



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS**

**"Alimentación de *Artemia franciscana* con Microalgas  
Cultivadas bajo diferentes tipos de Luz"**



**Tesis**  
Que para obtener el Título de  
**Oceanólogo**  
Presenta  
**Juan Gabriel Correa Reyes**

Ensenada, B.C.

Noviembre de 1993

**"ALIMENTACION DE *Artemia franciscana* CON MICROALGAS  
CULTIVADAS BAJO DIFERENTES TIPOS DE LUZ"**

**TESIS  
QUE PRESENTA  
JUAN GABRIEL CORREA REYES**

**Aprobada por:**



**Presidente del jurado**

**M.C. Maria del Pilar Sánchez Saavedra**



**M.C. Antonio Silva Loera  
Sinodal**



**Oc. Enrique Valenzuela Espinoza  
Sinodal**

**Ensenada Bja. Calif. a Noviembre de 1993**

## RESUMEN:

Se cultivó Chaetoceros sp. con la técnica semicontinua bajo tres diferentes tipos de luz (azul, blanca y azul con una contribución de 0.76 % de luz blanca), con la finalidad de alimentar Artemia franciscana para determinar diferencias en crecimiento, composición proximal y producción de progenie. Chaetoceros sp. se mantuvo en garrafones de 18 litros con 15 litros de medio "f", iluminación continua y tasa de dilución diaria equivalente al 50 % del volumen del cultivo. La mayor producción de microalgas se obtuvo en luz blanca seguida de luz azul y azul mezclada. Sin embargo, el mayor contenido protéinico para Chaetoceros sp. se encontró con luz azul mezclada (58.48%), que con luz azul (52.58%) y blanca (41.06%). El crecimiento de Artemia franciscana, evaluado al día de formación de parejas, fue significativamente mayor cuando se alimento con microalgas cultivadas bajo luz blanca (6890.75  $\mu\text{m}$ ), seguida de luz azul (6282.30  $\mu\text{m}$ ) y azul mezclada (6286.60  $\mu\text{m}$ ). El contenido protéinico fue mayor para Artemia alimentada con microalgas producidas con luz blanca (26.7%) y menores para azul mezclada (24.52%) y azul (22.54%), pero las diferencias, en estos casos no fueron significativas. Se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de sobrevivencia de Artemia al utilizar las dietas de microalgas cultivadas con luz azul (81 a 90 %), respecto a la luz blanca, con la cual se obtuvo aproximadamente el 70 % de mortalidad. Se determinó una mayor producción de nauplios para Artemia alimentada con las microalgas cultivadas en luz blanca, con respecto a las de luz azul mezclada y azul, pero los organismos alimentados con microalgas producidas bajo luz azul produjeron la mayor cantidad de quistes. La producción total de progenie de Artemia por cada pareja, fue superior con las microalgas cultivadas bajo luz blanca, pero la diferencias no fueron significativas. La discrepancia de los resultados, en dependencia de los varios criterios de evaluación, podría indicar que la dieta de luz azul resultó ser de menor calidad que las demás.

## **DEDICATORIA:**

### **A MI MAMA**

Luz Maria Correa Reyes, por todo su amor, apoyo y comprension, a lo largo de todos estos años. Y por que todo lo que soy se lo debo a ella. GRACIAS MAMITA.

### **A MIS ABUELITOS**

Genaro Correa García (†) y Maria de la Luz Juana Reyes Paredes (†), por haber sabido guiarme en el principio de mi vida.

### **A LETY**

Por su amor y cariño durante estos cinco años. Y por ser simplemente como es.

## **AGRADECIMIENTOS:**

A mi directora de tesis Maria del Pilar Sánchez Saavedra, por la ayuda y consejos brindados a lo largo de este trabajo de tesis.

Al Dr. Domenico Voltolina Lobina, por haber creído en mi y permitirme ser un estudiante más en su proyecto de investigación.

Al M.C. Antonio Silva Loera, Oc. Enrique Valenzuela y QFB Miguel H. Carrillo por la revisión, corrección y sugerencias sobre este trabajo, así como el aceptar ser mis sinodales.

Al P. Oc. Maria Leticia Monroy Lara por haberse desvelado junto conmigo durante todo el trabajo de esta tesis.

A mis tíos Adolfo, Alfonso, Genaro, German, Gela, Ana, Meche y Marcela, por su gran apoyo, cariño y confianza durante toda mi vida.

A mis primos Monica, Juan Carlos, German, Mauricio, Arturo, Fernando, Pilar, Jazmin, Adolfo, Marco, David e Isabel, por todos los momentos tan inolvidables que hemos vivido.

Al Oc. Gabriel Alejandro López Morteo por la gran ayuda brindada en la organización e impresión de este trabajo.

A todos mis amigos, maestros y personas que me ayudarán y apoyarán en el transcurso de mi carrera y de mi vida estudiantil.

A los "GEBOS", en especial a los del area de biología, por todos los momentos tan curas y las crudas que pasamos juntos.

Al departamento de Buceo de la Facultad de Ciencias Marinas y a la Asociación de Salvavidas y Rescate por todos los momentos que he vivido con ellos.

A mi Facultad porque en ella vivi uno de los momentos más importantes de mi vida

Al CICESE en especial al Departamento de Acuicultura. A mis técnicos Norberto y Francisco, por la ayuda en la implementación y buen funcionamiento de mis sistemas de cultivo.

Y para todos aquellos, que no por ser menos importantes, no aparecen en esta líneas.

## INDICE

I. INTRODUCCION .....	1
I.1.OBJETIVOS.....	11
II.MATERIALES Y METODOS .....	12
II.1.Selección de especies .....	12
II.2 Efecto de la luz de diferente longitud de onda .....	12
a).- Características de las lámparas.....	12
b).- Condiciones experimentales de luz .....	12
c).- Efecto del tipo de iluminación.....	13
d).- Composición proximal.....	14
II.3. Bioensayo de crecimiento.....	15
III.RESULTADOS .....	18
III.1 Efecto del tipo de iluminación sobre la producción de biomasa y la composición proximal de <u>Chaetoceros</u> .....	18
III.2. Bioensayo de crecimiento.....	24
1.- Crecimiento de <u>Artemia franciscana</u> .....	24
1.1 Comparación entre organismos de la misma edad.....	24
1.2 Duración de estadios y sobrevivencia .....	26
2.- Composición proximal de adultos a la fecha de apareamiento.....	29
3.- Formación de parejas.....	29
4.-Sobrevivencia .....	31
5.- Evaluación de progenie .....	32
IV. DISCUSIONES .....	37
IV.1. Producción de biomasa de <u>Chaetoceros</u> sp .....	37
IV.2. Composición bioquímica de <u>Chaetoceros</u> sp .....	39
IV.3. Crecimiento de <u>Artemia franciscana</u> .....	41
IV.4. Composición proximal de <u>Artemia franciscana</u> .....	42
IV.5. Producción de progenie de <u>Artemia franciscana</u> .....	44
V. CONCLUSIONES .....	46
VI. LITERATURA CITADA .....	47

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Rutas principales del carbono para el fitoplanctón. Abreviaciones: PCRC: Ciclo fotosintético de la reducción del carbono. PGA: 3-fosfoglicerato. PEP: Fosfoenolpiruvato. OAA: Oxaloacetato. ACoA: Acetil coenzíma A. (Modificada de Raven y Beardall, 1981 ..... 7
- Figura 2. Valores promedio de la densidad óptica antes y después de diluir, de cultivos semicontínuos de Chaetoceros sp. en luz azul (LA), azul mezclada (LAM) y blanca (LB ..... 19
- Figura 3. Curva de crecimiento promedio para Artemia franciscana, alimentada con Chaetoceros sp. cultivada en luz azul (LA), azul mezclada (LAM) y blanca (LB ..... 25
- Figura 4. Producción de progenie por pareja de Artemia franciscana alimentada con Chaetoceros sp. cultivado de la izquierda a la derecha, en luz blanca, luz azul mezclada y luz azul. Las cajas encierran el 50 % de los percentiles (25 % a cada lado del valor de la mediana ..... 36

## LISTA DE TABLAS

Tabla I. A). Valores promedio y desviación estándar del número de células (cél/ml), $\mu\text{g}$ del peso orgánico seco (POS) y de cenizas (PC) por millón de células para <u>Chaetoceros</u> sp. cultivado en luz azul (LA), azul mezclada (LAM), y blanca (LB). B). Pruebas "t" de diferencia de medias con los valores promedio de número de células, peso orgánico seco (POS) y de peso de cenizas (PC) donde A: acepta; y R: rechaza .....	20
Tabla II. Análisis de varianza de una vía realizado con los valores del porcentaje de proteínas, carbohidratos y lípidos de <u>Chaetoceros</u> sp. cultivado en luz azul (LA), azul mezclada (LAM) y blanca (LB).....	21
Tabla III. Valores promedio, desviaciones estándar y comparaciones a posteriori vía "LSD" ( $\alpha=0.05$ ) de los valores de proteínas, lípidos y carbohidratos en porcentaje de peso orgánico seco (POS) de <u>Chaetoceros</u> sp. cultivado en luz azul (LA), azul mezclada (LAM) y blanca (LB). También se indica el contenido de cenizas (en % del peso seco total).....	21
Tabla IV. Análisis de varianza de una vía no paramétrico de Kruskal-Wallis (K-W) calculado con los valores del porcentaje de cenizas (PC) de <u>Chaetoceros</u> sp. cultivado con luz azul (LA), azul mezclada (LAM) y blanca (LB).....	22
Tabla V. Análisis de varianza de una vía calculado con los valores de clorofila "a", "b" y "c" ( $\mu\text{g}/10^6$ cél.) para <u>Chaetoceros</u> sp. cultivado con luz azul (LA), azul mezclada (LAM) y blanca (LB).....	23
Tabla VI. Valores promedio, desviaciones estándar y comparaciones a posteriori vía "LSD" ( $\alpha=0.05$ ) para los valores de clorofila ( $\mu\text{g}/10^6$ cél.) en <u>Chaetoceros</u> sp. cultivado en luz azul (LA), azul mezclada (LAM) y blanca (LB) .....	23

Tabla VII. Análisis de varianza de una vía no paramétrico de Kruskal-Wallis (K-W) calculado con los valores de longitud para los días 2,10 y estadio de adultos en <u>Artemia franciscana</u> alimentada con <u>Chaetoceros</u> sp. cultivado con luz azul (LA), azul mezclada (LAM) y blanca (LB).....	26
Tabla VIII. Análisis de varianza de una vía calculado con los valores de longitud por día y por estadio de vida para <u>Artemia franciscana</u> alimentada con <u>Chaetoceros</u> sp. cultivado en luz azul (LA), azul mezclada (LAM) y blanca (LB) .....	27
Tabla IX. Valores promedio (en $\mu\text{m}$ ), desviación estándar (D.E.) y comparaciones a posteriori vía "LSD" ( $\alpha=0.05$ ) con los valores de talla promedio para las diferentes fechas de medición para <u>Artemia franciscana</u> alimentada con <u>Chaetoceros</u> sp. cultivado con luz azul (LA), azul mezclada (LAM) y blanca (LB) .....	28
Tabla X. Caracterización por estadio de vida, donde N=nauplio, M=metanauplio, J=juvenil y A=adulto, durante las fechas de muestreo y tiempo para la formación de parejas (FP) y porcentaje de sobrevivencia de <u>Artemia franciscana</u> alimentada con <u>Chaetoceros</u> sp. cultivado con luz azul (LA), azul mezclada (LAM) y blanca (LB) .....	29
Tabla XI. Análisis de varianza de una vía realizado con los valores del porcentaje de proteínas, carbohidratos, lípidos, cenizas y peso orgánico seco (POS), de <u>Artemia franciscana</u> alimentada con <u>Chaetoceros</u> sp. cultivado con luz azul (LA), azul mezclada (LAM) y blanca (LB).....	30
Tabla XII. Valores promedio, desviaciones estándar y comparaciones a posteriori vía "LSD" ( $\alpha=0.05$ ) para los valores de proteínas, lípidos, carbohidratos en porcentajes de peso orgánico seco (POS), de <u>Artemia franciscana</u> alimentada con <u>Chaetoceros</u> sp. cultivado en luz azul (LA), azul mezclada (LAM) y blanca (LB).....	31

- Tabla XIII. Porcentajes de sobrevivencia (por acuario) para Artemia franciscana alimentada con Chaetoceros sp. cultivado con luz azul (LA), azul mezclada (LAM) y blanca (LB), a las fechas inicial y final del período de formación de parejas..... 31
- Tabla XIV. Días para la formación de parejas por acuario (A-C) de Artemia franciscana alimentada con Chaetoceros sp. cultivado con luz blanca. Días de evaluación, valores mínimos y máximos de nauplios por pareja y mediana general (Mp) de producción de progenie..... 33
- Tabla XV. Días para la formación de parejas por acuario (A-C) de Artemia franciscana alimentada con Chaetoceros sp. cultivado en luz azul mezclada. Días de evaluación, valores mínimos y máximos de nauplios y quistes por pareja, mediana de nauplios (acuاریo B y C) (Mn-BC), medianas de nauplios (Mn-A) y quistes del acuario A (Mq-A) y mediana de producción de progenie general (Mp) ..... 34
- Tabla XVI. Días para la formación de parejas por acuario (A-C) de Artemia franciscana alimentada con Chaetoceros sp. cultivada en luz azul. Días de evaluación, valores mínimos y máximos de nauplios y quistes por pareja, mediana de nauplios (Mn), quistes (Mq) y mediana de producción de progenie general (Mp) ..... 35

## "ALIMENTACION DE *Artemia franciscana* CON MICROALGAS CULTIVADAS BAJO DIFERENTES TIPOS DE LUZ"

### I. INTRODUCCION:

El alimento utilizado convencionalmente en la acuicultura para la mayoría de los estadios larvales y para algunos adultos de moluscos, crustáceos y peces son las microalgas. Existen estudios relacionados con la formulación de dietas alternativas (Gabbot *et al.*, 1976; Langdon y Waldock, 1981; Langdon *et al.*, 1985), sin embargo, hasta el momento ninguna de estas formulaciones garantiza niveles comparables de sobrevivencia y crecimiento (Droop, 1975; Coutteau y Sorgeloos, 1992). Es por esto, que se sigue investigando sobre el valor alimenticio de estos microorganismos y las formas de modificarlo (Parsons *et al.*, 1961; Wikfors, 1986; Whyte, 1987).

Para esto, hay que considerar diferentes factores y técnicas que pueden producir cambios en la composición de una microalga; entre éstos la forma de cultivarla (p.e. manteniéndola en cultivos semicontínuos o contínuos con diferentes tasas de cosecha, el variar la cantidad y las concentraciones relativas de los nutrientes presentes en el medio o el introducir artificialmente factores limitantes como falta de CO<sub>2</sub> o de luz), o mantenerla y cosecharla en diferentes fases de crecimiento, son las que se mencionan más frecuentemente (Fogg y Thake, 1987; Fabregas *et al.*, 1989).

