

CULTIVO DE ARTEMIA

MEMORIAS

AUTORES

VICTOR FERNANDO AGRAZ GÜEREÑA

HECTOR RAFAEL ALVAREZ MELERO

JOSE LUIS AVIÑA CERVANTES

JOSE LUIS BALTIERRA RODRIGUEZ

GUSTAVO CALDERON RODRIGUEZ

1987

PREFACIO

Entre las modalidades de titulación que ofrece la Universidad, consideramos que los cursos de titulación son una opción oportuna, y no por esto la mas fácil. Lo anterior, tomando en cuenta que no siempre es posible estar dentro de proyectos de investigación, ni mucho menos contar con apoyo para realizar una investigación individual.

El presente libro es el fruto del esfuerzo intensivo de nuestro grupo de trabajo, constituido por el M.C. Antonio Silva y alumnos participantes del curso de titulación. El cual se impartió durante el período del 25 de Agosto al 7 de Noviembre de 1986, en la Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California.

Estamos concientes, en que este trabajo representa un breve compendio de los conocimientos que se tienen sobre Artemia. Sin embargo, desde el inicio de su integración, se tuvo en mente la idea que este curso cristalizara en un trabajo que sirviera de orientación y apoyo en actividades de investigación y acuiculturales, en todo aquel lugar donde llegue a ser leído.

Las materias del curso fueron impartidas por:

M.C. Antonio Silva Loera
Ocean. Carlos Grandos Machuca
Maestro invitado:
Ocean. Eloy Sosa Cordero

Teoría
Laboratorio
Métodos Estadísticos

LISTA DE PARTICIPANTES

AGRAZ GUERENA VICTOR FERNANDO
ALVAREZ MELERO HECTOR RAFAEL
AVINA CERVANTES JOSE LUIS
BALTIERRA RODRIGUEZ JOSE LUIS
CALDERON RODRIGUEZ GUSTAVO
FLORES UZETA OLGA
GONGORA BARBOSA SEVERO JOSE
HASMANN COSIO YUL LEOPOLDO
HERRERA MESINA ALFREDO ELIUD
JARQUIN H. LUZ AHMED
LOPEZ DADO HUMBERTO
LOPEZ DOMINGUEZ PABLO
PEREDA PARAMO HUGO
PEREZ ARROYO VICTOR
SANCHEZ JUAREZ ENRIQUE
SANCHEZ OCHOA MARIA CRISTINA
SILVA LOERA JAFET FERNANDO
SOLIS OSUNA FERNANDO
TORRES DE JESUS RUPERTO
WAUMAN ROJAS CARLOS ENRIQUE
WAUMANN ROJAS GERARDO DE JESUS

CONTENIDO

	PAGINA.
I.- INTRODUCCION.....	1
II.- BIOLOGIA.....	7
1. INTRODUCCION.....	7
2. TAXONOMIA.....	10
2.1. Antecedentes.....	10
2.2. Clasificación actual.....	11
2.3. Criterios para determinar razas ó subespecies de <u>Artemia</u>	14
2.4. Consideraciones sobre la categoría de especie	18
3. MORFOLOGIA DE <u>ARTEMIA</u>	21
3.1. Estructuras externas.....	24
3.2. Estructuras internas.....	28
4. DESARROLLO Y REPRODUCCION.....	34
4.1. Criptobiosis o Diapausa.....	34
4.2. Desenquistamiento.....	35
4.3. Desarrollo larval.....	37
4.4. Reproducción.....	49
5. FISILOGIA DE <u>ARTEMIA</u>	59
5.1. Consumo de oxígeno.....	59
5.2. Pigmentos respiratorios.....	63
5.3. Control iónico y osmótico.....	65
5.4. Efectos de la temperatura.....	78
6. ECOLOGIA DE <u>ARTEMIA</u>	82
6.1. Habitat y distribución.....	82
6.2. Mecanismos de adaptación.....	84
6.3. Tolerancia de <u>Artemia</u> a factores abióticos.....	86
6.4. Competencia y depredación.....	93
7. AFECCIONES EN <u>ARTEMIA</u>	95
7.1. Origen microbiano.....	95
7.1.1. Bacterias.....	96
7.1.2. Hongos.....	98
7.1.3. Virus.....	100
7.2. Origen químico.....	100
7.3. Uso de Antibióticos.....	107
7.4. Uso de <u>Artemia</u> en pruebas de toxicidad.....	109
7.4.1. Uso de quistes para estudios de toxicidad.....	111

7.4.2.	Uso de nauplios para estudios de toxicidad.....	113
7.4.3.	Uso de adultos para estudios de toxicidad.....	114
7.4.4.	Metodología para estudios de toxicidad con <u>Artemia</u>	116
III.-	TECNICAS DE CULTIVO DE <u>ARTEMIA</u>	124
1.	INTRODUCCION.....	124
2.	CRITERIOS PARA DETERMINAR LA CALIDAD DE LOS QUISTES.....	126
2.1.	Tasa de eclosión.....	128
2.2.	Eficiencia de eclosión.....	129
2.3.	Porcentaje de eclosión.....	131
2.4.	Rendimiento de eclosión.....	132
2.5.	Tamaño y valor alimenticio de los nauplios.....	133
2.6.	Condición de los quistes envasados.....	135
3.	TECNICAS DE ECLOSION DE QUISTES.....	136
3.1.	Técnica simple.....	136
3.2.	Descapsulación de quistes.....	140
3.2.1.	Hidratación.....	142
3.2.2.	Tratamiento con la solución descapsuladora.....	143
3.2.3.	Lavado y tratamiento de desactivación.....	148
3.2.4.	Uso directo de quistes descapsulados	149
3.2.5.	Deshidratación y almacenamiento....	150
4.	PRODUCCION DE BIOMASA DE <u>ARTEMIA</u>	156
4.1.	Factores que influyen en el cultivo de <u>Artemia</u>	158
4.2.	Cultivo extensivo.....	160
4.3.	Cultivo intensivo en lotes.....	161
4.3.1.	Diseño y características de los tanques.....	162
4.3.2.	Construcción y colocación de los aireadores.....	163
4.3.3.	Control de la temperatura en el cultivo.....	166
4.3.4.	Sistemas automáticos para eliminar heces fecales.....	166
4.3.5.	Secuencia del cultivo.....	175
4.4.	Cultivo cerrado con flujo continuo.....	176
4.4.1.	Diseño y operación.....	177
4.4.2.	Sistema de cultivo.....	179
4.4.3.	Sistema de recirculación.....	180
4.4.4.	Recomendación técnica en	

	cultivos intensivos de <u>Artemia</u>	181
4.5.	Alimentación de <u>Artemia</u>	182
4.6.	Cosecha, procesamiento y transporte de <u>Artemia</u> adulto.....	185
5.	OBTENCION DE QUISTES.....	188
5.1.	Colecta en el medio natural.....	188
5.2.	Producción de laboratorio.....	189
5.3.	Tratamiento y preservación de los quistes.....	193
IV.	NUTRICION.....	195
1.	INTRODUCCION.....	195
2.	CONSIDERACIONES SOBRE EL ALIMENTO.....	199
2.1.	Tamaño de partículas.....	199
2.2.	Tasa de filtración.....	201
2.3.	Tasa de ingestión.....	206
2.4.	Cápsulas fecales.....	209
2.5.	Enzimas digestivas.....	212
3.	REQUERIMIENTOS NUTRITIVOS.....	214
3.1.	Proteínas.....	214
3.2.	Lípidos.....	217
3.3.	Carbohidratos.....	220
3.4.	Vitaminas.....	221
4.	TIPOS DE ALIMENTO.....	225
4.1.	Inerte.....	225
4.2.	Vivo.....	227
4.3.	Solubilizado.....	228
4.4.	Encapsulado.....	230
4.5.	Preparación de dietas.....	231
4.6.	Alimento complementario.....	235
5.	EFFECTO DE FACTORES FISICO-QUIMICOS EN LA NUTRICION DE <u>ARTEMIA</u>	237
V.	LITERATURA CITADA	243

LISTA DE TABLAS

TABLA	PAGINA
I. Sistemática del género de <u>Artemia</u> (resumido) de Barigozzi, (1980).....	19
II. Ontogenia de las estructuras de <u>Artemia</u> en donde sucede el control iónico.....	76
III. Lista actualizada de distribuidores de quistes de <u>Artemia</u>	127
IV. Tamaño y peso individual de nauplios de <u>Artemia</u> a partir de quistes de diferentes lugares, eclosionados en condiciones "standard" (Salinidad 35 ppm y temperatura de 25 g.c.).....	134
V. Agua de mar artificial, utilizada para la eclosión y cultivo de <u>Artemia</u>	138
VI. Diámetro interno del tubo airador en relación con la profundidad a que son introducidos.....	164
VII. Características del separador de placas para tratar un tanque de cultivo de 2 m ³	170
VIII. Características de un tubo separador que se utiliza para eliminar los desechos de un tanque de 350 l.....	174
IX. Tipos de preservado de quistes, ventajas y desventajas de cada uno.....	194

LISTAS DE FIGURAS

FIGURA		PAGINA
1.	Esquema filogénético de la superclase crustacea .	12
2.	Características morfológicas de <u>Artemia</u>	22
3.	Diagrama esquemático de la fila izquierda de toracópodos con indicación de sus movimientos separados.....	25
4.	Esquema del sistema nervioso y de los aparatos circulatorio y reproductor femenino de <u>Artemia</u> ...	30
5.	Vista lateral del aparato reproductor de un macho adulto de <u>Artemia</u>	32
6.	Vista lateral del aparato reproductor de una hembra adulta de <u>Artemia</u>	32
7.	Proceso de eclosión de <u>Artemia</u>	39
8.	Nauplio recién eclosionado. Vista ventral.....	43
9.	Estadios de desarrollo de <u>Artemia</u>	44
10.	Principales vías de los movimientos de agua e iones.....	68
11.	Relación entre la presión osmótica de los fluidos corporales y el medio ambiente en un medio hipotónico.....	70
12.	Composición química de la hemolinfa de <u>Artemia</u>	72
13.	Relación entre la presión osmótica de los fluidos del cuerpo y el medio ambiente, en un medio hipertónico.....	75
14.	Diagrama esquemático de un sistema para la obtención de salmuera (Sterling Brinomat, Spotle, 1970).....	151
15.	Diseño de recipiente para descapsulación vista lateral y superior.....	154
16.	Secuencia del proceso de descapsulación.....	155

17.	Vista lateral y superior del estanque (raceways) para el cultivo de <u>Artemia</u>	163
18.	Detalle de las instalaciones de las líneas de aire.....	165
19.	Diseño del separador de placas.....	168
20.	Diseño del tubo separador.....	173
21.	Diseño general de un sistema cerrado de cultivo con flujo continuo.....	178

I. INTRODUCCION

I. INTRODUCCION.

Recientemente se ha puesto de manifiesto la urgente necesidad que existe de implementar más y mejores métodos de obtención de alimento para una población mundial cada día en aumento.

De sobra es conocido que una dieta complementada con productos de origen acuático proveerá de los requerimientos mínimos nutricionales si son consumidos adecuadamente.

Se considera que a medida que nos acercamos a una producción máxima a través de la agricultura tradicional alrededor del mundo, nuevas formas de alimento humano se están desarrollando para prevenir una crisis mundial de comida. Un recurso lógico de estudio y explotación puede ser el mar, que por mucho tiempo se pensó que era una fuente ilimitada de proteína para la humanidad. Sin embargo es razonable pensar que la tasa actual de explotación no puede ser incrementada significativamente si se consideran los límites de la producción orgánica primaria que existen en el océano.

Aunque la producción agrícola parece que gana terreno en el problema de la escasez de comida, se debe hacer notar que una gran porción de la población mundial se va a la

cama con hambre, y un menor, pero significativo número de personas muere de hambre cada año. Millones de otras gentes no pasan hambre, pero su desarrollo físico y mental así como su habilidad para trabajar se limita por una dieta inadecuada. Las deficiencias proteínicas presentan un serio problema en muchas partes del mundo, por lo tanto, la producción de alimento de otras fuentes que no sean las tradicionales (agricultura y ganadería) son bienvenidas dentro del contexto de aprovisionamiento mundial de recursos, (Wheaton, 1977).

La acuicultura, esto es, la explotación de los recursos biológicos marinos o dulceacuícolas, con tecnologías de cultivo, ha venido a solucionar en parte, las situaciones antes mencionadas. Se dice que "en parte" ya que el total de la producción acuícola, como se practica en la actualidad no podrá rebasar jamás los volúmenes totales de las grandes pesquerías a nivel mundial, y si a esto se añade la inminente explotación del "krill" en aguas del Antártico, por potencias pesqueras como Rusia, Japón y Australia, estos volúmenes serán fácilmente duplicados.

Sin embargo, la práctica de la acuicultura viene a resolver varios problemas, principalmente en países en vías de desarrollo como el nuestro, como pueden ser : primero, uso de tierras salobres no aprovechables en agricultura,

segundo, uso integral de cuerpos de agua alejados de la costa (lagos, represas, rios, salinas, etc), tercero, creaci3n de empleos, cuarto, generaci3n de divisas, en el caso de cultivarse para la exportaci3n y finalmente, provisi3n de proteina barata.

La acuicultura en M3xico ha sido satisfactoria en el cultivo de peces dulceacuicolas. El cultivo de ostiones ha alcanzado cierta importancia, y recientemente se est3 cultivando camar3n, el cual es un recurso de gran importancia econ3mica.

Como se puede ver, a excepci3n del osti3n y algunas tilapias, todas las especies mencionadas caen dentro del tercer nivel de la cadena tr3fica, esto significa que habr3 que proveerles de alimento suplementario durante varios estadios de su ciclo de vida, y para algunos durante todo el tiempo de su desarrollo. No menos importante ha sido, resolver el problema de nutrici3n en estos organismos, lo cual a llegado a ser un cuello de botella en la pr3ctica de la acuicultura de 3stas especies, puesto que no solo es importante conocer que organismo cumple con los requerimientos nutricionales, sino el tama1o y sobre todo la disponibilidad del alimento en el momento preciso.

Una forma de alimento que satisface los interrogantes

anteriores son los nauplios de un pequeño crustáceo anostraco del género Artemia, que como se verá en el desarrollo de las presentes memorias, posee características en cuanto a su valor alimenticio, comportamiento y manejo que lo sitúan en un lugar de gran relevancia dentro del ambiente de la acuicultura y no solo dentro de la acuicultura, pues por su alto contenido protéico se ha pensado en que puede ser utilizable como complemento protéico en el alimento humano y aunque esto se puede pensar como una utopía, no hay que descartar la posibilidad antes de implementar la tecnología necesaria para tal aplicación. Van Ballaer (1986) menciona que en Tailandia, a partir del remanente de producción de Artemia, se elabora una "salsa" enriquecida a partir de Artemia para consumo humano.

Es válido notar que Artemia no solo es valiosa como alimento sino también como un recurso comercial disponible de manera natural en la mayor parte de los campos salineros del mundo, la presencia de Artemia en dichas salinas contribuye a que la sal, producto de ellas, sea de una calidad mejor que en las que no se encuentra, ya que actúa como un filtro de impurezas al utilizar parte de estas "impurezas" (microalgas y materia orgánica) como alimento.

No obstante lo anterior, la atención y utilización de Artemia en un principio fué otra, debido a su ciclo de vida corto Artemia ha sido ampliamente usada en : investigación, (pruebas nutricionales, pruebas toxicológicas, pruebas genéticas, pruebas fisiológicas) docencia, (investigación básica, enseñanza de biología, técnicas acuiculturales)

Debido a la característica de reproducción que presenta Artemia, de enquistar los embriones bajo ciertas condiciones ambientales, es posible también comerciar con dichos quistes ya que son fácilmente almacenados y transportados, pudiendo bajo técnicas muy sencillas rehidratarlos, con la consecuente eclosión de los náuplios.

Actualmente en el mercado mundial un kg de quistes de Artemia tiene un costo aproximado promedio de \$ 60.00 dls (abaratándose al comprar por volúmenes mayores, de acuerdo a la localidad y según cosecha anual), presentando una perspectiva interesante de explotación por el gran mercado potencialmente en aumento de ejemplo, en Ecuador se tiene una gran extensión de estanquería para cultivo de camarón, lo cual requiere de producción de larvas de camarón en laboratorio, Sorgeloos (1986) estima que dentro de los próximos cinco años en esa sola región el consumo de quistes de Artemia alcanzará las 50 toneladas métricas

anuales. Lo anterior habla de por sí de la importancia de Artemia, de su explotación, de su comercialización, de su cultivo, de su biología.

II. B I O L O G I A

II. BIOLOGIA

1. INTRODUCCION

Artemia es un pequeño crustáceo cosmopolita que ha llegado a ocupar nichos que otros organismos han dejado vacíos. No obstante lo anterior, está ausente en lugares que reúnen las condiciones para que pudiera desarrollarse.

Entre los factores que han favorecido su distribución mundial están, el viento, corrientes en épocas de lluvias, movimientos tectónicos y transporte animal. (Proctor, 1964; Proctor y Malone, 1965), así como la inoculación deliberada hecha por el hombre (Geddes, 1980).

Su existencia sobre la tierra data desde el Cámbrico y durante su evolución no ha sufrido cambios morfológicos notables, lo cual podría sugerir que Artemia sea un organismo primitivo, sin embargo se sabe que posee mecanismos especializados que le han permitido llegar a ocupar nichos de condiciones extremas.

El interés sobre Artemia se hace notar a partir de la segunda mitad del siglo pasado, y el interés fue meramente científico, estudiándose su histología, genética, fisiología, nutrición y desarrollo. Recientemente se ha

propuesto el estudio de nauplios de Artemia en estudios de toxicidad.

El hábito reproductivo de Artemia es uno de los mecanismos que ha permitido que llegue a desarrollarse en biotopos que presentan características de gran variación en las condiciones ambientales estacionalmente. La reproducción suele efectuarse en ciertas condiciones adversas mediante la generación de embriones encapsulados (quistes) capaces de soportar los rigores de la estación (sequedad y elevada salinidad) y cuando las condiciones vuelven a ser favorables, el quiste reanuda su desarrollo.

En este estadio de enquistamiento, Artemia ha alcanzado gran importancia comercial y por su fácil transporte y manejo. Su aplicación primordial, es como nauplio recién eclosionado, para la alimentación de larvas de peces y crustáceos.

La amplia distribución de Artemia en biotopos geográficamente aislados, ha generado especiación genética, lo cual ha dado como resultado una gran variedad genotípica y fenotípica.

Por lo anterior el nombre de Artemia salina L. solamente es válida para los organismos encontrados en las

salinas de Lymington, Inglaterra. Artemia de otras localidades, aunque emparentadas, pueden ser realmente distintas, lo cual es importante considerar para su caracterización taxonómica de especie.

2. TAXONOMIA.

2.1. Antecedentes

La primera descripción de la especie fue hecha en 1775 por Schlosser, en 1978, fue nombrada Cancer salinus por Lineo y luego renombrada Artemia salina por Leach en 1819.

Artemia salina (Leach) por mucho tiempo fue considerada como la única especie del género, descrita con organismos colectados en Lymington, Inglaterra. En un principio, se conocía como una especie bisexual, y en las observaciones sobre su morfología fueron distinguiéndose diferentes variantes en función de la concentración salina del medio. Ya para mediados del siglo XIX se empezaron a reconocer en Europa algunas otras variedades de Artemia con reproducción partenogenética

Las observaciones morfológicas condujeron a considerar como diferentes a organismos provenientes de lugares distintos, lo cual pronto dió origen a muchos términos sinónimos; uno de los más notables fue Artemia gracilis, empleado por Verrill en 1869 (citado por Barigozzi, 1980) para designar la Artemia de California, U.S.A, dejando el nombre Artemia salina para la Artemia de Europa. Sin embargo, todos esos nombres no condujeron a la división de

la especie, más bien todas las variantes fueron incluidas bajo la denominación Artemia salina (Barigozzi, 1980).

Fue necesario realizar análisis de características genéticas para acumular elementos que pudieran justificar una revisión de la sistemática de Artemia salina, los primeros elementos fueron caracterizaciones de la morfología, tipos de reproducción y condiciones fisiológicas relacionados con el medio ambiente natural en donde se desarrollaba. El análisis fino y detallado en las últimas décadas utilizando las herramientas de los análisis bioquímicos de proteínas (particularmente electroforesis de hemoglobinas y enzimas) ha permitido un conocimiento más a fondo de los caracteres y ha conducido a una eventual explicación con mayor detalle de los procesos de especiación, así mismo, a una eventual sistemática más adecuada del género Artemia.

2.2. Clasificación actual

El género Artemia (Leach, 1819) forma parte de la clase (superclase) crustácea, subclase (clase) branchiopoda, orden anostraca, familia Artemiidae, Figura 1, la cual posee 11 pares de apéndices torácicos en forma de hoja, portadores cada uno de numerosas setas, Artemia Recibe distintos nombres vernáculos : brine

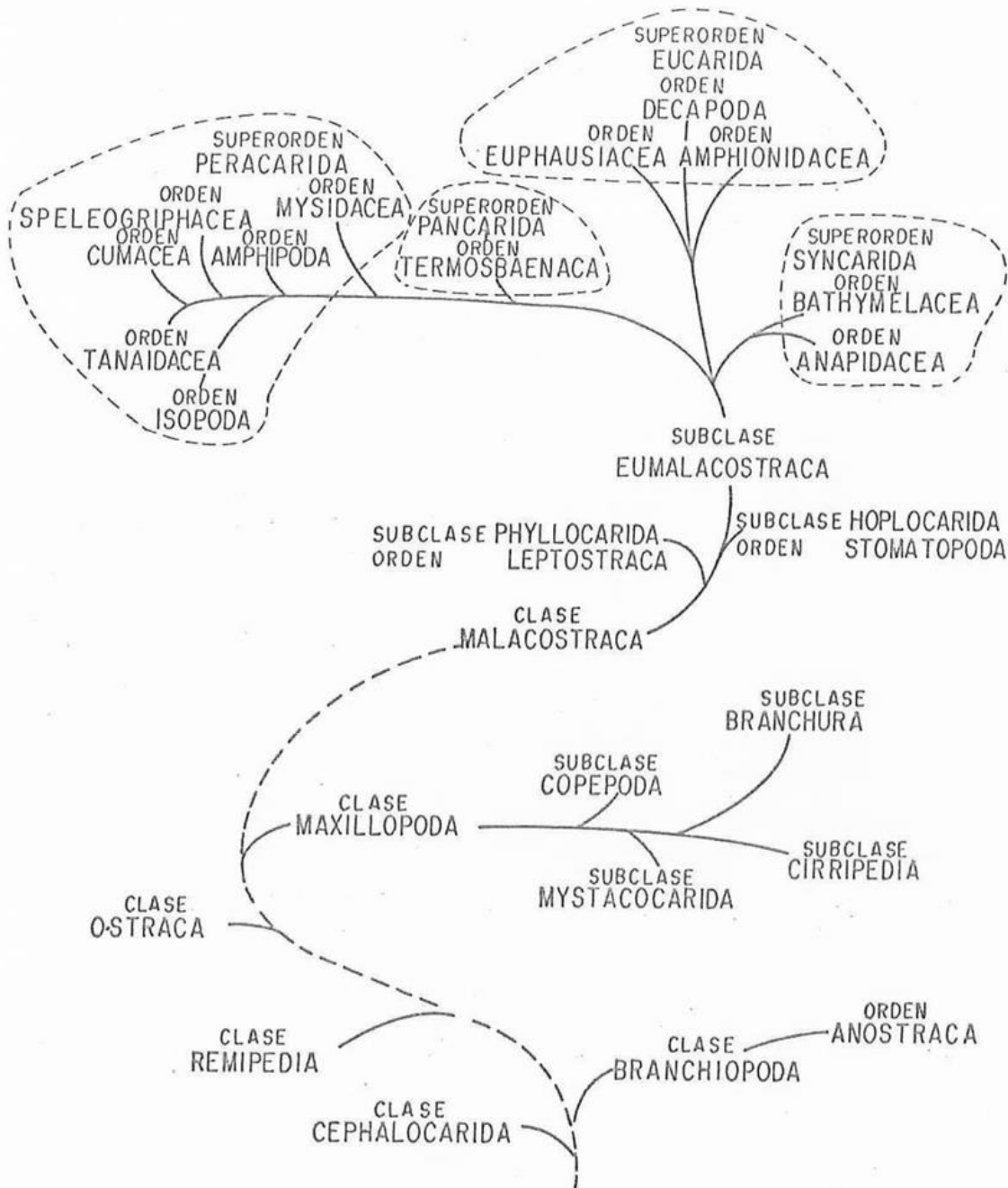


Figura 1.-Esquema filogenético de la superclase Crustacea. La línea quebrada enfatiza el origen incierto de las cinco clases y sus relaciones con las otras.

shrimp, saltztierchen, bahar el dud, fezzanwurm, etc, que pueden traducirse como "camarón salino", en relación a su presencia en aguas de elevada salinidad (Amat, 1985).

La sistemática actual del género Artemia siguiendo la clasificación de Bowman y Abele (1982) es :

SUPERCLASE	CRUSTACEA
CLASE	BRANCHIOPODA
ORDEN	ANOSTRACA
FAMILIA	ARTEMIIDAE
GENERO	ARTEMIA

2.3 Criterios para determinar razas o subespecies de Artemia.

Los criterios que se consideraban importantes para una posible diferencia y determinación de especie, subespecie y raza o variedad de Artemia se basó en las observaciones iniciales sobre el organismo tomándose en cuenta solo caracteres morfológicos, lo cual generó una sinonimia, debido a que Artemia modifica estructuras de acuerdo a la edad, sexo e influencias ambientales (Bowen et al, 1978) y resultan poco confiables para describir entes sistemáticos (Barigozzi, 1980).

Barigozzi (1980) menciona que desde finales de siglo anterior y principios de éste, se buscó identificar el número cromosómico y forma reproductiva como elementos de mayor confiabilidad para lograr una revisión sistemática de Artemia

Dado que el aislamiento geográfico y las condiciones específicas del habitat conducen a variaciones en el fenotipo, presentando distintas características biológicas, químicas y fisiológicas (Vanhaecke y Sorgeloos 1980), posteriormente se consideró la presencia de barreras al intercambio genético como criterio de clasificación, llegándose a encontrar aislamiento entre poblaciones de

California, Italia y Norte de Africa (Kuenen, 1939; Gilchrist, 1960) e inclusive entre 2 poblaciones de Artemia que viven en una misma salina (Halfer Cervini et al., 1968).

Estudios recientes sobre número cromosómico han permitido sugerir la existencia de varias especies hermanas o emparentadas considerándose como tales las especies aisladas reproductivamente en la naturaleza, pero idénticas o muy similares en apariencia externa (Bowen et al., 1978; Piccinelli y Prosdocimi, 1968)

La mayoría de estas especies hermanas tienen 42 cromosomas, y un número de variantes partenogenéticas con diferentes tipos de meiosis y diferentes grados de ploldia. (Barigozi, 1980).

Ultimamente se han aplicado distintas técnicas de análisis bioquímicos a poblaciones de Artemia de ciertas localidades bien caracterizadas (patrones electroforéticos y enfocamiento iso-eléctrico), siempre buscando un carácter diagnóstico de la especie, definido por Ayala y Powell (1972) como aquél que permite asignar un individuo correctamente a una de dos especies, con una probabilidad de 99 % o mayor. Los ensayos hechos a nivel de enzimas con proteínas del tipo fosfogluco-sisomerasas, estererasas, alcalino-fosfatasas y hemoglobinas (Bowen et al., 1978) y

con ésteres metílicos de ácidos grasos (Schauer et al., 1980) han sido considerados como los mejores caracteres diagnósticos, y han permitido corroborar hasta ahora la existencia de 6 especies hermanas, como son :

- A. franciscana Kellog (1906) de la Bahía de San Francisco California (U.S.A.)
- A. tunisiana Bowen y Sterling (1978)
- A. urmiana Gunther (1900) del Lago Urmia (Rusia)
- A. monica Verril (1869) del Lago Mono en California (U.S.A.)
- A. parthenogenética Bowen y Sterling (1978)

En 1980, Vanhaecke y Sorgeloos retoman el análisis de parámetros biométricos y más específicamente las características del quiste, para diferenciar las razas de Artemia, considerándolas como buenas herramientas para este fin, lo cual está altamente correlacionado con los resultados obtenidos con el uso de electroforésis.

Sin embargo, el avance en los elementos de la sistemática de Artemia no ha sido definitivo, estos intentos de sistemática, han ido poco a poco tomando forma en base a los elementos que corroboran la caracterización de algunos grupos de Artemia, sin que al momento se tenga

una guía de identificación de razas o subespecies de Artemia, por lo que pudiera resultar peligroso, denominar alguna especie, para el género sin tener la mayoría de los elementos sistemáticos.

Entre los puntos que pueden favorecer un reordenamiento taxonómico de Artemia, partiendo del postulado de que el aislamiento reproductivo puede ser evidencia de un tronco común filogenético, se debe de considerar, antes que nada, el origen de los quistes, puesto que el investigador o comerciante pueden utilizar nomenclaturas triviales y distintas. Por otra parte, el transporte de los quistes por humanos favorece la dispersión y entorpece la clasificación al favorecerle especiación. Además de que mezclas de especies hermanas en un mismo hábitat aumenta la diversidad genética. Entre los requisitos importantes se tienen que las poblaciones de Artemia deben mostrar ser homogéneas, no presentar mezclas de especies hermanas, los apareamientos interintrapoblacionales deben suceder utilizando además de quistes eclosionados del medio natural (no de laboratorio) por asegurar muestras de genotipos independientes, finalmente se deberá de determinar si existe aislamiento del hábitat, mediante pruebas de fertilidad cruzada, en donde la credibilidad y fertilidad de la progenia será con parámetros de la magnitud de especiación causada por el

aislamiento de las poblaciones de Artemia.

2.4. Consideraciones sobre la categoría de especie.

En vista de todo lo anterior, Barigozzi (1980) divide la sistemática del género en dos secciones : Una comprende las especies hermanas bisexuales, determinadas principalmente por entrecruzamiento mediante análisis cromosómico. Y otro grupo que comprende el complejo partenogenético, que necesita de otro método de análisis. Resume la sistemática de las especies de Artemia en la tabla No. I.

Debido al incremento constante en especies hermanas, y la ocurrencia de especies emparentadas en Cerdeña y México, Barigozzi (1980) concluye que no hay razón para conservar la denominación Artemia salina, excepto para el material original de las salinas de Lymington, Inglaterra ahora desaparecidas.

Los editores del Symposium Internacional sobre Artemia, efectuado en Corpus Christi, Texas en 1979, han puesto los siguientes lineamientos para la sistemática del género.

Tabla No. I SISTEMÁTICA DEL GÉNERO ARTEMIA, (resumido de Barigozzi, 1980).

GRUPO	NOMBRE	LOCALIDADES
I. Bisexual Diploide Tetraploide.	<u>A. salina</u> Leach	Lymington (Inglaterra).
	<u>A. franciscana</u> Kellogg	Norte América (California, USA.).
	<u>A. tunisiana</u> Bowen	Africa del Norte (Cagliari (Cerdeña).
	<u>A. urmiana</u> Gunther	Lago Urmia (Irán).
	<u>A. persimilis</u> Prosdócimi Y Piccinelli.	Sn. Bartolomeo (Cagliari), Hidalgo, (México).
	<u>A. monica</u> Verrill	Lago Mono (California).
	<u>A. odessa</u> Nuevo nombre.	Odessa (URSS).
II. Partenogénético -- con diferentes grados de ploidía, diferentes mecanismos de regulación del número de cromosomas.	<u>A. parthenogenetica</u> de Istria.	Istria.
	<u>A. parthenogenetica</u> de Sta. Gilla.	Sta. Gilla (Cagliari)
	<u>A. parthenogenetica</u> de Pulia	Margherita Di Savoia (Italia).
	<u>A. parthenogenetica</u> de Comacchio.	Comacchio (Italia).
	<u>A. parthenogenetica</u> de Sète	Sète (Francia)
	<u>A. parthenogenetica</u> de Odessa.	Odessa (URSS).
	<u>A. parthenogenetica</u> de India.	Madras (Kutch)
	<u>A. parthenogenetica</u> de Australia	Puerto Hedland (Australia).
	<u>A. parthenogenetica</u> de Japón.	Yamaguchi (Japón).
<u>A. parthenogenetica</u> del Mar Muerto.	Mar Muerto.	

El binòmen Artemia salina (L.) no es taxonòmicamente correcto (Bowen y Sterling, 1978; Bowen et al., 1980) dadas las importantes diferencias genèticas entre razas partenogenèticas de Artemia, a menos que pueda identificarse una especie exacta y hasta que se comprenda mejor la especiación en el camaròn salino, debe usarse solamente la designación genèrica Artemia (Persoone et al., 1980).

3. MORFOLOGIA DE ARTEMIA

Artemia es un crustáceo cuyo cuerpo está segmentado en 24 metámeros y presenta simetría bilateral, figura 2. Por cada segmento posee un par de apéndices al igual que los demás crustáceos. Artemia posee un exoesqueleto mucho más delgado que otros crustáceos lo cual representa ventajas de menor gasto energético para su elaboración, sin embargo tiene la desventaja de favorecer procesos de difusión. La subclase Branchiopoda, a la cual pertenece Artemia, está caracterizada por poseer exoesqueleto en forma de escudo el cual cubre los apéndices o extremidades de los organismos, como si fuera un bivalvo, y presentan la característica de funcionar como estructuras de intercambio gaseoso, y de intervenir en la locomoción. El orden Anostraca de la subclase Branchiopoda, se caracteriza por la ausencia del exoesqueleto en forma de escudo y se asemeja más al de cualquier crustáceo, pero se conserva la característica de que los apéndices presentan esa doble función de estructuras locomotoras y de intercambio gaseosos.

