

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

**EFFECTO DEL FIERRO Y LA HIPOXIA SOBRE  
LA PRODUCCION DE QUISTES Y NAUPLIUS  
DE *Artemia franciscana*.**



**TESIS**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
**OCEANOLOGO**  
PRESENTA  
**MARIA DE LOURDES SWENSON ALVARADO**

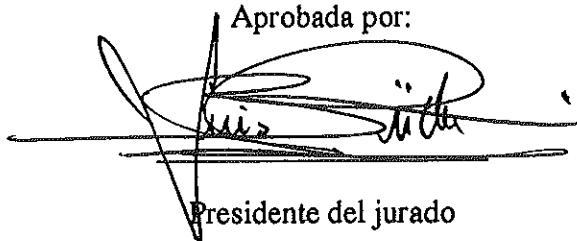
**EFFECTO DEL FIERRO Y LA HIPOXIA SOBRE LA PRODUCCION DE  
QUISTES Y NAUPLIUS DE *Artemia franciscana*.**

TESIS

QUE PRESENTA:

MARIA DE LOURDES SWENSON ALVARADO.

Aprobada por:



A handwritten signature in black ink, appearing to read "Luis Fernando Bückle Ramírez", written over a horizontal line.

Presidente del jurado

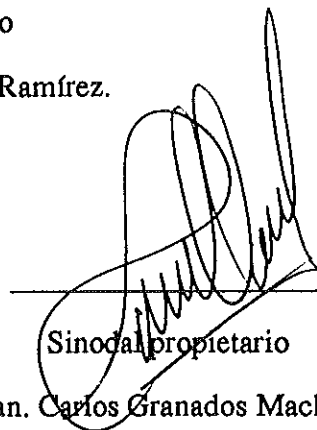
DR. Luis Fernando Bückle Ramírez.



A handwritten signature in black ink, appearing to read "Francisco Correa Sandoval", written over a horizontal line.

Sinodal propietario

DR. Francisco Correa Sandoval.



A handwritten signature in black ink, appearing to read "Carlos Granados Machuca", written over a horizontal line.

Sinodal propietario

Ocean. Carlos Granados Machuca.

## RESUMEN

Se sometió a una población de *Artemia franciscana* a diferentes condiciones de estrés utilizando una concentración de hierro de 1.87 gFe/l y períodos de inyección de 7 minutos de N<sub>2</sub> cada 8 horas durante 24 días, para inducir a la oviparidad de los organismos. Se comparó con el sistema control (0.65 mgFe/l).

Se realizaron recolectas de quistes y nauplius cada dos días con el fin de evaluar la producción. Porcentualmente se obtuvo un 31% de quistes en la condición Fe-N<sub>2</sub> en comparación con el 25.3% obtenido para el control. El análisis estadístico indica que no se encontraron diferencias significativas en la producción de quistes para la condición Fe-N<sub>2</sub> vs. el control; no existe un efecto sinérgico del hierro puro y el N<sub>2</sub> que afecte a las artemias y por consiguiente la producción de quistes.

Se encontraron quistes en estado de "no dormancia" lo cual es indicador de un cambio de reproducción de las hembras de artemia al igual que una coloración rojo oscuro en organismos sometidos al estrés de Fe-N<sub>2</sub> en comparación con los organismos en control los cuales tuvieron una coloración rosa claro. Existe una correlación entre el color de los animales y el tipo de reproducción.

## AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma de Baja California por ser mi formación como profesional.

Al Dr. Luis Fernando Bückle Ramírez por su apoyo constante durante la realización de éste trabajo así como agradezco la confianza que me brindó durante todo éste tiempo; sus observaciones y aportaciones me fueron esenciales para mi formación como Oceanólogo, Muchas Gracias.

Al Dr. Francisco Correa Sandoval y al Ocean. Carlos Granados Machuca por el apoyo brindado y por sus observaciones, críticas y aportaciones en la revisión del escrito.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada por la Beca-Tesis que me otorgó muy especialmente al M. en C. Francisco Suárez Vidal y al M. en C. Claudia Farfán; al departamento de Acuicultura por permitirme utilizar sus instalaciones para la realización de los experimentos y escrito.

Al Cand. Dr. Beatríz Cordero E. y al Cand. M. en C. Benjamín Barón S. por su ayuda para la realización de los análisis estadísticos en éste trabajo.

Al Dr. Domenico F. Voltolina L. por sus tan acertados consejos.

Agradezco a las personas que compartieron conmigo sus conocimientos: Al Dr. Fernando Díaz., al M. en C. Clara Caro., al M. en C. Enrique Olivares., al Cand. Dr. Pilar Sánchez., al M. en C. Ma. de Lourdes Trujillo.

## INDICE

	Página
<b>I INTRODUCCION</b>	1
I.1  Objetivo general.	4
I.1.1  Objetivos específicos.	4
I.1.2  Hipótesis.	4
<b>II ANTECEDENTES</b>	5
II.1  Influencia del oxígeno en la producción de quistes.	6
II.1.1  Relación oxígeno-nitrógeno en el estrés de <i>Artemia</i> sp.	7
II.2  Consideraciones sobre la química del fierro.	7
II.2.1  Relación oxígeno-nitrógeno en presencia de fierro para la producción de quistes.	8
<b>III METODOLOGIA</b>	10
III.1  Investigación experimental previa.	10
III.1.1  Alimento.	13
III.1.1.1  condiciones previas.	13
III.1.2  Condiciones experimentales.	14
III.1.3  Parámetros físico-químicos.	16
III.1.4  Diseño del sistema experimental.	17
III.1.5  Procesamiento de muestras.	18
III.1.5.1  Parámetros físico-químicos.	18
III.1.5.2  Recolecta de quistes y nauplius.	18
III.1.5.3  Tratamiento estadístico.	19

	<b>Página</b>
<b>IV RESULTADOS</b>	<b>21</b>
IV.1 Variables físico-químicas.	21
IV.2 Alimento.	23
IV.2.1 Densidad celular.	23
IV.3 Relación del fierro puro en el medio.	24
IV.4 Población de <i>Artemia franciscana</i> .	25
IV.4.1 Proporción de sexos.	25
IV.4.2 Diferencias de longitud en adultos para cada tratamiento.	25
IV.4.3 Producción de quistes y nauplius en los experimentos preliminares.	27
IV.4.4 Análisis estadísticos para quistes y nauplius de <i>Artemia</i> <i>franciscana</i> producidos en los experimentos preliminares.	28
IV.4.5 Producción de quistes y nauplius en el experimento final.	31
IV.4.6 Estimación de la concentración de hemoglobina en <i>Artemia</i> <i>franciscana</i> .	36
IV.4.7 Tasa de sobrevivencia y mortalidad.	36
IV.4.8 Análisis estadísticos de producción de quistes y nauplius de <i>Artemia franciscana</i> .	37
<b>V DISCUSION</b>	<b>40</b>
<b>VI CONCLUSIONES</b>	<b>48</b>
<b>LITERATURA CITADA</b>	<b>49</b>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA	Página
1. Diseño experimental. 1.- Bloque experimental de 50 litros; 2.- Unidad experimental o subdivisiones; acuarios de 11x9x9 cm (a,b,c,d,e,f).	12
2. Número de quistes producidos por <i>Artemia franciscana</i> en 9 recolectas durante el experimento.	32
3. Número de nauplius producidos por <i>Artemia franciscana</i> en 9 recolectas llevadas a cabo en el experimento.	33
4. Nauplius y quistes de <i>Artemia franciscana</i> producidos bajo la condición Fe-N <sub>2</sub> .	35
5. Nauplius y quistes de <i>Artemia franciscana</i> producidos en el Control.	35

## LISTA DE TABLAS

TABLA	Página
I. Variación de la temperatura (°C), oxígeno, salinidad y pH en el sistema control y en la condición Fe-N <sub>2</sub> . Se reportan la media y el error estándar.	21
II. Variación del oxígeno (ppm) durante los períodos de inyección del N <sub>2</sub> (tiempos de disminución y tiempos de recuperación).	22
III. Raciones de la microalga <i>Chaetoceros</i> sp. administradas a las cepas de <i>Artemia franciscana</i> según su edad (Correa, 1991).	23
IV. Variación de la densidad (10 <sup>6</sup> cel/ml) de <i>Chaetoceros</i> sp. durante la fase experimental.	24
V. Relación en peso (gramos) del hierro puro al inicio del experimento y su superficie de contacto, diámetro del disco y alto por repetición.	24
VI. Análisis de varianza para la longitud en hembras del control y de la condición Fe-N <sub>2</sub> .	25
VII. Análisis de varianza para la longitud de los machos del control y de la condición Fe-N <sub>2</sub> .	26
VIII. Análisis de rango múltiple para la longitud de las hembras del control y de la condición Fe-N <sub>2</sub> .	26

	<b>Página</b>
IX. Análisis de rango múltiple para la longitud de los machos del control y de la condición Fe-N <sub>2</sub> .	26
X. Número total de quistes y nauplius producidos por <i>Artemia franciscana</i> después de cinco recolectas.	27
XI. Análisis de varianza paramétrico para la producción de quistes de <i>Artemia franciscana</i> .	28
XII. Análisis de rango múltiple para la producción de quistes en <i>Artemia franciscana</i> en los experimentos preliminares.	29
XIII. Análisis de varianza paramétrico para la producción de nauplius de <i>Artemia franciscana</i> .	29
XIV. Análisis de rango múltiple para la producción de nauplius de <i>Artemia franciscana</i> .	30
XV. Tasa de mortalidad en los experimentos preliminares.	31
XVI. Promedio del número de quistes producidos por <i>Artemia franciscana</i> en intervalos semanales (1, 2 y 3).	33
XVII. Promedio del número de nauplius producidos por <i>Artemia franciscana</i> en intervalos semanales (1, 2 y 3).	34

	<b>Página</b>
XVIII. Comportamiento en la producción de quistes y nauplius para las condiciones individuales de los experimentos preliminares y el efecto sinérgico en el experimento final.	34
XIX. Código de color de Chow (1968). Estimación de la concentración de hemoglobina en <i>Artemia</i> sp. (Tomado de: Versichele y Sorgeloos, 1980).	36
XX. Porcentajes de mortalidad en la población de <i>Artemia franciscana</i> para cada condición experimental después de 24 días de experimentación.	37
XXI. Análisis de varianza paramétrico para la producción total de quistes de <i>Artemia franciscana</i> .	38
XXII. Análisis de rango múltiple para la producción total de quistes de <i>Artemia franciscana</i> .	38
XXIII. Análisis de varianza paramétrico para la producción total de nauplius de <i>Artemia franciscana</i> .	38
XXIV. Análisis de rango múltiple para la producción total de nauplius de <i>Artemia franciscana</i> .	39

## I INTRODUCCION

La acuicultura es foco de atención con las más optimistas expectativas para la producción de alimentos. El incremento en sus rendimientos ha contribuído a aumentar el entusiasmo por la actividad (De la Lanza-Espino y Arredondo, 1990).