A continuación, se hace una breve reseña de los factores más importantes que influyen sobre el crecimiento y la composición de las microalgas.

- Nutrientes.- Los elementos minerales que necesitan las microalgas se dividen en dos grupos: macronutrientes y micronutrientes. Los macronutrientes son usados directamente

por las algas para sintetizar los compuestos orgánicos que constituyen las células, mientras que los micronutrientes se necesitan en menores concentraciones como catalizadores o reguladores. Tradicionalmente se incluyen entre los macronutrientes el nitrógeno, el fósforo y el silicio. Las fuentes de nitrógeno asimiladas por las microalgas son preferentemente sales de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ). La fuente preferida de fósforo son generalmente, los fosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) inorgánicos en solución, aunque algunas especies pueden utilizar otras fuentes de fósforo, incluyendo las orgánicas. Los silicatos sólo son necesarios como macronutrientes en las diatomeas y principalmente en su forma de  $\text{H}_4\text{SiO}_4$  (Burton, 1980). En cuanto a los requerimientos de micronutrientes, éstos pueden variar de acuerdo a la especie. Los más importantes entre éstos son los metales como Cu, Zn, Co, Mn, Mo, y Fe, que en general se agregan a los medios de cultivo en las formas de sulfato cúprico ( $\text{CuSO}_4$ ), sulfato de zinc ( $\text{ZnSO}_4$ ), cloruro de cobalto ( $\text{CoCl}_3$ ), cloruro manganoso ( $\text{MnCl}_2$ ), molibdato de sodio ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ ) y cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) (Voltolina *et al.*, 1991). Entre los micronutrientes se pueden considerar también a las vitaminas, ya que varias especies de microalgas han perdido la capacidad de sintetizarlas y por lo tanto las requieren como nutrientes.

En el caso de las microalgas marinas, solamente se han encontrado deficiencias de las vitaminas  $\text{B}_{12}$ , tiamina y biotina (Riley y Chester, 1971; Bonin y Maestrini, 1981).

-  $\text{CO}_2$  y pH.- Todo crecimiento algal ya sea quimio- o fotolitotrófico usa, para la síntesis de componentes orgánicos, alguna forma disuelta de carbono inorgánico. En el agua, esto puede aparecer como  $\text{CO}_2$ ,  $\text{HCO}_3^-$  o  $\text{CO}_3^{2-}$ , en concentraciones relativas que dependen del pH del medio. El pH típico del agua de mar es de 8.0 a 8.5, y la forma de carbono más común es  $\text{HCO}_3^-$  (Kaplan *et al.*, 1986).

La cantidad de  $\text{CO}_2$  en el medio puede ser un factor limitante de primera importancia para el crecimiento de las microalgas, pero la cantidad de  $\text{CO}_2$  adicionada a un cultivo

debe controlarse, ya que un exceso de CO<sub>2</sub> causa disminuciones de pH que pueden ser letales para un cultivo (Goldman y Stanley, 1974).

- Salinidad.- Las microalgas marinas pueden en general sobrevivir dentro de un intervalo relativamente amplio de salinidad, sobre todo en el caso de especies costeras, pero esto puede implicar un gasto energético, debido a la necesidad de mantener un ambiente endocelular relativamente constante. Se ha encontrado que la salinidad óptima para muchas especies es entre 25 y 30 ‰, menor que la del agua de mar natural (Voltolina et al., 1991).

- Temperatura.- La mayoría de las especies de microalgas crecen entre los 10 y 35°C, con un óptimo entre 16 y 24°C (Voltolina et al., 1991).

La reproducción, que en las microalgas es principalmente asexual por división celular binaria, es influenciada por la interacción entre la intensidad luminosa y el período de iluminación, así como por la temperatura. En muchas diatomeas una temperatura de 20°C y una irradiancia de  $1.20 \times 10^{16} \text{ Q/s/cm}^2$  ( $200 \mu\text{M/s/m}^2$ ) son condiciones favorables para el crecimiento. Cuando la temperatura aumenta, la cantidad de la luz debe reducirse y cuando la temperatura disminuye debe incrementarse (Kaplan et al., 1986; Geider, 1987).

- Luz: La luz debe ser considerada como una de las variables ambientales de importancia fundamental para el fitoplancton, por su función como fuente de energía para la excitación de la clorofila "a" en el proceso fotosintético. Debido a sus grandes fluctuaciones en espacio (profundidad y latitud) y tiempo (días y estaciones), resulta ser muy frecuentemente un factor limitante para el fitoplancton (Darley, 1987).

El efecto de la luz sobre el fitoplancton marino es un tema al que se ha dado mucha atención, estudiándose principalmente su respuesta sobre la razón de fotosíntesis

(Steeman-Nielsen, 1975; Platt *et al.*, 1980), la importancia del ciclo luz-obscuridad (Brand y Guillard, 1981), los mecanismos de adaptación a la luz y a la sombra (Falkowski y Owens, 1980) y los cambios inducidos en el metabolismo celular (Prézelin, 1981).

Se sabe que cambios de irradiancia producen variaciones en la composición y/o concentración de pigmentos y en las características fotosintéticas y morfológicas. Steemann Nielsen y Jorgensen (1968) encontraron mayores razones de fotosíntesis y menores concentraciones de clorofila por célula en algas cultivadas en altas irradiancias de luz, que las cultivadas en bajas irradiancias.

Falkowski y LaRoche (1991) reportaron que la fotoaclimatación es acompañada por cambios morfológicos en el volumen de la célula, el número y densidad de las membranas tilacoides, el tamaño de los pirenoides y otros cuerpos de reserva (plastidios), y algunas veces por cambios en el número de plastidios por célula. A nivel celular también se notaron variaciones en la concentración y el tipo de pigmentos y en el contenido de lípidos.

Todas las algas son capaces de presentar fotoaclimatación, incluyendo los dinoflagelados, cianobacterias, diatomeas y clorofíceas unicelulares. Dependiendo del tipo de respuesta, estos cambios pueden ocurrir a escalas de tiempo diferente (instantáneas o de varias generaciones). Falkowski y Owens (1980) y Falkowski *et al.* (1981) clasificaron dos tipos básicos de aclimatación: la primera consiste en la alteración del tamaño pero no del número de unidades fotosintéticas, mientras que en la segunda se modifica el número de unidades fotosintéticas pero no cambia su tamaño. Estos mismos autores encontraron que el mecanismo de fotoaclimatación de las diatomeas es el primero, mientras que las clorofitas alteran el número de las unidades fotosintéticas.

Por otro lado, a través de estudios de laboratorio se ha visto que la luz no es la única

causante de éstos cambios, y que su calidad juega un papel muy importante en estas variaciones (Kirk, 1983).

Voskresenskaya (1972) encontró que bajo luz azul algunas plantas produjeron más aminoácidos y proteínas, en comparación a otras que crecieron bajo luz roja y blanca de la misma intensidad. Las razones de fotosíntesis fueron también mayores en luz azul con respecto a las encontradas para luz verde y blanca. Estos resultados difieren de los mencionados por Baatz (1941), quien reportó un mayor crecimiento en luz verde con respecto a la azul. Ojala (1993) encontró que las algas, al ser sometidas a una determinada calidad de luz, presentan una adaptación cromática, cambiando las proporciones de sus pigmentos fotosintéticos.

Las longitudes de onda azul-verde dominan los ambientes acuáticos de baja intensidad de luz, debido a la absorción diferencial de la luz en la columna de agua. Es por ésto que las proporciones de los pigmentos accesorios a la clorofila "a" pueden variar con la profundidad; con este mecanismo se logra una mayor eficiencia en la captación de energía, ya que los pigmentos accesorios tienen sus picos de absorción a longitudes de onda diferentes de las clorofilas. Por tal motivo, al ir aumentando la profundidad y no poder las clorofilas captar la energía luminosa presente, se incrementan los pigmentos accesorios (Darley, 1987). Por ejemplo, en el caso de las cianobacterias (algas azul-verde) Bogorad (1975) reportó que las células cultivadas bajo luz verde (540 nm) tienen proporciones mayores de ficoeritrina roja (640 nm) y ficocianina azul (con pico de absorción entre 610 y 640 nm).

Los cambios antes referidos se deben a que las variaciones en los espectros de irradiancia modifican algunas funciones metabólicas en todos los seres vivos (Voskresenskaya, 1972). En algunos trabajos con microalgas, se ha comprobado que variaciones en las longitudes de onda de la luz pueden causar cambios en la proporción

de constituyentes celulares, incluyendo los pigmentos, influyendo además en la fotosíntesis, en el crecimiento (Wallen y Geen, 1971 a, b; Faust *et al.* 1982, Humphrey; 1983) y en la secreción (Brown y Geen, 1974), aunque Morel *et al.* (1987) encontraron que la irradiancia es más importante que la composición espectral en la fotoaclimatación de la diatomea Chaetoceros protuberans.

Trabajos de Wallen y Geen (1971 a, b y c), demostraron que diferentes espectros de calidad de luz, pero de la misma intensidad luminosa, producen diferencias en la cantidad de DNA, RNA, en el número de células, en la concentración de proteínas y de pigmentos fotosintéticos. Además, la velocidad de crecimiento celular y el número de divisiones por día resultaron mayores en luz azul, con respecto a los encontrados con luz blanca y verde. Tanada (1951) reportó que la eficiencia fotosintética de los carotenos fue casi tan alta como la de clorofilas en diatomeas cultivadas con luz azul.

Al aumentar la síntesis de proteínas automáticamente hay un incremento en aminoácidos, en especial de glutamato y aspartato y otros productos intermedios del ciclo de Krebs, ya que, la luz azul estimula la  $\beta$ -carboxilación la cual a su vez favorece la fijación del  $\text{CO}_2$ , resultando en un incremento de la producción de oxaloacetato, malato y otros constituyentes del ciclo de Krebs (Wallen y Geen, 1971 a). Estos resultados fueron confirmados por Voskresenskaya (1972), quien determinó que algas cultivadas con luz azul sufrían cambios fisiológicos en el metabolismo celular. Mediante la incorporación de  $^{14}\text{C}$  se encontraron incrementos considerables en las concentraciones de aspartato, glutamato y malato, en comparación con las encontradas con luz roja y verde. La luz azul produce un incremento en la reacción de la glicólisis (Fig. 1), que origina un incremento en la producción de enzimas para la formación de fosfoenol piruvato (PEP). Como resultado de la activación de la carboxilación del PEP bajo luz azul, se forma oxaloacetato (OAA) que es parcialmente reducido a malato mientras otra fracción es

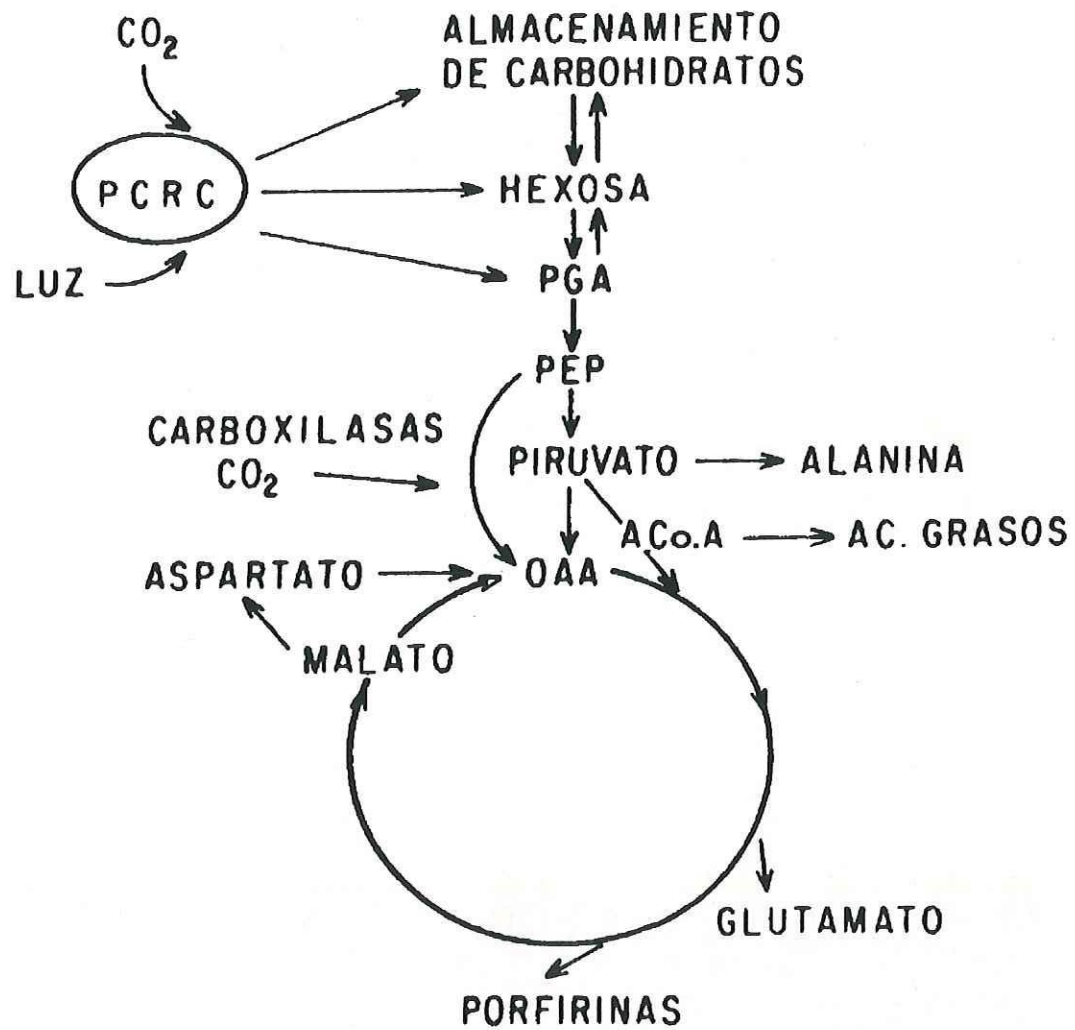


Figura 1. Rutas principales del carbono para el fitoplancton. Abreviaciones: PCRC: Ciclo fotosintético de la reducción del carbono. PGA: 3-fosfoglicerato. PEP: Fosfoenolpiruvato. OAA: Oxaloacetato. ACoA: Acetil coenzíma A. (Modificada de Raven y Beardall, 1981).

convertida a aspartato. El OAA puede servir también como fuente de reserva para la continua regeneración de las reacciones del ciclo de Krebs, permitiéndole a su vez la síntesis de glutamato. Esta ruta puede seguir tanto en presencia como en ausencia de fotosíntesis, probablemente en relación con un incremento de mecanismos anapleróticos asociados con la activación de las reacciones del ciclo de Krebs.

Flaak y Epifanio (1978) encontraron una mayor concentración de proteínas en Thalassiosira pseudonana cultivada con luz azul, con respecto a los cultivos en luz blanca y en una mezcla de luz azul y roja (agro-lite); observaron también que la calidad de luz y la fase del cultivo afectaban el tamaño de las células y que ostras adultas alimentadas con T. pseudonana cultivada con luz azul alcanzaban un tamaño inferior a las alimentadas con los otros cultivos.