Al igual que todos los crustáceos el primer estadio de vida es la larva nauplio, caracterizada por tres pares de apéndices que durante un posterior desarrollo se transformarán en las estructuras finales de antenas,

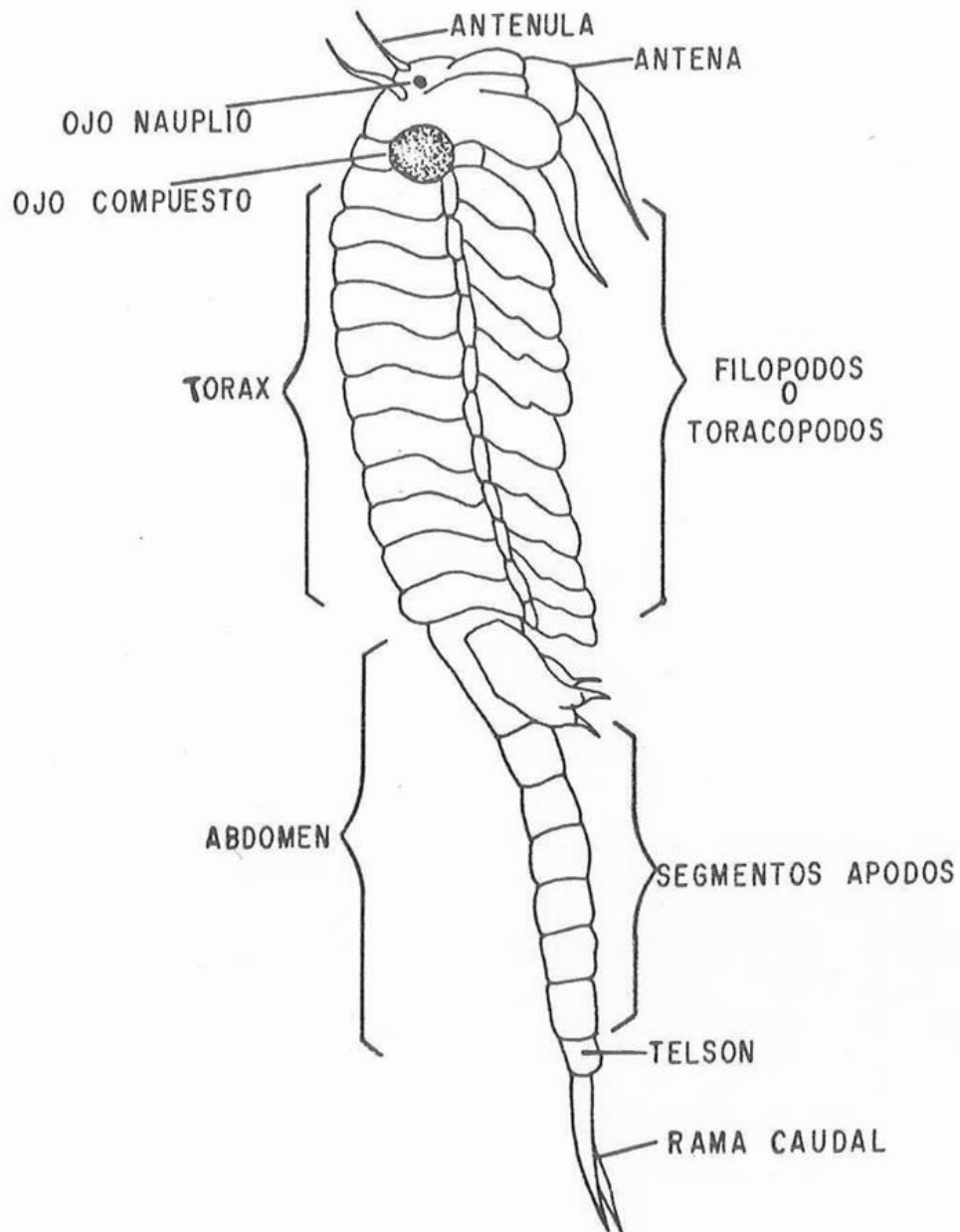


FIG. 2.- CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE Artemia

anténulas y mandíbulas. Poseen un organelo de recepción luminica ù "ojo nauplio". Esta larva sufrirá cambios en forma y estructura hasta alcanzar su estado adulto, donde se presentan caracterizaciones de morfología sexual diferenciada, en el macho las antenas se transforman en estructuras de apresiòn que durante la reproducción, permiten la formaciòn de parejas lo cual no sucede en la hembra, en la que se forma la bolsa o saco ovigero en la parte abdominal al final de la regiòn del torax. La presencia del ojo nauplio permanece aún despuès de la - - apariciòn de los ojos compuestos en Artemia.

3.1. Estructuras Externas.

El cuerpo de Artemia esta caracterizado en tres regiones principales : cabeza, tórax y abdómen.

La cabeza es el resultado de la fusión de los cinco primeros segmentos. En el primer segmento se localiza el primer par de apéndices denominado antenas. Sin setas notables, que en el macho se modifican como apéndices prensiles, desarrollándose en la parte interna de estos una pretuberancia que presenta dos tipos de setas. Las más pequeñas (más abundantes) son cónicas y frecuentemente aparecen en pares. Las más grandes son proyecciones celulares con setas que contienen neuronas sensitivas. Las primeras favorecen la aprensión por el macho sobre la hembra durante los procesos reproductivos, en tanto que de las setas sensoriales no está claro cual sea su función, aunque al parecer su finalidad esta relacionada con la reproducción. Su proximidad con las depresiones laterales de la hembra donde termina el oviducto con el ovisaco apoya esta sugerencia (Wolfe, 1980).

El segundo segmento tiene un par de apéndices denominados antenas que presentan un tamaño medio menor que los anteriores.

En la parte ventral se localizan dos pares de apéndices, las maxilas, aunque pequeñas poseen numerosas setas en forma de penachos que intervienen en la alimentación directamente.

Finalmente se localizan las mandíbulas, apéndices de tamaño medio mayor que los anteriores. En esta región de la cabeza se localizan los ojos compuestos y en el centro permanece el ocelo ó ojo nauplio.

En el estado adulto, el tórax se encuentra formado por once segmentos claramente notorios, dotados cada uno por un par de apéndices foliáceos llamados filópodos o toracópodos (blandos, aplanados, con gran cantidad de exopoditos y endopoditos con setas plumosas). Estos tienen triple función : locomoción, intercambio gaseoso y órgano captador de alimento. El movimiento continuo de enfrente hacia atrás favorece la propulsión del agua con lo que Artemia se impulsa rápidamente. El intercambio gaseoso se realiza en los toracópodos, por ser la parte más delgada del exoesqueleto. En la alimentación se combinan tres elementos fundamentales: una corriente de agua, filtración y

mecanismos de transporte para llevar los alimentos filtrados a la boca. Para lograr esto, los filòpodos se mueven en diferente direcciòn, cuando èstos van hacia adelante se produce una vòlvula de succiòn entrando el agua al surco medio, reteniendo las particulas y expulsando el agua lo cual ofrece el movimiento. La actividad de los toracòpodos es constante, de modo que Artemia està en continuo movimiento y alimentàndose sin cesar, lo cual favorece la acciòn de intercambio gaseoso en todo momento, figura 3.

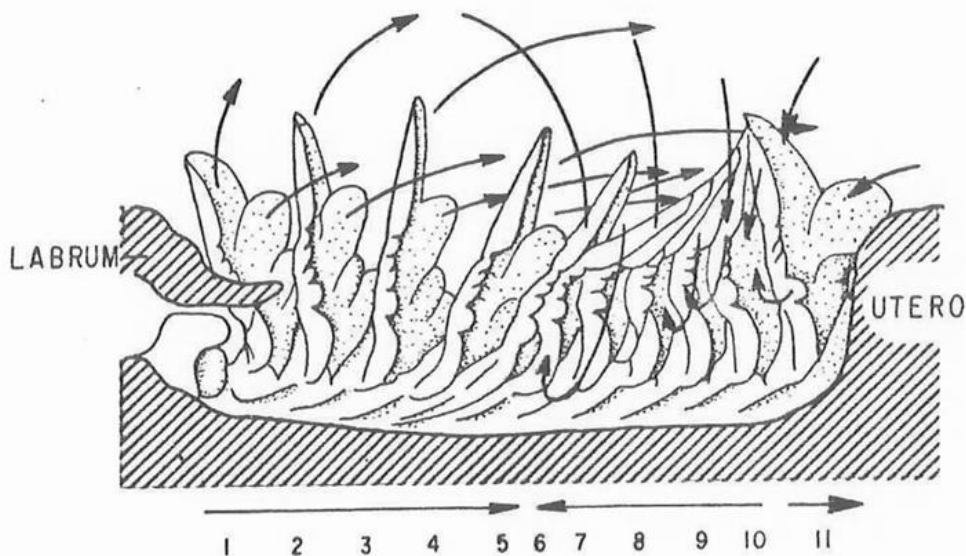


FIGURA 3. - Diagrama esquemático de la fila izquierda de toracòpodos con indicaciòn de sus movimientos separados en Artemia. (Tomado - de Vollmer, 1952).

El abdómen esta formado por ocho segmentosápodos, los dos mas próximos al tórax son los segmentos genitales. El telson es el último segmento abdominal y está provisto de furca caudal, siendo ésta muy reducida en especies poliploides cultivadas en medios muy salinos.

El exoesqueleto del cuerpo de Artemia varia en grosor de una a dos micras según la region del cuerpo, en los toracópodos y el tracto digestivo el grosor es menor que el resto del cuerpo, se compone de cuatro capas principales :

Epicuticula, es de proteina y lípidos, sin quitina, adquiere cierta consistencia por los cruces de enlaces de quinona.

Exocuticula, es un pequeño espacio laminar fibroso paralelo a la superficie con fibrillas compuestas de quitina y una proteina.

Endocuticula, esta porción, en oposición a la exocuticula consta de dos capas : la externa calcificada (principal) y la delgada no calcificada (membranosa). En la capa principal los cristales de calcio son paralelos a las microfibrillas de quitina.

Epidermis, es una fina capa de células que muestra todos los signos usuales de actividad secretora intensiva. Esta capa secreta las tres capas anteriores así como el fluido de muda.

3.2 Estructuras Internas

Sistema Nervioso.

Lo forman un cerebro rudimentario unido a un par de ganglios que se comunican a lo largo del cuerpo metamericamente. Hay un ganglio supraesofágico en posición anterior al cerebro que une este y recibe los impulsos nerviosos procedentes de los ojos compuestos, el ocelo, antenas y anténulas.

Aparato Circulatorio.

Es descrito como un sistema abierto, en el cual la sangre fluye libremente por toda la cavidad hemocèlica. Formado por un corazón elongado tubular que corre dorsalmente a través del cuerpo, colocado sobre el intestino, encerrado en el seno pericardial. La hemolinfa entra al corazón de este seno por los muchos pares de válvulas parecidas a rajaduras abiertas llamadas ostiòlos, en Branquiòpodos las hay de 14 a 18, figura 4.

Aparato Digestivo.

Consta de un atrio bucal, un esòfago, un par de pequeños divertìculos globulares que abarcan los segmentos cefàlicos 2 y 3 semejando un estómago que se continúa con un tracto o tubo intestinal terminando en el ano. Las partículas alimenticias son digeridas con ayuda de movimientos musculares rìtmicos de contracciòn, siendo las heces eliminadas por el ano en forma de cordones recubiertos (càpsulas fecales) distinta coloraciòn y consistencia en relaciòn a la naturaleza y abundancia del alimento.

Aparato Reproductor.

En *Artemia* la morfologia de los adultos es muy particular para cada sexo. El macho adulto tiene un par de antenas muy desarrolladas y transformadas semejantes a unas

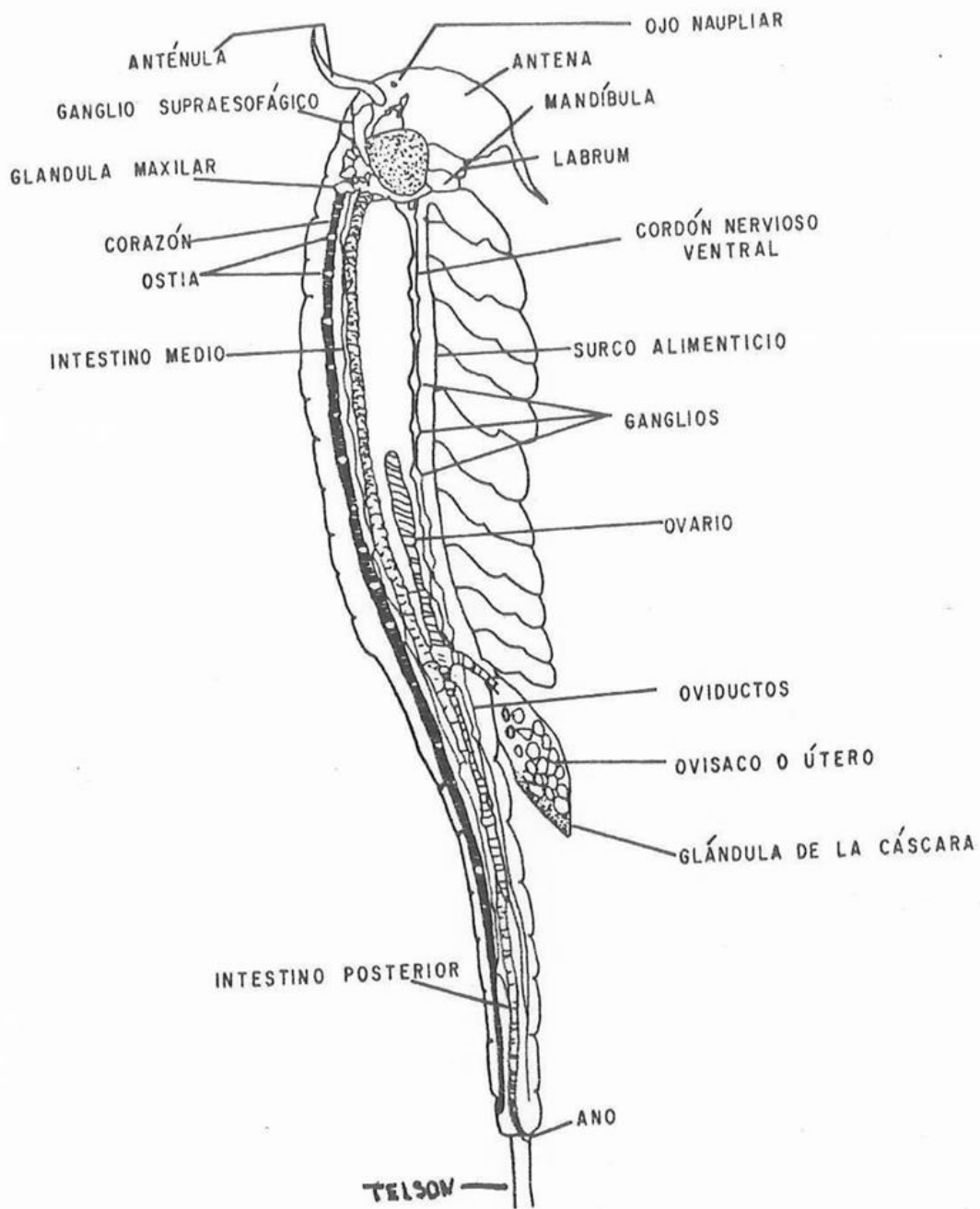


Figura 4.- Esquema del sistema nervioso y de los aparatos circulatorio y reproductor femenino de *Artemia*.

pinzas, con las cuales se sujeta firmemente alrededor de la hembra justamente frente al ovisaco.

El macho tiene un par de testículos tubulares compuestos de células germinales y de soporte, localizados a ambos lados del aparato digestivo posterior. La parte anterior de cada testículo se conecta a los conductos o vasos eferentes que secretan el líquido seminal y almacenan los espermatozoides. Este conducto consiste de un epitelio secretor, músculos longitudinales y circulares. Los conductos eferentes desembocan cada uno cerca de la punta de un pene respectivamente, figura 5.

El aparato reproductor femenino está formado por los ovarios fig. 6, que al igual que los testículos son dos tubos colocados a cada lado del aparato digestivo posterior. Cada ovario se encuentra conectado por un pequeño conducto a una bolsa lateral (oviducto) situado en la parte dorsal del ovisaco predominante. Dentro de ellas los oocitos inmaduros se encuentran colapsados, al madurar llenan el ovisaco y pueden ser observados a simple vista.

Los oocitos solamente están cubiertos por una membrana celular y 1.5 horas después de la penetración del espermatozoide se secreta una membrana "fertilizante" de forma progresiva.

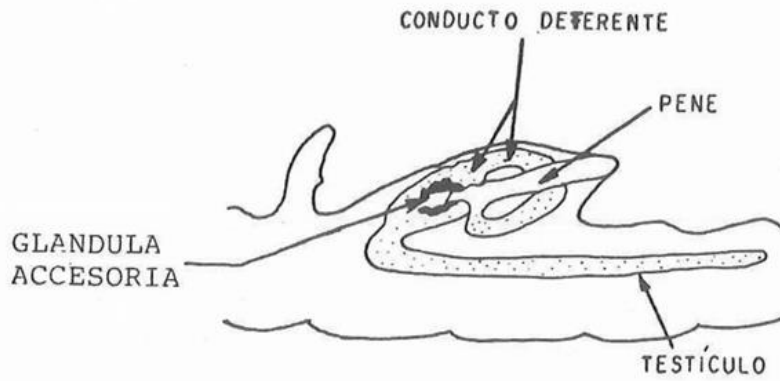


Figura 5.-Vista lateral del aparato reproductor de un macho adulto de Artemia.

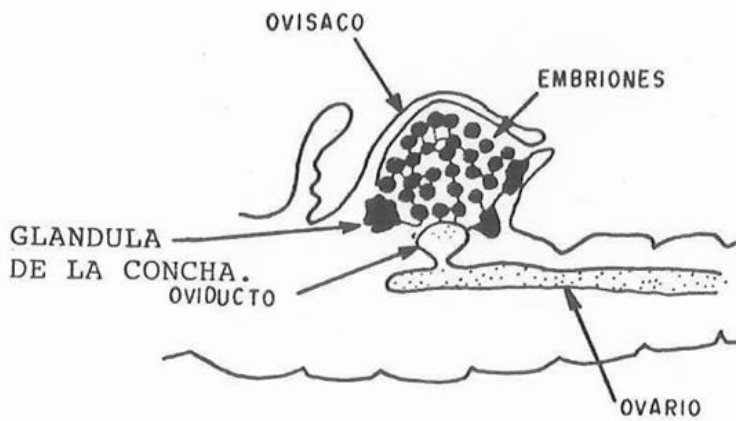


Figura 6.-Vista lateral del aparato reproductor de una hembra adulta de Artemia.

Del ovisaco de la hembra se pueden liberar quistes o larvas nauplio. La secreción de la glándula de Brown juega un papel importante para determinar el producto que saldrá del ovisaco, larvas nauplio ó quistes.

Aparato respiratorio.

No posee órganos específicos denominados branquias. La difusión de los gases se efectúa a través de las exopoditos de los 11 pares de toracópodos.

4. DESARROLLO Y REPRODUCCION

4.1 Criptobiosis o Diapausa

La reproducción tanto en las especies bisexuales como las partenogénéticas sucede mediante larvas libres o huevecillos conocidos como quistes. Estos últimos se forman cuando las condiciones externas se vuelven adversas para el desarrollo normal de Artemia, o sea, aumento de la salinidad, variación en la temperatura, disminución en concentración de oxígeno disuelto, falta de alimento, y otras. Bajo estas condiciones el desarrollo embrionario se suspende en el estadio de gástrula, almacenando trihalosa como reserva de carbohidratos y cubriéndose la superficie de cada embrión con un cascarón compuesto de lipoproteínas y hematina, segregada por la glándula de Brown, llamado corión. En tal condición de vida latente, o de quiste, como comúnmente se conoce esta etapa de desarrollo embrionario suspendido, Artemia puede permanecer por largos periodos de tiempo hasta que las condiciones en el medio ambiente son favorables para continuar el desarrollo.

De esa forma se asegura la continuidad de la especie a pesar de las condiciones ambientales. Tal estado de enquistamiento recibe varios nombres, criptobiosis (vidauculata) o estado de diapausa (latencia fisiológica).

Ahora bien, a los factores que intervienen directamente en la interrupción de este estadio de vida latente, se les llama inhibidores de la diapausa, esto es condiciones ambientales de desarrollo, como son : hidratación del quiste favorecido por bajas salinidades (28-30 ppm), incremento del metabolismo mediante temperatura de 25-28 grados C., niveles altos de oxígeno disuelto (cercano a la saturación), y control del pH en un rango de 7.5 a 8.0.

La exposición a luz intensa al menos una hora, favorecen el despertar del quiste, inhiben el estado de diapausa (Sorgeloos, 1973; Vanhaecke et al., 1981).

4.2 Desenquistamiento

El proceso de desenquistamiento, se inicia con la hidratación del quiste (Wheeler et al., 1979). Clegg (1964) menciona que tal desenquistamiento sucede debido principalmente a un aumento de la presión osmótica interna, lo cual alcanza valores casi dos veces la del medio externo. En salinidades de 35 ppm la presión osmótica alcanza valores de 24 atm aproximadamente y los máximos valores de la presión osmótica interna alcanzada en el quiste es de casi 47 atm.

Sin embargo cuando la presión osmótica externa alcanza valores cercanos y mayores de 65 atm (aproximadamente 2.0 M NaCl) se inhibe el desenquistamiento, la presión osmótica interna no favorece la ruptura del corión y membranas. En el medio ambiente la presión osmótica se debe principalmente al NaCl en tanto que la presión osmótica interna del quiste se debe principalmente al glicerol.

El glicerol se forma a partir de la trihalosa. Esta es un sustrato respiratorio que durante el despertar del quiste se transforma en glicògeno y glicerol. El glicerol se ha localizado en dos partes del quiste, en el embriòn y entre el embriòn y el corión. El glicerol del embriòn es metabolizado después de emerger en tanto que el glicerol inter-coriòn es liberado al medio. (Clegg, 1964)

El consumo de oxígeno, observado en los quistes hidratados es un parámetro de la actividad metabòlica, el cual implica la participación de enzimas. (Vallejo et al., 1980). En el estadio de diapausa la cantidad de agua presente es mínima de tal forma que toda actividad bioquímica, en la que participan las enzimas sobre sus sustratos se encuentra suspendida. En la rehidratación del quiste se favorece que se reestablezcan los procesos bioquímicos.

Marco et al., (1980) sugieren que la activación del quiste "dormido" tal vez sea debido a la acción de enzimas con actividad proteolítica que tienen su precursor almacenado dentro del quiste y que inicia su actividad después de la eclosión. Vallejo et al., (op. cit.), han observado actividad de la enzima citocromo-oxidasa, poco después de la hidratación del quiste, lo cual se incrementa al elevar la temperatura a valores característicos de la variedad de Artemia y mencionan que esta enzima (previa hidratación del quiste) es el sensor del oxígeno molecular que inicia el metabolismo.

Se ha encontrado que la continuación del desarrollo del quiste sucede posterior a la hidratación, con un aumento del pH interno de 7 a 8 aproximadamente y debido a la presencia de oxígeno molecular. En valores de pH cercanos a 8 la actividad de varias enzimas se incrementa, (Sato, 1967) esto es un proceso reversible pues la disminución de oxígeno molecular disponible suspende la actividad enzimática y se regresa el estado de diapausa. La repetición de este proceso en ambos sentidos resulta en la disminución de viabilidad de quiste.

4.3 Desarrollo Larval

Se considera el inicio del desarrollo larval desde el momento en que la larva rompe el conión para empezar así su

vida libre. Se diferencian tres fases muy claramente, estas etapas de emergencia han sido clasificadas con anterioridad por varios investigadores Jenning y Whitaker, 1941; Sato, 1966a).

El primer estadio de emergencia (E-1) es en el que la región de la cabeza emerge del corión y permanece aun dentro de una capa de doble membrana, es el momento en que se rompe el corión. El estadio de emergencia segundo (E-2), es aquél en que el nauplio ha emergido completamente del corión, pero permanece aún cubierto por una sola membrana (la interna). El tercer estadio (H), es el momento de la eclosión, en el cual la larva se libera de la membrana y resulta un nauplio de nado libre. Este proceso se conoce con el nombre de desenquistamiento, figura 7.

El nauplio recién eclosionado.- Mide alrededor de 450 a 550 micras variando según la raza u origen reproductivo. Tiene la forma característica de pera, es de color amarillo-naranja a casi incoloro y presenta un ligero adelgazamiento entre la región cefálica y el tronco. El ojo nauplio está pigmentado, tiene tres pares de apéndices que darán origen a las antenas, antenulas y mandíbulas posteriormente.

Existen varios esquemas que describen el desarrollo de Artemia.

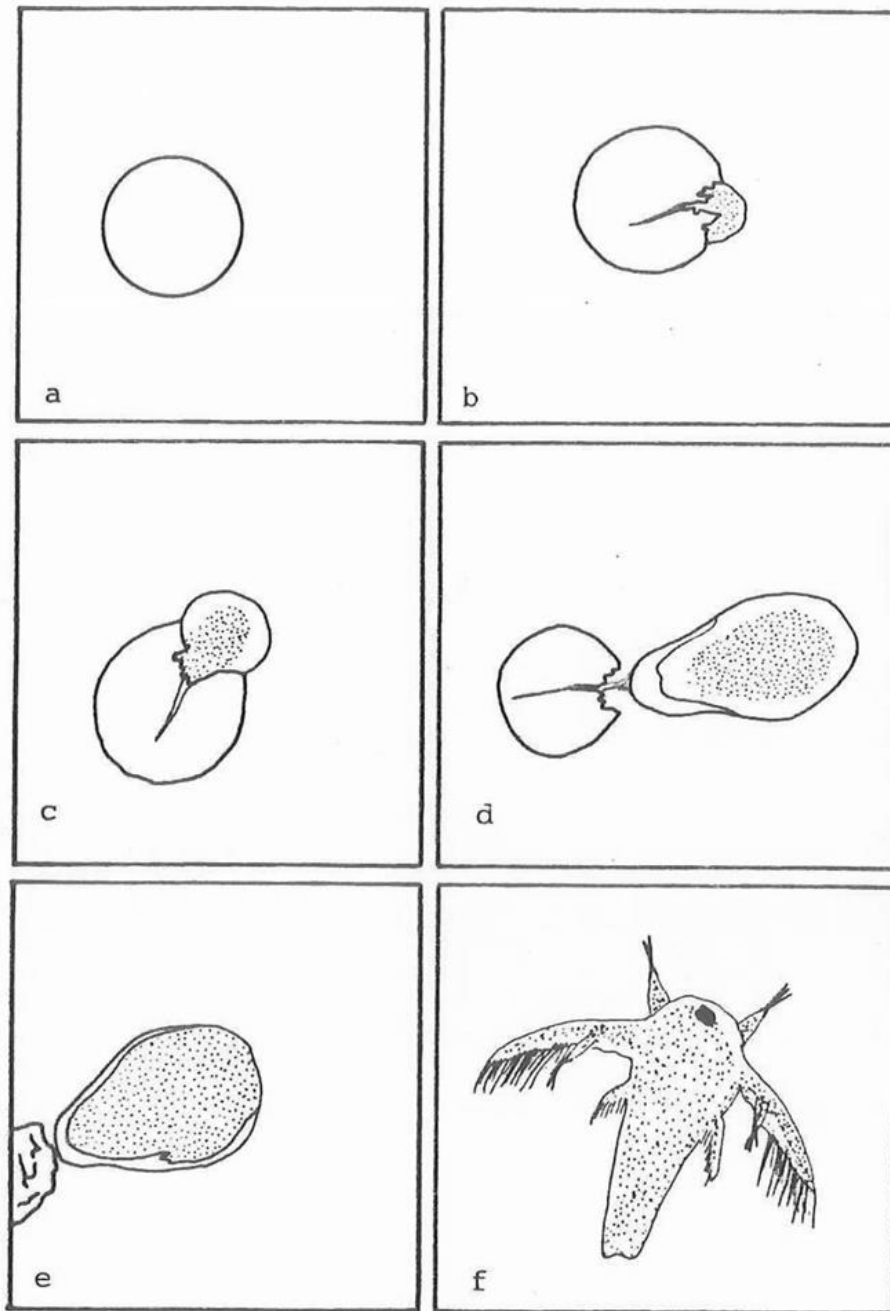


Figura 7.-Proceso de eclosión de Artemia. a) Quiste hidratado. b) Ruptura del Corión. c) Emergencia del nauplio, estadio E-1. d) Nauplio recién emergido, estadio E-2 e) Nauplio cubierto por una membrana de eclosión. f) Nauplio libre de membranas de eclosión. (De acuerdo a Wheeler et al., 1979).

Barigozzi (1939) utiliza una nomenclatura arbitraria que divide los estadios de desarrollo del ciclo de vida de Artemia en fases claramente distinguibles con un lente estereoscópico: Nauplio, larva recién eclosionada y corresponde al Instar I descrito por Heath (1924). Metanauplio I (forma triangular), metanauplio II (semejante al anterior pero más elongado), metanauplio III (larva en forma torácica), metanauplio IV (aparecen los primeros apéndices torácicos móviles, estos aumentan su tamaño y las antenas modifican su posición a paralela con la cabeza); en estas fases alcanzan una longitud que va desde 1.0 a 4.0 mm y corresponden a las fases de Instar II, III, IV, y V-VI Y VII-VII descritas por Heath (op. cit.) respectivamente. La fase de Juvenil se caracteriza por tener ojos pedunculados, abdomen elongado y segmentado, la furca se hace evidente y parecen adultos pequeños. En esta fase se alcanza una longitud de 5-7 mm y corresponde a los estadios de instar IX a XI de Heath (op.cit.). Finalmente, el adulto se caracteriza por tener un desarrollo completo de las antenas como órganos de sujeción durante la cópula, que le permite nadar abrazado de la hembra. En la hembra aparecen las bolsas ovigeras y se alcanza una longitud de 7 a 10 mm. Lo anterior corresponde al instar XII a XV, Heath (1924).

Anderson (1967), describe el desarrollo larval de Artemia salina a partir de quistes de California (U.S.A.),

atendiendo principalmente a características de desarrollo histológico. La fase I corresponde a un tamaño de 450-750 μm de longitud y presenta una coloración anaranjada debida a la presencia de vitelo. Esta fase esta caracterizada por un par de antenulas unirramias setadas, un par de antenas birramias de mayor longitud con un número de setas que son las estructuras que practicamente permiten la locomoción del nauplio y finalmente un par de apéndices más (mandíbulas), que son cortos, unirramios y con setas rudimentarias. Esta fase tiene una duración de 20 horas aproximadamente (a temperaturas de 20 g.c.) y termina con la primera muda. En la fase II se ha incrementado la longitud a 630 μm y la coloración es menor. La acción natatoria debida a las antenas ahora es más vigorosa. Las antenulas no presentan gran modificación, las antenas en contraste tienen una mayor longitud y las setas (que son más elongadas) se presentan articuladas. Las mandíbulas muestran un mayor desarrollo de las setas. Durante el desarrollo final de esta fase, se observa la pigmentación del ojo nauplio y la región del mesodermo del cuerpo presenta anillos somáticos de los tres primeros segmentos del cuerpo. Esta fase tiene una duración de 10 horas y termina con una segunda muda. La fase III se inicia cuando la larva emerge de la segunda muda y ha crecido un poco más (a 725 μm). El intestino esta diferenciado y el contenido del vitelo casi se ha consumido. En las antenulas las setas

terminales son vestigiales, en las antenas se observa un completo desarrollo en las setas del endópodo, las setas mandibulares permanecen sin cambios. Durante esta fase se inicia la alimentación exógena. La duración de este estadio es de 40 horas y termina con una tercer muda. Posterior a la tercer muda sucede la fase IV, donde se observa un desarrollo setal articulado en el exópodo de las antenas, la región postmanibular aumenta su longitud. La longitud de Artemia ahora es de 800 μ m. Aparecen los primeros muñones de los toracópodos en el tronco, así como las de las maxilas y maxilulas bajo el borde posterior del labrum. Según Anderson (1967), esta fase, que es la última que analiza, corresponde a la fase instar II descrita por Heath (1924).

La descripción que hace Heath (1924) de las fases de desarrollo las denomina instares y separa cada instar en varias mudas de acuerdo a la diferenciación estructural observada. En sus observaciones utilizó Artemia de la localidad de Redwood City, California (U.S.A.) que presenta una longitud en estado adulto de 9.5 a 10 mm aproximadamente, figuras 8 y 9.