La producción acuicultural depende del nivel científico que ha alcanzado un país y de las técnicas de cultivo porque el desarrollo de las empresas acuiculturales están limitadas por varios impedimentos, entre éstos está principalmente la falta de conocimientos científicos y de ingeniería para hacer al cultivo comercial de varias especies práctico y económicamente rentable (Wheaton, 1982).

Para sostener las especies cultivables uno de los tópicos más importantes es la fuente de alimento, porque el costo de éste afecta directamente el valor del producto final (Caro, 1991).

De las diversas fuentes nutricionales conocidas en la acuicultura, se ha encontrado que *Artemia* sp. es un alimento aceptado por diversos grupos de organismos tanto marinos como dulceacuícolas (Sorgeloos, 1980; Léger *et al.*, 1986).

La versatilidad de *Artemia* sp. en cuanto a su uso como alimento se fundamenta en el amplio rango de tamaño que tienen los diferentes estadios que caracterizan su desarrollo, la factibilidad de almacenar quistes por mucho tiempo y la producción poco compleja de adultos a nivel masivo (Amat, 1985; Léger *et al.*, 1986).

*Artemia* sp. es un crustáceo ampliamente utilizado en actividades acuiculturales; es de hecho el organismo en el cual casi el 99% de los acuicultores cifran sus esperanzas para alimentar larvas de peces y crustáceos de importancia comercial (Baltierra *et al.*, 1987).

El papel que desempeña *Artemia* sp. en la producción cada vez está tomando más interés entre los acuicultores, a pesar de los intentos de encontrar sustitutos de carácter inerte a ésta forma de alimento vivo, *Artemia* sp. sigue siendo indispensable para el logro de adecuados niveles de supervivencia y crecimiento en crustáceos y peces básicamente. Nauplius de *Artemia* no sólo constituyen el mejor, si no que en muchos casos el único recurso de alimento vivo para estadios juvenes de muchas especies en cultivos (Sorgeloos *et al.*, 1986).

*Artemia* sp. tiene un amplio rango de tolerancia a los factores físico-químicos (salinidad, temperatura y oxígeno disuelto), cualidad que permite cultivarla bajo condiciones de control poco rigurosas (Baltierra *et al.*, 1987). Si se toma en cuenta el corto ciclo de vida que tiene ésta especie, la factibilidad de su manejo y almacenamiento en forma de quistes, su elevada viabilidad durante varios años; el alto contenido protéico y su eficiencia en la conversión de alimento, *Artemia* sp. es el alimento más rentable para la acuicultura (Aviña *et al.*, 1987) y consecuentemente se ha generado una gran comercialización de quistes, larvas y adultos.

Con una amplia distribución en el ambiente natural a nivel mundial (Persoone y Sorgeloos, 1980; citados por: Baltierra *et al.*, 1987) y un ciclo de vida relativamente corto de (12 a 17 días) permiten obtener de la artemia una biomasa importante en poco tiempo (Baltierra *et al.*, 1987).

Uno de los tópicos más importantes de la biología de *Artemia* sp. es la reproducción. Tanto en las cepas bisexuales como en las partenogenéticas las hembras pueden tener dos formas de reproducción excluyentes: la ovoviviparidad y la oviparidad (Caro, 1991).

La ovoviviparidad ocurre cuando las condiciones ambientales son favorables, los nauplius se desarrollan totalmente en el interior del útero de la hembra y nacen directamente en forma de nauplius.

En la oviparidad, los huevos alcanzan el estado de blástula avanzada o gástrula incipiente, cesan en su desarrollo, son cubiertos de un corión resistente procedente de las glándulas de la cáscara y se emiten por la hembra como quistes, huevos císticos de duración o de "invierno" (Amat, 1985). Los quistes son formas diapáusicas de resistencia que constituyen el único mecanismo de supervivencia de la especie en condiciones adversas (Caro, 1991).

Al poner los quistes secos en condiciones favorables de salinidad, temperatura, oxigenación, pH e iluminación; eclosionan e inician en pocas horas el desarrollo y crecimiento de los organismos. En los últimos años ha surgido un enorme interés para hacer estudios sobre el cultivo de éstos organismos bajo condiciones de laboratorio.

El cultivo de *Artemia* sp. implica la producción colateral de alimento vivo o inerte con características bioquímicas y tamaño de partícula adecuadas para que pueda ser capturado y aprovechado por el organismo y realizar sus funciones metabólicas durante el crecimiento, desde nauplio hasta adulto. *Artemia* sp. puede cultivarse en el laboratorio alimentándola con productos de diversa índole: algas verdes, levaduras, salvado de trigo, de arroz y otros.

Actualmente existe una alta demanda de quistes de *Artemia* sp. especialmente para cultivos de *Penaeus* y *Macrobrachium*, géneros que requieren de éste alimento durante un período largo de su desarrollo larval (Caro, 1991).

## **I. 1 OBJETIVO GENERAL**

Estudiar la influencia del fierro puro y la hipoxia sobre la produccción de quistes de *Artemia franciscana*.

### **I. 1. 1 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

Conocer el efecto del fierro puro y su oxidación junto con la variación del oxígeno disuelto en la estimulación de la oviparidad de *Artemia franciscana*.

Investigar la acción del fierro puro oxidado en la oviparidad de *Artemia franciscana*.

Investigar el efecto de períodos de hipoxia en la oviparidad de *Artemia franciscana*.

### **I. 1. 2 HIPOTESIS**

Ho: Las artemias no producen quistes al someterlas a un estado de estrés cuando se inyecta nitrógeno al agua.

Ha: Se producen quistes al someter a las artemias a un estado de estrés con la inyección del nitrógeno.

Ho: Las artemias no producen quistes al disolver en el ambiente fierro puro oxidado.

Ha: Se producen quistes al aplicar el fierro puro oxidado.

Ho: No existe un efecto sinérgico del fierro y el nitrógeno que afecte a las artemias y por consiguiente la producción de quistes.

Ha: Exite un efecto sinérgico del fierro y el nitrógeno sobre las artemias que producen más quistes.

## II ANTECEDENTES

A continuación se describen consideraciones básicas de los factores que poseen un grado de influencia en la reproducción de *Artemia* sp. particularmente el fierro y el oxígeno.

Se han estudiado diversos factores críticos que tienen efecto en la producción de quistes: entre éstos se destacan la cantidad de oxígeno disuelto en el medio, la temperatura del agua, la salinidad, la densidad de organismos en el cultivo, la presencia de fierro quelado y el número de puesta de la hembra.

La posible interacción de los factores mencionados se destaca en las diferencias que se obtienen en la inducción a la reproducción ovípara, cuando se mantiene un estrés de oxígeno y se suministra fierro quelado: 48% de oviparidad en el control; 65% con el estrés de oxígeno y 74% con la presencia de fierro quelado (Berthélémy y Hedgecock, 1987).

Diversos autores señalan mecanismos responsables del cambio de ovoviviparidad a oviparidad; la salinidad fué mencionada como el factor responsable (Abony, 1915) y por Barigozzi (1939); Dutrieu (1960) relaciona la producción de quistes con la síntesis de hemoglobina, de acuerdo a Ballardín y Metalli (1963) el modo de reproducción está controlado por factores del medio ambiente; D'Agostino y Provasoli (1968) reportan que la oviparidad es inducida por la calidad o la cantidad del alimento, otros autores se refieren a la presencia de componentes particulares en el medio de cultivo o en el alimento, por ejemplo el fierro (Baker, 1966) o la clorofila (Dutrieu, 1960).

Investigaciones de laboratorio (Sorgeloos, 1975) revelan una definitiva influencia de los niveles bajos de oxígeno a la inducción a la oviparidad.

Por otra parte, investigaciones llevadas a cabo en California (E.U.A.) señalan una posible correlación entre la presencia del hierro en el medio y el incremento en la síntesis de hemoglobina con la producción de quistes (Baker, 1966; Chow, 1968).

## II. 1 INFLUENCIA DEL OXIGENO EN LA PRODUCCION DE QUISTES

Otros trabajos intentan explicar el fenómeno relacionándolo básicamente con la concentración de oxígeno en el medio como sigue:

ppm O<sub>2</sub>

									----- ovoviviparidad
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
oviparidad-----									

La acción discontinua del oxígeno y la acción de Fe<sup>+2</sup> parecen inducir una acentuada producción de huevos císticos (Amat, 1985).

Gilchrist (1954) y Gilchrist y Green (1960) mostraron que la hemoglobina y como su producto final, la hematina, se incrementan con la hipoxia.

Dutrieu (1960) sugiere que a causa de concentraciones bajas de oxígeno, la excreción de hematina vía la glándula de la cáscara situada en el ovisaco, inducen la dormancia de los quistes en el útero.

Sorgeloos *et al.*, 1975 encontró que las hembras de *Artemia* adaptadas a concentraciones de oxígeno de 2 mg/l acusan el efecto que produce la hipoxia, es decir, se observa en adultos una coloración rojo oscuro y un cambio en el tipo de reproducción ya que inicialmente es por ovoviviparidad y posteriormente por oviparidad.

Una baja concentración de oxígeno y la adición de Fe-EDTA llevan a cabo la producción de un tipo de hemoglobina (niveles bajos de oxígeno estimulan la producción de hemoglobina en general pero se produce la síntesis de una hemoglobina específica Hb-III

que depende su formación de la concentración de fierro en el medio) la cual juega un importante papel en la formación de la capa que cubre al quiste llamada corión (Lavens y Sorgeloos, 1984).

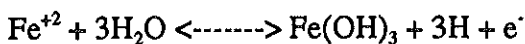
### II. 1. 1 RELACION OXIGENO-NITROGENO EN EL ESTRES DE *Artemia* sp.

La literatura que versa sobre la producción de quistes de *Artemia* sp., en general, está relacionada con las condiciones de estrés.

Para provocar un estrés de oxígeno, las inyecciones cíclicas de nitrógeno al ambiente de *Artemia* resultan bastante eficientes porque los organismos mantienen activa durante meses la reproducción por oviparidad. El estadio de desarrollo en el cual se provoca el estrés es muy importante porque los organismos juveniles tuvieron su primera descendencia por oviparidad al contrario de aquellos que en el estadio pre-adulto y adulto la descendencia inicial fué por ovoviviparidad (Lavens y Sorgeloos, 1984).

### II. 2 CONSIDERACIONES SOBRE LA QUIMICA DEL FIERRO

En presencia del O<sub>2</sub> el Fe<sup>+2</sup> es oxidado a Fe<sup>+3</sup>. La reacción que ocurre en la frontera óxica-anóxica es la siguiente:



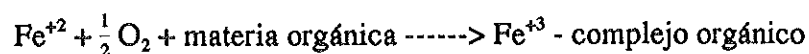
y un pH aproximado a 8.

En condiciones óxicas el fierro se encuentra oxidado en Fe<sup>+3</sup> formando dos especies principales: Fe(OH)<sub>3</sub> y FeOOH los cuales son sólidos (Cotton y Wilkinson, 1981).

