivencia en las primeras etapas larvales de los organismos acuáticos. Esta última aseveración ha sido reportada por distintos autores (Srivastava *et al.*, 2006; Koiso *et al.*, 2009; Guevara *et al.*, 2011; Fehér *et al.*, 2013; Mæhre *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2019; Duy Khoa *et al.*, 2021), dónde un mayor contenido de proteína en el alimento vivo, contribuye en la obtención del máximo crecimiento, supervivencia, rentabilidad de los cultivos (Zaki y Saad, 2010). Podemos complementar dicha información con lo realizado por Segovia (2019), dónde realizó un experimento de enriquecimiento para rotíferos y artemias como alimento para *Totoba macdonaldi*. En cuanto al enriquecimiento de rotífero se realizó con taurina (0, 200, 400, 600 y 800 mg/l) y el enriquecedor ORI-GREEN de la marca SKRETTING (con la concentración indicada por el proveedor), empleando una alimentación base de Rotigrow plus + levadura de pan. Los resultados mostraron un mayor peso y crecimiento con el tratamiento enriquecido con 600 mg/L de taurina, sin embargo, el tratamiento donde se utilizaron 800 mg/L de taurina fue el que obtuvo una mayor sobrevivencia ($71.81\% \pm 0.49$) y presentó un contenido de proteína cruda en rotífero de $49.88\% \pm 0.13$ y un mayor contenido de grasa cruda con un $8.2\% \pm 0.29$. En nuestros resultados obtuvimos que la dieta Rotigrow +

levadura de pan (T1) obtuvo un mayor contenido de proteína cruda (60.2%), por lo tanto, podemos inferir que obtendrá una mayor supervivencia.

Otras de las características de relevancia en los contenidos nutricionales del rotífero, es la grasa cruda, ya que este parámetro nutricional nos pudiera inferir la calidad y cantidad de los ácidos grasos presentes presente en el alimento vivo, mismo, que es obtenido del concentrado de microalgas o enriquecedor utilizado para alimentar a los rotíferos (Das *et al.*, 2012; Kandathil *et al.*, 2020). En este trabajo de investigación, se mostró que el tratamiento T2 fue el que obtuvo una mayor concentración de grasa, superando el 14% de su contenido proximal. Esto pudiera estar relacionado con las características nutricionales de la etiqueta con el enriquecedor, ya que ORI ONE contenía un mayor porcentaje de grasa (17.0%), respecto a los otro enriquecedores. Por tal motivo, se pudiera inferir que el tratamiento T2 será rico en ácidos grasos esenciales y ayudará a la nutrición de larvas en las primeras etapas. De manera general y lo observado con otros trabajos de investigación, se muestra que el que el contenido de grasa varía desde 8% a 17%, (Øie y Olsen, 1997; Guevara *et al.*, 2011; Hamre, 2016; Duy Khoa *et al.*, 2021), por lo que nuestros resultados obtenidos concuerdan con lo reportado en la bibliografía.

De manera general, se sabe que los aminoácidos son divididos en esenciales y no esenciales, sin embargo, ambos juegan un papel importante en el desarrollo de los organismos acuáticos (Tacon, 1989; Wu, 2010). Dentro de estos dos bloques de aminoácidos, se encuentran algunos aminoácidos limitantes, los cuales regulan las rutas metabólicas de los organismos, impactando en la salud, supervivencia, crecimiento y reproducción (Wu, 2009). En este mismo sentido, la Lys y Met, son