Desde el punto de vista de utilización práctica de las microalgas para la acuicultura, existen otras variables, aparte de la composición proximal, que deben de ser consideradas. Entre éstas, la aceptabilidad y la digestibilidad del alimento se pueden comprobar fácilmente, con bioensayos con organismos filtroalimentadores como por ejemplo los branquiopodo Artemia sp.

Artemia sp. es un organismo valioso para bioensayos, ya que, es de fácil cultivo, tiene un ciclo biológico corto (12- 17 días), es de fácil manejo y tiene un alto valor nutricional. La nutrición de Artemia se basa en su mecanismo de filtración no selectivo, esto quiere decir que ingiere todo tipo de partículas en suspensión; ya sean microalgas, bacterias, levaduras ó alimento inerte (salvados y harinas de diferentes tipos de cereales). Por lo antes mencionado, Artemia sp. se emplea en varias disciplinas, para la investigación y la enseñanza (Castro y Gallardo. 1985).

Más de 85% de las especies marinas que se han podido cultivar son alimentadas con nauplios de Artemia sp., usados como complemento, o a menudo como dieta única y

exclusiva (Kinne, 1976). Excelentes ejemplos de éstos son las etapas larvales de los camarones y los cultivos de peces (Bardach et al. 1986).

Por estudios de laboratorio se ha comprobado que alimentando Artemia con diferentes especies de microalgas, ya sea deshidratadas o frescas como: Dunaliella, Chlorella, Spirulina, Tetraselmis, Isochrysis, Chlamydomonas, Nitzschia, Scenedesmus y Chaetoceros se obtienen distintas tasas de crecimiento (Castro y Gallardo, 1985; Arriaga-Haro, CICESE, com. pers.) y que éstas pueden ser diferentes hasta con el mismo tipo de alimento suministrado en forma diferente (Paniagua-Chávez, 1993), también se han alimentado en laboratorio con suero de leche, extracto de hígado y con algunas macroalgas como Porphyra, Enteromorpha (Memorias de curso de titulación: Cultivo de Artemia), lo cual indica una buena plasticidad de Artemia a utilizar diferentes tipos de alimento.

Johnson (1980), reporta que Artemia en cultivos axénicos se vuelve infértil después de varias generaciones, ya que algunas bacterias llegan a proveer vitaminas que son necesarios para su alimentación. Las vitaminas son importantes para la formación de adultos maduros, ya que se ha comprobado que en ausencia de tiamina y ácido fólico estas no llegan a estadio de metanauplio y/o juvenil.

Con respecto a sobrevivencia se ha encontrado que Artemia alimentada con salvado de arroz presenta mayor sobrevivencia, crecimiento y bajo costo comparado con la dieta de alimento vivo, siendo este mejor, pero su producción masiva resulta onerosa, de ahí el uso de compuestos orgánicos como biodigeridos de vaca (Landau et al., 1985).

Johnson (1980), encontró que Artemia alimentada con Enteromorpha (Macroalga) más un porcentaje de salvado de arroz, tiene sobrevivencias del 85%. Otros estudios de alimentación de Artemia han demostrado que la alimentación con Porphyra perforata se obtienen mayores crecimientos en relación a Tetraselmis suecica, sin embargo la

sobrevivencia fue bajando, llegando en algunos casos a la mortalidad total antes de los 12 días de eclosión (Agraz-Guereña et al., 1987).

En el laboratorio de acuicultura del CICESE, se encontró que cultivos de Chaetoceros sp., bajo diferentes regímenes de luz, producen diferentes proporciones de proteínas, de lípidos y de carbohidratos (Sánchez-Saavedra y Voltolina, 1993). Por este motivo, se puede pensar que utilizando estos cultivos como alimento para Artemia se podrían obtener diferencias en su tasa de crecimiento, su composición y su tasa reproductiva, lo cual constituyó el propósito del presente trabajo.

## I.1. OBJETIVOS

- Medir el crecimiento, la composición proximal y la producción de progenie de Artemia franciscana alimentada con Chaetoceros sp., cultivada con luz blanca, luz azul y una mezcla de las dos.
- Cultivar la microalga Chaetoceros sp. con los tipos de luz mencionada, determinar la composición proximal de la biomasa producida y comprobar los datos de literatura que indican que con luz azul se puede incrementar el contenido de proteínas de las microalgas.

## **II. MATERIALES Y METODOS**

### **II.1. Selección de especie.**

La microalga utilizada en este trabajo fue Chaetoceros sp. Esta es una especie aislada localmente en aguas costeras y depositada en el cepario del CICESE con clave "CH-X-1", que fue escogida debido a que por sus características (i.e. rápido crecimiento, fácil adaptación a las condiciones de cultivo usuales, tamaño conveniente, y adecuado valor nutritivo) presenta interés para la acuicultura. En la actualidad es utilizada para la alimentación de larvas y adultos de moluscos y crustáceos en varios establecimientos académicos y comerciales mexicanos (Trujillo-Valle, 1993).

### **II.2. Efecto de la luz de diferente longitud de onda.**

#### **a) Características de las lámparas**

En base a las características de su espectro de emisión se seleccionaron lámparas fluorescentes de tipo comercial color azul, marca "Philips" o "General Electric" con número de catálogo "F40B" de 4 pies y de 40 Watts, las cuales emiten principalmente en la banda experimental de la luz azul entre 430 y 470 nm.

Para comparar el efecto del tipo de iluminación, se utilizaron como control lámparas de luz blanca fría marca "Sylvania" con número de catálogo "F40CW" de 4 pies y de 40 Watts, que emiten en un espectro con dos picos, uno en la banda del azul (430 - 450 nm) y el otro en la banda del verde-rojo (550-620 nm). Por medio de un medidor de cuanta con sensor esférico Biospherical Instruments, QSL-100, se midió la cantidad de luz que recibía el punto equivalente al centro de la base del recipiente de cultivo.

#### **b).- Condiciones experimentales de luz**

Se mantuvieron tres condiciones experimentales de luz continua, según las indicaciones de Sánchez-Saavedra y Voltolina (1993): luz azul, con una irradiancia de

$0.340 \times 10^{17} \text{ Q/s/cm}^2$  ( $565 \mu\text{moles/s/m}^2$ ), una irradiancia igual, obtenida con luz azul mezclada con aproximadamente  $2.6 \times 10^{14} \text{ Q/s/cm}^2$  ( $4.3 \mu\text{moles/s/m}^2$ ) de luz ambiental (luz blanca con características espectrales iguales a la de las lámparas blanco frío) y como control luz blanca, con una irradiancia de  $0.300 \times 10^{17} \text{ Q/s/cm}^2$  ( $498 \mu\text{moles/s/m}^2$ ). Los valores de  $\mu\text{m/s/m}^2$  están calculados siguiendo las formulas propuestas por Lüning (1981).

La luz azul se mantuvo aislada de la luz ambiental mediante una caja negra, situada de manera tal que cubría totalmente las lámparas de la luz azul y permitía el espacio necesario para mantener en su interior los cultivos expuestos a luz azul, sin interferir con el sistema de ventilación necesario para mantener la temperatura experimental ( $22^\circ \pm 2^\circ\text{C}$ ).

Las otras dos condiciones de iluminación se mantuvieron sin aislar de la contribución de la luz ambiental.

### c).- Efecto del tipo de iluminación

Para determinar el efecto de la calidad de la luz se realizaron cultivos semicontínuos de Chaetoceros sp. con diluciones diarias del 50 % del volumen total, manteniéndolos en garrafones con 15 litros de medio "f" (Guillard y Ryther, 1962), con una doble concentración de silicatos. Esto se preparó con agua de mar del sistema cerrado del laboratorio del CICESE, filtrada a través de un filtro biológico, uno rápido de arena, uno de diatomita, uno de carbón activado, y finalmente irradiada con luz ultravioleta (U.V.): además el agua fue desinfectada por vía química con hipoclorito de sodio ( $5.6 \text{ mg Cl/l}$ ), que posteriormente se neutralizó con tiosulfato de sodio siguiendo las recomendaciones de Hemerick (1973).

El pH se mantuvo entre 7.0 y 8.0 por medio de inyección de  $\text{CO}_2$  al sistema de

aireación, el cual a su vez mantenía a las células en suspensión. Los cultivos se mantuvieron por triplicado, y se realizaron mediciones diarias de la densidad óptica (D.O) para estimar el crecimiento de las microalgas y evaluar la estabilidad de los cultivos. Para cada tipo de luz se efectuaron curvas de calibración entre la densidad óptica y el número de células, realizando mediciones de absorbancia a 550 nm para evitar el pico de absorción de las clorofilas, y estimando el número de células con un hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad (Sorokin, 1973). Las ecuaciones utilizadas en la relación del número de células (y) y la densidad óptica (x), para los tres tipos de luz fueron: luz azul,  $y = (35933.13) + [(2.03 \times 10^7) * (x)]$ , azul mezclada,  $y = (145792) + [(1.83 \times 10^7) * (x)]$  y blanca,  $y = (0.0263) + [(4.52 \times 10^{-8}) * (x)]$ . La constancia en la cantidad de biomasa celular producida con respecto al tiempo, se comprobó mediante una prueba de significancia de la pendiente de la regresión ( $\beta=0$ ) entre las dos variables (Daniel, 1977).

Los valores promedio de la cantidad de biomasa celular evaluada durante la fase de estabilidad de los cultivos con los tres diferentes tipos de luz, se compararon con una prueba de diferencia de medias (Sokal y Rohlf, 1969).

#### **d).- Composición proximal**

La composición proximal de las células se determinó por medio de muestras tomadas por triplicado antes de la dilución de los cultivos y por lo menos en tres fechas de muestreo para cada caso, utilizando los siguientes métodos:

**Proteínas:** Con el reactivo de Folin-Ciocalteu, con la metodología descrita por Lowry *et al.* (1951), modificada por Malara y Charra (1972 a), Farber-Lorda (1986) y López-Elías (1990).

**Lípidos:** La extracción se realizó por medio de una mezcla cloroformo-metanol-agua, siguiendo la técnica de Bligh y Dyer (1959) modificada por Chiaverini (1972). La determinación se realizó con la metodología descrita por Pande *et al.* (1963).

Carbohidratos: La extracción se efectuó con ácido sulfúrico siguiendo la metodología descrita por Whyte (1987) y la determinación con la técnica de Dubois *et al.* (1956) según Malara y Charra (1972 b).

Peso seco y contenido de cenizas: Según la metodología descrita por Sorokin (1973).

Pigmentos: Según el método tricromático descrito por Parsons *et al.* (1984) usando, para las clorofilas, las ecuaciones SCOR/UNESCO detalladas en Strickland y Parsons (1965).

Los valores obtenidos se compararon con un análisis de varianza de una vía, después de averiguar que los datos cumplieran con las hipótesis que lo fundamentan: normalidad y homoscedasticidad de los datos. Cuando se detectaron diferencias significativas, se utilizó una prueba a posteriori vía mínima diferencia significativa (LSD) con  $\alpha=0.05$ , las letras iguales indican grupos homogéneos (Sokal y Rohlf, 1969).

### **II.3. Bioensayo de crecimiento:**

Se evaluaron la tasa de crecimiento, la composición proximal y la producción de prole de Artemia franciscana Kellogg, alimentada con Chaetoceros sp. mantenido en los tres tipos de luz, mediante cultivos de Artemia que se mantuvieron con iluminación continua provista por 2 lámparas de luz blanca fría marca "Sylvania" ( $0.110 \times 10^{17}$  Q/s/cm<sup>2</sup>), con número de catálogo "F96T12-CW", de 12 pies y de 75 Watts.

Se utilizaron quistes de San Francisco Bay Brand Inc., Lote No. 900827, que se descapsularon con el método del hipoclorito comercial (San Francisco Bay Brand, 1988) y se incubaron en agua de mar a una temperatura de 20-25°C. Los nauplios se colectaron durante las 6 horas siguientes a la primera eclosión, para asegurarse de que los organismos fueran de una misma cohorte. Por medio de un sifón se concentraron en un recipiente, en donde fueron desinfectados por un período de 5 minutos con una solución de mertiolate preparada según la proporción recomendada por Correa-Sandoval (1991), para después introducirlos a los sistemas experimentales, que consistieron de cuatro

acuarios, para cada calidad de luz:

Luz blanca: Se mantuvieron tres acuarios de 15 litros con 25,000 organismos cada uno, que fueron utilizados para las determinaciones bioquímicas. El cuarto acuario de 45 litros fue subdividido en tres secciones, cada una con 8 l de agua y con 5,000 organismos, que se usaron para las determinaciones de la tasa de crecimiento y la formación de parejas.

Luz azul y luz azul mezclada: Se mantuvieron tres acuarios de 15 litros con 6 litros de agua y con 10,000 organismos cada uno. Al igual que para luz blanca, estos organismos se utilizaron para las determinaciones bioquímicas. Un cuarto acuario de 45 litros fue sub-dividido en tres secciones, cada una con 6 l de agua y 3,700 organismos, que fueron empleados para estimar el crecimiento y la formación de parejas.

Las relaciones de número de organismos por mililitro fueron iguales para los tres ensayos.

A cada sección experimental se suministró diariamente una cantidad de microalgas, siguiendo la tabla de raciones propuesta por Correa-Sandoval (1991).

Se realizaron diariamente cambios de agua a cada cámara utilizando agua de mar pasada por U.V., con el propósito de eliminar las microalgas no consumidas y para evitar que éstas, al crecer y reproducirse, cambiaran sus características por efecto de la luz blanca (Sánchez- Saavedra, com. pers.).

Se tomaron diariamente 30 organismos de cada réplica, con el fin de poder evaluar cambios morfológicos y de tamaño. Los organismos fueron preservados en una solución fijadora compuesta de 25 ml de formol con pH ajustado a 8 con glicerofósforo de sodio, 5 ml de propilfenoxitol y 50 ml de propilenglicol, aforados a 500 ml con agua destilada (Correa-Sandoval, 1991), y posteriormente medidos con un microscopio estereoscópico marca "Olimpus" con una reglilla en el ocular, empleando los factores de calibración del

aparato para obtener la longitud total en micras.

Se decidió utilizar períodos fijos para realizar las mediciones de longitud y así poder comparar organismos de la misma edad y eventuales diferencias en el tiempo necesario para la aparición en cultivo de los varios estadios de desarrollo. También se consideraron los días de inicio de formación de parejas para cada tratamiento. El mayor intervalo de evaluaciones fue para luz azul y comprendió los días: 0, 2, 4, 8, 10, 12, 13 y 15. Para los otros dos tipos de luz, se escogieron los mismos días de medición hasta la fecha en que ocurrió la formación de parejas.

Cuando los organismos comenzaron a formar parejas se evaluó la sobrevivencia, se tomaron 100 organismos de cada acuario de 15 l y se procedió a estimar su peso seco y el peso de las cenizas. El resto de la biomasa de estos acuarios fue cosechada, lavada con agua destilada y congelada para determinar por triplicado su composición proximal utilizando la metodología descrita para el caso de las microalgas.