El fierro en presencia del agua y oxígeno forma el moho, éste es un hidrato de óxido de Fe<sup>+3</sup>. El sistema férrico-ferroso actúa como catalizador para la oxidación de la materia orgánica en presencia del O<sub>2</sub> de la siguiente manera:



la reacción oxidada resulta:



(Caro, 1991).

## II. 2. 1 RELACION OXIGENO-HEMOGLOBINA EN PRESENCIA DE FIERRO PARA LA PRODUCCION DE QUISTES

La hemoglobina es una proteína soluble del plasma y no se encuentra encerrada en las células de *Artemia*. La habilidad para sintetizar hemoglobina según la concentración de oxígeno en el medio, indica la dependencia de los adultos de ésta variable puesto que éstos organismos tienen una gran demanda por el O<sub>2</sub> para su producción energética para sus funciones biológicas básicas (Caro, 1991).

Durante el crecimiento los nauplius de *Artemia* sintetizan tres tipos de hemoglobina; Hb-I, Hb-II y Hb-III, la cantidad de cada hemoglobina varía con la edad, sexo del organismo y el contenido de oxígeno en el agua (Caro, 1991).

Lavens y Sorgeloos (1984) llevan a cabo algunas observaciones preliminares de cambios significativos en la concentración de la Hb-III en el pre-adulto en un medio hipóxico con Fe-EDTA confirmando la hipótesis sobre la regulación de la Hb-III en la oviparidad del adulto de *Artemia*.

Se atribuye una considerable importancia a la manera característica según la cual la molécula de la hemoglobina se une al oxígeno en su función de transportador. La

hemoglobina tiene una afinidad relativamente baja para captar la primera y segunda molécula de oxígeno, pero una vez que éstas se han incorporado, la unión de las demás es muy rápida. La pérdida de una molécula de oxígeno de la hemoglobina provoca que el resto se disocie más fácilmente cuando desciende la presión del oxígeno (Lehninger, 1978).

Por otra parte se ha comprobado que los bajos niveles de oxígeno provocan la síntesis de hemoglobina, específicamente Hb-III en las hembras, también se ha comprobado que existe una correlación positiva entre la presencia de fierro, condiciones de hipoxia, el incremento en la síntesis de hemoglobina y la producción de quistes (Versichele y Sorgeloos, 1980).

Estas características de enlaces químicos tanto de la hemoglobina junto con la baja concentración de oxígeno y la presencia de fierro en el medio explican porqué se sintetiza más hemoglobina en condiciones de hipoxia y de abundancia de hierro (Caro, 1991).

### III METODOLOGIA

#### III. 1 INVESTIGACION EXPERIMENTAL PREVIA

Para éste trabajo tanto los experimentos preliminares como en el final se utilizaron quistes de la especie *Artemia franciscana* correspondiente a la cepa del lote # 09G498 de la Argent Chemical Laboratories (E.U.A.) tipo Silver del Gran Lago Salado.

La descapsulación de los quistes se realizó con el método de hipoclorito comercial mediante la técnica propuesta por la San Francisco Bay Brand (Anónimo, 1988). Los quistes descapsulados se incubaron en agua de mar a 20°C durante 36 horas. Después que eclosionaron se recolectaron los nauplius con el fin de que la cohorte utilizada incluyera organismos de la misma edad; posteriormente se desinfectaron con una solución de 5 gotas de merthiolate por cada 100 ml de agua de mar (Correa y Bückle, 1993).

Los nauplius se trasladaron a un acuario de 50 l y se mantuvieron bajo condiciones ambientales de laboratorio (20 ± 1°C, iluminación contnua 24:0, pH 8, salinidad de 34 g/l, oxigenación contnua (aproximadamente 7 ppm de O<sub>2</sub>). Se alimentaron con microalgas vivas de la especie *Chaetoceros* sp. que fué suministrada de acuerdo a lo propuesto por Correa y Bückle, 1993. Todos los días se remplazó el 80% del alimento hasta completar la concentración inicial. La limpieza del sistema se hizo cada dos días utilizando un tamíz con luz de malla de 105µm con el fin de retener a los nauplius y permitir la salida de las heces. La densidad de los organismos se calculó después de homogenizar el medio con una muestra aleatoria de 1 ml. Se hicieron 30 recuentos con el fin de conocer la media de los organismos contenidos en un litro de agua de mar, posteriormente, se trasladaron de nuevo al acuario de 50 l.

De ésta manera se mantuvieron a los organismos hasta la etapa de adulto donde se comenzó a observar la formación de las primeras parejas aproximadamente 18 días a partir de la eclosión.

Se distribuyeron 50 parejas por acuario en 6 acuarios experimentales de 11x9x9 cm (Fig. I).

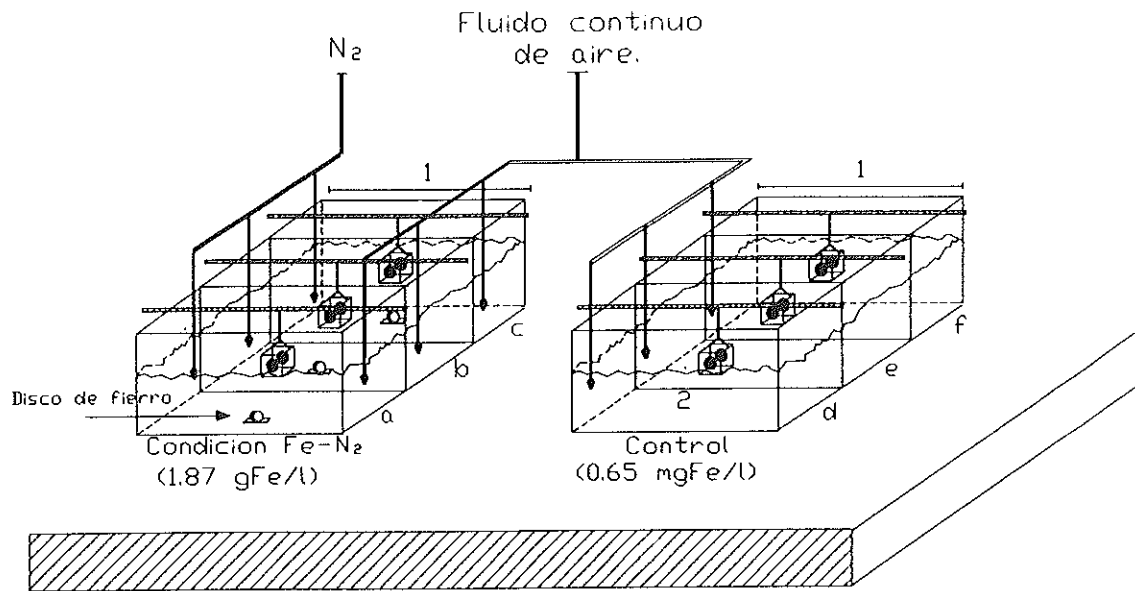


Figura 1. DISEÑO EXPERIMENTAL. 1.- Bloque experimental de 50 l; 2.- Unidad experimental o subdivisiones; acuarios de 11x9x9 cm (a, b, c, d, e, f).

Debido al estrés causado a los organismos al momento de ser escogidos por pareja y ser trasladados a cada acuario, se esperó un día más antes de comenzar el experimento con el fin de que éstos volvieran a formar nuevas parejas, si no todas, la mayoría. Se decidió tomar 50 parejas (100 organismos por acuario) ya que varios autores mencionan diversas densidades que oscilan entre 10 org/ml (Lavens y Sorgeloos, 1984), 7 org/ml (Caro, 1991), 1 org/ml (Versichele y Sorgeloos, 1980) y 1 org/5ml (Berthélémy y Hedgecock, 1987).

### **III. 1. 1 ALIMENTO**

#### **III. 1. 1. 1 CONDICIONES PREVIAS**

Ya que *Artemia* sp. es un organismo filtrador y su máximo crecimiento y conversión de alimento más eficiente está en relación a densidades constantes de alimento, se optó por utilizar la microalga *Chaetoceros* sp. por el conocimiento que se tiene de ella.

Esta microalga fué aislada de la Bahía de Todos Santos, Baja California., por Trujillo-Valle en 1988 (Cepa CH-X-I del C.I.C.E.S.E) (Voltolina *et al.*, 1991). Los criterios de elección se basaron en su alta tasa reproductiva, se adapta a medios simplificados, puede mantenerse en cultivos masivos y su costo de producción es bajo (Olivares, 1991).

La microalga se cultivó en el medio "f" de Guillard y Ryther (1962) con 2f de silicatos (Olivares, 1991) a nivel carboy (14 l) en un sistema semicontínuo y una razón de dilución del 50% que mantuvo el crecimiento de la microalga constante durante el experimento. Los cultivos fueron mantenidos con iluminación contínua proveída por cuatro lámparas fluorescentes de "luz blanca" de 40 watts. El pH se reguló adicionando CO<sub>2</sub> y la dilución se hizo diariamente a la misma hora para mantener el número de células constante. La concentración de alimento se averiguó mediante recuentos diarios con un hematocitómetro tipo Neubauer de dos cámaras, de 0.1 mm de profundidad.

Las microalgas cosechadas se suministraron a los organismos ubicados en los acuarios experimentales, la cantidad de microalgas por acuario se determinó en base a lo propuesto por Correa y Bückle, 1993.

### III. 1. 2 CONDICIONES EXPERIMENTALES

El mecanismo utilizado para incorporar fierro puro al biosistema fué el adicionar el metal en forma directa a cada acuario, es decir, en estado sólido y en forma de disco con el fin de que el fierro tuviese una mayor superficie de oxidación con respecto al agua y la aireación. Las dimensiones de cada disco de fierro fueron de aproximadamente 12-12.8 mm de diámetro y de 1.8-2.3 mm de alto.

La concentración óptima de fierro (en éste caso gramos de fierro puro por acuario experimental) se determinó de acuerdo a resultados preliminares (porcentajes de quistes y nauplius) obtenidos en los cultivos de prueba donde se trabajó con seis concentraciones de fierro en forma pura (0.93, 1.87, 3.75, 7.5, 15 y 30 g) (Tabla X). Las concentraciones mayores de fierro (7.5, 15 y 30 g) se utilizaron en base a la revisión de trabajos previos de Berthélémy y Hedgcock (1987), Versichele y Sorgeloos (1980) y Caro (1991).

Los autores mencionados adicionaron el fierro en forma quelada (Fe-EDTA) y concentraciones en mg/l, en éste caso, el fierro se adicionó en forma pura como antes se menciona y representada en gramos.

En lo que se refiere a las concentraciones menores (0.93, 1.87 y 3.75 g) se determinaron a partir de la concentración de 7.5 g es decir, ésta cantidad se dividió entre dos y se obtuvo 3.75 g y así sucesivamente; ésto con el fin de establecer concentraciones medias y bajas.

En los experimentos preliminares se observó que la concentración de 15g de hierro puro era la cantidad con la cual se obtenía un mayor porcentaje de quistes pero debido a la alta tasa de mortalidad para ésta concentración (Tabla XV) se decidió trabajar con la concentración de 1.87 gFe con tan solo el 19% de mortalidad. Las altas tasas de mortalidad se pudieron haber debido a que altas concentraciones de hierro en el medio eran tóxicas para los organismos.