considerados aminoácidos limitantes, ya que su contenido en fuentes proteicas terrestres se ve disminuido, afectando drásticamente el metabolismo del organismo carnívoros marinos (Mai *et al.*, 2006). El contenido de aminoácidos del rotífero (*Brachionus plicatilis*) se muestra en la Tabla 8. De manera particular, el tratamiento T1 mostró una mayor concentración de aminoácidos tanto esenciales, como no esenciales (28.5 % y 31.8 %, respectivamente). Sin embargo, el tratamiento T2 mostró una menor concentración en ambas fuentes de aminoácidos (20 y 22.6%). Por tal motivo, y resaltando algunos aminoácidos de gran importancia en el crecimiento de los organismos acuáticos, el tratamiento T1 (Rotigrow + levadura de pan) mostro un mayor contenido en Lys con 3.2%, Met con 1.3% y Arg con 4.5%. Estos aminoácidos son considerados esenciales en los organismos acuáticos, mismos que ejecutan diferentes funciones metabólicas, tal como; Transportadores de lípidos (beta oxidación en la membrana mitocondrial), osmorregulación, estructuras de membranas, precursores de neurotransmisores, transmetilaciones, transulfuraciones, síntesis de cisteína, taurina, incremento en el sistema inmune, desarrollo gastro intestinal y eliminación del amoniaco (Wilson, 2002; Harpaz, 2005; Zhou, 2005; Bouckenooghe *et al.* 2006; Mai *et al.* 2006). Nuestros resultados obtenidos en aminoácidos han sido mayores a lo encontrado por Waqalevu *et al.* (2019), donde el rotífero enriquecido mostró un contenido de Lys, Met y Arg de 1.40, 1.92 y 2.29 % respectivamente. Mientras que Duy Khoa *et al.*, (2021) realizaron un enriquecimiento de rotífero con aceite de huevos de salmón y obtuvieron un contenido de arginina y lisina (3.36 y 1.88% respectivamente). Por tal motivo, podemos aseverar que los rotíferos enriquecidos el Tratamiento T1, tendrá un mejor desempeño en la estimulación temprana de las larvas de peces marinos, en

especial de totoaba. Potencializando así su desarrollo y disminución de posibles malformaciones por déficit de nutrientes.

Tabla 7. Contenido de aminoácidos en el rotífero *Brachionus plicatilis* alimentado con cuatro distintos enriquecedores durante 3 días.

Aminoácidos	T1	T2	T3	T4
<i>Aminoácidos esenciales</i>				
HIS	0.9	0.6	0.7	0.8
ARG	4.5	3.3	3.6	3.7
THR	2.8	2	2.2	2.3
VAL	3.5	2.5	2.8	2.9
MET	1.3	0.9	1.1	1.1
LYS	3.2	2.1	2.6	2.7
ILE	3.2	2.3	2.6	2.7
LEU	5.3	3.7	4.2	4.5
PHE	3.6	2.6	2.9	3.1
Subtotal	28.5	20	22.7	23.8
<i>Aminoácidos no esenciales</i>				
ASP	6.7	4.9	5.4	5.5
SER	3.8	2.7	3	3.1
GLU	10.2	7.3	8.1	8.6
GLY	3	2.1	2.4	2.5
ALA	3.3	2.4	2.6	2.8
PRO	1.9	1.2	1.4	1.6
CYS	nd	nd	nd	nd
TYR	2.7	2	2.2	2.3
Subtotal	31.8	22.6	25	26.4
Otros				
TAU	nd	nd	nd	nd
Total	60.2	42.6	47.7	50.2

El alimento vivo no puede ser reemplazados por dietas comerciales debido a su calidad nutricional, principalmente el contenido de ácidos grasos esenciales (AGE) como el ARA (20:4n-6), EPA (20:5n-3) y DHA (C22:6 n-3), a los aminoácidos

y enzimas digestivas (Das *et al.*, 2012; Kandathil *et al.*, 2020). El Contenido de ácidos grasos del rotífero (*Brachionus plicatilis*) se observa en la Tabla 3. De manera general, T4 obtuvo una mayor concentración de ácidos grasos saturados (SFA) de 39.9%, y la menor concentración la obtuvo T1. En cuanto al contenido de ácidos grasos monoinsaturados, la mayor concentración fue mostrado en tratamiento T3 (35.9%) y la menor concentración observó en el T2. Sin embargo, T2 obtuvo una mayor concentración de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAS) de 48%, destacando ARA (C20:4n6) y DHA (C22:6n3) con una concentración de y 2.3 y 11.9% respectivamente. Cabe mencionar que la mayor concentración de EPA (C20:5n3) fue observado en el tratamiento T4 de 4.4% del 100% de los ácidos grasos metilados. Esto resultados concuerdan con lo reportado por Hamre *et al.* (2008), quien realizo un experimento utilizando enriquecimiento de yodo y selenio, el cual mostró contenidos de 1.6, 6.2, y 10.5% de ARA, EPA y DHA respectivamente e incrementando un 32% en supervivencia de larvas de bacalao del atlántico. Waqalevu *et al.*, (2019) obtuvo un mejor resultado con una dieta de *Chlorella vulgaris*, enriquecido con DHA y aceite de emulsión de huevos de salmón con un contenido de ARA, EPA y DHA de 0.37 ± 0.04 mg/g, 0.72 ± 0.07 mg/g y 1.81 ± 0.18 mg/g respectivamente. Sin embargo, estos autores observaron una menor tasa de supervivencia con respecto al tratamiento *Chlorella vulgaris* -DHA, atribuyendo estas diferencias a déficit de aminoácidos libres y proteína soluble. Por otro lado, Ghaderpour y Estévez (2020), encontraron un mayor contenido de DHA (335.1 mg g⁻¹) en los rotíferos enriquecidos con pimienta roja y una mayor concentración de ARA y EPA (172.7 mg g⁻¹ y 10.0 mg g⁻¹) en los enriquecidos por *Nannochloropsis sp.*