Instar I. Llamado larva recién eclosionada, es típicamente un nauplio, con una coloración anaranjada debida al vitelo. Consta de tres pares de apéndices

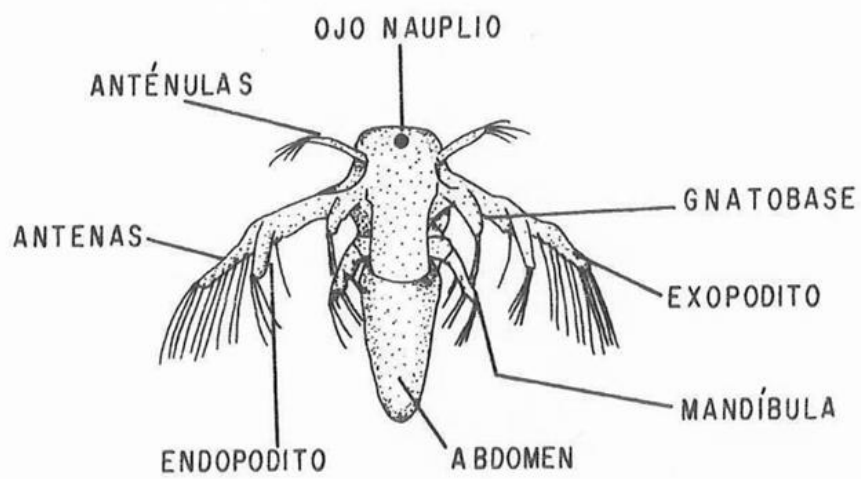


Figura 2.- Nauplio recién eclosionado, Vista ventral (Heath, 1924)

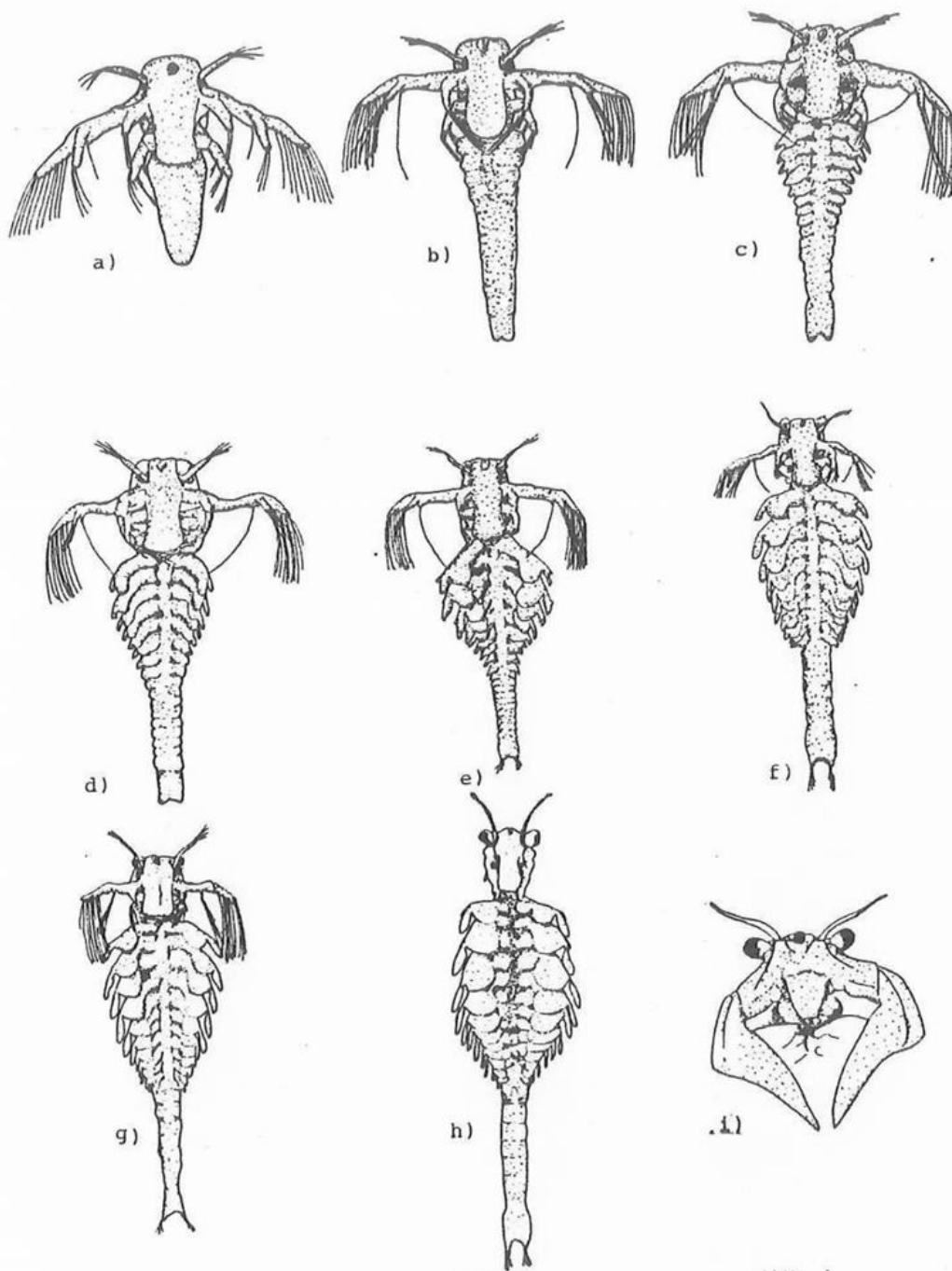


FIGURA 9.- Estadios de desarrollo de *Artemia*. a) Instar I; b) instar II; c) instar III; d) instar IV; e) instar V; f) instar VI; g) instar VII; h) instar VIII; i) cabeza del macho en instar XI.

(anténulas, antenas y mandíbulas), en la región ventral el labrum es una estructura predominante. El ojo nauplio está escasamente pigmentado. Las anténulas son cortas y presentan tres setas cada una. Las antenas birramias son estructuras de locomoción que presentan el endopodito pequeño y el exopodito más desarrollado con un mayor número de setas. Las mandíbulas son mucho más pequeñas que las antenas. Durante los 2-3 días siguientes el vitelo celular es consumido y aparecen levemente los muñones de los primeros toracópodos así como los de las maxilas y maxilulas. Se inicia la alimentación exógena. El tamaño promedio es de 0.4 mm.

Instar II. Una estructura que es determinante de esta fase es la marcada pigmentación del ocelo (ojo nauplio). Los ojos compuestos son notorios aunque sin pigmentación. El número de setas se ha aumentado así como su longitud. Las maxilas y maxilulas aparecen con la misma forma que tendrán en fases posteriores. Aparecen fuertemente marcados los muñones de los cuatro primeros apéndices natatorios. El cuerpo alcanza una longitud promedio de 0.6 mm.

Instar III. En esta fase los ojos compuestos se encuentran pigmentados, las anténulas y las antenas permanecen sin modificaciones durante este estadio de desarrollo. Es característico de esta fase la presencia de

los enditos (endopoditos modificados) de los tres primeros apéndices natatorios, así como la estructura Flabellum (elongación del apéndice en forma de abanico). El tamaño de esta fase es de 0.9 mm.

Instar IV. Aparece el flabellum en los siete pares de toracópodos y en los cinco primeros, los enditos aparecen bastante definidos. Aparecen los 18 segmentos en el cuerpo. La longitud promedio alcanzada es de 1.2 mm.

Instar V. La característica de esta fase es la presencia del flabellum en los primeros nueve pares de apéndices, en cambio, solo ocho muestran el sexto endito. Los ojos compuestos aparecen completamente pigmentados. El promedio de longitud alcanzada en esta fase es de 1.4 mm.

Instar VI. En esta fase, aparecen definidos todos los apéndices natatorios y solo 3 ó 4 no muestran claramente definidos los enditos. La longitud promedio máxima alcanzada es de 1.6 mm.

Instar VII. Todos los apéndices muestran definición de los enditos, aparecen indicios del desarrollo de la papila genital en la hembra y las papilas laterales en los machos. Se observa modificación en la forma de las antenas de los machos. La talla promedio alcanzada es de 2.0 mm.

Instar VIII. En ambos sexos las antenas dejan de formar un ángulo recto (aproximadamente) con el eje longitudinal del cuerpo, el cual se rota y en la mayoría de los casos, pasa a formar una paralela con el plano sagital del animal. Así mismo, en ambos sexos, el palpo mandibular pierde sus setas (en organismos preservados aparece encogido). El tamaño promedio de esta fase es de 2.4 mm.

Instar IX. Se observa un aumento de tamaño en las antenas del macho y el eje del exopodito forma ángulo obtuso con el protopodito (de la misma antena) lo cual causa que las puntas de éstas se junten hacia la parte media del organismo. Las hembras permanecen casi sin cambios notables en esta fase y las posteriores, sin embargo la longitud promedio es de 3.4 mm.

Instar X. En los machos el tamaño de las antenas es mayor y el ángulo del exopodito y el protopodito hacen que las puntas de las antenas se crucen por la parte media de Artemia. Aparecen las protuberancias frontales de las antenas en la cara interna de éstas. En ambos sexos las antenas constan de protopodito y exopodito, el endopodito ha desaparecido completamente. La longitud promedio de esta fase es de 4.7 mm.

Instar XI. En esta fase, prácticamente las antenas del macho han sufrido su completa modificación, el exopodito ha alcanzado su máximo desarrollo, se encuentra completamente aplanado, y el protopodito es bastante fuerte. Las protuberancias frontales se han desarrollado al máximo. La talla máxima promedio es de 5.2 mm.

Instar XII. En este estadio, normalmente maduros, se les encuentra con mucha frecuencia formando parejas. Y las hembras pueden tener dos tamaños, en uno la hembra parece que permanece en estadio Instar XI, pues es más pequeña que el macho, en el otro ambos tienen la misma longitud. Como en la mayoría de los crustáceos la formación de parejas y la cópula sucede después de una muda. El tamaño promedio ahora es de 6.4 mm.

En las fases posteriores, el único cambio notable es el aumento en longitud (6.9 mm. en Instar XIII hasta alcanzar 9.5-10.0 mm. en Instar XV y una mayor amplitud entre los ojos pedunculados. Esto sugiere mudas posteriores. Sin embargo, el hecho de un incremento en la longitud deja incierta la existencia de una fase posterior al Instar XV.

4.4 Reproducció

La diferenciación sexual de caracteres secundarios externos es bastante notable, según sus características, el macho se diferencia rápidamente de la hembra. El macho posee un par de antenas transformadas en apéndices prensiles mediante las cuales éste se abraza a la hembra en la zona anterior al ovisaco, para así favorecer la cópula.

El aparato reproductor del macho contiene todas las estructuras en pares, dos testículos, dos canales eferentes y dos penes, de los cuales únicamente introduce uno durante la cópula. (Ver figura 5).

Los ovarios de la hembra son dos tubos colocados uno a cada lado del tracto digestivo en el abdomen. A lo largo de los ovarios se encuentran bandas de ogonias y son más abundantes en el lado ventral, cuando los oocitos están en la parte lateral de los oviductos, la copulación es efectiva. (Ver figura 6).

La reproducción de Artemia, es uno de los aspectos más espectaculares de su biología, ya que puede presentar reproducción bisexual (con presencia de machos y hembras normalmente en igual proporción) y reproducción

partenogenética (generalmente telitoca). No se ha encontrado ninguna raza, cepa ó variedad que pueda alternar ambas formas cíclicamente, como en algunos otros crustáceos o rotíferos.

Dentro de los dos tipos de reproducción bisexual o partenogenética, las hembras darán lugar a dos tipos de huevos.

Los que siguen el desarrollo embrionario, totalmente, en el interior del útero (ovisaco) de la hembra y nacen directamente en forma de nauplios completamente desarrollados (proceso ovoviviparo).

El otro tipo son los que alcanzan el estado de blástula avanzada o gastrula incipiente y cesan su desarrollo, cubriéndose de un corión, compuesto protéico con núcleo de hierro, procedente de las glándulas de la cáscara o cápsulas de Brown y son expulsados por la hembra como quistes o huevos císticos, (proceso oviparo).

Algunos autores (Mathias, 1932; Lochhead, 1940; 1941; Dutrieu, 1960), han diferenciado dos tipos de quistes. Unos que pueden eclosionar inmediatamente después de la ovoposición apareciendo los nauplios poco después de haber sido expulsados por la hembra. Otros en estado de

criptobiosis o de diapausa, que no eclosionan inmediatamente y deben esperar un tiempo en esta condición para su eclosión.

En las razas de Artemia que presentan reproducción bisexual la dotación cromosómica suele ser diploide, mientras que en las partenogenéticas es típica la poliploidia (tetraploides, octaploides). En las razas partenogenéticas ocasionalmente aparecen machos (0.1 %). Estos machos parecen no ser funcionales, no inciden en el comportamiento reproductivo de las hembras con las que aparecen, aunque se cree que permiten alguna variación genética dentro de la población, tampoco pueden aparearse según experimentos, con hembras de cepas bisexuales (Amat, 1985).

En las cepas bisexuales, cuando se presenta la maduración sexual, el macho se abraza a la hembra mediante las antenas en forma de tenaza para conseguir el cabalgamiento del macho sobre la hembra en posición dorsal lo que favorecerá la cópula. Ambos nadarán firmemente unidos por largo tiempo durante y después de que la fecundación se haya completado.

Durante éste tiempo la ovogénesis ha progresado en la hembra, lo que es perfectamente observable gracias a la

transparencia general del cuerpo del animal.

Previo al desarrollo de la ovogénesis, en el abdómen de las hembras solo se ve la línea del tubo digestivo, a causa de lo opaco de su contenido. La observación de estas hembras adultas maduras presentan la aparición de unas pequeñas manchas opacas a lo largo de los ovarios, en forma de rosario a ambos lados del tubo digestivo.

Los ovarios están formados por cuatro tipos de células : células germinales (presumiblemente oogonias), células nutritivas, oocitos y células foliculares (Iwasaki, 1970). Las células germinales al dividirse dan origen a las células nutritivas y a los oocitos. Las formas de rosarios opacas son los oocitos que empiezan a acumular vitelo en su citoplasma, su aparición no es totalmente sincrónica, pueden pasar hasta 8 horas entre la manifestación de los primeros y los últimos. Los óvulos van creciendo en tamaño durante los días sucesivos, tiempo que varia según las distintas razas de Artemia. Las células nutritivas tiene una duración muy corta. Los oocitos pasan a los oviductos. En estas circunstancias parece que los oocitos se encuentran todos en primera metafase meiótica o en la fase equivalente para las cepas partenogenéticas, después de pasar los oocitos a los oviductos, empieza a desarrollarse en los ovarios una nueva generación, de óvulos.

Existe un periodo cuando la cópula efectiva se ve restringida, y es en circunstancias en que las hembras hayan completado recientemente su muda. La fecundación solo es efectiva cuando los oocitos se encuentran en los sacos laterales de los oviductos y en el útero. Además las hembras no tienen capacidad para almacenar el esperma introducido por los machos en una fecundación anterior (Amat, 1985).

Tras permanecer varias horas en los oviductos, los oocitos son fecundados al alcanzar una fase avanzada de maduración y pasan el útero donde se verifican las primeras divisiones o segmentaciones del huevo.

El desarrollo embrionario se completa en el útero, hasta que la hembra expelle los nauplios recién eclosionados, aunque un pequeño número de huevos en ocasiones se desarrollarán defectuosamente. La secuencia es la misma para el caso de formación de huevos císticos. En ocasiones se presenta una superposición de generaciones, aunque estas nunca lleguen a mezclarse.

Este ciclo reproductivo puede durar 4 y 6 días. Con esta misma frecuencia las hembras de *Artemia* efectúan expulsión de nauplios o de huevos císticos, cuyo número total es muy variable, dependiendo de las cepas, de las

condiciones del medio (salinidad y alimento) y de la edad de la hembra. La primera puesta de un ejemplar maduro oscila entre 10 y 30 nauplios o huevos cisticos por puesta, mientras que los ejemplares de edad más avanzada, en perfecto estado reproductivo, pueden dar entre 100 y 400. (Amat, 1985).

Los huevos en el ovisaco, pueden seguir su proceso normal ovoviviparo y originar nauplios que nacen directamente de la hembra. Si las glándulas de la cáscara están activas, segregan una substancia con alto contenido de hematina, de composición química relativa la hemoglobina que recubre al huevo, formando el corión. Si la secreción es copiosa, da un color pardo rojizo de diversos tonos, según las cepas, formando un huevo cistico, el cual puede permanecer durante mucho tiempo en criptobiosis. Si la secreción es menos abundante, el aspecto del quiste puede ser similar al anterior, pero eclosionan los nauplios a las pocas horas o pocos días después de haber sido expulsados por la hembra.

Los factores posibles que inducen esta activación de las glándulas de la cáscara y la consiguiente aparición del corión alrededor de los embriones gastrulados y sometidos a estado de vida latente pueden ser las condiciones del medio y las posibles combinaciones de

salinidad, temperatura, concentración de oxígeno, el tipo y abundancia de alimento y algunas otras. Se pueden sintetizar cantidades distintas de hemoglobina, variando igualmente su incorporación a la elaboración de la substancia base del corión de los huevos císticos por parte de las glándulas de la cáscara (Dutrieu, 1960).

Otros trabajos intentan explicar el fenómeno de la formación de quistes relacionándolo básicamente con la concentración de oxígeno en el medio. Cuando la concentración es cercana y menor a 2 mg O_2 /l. Se produce oviparidad, en tanto que niveles mayores pausan ovoviparidad.

El continuo "stress" debido a bajas concentraciones de oxígeno disuelto, y la presencia de iones Fe^{++} en el medio, parecen inducir una acentuada producción de huevos císticos.

Por lo tanto, aunque la elevada salinidad (y proporcional baja tensión de oxígeno) puede favorecer la producción de quistes, otros factores pueden influir también como el tipo de alimento la densidad de población, la edad de la hembra, y el origen de las cepas. En cultivos de laboratorio, realizados en el presente curso, bajo condiciones reguladas, se observaron ambos tipos de

reproducción entre distintos individuos de la misma población, apareciendo primer nauplios y posteriormente quistes en función de un aumento de salinidad (35 a 60 ppm) manteniéndose niveles de oxígeno casi constantes (6 - 7 ppm) con alimento a discreción y temperatura de 29 ± 1.5 g.c.

Los mecanismos responsables de la producción de quistes parecen ser más complejos y la explicación atribuible a una sola causa no es lo suficientemente amplia y satisfactoria.

En la literatura existente sobre el tema, se reflejan también estos esquemas procedentes de la observación de poblaciones naturales y en cultivo. Así, D'Agostino (1980) manifiesta que la primera puesta de hembras de Artemia siempre es ovovivipara, y que la reproducción por quistes (gástrula enquistada) es selectiva, ya que Artemia en condiciones "óptimas" de cultivo y alimentada con fitoflagelados "ad libitum", puede retrasar indefinidamente la producción ovipara.

Estos hechos pueden ser explicados a través de los procesos bioquímicos y fisiológicos de los carbohidratos en Artemia (Clegg, 1962, 1964, 1965, 1974; McDermott, 1974). Las hembras de Artemia adultas almacenan glucógeno como

material de reserva, este glucògeno serà empleado totalmente durante el proceso de ovulaciòn si èstas hembras no gozan de una alimentaciòn adecuada. Se comprueba experimentalmente que los niveles de glucògeno no disminuyen en hembras en ovulaciòn dotadas de una nutriciòn "ad libitum". En las hembras mal alimentadas, el glucògeno de reserva sufrirà una glucogenòlisis con incorporaciòn de glucosa a la hemolinfa, que serà utilizada por la propia hembra como fuente de energia en las células nutritivas de los oocitos, en los oviductos. Por otro lado, los bajos niveles de glucògeno en las hembras estimulan y ponen en marcha caminos biosintéticos alternativos, conducentes a la biosintesis y almacenamiento de trihalosa, carbohidrato de reserva, propio de los estados de criptobiosis.

Podria pensarse que la ovoviparidad de Artemia solo se dà en condiciones óptimas para ello, en ocasiones muy particulares. Pero más bien se podria pensar que la ovoviviparidad seria una adquisiciòn posterior, ya que Artemia suele vivir en medios en los que el agua persiste bastante tiempo y en donde èsta al abrigo de competidores, precisamente a causa de la elevada salinidad.

Resumiendo lo anterior, en las hembras partenogenéticas, la formaciòn de los óvulos se inicia con los oocitos en los ovarios, a los 2 días los oocitos se

transforman en óvulos y pasan a los oviductos laterales, permanecen aquí un día, y después pasan al útero donde continúan su desarrollo hasta gástrula, o bien, alcanzan el estado de nauplio y son liberados por la hembra, se dice que hasta 12 meses puede estar en reproducción una hembra partenogenética.

En el caso de ovoviviparidad, se han observado hembras partenogenéticas que expulsan 300 nauplios por puesta cada 5 días durante toda su vida, la cual puede prolongarse hasta 12 meses.

En la oviparidad, la glándula de la cáscara o glándula de Brown desarrolla gran actividad y es en este tipo de reproducción cuando se puede observar la glándula que en otros casos es difícil de ver. Dicha glándula segrega la sustancia que forma la concha o cascarón de los quistes, antes de ser liberados por la hembra. Durante el desarrollo de los embriones, en el saco ovigero se continúa formando y desarrollando nuevos oocitos, así la Artemia origina una descendencia numerosa.

5. FISILOGIA DE ARTEMIA

5.1. Consumo de Oxígeno.

Siendo el oxígeno molecular el aceptor final de protones en la fosforilación oxidativa del ciclo de los citocromos del ciclo de Krebs, se considera el consumo de oxígeno como un parámetro del metabolismo animal. Lo cual significa en que medida se está generando la energía necesaria para el desempeño de las funciones celulares.

En Artemia el consumo de oxígeno se observa desde el estadio de quiste, posterior a la hidratación. Clegg y Conte (1980) mencionan que posterior a 30 minutos de hidratación sucede un incremento en consumo de oxígeno por varias horas con una disminución conforme se aproxima la emergencia del nauplio. Se observa otro incremento del consumo de oxígeno al momento de la eclosión. Marco et al., (1980a; 1980b) refieren la acción de consumo de oxígeno en el quiste debida a la actividad de la enzima citocromo oxidasa durante el "despertar" del quiste, por otra parte, atribuyen a ésta molécula la capacidad de ser el sensor del oxígeno molecular disponible, que inicia y suspende el proceso del desarrollo embrionario.

El intercambio gaseoso sucede a través de las membranas cuando Artemia se encuentra en estadio de quiste

y primeros estadios de nauplios. Conforme avanza el desarrollo de Artemia el consumo energético es mayor pero también aumenta la superficie corporal que favorece la difusión gaseosa, sin embargo, a partir de una talla de 2 mm aproximadamente ya se encuentran funcionando otras estructuras como sitios de intercambio gaseoso. Conte (1977) y Conte et al., (1980) proponen que en los primeros estadios de desarrollo de Artemia la simple difusión pasiva gaseosa (oxígeno y bióxido de carbono) es un mecanismo adecuado para suplir las necesidades respiratorias, y cuando la concentración de oxígeno es menor que 1.0 ml/l se estimula un mecanismo anaeróbico facultativo extracelular en contraste con la estimulación y producción de hemoglobina en estadios posteriores. Las estructuras que favorecen el intercambio gaseoso son los exopoditos de los toracópodos (Amat, 1985). Una vez que Artemia alcanza su desarrollo el número final de toracópodos es de 11 pares.

El rango de concentración de oxígeno que puede soportar Artemia es de 1 ppm de oxígeno disuelto hasta sobresaturación, (150 %), condiciones que se observan en el medio natural cuando se eleva la salinidad o cuando suceden altas densidades de microalgas respectivamente. Debido a ésta característica se considera a Artemia como un

organismo típico euroxibionte (Persone y Sorgelcos, 1980).

Entre los efectos que modifican el consumo de oxígeno se encuentra el sexo y salinidad. En los trabajos de Gilchrist (1956; 1958) se encuentra que el consumo de oxígeno en hembras adultas no cambia notablemente al elevar la salinidad, en cambio, machos adultos mostraron disminución significativa cuando se mantuvieron en salinidades menores de 35 ppm, así mismo, Gilchrist (1954) reporta que adultos de ambos sexos responden a bajos niveles de oxígeno disuelto en altas salinidades mediante la síntesis de más hemoglobina.

Como se menciona previamente la temperatura tiene un efecto notable en el consumo de oxígeno. Engel y Angelovics (1968) encontraron una relación directa entre consumo de oxígeno y temperatura, observando tasas metabólicas cercanas a cero en temperaturas entre 5 y 8 g.c. Para una misma temperatura la tasa respiratoria disminuye (de 0.89 a 5 ppm y 0.43 a 200 ppm.) cuando se aumenta la salinidad, lo cual es un comportamiento común en Artemia pues también corresponde a lo reportado por Eliassen (1952), en que un aumento en la salinidad causa reducción de la tasa respiratoria en Artemia, lo cual está correlacionado con el "stress" osmótico que enfrenta a salinidades elevadas. Así mismo se menciona que el efecto de la salinidad sobre el

Q_{10} es casi independiente del de la temperatura sobre el consumo de oxígeno ya que los patrones de Q_{10} son muy semejantes en distintas salinidades. Sin embargo este aparente contraste bien puede deberse a las diferencias genéticas en los animales utilizados experimentalmente, lo cual hace difícil comparar resultados de varios investigadores que hayan utilizado los quistes de distintas localidades, por ejemplo Kratowich (1964) citado por Engels y Angelovics (1968) no encontró efecto significativo de la salinidad sobre la respiración de Artemia en salinidad mayor de 90 ppm. De las investigaciones hechas sobre respiración en Artemia se conoce que el mecanismo que utiliza cuando el oxígeno disponible no es el adecuado, es la síntesis de pigmentos respiratorios de mayor afinidad con el oxígeno molecular, como la hemoglobina.

La sangre de Artemia está constituida por células sanguíneas que carecen del pigmento respiratorio heme por lo que se asume que no intervienen en los procesos respiratorios. Los pigmentos respiratorios, hemoglobinas, son proteínas solubles que no se encuentran encerrados en una célula sanguínea (Lockhead y Lockhead, 1941). La capacidad de ganar o perder hemoglobina extracelular se ha observado que es dependiente de la cantidad de oxígeno disuelto disponible. Ahora bien, el proceso de disminución

de oxígeno disuelto en los medios naturales está altamente correlacionado con el aumento en la salinidad y ésta a su vez presenta un efecto sobre la tasa respiratoria por lo que no es un mecanismo simple el que influye en la síntesis de la hemoglobina. Lo que sí es un punto claro, es que un pigmento de alta afinidad por el oxígeno, como es la hemoglobina, resuelve el problema que enfrenta Artemia de : bajos niveles de oxígeno disuelto, mayor gasto energético debido al "stress" osmótico, causado por alta salinidad.

5.2 Pigmentos Respiratorios

Otro aspecto importante en respiración de Artemia es la relación que existe entre concentración de oxígeno disponible y tasa respiratoria. Declair et al., (1980) encontró que Artemia es un organismo cuya tasa de consumo de oxígeno es independiente de la concentración de oxígeno, el valor de la tensión crítica (P_c) es de 2 ml. oxígeno/l. Por debajo de la P_c pierde su capacidad reguladora. En condiciones de saturación de oxígeno disuelto el efecto de la temperatura (rango de 5 a 35 g.c.) es intenso, obteniéndose valores de Q_{10} de 2. Organismos activos (nadando) consumen mayor cantidad de oxígeno y al elevar la temperatura el consumo es mucho mayor, (casi dos veces más).

La respuesta a corto plazo de Artemia en condiciones de anoxia es el metabolismo anaeróbico. El consumo de glicógeno es casi de la mitad de las reservas en la primera hora de estar en condiciones de anoxia con la producción de ácido láctico, propionato y butirato, en la siguiente hora de acumulación de lactato disminuye (Declair et al., 1980). A largo plazo, en condiciones de hipoxia, Artemia tiene la capacidad de sintetizar pigmentos respiratorios más eficientes. Se conoce que son sintetizadas hemoglobinas (Hb) con afinidad distinta de acuerdo a la intensidad de la condición de hipoxia. La Hb-1 es la primera en aparecer, ésta es más abundante cuando las condiciones del medio no son severas, y por lo general también está presente la Hb-2. Cuando la concentración de oxígeno disuelto alcanza valores menores de 30 % de saturación disminuye la presencia de Hb-1 y aparece la Hb-3, en tanto que la cantidad de Hb-2 permanece casi constante hasta alcanzar la concentración de oxígeno disuelto de 10% .

Estos tres tipos de hemoglobinas presentan propiedades distintas. En pH de 8.5 la afinidad (valores de P_{50}) es de 6.5, 4 y 1.8 para Hb-1, Hb-2 y Hb-3 respectivamente. El efecto de Bohr es mayor en Hb-2 que en Hb-1, y en general la afinidad disminuye cuando aumenta la temperatura para los tres tipos de Hb, sin embargo en Hb-3 éste efecto es mucho menor.

La biosíntesis de hemoglobina no sucede antes de la eclosión (durante el desarrollo de la gástrula). La mayor tasa de síntesis se observa para Hb-2 y Hb-3 en el nauplio de 2-3 días de eclosionado y el factor que regula la síntesis de hemoglobina es la salinidad y presencia de oxígeno (el oxígeno disuelto es función de la concentración). Heip et al., (1980) atribuyen al factor ontogenético ser el regulador de la síntesis de hemoglobina, lo cual es bastante razonable puesto que cada variedad de Artemia llega a ocupar biotopos con diferencias distintas.

En estudios bioquímicos de las hemoglobinas de Artemia se menciona la existencia de una hemoglobina distinta a las anteriores de estructura muy semejante a Hb-2 y distinta de Hb-3. Bagshaw (1980) le denominó Hb-x (Hb-N), por otra parte, Heip et al., (1980) aduce que faltan más evidencias para determinar que sean en realidad dos hemoglobinas distintas lo que muestran los cromatogramas, y que se menciona como Hb-2 y Hb-N.

5.3 Control Iónico y Osmótico.

La capacidad de Artemia para enfrentar cambios considerables de la salinidad del medio es bastante

notable. Los cambios que soporta muchas veces suceden rápidamente por lo cual no es correcto asumir que Artemia tenga facultades de aclimatarse o soportar tales variaciones en el medio si no más bien posee estructuras que le permiten realizar un control osmótico efectivo para soportar los rigores del medio ambiente.

Las estructuras que permiten el control iónico y osmótico son funcionales y están presentes desde el momento de la eclosión. La concentración y composición del medio interno del nauplio de Artemia es considerablemente más baja que la del medio externo (Conte, 1977., Conte et al., 1972a; 1977). Esta regulación implica la existencia de alguna estructura que le permite la incorporación de agua del medio y la eliminación del exceso de iones.

En el cefalotórax existe una estructura que es la responsable de esta actividad reguladora, generalmente se le nombra órgano del cuello y siendo el órgano responsable del equilibrio de agua y electrolitos, muy semejantes a otros órganos de control de sal, también recibe nombre de glándula larval de la sal.

Recién eclosionada Artemia no enfrenta problemas de regulación osmótica pues posee un mecanismo hiperosmótico debido al sistema trihalosa-glicerol sin embargo, si es

necesario que se realice el control iónico de Na^+ y Cl^- , para lo cual se lleva a cabo la síntesis de la enzima ATPasa Na^+-K^+ , y el transporte y control iónico sucede en la glándula de la sal, donde existe mayor actividad de esta enzima.

Durante el desarrollo de Artemia se observa una transición en el mecanismo del control iónico y osmótico. Conforme el tracto se hace funcional los apéndices del torax aumentan en número y estructuras.

Es a través del epitelio de los toracópodos donde sucede el intercambio iónico y a través del epitelio intestinal donde sucede la incorporación del agua. Clegg y Conte (1980) mencionan que a partir del último instar desaparece, por autólisis y reabsorción, la glándula larval de la sal y es cuando son plenamente funcionales otras estructuras como reguladoras del agua y la sal.

Sin el mecanismo de control iónico y osmótico, sería de esperar que Artemia tuviera una concentración semejante a la del medio, sin embargo no sucede así y se postula como mecanismo regulador la ingestión activa de agua para compensar la pérdida por difusión, y para la eliminación de las sales que acompañan el agua ingerida, un sistema de

transporte activo hacia el exterior de iones, principalmente de Na^+ y Cl^- . La ingestión de agua sucede a través de la boca y se reabsorbe en el intestino, en tanto que el transporte iónico hacia el exterior sucede en los toracópodos, figura 10.

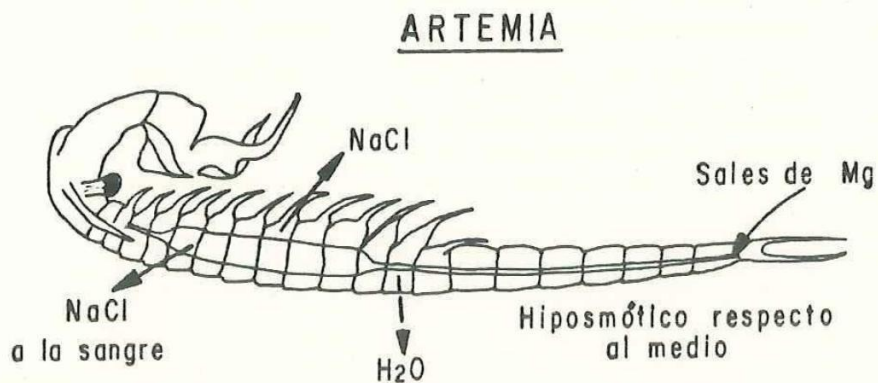


Figura 10.-Principales vías de los movimientos de agua e iones. Las flechas completas indican movimientos activos; las flechas punteadas, movimientos pasivos.