En los experimentos preliminares se trabajó también con dos períodos de hipoxia. En el primero de ellos se inyectó nitrógeno en ciclos contínuos de siete minutos cada ocho horas a una presión de 0.283 m<sup>3</sup>/h y en el segundo los períodos de inyección fueron de una hora de nitrógeno por cada 12 horas de aireación a una presión de 0.0849 m<sup>3</sup>/h. El período de inyección de nitrógeno donde se obtuvo el mayor porcentaje de quistes fué en el ciclo de ocho horas.

Se trabajó con la inyección de nitrógeno hasta disminuír la concentración de oxígeno disuelto en el medio a 2 ppm porque Sorgeloos *et al.*, (1975) encontró que la hipoxia se produce en hembras adaptadas a concentraciones de 2 mg/l. También Castro y Gallardo (1985) mencionan que las artemias tienen un rango amplio de supervivencia que se extiende de la saturación hasta 1 y 2 ppm que es la mínima concentración en la que puede vivir. Lavens y Sorgeloos (1984) mencionan que inyecciones de cuatro minutos de N<sub>2</sub> cada tres horas son suficientes para inducir a la oviparidad.

Los experimentos preliminares tuvieron una duración de tres semanas y cada dos días se llevaron a cabo recolectas de quistes y nauplius.

En el experimento final se trabajó simultáneamente con la inyección de N<sub>2</sub> mas el fierro puro en forma permanente (efecto sinérgico), el N<sub>2</sub> se adicionó en forma de burbujeo

al sistema y se hicieron cuatro mediciones durante la fase experimental tanto del tiempo de disminución como del tiempo de recuperación del O<sub>2</sub> en los acuarios respectivos con un oxímetro marca Ysi modelo 57.

Durante los experimentos preliminares y finales se mantuvo un sistema control (0.65 mgFe/acuario) para tener puntos de comparación entre organismos sometidos al estrés y organismos que se desarrollaron y reprodujeron bajo condiciones normales.

Igualmente para cada caso se llevaron a cabo tres repeticiones de cada condición experimental para realizar posteriormente análisis estadísticos y tener una mayor cantidad de datos comparables.

### **III. 1. 3 PARAMETROS FISICO-QUIMICOS**

El agua de mar provino de un sistema recirculado que se esterilizó en un sistema de luz ultravioleta (U.V.) y posteriormente se trató con cloro y tiosulfato de sodio según técnica descrita por Hemerick (1973) ésto se hizo para mantener a las microalgas en un sistema de monocultivo lo más puro posible y evitar la presencia de organismos patógenos.

Se mantuvieron estables la salinidad 32-35 g/l, el pH de 8.0-8.5, la temperatura de  $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ . El aire utilizado para el sistema control y aireación cíclica fierro-nitrógeno se filtró previamente en un filtro de carbón activado, la iluminación fué continua (24:0) con lámparas fluorescentes "luz blanca".

### III. 1. 4 DISEÑO DEL SISTEMA EXPERIMENTAL

Se trabajó con un diseño de 2x1 con una concentración de fierro puro de 1.87 g y un período de inyección de nitrógeno de siete minutos de nitrógeno por cada ocho horas de aireación a una presión de 0.283 m<sup>3</sup>/h establecidos en los experimentos preliminares. Se mantuvo un sistema control que contenía 0.65 mgFe/l.

Se incluyeron tres repeticiones para la condición fierro-nitrógeno y para el control.

Los bloques de experimentación de 50 l se subdividieron con paredes de acrílico en tres unidades, en cada unidad experimental se colocó un acuario de acrílico de 11x9x9 cm con malla de plancton de 105µm de tal forma que los animales pudieran ingerir el alimento circundante (microalgas) al igual que el fierro oxidado (moho) suspendido por la aireación. De ésta forma tanto quistes como nauplius quedan atrapados dentro de cada acuario, únicamente las heces caen al fondo del acuario. Los acuarios fueron detenidos por varillas individuales que atravesaban de lado a lado el bloque experimental (Fig. I).

En cada acuario se colocó un número inicial de organismos (50 parejas). El experimento tuvo una duración de tres semanas y media, se planeó originalmente cuatro semanas pero debido al incremento en la mortalidad se consideró que el tiempo de experimentación era el suficiente.

Para poder conocer el destino del fierro se llevaron a cabo observaciones directas relacionadas con la coloración de los organismos, se sugiere un código de color con respecto a la concentración de hemoglobina en las artemias (Tabla XIX).

La cantidad de fierro en el medio se midió de la siguiente manera; se pesaron los discos de fierro al iniciar y al finalizar el experimento (Tabla V); cada dos días al limpiar

el sistema se extraían los discos de hierro y se limpiaban de todo el moho formado alrededor de ellos y se colocaban de nuevo en el medio, la oxidación se reiniciaba de inmediato pasando el  $Fe^{+2}$  a  $Fe^{+3}$ .

### **III. 1. 5 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS**

#### **III. 1. 5. 1 PARAMETROS FISICO-QUIMICOS**

Las variables ambientales que se mantuvieron constantes durante la fase experimental se midieron a diario. La cantidad de oxígeno disuelto y la temperatura se leyeron con un oxímetro marca Ysi modelo 57. El pH se midió con un potenciómetro marca Orion modelo SA 230 y con un refractómetro se detectaron los cambios de salinidad. La concentración de alimento se determinó con un hematocitómetro tipo Neubauer de dos cámaras, de 0.1 mm de profundidad.

#### **III. 1. 5. 2 RECOLECTA DE QUISTES Y NAUPLIUS**

Cuando en cada acuario se formaron las parejas se comenzó a inyectar periódicamente el nitrógeno y se colocaron los discos de hierro en el fondo de cada unidad experimental (Fig. 1) de manera permanente. Siempre se mantuvo un sistema control. La recolecta de quistes y nauplius se hizo en cada acuario a partir del sexto día de formadas las parejas, para éste efecto se vertió todo el contenido de un acuario dentro de un tamíz de luz de malla de  $588\mu m$  de tal manera que los organismos adultos quedaran dentro del tamíz y tanto quistes como nauplius cayeran a otro tamíz de  $105\mu m$ , de éste tamíz la muestra se fijó en un vial con una solución de formaldehído al 4% (neutralizado con bórax).

El recuento de los quistes y de los nauplius se efectuó cada dos días, procedimiento que se realizó durante el tiempo de duración del experimento que sumaron un total de nueve recolectas.

La cantidad de quistes y de nauplius recolectados se contaron por observación directa de la muestra fijada en una celda con canales especialmente diseñada para éste fin bajo un microscopio estereoscópico marca Olympus con un aumento de 2.5x.

Al finalizar el experimento en la décima recolecta se fijaron todos los animales con una solución fijadora compuesta de 25 ml de formol con el pH ajustado a 8 con glicerofosfato de sodio, 5 ml de propilfenoxitol, 50 ml de propilenglicol, todo aforado a 500 ml con agua destilada (Correa y Bückle, 1993), se calculó tasa de supervivencia y se midieron 30 organismos por repetición (15 hembras y 15 machos) con el fin de determinar si existieron diferencias en cuanto a longitud entre los organismos del sistema control y de la condición fierro-nitrógeno.

La tasa de supervivencia se pudo conocer por la extracción y el recuento de organismos muertos en tres ocasiones (al 13 día de iniciado el experimento, al 18 día y al finalizar el experimento). Aunque en el experimento se observó que algunos animales habían muerto, se decidió no completar con organismos sanos (las 50 parejas iniciales) ya que éstos alterarían los resultados por no haber sido sometidos al estrés de oxígeno y a la adición de fierro puro. Tampoco se completaron los organismos que murieron en el control.

### **III. 1. 5. 3 TRATAMIENTO ESTADISTICO**

A los datos obtenidos se les aplicaron análisis estadísticos. Primeramente se verificó la normalidad de las muestras para las longitudes de los machos y de las hembras e

igualmente para las producciones de quistes y nauplius. La prueba de Kolmogorov-Smirnov fué la adecuada por tratarse de datos contínuos. Se aplicó de igual manera la prueba de Bartlett con el fin de comparar la homogeneidad de varianzas (Zar, 1984; Campbell, 1989).

La condición de independencia entre los acuarios (repeticiones del control y de nitrógeno-ferro ) se comprobó utilizando un análisis de varianza (ANDEVA) (Sokal y Rohlf, 1979). Se llevó a cabo un ANDEVA para las longitudes de los organismos adultos para saber si existían diferencias significativas entre el control y la condición Fe-N<sub>2</sub>.

El límite de aceptación o rechazo para los análisis de varianza es de:  $\alpha = 0.05$ .

Para verificar la igualdad de las variables físico-químicas (condiciones ambientales) se obtuvieron los estadígrafos más importantes: media, desviación estándar y error estándar.

## IV RESULTADOS

### IV. 1 VARIABLES FISICO-QUIMICAS

Las condiciones ambientales de experimentación se conservaron homogéneas en el transcurso del experimento (Tabla I).

**Tabla I.** Variación de la temperatura (°C), oxígeno, salinidad y pH en el sistema control y en la condición Fe-N<sub>2</sub>. Se reportan la media y el error estándar.

VARIABLE	Fe-N <sub>2</sub>	Control
pH	8.31±0.05	8.43±0.05
Temperatura	19.41±0.31	19.41±0.31
Oxígeno	7.4±0.01	7.5±0.01
Salinidad	33.8±0.3	33.8±0.3

La cantidad de oxígeno disponible para los organismos se mantuvo constante a excepción de los períodos de inyección de nitrógeno. A continuación se presenta una tabla donde se observa la variación del oxígeno (ppm) durante los períodos de inyección del N<sub>2</sub>.

La cantidad de oxígeno disponible nunca descendió de los valores promedio en los que *Artemia* sp. puede sobrevivir (1 y 2 ppm).

**Tabla II.** Variación del oxígeno (ppm) durante los períodos de inyección del N<sub>2</sub> (tiempos de disminución y tiempos de recuperación).

	ppm de O <sub>2</sub>		
	Acuario 1	Acuario 2	Acuario 3
Tiempo de disminución: 7 min	7.0 a 1.7	7.0 a 2.1	7.0 a 2.1
Tiempo de recuperación: 42 min	1.7 a 6.9	2.1 a 7.0	2.1 a 7.0
Tiempo de disminución: 6 min	6.9 a 1.8	6.9 a 1.9	6.9 a 2.1
Tiempo de recuperación: 43 min	1.8 a 6.8	1.9 a 6.6	2.1 a 6.8
Tiempo de disminución: 7 min	6.8 a 1.9	6.8 a 2.0	6.8 a 1.8
Tiempo de recuperación: 41 min	1.9 a 6.8	2.0 a 6.7	1.8 a 6.8
Tiempo de disminución: 6 min	6.6 a 1.8	6.6 a 2.4	6.6 a 2.0
Tiempo de recuperación: 41 min	1.8 a 6.6	2.4 a 6.5	2.0 a 6.6

Se reportan la media y el error estándar para cada caso:

Tiempo de disminución (en minutos)  $6.5 \pm 0.4$

Tiempo de recuperación (en minutos)  $41.7 \pm 0.9$

## IV. 2 ALIMENTO

### IV. 2. 1 DENSIDAD CELULAR

Durante el transcurso del experimento se conservó la densidad celular en todos los cultivos, no hubo variación de ningún tipo en cuanto al sistema control o la condición Fe-N<sub>2</sub>, para ambos casos el tipo de alimento fué el mismo al igual que la concentración por acuario. La cantidad de alimento proporcionado por organismo se basó en la Tabla III la cual señala el número óptimo de células que un animal debe ingerir con respecto a su edad.