Tabla 8. Contenido de ácidos grasos en el rotífero *Brachionus plicatilis* alimentado con cuatro distintos enriquecedores durante 3 días.

ID	T1	T2	T3	T4
Ácidos grasos				
C13:0	8.4	5.6	11.1	6.2
C14:0	1.8	1.1	2.2	8.3
C15:0	0.8	0.5	0.6	0.6
C16:0	11.9	17.9	10.8	18.3
C18:0	5.1	5.0	4.5	3.9
C22:0	0.5	0.7	0.5	NID
C24:0	NID	1.0	0.6	2.6
ΣSFA	28.4	31.8	30.2	39.9
C14:1	NID	0.5	1.0	NID
C16:1	13.5	1.1	14.0	9.3
C18:1n9	14.0	8.4	14.5	11.9
C18:1n7	3.0	1.7	3.9	2.2
C20:1n9	1.7	2.6	1.9	1.1
C22:1n9	0.4	0.7	NID	0.4
C24:1n9	0.5	0.8	0.5	0.5
ΣMUFAS	33.3	15.8	35.9	25.5
C16:3N4	1.5	1.3	1.3	1.2
C18:2n6	13.7	18.1	10.7	8.5
C18:3N4	0.4	NID	NID	NID
C18:3n3	4.3	6.0	1.9	1.7
C18:4n3	1.3	0.8	NID	NID
C20:3N6	0.7	1.2	0.8	NID
C20:3N3	0.9	0.6	2.7	0.7
C20:4N6	1.5	2.3	0.8	1.4
C20:5n3	4.1	3.5	3.9	4.4
C22:5n3	1.6	2.3	1.9	1.7
C22:6n3	3.4	11.9	5.0	10.6
ΣPUFAS	33.4	48.0	28.8	30.0
NID*	4.9	4.4	5.1	4.6

*NID= no identificados

Algunos autores han atribuido algunos beneficios que genera el contenido de ácidos grasos esenciales en las larvas de peces, moluscos y crustáceos, donde incrementa o favorece el desarrollo del sistema nervioso, enfermedades cardiovasculares, los efectos antiinflamatorios, estrés, pigmentación, crecimiento,

supervivencia, formación de eicosanoides, longitud estándar, longitud de cabeza, diámetro ocular, el número de rayos de la aleta caudal (Zaki y Saad, 2010; Hee-Jin Kim *et al.*, 2014; Matsui *et al.*, 2020; Samat *et al.* 2020; Sol *et al.*, 2022). Sin embargo, Kotani *et al.*, (2013) resalta que un contenido por arriba del 18% de DHA en rotíferos, muestra un impacto negativo en larvas de la dorada roja y que lo correcto es mantenerlo entre 6 o 13% en rotífero.

VII. Conclusiones.

El contenido nutricional del rotífero (*Brachionus plicatilis*) puede ser ampliamente modificado en función del alimento enriquecido que le sea proporcionado.

Cabe mencionar, que el tratamiento Rotigrow Plus + levadura de pan, mostró un mayor contenido de proteína cruda (60.2%), lo que mostró una mayor cantidad de aminoácidos no esenciales (31.8%) y aminoácidos esenciales (28.5%), de estos últimos resaltando el valor de Lys (3.2%), Met (1.3%) y Arg (4.5%). .

Sin embargo, el tratamiento ORI-ONE mostró un mayor contenido de lípidos totales (14.2%) e impactando en el contenido de ácidos grasos poliinsaturados esenciales, como lo son ARA (2.3%), EPA (3.5%) y DHA (11.9%).

VIII. Recomendaciones.

- ✓ Se recomienda seguir realizando pruebas con distintos enriquecedores para obtener un mejor perfil y así, satisfacer las necesidades nutrimentales en etapas larvarias.