La capacidad osmoreguladora de Artemia sucede en ambos sentidos. Es decir, en un medio muy concentrado (salmuera) los fluidos interiores de Artemia son hipotónicos respecto al medio, en cambio en agua de mar diluida más del 25 % (aproximadamente 8.7 ppm) los fluidos internos son hipertónicos. Croghan (1957) obtuvo sobrevivencia con Artemia por varias semanas en agua con un 0.26 % de cloruro de sodio. En agua dulce Artemia adulta no sobrevive por más de 24-36 horas. Lo anterior demuestra de un alto grado de permeabilidad y la presencia de un mecanismo activo para la captación de sales (NaCl) y eliminación de agua.

La situación de aguas diluidas a una concentración menor que la concentración de los fluidos internos, de Artemia, no es una condición natural en los biotopos que esta habita, y aunque puede presentarse tal condición esporádicamente (debido a lo cual posee la capacidad de hiperosmoregular), más bien sucede lo contrario y el control osmótico es de un organismo hiposmoregulador. En la figura 11 se aprecia la respuesta de Artemia de ser un organismo ampliamente hiposmoregulador y levemente hiperosmoregulador por condiciones de salinidad distintas.

La permeabilidad de Artemia no es homogénea en toda la superficie corporal. Croghan (1958b) encontró que el tracto digestivo es una región altamente permeable en comparación del resto del cuerpo.

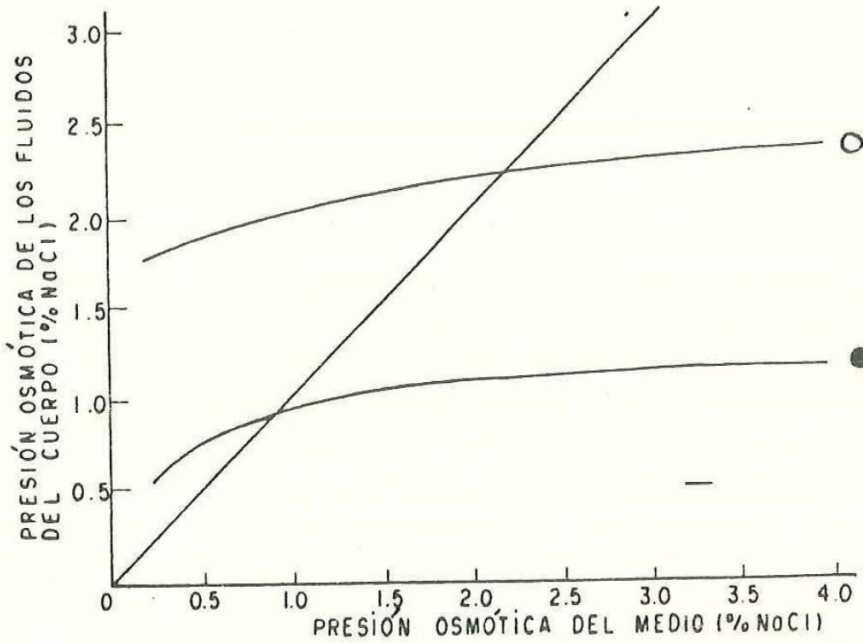


Figura 11-Relación entre la presión osmótica de los fluidos corporales y el medio ambiente, en un medio hipotónico. Presión osmótica de los fluidos corporales ●; Presión osmótica de los fluidos del intestino ○. La línea horizontal corta corresponde a valores de agua de mar típica. La línea que parte del origen representa isotonicidad. -- (de acuerdo a Croghan, 1958).

En esta región es donde sucede la incorporación de agua para compensar el efecto osmótico pasivo, que es uno de los principales problemas fisiológicos de Artemia al habitar medios con altas densidades, donde prácticamente se está deshidratando y compensa la pérdida de agua incorporada agua a una razón semejante a la que pierda.

Sin embargo, la incorporación de agua es acompañada de sales y conforme aumenta el gradiente osmótico también aumenta el gradiente iónico, es decir, al estar en aguas más saladas requiere de mayor cantidad de agua pero también incorpora mayor cantidad de sales. La ingestión de sales es un doble problema, pues no solo le afecta la cantidad de sales sino el tipo de éstas. La presión osmótica de los fluidos internos es proporcionada principalmente por iones de sodio (90% aproximadamente). Existen además otros iones como potasio y magnesio, no menos importantes en el balance iónico. De un análisis de la presión osmótica del agua de mar se obtuvo que su descenso en punto de congelación fue de -1.95 g.c. (32.5 ppm) y la concentración de las sales principales fue de : 565 mM/l (Na), 463 mM/l (Cl), 11 mM/l (K) y 55 mM/l (Mg). La relación de Na:Cl en agua de mar es 0.86 en tanto que la misma relación de los fluidos internos de Artemia es mayor que uno (62:51=1.2). La concentración de magnesio en Artemia es extremadamente menor que 55 mM/l mientras que la concentración potasio se mantiene

relativamente constante ante la variación en el medio (entre 5 y 8 mM/l). Esto no sería posible si no existiera un mecanismo de control iónico, el cual por ser un mecanismo de transporte activo contra gradientes iónicos y de potencial implica un gasto de energía proporcional a la magnitud del gradiente, figura 12.

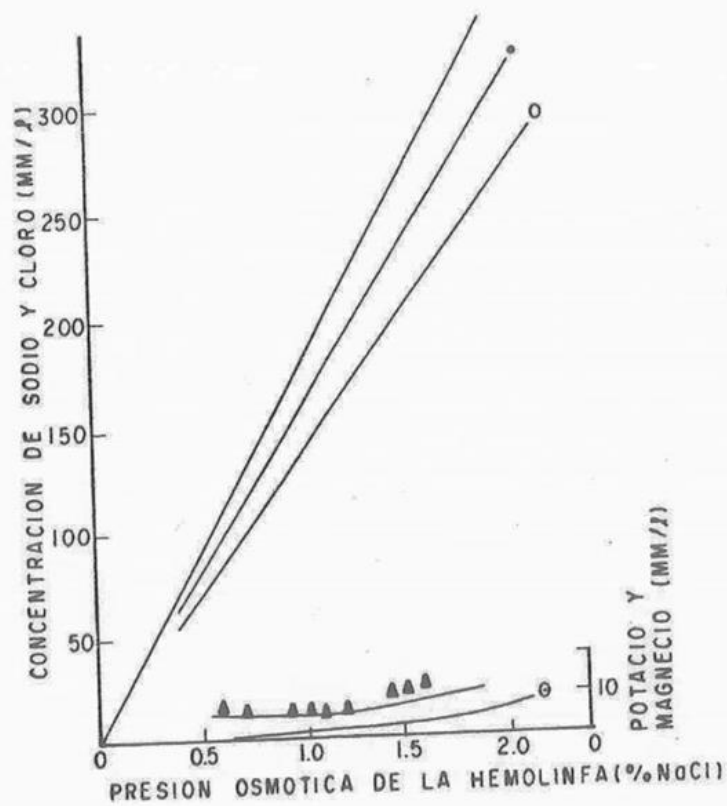


Figura 12. Composición química de la hemolinfa de Artemia. Sodio ●; Cloro ○; Potasio ▲; magnesio ⊙. La línea que parte del origen representa valores esperados, si la presión osmótica de la hemolinfa fuera causada solamente por iones de sodio y cloro. (según Croghan, 1958).

Redundando con un poco de mayor detalle sobre el mecanismo de regulación osmótica de *Artemia*, se sabe que tiene un sistema muy semejante al de teleosteos que poseen regulación hiposmótica. *Artemia* es un organismo filtro alimentador continuo y en consecuencia ingiere constantemente el medio que lo rodea. La experimentación de Croghan (1958c) sobre el comportamiento de ingestión de fluidos demostró que *Artemia* posee un alto nivel de ingestión de éstos sin que influya la concentración osmótica, así mismo observó que en el tracto digestivo sucede una incorporación de agua hacia los fluidos internos.

El paso del agua hacia en interior es facilitada mediante la ingestión de las sales disueltas que ésta contiene, sin embargo existe cierta discriminación o selección iónica, puesto que iones monovalentes son más fácilmente incorporados que los divalantes.

La presión osmótica del fluido del intestino siempre es mayor que la del fluido interno, pero en un medio más concentrado la presión osmótica del fluido del intestino permanece mucho menor que la del medio, aunque, el animal constantemente está ingiriendo fluidos del medio e incorporando agua de éste. Lo anterior demuestra que grandes cantidades de NaCl deben de ser incorporadas al

fluido interno a través del epitelio del intestino (Croghan, 1958d).

No obstante que la presión osmótica del fluido intestinal siempre es mayor que el fluido interno, las concentraciones de sodio y cloro en el fluido intestinal son mucho menores que el fluido interno, y esto, confirma que grandes cantidades de NaCl están ingresando hacia el fluido interno a través del epitelio del intestino acompañado de agua. Por esto se considera el intestino de Artemia como un mecanismo adaptado para la captación activa del agua controlando el balance del agua y evitando la deshidratación en un medio hipertónico, figura 13.

La ingestión e incorporación de agua compensa la pérdida por difusión, sin embargo las grandes cantidades de NaCl que acompañan la incorporación de agua contribuyen a un desbalance iónico. Este desbalance no llega a presentarse debido a un mecanismo de control iónico localizado en los metaepipoditos de los toracópodos Croghan (1958d), encontró que en los diez primeros pares de los toracópodos es donde sucede el intercambio iónico, el último par no presenta actividad. Esta actividad de control iónico consiste en la eliminación de iones monovalentes del fluido interno (básicamente iones de sodio y cloro).

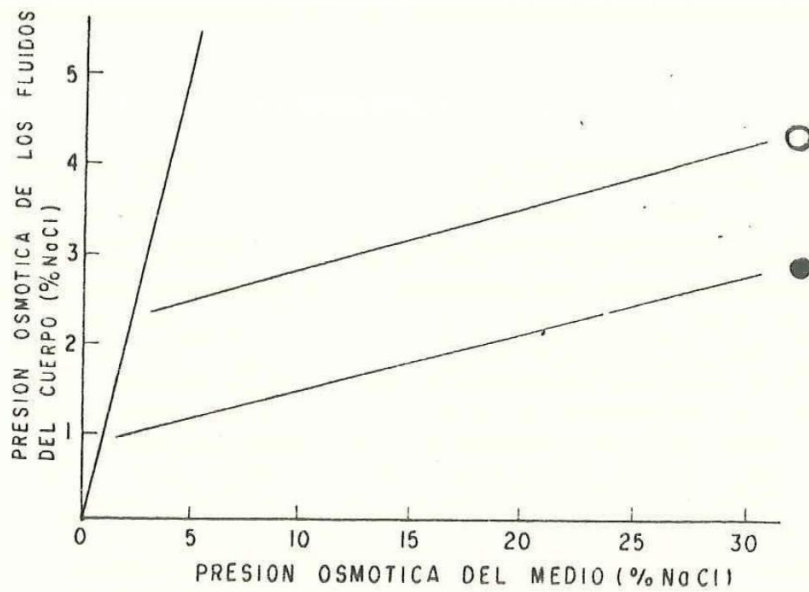


Figura 15.- Relación entre la presión osmótica de los fluidos del cuerpo y del medio ambiente, en un medio hipertónico. Presión osmótica de los fluidos internos ●; Presión osmótica de los fluidos del intestino ○. La recta que parte del origen representa isotonicidad (Según Croghan-1958).

Este transporte de iones hacia el exterior es contra un gradiente de concentración e implica un gasto energético. Es un proceso semejante al que sucede en teleosteos marinos (Croyhan, 1958d). En el estadio de nauplic la glándula del cuello está encargada de este control iónico y conforme progresa el desarrollo de Artemia se incorporan a ésta actividad los metaepipoditos de los toracópodos hasta que alcanzan completo desarrollo, y es cuando desaparece la glándula del cuello. El proceso se describe en la tabla II.

Tabla II.- Ontogenia de las estructuras de Artemia en donde sucede el control iónico.

Longitud (mm)	Pares de Toracópodos Presentes	Pares de Toracópodos Activos	Organo del Cuello Activo
0.5	0	0	+
1.0	0	0	+
1.7	5-6	1-2	+
2.0	6	3	+
2.5	8-9	4-5	+
3.0	10	6	+
3.8	11	7	+
6.0 (en adelante)	11	10	-

(De acuerdo a Croyhan 1958d)

El control iónico no sucede con todo tipo de iones. En agua de mar vive indefinidamente así como en una solución de NaCl 0.5M (solución isotónica con el agua de mar), en cambio en una solución 0.5M de NaBr, a pesar de ser isotónica con agua de mar, Artemia sobrevive por treinta horas. Los iones divalentes presentan mayor toxicidad que los monovalentes: por ejemplo en solución de sulfato de sodio (0.25M) en 24 horas muere; en solución de nitrato de sodio (0.25M) muere en seis horas; en cloruro de magnesio (0.25M) y en cloruro de calcio (0.25M) sobrevive tan solo 6 horas, lo anterior debido a la alta permabilidad iónica. No obstante lo antes mencionado es bueno recordar que existen variedades de Artemia que pueden ser más resistentes que otras, por ejemplo: las que habitan biotopos sulfatados, potásicos o carbonatados, soportarán mejor este tipo de iones.

Como una consideración final se menciona lo que sugieren algunos autores que no concuerdan con lo antes citado Bayly (1972) no está de acuerdo en que el intestino sea el sitio de mayor absorción de agua, argumentando el hecho de la baja concentración de NaCl del fluido intestinal, a pesar de haber sido ingerida de un medio muy concentrado, (debería tener mayor concentración por haber sido incorporada el agua), al parecer no considera el hecho de que todo flujo de agua con solutos disueltos se facilita

a través de una membrana si sucede sin la separación de los solutos. Además argumenta, que habiendo ligado boca y ano Artemia no sufrió deshidratación (por lo que asume la existencia de algún otro sitio para la incorporación de agua).

Al respecto cabe considerar que si no existe influjo iónico por las ligaduras, en Artemia, el gradiente osmótico no es notable y la difusión a través del animal bien puede suplir las necesidades osmóticas.

Otro investigador (Dall, 1967) sugiere que las "Branquias" de los toracópodos son el sitio donde sucede la reabsorción del agua, pero no existe evidencia que soporte esta idea. Finalmente Clegg y Conte (1980) mencionan que aparentemente no está resuelto el papel que desempeña el tracto digestivo en el balance del agua y electrolitos.

5.4 Efectos de la temperatura

Los rangos de la tolerancia de la temperatura en Artemia son amplios y varían de acuerdo a la localidad donde habita. Se tiene reportado un rango general desde 5 a 35 g.c., sin embargo pueden presentarse temperaturas

extremas mayores y menores, por ejemplo, en el Gran Lago Salado de Utah (E.U.A.) suceden cambios de temperatura anuales desde -5 a casi 50 g. c. en aguas someras. Sin embargo ahí existe una densa población de Artemia.

El principal efecto de la temperatura es sobre las reacciones bioquímicas, y en Artemia no sucede la excepción. Posterior a la hidratación del quiste e inhibición de la diapausa, la temperatura de 28 g.c. es la más adecuada para favorecer la eclosión; temperaturas menores retardan el proceso, y en menos de 10 ó 15 g.c. (según la variedad de Artemia) se inhibe, pero al volver a colocar los quistes en temperatura mayor se logra la eclosión de éstos.

Cuando se eleva la temperatura por arriba de 40 g.c. se disminuye la eficiencia de eclosión y el efecto es mayor si es mayor la temperatura. Este proceso no es reversible como cuando se disminuye la temperatura.

Es conveniente recordar lo mencionado sobre la viabilidad de los quistes: si se inicia y suspende el proceso de eclosión repetidas veces la viabilidad disminuye hasta obtener quistes no viables. Sobre todo en el caso de la disminución de temperatura. En tanto no se formen cristales es posible congelar quistes deshidratados

sin que pierdan viabilidad.

Todo parece sugerir que las enzimas que intervienen en el proceso de eclosión y de inicio de relaciones bioquímicas tiene una temperatura óptima.

En nauplios y adultos de Artemia se observa un efecto semejante al caso de los quistes, antes y después de una temperatura óptima según la variedad, los procesos bioquímicos en el interior de la célula se inhiben. Las temperaturas bajas inhiben procesos enzimáticos en tanto que temperaturas elevadas desnaturalizan las estructuras proteicas (enzimas). En temperaturas entre 28-30 g.c. se obtiene un crecimiento más rápido que en temperaturas de 18-20 g.c. en tanto que en temperaturas mayores de 35 g.c. el crecimiento es lento. Lo primero corresponde a la temperatura en que se favorece las reacciones termodinámicas celulares, al disminuir la temperatura se inhiben las reacciones y al elevarla la acción catalizadora de las enzimas sobre las reacciones, se afecta.

Lo anterior tiene un reflejo directo en el consumo de oxígeno, que es una medida del metabolismo, el cual aumenta al aumentar la temperatura y viceversa. Es decir, el

consumo energético será a mayor a mayor temperatura. Por tal razón, es recomendable vigilar que exista adecuada aireación y alimento para que el desarrollo de Artemia no se vea limitado por estos factores, que son disparados cuando se eleva la temperatura.

El efecto de la temperatura, siendo directo sobre el metabolismo (proceso bioquímico a nivel celular) se refleja en el crecimiento, maduración y reproducción de Artemia.

6. ECOLOGIA DE ARTEMIA

6.1. Habitat y Distribución.

Aunque Artemia ha sido estudiada en forma extensiva, casi la mayoría de los trabajos se han desarrollado en laboratorios, por lo cual las investigaciones en su medio natural son pocas, y el conocimiento podría ser limitado en este sentido.

Artemia se ha reportado en diferentes países de los cinco continentes, sin embargo, muchos de los cuerpos salinos en donde se aseguraba vivía alguna especie han desaparecido o han sido destruidos. Ejemplos de esto los tenemos en Inglaterra, Alemania, y Yugoslavia, en donde actualmente no existe Artemia, en los lugares iniciales.

Trabajos recientes reportan una amplia distribución geográfica de Artemia, la cual se encuentra dispersa en zonas climáticas tropicales, subtropicales y templadas, a través o a lo largo de la costa, lo mismo que en cuerpos de agua tierra adentro, alejados de la costa hasta cientos de kilómetros. Para diferenciar estos biotopos, se les ha llamado: thalassohalino al habitat de Artemia característico de las costas y athalassohalino al biotopo

de aguas interiores. Aunque cabe aclarar que éstos términos se refieren específicamente a la composición química del agua. Así, aquellos cuerpos de agua cuya composición química es predominantemente de NaCl vendrían a ser los primeros y las aguas cuya predominancia sean los sulfatos, carbonatos y otras sales, serían los segundos.

La mayoría de los biotopos costeros de Artemia (thalassohalinos) son someros, con mínimas estratificaciones físicas, químicas o biológicas, no así algunos biotopos interiores que llegan a ser muy profundos y por lo consiguiente con marcada estratificación.

Los biotopos athalassahalinos de Artemia generalmente están localizados en aguas interiores y se caracterizan por una composición iónica que difiere mucho de las del agua de mar. Hay aguas sulfatadas, con alto contenido de carbonatos y aguas ricas en potasio.

De acuerdo a la extensión, Artemia no presenta restricciones y puede vivir en grandes lagos, como en pequeñas pozas saladas. Sin embargo Artemia no vive en cualquier cuerpo de agua salada que exista en el mundo, la principal razón de esto es que Artemia no puede emigrar de un biotopo salino a otro a través del mar, debido a que no tiene estructuras de defensa anatómicas que la protejan de

los depredadores.

El principal medio de dispersión de Artemia ha sido mediante los quistes, que son transportados por el viento, las aves migratorias y por la deliberada inoculación del hombre. Esto se debe a que los quistes flotan en la superficie del agua, lo que hace que se adhieran a las patas y plumas de las aves. Los flamíngos y algunas especies de gaviotas y patos han contribuido a la distribución geográfica de Artemia no solo por medios externos, sino también por medios internos via la ingestión de quistes, o comiendo Artemia, que tengan quistes en su útero. Ha sido ampliamente demostrado que los quistes de son resistentes a las enzimas digestivas y que cuando son excretados no pierden su viabilidad, (Horne, 1966; MacDonald, 1980).

Loffler (1964) mostró experimentalmente que los quistes de Artemia permanecen intactos dentro del aparato digestivo de las aves hasta durante tres días, tiempo en el cual algunas pueden viajar más de mil kilómetros.

6.2. Mecanismos de Adaptación.

Como se ha mencionado Artemia no tiene estructuras de defensa contra los depredadores y viven en constante peligro

en medios cuya salinidad es tolerada por algunas especies zooplanctófagas, sin embargo han desarrollado un eficiente mecanismo de defensa ecológico gracias a su capacidad de adaptación fisiológica para vivir en medios de alta concentración salina, donde no podrían sobrevivir ninguno de sus predadores. De ésta forma se dice que escapa a la predación al ocupar nichos que otros han dejado vacíos.

Aunque Artemia posee el mejor sistema de osmorregulación conocido en el reino animal, el hecho es que al vivir en nichos con altos niveles de salinidad, implica que tenga que enfrentar bajos niveles de oxígeno, (la solubilidad del oxígeno es inversamente proporcional a la concentración de solutos). Usualmente tiene que competir contra este medio desfavorable para lo cual ha desarrollado un mecanismo capaz de sintetizar pigmentos respiratorios más eficientes como la hemoglobina. La concentración de éstos pigmentos se incrementan con el aumento de la salinidad causante de la disminución de los niveles de oxígeno disuelto. Un tercer mecanismo de adaptación ecológica, es su habilidad de asegurar la sobrevivencia de la especie formando embriones ametabólicos enquistados, o quistes que resistan mejor las condiciones extremas del medio ambiente, que los juveniles o adultos.

Versichele y Sorgeloos (1980) encontraron que las fluctuaciones de oxígeno, o más exactamente, las fluctuaciones en el potencial red-ox en el agua, parece que juegan un papel muy importante en el mecanismo de enquistamiento.

Otra prueba de que Artemia tiene una extremada adaptabilidad a las presiones de los cambios salinos es que los nauplios que eclosionan de los quistes en aguas de muy baja salinidad (abajo de 5 ppm), sobreviven muy bien cuando estas aguas se mezclan, por la acción del viento y por las corrientes, con aguas de muy alta salinidad.

6.3 Tolerancia de Artemia a factores abióticos.

A pesar de que es un organismo cosmopolita, no se le encuentra en todos los lugares donde podría estar, más bien ocupa muchos que otros organismos han dejado vacíos por la incapacidad fisiológica de estos para habitarlos. En su medio natural Artemia no es un organismo-presa más bien es un organismo predador tope, de tal manera que en lugares donde puede coexistir algún otro organismo zooplanctófago Artemia tiende a desaparecer. En el curso evolutivo de Artemia, se presume que tiene la capacidad de adaptación a ciertas condiciones ambientales que para otros organismos serían fatales. La descripción de los procesos de

evolución, selección y especiación quedan fuera del alcance de estas memorias, sin embargo, asumiendo tal hecho se mencionara la tolerancia de Artemia a los factores abióticos del medio donde habita, como son : temperatura, influencia iónica y osmótica, oxígeno disuelto y pH.

Temperatura.

Siendo la temperatura uno de los factores de intenso efecto en los organismos vivos, Artemia no escapa a esta consideración. Sin embargo, existen temperaturas más favorables que otras para su desarrollo, los cuales son diferentes de acuerdo al lugar de origen de Artemia. No obstante la consideración anterior, se puede considerar un rango de temperaturas que permiten el desarrollo de Artemia en general, este rango de tolerancia cae dentro de los 6 a 35 g.c. y de acuerdo a la mayoría de los reportes que se tienen, muchos coinciden en que el rango de temperatura óptimo es entre 25 y 30 g.c.

A pesar del rango de temperaturas que puede soportar Artemia se debe de tener cuidado de no modificar la temperatura súbitamente, todo cambio se debe hacer paulatinamente (5 grados/hora es una buena medida). En el caso de elevar la temperatura con altas densidades de Artemia es recomendable vigilar la concentración del

oxígeno disuelto en virtud de que aumentan los requisitos del organismo y disminuye la solubilidad de éste gas.

Al considerar la resistencia a la temperatura de los quistes de Artemia, se tiene que poseen una capacidad mucho mayor. Se pueden desencapsular y mantener en temperaturas cercanas al punto de congelación sin que pierdan viabilidad. Persoons y Sorgeloos (1980), hacen referencia a los trabajos del Skoultchi, y Morowitz (1964) y Hinton (1954) donde se menciona, respectivamente, que los quistes de Artemia deshidratados pueden soportar entre casi -273 y 100 g.c.

Influencia Iónica y Osmótica.

El "stress" iónico y osmótico que enfrenta Artemia es considerable. La composición iónica de un medio es sumamente importante pues el efecto que ocasiona la abundancia o escasez de algún catión o anión llega a causar la muerte de los organismos si no poseen un sistema osmoregulador eficiente. Es decir, no sólo es importante la cantidad de sales presentes (influencia osmótica), sino el tipo de éstas sales (influencia iónica), por ejemplo, en una solución salina de agua de mar (35 ppm) se tiene una concentración iónica aproximada a 1.0 osmolar y si se modifican las sales por un solo tipo de iones (1.0 molar),

salmueras de 350 ppm, sin embargo, esto no es un reflejo de un funcionamiento fisiológico y bioquímico normal. Por otro lado, no se encuentra Artemia en biotopos donde la salinidad (permanentemente) sea menor de 45 ppm y la explicación de lo anterior no es la incapacidad de Artemia para sobrevivir en ese medio, sino más bien, que a salinidades menores de 45 ppm se pueden desarrollar otros organismos que predan sobre Artemia, en tanto que en salinidades mayores no sucede así. En condiciones de laboratorio se han mantenido vivas en salinidades tan bajas como 5-10 ppm. En agua dulce Artemia adulta no vive por mucho tiempo, nauplios recién eclosionados soportan mejor esta condición por pocos días.

La influencia osmótica ha sido específica en Artemia. Variedades de algunas zona con mayor o menor salinidad promedio poseen un punto característico de concentración salina que les permite eclosionar, por ejemplo: los quistes de la variedad de Artemia de San Francisco no eclosionan en el medio natural hasta que la salinidad alcanza valores menores de 25 ppm (Persoone y Sorgeloos, 1960).

Para trabajos de laboratorio con quistes de Artemia el uso de aguas de mar (25 ppm) es un medio adecuado que no ocasiona "stress" iónico-osmótico sobre Artemia.

Oxígeno disuelto.

Debido a la amplia variación de la concentración salina en los biotopos de Artemia la variación de la concentración de oxígeno en el medio también varía, existiendo una proporción inversa entre salinidad y oxígeno disuelto.

Artemia es capaz de soportar bajas concentraciones de oxígeno disuelto cercanas a 1 mg/l y tan altas como el 150% de saturación (nivel alcanzable en condiciones de exceso de fitoplancton). El nivel óptimo de concentración de oxígeno puede ser impredecible pues, en condiciones de bajos niveles de oxígeno disuelto, Artemia es capaz de sintetizar pigmentos respiratorios más eficientes (Hemoglobina de varios tipos) que le permitan un adecuado funcionamiento fisiológico. Indudablemente, los niveles de oxígeno disuelto cercanos al punto de saturación serán los más adecuados. Efectos observables cuando las condiciones de oxígeno disuelto disminuyan son: que Artemia nadará cerca de la superficie, en pocos días se volverán de color rosa-pálido a rojizo y al momento de la reproducción se generará la producción de quistes.

pH del medio.

El pH de los medios acuáticos donde se ha encontrado Artemia tiene un rango de neutro o a ligeramente alcalino.

Sobre el efecto del pH poco es conocido respecto a su influencia sobre juveniles o adultos. En quistes es importante hacer notar que la eficiencia de eclosión decrece cuando el pH cae por debajo de 8.0 (Busa y Crowe, 1983). Sato (1967) menciona que un pH de 8.5 favorece la eclosión, lo cual es atribuible a procesos enzimáticos favorables en tal pH.

Brevemente se puede resumir que Artemia ha desarrollado mecanismos eficientes para enfrentar las condiciones abióticas adversas.

Siendo Artemia un organismo anatómicamente indefenso contra cualquier tipo de predador posee un mecanismo de defensa que es la adaptación fisiológica. En primer término, la capacidad de adaptación hacia medios de altas salinidades han hecho que Artemia posea un eficiente sistema de osmoregulación que le permite establecer el límite de escape de sus predadores al vivir en altas salinidades. Otra adaptación es la capacidad de sintetizar pigmentos respiratorios más eficientes que le permiten funcionar eficientemente en medios altamente salinos y escasos en oxígeno disuelto. Un último mecanismo de adaptación, no menos importante que los anteriores, es la capacidad de asegurar la sobrevivencia de la especie cuando las condiciones del medio ambiente se vuelven inadecuadas,

esto es, cambiar la forma de reproducción de ovípara o ovovivípara.

6.4 Competencia y Depredación

Cuando se usan salinidades de 35 ppm con densidades bajas de Artemia (1/ml), puede suceder que protozoarios ciliados del suborden hipotricnia compitan con ella, en cuyo caso se recomienda aumentar la salinidad (10 ppm./hora), hasta llegar a 50 ó 60 ppm. Estos cambios rápidos de salinidad no los soportan los ciliados y terminan por morir. Sin embargo en cultivos intensivos con densidades de 10/ml no se desarrollan estas poblaciones de protozoarios.

Las poblaciones de Artemia están sujetas a una alta depredación, en todas las situaciones donde el predador pueda soportar la salinidad del medio. La lista de los predadores de Artemia, por lo tanto, incluye por definición todas las especies que se alimenten de zooplancton que habitan agua de mar naturales. Ya que esta lista comprende peces: tropicales, camarón, langostino, langosta y larvas de peces que actualmene son sujetos a cultivos. El interés del uso de Artemia como alimento (presa) para estos organismos ha aumentado enormemente.

En habitats típicos de Artemia (en este caso, a más altas salinidades) varias categorías de insectos regularmente la predan como son: larvas de Odonatas, Coleópteros y Hemipteros acuáticos (algunas familias de estos últimos pueden resistir muy altas salinidades). Otras veces Artemia forma parte de la dieta de lisas, pescado blanco y tilapia, predan altamente sobre ella en salinas y lagos salados. Algunas de estas especies de peces pueden soportar salinidades de más de 120 ppm (Persoone y Sorgeloos, 1980).

Predadores de los cuales Artemia no se puede librar con la barrera de la alta salinidad son desde luego las aves. Para varias especies de aves acuáticas Artemia constituye una importante parte de su dieta. Isenmann (1975) reportó que en las salinas de Camargo (Francia), la pequeña gaviota (Larus minutus) se alimenta casi exclusivamente de Artemia de marzo a octubre. Además de gaviotas y avocetas, los flamingsos son el grupo de aves que más frecuentemente son citados como alimentadores de Artemia en cuerpos de agua salados (Rooth, 1965).

7. AFECCIONES EN ARTEMIA

7.1 Origen Microbiano

Las afecciones causadas por algún otro organismo, son consideradas como enfermedades infecciosas; este tipo de enfermedades ocupa el tercer lugar, después de la predación y catástrofes físicas periódicas (fluctuaciones de parámetros físico-químicos), en limitar el número de crustáceos en la naturaleza y viene a ser el segundo obstáculo para alcanzar el éxito acuicultural en branquiópodos después de requerimientos nutricionales, (Couch, 1978).

Los agentes de infección que causan enfermedades en Artemia son principalmente bacterias y hongos. Únicamente se tiene reportada una enfermedad causada por virus (Couch et al., 1975), sin embargo no se tiene información sobre la magnitud de estas enfermedades en poblaciones naturales.

En lo que se refiere a bacterias y hongos, atacan generalmente a los primeros estadios de Artemia en condiciones de baja salinidad. En altas salinidades no sobreviven hongos ni bacterias patógenas, y es raro encontrar a Artemia adulta afectada por ellos, ya que su habitat es generalmente muy salino.

7.1.1. Bacterias

Existen en general dos tipos de bacterias que pueden afectar a Artemia: las quitinívoras y las filamentosas. El primer grupo se caracteriza por alimentarse del exoesqueleto, mientras que el segundo grupo se adhieren a éste, sobre todo en los apéndices, de tal manera que impiden el libre movimiento de los toracópodos, entorpeciendo la función respiratoria y alimenticia.

En cultivos intensivos de Artemia se presenta la enfermedad "negra", que consiste en una mielinización en algunas partes del cuerpo, observándose puntos negros en el abdomen o en las antenas. Esta enfermedad es rara y se puede tratar colocando a los organismos en condiciones favorables de calidad y cantidad de alimento. Esta enfermedad se ha reportado para muchos otros crustáceos (Rosen, 1970). Se piensa que bacterias quitinívoras, tales como Beneckea sp. sean las causantes de esta enfermedad (Cook y Lofton, 1973).

Entre las especies filamentosas reportadas que afectan a Artemia están dos bacterias del género Vibrio: Vibrio alginolyticus y V. parahaemolyticus, que cubren el cuerpo y apéndices de los nauplios impidiéndoles nadar. La primera requiere de sólo 2 horas para cubrir el cuerpo del

nauplio (a concentración de 10 millones cel/ml), y la segunda necesita 8 horas, a una concentración superior a los 100 millones cel/ml. Sin embargo, a bajas concentraciones parecen no afectar a Artemia. (Gunther y Catena, 1980).

Existe una diferencia morfológica entre estas dos especies de Vibrio y una tercera que no ha mostrado efectos nocivos sobre Artemia (Vibrio anguillarum): en esta última no se ha identificado un flagelo lateral desenvainado, involucrado en el mecanismo de adherirse al nauplio. (Gunther y Catena, 1980).