**Tabla III.** Raciones de la microalga *Chaetoceros* sp. administradas a las cepas de *Artemia franciscana* según su edad (Correa y Bückle, 1993).

Edad de la <i>Artemia</i> (días)	Ración diaria (10 <sup>3</sup> xorg.)
1	150
2-4	300
5,6	450
7	600
8	750
9	1120
10,11	1140
12,13	1800
14,15	2160
16,17	2520
Días subsecuentes	2750

La Tabla IV muestra los valores promedio por cultivo en relación a la densidad celular de la microalga *Chaetoceros* sp. determinada por el recuento hecho con un hematocitómetro.

**Tabla IV.** Variación de la densidad ( $10^6$  cel/ml) de *Chaetoceros* sp. durante la fase experimental.

	Densidad celular ( $10^6$ cel/ml)
Carboy A	2952±112.832
Carboy B	2802±113.848

Se reportan la media y el error estándar.

#### IV. 3 RELACION DEL FIERRO PURO EN EL MEDIO

El hierro en presencia de agua y oxígeno forma un moho el cual es resultado de la oxidación del  $Fe^{+2}$  a  $Fe^{+3}$ , ésta continúa exposición del metal a la oxidación implica pérdida de hierro que se encuentra en suspensión en el medio. Entre mayor sea la superficie de contacto de los discos de hierro mayor será la oxidación.

**Tabla V.** Relación en peso (gramos) del hierro puro al inicio del experimento y su superficie de contacto, diámetro del disco y alto por repetición.

	Diámetro	Altura	Peso Inicial	Peso Final	Diferencia	Superficie de contacto
	(mm)	(mm)	(gramos)	(gramos)	(gramos)	mm <sup>2</sup>
Acuario a	12.45	2.0	1.873	1.848	0.025	321.7
Acuario b	12.45	1.9	1.873	1.851	0.022	317.7
Acuario c	12.40	2.0	1.873	1.858	0.015	319.4

#### IV. 4 POBLACION DE *Artemia franciscana*.

##### IV. 4. 1 PROPORCION DE SEXOS.

La razón entre machos y hembras fué de 1:1 para cada acuario experimental.

##### IV. 4. 2 DIFERENCIAS DE LONGITUD EN ADULTOS PARA CADA TRATAMIENTO

Se midieron 15 hembras y 15 machos de cada acuario experimental y se hizo un ANDEVA para ver si existían diferencias significativas en las hembras y los machos del control y de la condición Fe-N<sub>2</sub>. Con el ANDEVA no se encontraron diferencias significativas y el análisis de rango múltiple señala que los grupos son homogéneos (Tablas VIII y IX).

Tabla VI. Análisis de varianza para la longitud en hembras del Control y de la condición Fe-N<sub>2</sub>.

Fuente de variación	g.l.	C.M.	F	F crft.	Nivel sig.
Entre grupos	1	0.2741	0.408	3.955	0.5315
Dentro de grupos	88	0.6721			

**Tabla VII.** Análisis de varianza para la longitud de los machos del Control y de la condición Fe-N<sub>2</sub>.

Fuente de variación	g.l.	C.M.	F	F crít.	Nivel sig.
Entre grupos	1	0.71004	0.931	3.955	0.3474
Dentro de grupos	88	0.76231			

**Tabla VIII.** Análisis de rango múltiple para la longitud de las hembras del control y de la condición Fe-N<sub>2</sub>.

	N	Media±E.E.	Grupos homogéneos
Hembras en Fe-N <sub>2</sub>	45	9.9±0.1	*
Hembras en Control	45	9.8±0.1	*

**Tabla IX.** Análisis de rango múltiple para la longitud de los machos del control y de la condición Fe-N<sub>2</sub>.

	N	Media±E.E.	Grupos homogéneos
Machos en Fe-N <sub>2</sub>	45	7.5±0.1	*
Machos en Control	45	7.3±0.1	*

#### IV. 4. 3. PRODUCCION DE QUISTES Y NAUPLIUS EN LOS EXPERIMENTOS PRELIMINARES

En la Tabla X se muestra la producción total tanto de quistes como de nauplius producidos en el experimento preliminar, la mayor proporción en la producción de quistes se obtuvo en la concentración de 15 gFe (19.7%) y seguido de éste con el período de inyección de nitrógeno (16.9%). En lo que se refiere a la producción de nauplius el número mayor de éstos se obtuvo en el control (98.2%).

**Tabla X.** Número total de quistes y nauplius producidos por *Artemia franciscana* después de cinco recolectas.

Condición	Número de quistes	Número de nauplius	Total (100%)
Nitrógeno 0.283 m <sup>3</sup> /h	56 (16.9%)	274 (83%)	330
Control	50 (1.7%)	2754 (98.2%)	2804
0.93 gFe	23 (12.5%)	161 (87.5%)	184
1.87 gFe	57 (4.3%)	1261 (95.6%)	1318
3.75 gFe	49 (15.3%)	271 (84.6%)	320
7.5 gFe	11 (4.1%)	255 (95.8%)	266
15 gFe	36 (19.7%)	146 (80.2%)	182
30 gFe	30 (6.6%)	421 (93.3%)	451

#### IV. 4. 4 ANALISIS ESTADISTICOS PARA QUISTES Y NAUPLIUS DE *Artemia franciscana* PRODUCIDOS EN LOS EXPERIMENTOS PRELIMINARES

En base a los resultados obtenidos en los experimentos preliminares se decidió hacer un análisis estadístico para ver si existían diferencias significativas entre cada condición experimental. Tanto el ANDEVA para quistes como para nauplius no determinan diferencias significativas; las tablas XI y XIII lo demuestran. En los análisis de rango múltiple (Tablas XII y XIV) los resultados obtenidos establecen homogeneidad entre los grupos.

**Tabla XI.** Análisis de varianza paramétrico para la producción total de quistes de *Artemia franciscana*.

Fuente de variación	g.l.	C.M.	F	Fcrít.	Nivel sign.
Entre grupos	7	356.03	0.508	2.33	0.8218
Dentro de grupos	32	701.37			

**Tabla XII** Análisis de rango múltiple para la producción de quistes en *Artemia franciscana* en los experimentos preliminares.

Condición	N	Media±E.E.	Grupos homogéneos
Nitrógeno 0.283 m <sup>3</sup> /h	5	23.06±12.8	*
Control	5	3.24±1.50	*
0.93 gFe	5	26.57±10.9	*
1.87 gFe	5	27.11±18.8	*
3.75 gFE	5	14.14±5.90	*
7.5 gFe	5	22.90±19.3	*
15 gFe	5	11.17±5.60	*
30 gFe	5	14.39±6.25	*

**Tabla XIII.** Análisis de varianza paramétrico para la producción total de nauplius de *Artemia franciscana*.

Fuente de variación	g.l.	C.M.	F	F <sub>crít</sub>	Nivel sign.
Entre grupos	7	1154.6	0.957	2.33	0.478
Dentro de grupos	32	1205.9			

Tabla XIV. Análisis de rango múltiple para la producción de nauplius de *Artemia franciscana*.

Condición	N	Media±E.E.	Grupos homogéneos
Nitrógeno 0.283 m <sup>3</sup> /h	5	76.93±12.8	*
Control	5	96.75±1.5	*
0.93 gFe	5	53.42±15.9	*
1.87 gFe	5	52.88±22	*
3.75 gFe	5	85.85±5.9	*
7.5 gFe	5	77.07±19.3	*
15 gFe	5	68.82±17.9	*
30 gFe	5	65.6±17.1	*

En la tabla XV se presenta la tasa de mortalidad de *Artemia franciscana* para los experimentos preliminares obteniéndose una mayor mortalidad en la condición de 15 gFe con un 71%.

**Tabla XV.** Tasa de mortalidad en los experimentos preliminares.

Condición	Número inicial de organismos	Número final de organismos	% de mortalidad
Nitrógeno 0.283 m <sup>3</sup> /h	100	78	22%
Control	100	53	47%
0.93 gFe	100	69	31%
1.87 gFe	100	81	19%
3.75 gFe	100	63	37%
7.5 gFe	100	41	59%
15 gFe	100	29	71%
30 gFe	100	34	66%

#### IV. 4. 5 PRODUCCION DE QUISTES Y NAUPLIUS EN EL EXPERIMENTO FINAL.

En los acuarios Fe-N<sub>2</sub> y en los del sistema control se observan disimilitudes en cuanto al número de quistes y nauplius.

En la figura 2 se observa una mayor producción de quistes en los acuarios que contienen nitrógeno-ferro en comparación con la producción en el sistema control. No se observa una producción continúa de quistes, existe fluctuación y no se define un patrón en el tiempo.

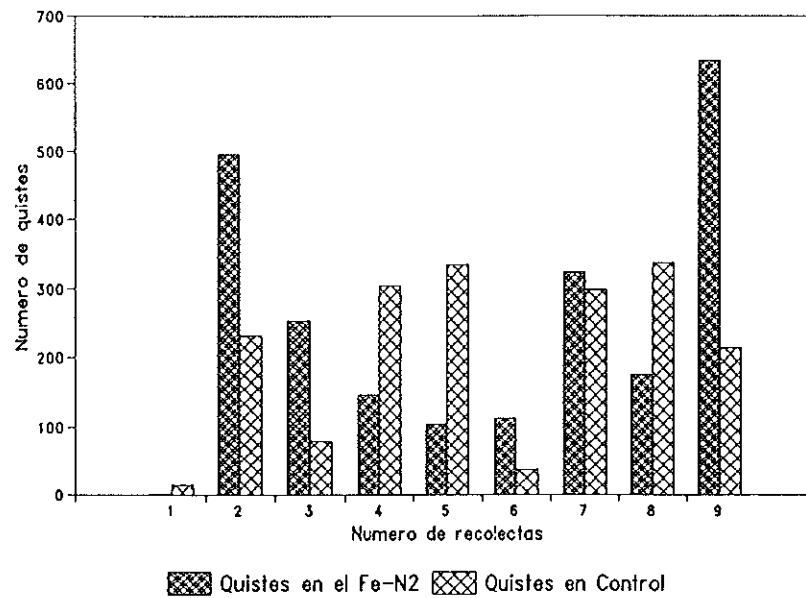


Figura 2. Número de quistes producidos por *Artemia franciscana* en nueve recolectas llevadas a cabo en el experimento.