Los cultivos en los acuarios de 45 l fueron utilizados para separar las parejas que se formaron cada día, hasta que el número de éstas empezó a decrecer, para posteriormente evaluar la cantidad de progenie producida por pareja, según su edad y tipo de alimentación. Las evaluaciones de producción de progenie fueron hechas arbitrariamente al tercer día después de la observación del primer nauplio o quiste debido a que Artemia, después de aparearse, vive en condición de cópula prácticamente continua.

Para cada situación experimental los organismos se identificaron por estadio de vida y se comparó su longitud total por medio de un análisis de varianza de una vía. Las posibles diferencias en su composición fueron evaluadas en la forma ya descrita para el caso de las microalgas en la sección anterior.

### III. RESULTADOS:

#### III.1 Efecto del tipo de iluminación sobre la producción de biomasa y la composición proximal de Chaetoceros sp.

Al comparar las gráficas de las lecturas de densidad óptica, antes y después de la dilución, de Chaetoceros sp. mantenido expuesto a los tres tipos de luz (Fig. 2), se encontró que los cultivos se mantuvieron estables durante aproximadamente 28 días en luz blanca, 40 para luz azul mezclada y 50 días para luz azul. Las fluctuaciones iniciales que se observan en luz blanca se deben a cambios en el pH y temperatura, que durante ese período fluctuaron entre 6.9 y 10 y entre 21 y 26 °C, respectivamente.

La estabilidad de la cantidad de biomasa celular (medida como D.O.) para los cultivos de Chaetoceros sp., durante el período de alimentación de Artemia, fue determinada mediante pruebas de significancia de la pendiente  $\beta=0$ . Estas pruebas se realizaron con los valores promedio de biomasa diaria producida durante el período de alimentación en el bioensayo con Artemia: para luz blanca a partir del día quince, mientras que, para los otros dos tipos de luz fue a partir del vigésimo día. Se encontró que para luz azul, azul mezclada y blanca los valores de  $f$  observados (0.0041, 0.0013 y 0.0089, respectivamente) fueron menores con respecto a los valores de  $f$  tabulados (1.77, 1.785 y 2.06 respectivamente), que indica que la pendiente no fue significativamente diferente de cero con respecto al tiempo, quedando de esta forma comprobada la estabilidad de los cultivos.

Mediante una prueba "t" de diferencia de medias se comparó la concentración celular media (antes de diluir), durante la fase de estabilidad de los cultivos (Tabla I); ésta resultó significativamente diferente, con un mayor número de células por mililitro en luz blanca ( $10.02 \times 10^6$ ), seguido del estimado en azul ( $7.63 \times 10^6$ ) y menor para azul mezclada ( $6.96 \times 10^6$ ).

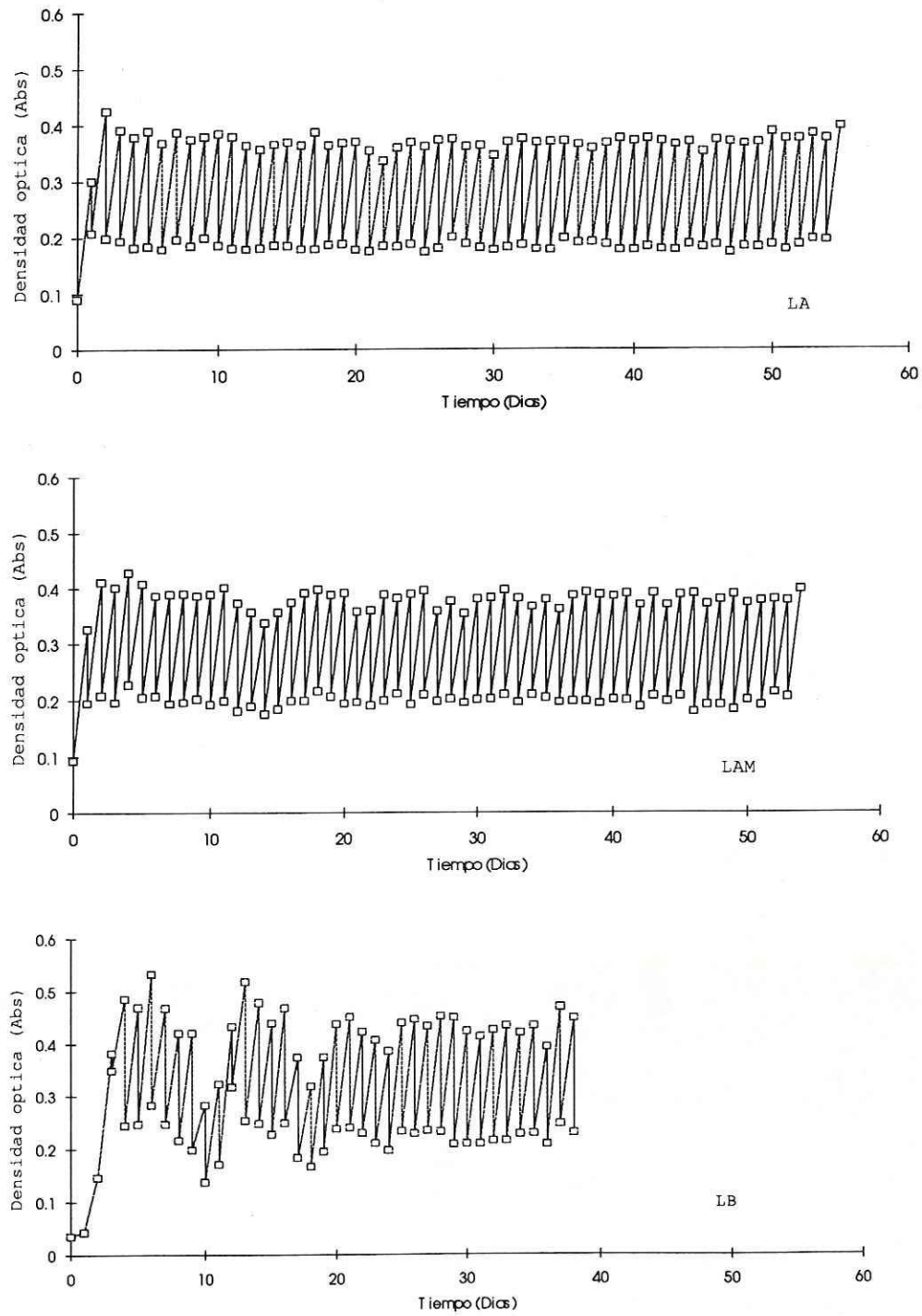


Figura 2. Valores promedio de la densidad óptica, antes y después de diluir, de cultivo semicontínuo de *Chaetoceros* sp. en luz azul (LA), azul mezclada (LAM) y blanca (LB).

Al comparar con la misma prueba el valor medio del peso orgánico seco (POS) y el peso de cenizas (PC) por millón de células, se encontró que los valores medios de POS no presentaron diferencia significativa entre luz azul y azul mezclada, y que ambos fueron diferentes de los obtenidos con luz blanca. En todos los casos, los valores de PC no resultaron diferentes (Tabla I).

Tabla I. A) Valores promedio y desviación estandar del número de células (cél/ml),  $\mu\text{gr}$  del peso orgánico seco (POS) y de cenizas (PC) por millón de células para *Chaetoceros* sp. cultivado en luz azul (LA), azul mezclada (LAM), y blanca (LB). B) Pruebas "t" de diferencia de medias con los valores promedio de número de células, peso orgánico seco (POS) y peso de cenizas (PC) donde A: acepta; y R: rechaza.

A)			
Tipo de luz	Cel $10^6$ /ml	$\mu\text{g}$ POS/ $10^6$ cel.	$\mu\text{g}$ PC/ $10^6$ cel.
LA	7.63 (0.13) b	19.135 (0.844) a	7.006 (2.135) a
LAM	6.96 (0.25) a	20.073 (3.982) a	7.852 (2.495) a
LB	10.02 (0.01) c	22.939 (1.937) b	5.151 (0.980) a
B)			
Comparación	Cél. $10^6$ /ml	$\mu\text{g}$ POS / $10^6$ cél.	$\mu\text{g}$ PC / $10^6$ cél.
LA:LAM	0.02871 (R)	0.57183 (A)	0.94788 (A)
LA:LB	1.39E-05 (R)	1.15E-04 (R)	0.08220 (A)
LB:LAM	6.79E-05 (R)	0.033957 (R)	0.07507 (A)

Al contrastar los porcentajes de cada uno de los constituyentes de la composición proximal de *Chaetoceros* sp., se encontró que los porcentajes de proteínas fueron menores para luz blanca con respecto a los obtenidos en luz azul y luz azul mezclada. El porcentaje de carbohidratos fue mayor en luz azul mezclada que en los otros dos tipos de luz y éstos no resultaron diferentes entre sí. En el caso del contenido de lípidos, fue

mayor en luz azul mezclada, seguido del estimador en luz azul y menor en luz blanca (Tabla II y III)

Tabla II. Análisis de varianza de una vía realizado con los valores del porcentaje de proteínas, carbohidratos y lípidos de *Chaetoceros* sp. cultivado en luz azul (LA), azul mezclada (LAM) y blanca (LB).

"Proteínas"					
Fuente de Variación	Suma de Cuad.	g.l	Cuad. Medio	Relacion-F	Nivel sig.
Entre grupos	1719.56460	2	859.78232	11.358	0.0003
Dentro de grupos	1816.68660	24	75.69528		
Total	3536.25130	26			

"Carbohidratos"					
Fuente de Variación	Suma de Cuad.	g.l	Cuad. Medio	Relacion-F	Nivel sig.
Entre grupos	132.20860	2	66.10430	5.512	0.0107
Dentro de grupos	287.84192	24	11.99341		
Total	420.05052	26			

"Lípidos"					
Fuente de Variación	Suma de Cuad.	g.l	Cuad. Medio	Relacion-F	Nivel sig.
Entre grupos	464.08533	2	2322.04267	22.367	0.0000
Dentro de grupos	248.98066	24	10.37419		
Total	713.06599	26			

Tabla III.- Valores promedio, desviaciones estandar y comparaciones a posteriori via "LSD" ( $\alpha = 0.05$ ) de los valores de proteínas, lípidos y carbohidratos en porcentaje de peso orgánico seco (POS) de *Chaetoceros* sp. cultivado en luz azul (LA), azul mezclada (LAM) y blanca (LB). También se indica el contenido de cenizas (en % del peso seco total).

Tipo de luz	Proteínas	Lípidos	Carbohidratos	Cenizas
LA	52.58 ( 6.169) b	20.40 (1.382) b	12.53 (2.501) a	26.51 ( 6.622) b
LAM	58.48 ( 7.646) b	25.03 (3.387) c	17.64 (3.941) b	28.75 (10.890) b
LB	41.06 ( 1.010) a	14.89 (0.337) a	13.52 (1.159) a	18.14 ( 1.619) a

Los valores de los porcentajes de cenizas resultaron ser no normales, por lo que se utilizó la prueba de análisis de varianza no paramétrico de una vía (Kruskal-Wallis), que demostró que el contenido de cenizas es significativamente inferior en las células cultivadas con luz blanca, con respecto a las mantenidas en los dos tipos de luz azul (Tabla IV).

Tabla IV. Análisis de varianza de una vía no paramétrico de Kruskal-Wallis (K-W) calculado con los valores del porcentaje de cenizas (PC) de *Chaetoceros* sp. cultivado con luz azul (LA), azul mezclada (LAM) y blanca (LB).

Tipo de luz	Tamaño de muestra	Rango promedio	Estadigrafo de K-W	Nivel Significancia
LA	9	21.7778	12.751	0.0017
LAM	9	21.6667		
LB	14	9.7857		

Con un análisis de varianza paramétrico de una vía, se detectaron diferencias significativas en el contenido de clorofila a, que resultó menor para luz blanca que en luz azul y azul mezclada (Tabla V); el mismo tipo de prueba no detectó diferencias en los contenidos de clorofila b y c (Tabla VI).

Tabla V. Análisis de varianza de una vía calculado con los valores de clorofila a, b y c ( $\mu\text{g}/10^6$  cel) para *Chaetoceros* sp. cultivado con luz azul (LA) azul mezclada (LAM) y blanca (LB).

"Clorofila a"					
Fuente de Variación	Suma de Cuad.	g.l	Cuad. Medio	Relación-F	Nivel sig.
Entre grupos	0.0289863	2	0.0144932	4.847	0.0171
Dentro de grupos	0.0717599	24	0.0029900		
Total	0.1007462	26			
"Clorofila b"					
Fuente de Variación	Suma de Cuad.	g.l	Cuad. Medio	Relación-F	Nivel sig.
Entre grupos	0.0000725	2	3.62578E-05	0.279	0.7593
Dentro de grupos	0.0031236	24	0.00013015		
Total	0.0031961	26			
"Clorofila c"					
Fuente de Variación	Suma de Cuad.	g.l	Cuad. Medio	Relación-F	Nivel sig.
Entre grupos	0.0058422	2	0.0029211	1.924	0.1679
Dentro de grupos	0.0364459	24	0.0015186		
Total	0.0422881	26			

Tabla VI. Valores promedio, desviaciones estandar y comparaciones a posteriori vía "LSD" ( $\alpha = 0.05$ ) para los valores de clorofila ( $\mu\text{g}/10^6$  cél.) en *Chaetoceros* sp. cultivado en luz azul (LA), azul mezclada (LAM) y blanca (LB).

Tipo de Luz	Clorofilas $\mu\text{g}/10^6$ cél.		
	"a"	"b"	"c"
LA	0.406 (0.033) a	0.138 (0.073) a	0.274 (0.017) a
LAM	0.392 (0.051) a	0.079 (0.011) a	0.276 (0.040) a
LB	0.330 (0.008) b	0.083 (0.004) a	0.244 (0.005) a

## III.2 BIOENSAYO DE CRECIMIENTO.

### 1.- Crecimiento de Artemia franciscana:

#### 1.1.- Comparación entre organismos de la misma edad:

La pendiente de la curva de crecimiento para Artemia franciscana alimentada con Chaetoceros sp. mantenido en luz blanca es aparentemente mayor de las que se obtuvieron con las otras dos condiciones experimentales (Fig 3).

La longitud total promedio inicial de los nauplios recién eclosionados fue de 0.45 mm. Las mediciones efectuadas en los días sucesivos indicaron que Artemia alimentada con Chaetoceros sp. mantenido en luz blanca creció más rápidamente (Fig. 3). De hecho, los resultados de los análisis de varianza y de las pruebas a posteriori indicaron la existencia de diferencias significativas en todos los días sucesivos (Tablas VII a IX): hasta el día 10, cuando los organismos que recibieron la dieta LB iniciaron a aparearse y se midieron por última vez, su talla resultó consistentemente mayor con respecto a las otras dos condiciones experimentales (Tablas VII y VIII, pruebas no paramétricas y paramétricas, respectivamente). También se notó una tendencia general de crecimiento ligeramente más rápido para Artemia alimentadas con microalgas cultivadas en luz mezclada, aunque las diferencias no fueron significativas hasta el día 12 (Tabla IX).