Desde el punto de vista de salud pública, Vibrio es una bacteria importante en el campo microbiológico del alimento marino. Vibrio parahaemolyticus es patógeno tanto para crustáceos como para humanos, ocasionando más del 70% de la gastroenteritis en Japón posiblemente por el consumo de pescado crudo (Sakazaki, 1965, citado por Vardenzant et al., 1970).

Vibrio alginolyticus ha sido implicado con epizoontes del camarón azul (Penaeus stylirostris) por Lightner (1977), y puesto que puede vivir en soluciones de NaCl al 11%, bien podría sobrevivir en algunos de los biotopos de

Artemia (Gunther y Catena, 1980).

La práctica de descapsular los quistes es una buena medida antiséptica para la eliminación de bacterias adheridas al quiste, puesto que Vibrio alginolyticus y V. parahaemolyticus pueden reproducirse rápidamente y pueden alcanzar concentraciones patológicas en el tiempo que toma eclosionar a los quistes de Artemia, sobre todo si el agua es tibia (Ulitzur, 1974). La habilidad de éstas especies de adherirse a los nauplios, les permite ser transmitidos como patógenos posibles de otros cultivos que utilizan nauplios vivos como alimento (Gunther y Catena, 1980).

7.1.2. Hongos.

Los hongos han llegado a ser notorios agentes de enfermedades en los crustáceos ya que se desarrollan rápidamente en varias partes del cuerpo de organismo afectado, interconectando estructuras tubulares.

Uno de los principales géneros que atacan a Artemia es Eusarium sp, el cual habita tanto en medios marinos como dulceacuicolas. Este hongo recientemente se ha reportado como un gran problema en la acuicultura, ya que se caracteriza por afectar mayormente organismos adultos (Johnson, 1974).

Eusarium sp se desarrolla generalmente en las branquias de crustáceos, (en Artemia en los toracópodos). Se cree que este hongo penetra al organismo a través de grietas o heridas presentes en el exoesqueleto y puede ser identificado por la presencia de esporas con la forma de "cancas", mismas que en el organismo se reproducen.

Los hongos causan problemas a los huevos y estadios larvales de crustáceos debido a la facilidad con la cual pueden penetrar a los estadios más frágiles. Una vez establecido el hongo, se dispersará rápidamente a otros huevos o larvas. Otro género común de hongos que afecta a larvas de crustáceos es Lagenidium sp (Phycomyceto), ya que el método de infección de este tipo de hongo requiere de un exoesqueleto muy delgado.

Existe un grupo de hongos, conocido como Trycomycetos, del cual se conocen especies que viven en el intestino de organismos crustáceos tanto marinos como dulceacuicolas, mientras que para los Aphanomyces se reporta que existen especies de este grupo que penetran los tejidos poco protegidos de crustáceos marinos sobre el reverso del telson, y una vez dentro del organismo ataca el tejido nervioso (Johnson, 1975).

7.1.3. Virus.

Hasta la fecha, únicamente una sola enfermedad causada por virus ha sido detectada para crustáceos. Couch et al., (1975) han descrito un virus de forma alargada, previamente descrito únicamente para insectos y termitas, el cual presenta muchas características de los bacilovirus (virus nucleares poliédricos). El virus ha sido llamado Bacilovirus penai (Couch, 1974). Este virus daña los tejidos penetrando al núcleo de las células y subsecuentemente destruyendo las células por propio desarrollo (Johnson, 1975).

7.2 Origen Químico

Los factores responsables de enfermedades no infecciosas en Artemia son distintos compuestos de origen químico que pueden alcanzar límites letales al aumentar su concentración en el medio. Entre los compuestos más comunes están los insecticidas, metales pesados, hidrocarburos, herbicidas, alguicidas y asbestos.

Desde la segunda guerra mundial, muchas clases de pesticidas y compuestos químicos industriales han sido incorporados al medio ambiente, ya sea intencional o inadvertidamente. La biota acuícola se encuentra mayormente

expuesta a éstos compuestos, ya que la porción acuática de la biosfera frecuentemente actúa como un gran receptáculo de todo desecho humano.

La mayoría de los crustáceos son bastante más sensitivos a los efectos tóxicos de la mayoría de los insecticidas que peces o moluscos en general. Experimentalmente se ha encontrado que los crustáceos en general acumulan ciertos compuestos clorinados, detectándose que concentran niveles considerables de éstos compuestos cuando se colectan de aguas contaminadas y aún cuando se toman directamente de aguas aparentemente limpias.

De los compuestos organoclorados, que se utilizan en agricultura se han reportado como más tóxicos para *Artemia* el DDT, Dieldrin, Clordano, Hexaclorobenceno (HCB), Hexaclorociclohexano (BHC), compuestos Bifenil Policlorinados (PCB), en concentración de 0.20 partes por 10^9 es letal. Además es una sustancia acumulable, no se elimina.

El DDT en concentración de 0.10 partes por 10^9 causa en crustáceos, primeramente temblores o vibraciones frecuentes del organismo, comportamiento hiperdinámico, más

tarde parálisis hasta llegar a la muerte, mientras que la exposición prolongada de crustáceos a concentraciones más bajas de DDT no provoca parálisis, pero si el organismo cae en una especie de letargo, se **rehusa** a comer, y por lo tanto muere. En concentración de 0.20 partes por 10^9 es letal, además es una sustancia acumulable, no se elimina (Couch, 1978). El efecto que el DDT provoca precisamente sobre Artemia, está en relación a la localización geográfica (Olney et al., 1980). El Dieldrin es letal en concentración de 0.90 partes por 10^9 sin embargo tiene la característica de ser eliminable.

Por lo que respecta a los compuestos organofosfatados, pocos han sido probado en especies de crustáceos, sin embargo los pocos que se han analizado han mostrado ser de toxicidad, casi 1000 veces mayor que los anteriores. Así mismo, y al igual que sucede con los organoclorados, los crustáceos han demostrado una sensibilidad mucho mayor a estos compuestos que peces o moluscos (Butler, 1966).

Dentro de los compuestos organofosfatos, el compuesto que más se ha estudiado en su efecto sobre crustáceos es el malatiòn, el cual es un potente inhibidor de la enzima acetilcolinesterasa (inhibición competitiva), impidiendo la producción de ATP en células nerviosas, afectando el sistema nervioso dejando a los organismos sin movimiento

(Coppage y Matthews, 1974).

Otros compuestos de elevada toxicidad son los metales pesados. Debido a que muchos de ellos se depositan en el quiste, es muy conveniente descapsularlos. Los lugares de acción de estos metales sobre los crustáceos son a través de los sitios de intercambio de iones (los toracópodos en Artemia).

Para Artemia las concentraciones letales para el 50% de la población (LC50) en 24 h son : 2.33 ppm para cobre, 5.34 ppm para mercurio, 32.1 ppm para arsénico, 63.2 ppm para zinc 68.8 ppm para cadmio y 207.2 ppm para plomo.

Estos compuestos presentan la desventaja de ser acumulables y fácilmente pasarán al organismo que ingiera quistes o nauplios de Artemia por lo que es conveniente tener el cuidado de analizar el origen de los quistes ya que los de diversas localidades poseen mayor o menor concentración de metales pesados, por ejemplo los quistes de Utah, presentan una concentración de 42 µg/g (peso seco) de cobre en tanto que en los de Brazil es casi 10 veces menor (4.7 µg/g: peso seco). Los de Italia presentan 17 µg/g (peso seco) de plomo en tanto que en los de Australia la concentración es casi 8 veces menor (2.1 µg/g: peso seco).

En forma amplia se puede resumir que los pesticidas cuando no llegan a ser letales muestran un efecto en la reproducción de Artemia, produciendo un número menor de cigotos (óvulo fertilizado) en tanto que los metales pesados disminuyen la fecundidad y el periodo de vida de Artemia.

Respecto al petróleo existe poca información sobre los efectos de este o sus derivados en Artemia y en general sobre crustáceos. Esto es algo extraño debido a que en muchas áreas donde existen refineries costeras, también son regiones productoras de camarones.

Anderson et al., (1974) reportaron resultados de estudios de toxicidad sobre crustáceos, donde demostraron que los naftalenos fueron los componentes más tóxicos del petróleo, así mismo indicaron que el contenido más alto de compuestos aromáticos en el petróleo refinado origina una mayor toxicidad que el petróleo crudo.

Se han reportado a la fecha, afecciones tales como lesiones no específicas sobre la quitina cuticular, proliferaciones de células y necrosis en la porción basal de los filamentos branquiales de crustáceos expuestos a concentraciones de 2.0 ppm de petróleo crudo.

En ocasiones se han utilizado herbicidas en estanques y también se ha hecho uso de alguicidas para los peces ya adultos, y se sabe que son poco tóxicos, pero para Artemia se encontró que algunos insecticidas orgánicos influyen en el número de cigotos y el número de sus crías. Unos de estos compuestos nitrogenados, el herbicida Amitriazole (3-amino 1,2,4 triazole), y un alguicida (amonio orgánico cuaternario) actúan en forma diferente. El herbicida probablemente inhiba la enzima metaloprotéica y los alguicidas la acción que desempeñan es superficial, de cualquier forma, ambos insecticidas causan la muerte de Artemia. Así mismo, dichos compuestos químicos alteran el número de crías, obteniendo muy bajos rendimientos en la cantidad del producto, (Grosch, 1980).

No se mencionaran dosis letales de toxicidad puesto que no se conoce un patrón de toxicidad para Artemia las dosis no están dadas en iguales unidades para todas las sustancias que afectan a Artemia, esto hace difícil compararlas entre sí. Si se administra una dosis sub-letal, su efecto se limita a alterar la fecundidad o el periodo de vida.

También las pinturas alguicida en suspensión, utilizadas generalmente para pintar las embarcaciones marinas, tienen un efecto tóxico sobre Artemia debido a que

contienen el agente activo de óxido de cobre. La fórmula más reciente para estas pinturas marinas, es el Organotin, que también es un ingrediente tóxico, ambos causan la muerte de Artemia.

El efecto del asbesto en el índice de sobrevivencia de Artemia fué estudiado usando diseños estadísticos. Esto es, decrece el índice de sobrevivencia en larvas de Artemia expuestas a fibras de asbestos, el efecto depende de la concentración, encontrándose un mínimo de sobrevivencia a 400 mg/l de fibras cortas de la variedad de asbesto Crisotilo. A mayores concentraciones no hay incremento en la mortalidad. La mortalidad más bien está relacionada con la longitud de las fibras de asbesto.

La fibra corta del asbesto Crocidolita, causa mayor mortalidad que la mediana ó larga que es la fibra Crisotilo, de una u otra forma tanto las fibras cortas como las largas causan mortalidad. Esto indica que la mortalidad por asbestos es causada por el tamaño y forma de las fibras, y no por su composición química.

De los compuestos quimioterapéuticos, Johnson (1975) ha reportado concentraciones tóxicas en crustáceos para los siguientes compuestos: formalina, permanganato de potasio, dicromato de potasio, sulfato de cobre, acriflavina, verde

de malaquita y azul de metileno. Estas sustancias no son tóxicas si se aplican durante periodos cortos (24-48 h.) y cantidades pequeñas (del orden de mg/l). Por lo regular son utilizadas como desinfectantes y bactericidas en Acuicultura, no obstante, es conveniente recordar que el beneficio de éstos compuestos puede resultar letal sin los debidos cuidados en su manejo.

7.3 Uso de Antibióticos.

Con el propósito de evitar infecciones en cultivos de Artemia bajo condiciones reguladas de laboratorio o cuerpos pequeños de agua, y procurar no propalar posibles infecciones a cultivos mayores o principales, se ha pensado en el uso de los antibióticos en Artemia adulta.

El uso de antibióticos en quistes de Artemia ha demostrado diferencia significativa sobre la eclosión entre tratados y los no tratados. Sin embargo no se conoce el mecanismo de afección de bacterias sobre la eclosión. Se considera que el efecto de las bacterias sobre los quistes sea un mecanismo de bloqueo de los microporos de las membranas del quiste que evita la interacción con el medio, o tal vez un posible efecto adverso de los metabolitos de las bacterias sobre el quiste. Coleman et al., (1980) sugieren que el posible efecto de las exotoxinas de las

bacterias es que actúen como un supresor de la eclosión. Mencionan que la eliminación de bacterias asegura un exitoso desarrollo del quiste y eclosión.

Los antibióticos utilizados en cultivos de Artemia son : estreptomocina, (10-20 mg/l), clorofenicol, (1-10 mg/l), furacin (1 mg/l), triburalin, (0.01 mg/l), oxytetraciclina (25-60 mg/l), penicilina (20 mg/l). Otros compuestos utilizados para combatir microorganismos son : formaldehído 25 ppM (duración continua), cutrine-plus 0.01 mg/Cu/l (duración 24 h) ó 0.1 mg/Cu/l (duración 4 o 5 h) y oxalato verde de malaquita .005 ppM (duración continua).

No obstante lo anterior la mejor recomendación sobre el uso de antibióticos es evitarlos, por varias razones, una de ellas es que se puede crear resistencia bacteriana al antibiótico, llega a ser incosteable en cultivos mayores, además de que requiere de su aplicación de personal capacitado.

Más bien, existen consideraciones que se deben de seguir y que a fin de cuentas son más efectivas. Vigilar la temperatura, entre 25 y 30 g.c. es adecuado pues a temperaturas mayores se favorece el "stress" en Artemia y las condiciones de reproducción de bacterias, así mismo, es recomendable tener control microbiano en los quistes,

cuando se proporcionan nauplios de Artemia a otros organismos como alimento, para evitar la propagación de éstos. En estos casos la práctica de la desencapsulación elimina la cápsula que es el sustrato de microorganismos, además, la solución desencapsuladora es un desinfectante bastante efectivo.

Finalmente cabe la posibilidad del uso de alguna otra metodología para eliminar microorganismos indeseados con luz ultra violeta, cloro, ácido clorhídrico, ácido acético, sin el uso de antibióticos.

7.4. Uso de Artemia en pruebas de toxicidad.

El constante interés que se ha tenido en determinar los efectos nocivos de sustancias químicas en el ecosistema, ha conducido al desarrollo de investigaciones de pruebas ecotóxicas para evaluación de los efectos potenciales de los contaminantes en la biota.

En virtud de las medidas de regularización que se están tomando a nivel tanto nacional como internacional, es obvio que es altamente deseable la estandarización de los métodos que pueden verse rechazados o recomendados en distintos niveles de complejidad de pruebas.

Este es el caso de las pruebas rutinarias, que deben ser reproducibles confiables y lo más sencillo posibles. Esto significa que estas pruebas no deben requerir de equipo ni personal especializado. Entre las numerosas especies que se han utilizado para los estudios de toxicidad en el medio ambiente marino, Artemia aparece como el candidato más adecuado para desarrollar un bioensayo normalizado "standard" para uso mundial.

Los quistes deshidratados de Artemia son accesibles todo el año y pueden ser llevados fácilmente en pequeños depósitos a cualquier parte del mundo. Como resultado, es posible eliminar completamente el mantenimiento de cultivos "stock".

Esta ventaja de Artemia ha conducido a un marcado incremento del uso de estos organismos para bioensayos en las últimas dos décadas. Desafortunadamente, una revisión de la literatura revela que no existe uniformidad, tanto en las metodologías como en el criterio utilizado para estimar una relación de dosis-efecto.

Partiendo de la urgente necesidad de igualar algunas metodologías de bioensayos representativas del medio marino, y considerando las ventajas inherentes al uso de Artemia, se han estudiado un número de parámetros de

importancia para el desarrollo de rutinas cortas de toxicidad para esta especie en particular.

El criterio de dosis-efecto utilizado para estimar la toxicidad de Artemia, puede ser clasificada en tres categorías de acuerdo al estadio de vida en que se encuentre ésta.

- a) Quiste
- b) Nauplio
- c) Adulto

7.4.1 Uso de quistes para estudios de toxicidad

De lo que se conoce, Delcambe (1955) fue el primer científico en utilizar el proceso de eclosión en general como un criterio de bioensayo, método luego adoptado por otros científicos, tomando en consideración varios aspectos. Primero, el porcentaje de quistes sin eclosionar, segundo el porcentaje de nauplios en estadios de emergencia, (E-1, E-2) y finalmente el porcentaje de nauplios nadando libremente.

Jensen (1975) propuso el uso de la Tasa de Eclosión como técnica de bioensayo "standard". Saliba y Krzyz (1976a) estudiaron la influencia de metales pesados en la eclosión de quistes de Artemia.

Una intercomparación de la relación de dosis-efecto obtenida por distintos autores (bajo este criterio) difícilmente se puede lograr. En verdad, las condiciones de eclosión varían ampliamente, por ejemplo: la temperatura, la duración de la prueba, los factores abióticos del medio de incubación (ph, nivel de oxígeno), y en muchos casos no son descritas apropiadamente o tomadas en consideración.

Sin embargo, Jennings y Whitaker (1941); Nimura (1968) y Jones (1972) han demostrado que el pH no debe ser menor de 7 para poder obtener una buena eclosión. Sato (1967) recomienda un pH de 8.5.

El uso de soluciones de NaCl sin amortiguar, puede resultar en una baja eficiencia de eclosión, incluso en los testigos. Entonces se sobreestima la toxicidad del producto que produzca un descenso en el pH. Una aireación adecuada del medio es prerequisite para obtener una eclosión exitosa, hecho subrayado por Nimura, (1968).

La mayor restricción de usar la eclosión como criterio "standard" de bioensayo es la variabilidad de la eficiencia de eclosión y la tasa de eclosión entre las diferentes razas geográficas de *Artemia*, y entre los diferentes lotes de una raza específica.

7.4.2. Uso de nauplios para estudios de toxicidad.

El uso de los nauplios de *Artemia* se ha popularizado para evaluar la toxicidad de una amplia variedad de compuestos químicos, como son : pesticidas, petroquímicos y dispersantes de aceites, sales de metales pesados, micotoxinas, metabolitos microbianos y fungales, así como productos cancerígenos.

En muchos casos, se ha dado poco énfasis a las condiciones de eclosión. En los trabajos de Cox (1974); Curtis et al., (1974); Granade et al., (1975) y Hudson y Bagshaw (1978), no quedan claros detalles de las condiciones de eclosión. Varios autores hacen referencias mínimas a la temperatura de eclosión, cuando precisamente este factor influye enormemente en el índice de eclosión de los quistes, y la tasa de mudas del nauplio (Sorgeloos et al., 1978).

Para realizar éstas pruebas, es importante que los nauplios de *Artemia* sean exactamente de la misma edad. Tarzwell, (1969); Claus, (1976) citado por Vanhaecke et al., (1980), Sorgeloos et al., (1978) observaron que las larvas instar II son más sensibles que las instar I. Resultando que, los datos obtenidos por aquellos que no siguen un procedimiento homogéneo y constante en relación a

las condiciones de eclosión (sin conocer la edad exacta de los nauplios al inicio de las pruebas) pueden fluctuar de un momento a otro.

En los estadios instar I y II no se observa diferencia significativa de sensibilidad ante agentes tóxicos (Sorgeloos et al., 1978), así como en los estadios Instar III, V, VII, IX, y XI (Terpley 1958).

Como se ha mencionado, otro factor responsable de diferencias en los resultados de dosis-efecto, es el origen geográfico de los quistes. Sorgeloos et al., 1978 encontraron rangos de tolerancia diferentes para distintos factores ambientales entre algunas poblaciones geográficas de Artemia. Entre los primeros intentos para unificar criterios de pruebas toxicológicas, Tarzwell (1969), y posteriormente Zillioux et al., (1973) enfatizan la importancia de la selección de una raza específica de Artemia para los bioensayos.

7.4.3. Uso de adultos para estudios de toxicidad

Se han tomado en consideración algunos criterios para la relación dosis-efecto, y sus efectos : mortalidad, longevidad, fecundidad, capacidad reproductiva, sobrevivencia de cigotos, bioacumulación del tóxico.

El uso de Artemia adulta para estudios de toxicidad no es muy común, por las dificultades biotecnológicas que implica su manejo y que pueden ser distintas en cada experimento, por ejemplo: frecuencia, tipo y densidad de alimento, condiciones fisicoquímicas del medio de cultivo. En cambio el uso de nauplios de Artemia, puesto que no requiere de alimento exógeno, ni periodos largos de cultivo, se pueden caracterizar como libres de condiciones de "aclimatación" que pueden alterar los bioensayos y presentar un punto de referencia más confiable.

Como consecuencia, los adultos son menos adecuados que los nauplios para pruebas "standard" de corta duración, inclusive desde el punto de vista económico.

Respecto a la sensibilidad de Artemia comparada con otros organismos acuáticos, como una especie candidato para bioensayos "standard" de corta duración, se deben tomar en cuenta las siguientes consideraciones:

1. A la fecha Artemia es la única especie animal accesible que debido a la disponibilidad comercial de los quistes, pueden ser usada para bioensayos en cualquier lugar del mundo y en cualquier momento, sin necesidad de mantener un "stock" previo.
2. Artemia es una especie adecuada para evaluar la toxicidad relativa de un amplio rango de compuestos

químicos.

3. Artemia no pertenece a las especies de organismos marinos más sensibles.
4. La eclosionabilidad de los quistes de Artemia no parece ser un buen criterio.
5. Artemia durante los primeros estadios larvarios instar I y II, puede sobrevivir sin alimento el tiempo necesario para realizar pruebas de toxicidad agudas.
6. Para sostener la repetibilidad de los resultados, los quistes de Artemia deben ser eclosionados bajo condiciones estrictamente controladas de temperatura, salinidad, aireación, luz y pH.
7. Las larvas de Artemia utilizadas deberán ser exactamente de la misma edad al inicio de cada experimento.

7.4.4 Metodología para estudios de toxicidad con Artemia.

Los procedimientos técnicos finalmente establecidos, con respecto a la eclosión y cultivo de Artemia son resultado de muchas pruebas y basados extensivamente en experiencias existentes en el centro de Referencia de Artemia en Bélgica.

Los quistes se deberán incubar en condiciones controladas idénticas. Para cada prueba, se toman 100 mg. de quistes y se colocan en 100 ml. de agua de mar artificial

(35 ppm) en tubos cilindrocónicos a una temperatura de 25 ± 1 g.c. El agua de mar utilizada se prepara con la fórmula de acuerdo a Kinne, (1971), haciéndose pasar por un filtro con luz de malla de 0.2 micras, se airea y se mantiene a un pH de 7.5.

Para recolectar los nauplios eclosionados, se detiene el burbujeo por unos diez minutos y los nauplios concentrados en el fondo mediante una fuente luminosa son succionados con pipeta y transferidos a un recipiente vial, con agua de mar nueva.

Todos los experimentos se realizan en cajas de Petri de cristal (60 mm X 12 mm) ya que presentan la ventaja de ser muy manejables para revisar la mortalidad bajo microscopio de disección. Se trasladan los nauplios a cajas Petri con una pipeta Pasteur, añadiendo poco menos de 0.5 ml, de agua de mar artificial. Las cajas de Petri se llenan con 10 ml de la respectiva concentración de tóxico con agua de mar artificial, se tapan y colocan en la obscuridad en una cámara de incubación a temperatura constante de 25 ± 1 g.c. La duración de la prueba corresponderá a periodos establecidos en este tipo de bioensayos. Los organismos no se alimentan durante el bioensayo. La concentración de tóxico a ser probada se escoge de la escala logarítmica de Doudoroff et al., 1951.

Ensayos preliminares han revelado que los bioensayos en triplicado, con 10 nauplios por caja cumplen un buen arreglo entre la precisión de la prueba y los imperativos económicos de mano de obra y tiempo.

Al final del periodo experimental, el número de larvas muertas se anotan para cada caja Petri. Los nauplios se consideran muertos al suspenderse el movimiento apendicular después de pocos segundos.

El LC50, a un nivel de 95% de confianza y la función de la pendiente se calculan con el método de Litchfield y Wilcoxon (1949). También se utilizan métodos de estos autores para la comparación estadística de los valores obtenidos de LC50. Los valores medios de las réplicas se comparan con la prueba "t" de Student, aunque tal vez un método más apropiado, conforme al diseño experimental sea un análisis de varianza adecuado al número de réplicas y factores.

El uso de Artemia para la evaluación predictiva de la toxicidad de una amplia variedad de compuestos ha sido probado en numerosos trabajos de investigación. Sin embargo, ninguno de los métodos propuestos hasta ahora es aceptable como una prueba de toxicidad simple, rutinaria y de corta duración, ya sea por la falta de precisión en la

descripción del procedimiento experimental ó porque no se han considerado algunas características biológicas básicas de esta especie de pruebas en particular.

Las pruebas de toxicidad de 24 h con nauplios de Artemia de estadios instar II-III, parecen ser las más indicadas como pruebas rutinarias. No solo son más sensibles los nauplios en estadios instar II y III que los nauplios del instar I y los adultos, sino que es más difícil desarrollar un periodo experimental para obtener una población homogénea de larvas instar I, que una población mixta de larvas instar II y III.

Los nauplios de Artemia pueden ser cosechados en cualquier momento durante el proceso de eclosión para constituir la población de pruebas. No se ha observado diferencia en sensibilidad entre larvas que eclosionan temprano ó tarde. Una población homogénea de larvas instar II y III puede obtenerse fácilmente por un almacenaje de nauplios recién eclosionados, durante 24 horas a 25 g.c. En lo que respecta a la duración del bioensayo es recomendable una prueba de toxicidad de 24 h. Con nauplios del instar II y III se obtienen resultados con la más amplia replicabilidad. Los periodos de prueba mayores de 24 h deben evitarse porque los animales mueren de inanición.

Alimentarlos no solo complicaría el procedimiento de prueba, pues podría sesgar los resultados por la absorción del tóxico en el alimento y su ingestión subsecuente. Se asume que los aspectos a considerar para tener una prueba homogénea y comparable son: selección del estadio de desarrollo, no proporcionar alimento, determinar la duración de la prueba por periodos cortos de 24 a 48 h, comparar la sensibilidad de los nauplios de *Artemia* eclosionados primero y eclosionados después, considerar la posible influencia de condiciones de almacenaje y empaque de los quistes, seleccionar un tóxico "standard" (calidad de referencia), determinar la precisión y repetibilidad de la prueba.

Se ha demostrado que distintas poblaciones de *Artemia* tienen óptimos ecológicos y sensibilidades diferentes. Por lo cual se ha seleccionado una raza geográfica para un bioensayo "standard". Actualmente la población geográfica de Macau (Brasil), parece ser la más adecuada. Los quistes Brasileños están disponibles mundialmente y se garantiza el origen exacto de estos quistes. Los niveles de insecticidas y metales pesados acumulados en quistes de *Artemia* de esta localidad son mucho menores que los de algunas otras regiones (Olney et al., 1980). No se han observado diferencias en sensibilidad entre diferentes lotes de esta población, aún cuando puede presentarse cierta variación en

la tasa de eclosión y eficiencia en lotes distintos.

La mayor ventaja del uso de Artemia para estudios de toxicidad es la disponibilidad de los quistes. La sensibilidad de los nauplios no se ve afectada por almacenaje de los quistes bajo diferentes condiciones, pero es recomendable su almacenaje en ambientes carentes de humedad y oxígeno para mantener un alto grado de eclosión.

De la comparación de los datos de replicabilidad de los bioensayos con Daphnia sp. y Ercahydanis sp. y los valores obtenidos para nauplios de Artemia, se ve que la replicabilidad de esta prueba "standard" cuando menos iguala la de pruebas internacionalmente adoptadas para las especies antes mencionadas.

Una prueba "standard" de corta duración con nauplios de Artemia es deseable por muchas razones. No necesita equipo elaborado, ni tiempo ó esfuerzo. Las preparaciones para eclosionar los quistes se hacen en pocos minutos, y el pipeteo de los nauplios a las cajas petri no toma mas de 30 segundos por caja y el conteo de los nauplios muertos toma cuando mucho un cuarto de hora por experimento. Como resultado puede considerarse como una prueba de toxicidad muy práctica y una de las más baratas que se han propuesto.

Perscoone en 1980 revisó los factores que se consideran importantes en la elaboración de pruebas acuáticas ecotoxicológicas de rutina, considerando un antagonismo básico entre la representatividad y sensibilidad ecológica por un lado, y lo manejable, práctico y costoso por el otro. Este mismo autor ha propuesto un criterio para la unificación o intercalibración de pruebas "standard" de toxicidad de Artemia : Que las pruebas sean de 24 h de duración con nauplios en estadios instar II y III, con quistes de un lugar conocido (se recomiendan los de Macau Brazil), uso de agua de mar artificial (Instat Ocean Sea Water), y el uso de dicromato de potasio y sulfato de sodio como tóxicos de referencia, así mismo se debe hacer un análisis estadístico adecuado de los resultados. El proceso y material sería proporcionado por el Centro de Referencia de Artemia (Bélgica).

Lo anterior es con la finalidad de proponer una prueba "standard" a corto plazo para la biota marina y sea aceptado como patrón de pruebas tóxicas (International Standardization Organization).

Posteriormente, Vanhaecke, et al., (1981) proponen una prueba corta de toxicidad con nauplios de Artemia en donde se dictan los procedimientos de laboratorio con detalle para este tipo de actividades. La prueba de concentración

letal para el 50% de la población será de una duración de 24 h (LC50 - 24 h). Se recomienda el uso de nauplios en estadio instar II y III de quistes de una variedad bastante conocida y se proponen sean utilizados los quistes de Artemia del Centro de Referencia de Artemia (Sorgeloos, 1981). El uso del tóxico de referencia recomendado es Lauryl Sulfato de Sodio, grado reactivo 98 - 102 % .

III. T E C N I C A S
D E
C U L T I V O

III TECNICAS DE CULTIVO DE ARTEMIA

1. INTRODUCCION

Los primeros intentos para cultivar Artemia datan desde los años de 1930, en que se vió que podía ser utilizada como alimento de larvas de peces, y no es sino hasta finales de la década de 1960 cuando adquirió un auge muy importante el cultivo de este crustáceo y permitió que sus larvas, diez años mas tarde, fueran usadas ampliamente como alimento en cultivos comerciales de camarón y langostino principalmente. Ahora los acuicultores de éstas especies son los principales consumidores de este organismo.

La tecnología de cultivo de Artemia ha venido desarrollándose casi de manera paralela con el conocimiento que se tiene de este organismo, especialmente en lo que atañe al aspecto fisiológico. Las respuestas a diversas condiciones del medio han sido utilizadas como principios para el diseño, construcción y operación de los sistemas de cultivo, tanto extensivos como intensivos. La mayor parte de esa tecnología ha sido desarrollada por investigadores del Centro de Referencia de Artemia en Bélgica, que trabaja en estrecha colaboración con varios institutos y laboratorios de acuicultura en todo el mundo.

En el presente capítulo se dan a conocer las principales técnicas que han sido desarrolladas para la determinación de la calidad de los quistes y la producción de biomasa y quistes de Artemia.

2. CRITERIOS PARA DETERMINAR LA CALIDAD DE LOS QUISTES.

Desde el punto de vista comercial, es importante conocer la calidad de los quistes, ya que de ésta depende el rendimiento de una marca comercial. Existen diversas fuentes disponibles en el mercado para la adquisición de quistes de Artemia en América, Asia, Australia y Europa. La tabla III, presenta un listado de información sobre las principales granjas productoras de quistes.

En virtud de que no hay un precio uniforme, ni sistemas "standard" para garantizar características cualitativas específicas de las diferentes marcas comerciales de quistes, la calidad del producto obtenido depende grandemente de la capacidad de negociación del comprador, que ajuste su presupuesto a la compra de una mayor cantidad de quistes de regulares condiciones, para obtener un mayor rendimiento de acuerdo a sus necesidades.

Aparte de los aspectos comerciales tales como precio, condiciones de pago, fletes, costo del seguro, etc., los siguientes criterios pueden ser utilizados para la selección de un producto específico de quistes, tasa de eclosión, eficiencia de eclosión, porcentaje de eclosión, rendimiento de eclosión, valor alimenticio y tamaño del nauplio eclosionado y condición de los quistes envasados. (Sorgeloos et al., 1983)

Tabla III.- Lista actualizada de distribuidores de quistes de Artemia.

-
- Aquafauna Bio-Marina, Inc.
P.O. Box 5, Hawthorne, Calif. 90250, U.S.A
Teléfonos (213) 676-9387, (213) 973-5275,
Cable "Biomarine", Hawthorne, Calif. (Distribuidor de
Great Salt Lake, Utah, U.S.A.)
 - Aquarium Products.
180L Pernod Court, Gleen Burnie, Md. U.S.A. 21061
Teléfono (301) 761-2100 (Productor y distribuidor de
Colombia y Argentina)
 - Artemia Inc.
P.O. Box 2891, Castro Valley, Calif. U.S.A. 94546
Teléfono (415) 582-8866 (Productor y distribuidor de
Shark Bay, Australia y distribuidor de Macau, Brasil).
 - China National Cereals, Oils and Foodstuffs Import
and Export, Corp.
Tientsin Branch No. 134 Chih Feng Road. Tientsin, P.R.
China "Fooaco" Telex 22503 CN (Productor y
distribuidor de Tientsin).
 - Henrique Lage Marinocultura Ltda.
Rue Henrique Lage s/n. Inburanas 59500 Macau-RN,
Brasil. Teléfono (084) 521-1150. Telex 842187 HLSN,
BR. (Productor y distribuidor de Macau Brasil).
 - Jungle Laboratories Corporation.
P.O. Box 66. Comfort, Canada. Telex 780131
Teléfono (512) 995-2789 (Productor y distribuidor de
Chaplin Lake, Canadá).
 - Salmac-Sosal.
A. Cunha de Mata, 126/128. Mossoro-Rn, Brasil
Teléfono (084) 321-3122, Telex 811811 (Productor y
distribuidor de salinas: Guanabara y Sosal, Brasil).
 - Sander's Brine Shrimp, Co.
1255 West 4600 South Ogden, Utah 84403 U.S.A
Teléfono (801) 393-5027. (Productor y distribuidor de
Great Salt Lake de Utah, U.S.A.).
 - San Francisco Bay Brand, Inc.
8239 Enterprise Drive, Newark, Calif. U.S.A. 94560
Teléfono (415) 792-7200 Telex NANETLX-SUVL-792-7200
(Productor y distribuidor de San Francisco Bay Calif.,
U.S.A).