- ✓ Se recomienda analizar los contenidos proximales, aminoácidos y ácidos grasos de los enriquecedores y así como también, caracterizar bioquímicamente a los rotíferos en su alimento basal o inicial.

- ✓ Realizar mezclas en diversas proporciones de Rotigrow Plus +levadura de pan y ORI-ONE, para obtener el mejor balance en ácidos grasos esenciales poliinsaturados.

- ✓ Se recomienda hacer baños de iodo y selenio por 1.5 horas, esto con el fin de alcanzar mayores resultados en la supervivencia de las larvas.

- ✓ Finalizar con una prueba de alimentación de larvas y poder estimar el requerimiento idóneo de cada especie a reproducir.

IX. Bibliografía.

- Aires, D., Capdevila, N., Segundo, M.J. (2005). Ácidos grasos esenciales. 24 (4), pp. 96-102.
- AOAC. (1995). Asociación de Químicos Analíticos Oficiales. Métodos oficiales de análisis de AOAC International Vol. 1. AOAC International, Arlington, VA.
- Bouckenooghe, T., Remacle, C., Reusens, B. (2006). ¿Es la taurina un nutriente funcional? *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 9 (6): 728-733. PMID: 17053427. doi: 10.1097/01.mco.0000247469.26414.55
- Burbano, M.F., Torres, G.A., Prieto, M.J., Gamboa, J.H., Chapman, F.A. (2020). Increased survival of larval spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869) when fed with the copepod *Cyclopina sp.* and *Artemia nauplii*. *Aquaculture*. 519: 1-6.
- Camacho-Grajeda, M.V., Kotani, T., Sakakura, Y. Atsushi, H. (2008). Effects of feeding copepod and Artemia on early growth and behaviour of the self-fertilizing fish, *Rivulus marmoratus*, under laboratory conditions. , *Aquaculture* 281, pp. 100-105.
- Cavalin, F. G., & Weirich, C. R. (2009). Larval performance of aquacultured Florida pompano (*Trachinotus carolinus*) fed rotifers (*Brachionus plicatilis*) enriched with selected commercial diets. *Aquaculture*. 292(1): 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.03.042>
- Copeman, L. A., Parrish, C. C., Brown, J. A., & 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(1): 285–304. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00849-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00849-3)
- Das, P., Mandal, S., Bhagabati, S., Akhtar, M., Singh, S. (2012). Important live food organisms and their role in aquaculture. *Frontiers in aquaculture*. 5(4): 69-86.
- Duy Khoa, T. N., Waqalevu, V., Honda, A., Matsui, H., Truong, N. X., Sakaguchi, K., Kawaji, H., Ishikawa, M., Shiozaki, K., Kotani, T. (2021). Enrichment effects of fermented by-product of Shochu distillery on *Brachionus plicatilis sp.* rotifer

- and larviculture performance in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*. 535. 736352. ISSN:0044-8486. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736352>
- FAO. (2002). *Sobre la acuicultura y la pesca*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la alimentación. Recuperado el 04 de mayo del 2021 de: http://www.fao.org/spanish/newsroom/action/facts_fi_aqua.htm
- FAO. (2020). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción. Roma. <https://doi.org/10.4060/ca9229es>. ISSN 2663-8649.
- Fehér, M., Baranyai, E., Simon, E., Bársony, P., Szűcs, I., Posta, J., & Stündl, L. (2013). The interactive effect of cobalt enrichment in *Artemia* on the survival and larval growth of barramundi, *Lates calcarifer*. *Aquaculture*. 414–415, 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.07.031>
- Folch, J., Lee, M., Stanley, G. (1957). A simple method of isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497–509.
- García, A., Parrish, C., Brown, J. (2008). Use of enriched rotifers and *Artemia* during larviculture of Atlantic cod (*Gadus morhua* Linnaeus, 1758): effects on early growth, survival and lipid composition. *Aquaculture Research*. 39(4): 406-419. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01816.x>.
- Ghaderpour, S. y Estevez, A. (2020). Effect of Short-Term Rotifer Enrichment with Marine Phospholipids on Growth, Survival, and Composition of Meager (*Argyrosomus regius*) Larvae. *Frontiers in Marine Science*. 7(579002): 1-11. ISSN:2296-7745. DOI=10.3389/fmars.2020.579002
- Guevara M., Bastardo L., Cortez R., Arredondo-Vega B., Romero L., Gómez P. (2011). Pastas de *Rhodomonas salina* (Cryptophyta) como alimento para *Brachionus plicatilis* (Rotifera). *SciELO*. 59(4): 1503-1515. ISSN:0034-7744
- Guinot D., Monroig O., Hontoria F., Amat F., Varó I. y Navarro J. C. (2013). Enriched on-grown *Artemia metanauplii* actively metabolise highly unsaturated fatty acid-rich phospholipids. *Aquaculture*. 412-413, pp. 173-178.
- Hamre, K., Mollán, T.A., Øystein, S., Børre, E. (2008). Rotifers enriched with iodine and selenium increase survival in Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae.