La producción de nauplius (figura 3) tuvo un valor máximo en la quinta recolecta del sistema control, a partir de ésta, la tendencia es decreciente. En los acuarios fierro-nitrógeno se observa una tendencia al incremento en recolectas sucesivas hasta un máximo en la séptima recolecta.

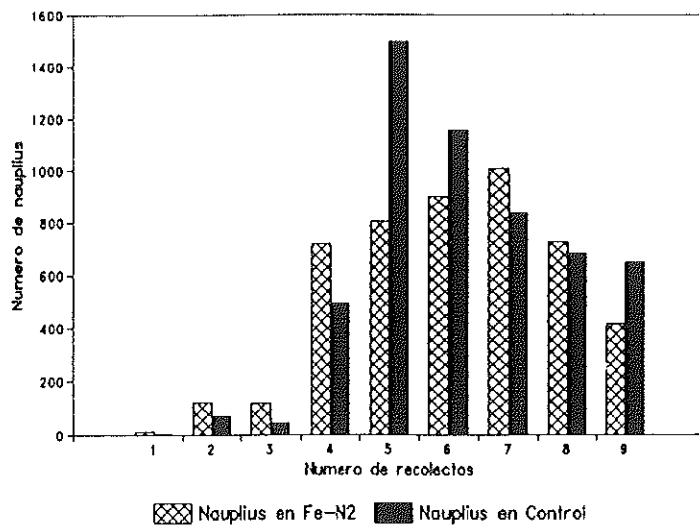


Figura 3. Número de nauplius producidos por *Artemia franciscana* en nueve recolectas durante el experimento.

En el promedio de quistes y nauplius producidos por *Artemia franciscana* en períodos semanales se observa que hay una mayor producción de quistes en la condición Fe-N<sub>2</sub> donde se destaca un incremento en el número de quistes en la tercera semana de recolecta (50.6%) (Tabla XVI). La producción de nauplius en el sistema control es mayor en la segunda semana de recolecta (Tabla XVII).

Tabla XVI. Promedio del número de quistes producidos por *Artemia franciscana* en intervalos semanales (1, 2 y 3).

Semanas	1	2	3	Total (100%)
Fe-N <sub>2</sub>	83 (33.3%)	40 (16.0%)	126 (50.6%)	249
Control	36 (17.5%)	75 (36.5%)	94 (45.8%)	205

**Tabla XVII.** Promedio del número de nauplius producidos por *Artemia franciscana* en intervalos semanales (1, 2 y 3).

Semanas	1	2	3	Total (100%)
Fe-N <sub>2</sub>	27 (5.0%)	269 (50.2%)	239 (44.6%)	535
Control	13 (2.1%)	349 (57.8%)	241 (40.0%)	603

En la Tabla XVIII se observan los porcentajes de quistes y nauplius obtenidos en los experimentos preliminares y final, el mayor porcentaje se obtuvo para la condición Fe-N<sub>2</sub> con un 31% lo cual demuestra que existe un efecto sinérgico en la producción de quistes.

**Tabla XVIII.** Comportamiento en la producción de quistes y nauplius para las condiciones individuales de los experimentos preliminares y el efecto sinérgico en el experimento final.

Condición	Quistes (%)	Nauplius (%)	Número Total (%)
N <sub>2</sub> 0.283 m <sup>3</sup> /h	56 (16.9%)	274 (83.0%)	330
Fe (1.87g)	57 (4.30%)	1261 (95.6%)	1318
N <sub>2</sub> + Fe (1.87g)	249 (31.0%)	535 (68.2%)	784
Control	205 (25.3%)	603 (74.6%)	808

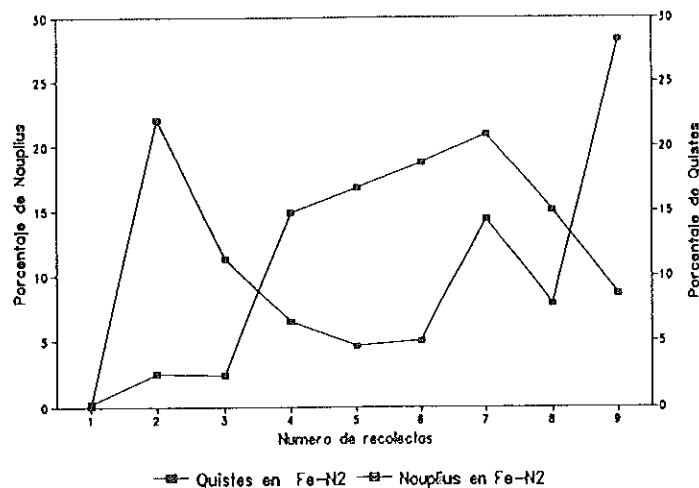


Figura 4. Nauplius y Quistes de *Artemia franciscana* producidos en la condición Fe-N<sub>2</sub>

El número de quistes y nauplius producidos en el control; figura 5 representa una producción cíclica de quistes mientras que la producción de nauplius tiene un máximo en la quinta recolecta que disminuye en relación al tiempo (número de recolectas).

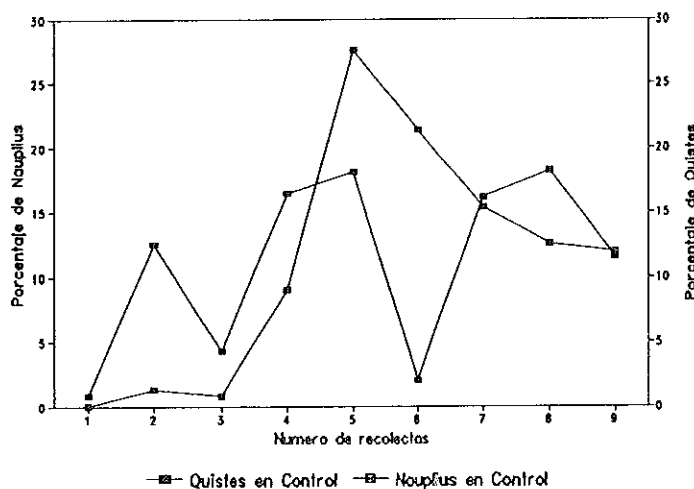


Figura 5. Nauplius y Quistes de *Artemia franciscana* producidos en el Control.

#### IV. 4. 6 ESTIMACION DE LA CONCENTRACION DE HEMOGLOBINA EN *Artemia franciscana*

Para determinar la concentración de fierro en los organismos nos basamos en la coloración propuesta por Chow (1968) tomado de: Versichele y Sorgeloos (1980) que sugiere un código para estimar la concentración de la hemoglobina en *Artemia* sp. (Tabla XIX).

Tabla XIX. Código de color de Chow (1968). Estimación de la concentración de hemoglobina en *Artemia* sp. (Tomado de: Versichele y Sorgeloos, 1980).

0:	Sin color
+	rosa claro
++:	rosa claro y manchas rojas
+++:	rojo
++++:	rojo oscuro

Los organismos en el sistema control tuvieron una coloración 0 (Sin color) a comparación de las artemias en la condición Fe-N<sub>2</sub> con una coloración +++ (rojo) a ++++ (rojo oscuro) en la medida que la oxidación del fierro se incrementaba y se reflejaba en la coloración de los organismos.

#### IV. 4. 7 TASA DE SOBREVIVENCIA Y MORTALIDAD

La tasa de mortalidad que ocurrió en cada acuario se determinó al finalizar el experimento. La mayor mortalidad se obtuvo en una repetición de cada condición experimental (acuاریo-a y acuاریo-e). En general, el porcentaje de mortalidad no sobrepasó el 40% del total de los organismos con que se inició el experimento.

**Tabla XX.** Porcentajes de mortalidad en la población de *Artemia franciscana* para cada condición experimental después de 24 días de experimentación.

Condición	Número inicial de organismos	Número final de organismos	% de mortandad
Fe-N <sub>2</sub> (Acuario a)	100	41	59%
Fe-N <sub>2</sub> (Acuario b)	100	74	26%
Fe-N <sub>2</sub> (Acuario c)	100	61	39%
Control (Acuario d)	100	67	33%
Control (Acuario e)	100	34	66%
Control (Acuario f)	100	65	35%

#### IV. 4. 8 ANALISIS ESTADISTICOS DE PRODUCCION DE QUISTES Y NAUPLIUS EN *Artemia franciscana*.

Se realizaron pruebas de normalidad de Kolmogorov-Smirnov por tratarse de datos contínuos. No se encontraron diferencias significativas para los quistes y los nauplius en el control y en la condición Fe-N<sub>2</sub>.

En base a los resultados obtenidos en los análisis de normalidad se procedió a realizar análisis de varianza paramétrico para los quistes y nauplius obtenidos en el sistema control como en la condición Fe-N<sub>2</sub> con sus respectivas repeticiones.

**Tabla XXI.** Análisis de varianza paramétrico para la producción total de quistes de *Artemia franciscana*.

Fuente de variación	g.l.	C.M.	F	F crít.	Nivel sign.
Entre grupos	1	124.88	0.125	4.03	0.7287
Dentro de grupos	52	997.77			

**Tabla XXII.** Análisis de rango múltiple para la producción total de quistes de *Artemia franciscana*.

Condición	N	Media±E.E.	Grupos homogéneos
Quistes en Fe-N <sub>2</sub>	27	35.82±6.1	*
Quistes en control	27	38.86±6.0	*

**Tabla XXIII.** Análisis de varianza paramétrico para la producción total de nauplius de *Artemia franciscana*.

Fuente de variación	g.l.	C.M.	F	Fcrft	Nivel sign.
Entre grupos	1	124.88	0.116	4.03	0.7389
Dentro de grupos	52	1080.86			

**Tabla XXIV.** Análisis de rango múltiple para la producción total de nauplius de *Artemia franciscana*.

Condición	N	Media±E.E.	Grupos homogéneos
Nauplius en Fe-N <sub>2</sub>	27	60.47±6.3	*
Nauplius en control	27	57.42±6.2	*

El análisis de varianza aplicado permitió detectar que no hubo diferencias significativas entre el sistema control y la condición Fe-N<sub>2</sub> en cuanto a la producción de quistes y nauplius.

## V DISCUSION

Los factores ambientales fluctuaron en forma muy pareja de tal manera que su grado de influencia en los resultados se considera mínima. En la Tabla I se presenta la variación de la temperatura, la salinidad, el pH y el oxígeno durante la fase experimental para el control y la condición Fe-N<sub>2</sub>. El reducido error estándar señala que las condiciones se mantuvieron homogéneas.