(Tomada de Sorgeloos et al, 1983)

-
- Ocean Star International, Inc.
P.O. Box, Showville, Utah 84336, U.S.A.
Teléfono (801) 872-8217 (Productor y distribuidor de
quistes de UTAH).

2.1. Tasa de Eclosión

Se define como el periodo de tiempo transcurrido desde la incubación hasta la eclosión de la mayor parte de los quistes de una muestra dada.

Para determinar la tasa de eclosión se sigue el procedimiento descrito por Vanhaecke y Sorgeloos (1982) :

Primero se toman dos muestras de 250 mg de los quistes a analizar, colocándose cada una en tubos cilíndricos de fondo cónico, con 100 ml. de agua de mar con salinidad de 35 partes por mil (ppm); segundo la incubación de los quistes se lleva a cabo en presencia de luz a una intensidad de 1000 Lux y una temperatura entre 28 y 30 grados centígrados manteniéndose estos en suspensión mediante aireación suave y continua desde el fondo de cada tubo; tercero, a partir de las 12 horas de incubación, se inicia el conteo de los nauplios eclosionados en cada muestra, tomando para ello 4 submuestras de 250 microlitros, utilizando una micropipeta automática. El muestreo se continúa cada hora, hasta que no haya diferencias significativas en 3 series de conteos consecutivos; el valor promedio de las cuatro submuestras expresan el porcentaje de eclosión para cada hora. El valor promedio de las cuatro submuestras, expresa el porcentaje

de eclosión. Una vez finalizado el conteo, los valores promedio obtenidos para cada hora se ajustan por regresión, para determinar la relación de los nauplios eclosionados contra el tiempo. Una vez ajustados los datos se obtiene una curva de frecuencias acumulativas de donde se derivan los siguientes valores :

T_0 = Tiempo al cual se observan los primeros nauplios eclosionados.

$T_{10,50,90}$ = Tiempo en el que se alcanza el 10, 50 y 90 % de nauplios eclosionados respectivamente.

$T_s = T_{90} - T_{10}$ = Medida de la sincronía de eclosión.

2.2. Eficiencia de eclosión

Se define como el número de nauplios vivos obtenidos por unidad de peso de quistes (1 gramo) (Sorgeloos et al., 1978). De manera práctica se puede expresar también como : la cantidad de peso (gramos) de quistes que se necesitan para producir un millón de nauplios.

La eficiencia de eclosión está dada por la relación :

$$E.E. = \frac{\text{Número de nauplios vivos}}{\text{1 gramo de quistes}}$$

Para determinar la eficiencia de eclosión se sigue el procedimiento descrito según Sorgeloos et al., (1978):

Primero se toman tres muestras de 250 ml. del lote de quistes a tratar, posteriormente los quistes se colocan en tubos cilindricos de fondo cónico con 80 ml de agua de mar natural, de preferencia filtrada con salinidad de 35 ppm, una temperatura entre 28 y 30 g.c., manteniéndose en suspensión por aireación suave y continua desde el fondo de cada tubo. Después de una hora se ajusta el volumen a 100 ml. con agua de mar natural, tomándose posteriormente cinco submuestras (alícuotas de 250 microlitros) de cada tubo con una micropipeta automática. Cada submuestra se coloca en tubos de plástico (6 a 8 ml.) con tapón, debiéndose limpiar la punta de la pipeta cada vez que se realiza la operación. Posteriormente se ajusta el volumen a 4 ml., utilizando para ello agua de mar natural. El contenido de todas las submuestras debe mantenerse en suspensión continua durante el periodo de prueba, recomendándose para ello ajustar los tubos a un eje rotatorio manteniendo una velocidad de cinco revoluciones por minuto. Las muestras deberán incubarse a temperaturas entre los 28 y 30 g.c. en condiciones de luz continua a una intensidad de 1000 Lux. Después de 48 horas el contenido de cada tubo se fija con unas gotas de lugol y algún colorante a fin de facilitar el conteo, el cual se realiza utilizando un filtro apropiado para retener los

nauplios; finalmente se cuantifica el número de nauplios de cada submuestra (N_i , que puede variar de 1 a 5) y se calcula el promedio (N), que se multiplica por cuatro, para extrapolar a 1 ml., el que a su vez se multiplica por 100 para estimar la cantidad de nauplios en 10 ml. y estos a su vez se multiplican nuevamente por cuatro, para ajustar los valores de a 1 gramo. Lo anterior se hace considerando que se partió de 250 mg. de muestra original. Por lo tanto :

$$E.E. = N \times 4 \times 100 \times 4$$

2.3. Porcentaje de eclosión

Se define como el número de nauplios que eclosionarán a partir de 100 quistes del lote a tratar. La estimación del porcentaje de eclosión se obtiene mediante la relación :

$$P.E. (\%) = \frac{\text{Número de nauplios}}{100 \text{ quistes}} \times 100$$

El procedimiento para determinar el porcentaje de eclosión es el siguiente (Sorgeloos et al., 1978) : primero, se toman cinco muestras de cien quistes del lote a tratar, con una o tres réplicas; en seguida se colocan los

quistes en tubos cilindricos de tamaño adecuado con tapón de hule. Se agrega agua de mar natural de preferencia filtrada y se mantienen en suspensión continua mediante agitación suave a temperaturas entre 28 y 30 g.c.. Finalmente, después de un tiempo predeterminado (36 ó 48 horas), dependiendo de las condiciones de la cepa, se efectúa el conteo de nauplios en cada tubo. Con los valores obtenidos se estima el promedio del número de nauplios y este se aplica directamente en la relación antes mencionada.

2.4. Rendimiento de eclosión

Se define como la cantidad de biomasa (peso seco de nauplios recién eclosionados), que produce un gramo de quistes de una variedad particular de *Artemia* (Vanhaecke y Sorgeloos, 1983). El rendimiento se obtiene mediante el producto del peso seco (mg) de un nauplio por la eficiencia de eclosión.

$$R.E. = \text{Peso seco de un nauplio (Mg)} \times E.E.$$

Los criterios antes mencionados son importantes para determinar la calidad de los quistes, sin embargo, algunos tienen ventaja sobre otros. El porcentaje de eclosión es la medida de la calidad de eclosión de los quistes, pero sus

valores no toman en cuenta las impurezas del producto, que en cambio si se consideran en la eficiencia de eclosión, la cuál tiene una relación directa con el grado de limpieza del producto. En este caso se dice que un producto es bueno, cuando se obtiene un millón de nauplios a partir de tres o cuatro gramos de quistes, aunque todavía se considera aceptable si se obtienen a partir de siete u ocho gramos.

La tasa y eficiencia de eclosión son estimaciones valiosas ya que mediante éstas, se puede determinar en que momento se va a obtener el número máximo de nauplios, además se podrá calcular cuantos millones de nauplios se tendrán para determinada hora. El dato también es útil para programar la cosecha y poderse brindar oportunamente como alimento a otros organismos, y de ser necesario, su transportación.

2.5. Tamaño y valor alimenticio de los nauplios.

El tamaño de los nauplios, es importante, si se considera que éste interfiere en los mecanismos de ingestión de los predadores. El uso de nauplios de mayor tamaño (con un alto peso individual) permitirá al predador consumir menor cantidad de energía al alimentarse (Vanhaecke y Sorgeloos, 1980), en virtud de que el

organismo requerirá tomar un menor número de nauplios para satisfacer sus necesidades. En la tabla IV, se presentan datos de tamaños de nauplios de diferentes localidades.

Tabla IV.- Tamaño y peso individual de nauplios de *Artemia* a partir de quistes de diferentes lugares, eclosionados en condiciones "standard" (salinidad 35 ppm y temperatura de 25 g.c.)

Fuente de quistes	Tamaño del nauplio (μm)	Peso seco del nauplio (μg)
Bahía de San Francisco, Cal (SFB)	428	1.63
Macau, Brasil (BRASIL)	447	1.74
Gran Lago Salado, Utah (GSL)	486	2.42
Bahía Tiburón, Australia (AUSTRALIA)	458	2.47
Lago Chaplin, Canada (AN)	475	2.04
Buenos Aires, Argentina (ARG)	431	1.72
Levalduc, Francia (FRANCIA)	509	3.08
Tientsin, R.P.China (CHINA)	515	3.09
Margarita de Savoid, Italia (ITALIA)	517	3.33
Centro de Referencia de <i>Artemia</i> (RAC)	448	1.78

(Según Sorgeloos et al., 1983).

En cuanto al valor alimenticio de los nauplios de *Artemia*, se ha demostrado que nauplios de diferentes regiones geográficas tienen un rendimiento distinto como fuente de alimento. (Sorgeloos, 1980; Beck et al., 1980). En términos generales se obtienen buenos resultados con nauplios de Levalduc (Francia), Macau (Brasil),

Margarita di Savoia (Italia), Bahía Tiburón (Australia) y Tientsin (Republica de China). Resultados regulares se alcanzan utilizando nauplios del Lago Chaplin (Canadá) y del Gran Lago Salado de Utah (U.S.A.).

Aunque se desconocen exactamente cuales son los factores que determinan la eficiencia nutricional de Artemia, como una fuente de alimento dada, para la selección de quistes, se debe tomar en cuenta la diferencia del nivel de contaminación del medio de un lugar a otro, el patrón de ácidos grasos poli-insaturados de Artemia y los efectos sinérgicos posteriores en las especies predadoras (Sorgeloos et al., 1983).

2.6. Condición de los quistes envasados

Los quistes de Artemia deben almacenarse en seco, con un porcentaje de humedad menor del 9%, de preferencia entre 2 y 5% y en condiciones de carencia de oxígeno molecular (Sorgeloos, 1978). Al respecto es importante conocer la condición de los quistes comerciales, ya que cuando estos no se envasan en latas selladas al vacío o bajo atmósfera de nitrógeno, la tasa y eficiencia de eclosión comienzan a disminuir después de unos meses de almacenamiento a temperatura ambiente (Vanhaecke y Sorgeloos, 1982). La congelación de los quistes incrementa su período de viabilidad, sin embargo cuando se almacenan los quistes a

bajas temperaturas, es necesario que éstos se mantengan a temperatura ambiente por una o dos semanas, antes de llevar a cabo la incubación, con el fin de alcanzar un máximo rendimiento en la eclosión (Kinne, 1977; Hessinger y Hessinger, 1981).

3. TECNICA DE ECLOSION DE QUISTES

3.1. Técnica Simple.

La eclosión de quistes en altas densidades puede lograrse mediante el uso de recipientes cilíndricos con fondo cónico. Para la construcción de éstos se pueden utilizar bolsas de plástico selladas en los extremos o bien tanques de PVC ó fibra de vidrio con resina. Las dimensiones de los recipientes pueden variar de acuerdo a las necesidades particulares.

Por razones prácticas la eclosión de quistes se lleva a cabo en agua de mar, aunque en salinidades de 5 ppm, la tasa de eclosión se incrementa y en algunas variedades de Artemia la eficiencia de eclosión también, dando por resultado nauplios con alto contenido de energía (Sorgeloos, 1980; Vanhaecke y Sorgeloos, 1983). Lo anterior se ve favorecido por el efecto osmótico de agua de menor

salinidad que incrementa la presión osmótica interna del quiste para su eclosión; en base a lo anterior se puede utilizar agua de mar diluida con agua dulce. También puede usarse una solución de agua de mar artificial para eclosionar quistes de Artemia preparada mediante la fórmula que se presenta en la tabla V.

Durante el proceso de eclosión, se debe cuidar que el pH no presente valores menores de 8.0, ni mayores de 9.0, la temperatura puede variar de 25 a 30 g.c. y los niveles de oxígeno disuelto deberán mantenerse por arriba de 2mg/l. Esto último puede lograrse mediante tasas de aireación de aproximadamente 7 l/min en recipientes de 20 l, y de 20 l/min para tanques de 75 l.

Dependiendo de la calidad del producto, los quistes al ser puestos a eclosionar pueden volver turbia el agua después de la hidratación, debido a impurezas orgánicas asociadas a ellos, por lo que se deberán de enjuagar y colocar en agua limpia para su eclosión.

El desarrollo de bacterias con el consecuente incremento en la demanda de oxígeno durante la eclosión, puede reducirse, mediante un pre-lavado de los quistes una hora antes de ponerlos en el medio para eclosionar.

Tabla V.- Agua de mar artificial, utilizada para la eclosión y cultivo de Artemia.

Solutos	Solución para eclosionar (a)	Medio de cultivo (a)
Sal de mar (NaCl)	5.0	31.08
MgSO ₄ (b)	1.3	7.74
MgCl ₂	1.0	6.09
CaCl ₂	0.3	1.53
KCl (b)	0.2	0.97
NaHCO ₃ (b)	2.0	2.00

(a) Gramos de sal (grado reactivo) por litro de agua dulce

(b) Se puede disolver separadamente en agua dulce caliente antes de agregar otras sales a la solución.

(De acuerdo a Sorgeloos et.al., 1983).

El pre-lavado se hace con agua dulce y la separación de los quistes se lleva a cabo utilizando un tamiz de 125 μ m de luz de malla.

La iluminación de los quistes es esencial al menos durante las primeras horas de hidratación, para alcanzar resultados máximos de eclosión (Sorgeloos, 1973; 1980). Una iluminación continua con intensidad de 1000 Lux, asegura resultados óptimos. Esto puede lograrse con tubos de luz fluorescente de 40 Watts, colocados a 20 cm de los recipientes de eclosión.

A partir de su eclosión los nauplios de Artemia dependen totalmente de sus reservas energéticas para nutrirse, por lo tanto estos deberán de cosecharse y darse como alimento a larvas de crustáceos y peces lo mas pronto posible después de eclosión por ser cuando poseen mayor valor nutritivo (Benijts et al., 1977).

La cosecha de nauplios de Artemia, libres de cascarones vacíos y quistes no eclosionados, se realiza después de interrumpir la aireación por cinco o diez minutos. Tomando en cuenta el fototropismo positivo de los nauplios, su aglomeración puede obtenerse mediante el oscurecimiento de la parte superior del recipiente de eclosión, asegurando que la luz solo alcance la parte inferior del cono. Los cascarones de los quistes flotaran en la superficie, mientras que los nauplios se concentraran en la parte inferior del cono.

La flotabilidad de los cascarones de los quistes puede también incrementarse por un aumento en la salinidad superior de 35 ppm. Este paso debe realizarse poco antes de la cosecha, mediante la adición de sal. El cambio rápido de salinidad no daña los nauplios recién eclosionados de Artemia. (De los Santos et al., 1980).

Para prevenir la contaminación del tanque de cultivo por desechos de eclosión y bacterias se recomienda que al cosechar nauplios estos sean lavados con agua de mar filtrada y pasada por UV, sobre un tamiz de 125 μ m antes de ser transferidos al tanque de cultivo de larvas de peces y crustáceos.

Si se desean conservar los nauplios recién eclosionados, éstos pueden mantenerse en refrigeración con temperatura de 0 a 4 grados centígrados y densidades de 15,000 nauplios/ml, durante períodos de cuarenta y ocho horas, lo cual no representará merma significativa de energía (Sorgeloos et al., 1983).

3.2. Descapsulación de quistes

La separación completa de los nauplios de *Artemia* de sus quistes, no siempre es posible de manera eficiente, por lo que el cascarón de éstos puede ser ingerida por los organismos a los cuales se da *Artemia* como alimento, provocando efectos nocivos (Sorgeloos et al., 1977), particularmente debido a su alto contenido bacteriano, y su dificultad para ser digeridos (Wheeler et al., 1979).

El cascarón duro de los quistes de *Artemia* puede eliminarse sin afectar la viabilidad del embrión, mediante

exposiciones cortas de los quistes hidratados en soluciones de hipoclorito de sodio ó de calcio. Este proceso se conoce como descapsulación de quistes (Sorgeloos et al., 1977).

La descapsulación no sólo elimina los problemas de separación de los nauplios, sino que presenta las siguientes ventajas: desinfección de los quistes, optimización en la tasa y eficiencia de eclosión, se reduce el período de eclosión, debido a una exposición más eficiente del quiste al estímulo luminoso, y por último, ya desencapsulados son una fuente de alimento tan buena como los nauplios recién eclosionados, ya que pueden ser utilizados diariamente como alimento.

Cuando se utilizan quistes descapsulados como alimento tienden a hundirse, ya que la cáscara del quiste favorece su flotabilidad. Esto puede ser una desventaja que se soluciona colocando aireación que los mantenga en constante movimiento, y así puedan estar en la columna de agua al alcance de sus predadores.

El procedimiento de descapsulación involucra los siguientes pasos consecutivos: primero, Hidratación de los quistes. Segundo, tratamiento con la solución de hipoclorito. Tercero, lavado y desactivación de los

residuos de cloro. Cuarto uso directo o deshidratación para almacenamiento.

3.2.1. Hidratación

La eliminación completa del corión sólo puede llevarse a cabo cuando los quistes se hidratan totalmente y toman una forma esférica. En muchas variedades de *Artemia* la hidratación total se alcanza después de dos horas de estar en agua dulce o salada (35 ppm como máximo) a 25 grados centígrados (el tiempo de hidratación se incrementa con la disminución de temperatura y aumento de salinidad). Los recipientes utilizados para eclosionar los quistes deben tener una forma apropiada, para que estos alcancen una turgencia homogénea.

Después de alcanzar una hidratación completa, se transfieren a la solución de hipoclorito, no sin antes haber sido lavados en un tamiz de 120 μm para remover impurezas.

Los quistes hidratados que no pueden ser tratados inmediatamente con hipoclorito, se deben almacenar en refrigeración (4 g.c.), sólo durante algunas horas.

3.2.2. Tratamiento con la solución descapsuladora

Para llevar a cabo esta fase, se pueden utilizar dos fuentes de hipoclorito : Blanqueador líquido NaOCl (hipoclorito de sodio) o polvo blanqueador Ca(OCl)_2 (hipoclorito de calcio). La actividad del producto activo en la marca comercial del producto normalmente debe corregirse.

La actividad del hipoclorito de sodio puede determinarse por varios métodos. Para soluciones recientes o almacenadas adecuadamente, la forma más conveniente es la determinación. (Bruggeman et al., 1980).

La solución descapsuladora se prepara con agua de mar a 35 ppm procurando, mantener la temperatura entre 15 y 20 g.c. en virtud de que ocurre, una reacción exotérmica, sobre todo cuando se manejan cantidades de quistes mayores de 100g, pudiéndose elevar hasta más de 40 g.c. Esto se deberá evitar añadiendo hielo.

Cuando se usa la solución descapsuladora Ca(OCl)_2 , primero se disuelve el polvo blanqueador y después se agrega al CaO o Na_2CO_3 . Esta solución se agita mediante aireación fuerte y continúa, posteriormente se deja reposar hasta sedimentarse y solo se utiliza el sobrenadante.

Los quistes ya hidratados, se ponen en la solución descapsuladora y se mantienen en suspensión continua, mediante agitación manual o burbujeo desde el fondo del recipiente cónico. En pocos minutos se inicia la reacción exotérmica formándose espuma, y conforme el corión se disuelve, se observa un cambio gradual en la coloración de los quistes, que va de café a gris cuando se usa $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ o de café a naranja con NaOCl . El proceso de descapsulación sólo requiere de diez a quince minutos.

Para la preparación de la solución descapsuladora se han utilizado principalmente dos sustancias, una el hipoclorito de sodio ($\text{Na}(\text{OCl})_2$) y la otra el hipoclorito de calcio ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$), mismas que al disociarse tienen un efecto oxidante, que es el que disuelve el corión que envuelve al embrión de Artemia.

El proceso de descapsulación ha sido descrito con anterioridad y detalle (Sorgeloos et al., 1977 ; Sorgeloos et al., 1978) y algunos de éstos métodos con bastante precisión y detalle (Bruggeman et al., 1979). Amat (1985) presenta un resumen de lo anterior que simplifica bastante la manera de preparar una solución descapsuladora con un grado de precisión bastante aceptable.

Para determinar un volumen de solución descapsuladora

por unidad de peso de quistes tan solo es necesario utilizar un refractómetro que permita conocer la concentración del compuesto activo expresado como índice de refracción. Amat 1985 sugiere las siguientes expresiones, en la cual, relaciona la concentración real (C) de la solución activa en función del índice de refracción (I) leído.

$$C = (3000 \times I) - 4003 \quad (1)$$

En condiciones que el producto activo alcance valores de refracción que no puedan ser registrados por el refractómetro, la expresión anterior quedaría modificada por el factor de dilución (1:1) de la siguiente forma :

$$C = 2 ((3000 \times I) - 4003) \quad (2)$$

Experiencias de laboratorio han demostrado que la proporción adecuada de producto activo y cantidad de quistes es de un gramo de ingrediente activo (hipoclorito) por cada dos gramos de quistes secos y una densidad de 75 gramos de quistes secos por litro de solución descapsuladora. Para lo cual es necesario establecer la relación del volumen (V) a utilizar el hipoclorito por la concentración (C) de éste, lo cual queda expresado por la siguiente ecuación :

$$V = (1000) \times (0.5 \times P) / C \text{ ml/g de quistes} \quad (3)$$

en donde $(0.5XP) / C$ ml/g de quistes) es, en gramos, el ingrediente activo necesario para descapsular un gramo de quistes. Por lo cual, el volumen total de la solución descapsuladora para un peso (P) dado (gramos de quistes) será :

$$1000 \times P / 75 \text{ ml,}$$

y por lo tanto será, necesario añadir el siguiente volumen:

$$V = (1000 \times P / 75) \text{ ml}$$

Un ejemplo de lo anterior sería :

Para descapsular 10g de quistes secos de Artemia, cuando el índice de refracción es de 1.3800 la concentración del 1 producto activo en g/l será :

$$C = (3000 \times 1.3800) - 4003$$

$$C = 167 \text{ g/l}$$

el volumen total de la solución de hipoclorito será :

$$V = \frac{1000 \times 0.5 \times 10 \text{ g}}{167 \text{ g/l}}$$

$$V = 30 \text{ ml}$$

el volumen total de la solución descapsuladora para un peso (P) dado de quistes será :

$$1000 \times 10/75 = 133 \text{ ml}$$

por lo que el volumen de agua que se deberá de añadir a la solución de hipoclorito será de :

$$133 - 30 = 103 \text{ ml}$$

es decir, a partir de una solución comercial de hipoclorito con un índice de refracción de 1.3800 para descapsular 10g de quistes secos se utilizan 30ml de hipoclorito y 103ml de agua.

Cuando se manejan cantidades mayores de quistes, y consecuentemente mayores volúmenes de agente oxidante, es recomendable vigilar que el pH no se vuelva ácido. La disociación de hipoclorito es función del pH y en valores de 8 y 10 es cuando sucede la máxima disociación del hipoclorito. Bruggeman et al., (1980) recomiendan que para optimizar el proceso de descapsulación se puede utilizar agua de mar a la que se deberá de añadir hidróxido de sodio en una proporción de 2g de NaOH por cada 15g de quistes secos (2.5ml de NaOH preparada al 40% por cada 100ml de solución descapsuladora).

Una indicación final, el hipoclorito comercial generalmente tiene una concentración de 5.25% a la cuál corresponde un índice de refracción (I) de 1.3540, por lo que para descapsular 100g de quistes secos Bruggeman et al., (1979) recomiendan :

$$\text{Concentración} \quad ((2000 \times 1.3540) - 40003) = 59 \text{ g/l}$$

$$\text{Vol. de hipoclorito} \quad \frac{1000 \times (0.5 \times 100)}{(59)} = 850 \text{ ml}$$

$$\text{Vol. total de solución} \quad (1000) \times (100/75) = 1330 \text{ ml}$$

$$\text{Vol. de agua} \quad 1330 - 850 = 480 \text{ ml}$$

$$\text{Vol. de NaOH (40\%)} \quad \frac{1330}{100} \times 2.5 = 33 \text{ ml}$$

(Nota: Las cantidades están aproximadas a números enteros para facilitar el ejemplo).

3.2.3 Lavado y tratamiento de desactivación

Inmediatamente después de que el corión se disuelve, lo cuál se puede observar bajo el microscopio, aunque con la práctica basta observar el cambio de coloración en los quistes, los quistes descapsulados se filtran y se lavan sobre un tamiz de 120 μm de luz de malla, con agua dulce (ó agua de mar), hasta que desaparezca el olor a cloro. Los residuos tóxicos de la solución descapsuladora que permanezcan absorbidos por los quistes son desactivados con una solución al 1% de sulfito sódico ($\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) o de

tiosulfato sódico ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) en la proporción de 0.5 ml de cualquiera de las soluciones anteriores por 10g. de quistes descapsulados, Bruggeman et al., (1980) menciona que un baño en ácido clorhídrico (0.1N) o ácido acético (0.1N) durante medio minuto es suficiente para eliminar los restos de cloro, posteriormente se deberán de enjuagar con agua dulce o agua de mar.

Una vez desactivado el cloro los quistes se transfieren a un recipiente con agua dulce o de mar. Los quistes descapsulados se precipitarán entonces y los que no han sido tratados apropiadamente y que aún contienen fragmentos de corión, pueden ser colectados en la superficie del agua y deshidratados en salmuera para ser tratados en el siguiente lote de quistes o descapsular.

3.2.4. Uso directo de quistes descapsulados

Los quistes hidratados y descapsulados pueden ser usados directamente como alimento para larvas, de peces y si es necesario pueden almacenarse por algunos días en refrigeración a temperatura de 0 a 4 grados centígrados. Como se mencionó anteriormente, es importante asegurar una suficiente agitación para mantenerlos en suspensión al ser utilizados como alimento.

En virtud de que los quistes descapsulados son más pequeños que los nauplios recién eclosionados, se pueden dar como alimento a organismos en estadio larval. Como ejemplo podemos mencionar que los quistes descapsulados de Artemia de la Bahía de San Francisco (U.S.A) tienen un diámetro promedio de 210 micras y los nauplios tienen una longitud de 428 micras; en volumen los primeros son 50 % más grandes que los segundos. Los quistes descapsulados también pueden incubarse inmediatamente para la producción de nauplios.

3.2.5. Deshidratación y almacenamiento

Una vez realizados los procesos de desactivación de residuos de cloro y lavado, los quistes que vayan a ser almacenados requieren deshidratarse, para ello se lavan y se colectan con una malla de 120 μ m después se llevan a una solución de salmuera saturada en proporción de 1g (peso seco) de quistes por 10 ml de salmuera. La preparación de salmuera puede automatizarse utilizando la modificación al sistema descrito por Spotte, (1970) o algún sistema semejante (figura 14). En este sistema la saturación y filtración se realiza al mismo tiempo de manera automática, con circulación por gravedad de agua dulce a través de varias capas de sal en grano. La deshidratación se lleva a

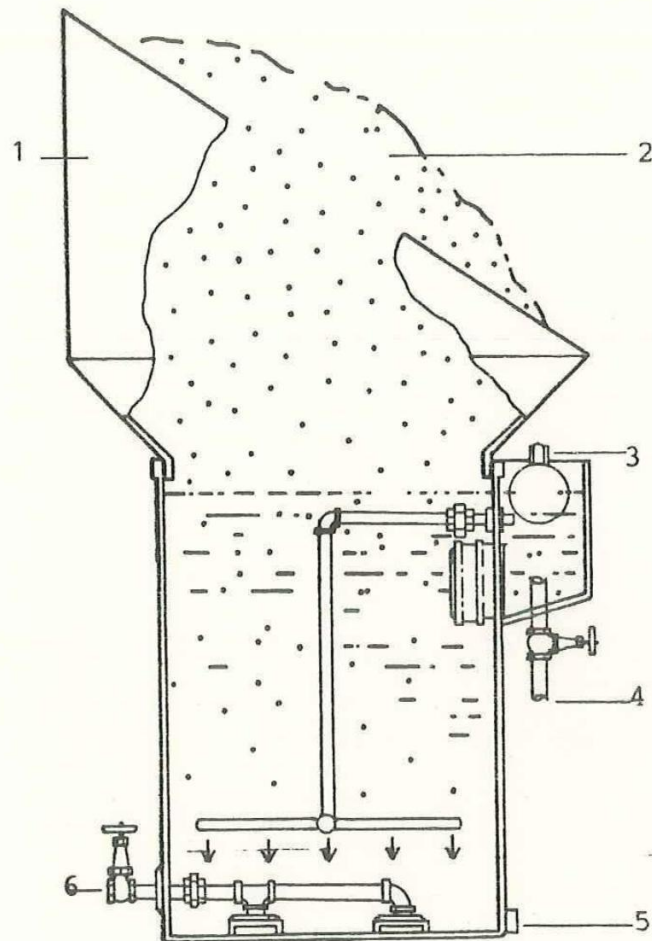


FIG. 14 Diagrama esquemático de un sistema para obtención de salmuera (Sterling Brinomat, Spotts, 1970)

1) tolva; 2) sal a granel evaporada; 3) flotador regulador del nivel de agua; 4) llave alimentadora; 5) llave de drenado; 6) descarga de salmuera

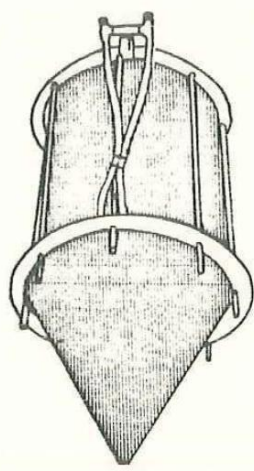
cabo durante la noche (o un mínimo de tres horas) a temperatura ambiente. Los quistes pierden la mayor parte del agua celular y una vez deshidratados, se interrumpe la aireación y se extraen, para ser lavados y colectados con una malla de 120 μm . Posteriormente se transfieren a un recipiente de plástico (o material resistente a la acción de sal) que contenga salmuera saturada y después se almacenan en un congelador a la temperatura mencionada.

Utilizando salmuera con una concentración de sal (NaCl) de 330 g/l se garantiza aproximadamente un 20 % de la capacidad de eclosión para algunos meses de almacenamiento. Para períodos de almacenaje mayores, la cantidad de agua en el quiste debe ser menor de 10% lo que se logra usando MgCl_2 (en salmuera) en concentraciones de 1600g. de MgCl_2 /l de agua dulce.

Antes de su uso directo o para eclosión los quistes descapsulados, que por alguna razón fueron deshidratados, se filtran en una malla de 120 μm , se enjuagan con agua dulce para eliminar todo resto de sal. Tomando en cuenta que los quistes descapsulados pierden su capacidad de eclosión cuando son expuestos a la luz ultravioleta, se recomienda llevar a cabo el tratamiento de descapsulación y conservación de quistes lejos de la luz solar directa.

La rutina de descapsulación y el tratamiento especial, cuando se utiliza una gran cantidad de quistes, se facilita mediante el uso de un recipiente especial de descapsulación, como el que se describe en la figura 15, donde durante todo el tratamiento los quistes permanecen en suspensión en un cilindro con fondo cónico.

Los pasos progresivos para transferir los quistes de un baño a otro, se describen en la figura 16.



Vista lateral del recipiente de descapsulación.