- Aquaculture. 284 (1-4): 190-195. ISSN: 0044-8486.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.07.052>
- Hamre, K. (2016). Nutrient profiles of rotifers (*Brachionus* sp.) and rotifer diets from four different marine fish hatcheries. *Aquaculture*. Vol. 450:136-142. ISSN: 0044-8486. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.07.016>
- Harpaz, S. (2005). L-Carnitine and its attributed functions in fish culture and nutrition—a review. *Aquaculture*. 249:3–21.
- Hee-Jin, K., Yoshitaka, S., Isao, M., Toshio, N., Kazushi, T., Haruyuki, F., Atsushi, H. (2014). Feeding effect of selenium enriched rotifers on larval growth and development in red sea bream *Pagrus major*. *Aquaculture*. 432: 273-277. ISSN: 0044-8486. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.05.021>.
- Ismiño, O.R. (2002). Cultivo masivo de alimento vivo para larvas de peces. MEMORIAS: Manejo de Fauna silvestre en Amazonia y Latinoamérica, pp. 23-24. Recuperado el 04 de mayo del 2021 de: https://www.produccion-animal.com.ar/produccion_peces/piscicultura/23-alimento_larvas.pdf
- Jobling, M.(2001). Nutrient partitioning and the influence of feed composition on body composition. In: Houlihan, D., Boujard, T., Jobling, M. (Eds.), *Food Intake in Fish*. Blackwell Science, Oxford, pp. 354–375.
- Kandathil, D., AkbarAli, I., Schmidt, B., John, E., Sivanpillai, S., Thazhakot, S. (2020). Improvement of nutritional quality of live feed for aquaculture: An overview. *Aquaculture Research*. 51(1): 1-17. <https://doi.org/10.1111/are.14357>.
- Kassim, Z., John, A., Chin, L., Zakaria, N., Asgnari, N. (2014). Sustainable technique for selected live feed culture. En: Hernandez-Vergara, M. and Perez-Rostro, C. (Eds.), *Sustainable Aquaculture Techniques*, Croatia. pp. 105-133.
- Klaoudatos, S. D., Iakovopoulos, G., & Klaoudatos, D. S. (2004). *Pagellus erythrinus* (Common Pandora): A promising candidate species for enlarging the diversity of aquaculture production. *Aquaculture International*. 12(3): 299–320. <https://doi.org/10.1023/B:AQUI.0000036186.31318.4a>
- Koiso, M., Yoshikawa, M., Kuwada, H., & Hagiwara, A. (2009). Effect of maternal diet on survival and life history parameters of next generations in the rotifer