La concentración de oxígeno fluctuó en forma cíclica porque los períodos de inyección de nitrógeno se mantuvieron fijos durante el experimento, la Tabla II demuestra que en los tiempos de disminución y recuperación del oxígeno no hubieron fluctuaciones. Partiendo de una concentración de 7 ppm a 2 ppm de oxígeno el tiempo de disminución fué de siete minutos aproximadamente. Con éste método los organismos fueron sometidos a un estrés drástico de oxígeno en un período corto de tiempo. Se observó que durante los períodos de inyección los organismos comenzaban a nadar en forma más rápida que lo normal, su tendencia de nadar hacia la superficie denotaba que la concentración de oxígeno en el medio disminuía. Cuando el agua del subsistema recuperaba la concentración de oxígeno inicial los organismos volvían a su estado normal. Dutrieu (1960) menciona que la hipoxia induce a la síntesis de la hemoglobina y a la excreción de la hematina por la glándula de la cáscara y la consecuente producción de quistes. Sorgeloos *et al.*, 1975 encuentra que el efecto de la hipoxia se produce en hembras adaptadas a una concentración de 2 mg/l de O<sub>2</sub>. Versichele y Sorgeloos (1980) mencionan un incremento en el porcentaje de oviparidad cuando las artemias son sometidas a una aireación discontinua (71% de oviparidad vs. 39% de oviparidad con aireación continua). Lavens y Sorgeloos (1984) lograron su máxima inducción a la oviparidad con la inyección de N<sub>2</sub> en períodos de cuatro

minutos cada tres horas. En los experimentos preliminares se obtuvo un mayor número de quistes cuando las artemias eran sometidas a una inyección de  $N_2$  comparativamente al control (Tabla X). Sin embargo, estadísticamente no se encontraron diferencias significativas en cuanto al número de quistes o nauplius producidos en el control y en el que se inyectó nitrógeno.

La densidad de alimento suministrada fué suficiente durante toda la fase experimental; aspecto que se comprobó mediante los recuentos diarios que demostraron cantidades superiores a los  $2 \times 10^6$  cél/ml. La concentración del alimento fué estable y no hubo limitación en la densidad disponible de las microalgas, por lo cual se sustrae a los resultados de ésta investigación cualquier efecto directo o indirecto sobre la reproducción de artemia.

La posible interacción de los factores que promueven la producción de quistes se destaca cuando se mantiene un estrés de oxígeno y se suministra fierro quelado. La presencia de fierro quelado parece que facilita la síntesis de hemoglobina y los animales tienen una concentración más alta de hemoglobina en comparación con el control; ésto trae como consecuencia el cambio de reproducción de ovovivípara a ovípara.

Los organismos emplean preferentemente el  $Fe^{+2}$  para la formación de la hemoglobina; sin embargo, en las condiciones químicas del medio en que estuvo el metal en éste experimento existe una probabilidad muy alta de que el estado de oxidación ( $Fe^{+2}$ ) fuese el menos abundante y que el equilibrio químico fuera favorable a la presencia del estado de oxidación  $Fe^{+3}$  (Caro, 1991). El fierro en presencia del agua y oxígeno forma un moho el cual es un hidrato de óxido de  $Fe^{+3}$ ; durante el desarrollo experimental se observó la formación de éste moho al poco tiempo de poner el disco de fierro en contacto con el agua.

Es posible que la disponibilidad de éste hierro en el medio haya estado limitado para las artemias debido a la amplia gama de tamaño que tienen los complejos floculados que pudieran haber sido más grandes que el umbral de ingestión de los animales. Las artemias adultas filtran partículas con tamaños que oscilan entre 30-40  $\mu m$  como máximo (Dobbeleir, *et al.*, 1980).

En base a los resultados de los experimentos preliminares es posible afirmar que las artemias producen quistes cuando se adiciona hierro puro al medio y cuando se someten a períodos de hipoxia de manera individual, la Tabla X muestra los porcentos de quistes y nauplius obtenidos con las diferentes concentraciones de hierro puro y período de inyección de  $N_2$  después de cinco recolectas. Se obtuvo la mayor producción de quistes para la concentración de 15g de hierro pero debido a la alta tasa de mortalidad (71%) se optó por trabajar en el experimento final con la concentración de 1.87gFe ya que en éste caso sólo el 19% de organismos murieron a lo largo del experimento (Tabla XV). Sin embargo, a pesar de los porcentajes obtenidos, los análisis estadísticos arrojan resultados contrarios, es decir, no existieron diferencias significativas en cuanto a la producción de quistes y nauplius entre las diferentes concentraciones de hierro puro, período de inyección de  $N_2$  y el control.

En el experimento final se trabajó con la concentración de hierro puro de 1.87 gFe/l conjuntamente con el período de inyección de  $N_2$  de siete minutos cada ocho horas. Después de nueve recolectas se observó una mayor producción de quistes en la condición Fe- $N_2$  comparativamente a los producidos en el control (Fig. 2). La quinta y novena recolecta son las más abundantes en quistes y las recolectas intermedias tienen valores bajos.

En lo que se refiere a la producción de nauplius en la condición Fe-N<sub>2</sub> y el control (Fig. 3) se observó un número mayor de nauplius en el control que implica una disminución gradual del número de nauplius al igual que los producidos en la condición Fe-N<sub>2</sub>.

Un análisis visual del comportamiento en el tiempo arroja resultados que señalan un cambio drástico en el tipo de reproducción de las hembras de artemia (Fig. 4), se observa en la novena recolecta que el porcentaje de quistes tiende a aumentar contrariamente a los nauplius que disminuyen. Al parecer existe un cambio en el tipo de reproducción de los organismos que se encontraban bajo ésta condición pero debido a la alta tasa de mortalidad no se pudo definir éste comportamiento con respecto al tiempo.

En la figura 5 se observa un comportamiento cíclico de producción de quistes en el control, en la quinta recolecta hay un máximo de nauplius que disminuyen en el tiempo. Es difícil el definir el patrón que deben tener las hembras y machos en la producción de nauplius y quistes en condiciones normales de laboratorio (control) ya que en literatura no se encontró información referente a producción de descendientes.

En base a los resultados porcentuales de el experimento final (Tabla XVIII) existe un efecto sinérgico del fierro y el nitrógeno en la producción de quistes, 31% para la condición Fe-N<sub>2</sub> contra 25.3% para el control, comparativamente en los experimentos individuales (preliminares) se obtuvo un 16.9% en el nitrógeno y 4.3% en el fierro (1.87gFe). El efecto que en conjunto, producen sobre las artemias el Fe-N<sub>2</sub> es más evidente ya que individualmente tanto el fierro como el nitrógeno no provocan cambios si se contrastan con el control.

Para la producción de quistes y nauplius en la condición Fe-N<sub>2</sub> y el control, en los análisis estadísticos (Tablas XXI y XXIII) no se encontraron diferencias significativas. Los análisis de rango múltiple para la producción de quistes y nauplius estiman que son grupos homogéneos.

En términos estadísticos no hubo diferencias significativas como para decir que la hipoxia y la adición de hierro en el medio influyeron en cuanto a la producción de quistes y nauplius.

A diferencia de los reportes de los estudios sobre la acción favorable de un exceso de hierro y un estrés de oxígeno en el aumento de la oviparidad de *Artemia* sp. (Sorgeloos *et al.*, 1975; Caro, 1991; Lavens y Sorgeloos, 1984; Versichele y Sorgeloos, 1980) en ésta investigación no se encontró una relación estadística clara entre el metal adicionado al medio más un estrés de oxígeno y el aumento en la producción de quistes.

Caro (1991) menciona que el promedio total en las tasas de quistes/hembras y nauplius/hembras proporcionaron valores menores a los encontrados para la misma especie en diversos estudios, no encontró una relación clara entre el metal adicionado y el aumento en la producción de quistes. Obtuvo un promedio más alto de quistes semanales en el grupo control y menor en sus concentraciones de Fe-EDTA contrariamente a los esperado.

Berthélémy y Hedgecock (1987) mencionan que niveles bajos de oxígeno generan efectos poco notables que pueden deberse a que el tiempo de exposición al burbujeo de nitrógeno no fué el suficiente. Por otro lado mencionan que con la adición de 30 mg de Fe-EDTA obtienen un 74% de producción de quistes en comparación con el 48% en el control. Las mayores producciones de quistes se generan en experimentos donde los factores de fotoperiodo, altas concentraciones de salinidad y bajas temperaturas promueven

a la reproducción ovípara. Así, por ejemplo de un 70 a un 93% de producción de quistes con un fotoperiodo de 12 horas luz o menos; con temperaturas de 16°C obtienen un 87% contra un 48% en el control.

Versichele y Sorgeloos (1980) mencionan un incremento en el porcentaje de oviparidad cuando las artemias se someten a Fe-EDTA mas aireación discontínua, éstos autores encontraron un 96% en el experimento y un 74% en el control.

Durante el desarrollo del experimento se observaron las coloraciones de los organismos que de la condición estresante Fe-N<sub>2</sub> resultó rojo (+++) a rojo oscuro (++++) (Tabla XIX) conforme trascurría el tiempo de contacto. En la primera semana de estrés las artemias comenzaron a tornarse de rosa pálido a rojo y posteriormente a rojo oscuro, éste efecto se observó tanto para los machos como para las hembras, lo que parece apoyar un efecto positivo del "moho" en la coloración del corion de los quistes; los organismos en el control mantuvieron su coloración inicial (rosa claro) durante el desarrollo de la fase experimental.

Versichele y Sorgeloos (1980) mencionan la presencia de una correlación entre el color de los animales, el tipo de reproducción y la aireación interrumpida en *Artemia* sp. provocan una coloración roja probablemente relacionada con el incremento en la producción de hemoglobina.

La pérdida de peso de los discos de fierro puro de éste estudio fué mínima para el tiempo en que éstos se encontraron expuestos a la oxidación (Tabla V) la cantidad de fierro oxidado en suspensión disponible por acuario tal vez fué mínima como para haber afectado a los organismos y por consiguiente un cambio en el tipo de reproducción.

Los quistes producidos en la condición Fe-N<sub>2</sub> se encontraban al parecer en un estado de "no dormancia", es decir que eclosionan inmediatamente después de ser liberados por la hembra (Lavens y Sorgeloos, 1987). Si las glándulas de la cáscara están activas segregan una sustancia de una composición química relacionada con la hematina que recubre el huevo, formando el corión protector del huevo cístico. Si la secreción es copiosa, se forma el huevo cístico, que puede permanecer durante muchísimo tiempo en criptobiosis. Si la secreción es menos abundante el aspecto del quiste puede ser muy similar al anterior, pero de él eclosionan nauplius a las pocas horas o días después de haber sido emitidos por la hembra (Amat, 1985). Este fenómeno se observó a lo largo del experimento tanto en la condición Fe-N<sub>2</sub> (1.87 gFe/l), como en el control (0.65 mgFe/l) no se ha establecido con claridad el objetivo que tiene el estado de "no dormancia", sin embargo, éste fenómeno poco común puede deberse a que el mecanismo que induce a la diapausa no funciona adecuadamente, y el resultado es la producción directa de quistes (Lavens y Sorgeloos, 1987).