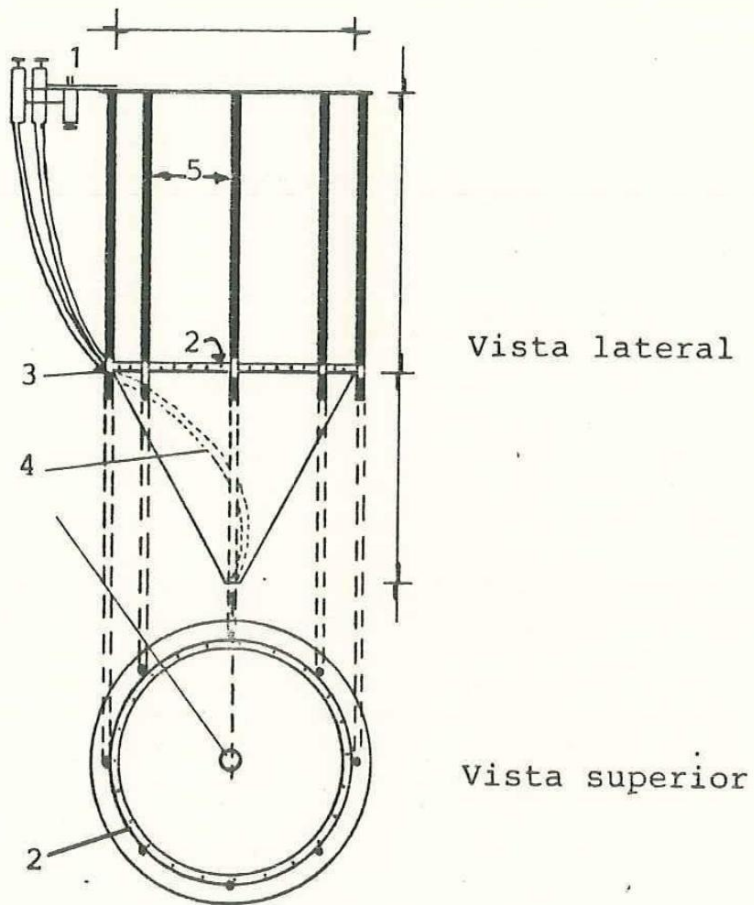


FIG. 15.-Diseño de recipiente para descapsulación, vista lateral y superior.
 1)aire; 2)línea horizontal de aireación; 3)soporte horizontal de la malla; 4) línea de aireación..-al fondo; 5)soporte vertical de la malla

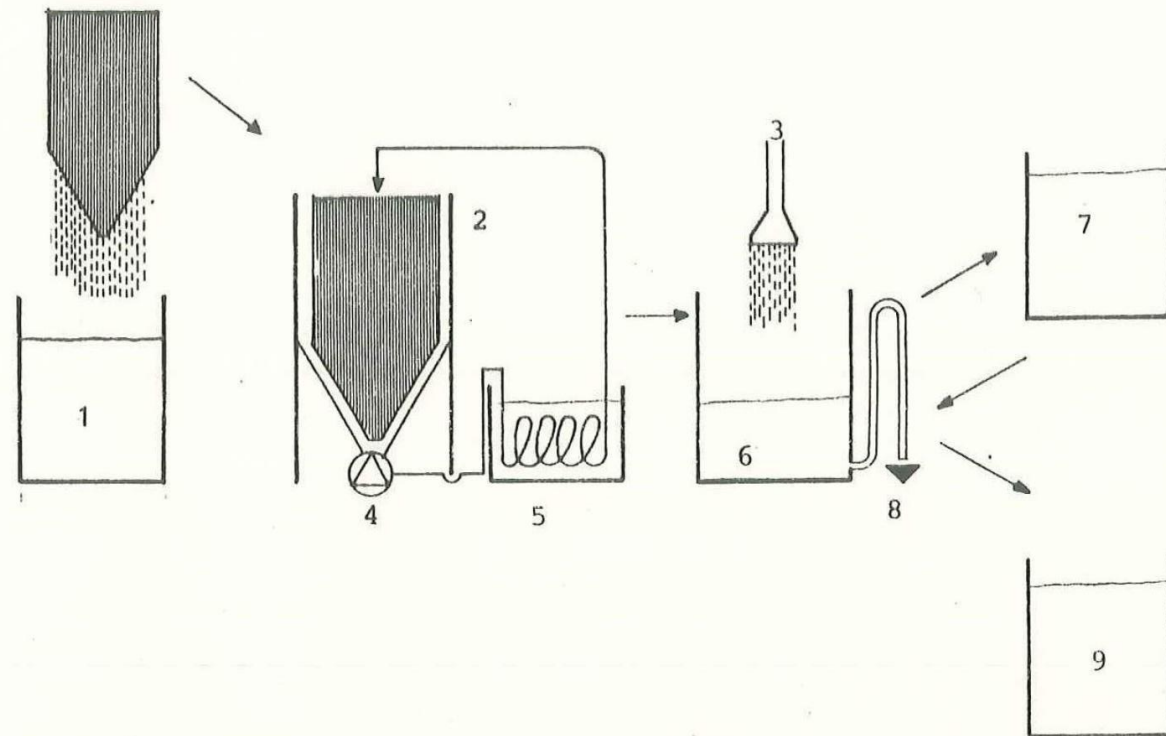


FIG.16.-Secuencia del proceso de descapsulación

1)Hidratación; 2)descapsulación; 3)agua corriente
 4)Bomba; 5)sistema de enfriamiento; 6)enjuague en
 agua; 7)enjuague en ácido; 8)sifón intermitente;
 9)deshidratación en salmuera

4. PRODUCCION DE BIOMASA DE ARTEMIA.

La producción de biomasa de Artemia se puede realizar de manera extensiva ó intensiva. La forma extensiva se refiere a la siembra de organismos en las áreas donde se va a llevar a cabo el cultivo, sin el control de los factores fisicoquímicos del medio y sin un suplemento directo adicional de alimento. El rendimiento de producción por unidad de área en tales condiciones es bajo, aunque barato.

La integración de la producción extensiva de Artemia a actividades acuiculturales se encuentra restringida a climas templados y cálidos, caracterizados por tener prolongadas temporadas de estiaje. Lo anterior hace necesario técnicas alternativas de cultivo, que permiten una producción constante de Artemia durante todo el año.

El cultivo intensivo se caracteriza por el manejo de grandes densidades de organismos, el control efectivo de los parámetros fisicoquímicos del medio de cultivo, el uso de sistemas sofisticados de acuerdo al grado de automatización que se desee y la adición controlada de alimento. El rendimiento de estos cultivos es alto, por unidad de volumen. De manera general, el cultivo intensivo puede realizarse mediante el uso de sistemas abiertos ó cerrados.

a) Sistema Abierto.

La característica principal de este tipo de sistema es el recambio total del volumen de agua, para el mantenimiento adecuado de las condiciones fisicoquímicas del medio de cultivo.

En el sistema abierto existe una renovación constante de agua, por lo que su aplicación se restringe a lugares donde se disponga de suficiente volumen de agua con temperaturas adecuadas, como la que se obtiene de los efluentes de plantas termoeléctricas o geotérmicas (Sorgelcos et al., 1983). Lo antes expuesto, sugiere la necesidad de evaluar previamente las condiciones del medio, con el propósito de seleccionar el sistema de cultivo adecuado, ya que en un sistema abierto, el alimento no consumido se pierde.

b) Sistema cerrado.

Se caracteriza por el aprovechamiento integral del volumen de agua utilizado, el cual es sometido a un proceso de separación de partículas y heces fecales, pudiéndose proporcionar un tratamiento adicional para mejorar la calidad del agua, conservar la temperatura, dar tratamiento con luz ultravioleta y procurar sostener condiciones favorables en el medio de cultivo.

4.1 Factores que influyen en el cultivo de Artemia

a) Temperatura

La mayoría de las variedades de Artemia parecen no sobrevivir a temperaturas por debajo de los 6 g.c., excepto en forma de quiste. La temperatura máxima que ha sido reportada es de 35 g.c. lo cual ocurre en climas tropicales (Persoone y Sorgeloos, 1980), que constituyen la mejor parte de los habitats naturales de Artemia. Los mejores resultados obtenidos en cultivos se sitúan dentro del rango de 25 a 30 g.c. siendo 28 g.c. la temperatura óptima en muchas variedades de Artemia (Bossuyt y Sorgeloos, 1980). En cuanto a la eficiencia de conversión de alimento, ésta se mejora al aumentar la temperatura, requiriéndose además un aumento en la cantidad de alimento que se tiene que suministrar debido al gasto mayor de energía para cubrir sus necesidades metabólicas.

b) Salinidad.

En lo que se refiere al límite de salinidad, se ha encontrado que Artemia puede sobrevivir casi en agua dulce (10 ppm) hasta salinidades de 340 ppm (Post y Youssef, 1977), citado por Persoone y Sorgeloos, 1980. Pero es obvio que bajo tales condiciones los animales apenas y pueden sobrevivir debido al gran gasto energético para su control osmótico.

Artemia puede ser cultivada dentro del rango de salinidad de 5 a 80 ppm, aunque se ha observado que es más práctico y se obtienen buenos resultados en 36 ppm (Sorgeloos 1973; Smith et al., 1978). Sin embargo en general no hay salinidad óptima de cultivo (Persoone y Sorgeloos, 1980), ya que varía de acuerdo a la variedad de Artemia y al tipo de alimento suministrado. Por ejemplo, con dieta de microalgas verdes, se puede tener al cultivo a salinidades bajas y en cambio con dietas inertes es recomendable tener salinidades un poco mayores, para evitar la proliferación bacteriana en el medio de cultivo, no obstante, hay que tomar en cuenta que a mayor salinidad los organismos invierten parte de su energía en la osmorregulación, lo que provoca que sus requerimientos alimenticios sean mayores.

c) Oxígeno disuelto.

Artemia soporta amplios rangos de concentración de oxígeno disuelto, presentando un desarrollo óptimo entre 5 y 7 mg/l. Cuando estos valores decaen de manera súbita hasta 2 mg/l se presenta una mortalidad total; sin embargo, cuando la disminución ocurre en forma paulatina, Artemia tiene la capacidad de sintetizar hemoglobina, que le permite adaptarse a las nuevas condiciones del medio (Bowen et al., 1978).

d) pH

En relación con este parámetro se recomienda que no baje de 7.5, ya que mientras más ácido se encuentra el medio, será mayor la tasa de mortalidad y menor la de crecimiento. Para elevar el pH se recomienda utilizar bicarbonato de sodio (Na_2CO_3), hidróxido de sodio (NaOH) o alguna otra sal alcalina; En cultivos extensivos se puede añadir cal hidratada ($\text{CaO} \cdot \text{H}_2\text{O}$) al estanque.

e) Luz.

Se sabe que en presencia de luz, los organismos nadan más activamente, consumiendo energía en la locomoción y en consecuencia el crecimiento de los organismos es más lento, por lo que se recomienda que el cultivo se efectúe con poca intensidad de luz y de ser posible en condiciones de oscuridad.

4.2 Cultivo extensivo

Para desarrollar este cultivo, se pueden aprovechar las pozas naturales o los estanques utilizados para la producción de sal. En las zonas salineras la profundidad de la poza o estanque no debe ser menor de 0.5 m.

Durante el desarrollo de cultivos extensivos se recomienda la práctica de las siguientes actividades : Primero, revolver el sedimento del fondo de la poza o estanque. Segundo, fertilización mediante el uso de abono orgánico o inorgánico. Tercero, preparación de la salinidad del estanque. Si se sospecha de la existencia de organismos predadores en el estanque, se espera a que la salinidad alcance valores cercanos a 80 ppm para eliminar los organismos. Finalmente, siembra de Artemia. Para realizar la siembra se pueden utilizar nauplios y organismos juveniles, los cuales son acondicionados a la salinidad del estanque. La densidad de cultivo puede variar de 30 a 100 org/l.

Durante el desarrollo del cultivo se debe vigilar que la temperatura no sobrepase los límites adecuados para el crecimiento. También se debe cuidar que la transparencia del agua del estanque no sea mayor de 0.30 a 0.40m, con el fin de mantener una concentración conveniente de alimento natural.

4.3 Cultivo intensivo en lotes

Este tipo de cultivo involucra el cultivo de nauplios de Artemia hasta su talla adulta, sin esperar a nuevas generaciones de nauplios. El rendimiento que se puede

alcanzar es hasta de $5\text{kg}/\text{m}^3$ de biomasa húmeda (Lavers et al., 1985). Generalmente se realiza en cuerpos de agua pequeños, como tanques o piletas.

4.3.1. Diseño y características de los tanques

Los tanques utilizados son de forma rectangular, de preferencia sin ángulos para facilitar la circulación del agua, aunque se diseñaron primariamente para cultivo larvario de camarones; en cultivo de *Artemia* han funcionado bien. El tanque se provee de una división central, que se encuentra a una distancia de los extremos equivalente a $1/3$ ó $2/3$ del ancho del tanque, figura 17.

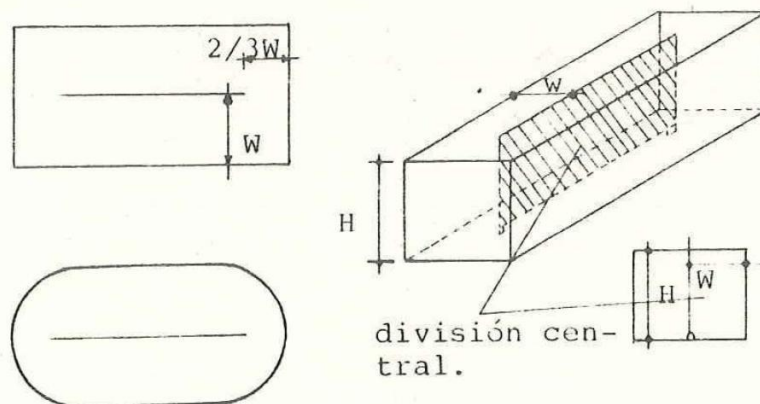


FIG. 17 Vista lateral y superior de los estanques (raceways) para cultivo de *Artemia*.
H) alto; W) ancho.

La división central debe estar separada del fondo por una distancia de 2 a 5 cm. Es recomendable que la proporción que guarde la altura no debe exceder de 1m, para que la elevación de aire desde el fondo sea más eficiente (Bossuyt y Sorgeloos, 1980).

El material que se utiliza en la construcción de los tanques puede ser: concreto, triplay tratado, fibra de vidrio o placas de aluminio detenidas por ángulos de hierro y sobre una placa de concreto.

Cuando se trabaja en áreas con suelo blando, el tanque se instala con un marco de hierro en el fondo, y las placas de aluminio, son reforzadas en la parte superior, con cables de acero. Para sellar las uniones, se recomienda utilizar cemento para PVC, fibra de vidrio o silicon.

4.3.2. Construcción y colocación de aireadores

La manera más fácil de construir aireadores es usando tubería doméstica (PVC) por ser un material fácil de adquirir, barato, resistente, no tóxico y de fácil manejo. La parte del tubo que se coloca en el fondo del tanque, se corta en ángulo de 45 grados. Los aireadores se sostienen a la división central por medio de una abrazadera, con el fin de mantenerlos en una posición estable con la que se favorece la máxima circulación del agua.

Los aireadores, funcionan bajo el principio de elevación de agua, por medio de aire ("Airlifts"). Para que el sistema de aireación sea más eficiente el extremo superior de los tubos debe quedar por encima del nivel del agua no más de 5 cm de manera que ésta facilite el movimiento del agua dentro del tanque.

Los aireadores se instalan separados uno de otro, por una distancia entre 0.25 y 0.40 m. El diámetro de los aireadores en relación con la profundidad a que son introducidos puede ser variable (Tabla VI).

Tabla VI. Diámetro interno del tubo aireador en relación con la profundidad a que son introducidos.

Nivel del agua (cm)	Diámetro interno (mm)
20	25
40	40
75	50
100	60

(Tomado de Bossuyt y Sorgeloos, 1980)

La distribución del aire, a través de los aireadores se hace mediante la introducción de una manguera de polietileno, de 6 mm de diámetro, en un orificio que se encuentra en la parte superior del aireador.

El orificio debe tener un diámetro menor que la manguera, para que ésta al penetrar quede ajustada, evitando con esto que escape aire. La profundidad hasta la que debe de llegar el tubo con aire es importante pues al estar colocada más al fondo favorece la elevación del agua, así como el intercambio gaseoso, puesto que el trayecto que recorre la burbuja es mayor. Las mangueras inyectoras de aire se conectan a un distribuidor central, figura 18'.

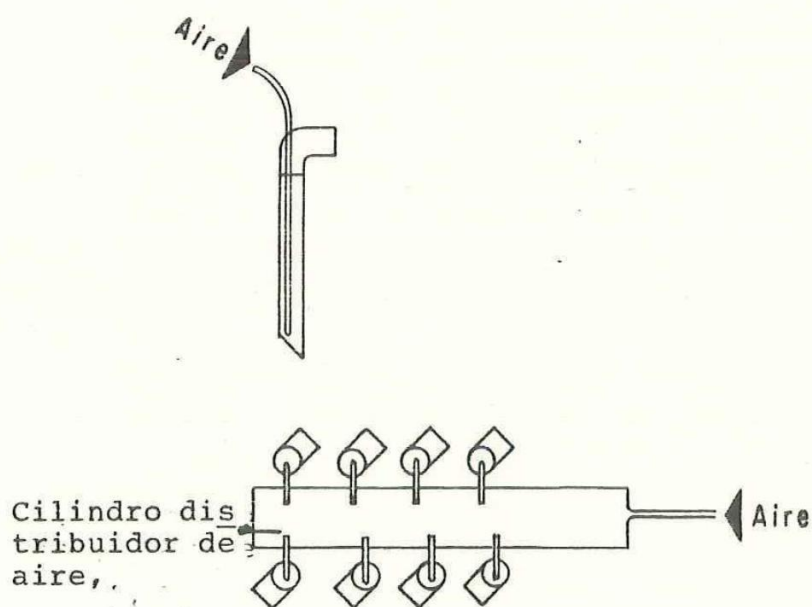


Fig.18.-Detalle de las instalaciones de las líneas de aire.

4.3.3. Control de la temperatura en el cultivo

La temperatura óptima en el tanque de cultivo, se puede lograr mediante la introducción de calentadores de vidrio acoplados a un termostato. Otra forma indirecta de calentar el agua, se hace mediante la instalación de un tubo de cobre cubierto por una lámina de aluminio en el fondo del tanque. La lámina de aluminio podrá ser de 1 mm de espesor y actúa como conductor de calor. Separado del tanque se coloca un recipiente en el que se calienta el agua a 50 g.c. esta temperatura es controlada por un termostato con interruptor de seguridad. Una vez calentada el agua, ésta se hace circular a través del tubo de cobre, hasta alcanzar la temperatura deseada en el tanque de cultivo. Otra manera menos sofisticada es hacer pasar agua por un serpentín colocado dentro del tanque de cultivo previamente calentada en un calentador de agua doméstico, lo cual permite regular el flujo del agua para ajustar la temperatura en el tanque de cultivo.

4.3.4 Sistemas automáticos para eliminar heces fecales.

En cultivos intensivos de Artemia, con densidades altas (3000 org/l), la acumulación de desechos fecales interfiere en el crecimiento y la sobrevivencia de la población, pues los metabolitos de bacterias que degradan

las heces fecales, y el alimento inerte no ingerido altera la calidad del agua del cultivo.

Existen varias maneras para eliminación de desechos sólidos, por ejemplo: el separador de placas, sistema desarrollado por Mock et al., (1977). Está formado por un tanque rectangular, con inclinación del fondo a lo largo del tanque y a lo ancho del mismo (Figura 19).

El propósito de la pendiente es acumular los desechos en las cercanías de la salida del drenaje. El tanque es subdividido por varias placas separadas del fondo, e inclinadas en ángulo de 30 a 45 grados. Las placas se encuentran colocadas de manera perpendicular al flujo de agua. La separación entre cada placa es de 2 cm. En la parte más profunda del tanque se fija un tubo de PVC, con una abertura longitudinal, el cual es conectado a un tubo sifón, que extrae las partículas de desecho.

El funcionamiento del separador colocado a un lado del tanque de cultivo es el siguiente: El agua con los desechos sólidos provenientes del cultivo, pasa al separador a través de un tubo, semejante al aireador descrito anteriormente, el tubo lleva en el extremo sumergido una malla 0.5 a 1 mm de abertura, que permite el paso de las partículas inertes, las cuales al circular por el separador

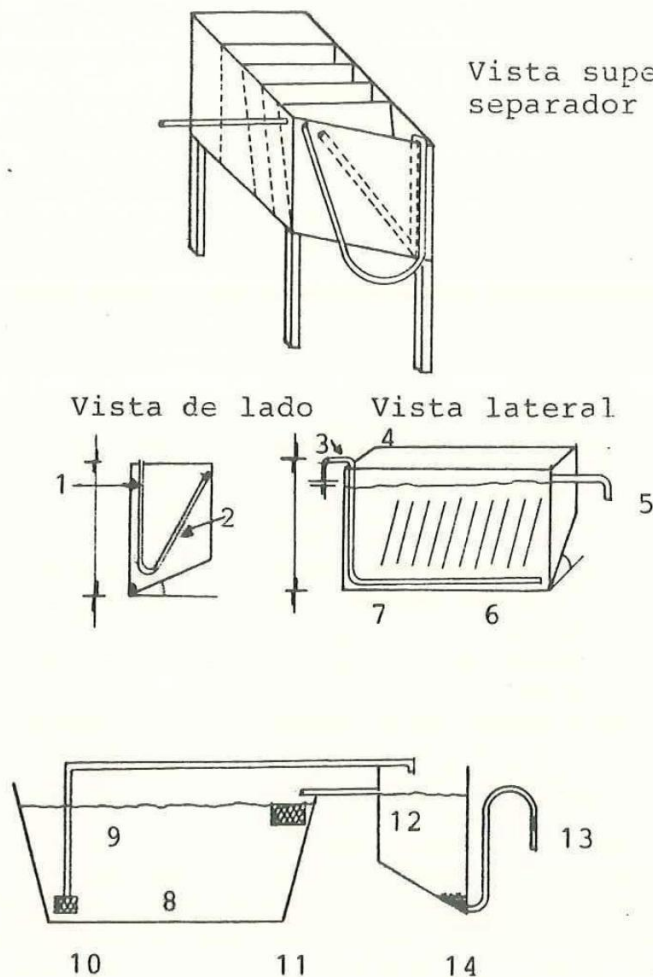


FIG 19-Diseño del separador de placas.
 1)Parte fija del sifón; 2)parte flexible del sifón; 3)sifón; 4)entrada de flujo; 5)salida del flujo; 6)tubo para drenar; 7)placas inclinadas; -- 8) Canal rápido de Artemia (raceway) 9) Elevador de aire; 10)malla para retención de adultos en el raceway; 11)malla para recolección de quistes; 12)separador de placas; 13)sifón para remoción de heces; 14)acumulación de heces.

se van depositando en el fondo, mientras que los nauplios que eventualmente pasan por la malla, nadan en la superficie y pueden ser retornados al tanque de cultivo, por medio de un tubo que comunica el separador y el tanque de cultivo.

La sedimentación de los desechos puede optimizarse, ajustando la velocidad de flujo, lo cual determina el tiempo de retención del agua en el tanque separador. Se ha observado que una mayor retención del agua permite lograr una eficiente sedimentación de partículas de desecho. El diseño e instalación del sistema separador así como las características del separador de placas, para tratar el agua cultivo de un tanque de capacidad de 2 m^3 , puede ser menos complicado que los beneficios que aporta, figura 18 y tabla VII.

Tabla VII. Características del separador de placas para tratar un tanque de cultivo de 2 m³.

Dimensiones	Largo	0.60 m
	Ancho	0.40 m
	Profundidad	0.50-0.60 m
Número de placas :	Once	
Inclinación de las placas :		30-45°
Inclinación del fondo :		30-40°
Diámetro del tubo de desagüe :		2.5 cm
Tasa de bombeo :		3-4 l/min
Tubo filtrador :	Alto	0.50 m
	Diámetro	10 cm
Diámetro del dren :		2 cm
Tiempo de retención :		30-40 minutos

(Tomado de Bossuyt y Songelcoos, 1980)

La descomposición de los desechos acumulados, deterioran la calidad del agua, por lo que éstos deben ser extraídos del separador de placas cada 2 ó 3 días.

Es importante reconocer que el separador de placas resulta eficiente para eliminar las partículas, sin embargo por su tamaño relativamente grande es difícil evitar la pérdida de temperatura del sistema, lo cual representa una desventaja en su uso cuando se aplica calor al sistema.

Tubo separador.

Este tipo de separador de partículas es menos eficiente que el de placas, sin embargo su construcción y

operación es más sencilla, puesto que se instala dentro del mismo sistema.

Los componentes del separador son dos tubos (A y B) de PVC y un aireador, los cuales van colocados en el interior del tanque de cultivo.

El tubo (A) es de fondo cerrado y con "ventanas laterales" cubiertas por una malla-filtro de 0.5 a 1 mm de luz. En la parte inferior externa lleva colocado un collar de aireación, cuya función es la de prevenir la obstrucción de la malla filtradora con los organismos ó desechos fecales y de alimento.

El tubo (B) también está cerrado en el fondo y su diámetro es ligeramente más pequeño que el cilindro (A). En virtud de que el tubo es colocado en el interior del tubo (A), se recomienda que la base del fondo, sea la misma para los dos tubos.

En la parte interna del tubo (B) se coloca el aireador que va a servir como bomba de succión en el sistema.

Para un buen funcionamiento del filtro, los tubos deben quedar acomodados verticalmente en el tanque, tomando en cuenta las observaciones siguientes: el tubo (A) debe sobresalir ligeramente del nivel de agua en el tanque de

cultivo. El tubo (B), debe quedar un poco abajo del nivel de agua y la salida del aireador queda por encima del tubo (A).

El funcionamiento del tubo separador es el siguiente: cuando el aireador es puesto a trabajar, la succión por las burbujas genera una corriente de agua hacia el interior del cilindro A, que acarrea los desechos fecales alimento y eventualmente nauplios nadadores, que logran pasar a través de la malla. Tomando en cuenta que los desechos son más pesados, éstos tendrán que irse al fondo, mientras que los nauplios nadadores y el alimento de menor densidad se dirigirán a la superficie.

En virtud de que el tubo (B), se encuentra por debajo del nivel de agua los nauplios, el alimento menos denso y eventualmente algunos desechos se dirigen al fondo del tubo (B) para de ahí ser regresados nuevamente al tanque de cultivo, a través del tubo aireador, figura 20 y tabla VIII.

Los desechos acumulados en el fondo del tubo (A), deben ser sifoneados fuera del cultivo cuando menos una vez al día.

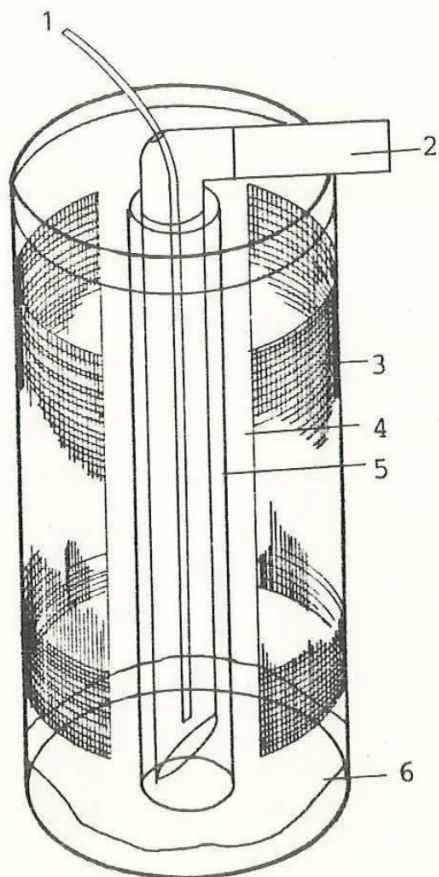


FIG20-Diseño del tubo separador.
1) aire; 2) salida de agua;
3) tamíz; 4) cilindro A; --
5) cilindro B; 6) heces.

Tabla VIII. Características de un tubo separador que se utiliza para eliminar los desechos de un tanque de 350 l.

Tubo A :	diámetro	9.5 cm
	altura	45.0 cm
Tubo B:	diámetro	6.0 cm
	altura	40.0 cm
Aireador :	diámetro	3.0 cm
Tasa de Bombeo :		2-3 l/min

(De acuerdo a Bossuyt y Sorgelcoos, 1980)

4.3.5 Secuencia del Cultivo

En el cultivo intensivo de *Artemia* se recomienda utilizar agua de mar natural o sintética, con una salinidad en el rango de 30 a 50 ppm, manteniendo el pH entre 7.5 y 8.5 y procurando que la temperatura sea de 25 a 30 g.c.

Para el procedimiento de incubación se toman nauplios de quistes incubados en laboratorio y se recomienda el uso de densidades de organismos menores a 3 nauplios/ml.

La incubación de quistes descapsulados se hace en agua de mar 35 ppm a temperaturas de 28 g.c. los cuales, dependiendo de la raza o variedad de los quistes, eclosionarán a partir de las 24 horas siguientes.

Hacer un conteo eventual de submuestras para la determinación aproximada del número de nauplios por volumen. Realizar la transferencia de un número predeterminado de nauplios al tanque de cultivo, de acuerdo a la densidad antes referida.

No distribuir el alimento durante la primera noche debido a que los nauplios consumen sus reservas de vitelo, por lo que no requieren de alimento durante las primeras 24 horas después de eclosión. La distribución del alimento

deberá ser a intervalos de tiempo durante día y noche, para mantener su concentración en el medio de cultivo se vigilará que la transparencia del agua no sea mayor que 30 cm. La cantidad diaria de alimento tiene que ser ajustada al tamaño de las larvas, incrementándose la cantidad y la frecuencia de aplicación.

A partir de la segunda semana, cuando los organismos alcanzan un tamaño de aproximadamente 4 mm, se procede a colocar un tubo separador, para extraer los desechos acumulados, iniciando con un filtro de malla de 500 μ m, reemplazándolo posteriormente por otros de mallas de 750 y 1000 micras. Después de una o más semanas las líneas de aireación deben revisarse eventualmente, limpiarse para evitar su obstrucción por depositación de sal en las partes internas de las líneas de aire. Los parámetros más importantes de la calidad del agua que deben ser monitoreados regularmente durante el período de cultivo: oxígeno disuelto, salinidad, pH y temperatura.

4.4 Cultivo cerrado con flujo continuo.

El rendimiento obtenido mediante la utilización de este sistema es de 20 Kg/m³ de peso húmedo de *Artemia* preadulto en 14 días, a partir de 50 gramos de quistes. (Lavers et al., 1985). Este rendimiento resulta atractivo

si lo comparamos con el que se logra utilizando la técnica de cultivo en lotes, que es de 2 Kg/M³ en el mismo tiempo según Bossuyt y Sorgeloos (1980).

4.4.1 Diseño y Operación

Los componentes principales del sistema constan de 6 tanques de cultivo de 300 litros cada uno, un sistema de tratamiento biológico y un tanque elevado con caída constante de agua por gravedad, figura 21.

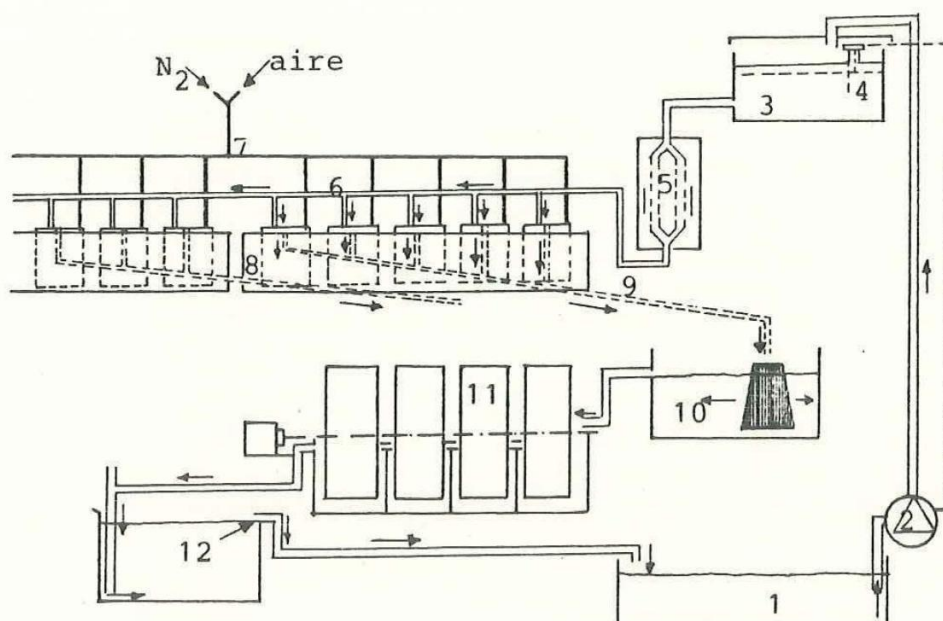


FIG. 24. Diseño general de un sistema cerrado de cultivo con flujo continuo.

1) Depósito; 2), 4) Bomba activada mediante detector de nivel; 3) Tanque principal - - 5) Luz ultra-violeta; 6) Línea de suministro de agua; 7) Suministro de aire/ N_2 ; 8) Unidades de cultivo; 9) Línea de drenado; 10) tanque colector y filtro para recuperación de quistes; 11) Filtro biológico; 12) Tanque de sedimentación.

La temperatura del medio de cultivo puede ser controlada por medio de calentadores con termostato, que se colocan en la salida del tratamiento biológico. Este sistema de cultivo permite que la densidad de cultivo sea de hasta 10,000 nauplios por litro.

4.4.2 Sistema de cultivo

El agua es bombeada del depósito a un tanque elevado desde donde es llevada por gravedad al tanque de cultivo (0.10 X 0.70 X 0.50 m) de 500 l aproximadamente. El tiempo de retención de agua en el tanque de cultivo puede ser de media a tres horas y este se ajusta en función de la edad del organismo, a mayor tamaño menor tiempo de retención.

Una modificación importante introducida en este sistema es el cambio de diseño del tubo filtrador, mencionado en el cultivo en lotes. El aquí descrito consta de un tamiz cilíndrico hecho de acero inoxidable de 13.5 cm de diámetro, el cual se coloca verticalmente en el tanque de cultivo. En las partes superior e inferior del cilindro, se colocan dos anillos de PVC. En el anillo inferior se instala un collar de aireación que produce una cortina de burbujas que limpia la malla, evitando la obstrucción de ésta. El anillo superior se coloca ligeramente por debajo del nivel de agua, para prevenir que

los nauplios queden atrapados en la espuma.

En el interior del tubo filtrador se coloca el tubo aireador, tal como se describió en el cultivo de lotes. Esto se hace con el fin de asegurar un flujo más o menos laminar, dando como resultado una mejoría en la capacidad de autolimpieza.

Para lograr una mejor separación de los sólidos suspendidos, el tubo filtrador se cambia cada 2 o 4 días la malla de los tubos es de 150 a 400 μm de luz y la selección de la apertura depende del tamaño de *Artemia*. El uso de este tipo de filtro mejora las condiciones del cultivo, que redundan en un incremento en la producción, especialmente cuando se utiliza alimento inerte.