- Brachionus plicatilis sp. complex. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 75(5): 828–833.
<https://doi.org/10.2331/suisan.75.828>
- Kotani, T., Fushimi, H., Ota, Y., Miyajima, A., Sudo, K., Hayashi, M., Sato, N., Sato, S. (2013). EFFECT OF DHA AMOUNT IN SHIOMITSUBOWAMUSHI ON RED SEA BREAM SEEDLING PRODUCTION AND BREEDING RESULTS. *The Japan Society of Fisheries Growth*. 61(4): 321-330. ISSN: 2185-0194.
<https://doi.org/10.11233/aquaculturesci.61.321>
- Lavens, P. y Sorgeloos, P. (1996). Manual on the production and use of live food for aquaculture. Artemia Reference Center. FAO. Bélgica.
- Lee, M.C., Park, J. C., Yoon, D.-S., Choi, H., Shin, K.-H., Kim, H.-J., ... Lee, J.-S. (2019). Lipid metabolism modulation by five different food types in the monogonont marine rotifer *Brachionus koreanus*. *Aquaculture*. 503, 596–601.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.12.043>
- Lehmuskero, A., Chauton, M., Boström, T. (2018). Light and photosynthetic microalgae: A review of cellular-and molecular-scale optical processes. *Progress in Oceanography*, 168: 43-56.
<https://doi.org/10.1016/j.pocean.2018.09.002>.
- Lubzens, E. (1987). Raising rotifers for use in aquaculture. *Hydrobiologia*. 147(1): 245–255. <https://doi.org/10.1007/bf00025750>
- Luna-Figueroa, J., Arce Uribe, E., y Figueroa Torres, J. (2018). Ventajas e inconvenientes del uso de alimento vivo en la nutrición de peces. *Inventio: la génesis de la cultura universitaria en Morelos*, 14 (33), pp. 39-43.
- Mæhre, H. K., Hamre, K., & Elvevoll, E. O. (2013). Nutrient evaluation of rotifers and zooplankton: Feed for marine fish larvae. *Aquaculture Nutrition*, 19(3), 301–311. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2012.00960.x>
- Mai, K., Wan, J., Ai, Q., Xu, W., Liufu, Z., Zhang, L., Zhang, C., Li, H. (2006). Dietary methionine requirement of juvenile yellow croaker *Pseudosciaena crocea* R. *Aquaculture*. 251:564–572.
- Matsui, H., Shiozaki, K., Okumura, Y., Ishikawa, M., Waqalevu, V., Hayasaka, O., Honda A., Kotani, T. (2020). Effects of phosphorous deficiency of a microalga *Nannochloropsis oculata* on its fatty acid profiles and intracellular structure

- and the effectiveness in rotifer nutrition. *Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts*. 49. 101905. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101905>.
- Morizane, T. (1991). A review of automation and mechanization used in the production of rotifer in Japan. *Rotifer and microalgae culture systems. Proceeding of US–Asia workshop*. pp. 79–88. Honolulu, Hawaii: The Oceanic Institute.
- Naciones Unidas. (2010). *Conferencia de Revisión continuada del Acuerdo Relativo a la Conservación y Ordenación de Poblaciones de Peces Transzonales y las Poblaciones de Peces altamente migratorios*. New York. Recuperado el 04 de mayo del 2021 de: https://www.un.org/depts/los/convention_agreements/reviewconf/FishStocks_SP_A.pdf
- Nandy, A. C., Majunder, S.K. y Chakraborty, R.K. (1976). Experiments on the mass culture of *Brachionus Mulleri Pallas* in glass aquaria. Central Inland Fisheries Research Institute.
- NGHIA, N.T., WILLE, M., VANDENDRIESSCHE, S., THE VINH, Q., SORGELOOS, P. (2007). Influence of highly unsaturated fatty acids in live food on larviculture of mud crab *Scylla paramamosain* (Estampador 1949) larvae. *Aquaculture Research*, 38(14): 1512-1528.
- Øie, G., Olsen, Y. (1997). Protein and lipid content of the rotifer *Brachionus plicatilis* during variable growth and feeding condition. In: Hagiwara, A., Snell, T., Lubzens, E., Tamaru, C. (eds) *Live Food in Aquaculture. Developments in Hydrobiology*, vol 124. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-017-2097-7_39.
- Prieto Guevara, M. J. (2006). Alimento vivo y su importancia en acuicultura. *Revista Electrónica de Ingeniería en Producción Acuícola*, 2 (2).
- ProAqua. (2021). *Skretting Alimento ORI-ONE [Bolsa De 1.5 Kg]*. ProAqua México| Proveedora de Insumos Acuícolas, S.A. de C.V. Recuperado el 04 de mayo del 2021 de: <http://www.proaqua.mx/skretting-alimento-ori-one-bolsa-de-1-5-kg/>