Un día después de esta fecha, se notó un incremento importante de tallas en todos los acuarios que recibieron microalgas cultivadas con los dos tipos de luz azul, pero esto fue más notorio en la dieta producida con luz mezclada, cuyos organismos alcanzaron una longitud total promedio significativamente mayor e iniciaron a aparearse, mientras que los de la dieta de microalgas mantenida en luz azul tardaron hasta los días 15 y 16 para alcanzar una talla similar (6.28 mm; D.E: 0.75) e iniciar el proceso de apareamiento (Tabla IX).

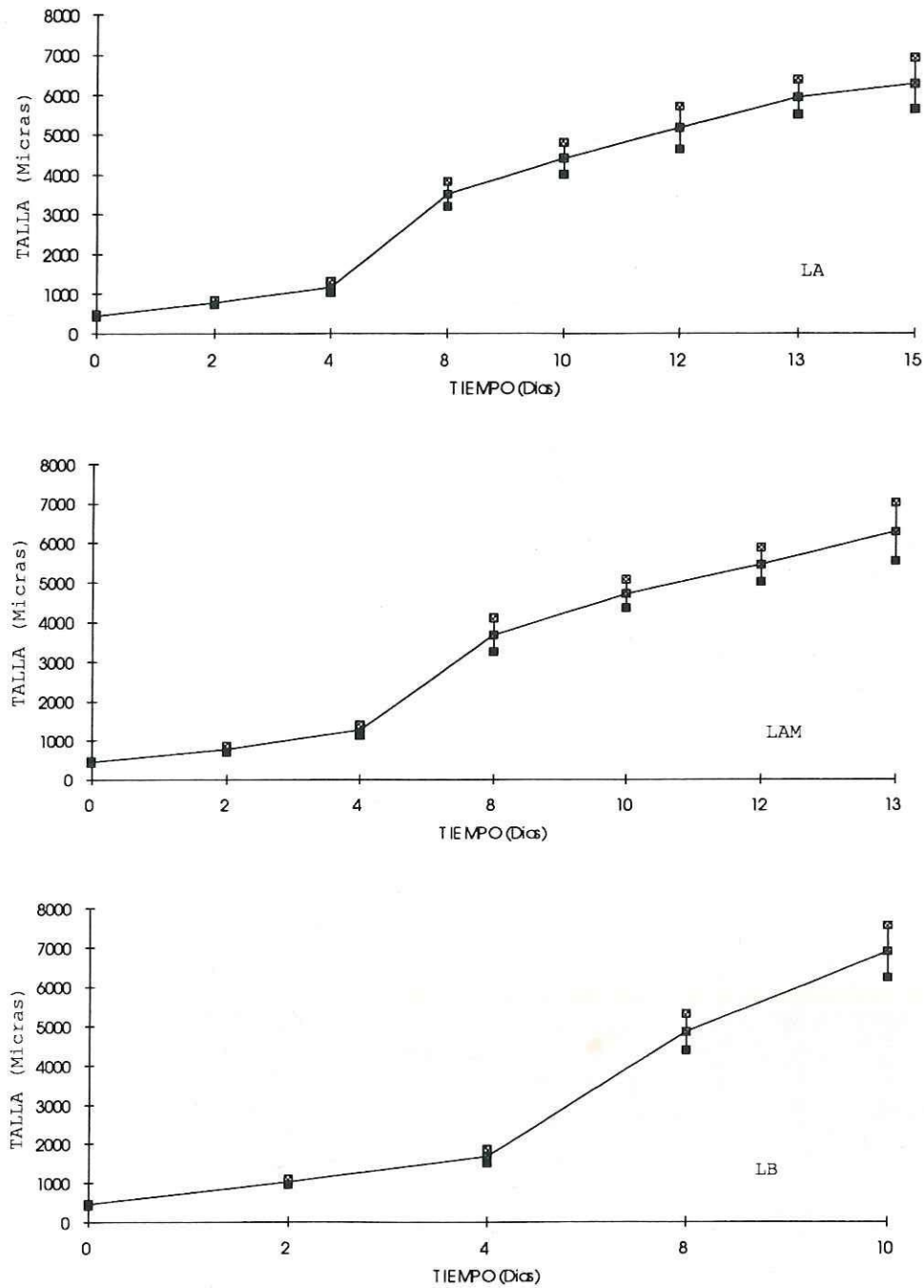


Figura 3. Curva de crecimiento promedio para *Artemia franciscana*, alimentada con *Chaetoceros* sp., cultivado en luz azul (LA), azul mezclada (LAM) y luz blanca (LB).

Tabla VII. Análisis de varianza de una vía no paramétrico de Kruskal-Wallis (K-W) calculado con los valores de longitud para los días 2, 10 y estadio de adultos en Artemia franciscana alimentada con Chaetoceros sp. cultivado con luz azul (LA), azul mezclada (LAM) y blanca (LB).

"Día 2"				
Tipo de luz	Tamaño de muestra	Intervalo Promedio	Estadígrafo de K-W	Nivel Significancia
LA	30	29.6333	57.2034	3.78808E-13
LAM	30	32.1000		
LB	30	74.7667		
"Día 10"				
Tipo de luz	Tamaño de muestra	Intervalo Promedio	Estadígrafo de K-W	Nivel Significancia
LA	30	24.2333	62.8733	2.22045E-14
LAM	30	36.7667		
LB	30	75.5000		
"Comparación entre estadio de adultos"				
Tipo de luz	Tamaño de muestra	Intervalo Promedio	Estadígrafo de K-W	Nivel Significancia
LA	30	38.8833	62.0367	3.37508E-14
LAM	30	22.8833		
LB	30	74.7333		

### 1.2.- Duración de estadios y sobrevivencia:

A pesar de las diferencias de tamaño ya señaladas, los estadios de nauplios y metanauplios tuvieron la misma duración con las tres dietas. Para las etapas sucesivas, los organismos alimentados con Chaetoceros sp. producido con luz azul solamente pasaron al estado adulto al día 12, dos días después que con las otras dietas. Además fue notoria la rapidez con la cual los adultos alimentados con microalgas cultivadas en luz blanca iniciaron a aparearse, en comparación con aquellos que recibieron microalgas producidas con los dos tipos de luz azul.

Tabla VIII. Análisis de varianza de una vía calculado con los valores de longitud por día y por estadio de vida para Artemia franciscana alimentada con Chaetoceros sp. cultivado en luz azul (LA), azul mezclada (LAM) y blanca (LB).

"Día 4"					
Fuente de variación	Suma de Cuad.	g.l.	Cuad. Medio	Relación-F	Nivel sig.
Entre grupos	4375988.6	2	2187994.3	87.680	0.0000
Dentro de grupos	2171019.9	87	24954.3		
Total	6547008.5	89			

"Día 8"					
Fuente de variación	Suma de Cuad.	g.l.	Cuad. Medio	Relación-F	Nivel sig.
Entre grupos	32743960	2	16371980	95.989	0.0000
Dentro de grupos	14838838	87	170561		
Total	47582798	89			

"Día 12"					
Fuente de variación	Suma de Cuad.	g.l.	Cuad. Medio	Relación-F	Nivel sig.
Entre grupos	1118345	1	1118344.5	4.578	0.0366
Dentro de grupos	14167177	58	244261.7		
Total	15285521	59			

"Día 13"					
Fuente de variación	Suma de Cuad.	g.l.	Cuad. Medio	Relación-F	Nivel sig.
Entre grupos	1730941	1	1730941.4	4.462	0.0390
Dentro de grupos	22499741	58	387926.6		
Total	24230683	59			

"Comparación entre adultos al día de formación de parejas"					
Fuente de variación	Suma de Cuad.	g.l.	Cuad. Medio	Relación-F	Nivel sig.
Entre grupos	7352271	2	3676135.6	7.535	0.0010
Dentro de grupos	42446337	87	487888.9		
Total	49798609	89			

Artemia alimentada con microalgas cultivadas bajo luz blanca fueron las que alcanzaron tallas mayores, en un menor número de días. Sin embargo, esto se ve contrarrestado por la baja sobrevivencia que se presentó, resultando casi tres veces menor que las alimentadas con los otros dos tipos de alimento y evaluadas para la fecha del primer apareamiento (Tabla X).

Tabla IX. Valores promedio (en  $\mu\text{m}$ ), desviación estándar (D.E.) y comparaciones a posteriori vía "LSD" ( $\alpha=0.05$ ) con los valores de talla promedio para las diferentes fechas de medición para *Artemia franciscana* alimentada con *Chaetoceros* sp. cultivado con luz azul (LA), azul mezclada (LAM) y blanca (LB).

"Día 2"				
Tipo de Luz	n	Talla promedio	D.E.	Comparación
LA	30	774.2933	53.43	a
LAM	30	778.3600	75.17	a
LB	30	1021.5467	77.60	b
"Día 4"				
Tipo de Luz	n	Talla promedio	D.E.	Comparación
LA	30	1163.0667	143.99	a
LAM	30	1266.3600	136.92	a
LB	30	1673.8400	181.35	b
"Día 8"				
Tipo de Luz	n	Talla promedio	D.E.	Comparación
LA	30	3502.2133	317.68	a
LAM	30	3679.5200	423.30	a
LB	30	4861.1500	463.17	b
"Día 10"				
Tipo de Luz	n	Talla promedio	D.E.	Comparación
LA	30	4405.3500	396.26	a
LAM	30	4708.5000	353.28	a
LB	30	6890.7500	665.55	b
"Día 12"				
Tipo de Luz	n	Talla promedio	D.E.	Comparación
LA	30	5170.7500	539.41	a
LAM	30	5443.8000	425.77	a
"Día 13"				
Tipo de Luz	n	Talla promedio	D.E.	Comparación
LA	30	5946.9000	438.85	a
LAM	30	6286.6000	746.59	b
"Comparación entre estadio de adultos"				
Tipo de Luz	n	Talla promedio	D.E.	Comparación
LA	30	5170.7500	539.41	b
LAM	30	4708.5000	353.28	a
LB	30	6890.7500	665.55	c
"Comparación entre adultos al día de formación de parejas"				
Tipo de Luz	n	Talla promedio	D.E.	Comparación
LA	30	6282.3000	643.84	a
LAM	30	6286.6000	746.59	a
LB	30	6890.7500	665.55	b

Tabla X. Caracterización por estadio de vida, donde N=nauplio, M=metanauplio, J=juvenil y A=adulto, durante las fechas de muestreo y tiempo para la formación de parejas (FP) y porcentaje de sobrevivencia de Artemia franciscana alimentada con Chaetoceros sp. cultivado con luz azul (LA), azul mezclada (LAM) y blanca (LB).

Día	LA	LAM	LB
0	N	N	N
2	M	M	M
4	M	M	M
8	J	J	J
10	J	A	FP
12	A	A	
13	A	FP	
15-16	FP		
% Sobrev.	89.80	81.22	30.41

## 2.-Composición proximal de adultos a la fecha de apareamiento:

En cuanto a la composición proximal de Artemia alimentada con las tres dietas, no se encontraron diferencias en el contenido de proteínas, carbohidratos, peso orgánico seco y cenizas entre tratamientos, mientras que el contenido de lípidos fue significativamente inferior en el caso de la dieta producida con luz blanca (Tablas XI y XII).

## 3.- Formación de parejas:

Como ya señalado, se encontraron diferencias en el número de días necesarios para obtener la madurez sexual, que fue menor con el alimento mantenido en luz blanca. Además, se observó que el número de parejas empezó a decrecer al tercer día desde la fecha de primer apareamiento en el caso de luz blanca, mientras que para luz azul esto sucedió al sexto día y hasta el noveno en el caso de luz azul mezclada.

Tabla XI. Análisis de varianza de una vía realizado con los valores del porcentaje de proteínas, carbohidratos, lípidos, cenizas y peso orgánico seco ( POS ), de Artemia franciscana alimentada con Chaetoceros sp. cultivado con luz azul (LA), azul mezclada (LAM) y blanca (LB).

"Proteínas"					
Fuente de Variación	Suma de Cuad.	g.l	Cuad. Medio	Relación-F	Nivel sig.
Entre grupos	77.2495	2	38.6248	0.816	0.4541
Dentro de grupos	1136.0075	24	47.3336		
Total	1213.2570	26			

"Carbohidratos"					
Fuente de Variación	Suma de Cuad.	g.l	Cuad. Medio	Relación-F	Nivel sig.
Entre grupos	0.0758	2	0.0379	0.036	0.9647
Dentro de grupos	25.3130	24	1.0547		
Total	25.3888	26			

"Lípidos"					
Fuente de Variación	Suma de Cuad.	g.l	Cuad. Medio	Relación-F	Nivel sig.
Entre grupos	1510.1906	2	755.0953	41.936	0.0000
Dentro de grupos	432.1377	24	18.0057		
Total	1942.3283	26			

"Cenizas"					
Fuente de Variación	Suma de Cuad.	g.l	Cuad. Medio	Relación-F	Nivel sig.
Entre grupos	1.4499	2	0.7249	0.421	0.6610
Dentro de grupos	41.3060	24	1.7211		
Total	42.7559	26			

"POS"					
Fuente de Variación	Suma de Cuad.	g.l	Cuad. Medio	Relación-F	Nivel sig.
Entre grupos	1.4499	2	0.7249	0.421	0.6610
Dentro de grupos	41.3060	24	1.7211		
Total	42.7559	26			

Tabla XII.- Valores promedio, desviaciones estandar y comparaciones a posteriori vía "LSD" ( $\alpha=0.05$ ) para los valores de proteínas, lípidos, carbohidratos en porcentajes de peso orgánico seco (POS), de *Artemia franciscana* alimentada con *Chaetoceros* sp. cultivado en luz azul (LA), azul mezclada (LAM) y blanca (LB). También se indica el contenido de cenizas (en % del peso seco total).

Tipo de luz	Proteínas	Lípidos	Carbohidratos	Cenizas
LA	22.539 (5.021) a	28.913 (2.468) b	3.882 (0.641) a	11.367 (0.645) a
LAM	24.518 (5.965) a	32.752 (3.978) b	3.865 (0.365) a	11.016 (0.506) a
LB	26.681 (3.256) a	15.320 (1.797) a	3.985 (1.042) a	10.805 (1.416) a

#### 4.- Sobrevivencia:

La sobrevivencia en los acuarios de *Artemia* destinados a la formación de parejas resultó ser diferente, al primer día de apareamiento, con un menor porcentaje para las microalgas mantenidas en luz blanca con respecto a las otras dos dietas (Tabla XIII). Al comparar la sobrevivencia de *Artemia* de los mismos acuarios, entre los días inicial y final del período de formación de parejas, se encontró un menor porcentaje para los organismos alimentados con las microalgas producidas con luz blanca, con respecto a los otros dos tipos de alimento (Tabla XIII).