En lo que se refiere a la longitud de los organismos tanto en el control como en la condición Fe-N<sub>2</sub> no se encontraron diferencias significativas para las hembras y los machos. El tamaño habitual suele estar comprendido entre los 10 y 12 mm de longitud total (Amat, 1985). En las Tablas VI y VII se muestran los resultados de los análisis de varianza aplicados para cada sexo en cada condición, en ambos casos la F observada es menor que la F crítica, por consiguiente, no existen diferencias significativas. Las Tablas VIII y IX muestran el análisis de rango múltiple en el cual resultan grupos homogéneos para hembras y machos en el control y en la condición Fe-N<sub>2</sub> lo implica que los organismos no se vieron afectados por las condiciones estresantes en las cuales se desarrollaron.

El porcentaje de mortalidad se determinó con el recuento de los organismos vivos al finalizar el experimento (Tabla XX). Durante la primera semana del experimento la tasa de supervivencia se mantuvo constante, los machos comenzaron a debilitarse aproximadamente a la segunda semana y media y la tasa de mortalidad se incrementó drásticamente en aproximadamente siete días donde la mortalidad en machos sobrepasó el 40% en todos los acuarios y las hembras también comenzaron a morir. Por las características externas de los organismos enfermos se puede decir que la infección fue causada por una bacteria del género *Vibrio* (Caro, 1991). El mayor porcentaje de mortalidad se observó en la segunda repetición del grupo control (acuario-e) y en la primera repetición de Fe-N<sub>2</sub> (acuario-a) ambos sobrepasaron el 50%.

## VI CONCLUSIONES

1.- Al someter a las artemias a un estado de estrés inyectando nitrógeno y disolviendo fierro puro en el medio, se produjo un mayor porcentaje de quistes que en el control; 31% en la condición Fe-N<sub>2</sub> versus 25.3% en el control.

2.- En los análisis estadísticos no se encontraron diferencias significativas entre la producción de quistes y nauplius de *Artemia franciscana* en la condición Fe-N<sub>2</sub> versus control.

3.- La alta tasa de mortalidad de los machos (> del 50%) afectó en forma directa la reproducción de las artemias debido a la ausencia de pareja y por consiguiente el número de quistes y nauplius que se recolectaron.

4.- La coloración de los organismos en los acuarios que contenían fierro puro y nitrógeno es indicador de que la concentración de hemoglobina era mayor que en los organismos del control.

5.- Los quistes producidos en estado de "no dormancia" pueden ser el reflejo de un cambio de reproducción de las hembras de artemia.

## LITERATURA CITADA

- Abony, A. 1915. Experimentelle daten zum erkennen der *Artemia*-Gattung. Z. Wiss. Zool. 114:95-168.
- Amat, F. 1985. Biología de *Artemia*. Inf. Técn. Inst. Invs. Pesq. (126-127):3-43.
- Amat, F. 1985. Utilización de *Artemia* en acuicultura. Inf. Técn. Inst. Inv. Pesq. (128-129):3-43.
- Anónimo. 1988. Tips on cyst decapsulation. San Francisco Bay Brand, Inc. 2 p.
- Aviña, C., López, D. y Pereda, P., 1987. Análisis del crecimiento y sobrevivencia de *Artemia* alimentada con diferentes concentraciones de *Porphyra perforata* en laboratorio, Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias Marinas, U. A. B. C., Ensenada, B. C., 32 p.
- Baltierra, R., Calderón, R y Sánchez, J.L., 1987. Evaluación del crecimiento y sobrevivencia de *Artemia* sp. utilizando *Porphyra perforata* (Rhodophyta) como alimento, Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias Marinas, U. A. B. C., Ensenada, B. C., 51 p.
- Baker, M. 1966. Autoecology of *Artemia*: factors influencing hemoglobin synthesis and cyst production. Thesis. San Francisco. State College. 117 p.
- Ballardin, E. y Metalli, P. 1963. Osservazioni sulla biologia di *Artemia salina*, Leach. Technique di cultura e fenomeni riproduttivi. Rc. Ist. Comb. Sci. Lett. B97:154-194.
- Barigozzi, C. 1939. La biologia di *Artemia salina*, Leach studiata in aquario (Morfologia e velocita di sviluppo). Atti Soc. Ital. Sci. Nat. 78(2):137-160.
- Berthélémy, N. y Hedgecock, D., 1987. Effect of enviromental factors on cysts formation in the Brine Shrimp *Artemia*. p. 167-182. In *Artemia Research and its Applications*. Vol. 3. Ecology, Culturing, Use in Aquaculture. P. Sorgeloos *et al.*, (eds). Universa Press, Wetteren, Belgium. 556 p.
- Campbell, R. 1989. Statistics for Biologists. Third Edition. Cambridge University Press, Great Britain. 445 p.

- Caro, C. 1991. El efecto del hierro en la oviparidad de una población de *Artemia franciscana*, Kellogg, 1906. Tesis de Maestría en Ciencias, C. I. C. E. S. E., Ensenada, B. C., 88 p.
- Castro, T. y Gallardo C., 1985. *Artemia* sp. en investigación y docencia, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, División Ciencias biológicas y de la salud, México, D. F.
- Correa, F. 1991. Caracterización biológica y bioquímica de algunas poblaciones de *Artemia Kellogg*, 1906. Tesis de doctorado. C. I. C. E. S. E. Ensenada, B. C. 154 p.
- Correa, F. y Bückle, L.F., 1993. Morfología y biometría de cinco poblaciones de *Artemia franciscana* (Anostraca:Artemiidae). Rev. Biol. Trop., 41(1):103-110.
- Cotton, F. y Wilkinson, G. 1981. Química Inorgánica Avanzada. Editorial Limusa, México, D.F. p. 829-895.
- Chow, V. 1968. Physiology of *Artemia*: effect of nutrition and oxygen tension on survival and haemoglobin production, Thesis. San Francisco. State College. 106 p.
- D'Agostino, A. y Provasoli, L. 1968. Effects of salinity and nutrients on mono- and diaxenic cultures of two strains of *Artemia salina*. Biol. Bull. 134(1):1-14.
- De La Lanza-Espino, G., Arredondo, F., 1990. La Acuicultura en México: De los Conceptos a la Producción. Instituto de Biología, U. N. A. M. México, D. F.
- Dobbeleir, J., Noel, A., Bossuyt, E., Bruggeman, E. y Sorgeloos, P. 1980. New Aspects of the use of inert diets for high density culturing of brine shrimp. p. 165-174. In: The Brine Shrimp *Artemia*. Vol. 3 Ecology, Culturing, in Aquaculture. G. Persoone *et al.*, (eds.). Universa Press, Wetteren, Belgium.
- Dutrieu, J. 1960. Observations biochimiques physiologiques sur le développement de *Artemia salina* Leach. Arch. Zool. Exp. Gen. 99: 1-134. In: The Brine Shrimp *Artemia*. Vol. 3 Ecology, Culturing, Use in Aquaculture. G. Persoone *et al.*, (eds.). Universa Press, Wetteren, Belgium.

- Gilchrist, B. 1954. Haemoglobin in *Artemia* Proc. Roy. Soc. Lond. Ser. B. 143:136-146.
- Gilchrist, B. y Green, J. 1960. The pigments of *Artemia* Proc. Roy. Soc. Lond. Ser. B.152:118-136.
- Hemerick, G. 1973. Mass culture, p. 253-273. In: Handbook of phycological methods (J.R. Stein, ed.). Cambridge University Press., London, 448 p.
- Lavens, P. y Sorgeloos, P. 1984. Controlled production of *Artemia* cysts under standard conditions in a recirculating culture system. Aquaculture Engineering. (3):221-235.
- Lavens, O. y Sorgeloos, P. 1987. The cryptobiotic state of *Artemia* cysts, its diapause deactivation and hatching: a review. p. 47-63. In: *Artemia* research and its applications. Vol. 3. Ecology, Culturing, Use in Aquaculture. P. Sorgeloos *et al.*, (eds). Universa Press, Wetteren, Belgium. 556 p.
- Léger, P., Simpson, K. y Sorgeloos, P. 1986. The use and nutritional value of *Artemia* as a food source. Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev. 24: 521-623.
- Lehninger, A. 1978. Bioquímica. Segunda edición, Ediciones Omega, S. A., Barcelona, España. 1117 p.
- Lenz, P. Ecological studies on *Artemia*: a review. In: *Artemia* Research and its Applications. 1987. Vol. 3. Ecology, Culturing, Use in Aquaculture. P. sorgeloos *et al.*, (eds). Universa Press, Wetteren, Belgium. 556 p.
- Olivares, E. 1991. Balance Energético de los Adultos de *Artemia franciscana*, Kellogg, 1906, bajo diferentes condiciones de temperatura. Tesis de Maestría en Ciencias. C. I. C. E. S. E. Ensenada, B. C. 63 p.
- Pesoone, G. y Sorgeloos, P. General aspects of the ecology and biogeography of *Artemia*. In: *The Brine Shrimp Artemia*. 1980. Vol. 3. Ecology, Culturing, Use in Aquaculture. G. Pesoone *et al.*, (eds). Universa Press, Wettere, Belgium, 456 p.
- Sorgeloos, P., Baeza-Mesa, M., Benijts, F. y Pesoone, G. Research on the Culturing of the Brine Shrimp *Artemia salina* L. at the state University of Ghent (Belgium). 10<sup>th</sup> European Symposium on Marine Biology, Ostend, Belgium, Sept. 17-23, 1975. vol. 1:473-495.

- Sorgeloos, P. 1980. The Use of the Brine Shrimp *Artemia* in Aquaculture. p. 25-46. In: The Brine Shrimp *Artemia*. Vol. 3. Ecology, culturing, Use in Aquaculture. G. Persoone *et al.*, (eds). Universa Press, Wetteren, Belgium. 456 p.
- Sorgeloos, P., Lavens, P., Léger, P., Tackaert, W., Versichele, D., 1986. Manual of the Culture and Use of Brine Shrimp *Artemia* in Aquaculture. State University of Ghent, Belgium, 319 pp.
- Sokal, R. y Rohlf, F. 1979. Biometría. Principios y Métodos Estadísticos en la Investigación Biológica. H. Blume Ediciones, Madrid, España. 832 p.
- Versichele, D. y Sorgeloos, P. 1979. In: The Brine Shrimp *Artemia*. Vol. 3. Ecology, culturing, Use in Aquaculture. Proceedings of the International Symposium on the Brine Shrimp *Artemia salina*. Corpus Christi, Texas, U. S. A., 246 pp. (Fuente ASFA).
- Versichele, D. y Sorgeloos, P. 1980. Controlled production of *Artemia* cysts in batch cultures. p. 231-246. In: The Brine Shrimp *Artemia*. Vol. 3. Ecology, Culturing, Use in Aquaculture. G. Persoone *et al.*, Universa Press, Wetteren, Belgium. 456 p.
- Voltolina, D., Trujillo, M. y González, I. 1991. La colección de cepas de microalgas del departamento de Acuicultura del C. I. C. E. S. E. Comunicaciones Académicas. Serie Acuicultura. 50 p.
- Wheaton, F. 1982. Acuicultura. Diseño y Construcción de Sistemas. AGT Editor, S. A. México, D. F. 704 p.
- Zar, J. 1984. Bioestatistical Analysis. Second edition. Prentice-Hall, Inc. U. S. A., 718 p.