- Reed Mariculture. (2019). *RotiGrow*® *Plus*. Reed Mariculture: ENSURING HATCHERY SUCCESS. Recuperado el 04 de mayo del 2021 de: https://reedmariculture.com/products/rotigrow-plus#tab_tech
- Reed Mariculture. (2019). *RotiGrow*® *OneStep*. Reed Mariculture: ENSURING HATCHERY SUCCESS. Recuperado el 04 de mayo del 2021 de: https://reedmariculture.com/product_rotigrow_onestep.php
- Rivas García, L. M. (2014). Influencia del alimento vivo sobre el crecimiento y supervivencia durante el desarrollo temprano del huachinango del Pacífico (*Lutjanus peru*) y del pargo amarillo (*Lutjanus argentiventris*) (Tesis de maestría). Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste, S.C. Recuperado de: https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/546/1/rivas_l.pdf
- Samat, N. A., Yusof, F. M., Rasdi, N. W., Karim, M. (2020). Enhancement of Live Food Nutritional Status with Essential Nutrients for Improving Aquatic Animal Health: A Review. *Animals*. 10(12): 1-27. EISSN: 2076-2615. <https://doi.org/10.3390/ani10122457>
- Segovia Salas, J. C. (2019). Efecto del enriquecimiento de rotíferos (*Brachionus plicatilis*) y *Artemia sp.* con taurina sobre el crecimiento y sobrevivencia de larvas de *Totoaba macdonaldi*. Universidad Autónoma de Baja California, Facultad de Ciencias Marinas. pp: 1-53.
- Seiffert, M., Cerqueira, V., Madureira, L. (2001). Effect of dietary (n-3) highly unsaturated fatty acids on growth and survival of fat snook (*Centropomus parallelus*, Pisces: Centropomidae) larvae during first feeding. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 34: 645-651. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2001000500013>.
- Sol, J., Li, J., Li, Y., Du, J., Zhao, N., Mai, K., Ai, Q. (2022). Regulation of $\Delta 6$ Fads2 Gene Involved in LC-PUFA Biosynthesis Subjected to Fatty Acid in Large Yellow Croaker (*Larimichthys crocea*) and Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biomolecules*. 12(5): 1-20. EISSN: 2218-273X. <https://doi.org/10.3390/biom12050659>

- Srivastava, A., Hamre, K., Stoss, J., Chakrabarti, R., & Tonheim, S. K. (2006). Protein content and amino acid composition of the live feed rotifer (*Brachionus plicatilis*): With emphasis on the water soluble fraction. *Aquaculture*, 254(1), 534–543.
- Tacón, A. G. (1989). NUTRICION Y ALIMENTACION DE PECES Y CAMARONES CULTIVADOS MANUAL DE CAPACACITACION. FAO. Recuperado el 01 de mayo del 2022 de: <https://www.fao.org/3/ab492s/AB492S00.htm#TOCwu>
- Torrentera Blanco, L. y Tacón Albert, G.J. (1989). LA PRODUCCION DE ALIMENTO VIVO Y SU IMPORTANCIA EN ACUACULTURA. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Recuperado el 04 de mayo del 2021 de: <http://www.fao.org/3/ab473s/AB473S00.htm#:~:text=En%20la%20Acuacultura%2C%20uno%20de,de%20peces%2C%20crust%C3%A1ceos%20y%20molusos>
- Waqalevu, V., Honda, A., Dossou, S., Duy Khoa, T.N., Matsui, H., Mzengereza, K., Liu, H., Ishikawa, M., Kazuhiro, S., Kotani, T. (2019). Effect of oil enrichment on *Brachionus plicatilis* rotifer and first feeding red sea bream (*Pagrus major*) and Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*. 510: 73-83. ISSN: 0044-8486. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.05.039>
- Wax, E. (2019). *Aminoácidos*. MedlinePlus. Recuperado el 04 de mayo del 2021 de: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/002222.htm>
- Wikfors, G., Ohno, M. (2001). Impact of algal research in aquaculture. *Journal of Phycology*, 37(6), 968-974. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2001.01136.x>.
- Wilson, R. P. (2002). Protein and amino acids. In: Halver JE, Hardy RW (eds) *Fish Nutrition*, 3rd edition. Elsevier Science. San Diego, USA, pp 144–179.
- Wu, G. (2009). *Amino acids: metabolism, functions, and nutrition*. Springer-Verlag. Vol. 37: 1-17. DOI:10.1007/s00726-009-0269-0.
- Wu, G. (2010). *Functional Amino Acids in Growth, Reproduction, and Health*. American Society for Nutrition. 1:31-37. Doi:10.3945/an.110.1008.
- Zaki, M., Saad, H. (2010). Comparative study on growth and survival of larval and juvenile *Dicentrarchus labrax* rearing on rotifer and *Artemia* enriched with four different microalgae species. *African Journal of Biotechnology*. 9(24):

3676-3688.

ISSN:

1684–5315.

<https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/82463>

Zhou, X. (2005). Use of synthetic lysine in fish feeds: a review on research and application. *Feed Ind.* 27:1–7.