Tabla XIII. Porcentajes de sobrevivencia (por acuario) para *Artemia franciscana* alimentada con *Chaetoceros* sp. cultivado con luz azul (LA), azul mezclada (LAM), y blanca (LB), a las fechas inicial y final del período de formación de parejas.

Tipo de luz	Inicial			Final		
	A	B	C	A	B	C
LA	58.38	57.62	79.24	76.92	85.30	100.00
LAM	56.54	53.33	8.65	88.76	92.60	62.30
LB	22.00	26.66	10.66	31.92	39.54	19.78

### 5.- Evaluación de progenie:

Esta parte del trabajo fue complicada por la inesperada producción de quistes en algunos de los acuarios con Artemia alimentada con microalgas cultivadas con los dos tipos de luz azul. Este fenómeno se notó, muy probablemente, varios días después de su primera ocurrencia, sin que fuera posible evaluar la fecha de su inicio ni la posibilidad de pérdida de una parte de los quistes, debida a los cambios parciales de agua, que se siguieron haciendo con frecuencia diaria hasta el final del experimento.

En el caso de luz blanca, la primera aparición de nauplios se notó en todos los casos cinco días después de la fecha de formación de parejas, independientemente de la edad de los organismos al momento de apareamiento, y se notaron diferencias importantes entre acuarios. La producción de progenie fue limitada a nauplios y varió entre 2.04 y 79.5 nauplios por pareja (considerando el número inicial de parejas aisladas, por día y por acuario), con un valor general de la mediana de 34.32 nauplios por cada pareja, que considera los números iniciales (mínimo) y los finales (máximo) de parejas en todos los acuarios, que se optó por utilizar como único criterio de evaluación debido a la gran variabilidad encontrada (Tabla XIV y figura 4).

En el caso de la luz mezclada, la progenie fue limitada a larvas tipo nauplios en dos de los acuarios, mientras que en el otro se encontraron nauplios y quistes, con una mayor producción de los segundos. Es importante resaltar la diferencia del tiempo transcurrido entre la formación de parejas y la fecha de aparición de nauplios, que se notaron entre una semana y hasta once días después del apareamiento (Tabla XV). El valor de la mediana de los nauplios producidos, considerando sólo los acuarios en los cuales no se notaron quistes, y los números iniciales y finales de parejas, fue de 9.31 nauplios por cada pareja. Para el acuario con producción mixta los valores fueron de 1.81 nauplios y 20.75 quistes y el valor general para todos los acuarios, sin considerar el tipo

Tabla XIV. Días para la formación de parejas por acuario (A-C) de *Artemia franciscana* alimentada con *Chaetoceros* sp. cultivado con luz blanca. Días de evaluación, valores mínimos y máximos de nauplios por pareja y mediana general (Mp) de producción de progenie.

Acuario	Día For Par	Día Eval.	Nauplios	
			Mínimo	Máximo
A	10	18	38.00	76.00
	11	19	38.16	42.47
	12	20	32.75	35.90
B	10	18	4.12	7.78
	11	19	2.04	2.84
	12	20	2.46	2.61
C	10	18	25.60	25.60
	11	19	44.28	49.72
	12	20	79.49	91.18

Mp= 34.32

de progenie, de 8.55 por cada pareja (Tabla XV).

Finalmente, en el caso de la luz azul, la mayor producción de nauplios se notó en el caso de las parejas aisladas al primer día, mientras que la progenie producida por las aisladas en días sucesivos fue, con escasas excepciones, dominada por quistes. Las medianas de los valores de progenie producida se indican en la tabla XVI y la general (16.43 por pareja) se representa en la figura 4.

Tabla XV. Días para la formación de parejas por acuario (A-C) de *Artemia franciscana* alimentada con *Chaetoceros* sp. cultivado en luz azul mezclada. Días de evaluación, valores mínimos, máximos de nauplios y quistes por pareja, mediana de nauplios (acuario B y C) (Mn-BC) medianas de nauplios (Mn-A) y quistes (Mq-A) del acuario A y mediana de producción de progenie general (Mp).

Acuario	Día For Par	Día Eval.	Nauplios		Quistes	
			Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
A	16	27	2.50	3.08	NE	NE
	17	31	0.00	0.00	8.17	11.06
	18	31	0.00	0.00	7.36	8.94
	19	31	0.34	0.52	18.23	28.24
	20	31	0.99	1.12	23.26	26.23
	21	31	4.00	4.32	32.50	35.14
B	15	22	15.00	16.67	0.00	0.00
	16	26	5.00	5.26	0.00	0.00
	17	27	2.70	3.51	0.00	0.00
	18	27	0.94	1.18	0.00	0.00
	19	27	2.92	3.12	0.00	0.00
	20	28	1.77	2.14	0.00	0.00
	21	30	5.17	6.71	0.00	0.00
C	13	22	20.00	25.93	0.00	0.00
	14	22	28.21	31.21	0.00	0.00
	15	22	15.63	18.07	0.00	0.00
	16	23	6.27	7.62	0.00	0.00
	17	24	9.36	10.62	0.00	0.00
	18	24	5.41	10.14	0.00	0.00
	19	25	9.25	12.62	0.00	0.00
	20	27	44.40	46.85	0.00	0.00
	21	29	71.06	139.17	0.00	0.00

Mn-BC = 9.31

Mn-A = 1.81

Mq-A = 20.75

Mp = 8.55

NE - Valor no evaluado

Tabla XVI. Días para la formación de parejas por acuario (A-C) de *Artemia franciscana* alimentada con *Chaetoceros* sp. cultivado en luz azul. Días de evaluación, valores mínimos y máximos de nauplios y quistes por pareja, mediana de nauplios (Mn), quistes (Mq) y mediana de producción de progenie general (Mp).

Acuario	Día For Par	Día Eval.	Nauplios		Quistes	
			Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
A	16	23	24.00	24.00	NE	NE
	17	31	0.00	0.00	36.00	60.00
	18	31	0.00	0.00	59.40	138.60
	19	31	0.13	0.40	19.25	61.60
	20	31	0.00	0.00	9.94	10.74
	21	31	0.26	0.29	16.39	18.14
B	16	30	118.97	118.97	NE	NE
	17	31	0.00	0.00	56.57	99.00
	18	31	0.00	0.00	14.74	19.28
	19	29	2.06	2.43	0.00	0.00
	20	31	0.00	0.00	10.28	14.19
	21	31	1.70	1.74	19.86	20.29
C	16	30	22.78	24.85	NE	NE
	17	31	0.00	0.00	27.30	32.76
	18	31	0.00	0.00	4.60	6.07
	19	28	1.61	1.84	0.00	0.00
	20	28	1.17	1.39	0.00	0.00
	21	31	0.51	0.59	14.36	16.47

Mn = 1.72

Mq = 19.26

Mp = 16.43

NE - Valor no evaluado.

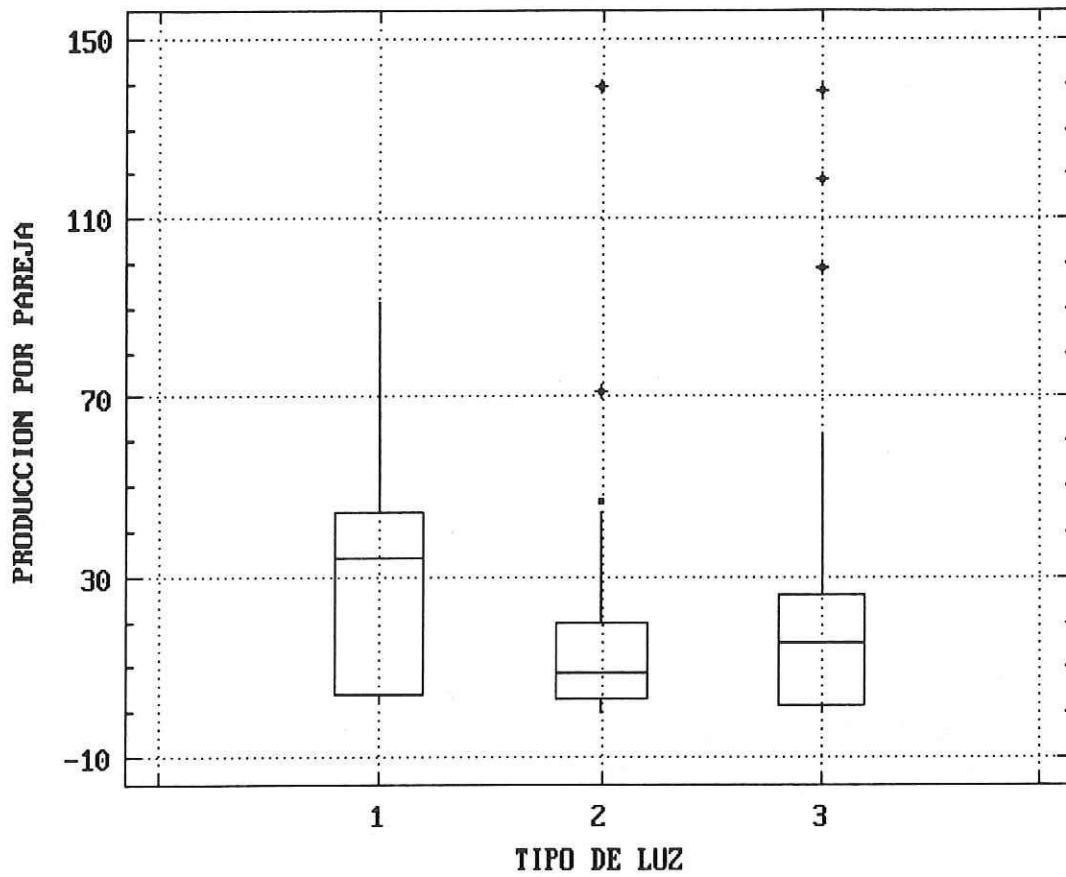


Figura 4. Producción de progenie por pareja de *Artemia franciscana* alimentada con *Chaetoceros* sp. cultivado de la izquierda a la derecha, en luz blanca, luz azul mezclada y luz azul. Las cajas encierran el 50% de los percentiles (25% a cada lado del valor de la mediana).

## IV. DISCUSIONES

### IV.1 Producción de biomasa de Chaetoceros sp.

Las diferencias encontradas en la producción de biomasa y en su calidad, con respecto a otros trabajos llevados a cabo con esta cepa, son debidas solamente a la composición espectral de la luz a la cual los cultivos fueron expuestos y a la concentración de luz utilizada para estos trabajos, en virtud de que las demás condiciones de cultivo fueron constantes.

Por lo que se refiere a la cantidad de biomasa producida, López-Elías y Voltolina (1993) reportaron una producción diaria, con cultivos de la misma cepa mantenida en las mismas condiciones y con la misma técnica, pero con una irradiancia de luz blanca inferior a la usada para este trabajo ( $1.2 \times 10^{16}$  Q/s/cm<sup>2</sup>), equivalente a aproximadamente  $4.3 \times 10^6$  cél/ml. Densidades celulares cercanas a la mencionada constituyen la norma en el laboratorio de acuicultura del CICESE en condiciones normales de cultivo (Cordero-Esquivel, CICESE, com. pers.) y fueron de hecho superadas solamente por Sánchez-Saavedra y Voltolina (1993), aumentando los niveles de irradiancia a valores parecidos a los utilizados en este trabajo. Aún en este último caso, las densidades celulares fueron inferiores a los valores aquí reportados, con un máximo ligeramente inferior a  $8 \times 10^6$  cél/ml para luz blanca, y de  $6.8$  y  $6.6 \times 10^6$  cél/ml para luz azul mezclada y azul respectivamente.

Resulta evidente la ventaja de usar valores altos de irradiancia, ya que permiten una cosecha diaria superior al doble de la que se obtiene en condiciones normales de laboratorio, con un costo de operación inferior, ya que disminuyen varios de los costos implicados en el uso de reactivos, la esterilización del medio y el consumo de aire comprimido y de CO<sub>2</sub>, sin contar los involucrados en el uso de espacio y de materiales y mano de obra para la limpieza de los recipientes de cultivo. Estos, solamente fueron

cambiados precaucionalmente, en forma ocasional durante la duración de los cultivos, con un máximo de dos-tres recipientes por cada situación experimental.

Es importante subrayar que las concentraciones celulares que se obtuvieron aumentando la irradiancia recibida a la superficie de los cultivos, fueron entre cinco a diez veces superiores a las que se obtienen, en condiciones normales, en cultivos masivos de volumen superior a los 200 a 300 litros. Esto significa que los 5 a 7.5 litros que se obtienen diariamente por cada carboy corresponderían a entre 25 y 75 litros de cultivo masivos normales.

Con respecto al tamaño celular, evaluado en términos de peso de las células, se obtuvieron variaciones en los diferentes tipos de luz, con células más pequeñas en luz blanca con respecto a luz azul mezclada y luz azul. Este mismo comportamiento fue reportado por Sánchez-Saavedra y Voltolina (1993), a diferencia de lo reportado por López- Elías y Voltolina (1993) y Cordero-Esquivel *et al.* (1993) que obtuvieron pesos por millón de células mayores a los reportados en este trabajo.

Otra característica relevante fue el bajo contenido de bacterias observado en los cultivos, a lo largo del tiempo experimental, el cual fue aproximadamente 55 días, mientras que Cordero-Esquivel *et al.* (1993) reportaron densidades altas de bacterias con tiempos menores de cultivo.

Esto por otro lado coincide con lo observado por Sánchez-Saavedra (CICESE, com. pers.) y es probablemente debido a la escasa producción de compuestos extracelulares en nuestras condiciones de cultivo, sobre todo debido a las altas irradiancias y a la velocidad de reproducción, que puede considerarse casi exponencial, etapa en la cual la secreción de productos extracelulares es mínima (Fogg y Thake, 1987).

#### IV.2 Composición bioquímica de Chaetoceros sp.

Por lo que se refiere a proteínas, nuestros datos semejan los resultados de Sánchez-Saavedra y Voltolina (1993), aunque ligeramente mayores. Esto probablemente se debe a las diferentes condiciones de extracción, ya que en nuestro trabajo se utilizó NaOH 1N en vez que 0.1N, que pudiera haber resultado en una mayor extracción.

Por lo que se refiere a las demás fracciones, hay algunas discrepancias entre los datos de este trabajo y el de los autores ya mencionados, siendo el único término de comparación ya que otros autores que estudiaron el efecto de luz azul sobre la composición de microalgas en cultivo trabajaron en condiciones experimentales diferentes (cultivos de bajas dimensiones, bajas concentraciones de luz) y además concentraron su interés sobre la fracción protéinica, sin reportar las concentraciones relativas de las otras fracciones bioquímicas (Wallen y Geen, 1971 b; Flaak y Epifanio, 1978).

En este trabajo, con la excepción de luz blanca, los lípidos representaron más que el 20% del total de la sustancia orgánica, que es un valor superior al reportado anteriormente en estas condiciones de cultivo. La diferencia más importante la encontramos para carbohidratos en luz azul mezclada que representó aproximadamente el 17.5% y fue menor del 5% en el trabajo que anteriormente mencionamos como punto de comparación. La posible explicación a esta discrepancia se refiere al hecho de que en las condiciones experimentales la contribución de luz ambiental fue inferior ( $4.3 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ) que la medida por Sánchez-Saavedra y Voltolina (1993) resultando en  $6.5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ . De acuerdo con la teoría propuesta por esos autores, el contenido energético de la luz azul mezclada, que es ligeramente inferior a la luz azul pura, sería suficiente para que los productos primarios de la fotosíntesis se desvíen casi en su totalidad hacia la formación de proteínas y lípidos, mientras que en luz azul sola la energía sería suficiente para que una parte de los productos del ciclo de Calvin siga la ruta glucogénica, que es un proceso

que requiere de mayor energía. Sin embargo, los procesos de fosforilación son importantes, ya que pueden variar de acuerdo a la cantidad de luz y a su vez se traducen en diferentes cantidades de biomasa producida (Prézelin, 1981).

En este trabajo, la menor contribución de luz blanca disminuiría la diferencia entre contenidos energéticos de los dos tipos de luz azul y por ende en ambas situaciones puede darse la síntesis de carbohidratos. Por otro lado, la diferencia en porcentajes de carbohidratos que resultaron mayores en luz azul mezclada, pudiera también ser en parte debido al mayor porcentaje de sustancia orgánica explicado en esta situación (aproximadamente 100%, en vez que 85 y 70% para luz azul y luz blanca, respectivamente).

Los altos porcentajes de proteínas en las dos condiciones de luz azul, estos corresponden al patrón general de respuesta de organismos vegetales a la exposición a luz azul, que acelera el proceso de síntesis protéica y causa por consiguiente una mayor concentración de las proteínas celulares, como lo describieron, entre otros Wallen y Geen (1971 b), Voskresenskaya (1972) y Gostan *et al* (1986).

El alto contenido de clorofila "a" en luz azul también corresponde al patrón general, indicando de esta forma un incremento de las dimensiones o del número de las unidades fotoreceptoras, probablemente como reflejo de su menor eficiencia en luz azul.

La posibilidad de producir una gran cantidad de microalgas en un espacio reducido, aumentando considerablemente la cantidad de luz disponible, debe ser tomada en consideración evaluando la importancia de todos los diferentes factores que influyen sobre el costo total de operación del laboratorio, y que se reflejan en el costo del producto final. Así por ejemplo, el uso de altas irradiancias puede permitir ahorros importantes de productos químicos (nutrientes y detergentes para la limpieza de estanquería, entre otros) y en el costo de la mano de obra destinada al mantenimiento y a

la cosecha de los cultivos y a la limpieza de la estanquería. Por otro lado es evidente que aumenta notablemente el costo de la energía necesaria, al cual se agrega la necesidad de utilizar mayores cantidades de CO<sub>2</sub> debido a la actividad fotosintética de las microalgas.

Este último factor por otro lado pudiera ser balanceado por las densidades celulares que pueden ser alcanzadas utilizando un mayor número de lámparas para el cultivo, además de que esta técnica conllevaría una menor inversión para la construcción, el equipamiento y el mantenimiento del laboratorio.

#### **IV.3. Crecimiento de Artemia franciscana.**

Los datos que se reportaron sobre las tallas de los adultos y sobre el número de días necesario para la formación de parejas están dentro del intervalo reportados por cepas o lotes diferentes de Artemia franciscana, alimentada con dietas adecuadas para que alcance la madurez sexual y la formación de parejas. Según los datos obtenidos en laboratorio, en estos casos Artemia tarda entre 10 y 15 días para aparearse, y éstos valores se utilizaron como medidas de eficiencia dietética de los varios alimentos probados.

Paniagua-Chávez (1993) encontró que Artemia franciscana alimentada con cultivos frescos de Dunaliella sp. se apareó a los 10 días de edad, pero al ser alimentada con Dunaliella sp. preservada por congelación el apareamiento tardó un día más. Esta diferencia, en las tallas de organismos de la misma edad y la composición final de la biomasa de Artemia producida, permitió descartar la posibilidad de utilizar Dunaliella sp. preservada como alimento para Artemia.

Casos similares se presentaron alimentando Artemia con dietas inertes, como salvados de granos u otras microalgas preservadas. En cada caso, la edad de primer apareamiento resultó un parámetro importante de evaluación (Arriaga-Haro, com. pers. y González-Medina, com. pers.).

Aunque se obtuvo una calidad celular superior para los cultivos de Chaetoceros sp. mantenido en luz blanca, la respuesta general en este trabajo fue muy similar a lo reportado por Flaak y Epifanio (1978), quienes reportaron una mayor eficiencia dietética de las microalgas con bajo contenido protéinico, para alimentar ostras adultas cercanas a procesos de reproducción, en donde, sus requerimientos son principalmente de carbohidratos. Por otro lado, en nuestro caso la sobrevivencia fue notablemente inferior en los organismos que recibieron la dieta de microalgas cultivadas con luz blanca. Esto tiene que tomarse en consideración ya que el ahorro en el tiempo de cultivo de este organismo necesario para alcanzar el estado de adulto sería contrarrestado por el menor número de individuos que alcanzan esa talla.

Al comparar los datos de longitud total de Artemia en el estadio de adulto obtenidos en este trabajo con los obtenidos por Sánchez-Saavedra (com. pers.), quien utilizó la misma microalga cultivada bajo condiciones similares de luz, encontró longitudes mayores para las Artemias alimentadas con Chaetoceros sp. mantenido en luz azul (5.7 mm.) y luz azul mezclada (5.3 mm.) y valores significativamente menores en luz blanca (4.9 mm.). En este trabajo se evaluó una respuesta inversa, ya que, las tallas mayores fueron con luz blanca y menores para los dos tipos de luz azul. Estas diferencias en tallas probablemente son debidas a variaciones en la composición proximal del alimento y quizá también se vieron influenciados por la diferencia en el tiempo para llegar al estadio de adulto.

#### **IV.4. Composición proximal de Artemia franciscana.**

Los datos reportados demuestran que solo se recuperó y se pudo explicar entre el 45 y el 60% del total de la sustancia orgánica. Esto en parte seguramente se debe al hecho que ninguna de las técnicas utilizadas detecta y mide cuantitativamente la quitina, que es el componente principal del exoesqueleto de todos los crustáceos. Por otro lado, otros

análisis de biomasa de Artemia efectuados en fresco pudieron explicar en general porcentajes notablemente mayores (Paniagua-Chávez, 1993; Cordero-Esquivel y Correa-Sandoval, com. pers.). Por este motivo, probablemente el bajo porcentaje explicado se debe al hecho que los organismos que se usaron para estos análisis fueron preservados en congelación durante por lo menos un mes, lo cual pudo haber causado pérdidas importantes, como ya notado en el caso de algunas microalgas preservadas con la misma técnica por Paniagua-Chávez (1993) y Cordero-Esquivel *et al.* (1993), que describen pérdidas del 20% o superiores con períodos similares de preservación. En el caso de Artemia ésto fue confirmado recientemente por Arriaga-Haro (com. pers.), que encontró pérdidas iguales y superiores a las reportadas en este trabajo, y por González-Medina (com. pers.) quien encontró pérdidas cerca del 50% de la biomasa (en peso seco), después de 2 a 3 días de congelamiento.

Por lo anterior, nuestros datos tienen que ser utilizados con precaución. Aparentemente proteínas y lípidos constituyen las fracciones bioquímicas más importantes de Artemia, mientras que los carbohidratos representan en todos los casos el 4% aproximadamente de la biomasa. En general, la literatura reporta que los lípidos constituyen la mayor parte de las sustancias de reserva de los crustáceos planctónicos ya que esta fracción permite una mayor flotabilidad de estos organismos (Sargent *et al.* 1989; Guerrero-Ruíz, 1991). Por otro lado, el contenido protéinico es notablemente más bajo del reportado para Artemia (Tacon, 1990). Es posible por lo tanto que esta diferencia, además de poder ser causada por una pérdida, debida a la técnica de preservación, pueda ser el resultado de una extracción insuficiente. Datos que obtuvimos en fecha posterior a los análisis (Dorsey *et al.*, 1977) demuestran que, para obtener la extracción completa de las proteínas se requieren tiempos que pueden ser muy diferentes, en dependencia del material biológico analizado, y que, en la mayoría de los casos se

alcanza la recuperación total del nitrógeno protéinico con tiempos de extracción de por lo menos una hora. En este trabajo el tiempo de extracción fue inferior (30 min.), lo cual pudiera constituir la explicación de esta importante diferencia.

No todos los datos están en este caso disponibles: no sabemos por ejemplo si la importante mortalidad notada con una de las dietas se produjo durante la primera fase del bioensayo o en tiempos posteriores; ésto es un factor que debería tomarse en consideración si se quisiera producir biomasa de Artemia para la alimentación de organismos adultos, como peces de ornato, peneidos u otros organismos zooplancófagos adultos. Si por otro lado, la mortandad fuera limitada a etapas tardías de desarrollo, la utilización de esta dieta pudiera redundar en una disminución notable del tiempo necesario para alcanzar tales estadios, y pudiera ser posteriormente enriquecida o sustituida por las dietas con los cuales se obtuvieron sobrevivencias mayores.

#### **IV.5. Producción de progenie de Artemia franciscana.**

Información relacionada con este trabajo ha demostrado una singular falta de información sobre la producción de progenie de Artemia, con la excepción de trabajos en los cuales se intenta favorecer la producción de quistes introduciendo diferentes factores de estrés como son el aumento de salinidad (Gopalakrishnan *et al.* 1989) o condiciones hipoxicas aunadas a incrementos en la concentración de hierro (Swenson-Alvarado, 1993).

Además, por lo menos con una de las dietas es posible obtener en condiciones de laboratorio quistes de Artemia, que son un producto muy cotizado y que, debido al aumento constante de la demanda, es considerado uno de los cuellos de botella para el desarrollo de la acuicultura, sobre todo en los países menos desarrollados. De hecho, por este motivo investigaciones recientes están dirigidas a determinar las condiciones de cultivo que permitan producir quistes en sistemas de cultivo intensivo (Balasundaram y

Kumaraguru, 1987; Figueredo-López *et al.*, 1987; Lavens y Sorgeloos, 1987).

En términos de producción total de progenie por pareja, los valores aquí reportados son comparables a los obtenidos por Arriaga-Haro (com. pers.) y González-Medina (com. pers.), aunque en este trabajo la producción de quistes, se observó exclusivamente con microalgas producidas con luz azul, hace pensar que se introdujo involuntariamente algún factor de estrés en las condiciones de cultivo. Como se sabe, condiciones medio ambientales extremas como alta salinidad, baja concentración de oxígeno, entre otras, dan como resultado que Artemia produzca quistes (Castro y Gallardo, 1985), en este trabajo no se presentaron anomalías en estos parámetros. Algunas posibles explicaciones relacionadas con la producción de quistes, podrían ser que los cultivos de microalgas presentaron muy baja producción de bacterias. Johnson (1980), reporta que al mantener a Artemia en cultivos axénicos se vuelve infertil, después de varias generaciones, ya que algunas bacterias llegan a producir vitaminas que son esenciales para su alimentación y se ha comprobado que en ausencia de tiamina y ácido fólico estas no llegan de estadio metanauplio y/o juvenil.

González-Medina, (com. pers.), encontró que bajos niveles de iluminación durante los ensayos de alimentación provocan alguna deficiencia dietética de las microalgas. La última posibilidad sería confirmada por el crecimiento notablemente más lento con estas dietas. Finalmente, la diferencia pudiera ser debida a que los quistes utilizados para los bioensayos con las microalgas producidas en luz azul presentaron un porcentaje de eclosión notablemente bajo, de un orden de magnitud inferior al que se obtuvo para el ensayo con luz blanca. Por tal motivo no hay suficientes fundamentos para determinar si la dieta de luz azul es adecuada o no.

## V. CONCLUSIONES.

1).- Al utilizar luz de distinta calidad (luz azul, azul mezclada y blanca), permite obtener dietas diferentes cultivando una sola especie de microalga.

2).- Para luz azul mezclada un pequeño cambio cuantitativo de la contribución de luz ambiental permitió la producción de una dieta con características considerablemente diferentes y con una mayor proporción de los constituyentes celulares.

3).- Al utilizar Chaetoceros sp. cultivado bajo diferentes calidades de luz, se plantea la posibilidad de disminuir el número de especies que es generalmente necesario mantener para poder ofrecer dietas adecuadas a los diferentes organismos o estadios de vida que se están alimentando con ellas.

4).- Al utilizar Chaetoceros sp. cultivado bajo diferentes calidades de luz y al ser suministrado como alimento de Artemia, no demostró tener diferencias en la composición de proteínas y carbohidratos.

5).- El uso de Chaetoceros sp. producido bajo diferentes calidades de luz, y al ser suministrado como alimento de Artemia, trae como consecuencia variaciones en la velocidad de crecimiento, la sobrevivencia y en el tiempo necesario para alcanzar la madurez sexual.

6).- Apesar de la buena calidad del alimento suministrado a Artemia, se observó una gran variabilidad en la producción de su progenie.

## V. LITERATURA CITADA

- Agraz-Guereña, V. F., H.R. Alvarez, S.J. Góngora, y M.C. Sánchez. 1987. **Efecto de cuatro concentraciones de Tetraselmis suecica sobre el crecimiento y supervivencia de Artemia a densidades de 3000 larvas por litro.** Memoria de curso de titulación de cultivo de Artemia. Facultad de Ciencias Marinas. Universidad Autónoma de Baja Caalifornia. Ensenada B.C. México. 45 pp.
- Baatz, I. 1941. **Die Bedeutung der Lichtqualität für Wachstum und Stoffproduktion planktonischer Meeresdiatomeen.** *Planta*. 31:726-766.
- Balasundaram, c. y A.K. Kumaraguru. 1987. **Laboratory studies on growth and reproduction of Artemia (Tuticorin strain).** En: Sorgeloos, P., D.A. Bengtson, W. Declair, y E. Jaspers. (Eds). "Artemia Research and Its Applications: Vol. 3. Ecology, Culturing and Use in Aquaculture. Universa Press, Wetteren, Belgium.556 pp.
- Bardach, J.E., J.H. Ryther y W.O. McLarney. 1986. **Acuicultura. Crianza y cultivo de organismos marinos y de agua dulce.** AGT Editor, S.A. México. 741 pp.
- Bligh, E.G. y W.J. Dyer. 1959. **A rapid method of total lipid extraction and purification.** *Can.J. Biochem.Physiol.* 37:911-917.
- Bogorad, L. 1975. **Phycobiliproteins and complementary chromatic adaptation.** *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 26:369-401.
- Bonin, D.J. y S.Y. Maestrini. 1981. **The role of phytohormones and vitamins in species sucesion of phytoplankton.** p. 310-322. En: Platt, T. (ed.). "Physiological Bases of Phytoplankton Ecology". Canadian Bulletin of Fisheries and Aquatic Sci. No. 210. 346 pp.

- Brand, L.E. y R.L.L. Guillard. 1981. **The effects of continuous light and light intensity on the reproduction rates of twenty-two species of marine phytoplankton.** J.exp. mar. Biol. Ecol. 50:119-132.
- Brown, T.J. y G.H. Geen. 1974. **The effect of light quality on the carbon metabolism and extracellular release of Chlamydomonas reinhardtii Dangeard.** J. Phycol. 10:213-220.
- Burton, J.D., 1980. **Factors limiting primary production: Nutrients.** 305-345 En: J.E.G. Raymont. 1980. Plankton and productivity in the oceans. Pergamon Press, Oxford and New York. 489 pp.
- Castro, T. y C. Gallardo. 1985. **Artemia sp. en investigación y docencia.** Cuadernos CBS 2. Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco, México. 42 pp.
- Chiaverini, J. 1972. **Techniques d'extraction et d'analyse des lipides.** Université de Paris. et M. Curie, Paris. Station Zoologique Villefranche-Sur-Mer. Notes de Travail No. 12. 12 pp.
- Claus, C., F. Benijts, G. Vandeputte y W. Gardner, 1979. **The biochemical composition of the larvae of two strains of Artemia salina (L) reared on two different algal foods.** J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 36:171-183.
- Cordero-Esquivel, B., D. Voltolina y F. Correa-Sandoval., 1993. **The biochemical composition of two diatoms after different preservation techniques.** Comp. Biochem. Physiol. 1105: 369-373.
- Correa-Sandoval. F. 1991. **Caracterización biológica y bioquímica de algunas poblaciones de Artemia franciscana Kellogs. 1906.** Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, México. 154 pp.

- Coutteau, P. y P. Sorgelos. 1992. **The use of algae substitutes and requirements for live algae in the hatchery and nursery rearing of bivalve mollusks: an international survey**. J. Shellfish Res. 11:467- 476.
- Daniel, W. W., 1977. **Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud**. Editorial Noriega Limusa., México. 661 pp.
- Darley, W.M. 1987. **Biología de las Algas. Enfoque Fisiológico**. Cap. 2:29-80. Ed. Limusa. México. 236 pp.
- Dorsey, T.E., P.W. McDonald y O.A. Roels. 1977. **A heated biuret-folin protein assay which gives equal absorbance with different proteins**. Anal. Biochem. 78:156-164.
- Droop, M.R. 1975. **The chemostat in mariculture**. 71-93. En: Persoone, G. y E. Jaspers (Eds.). Proc. 10 th. Europ. Symp. Mar. Biol. Ostend, Belgium.
- Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers y F. Smith. 1956. **Colorimetric method for determination of sugars and related substances**. Analyt.Chem. 28:350-356.
- Fabregas, J., J. Abalde., B. Cabeza y C. Herrero. 1989. **Changes in protein, carbohydrates and gross energy in the marine microalga Dunaliella tertiolecta Butcher by nitrogen concentrations as nitrate, nitrite and urea**. Aquacultural Engineering. 8:223-239.
- Falkowski, P. G. y J. LaRoche. 1991. **Acclimation to spectral irradiance in algae**. J. Phycol. 27:8-14.
- Falkowski, P.G. y T.G. Owens. 1980. **Light-shade adaptation**. Plant. Physiol. 66:592-595.

- Falkowski, P.G., Owens, T.G., Ley, A.C. and Mauzerall, D.C. 1981. **Effects of growth irradiance levels on the ratio of reaction centres in two species of marine phytoplankton.** *Plant. Physiol.* 68:969-973.
- Farber-Lorda, J. 1986. **Etudes biologiques, energetiques et biochimiques du krill antarctique Euphausia superba et Thysanoessa macrura recolecte au cours de la campagne Fibex (Février 1981).** These de Doctorat Universite d' Aix-Marseille II. 214 p.
- Faust, M.A., J.C. Sager y B.W. Meeson. 1982. **Response of Prorocentrum mariaelebouriae (Dinophyceae) to light of different spectral qualities and irradiances: growth and pigmentation.** *J. Phycol.* 18:349-356.
- Figueredo-López, J., J. Cabrera-Peña y R. Murillo. 1987. **Infraestructura experimental para el cultivo de Artemia a altas densidades.** *Rev. Latinoam. de Acuicult.*,34:21-25.
- Flaak, A.R. y C.E. Epifanio. 1978. **Dietary protein levels and growth of the Oyster Crassostrea virginica.** *Mar. Biol.* 15:157-163.
- Fogg, G.E. y B. Thake. 1987. **Algal Cultures and Phytoplankton Ecology.** The University of Wisconsin Press, Madison. 269 pp.
- Geider, R. J. 1987. **Light and temperature dependence of the carbon to chlorophyll a ratio in microalgae and cyanobacteria: implications for physiology and growth of phytoplankton.** *New Phytol.* 106:1-34.
- Gabbot, P.A., D.A. Jones y D.H. Nichols. 1976. **Studies on the design and acceptability of microencapsulated diets for marine particle feeders. II. Bivalve molluscs.** *Proc. 10 th. Europ. Symp. Mar. Biol. Ostend, Belgium.* 1:127-141.

- Goldman, J.C. y H.I. Stanley. 1974. **Relative growth of different species of marine algae in wastewater-seawater mixtures.** Mar. Biol. 28:17-25.
- Gopalakrishnan, P., V.R. Krishna y R.T. Surendra. 1989. **Some observations on the growth and cyst production characteristics of the brine shrimp Artemia sp. (Gujarat strain) in pond culture and its potential for import substitution.** Fishery Technology, 226:100-103.
- Gostan, J., C. Lechuga-Deveze y L. Lazzara. 1986. **Does blue light affect the growth of Chaetoceros protuberans (Bacillariophyceae).** J. Phycol. 22:63-71.
- Guerrero-Ruiz, M.A. 1991. **Variabilidad espacial de la composición bioquímica del material orgánico particulado y de los eufasidos, en relación con las condiciones hidrológicas del golfo de Tehuantepec durante enero de 1989.** Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Marinas. Universidad Autónoma de Baja California. 109 pp.
- Guillard, R.L.L. y J.H. Ryther. 1962. **Studies on marine planktonic diatoms I. Cyclotella nana Hustedt and Detonula confervacea (Cleve) Gran.** Can. J. Microbiol. 8:229-239.
- Hemerick, G. 1973. **Mass culture.** 255-273. En: (Eds) Handbook of phycollogical methods. J.R. Stein. Cambridge Univ. Press, New York. 448 pp.
- Humphrey, G.F. 1983. **The effect of the spectral composition of light on the growth, pigments, and photosynthetic rate of unicellular marine algae.** J. exp. mar. Biol. Ecol. 66:49-67.
- Johnson D. A. 1980. **Evaluation of various diets for optimal growth and survival of selected life-stages of Artemia.** p 185-192. En: The brine shrimp Artemia Vol. 3 Ecology, Culturing, Use in aquaculture. Persoone G., P. Sorgeloos, O. Roels, Jaspers (Eds.) Universa Press, Wetteren, Belgium, 426 pp.

- Kaplan, D., A.E. Richmond, Z. Dubinsky, y S. Aaronson. 1986. **Algal Nutrition**. 147-190. En: Richmond, A. (Eds.). *Handbook of Microalgal Mass Culture*. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. 528 pp.
- Kinne, O. 1976. **Introduction to volume III**. 1-17. En: Kinne, O. (Eds.). "Marine Ecology. Vol. 3. Part. 1: Cultivation". John Wiley and Sons. London. 301 pp.
- Kirk, J.T.O. 1983. **Light and Photosynthesis in Aquatic Ecosystems**. Cambridge University Press, Cambridge. 401 pp.
- Landau, M., G. Miyamoto y C. Bolis, 1985. **Growth and amino-acids composition of Artemia salina (L. 1785) fed algae grown in different media**. (Anostraca). *Crustaceana* 49:318-321.
- Langdon, C.J. y M.J. Waldock. 1981. **The effect of algal and artificial diets on the growth and fatty acid composition of Crassostrea gigas spat**. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 61:431-448.
- Langdon, C.J., D.M. Levine y D.A. Jones. 1985. **Microparticulate feeds for marine suspension feeders**. *J. Microencap.* 2:1-11.
- Lavens, P. y P. Sorgeloos. 1987. **Design, operation, and potential of a culture system for the continuous production of Artemia nauplii**. En: Sorgeloos, P., D.A. Bengtson, W. Decler y E. Jaspers. (Eds.). "Artemia Research and Its Applications: Vol. 3. Ecology, Culturing, Use in Aquaculture. Universa Press. Wetteren, Belgium. 556 pp.
- López-Elías, J.A. 1990. **Cultivos semi-contínuos de cuatro especies de microalgas con medios simplificados: evacuación de técnicas analíticas y de producción**. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, México. 163 pp.

- López-Elías, J.A. y D. Voltolina. 1993. **Cultivos semicontínuos de cuatro especies de microalgas con un medio no convencional.** Ciencias Marinas. 19(2):169-180.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrought, A.L. Farr y R.J. Randall. 1951. **Protein measurement with the Folin phenol reagent.** J. Biol. Chem. 193:265-275.
- Lüning, K. 1981. **Light.** En: Lobban, C.S. y M. J. Wynne. (Eds.). The biology of seaweeds. Botanical Monographs. Oxford, Blackwell Sci. Publ. 17:326-330.
- Malara, G. y R. Charra. 1972 a. **Dosage des protéines particulières selon la méthode de Lowry.** Université de Paris. Station Zoologique. Villefranche-Sur-Mer. Notes de Travail. No. 5. 11 pp.
- Malara, G. y R. Charra. 1972 b. **Dosage des glucides particuliers de phytoplancton selon la méthode de Dubois.** Université de Paris. Station Zoologique. Villefranche-Sur-Mer. Notes de Travail. No. 6. 12 pp.
- Morel, A., Lazzara, L. y Gostan, G. 1987. **Growth rate and quantum yield time response for diatom to changing irradiances (energy and color).** Limnol. Oceanogr. 32:1066-1084.
- Ojala, A. 1993. **The influence of light quality on growth and phycobiliprotein/chlorophyll a fluorescence quotients of some species of freshwater algae in culture.** Phycology. 32:22-28.
- Pande, S.V., R.P. Khan y T.A. Venkitasubramanian. 1963. **Microdetermination of lipids and serum total fatty acid.** Analyt. Biochem. 6:415-423.
- Paniagua-Chávez, C.G. 1993. **Viabilidad, composición proximal y valor alimenticio de Dunaliella sp. preservada por congelamiento.** Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, México. Tesis de Maestría en Ciencias. 67 pp.

- Parsons, T.R., Y. Maita y C.M. Lalli. 1984. **A Manual Of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis**. Pergamon Press, Oxford. 173 pp.
- Parsons, T.R., K. Stephens y J.D.H. Strickland. 1961. **On the chemical composition of eleven species of marine phytoplankters**. J. Fish. Res. Bd. Canada 18:1001-1016.
- Platt, T., C.L. Gallegos y W.G. Harrison. 1980. **Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton**. J. Mar. Res. 138:687-701.
- Prézelin, B.B. 1981. **Light reactions in photosynthesis**. 1-53. En: Platt, T. (Eds.). **Physiological Bases of Phytoplankton Ecology**. Can. Bull. Fish. Aquatic Sci. 210. 346 pp.
- Raven, J.A. y J. Beardall. 1981. **Respiration and photorespiration**. 55-82. En: Platt, T. (Eds.). **Physiological Bases of Phytoplankton Ecology**. Can. Bull. Fish. Aquatic Sci. 210. 346 pp.
- Riley, J.P. y R. Chester. 1971. **Introduction to marine chemistry**. Academic Press, London. 465 pp.
- San Francisco Bay Brand, Inc. 1988. **Tips on cyst decapsulation and commercial cyst usage**. 4 pp.
- Sánchez-Saavedra, M.P. y D. Voltolina. 1993. **The chemical composition of Chaetoceros sp. (Bacillariophyceae) under different light conditions**. Comp. Biochem. Physiol. B. (En prensa).
- Sargent, J., R.J. Henderson y D.R. Tocher. 1989. **The Lipids**. En: Halver, J.E. (Eds.) "Fish nutrition". Academic Press, Inc., New York, USA. 153-218.
- Sokal, R.R y F.J. Rohlf. 1969. **Biometría: Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica**. H. Blume Ediciones. Barcelona. 832 pp.

- Sorokin, C. 1973. **Dry weight, packed cell volume and optical density.** 321-343. En: Stein, J.R. (Eds.). Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurement. Cambridge University Press, New York. 394 pp.
- Stemann-Nielsen, E. y E.G. Jorgensen. 1968. **The adaptation of plankton algae. I. General part.** Physiologia Plant. 21:401-413.
- Stemann-Nielsen, E. 1975. **Marine Photosynthesis. With special emphasis on the ecological aspects.** Elsevier Scientific Publishing Company. 141 pp.
- Strickland, J.D.H. y T.R. Parsons. 1965. **A Manual of Seawater Analysis.** Bull. Fish. Res. Bd Can. 125:1-195.
- Swenson-Alvarado, M.L. 1993. **Efecto del fierro y la hipoxia sobre la producción de quistes y nauplios de Artemia franciscana.** Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Marinas. Universidad Autonoma de Baja California. México. 52 pp.
- Tacon, A.G.J. 1990. **Standard Methods For The Nutrition and Feeding of Farmed Fish and Shrimp.** Argent Laboratories Press. Redmond, Washington, USA. 208 pp.
- Tanada, T. 1951. **The photosynthetic efficiency of carotenoid pigments in Navicula minima.** Am. J. Bot. 38:276-283.
- Trujillo-Valle, M. L. 1993. **La Colección de Microalgas del CICESE. Informe técnico.** Comunicaciones Académicas, Serie Acuicultura, CICESE. CIACT9301. 103 pp.
- Voltolina, D., M.L. Trujillo-Valle y M.I. González-Leonardo. 1991. **La Colección de Cepas de Microalgas del Departamento de Acuicultura del CICESE.** Comunicaciones académicas. Serie de Acuicultura. CTACT-9101. 50 pp.
- Voskresenskaya, N.P. 1972. **Blue-light and carbon metabolism.** Ann. Rev. Plant Physiol. 23:219-234.

- Wallen, D.G. y G.H. Geen. 1971 a. **Light quality inrelation to growth, photosynthetic rates and carbon metabolism in two species of marine plankton algae.** Mar. Biol. 10:34-43.
- Wallen, D.G. y G.H. Geen. 1971 b. **Light quality and concentration of proteins, RNA, DNA and photosynthetic pigments in two species of marine plankton algae.**Mar. Biol. 10:44-51.
- Wallen,D.G. y G.H. Geen. 1971 c. **The nature of the photosynthate in natural phytoplankton populations in relation to light quality.** Marine Biology 10:157-168.
- Whyte, J.N.C. 1987. **Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves.** Aquaculture 60:231-241.
- Wikfors, G.H. 1986. **Altering growth and gross chemical composition of two microalgal molluscan food species by varying nitrate and phosphate.** Aquaculture 59:1-14.