En cuanto a la malla del filtro, se observa que los construidos con material de acero inoxidable reducen considerablemente la obstrucción del filtro y la eliminación de partículas es más eficiente. Esto comparado con los resultados obtenidos con malla de nylon (Lavens et al., 1985).

4.4.3 Sistema de recirculación

El agua que sale del tanque de cultivo, es pasada por

un separador de placas y posteriormente por una unidad de tratamiento biológico, filtrándose mediante un tamiz de 150 μm . Una vez libre de sólidos en suspensión el agua pasa a un depósito de almacenamiento desde donde es bombeada nuevamente al tanque elevado que surtirá por gravedad el tanque de cultivo.

4.4.4 Recomendaciones técnicas en cultivos intensivos de Artemia

- a). Aireación continua, que asegure la difusión de oxígeno en el medio de cultivo.
- b). Mantener circulación constante del medio, lo cual permite una mayor disponibilidad del alimento ya que Artemia es un nadador constante.
- c). Procurar profundidades menores de tubos aireación, lo que evita el gasto en difusores y componentes más potentes.
- d). Proporcionar alimento con frecuencia regular, dependiendo de la densidad y tamaño de los organismos.
- e). Asegurar que la distribución del alimento sea homogénea y constante.
- f). Evitar con sistemas automáticos, cambios frecuentes de agua y profundidades mayores de 1 m pues lo anterior eleva los costos de producción.

Las consideraciones anteriores permiten extrapolar la producción a niveles mayores, pero si intervienen estructuras técnicas sofisticadas, no es predecible la producción extrapolada a cantidades mayores y los costos de producción convierten la actividad en incosteable.

4.5 Alimentación de Artemia

Artemia es un organismo filtro-alimentador no selectivo. (Barker y Jorgensen, 1966; Provasoli y D'Agostino, 1969). El tamaño de las partículas útiles para la alimentación de Artemia es de 1 a 30 μm en las primeras etapas de vida y de 45 a 50 micras en etapa adulta (Dobbeleir et al., 1980).

Al momento de preparar una dieta para Artemia es de vital importancia proveerle de aquello que no puede sintetizar por sí misma. Una dieta ideal deberá ser rica en proteínas y lípidos, tales como ácidos grasos (esenciales), terpenos (esenciales), esteroides (esenciales), triglicéridos, fosfátidos y glicolípidos. De los carbohidratos importantes se encuentra el almidón que debe estar presente en proporción 5:1 con la albúmina, ya que de carecer el almidón moriría en un término de pocos días.

De los ácidos grasos que no deben de faltar en la dieta ideal se encuentran : ácido palmítico, ácido palmitoléico, ácido margárico, y ácido esteárico.

Los terpenos (carotenos), que también son esenciales para Artemia, deben ser incluidos en la dieta, ya que ésta no los sintetiza. Los terpenos forman cadenas largas de 30 a 40 carbonos; muchas dobles ligaduras y anillos de 5 carbonos, algunos de los más importantes son: beta-caroteno, ubiquinona, criptoxantina, zeaxantina, y astaxantina. La cantaxantina también es importante pues de ella se derivan las vitaminas A y E que cumplen funciones básicas para la fecundidad y viabilidad de los cigotos.

Como ya se mencionó, la preparación de una dieta, sea natural o artificial, viva o inerte, implica costos de producción, por lo que es conveniente hacer uso de las características filtradoras de Artemia, para ofrecerle como alimento productos de desecho de algunas industrias alimenticias como: salvado de arroz, cebada, copra de coco, que reúnan éstos requerimientos para abaratar este rubro.

Dentro de las dietas naturales se encuentran como primera opción los cultivos de microalgas y bacterias, o bien, la presentación seca del polvo de macroalgas. Otra alternativa para la dieta artificial es agregar en forma

soluble ciertos aminoácidos, lípidos y carbohidratos, al medio de cultivo.

Al brindar exclusivamente dietas solubilizadas se ha observado que aún cuando reúnan los requerimientos nutricionales de Artemia, y llegan a ser utilizadas durante el desarrollo, éste es lento y termina por morir, pues la presencia de alimento particulado es necesario ya que estimula el hábito filtroalimentador. Lo anterior hace que estas dietas no sean recomendadas como alimento para Artemia.

Si se considera que el desarrollo de Artemia es mejor cuando la concentración de alimento en el medio permanece constante (Provasoli y D'Agostino, 1969), se recomienda mantener estas condiciones a lo largo del período de cultivo. Lo anterior se puede lograr apoyándose en adaptaciones sofisticadas de espectrofotometría o de manera más simple utilizando el principio del disco de Secchi, a partir de lecturas de transparencia del agua, lo que permitirá detectar el momento en el cual la concentración de alimento disminuye.

Un aspecto importante durante el cultivo de Artemia, es la vigilancia de la concentración de alimento, ya que bajas concentraciones provocan un crecimiento menor

mientras altas densidades, dan como resultado efectos similares al ayuno o inanición, causada por el exceso de alimento en el tracto digestivo que no alcanza a ser digerido eficientemente.

El método para alimentar a Artemia, puede llevarse a cabo mediante el suministro por goteo continuo o mediante raciones manuales cada doce horas.

Cuando se utilizan dietas inertes no esterilizadas se debe poner especial atención en el desarrollo de bacterias, que pueden proliferar en virtud de las condiciones de temperatura del cultivo. También se recomienda utilizar reactivos antiespumantes no tóxicos, para evitar la formación de espumas en la superficie, donde puedan quedar atrapados los organismos y morir.

Para seleccionar el tipo de alimento a utilizar en el cultivo, se debe tomar en consideración que el alimento no sea hidrosoluble y que la relación entre proteínas, lípidos y carbohidratos sea 1:2:1, además que contenga vitaminas A y E.

4.6 Cosecha, procesamiento y transporte de Artemia Adulto.

a). Cosecha.

La cosecha de Artemia adulta se puede hacer instalando

redes de luz de malla adecuada, que se colocan en el tubo de salida de los tanques de cultivo durante el vaciado.

Otra forma de realizar la cosecha es mediante el cierre de las válvulas de aireación del tanque, de tal manera que al disminuir la disponibilidad de oxígeno en el medio, los organismos se acercan a la superficie donde pueden ser colectadas con una red de cuchara (Sorgeloos et al., 1983).

b). Congelación.

Para congelar Artemia, primero se colocan en un tamiz y se lavan rápidamente con agua fría (5-10 g.c.). Para quitar el exceso de agua se ponen sobre papel secante o cualquier otro material absorbente (no se debe de ejercer presión para "exprimir" los organismos). Posteriormente se colocan las Artemia en moldes para cubos de hielo y se introducen en un congelador a una temperatura de - 25 g.c. Este proceso debe de ser rápido, para evitar la formación de cristales que pueden dañar los tejidos y membranas, lo cual ocurre cuando la congelación es lenta.

c). Secado

En determinadas ocasiones se puede utilizar Artemia adulta deshidratada, lo cual facilita su manejo y

transporte. El secado de Artemia, puede llevarse a cabo en tambores térmicos rotatorios. El secado al sol directo o en horno, afecta significativamente el valor nutricional.

d). Transporte

Para transportar Artemia viva, se recomienda utilizar bolsas de polietileno o recipientes de plástico. Se recomienda agregar al agua 3 gramos de Bicarbonato de Sodio/l (Na_2CO_3), para obtener niveles básicos de pH y mantener una mayor sobrevivencia, lo anterior está relacionado con la toxicidad del amonio.

Una vez que los organismos se encuentren en el interior de las bolsas, éstas se deberán de llenar con oxígeno puro. La temperatura de transporte debe de ser entre 10 y 15 g.c. ya que temperaturas superiores disminuyen la sobrevivencia.

5. - OBTENCION DE QUISTES

Como ya se mencionò, Artemia puede reproducirse ovíparamente. Esta estrategia reproductiva es la respuesta del organismo al efecto adverso de parámetros ambientales como : temperatura, salinidad, concentración de oxígeno, cantidad y tipo de alimento, etc., ante tales condiciones la forma de reproducción es mediante quistes.

Los quistes tienen alta demanda entre investigadores y acuicultores, debido a su facilidad para el transporte y almacenamiento, así como su disponibilidad en el mercado.

5.1 Colecta en el medio natural.

En el medio natural los quistes que se encuentran flotando, se colectan por medio de una red de malla 15-200 µm. El procedimiento que se sigue consiste en rodear la "mancha" de quistes con una red, la cual se va cerrando lentamente para concentrarlos en una área pequeña, donde son colectados con redes de cuchara.

Si en el área de colecta predominan vientos a lo largo del año, se acude a la orilla opuesta a la dirección del viento, para realizar una inspección del sedimento. Cuando la evaporación es alta los quistes quedan en áreas secas,

mezclados con el sedimento, de donde son separados de acuerdo al siguiente procedimiento : Primero se colectan los quistes con pala o cucharones, junto con arena y material del lugar, después se separan con un tamiz (de 10 mallas/pulgada cuadrada) del material no deseado, como plumas, ramas, etc. En seguida para separar los quistes de la arena, se realiza un lavado en salmuera (15-20% de sal). Los quistes, de menor densidad, flotan y la arena se deposita en el fondo. Finalmente se colectan los quistes con malla de 150-200 μ m.

E.2. Producción en laboratorio.

La viabilidad técnica de la inducción controlada para la producción de quistes ha sido demostrada para poblaciones cultivadas por lotes en el laboratorio en tanques operados con aireadores (Bossuyt y Sorgeloos, 1980). Al mismo tiempo se han alcanzado grandes avances en los cultivos intensivos de Artemia, utilizando sistemas de flujo continuo, como los descritos por Sharfstein et al., (1979), y Brisset et al., (1982). En estos trabajos se alcanzan altas tasas de sobrevivencia, con cultivos de densidad mayor de 18,000 organismos/l.

Para cada sistema, ya sea por lotes o de flujo continuo utilizados para la producción de biomasa de

Artemia, se hacen adaptaciones, a efecto de inducir la oviparidad en las hembras adultas.

a). Mecanismos de inducción a la oviparidad.

Por medio de resultados experimentales se han logrado conocer los mecanismos que inducen a la oviparidad en Artemia. Una de las condiciones más aceptadas es que a concentraciones de oxígeno en el medio menores de 2 mg/l. se induce en los organismos la producción de hemoglobina (Bowen et al., 1969).

Siendo ésto una forma de adaptación para suplir sus requerimientos respiratorios y en las hembras se dispara el funcionamiento de la glándula de la cáscara, situada en la parte interior del ovisaco. El producto de secreción de esta glándula reviste a los ovocitos de una cubierta quitinosa, llamada corión, que presenta como principal componente la hematina, que es un producto formado a partir de la hemoglobina, (Gilchrist, 1960). Lo cual depende también de la concentración de iones libres de (Fe) en el medio (Grigliatti, 1969).

Trabajos más recientes revelan que el tipo de hemoglobina sintetizada en tales condiciones es la Hb-III. (Heip et al., 1978a; 1978b). Observaciones preliminares de

aumentos significativos en la concentración de Hb-III, arriba del 13% del contenido total de hemoglobina en preadultos de Artemia, confirman la hipótesis de la regulación de la oviparidad por este tipo de hemoglobina. (Lavens y Sorgeloos 1984).

Una evidencia de que no todas las hemoglobinas controlan el modo de reproducción en Artemia, proviene de observaciones de la coloración de los organismos: las hembras con una tonalidad roja siempre producen nauplios y las que presentan un color rojo pálido producen quistes (Lavens y Sorgeloos, 1984). De acuerdo a Chow (1968) la coloración de los organismos es solo una forma simple para estimar las concentraciones de hemoglobina.

b). Técnicas de producción de quistes.

En general se utilizan los mismos sistemas para la producción de biomasa de Artemia adulta, a los cuales se les hacen ligeras adaptaciones, para inducir la oviparidad aplicando el siguiente procedimiento: Si se parte de nauplios recién eclosionados se llevan éstos a la etapa de preadultos manteniendo las condiciones reguladas de 25 a 30 g.c. de temperatura, salinidad de 35 ppm, oxígeno disuelto cercano a la saturación, y pH entre 7.5 y 8.0. Opcionalmente se agrega un quelante, EDTA-Fe en dosis de 10 a 25 mg/l

en el medio de cultivo, Esto favorece la síntesis de hemoglobina. (Versichele y Sorgeloos, 1980).

La disminución del nivel de oxígeno disuelto se puede iniciar mediante el aumento de salinidad paulatina, aunque esto va a representar un mayor gasto energético en Artemia para el control osmótico.

Otra medida es retirar la aireación por periodos regulares vigilando que los niveles de oxígeno disuelto vayan disminuyendo poco a poco para dar tiempo de respuesta adaptativa y no provocar "stress" mortal en la población de Artemia.

Lavens y Sorgeloos (1984) han utilizado Nitrógeno en las líneas de aireación a fin de obtener una mayor disolución de este gas en el agua con el desplazamiento de oxígeno. De acuerdo a lo anterior es posible mantener densidades de 18,000 organismos/l. Recomiendan no disminuir los niveles de oxígeno a menos de 2 mg/l.

Se debe vigilar no elevar la temperatura a más de 28 g.c. puesto que al hacerlo se disparan los procesos metabólicos con un aumento en la demanda del consumo de oxígeno lo cual tiene un efecto adverso y puede causar alta mortalidad.

5.3. Tratamiento y preservación de los quistes.

Después de colectados los quistes se lavan con agua destilada, para eliminar restos de sales, se esterilizan con una solución de "Antiformin" : 70 ml de "Antiformin" diluidos en 930 ml. de NaCl (0.2. M). El tiempo de permanencia en esta solución, no debe de exceder de 10-15 minutos. Posteriormente se procede a deshidratarlos.

Para preparar el "Antiformin" se toman 100 ml de Hipoclorito de Sodio al 5% (generalmente es la concentración de la presentación comercial) y se agregan 5.7 gramos de NaOH y 3.2 gramos de NaCO₃.

Se pueden secar al sol por exposición de aproximadamente 30 horas. También puede realizar el secado utilizando tambores térmicos rotatorios. Se recomienda que la humedad de los quistes deshidratados no exceda de 9%.

Antes del envasado se deben separar los quistes utilizando un tamiz de 250 - 350 um, para evitar la aglomeración de quistes en "bolas". Finalmente se envasan en latas, bolsas de polietileno o se conservan en salmuera. No todos los envases presentan las mismas ventajas (tabla IX).

Tabla IX. Tipos de preservado de quistes, ventajas y desventajas de cada uno.

PRESERVADO	VENTAJAS	DESVENTAJAS	RECOMENDACIONES
En Lata	Mayor viabilidad de los quistes durante periodos largos de tiempo; fácil transpor-tación, resis-tencia, manejo	Oxidación de la lata; costo de la lata	Conservar en lugar fresco y seco
En Bolsa	Se elimina el riesgo de oxidación; fácil transpor-tación costo menor	Es fácil de romper. Manejo delicado	Conservar en lugar fresco y seco
En Salmuera	Bajo costo; difícil transpor-tación	Lavar los quistes antes de ser utilizados; pierden viabilidad los quistes.	Conservar a temperaturas bajas. No congelar

IV. NUTRICION

IV. NUTRICION

1. | INTRODUCCION

La nutrición de Artemia, se basa en su mecanismo de filtración no selectiva, que consiste principalmente en la captación de partículas alimenticias mediante setas plumosas de los toracópodos y que son conducidas a través del surco abdominal hacia la estructura bucal.

En sus primeros estadios larvarios, Artemia se alimenta de las sustancias nutritivas contenidas en su saco vitelino (D'Agostino y Provasoli, 1968). Posterior a este estadio, los nauplios utilizan las setas de las antenas para obtener alimento exógeno. En su forma adulta, Artemia posee estructuras especializadas para la filtración de partículas en el margen de los endópodos de los apéndices torácicos.

La forma de alimentación empieza con la formación de corrientes de agua originadas por los toracópodos, los cuales al filtrar éstas corrientes, atrapan las partículas que traen en suspensión y son llevadas a través del surco abdominal a la cavidad bucal.

Por ser Artemia un filtrador no selectivo, ingiere

todo tipo de partículas que son filtradas por los toracópodos, aunque éstas partículas deben tener las siguientes características: Un tamaño adecuado que logre pasar por la boca del organismo. El alimento disponible pueda ser digerido por el conjunto de enzimas digestivas que posee el organismo, para lo cual es conveniente que la rapidez, con que pasa el alimento por el tracto digestivo, permita la acción enzimática sobre el alimento. Que la cantidad de alimento ingerido no sea demasiado, pues esto crearía una presión que resultaría, en un flujo rápido del alimento, en el interior del intestino. Lo anterior puede provocar un bajo índice de aprovechamiento por una inadecuada asimilación del alimento.

Una vez que el alimento llega a la boca, es detenido por el Labrum, que se extiende a nivel de los apéndices torácicos, donde un fluido mucoso es secretado por éste, cementando las partículas en una masa o pelotas alimenticias que pasan a las mandíbulas para ser ingeridas.

En el caso de exceso de alimento en el medio, esta secreción no se lleva a cabo y las partículas son tomadas directamente. Una vez que éstas se encuentran en el tracto digestivo, da inicio una actividad enzimática acompañada de movimientos rítmicos y de absorción para el aprovechamiento del material nutritivo.

Reeve (1963a) discute y expone los factores que determinan la velocidad de filtración, concluyendo que el proceso de captación de partículas por Artemia se puede analizar en función de los siguientes conceptos y la relación que ellos guardan :

Tasa de Filtración : Cantidad de agua que pasa por el mecanismo del organismo en un tiempo dado.

Tasa de Ingestión : Cantidad de partículas consumidas en una unidad de tiempo.

En Artemia la tasa de filtración depende de la concentración de alimento en el medio, en cambio la tasa de ingestión no es proporcional a la concentración de alimento, pero es mayor si esta aumenta (Reeve, 1963b).

La tasa máxima de filtración es función del tamaño del organismo y la tasa máxima de ingestión es función del tamaño del alimento; el volumen de agua filtrada depende de la concentración de alimento en el medio. El aparato filtrador de Artemia no es selectivo, solo el tamaño de la partícula llega a ser limitante.

En el medio natural el alimento principal de *Artemia* lo constituyen microalgas y bacterias (Provasoli y D'Agostino 1969). En condiciones reguladas de laboratorio han sido utilizados otros tipos de alimento como : Microalgas (*Dunaliella*, *Isochrysis*, *Tetraselmis*, *Chaetoceros*, *Nitzschia*, *Chlamydomonas*, *Clorella*), salvado de arroz, suero de leche, extracto de hígado, microalgas deshidratadas (*Clorella*, *Scenedesmus*, *Spirulina*), macroalgas deshidratadas (*Enteromorpha*, *Porphyra*).

Nimura (1967) describe los requerimientos mínimos de sobrevivencia, proponiendo que éstos pueden ser agrupados en : vitaminas (Biotina, Tiamina, Riboflavina, Piridoxina, Acido Fólico, Vitaminas E y D), proteínas (Acidos nucleicos y Aminoácidos), Carbohidratos (Almidón) y Lípidos (Acidos Grasos). Paralelamente a éstos compuestos esenciales, se requiere también una actividad de ingestión de materia particulada, ya que esto mantiene el reflejo digestivo sin el cual el organismo muere, aun en medios enriquecidos con las sustancias disueltas antes mencionadas.

Para la alimentación de *Artemia* se han utilizado gran cantidad de materiales, incluyendo micro algas, bacterias, levaduras, y alimentos inertes, como harinas de cereales y macroalgas. Sus efectos han sido evaluados y reportados por diferentes autores.

2.- CONSIDERACIONES SOBRE EL ALIMENTO.

2.1. Tamaño de partículas.

En comparación con otros crustáceos, Artemia, tiene un mecanismo primitivo de alimentación siendo por tanto un organismo filtroalimentador fagotrófico no selectivo (Provasoli et al., 1959; citado por Dobbeleir et al., 1980). Las partículas suspendidas en el medio son removidas por las pulsaciones de los toracópodos sin importar la naturaleza de las mismas. Las sustancias solubles en el medio no pueden ser ingeridas eficientemente, excepto en los primeros estadios larvales (Dobbeleir et al., 1980). La acción de los toracópodos le permite coleccionar las partículas alimenticias y otras que no lo son, sin embargo, no tiene otra alternativa que comer continuamente, pues como ya se mencionó, Artemia constantemente esta nadando y con este batir constante de los toracópodos obtiene la captación de alimento sin cesar.

El alimento consumido por Artemia en la naturaleza se compone de porcentajes variados de partículas de material inerte, biológico (detritus orgánico), y de organismos vivientes de un rango de tamaño apropiado (normalmente de microalgas y bacterias).

En muchos biotopos de Artemia la presencia de un gran número de éstas, comunmente coincide con un afloramiento de microalgas. Los nutrientes disueltos y la materia orgánica y partículas en este tipo de agua, favorece el desarrollo de bacterias heterotróficas.

Experimentos llevados a cabo por Reeve (1963a) y Dobbeleir et al., (1980), han demostrado que Artemia no presenta una habilidad apreciable para discriminar entre alimento vivo de dos o tres tipos diferentes, así como tampoco discrimina entre partículas nutritivas y no nutritivas. También se ha reportado la ingestión de arena y microesferas de vidrio, que ha servido para determinar los rangos de tamaño de partícula y la concentración de éstas que puede ingerir Artemia.

Dobbeleir et al., (1980) trabajaron con microesferas de vidrio de diferentes diámetros (de pocos micrómetros hasta 120 micrómetros), poniéndolas en tubos de ensaye en los cuales había nauplios adultos de Artemia. Una vez ingeridas las microesferas se medían las que quedaban en el medio, encontrándose que para los nauplios, el tamaño máximo de partículas que puede ingerir, es del orden de 25-30 micrómetros y para los adultos los valores son de 40-50 micrómetros.

Estos resultados nos indican la no selectividad del aparato de alimentación de *Artemia*, por lo que, la presencia de material algal en el conducto digestivo no debe ser considerado como evidencia de su valor nutricional o de su digestibilidad por parte del organismo.

3.2. Tasa de filtración.

Uno de los factores que regulan el primer nivel trófico en la biomasa de los sistemas acuáticos, es el pastoreo de zooplancton. Con el propósito de conocer la tasa de filtración del zooplancton en general, se han llevado a cabo experimentos en el laboratorio, para poder encontrar las tasas que existen en el medio natural (Braun, 1980), sin embargo es difícil de obtener una interpretación satisfactoria en condiciones naturales porque influyen innumerables factores en la concentración de alimento (Steele, 1956; citado por Braun, 1980).

El concepto más actualizado de la tasa de filtración fué desarrollado por Harvey (1937) y Gauld (1951) con técnicas de conteo celular, en experimentos "in vitro" con algas y zooplancton. Marshall y Orr (1956 y 1952) expandieron este estudio usando isótopos radiactivos de carbono y fósforo. Recientemente Adams y Steele, (1966) (citados por Braun, 1980) incorporaron el carbono 14 con el

método de clorofila. Muchos investigadores en la última década han usado equipos de conteo para experimentos de pastoreo.

Reeve (1953b) define la tasa de filtración como la cantidad de agua que pasa a través de los mecanismos que atrapan el alimento de un organismo.

Reeve (1953a) trabajando con *Artemia* proporcionó como alimento, tres diferentes microalgas con distintas concentraciones, encontrando que la tasa de filtración depende de la concentración de alimento en el medio. La tasa máxima de filtración se mantuvo con una concentración de alimento en el medio. La tasa máxima de filtración se mantuvo con una concentración baja de alimento y empezó a decrecer cuando aumentaba la concentración de microalgas, también encontró que la tasa máxima de filtración es función del tamaño del organismo e independiente del tamaño del alimento, esto es, que a medida que *Artemia* crece, su tasa máxima de filtración se reduce, no importando la concentración de alimento en el medio.

Braun 1980, experimentó con *Artemia* para el cálculo de la tasa de filtración basándose en la ecuación de Adams y Steele 1966 :

$$F = (1/n*t) \ln(C_0/C_t) \text{ (ml/org/día)}$$

Donde : F = Tasa de filtración

n = Número de orgs. por litro

t = Período del experimento

C₀ = Concentración de clorofila "a" ó los conteos del control por minuto.

C_t = Concentración de clorofila "a" ó los conteos por minuto del medio.

Durante los experimentos se determinaron tres tipos de tasas de filtración :

- a). Cuando es usado el carbono 14, el término C_t es igual a la radioactividad encontrada en el medio más la encontrada en los desechos fecales y denominada (F).
- b). Si C_t es sólo la clorofila medida en la botella experimental, la tasa de filtración se denomina "F₁".
- c). Si C_t es el total de clorofila encontrada en la botella experimental junto con la que esta en los desechos fecales se le llama "F₂".

Con esta ecuación se encontró que más allá del valor promedio de 18.45 microgramos por litro de clorofila para la tasa de filtración, ésta disminuye conforme la concentración de alimento aumenta y por debajo de este valor, la tasa de filtración disminuye conforme la concentración de alimento decrece.

Un valor muy alto de concentración de clorofila "a" encontrado en el mar, puede ser de 20 microgramos por litro y en algunas ocasiones hasta de 30 microgramos por litro (Atkins y Jenkins 1953, citados por Braun 1980), de tal manera que el valor promedio mencionado corresponde aproximadamente a una población muy rica de fitoplancton en el mar.

Las variaciones en la tasa de filtración o de ingestión en *Artemia* respecto al incremento en la concentración de alimento han sido estudiadas por varios autores. Reeve y Walter en 1977 muestran valores para *Artemia* que sugieren que la tasa de filtración es constante en altas concentraciones de alimento (10,000 a 1'000,000 cels/cm³), con un promedio de 100,000 cels/cm³. En bajas concentraciones (alrededor 1,000 cels/cm³), la tasa de filtración decrece conforme la concentración de alimento aumenta.

Por otra parte, Rainbridge (1957) (citado por Braun, 1980), sugiere que una rica concentración de diatomeas en el mar tiene un promedio de $5,600 \text{ cels/cm}^3$ y en caso de mareas rojas alcanza concentraciones hasta de $51,000 \text{ cels/cm}^3$. La densidad máxima de fitoplancton es normalmente de 500 cels/cm^3 para las diatomeas y $2,500 \text{ cels/cm}^3$ para los flagelados, por lo que los valores de Reeve 1980, están derivados de una concentración altísima en comparación con la encontrada en el medio natural.

Braun (1980) reporta que los valores de la tasa de filtración de los nauplios de Artemia son extremadamente bajos con respecto a los valores de los adultos por lo que asume que existe una relación lineal entre la talla y la tasa de filtración, corroborando lo reportado por Reeve (1963b) y por el trabajo de Cushing (1959) para copépodos en general. Respecto a este organismo Gauld (1951) demostró que la tasa de filtración es aproximadamente proporcional al cuadrado de su longitud y que la misma tasa tiene una relación directa con la temperatura, ya que obtuvo valores muy bajos a temperaturas bajas fácilmente de explicarse debido a que en el medio natural el metabolismo de los animales disminuye a bajas temperaturas resultando subsecuentemente un decremento en la tasa de filtración.

2.3 Tasa de ingestión.

Uno de los factores importantes para conocer la nutrición de un organismo, es la tasa de ingestión, que Gauld (1951) definió como la cantidad consumida de partículas capturadas por medio de los mecanismos del organismo que remueven el medio ambiente.

Se ha mencionado que Artemia es un organismo filtrador no selectivo, por lo cual ingiere todo tipo de partículas de diámetro apropiado, no siendo necesariamente esto un indicador de la asimilación de alimento. La presencia de material alimenticio (algas o detritus) en el tubo digestivo de Artemia, no debe ser considerado como una evidencia de su valor nutricional o de su digestibilidad por éste organismo.

La tasa de ingestión está íntimamente ligada con la concentración de alimento en el medio y los valores de la tasa de filtración que alcanza el organismo. A medida que se aumenta la concentración de alimento, la tasa de ingestión también se incrementa y el metabolismo es positivo. Esta concentración alcanza un límite después del cual el alimento se aglomera en la boca de Artemia, formando un bolo tan grande que no puede ser ingerido. Además, pasa demasiado rápido por el tracto digestivo y no

permanece el tiempo que se requiere para ser digerido y asimilado correctamente, sucediendo entonces que a pesar de que el organismo tiene alimento abundante se está muriendo de hambre, y por lo tanto su crecimiento se retarda o se inhibe. Trabajos previos a estos estudios habían sugerido que la inhibición del crecimiento, era debida a la teoría de exclusión animal de Hardy (1936), la cual argumentaba que las microalgas producen algún metabolito venenoso al predador.

La concentración de alimento esta también ligada a la edad de Artemia en su relación con la tasa de ingestión. En este sentido la tasa de ingestión no es proporcional a la concentración de alimento. Si esta aumenta la tasa de ingestión también aumenta, pero a medida que Artemia crece consume menos alimento por unidad de peso. Los organismos mayores alcanzan su máxima tasa de ingestión con un número menor de células ingeridas.

Reeve (1963b) realizó un experimento con Artemia de diferentes tamaños para determinar la tasa de ingestión y la relación que esta tiene con otros factores como son la edad, concentración de alimento tamaño de alimento, variación de éste.

En relación al tamaño Reeve (1963b) utilizó organismos

de seis tallas diferentes (0.5, 1, 2, 5, 7.5 y 10 μm .) reportando que a medida que el tamaño de *Artemia* aumenta, la tasa máxima de ingestión se alcanza con una concentración menor de alimento en el medio. Cuando el organismo alcanza su máxima tasa de ingestión, ésta se mantiene constante a pesar del aumento de concentración de alimento, y al mismo tiempo decrece la tasa de filtración. Durante el tiempo que tarda *Artemia* en alcanzar su tasa máxima de ingestión, la tasa de filtración se mantiene constante a pesar del aumento en la concentración de alimento.

Aunque la tasa máxima de filtración es independiente del tamaño de la célula, la tasa máxima de ingestión es inversamente proporcional a éste, por ejemplo, Reeve (1963b) reportó los siguientes valores para tres tipos diferentes de alimento :

Microalgas	Tasa Max. Ing.	Vol. Particula	Vol. Ingerido
<i>Chlorella</i>	1'500,000 (cels)	31 (μm^3)	465 ($\mu\text{m}^3 \times 10^5$)
<i>Phaeodactyllum</i>	400,000	113	452
<i>Dunaliella</i>	150,000	345	518

Existe un paralelo entre la tasa de filtración y la tasa de ingestión, ya que a veces entre mayor es el número

de partículas que se van a ingerir, mayor es la filtración y después de cierto momento, la tasa de filtración baja y la de ingestión aumenta. Finalmente se mantiene un equilibrio entre ambas tasas. Si se aumenta la concentración de partículas en el medio, este equilibrio se rompe.

2.4 Cápsulas fecales.

El estudio de los residuos de alimento digerido adquiere importancia, ya que a través de ellos se pueden conocer algunos aspectos del movimiento del alimento a través del intestino y nos permite conocer si éste proceso tiene algún efecto sobre el método de alimentación del organismo, así como del tipo de alimento que puede aprovechar mejor.

El estudio de las cápsulas fecales fué usado por Harvey et al., (1935) como una medida de la actividad del pastoreo del zooplancton en el mar. Raymond y Gross (1942) reportaron que el tamaño de las cápsulas fecales producidas por Calanus varían con la naturaleza y cantidad de alimento disponible y era diferente para machos y hembras.

Reeve (1963c) llevó a cabo un experimento en el cual utilizó Artemia de 6 tamaños diferentes, midiendo

diariamente el número de cápsulas. El mismo autor muestra que no hay una relación directa entre la producción y el tamaño de las cápsulas, y el aumento en la concentración de alimento en el medio. También muestra que la producción y el tamaño de las cápsulas parece independiente de la naturaleza del alimento. Es importante señalar que debido a que el organismo no distingue entre partículas alimenticias y no alimenticias, en bajas concentraciones de alimento, la producción de cápsulas es similar en los experimentos con microalgas y con granos de arena, pero a medida que la concentración de arena se incrementa, la producción de cápsulas también aumenta. Esto último indica que los granos de arena podrían tener una función aceleradora de la egestión.

Artemia produce cápsulas fecales durante toda su vida, aún cuando no haya alimento en el medio. Reeve (1963c) al experimentar con Artemia en una concentración de alimento normal y otras sin alimento alguno, reporta que no hay diferencia en el número de cápsulas formadas entre uno y otro grupos de animales.

Las cápsulas fecales tienen una membrana quitinosa, posiblemente formada por proteínas y carbohidratos que se forma a lo largo del tracto digestivo. Dentro de las cápsulas existe una matriz mucosa que mantiene unido el

contenido. La película quitinosa está en constante producción, aún cuando no haya alimento. El hecho de envolver los desechos fecales es típico de algunos crustáceos primitivos, en los copépodos es un mecanismo de prevención que evita que el propio organismo ingiera sus propios desechos, lo que resultaría en un gasto energético ya que las cápsulas fecales tienen un contenido energético mínimo.

La capa quitinosa actúa como un moderador del tiempo de residencia del alimento en el tracto digestivo, mientras no se recubren los desechos, éstos no salen del organismo. Pero como la ingestión es continua, ésta capa también sirve como lubricante.

Artemia posee un esfínter anal que es el que le da forma de rosario a la cápsula.

El esfínter funciona por medio de bandas de músculos circulares, que rodean al epitelio y hacen que el orificio anal, se contraiga y una banda de músculos radiales, que van del intestino a la pared del cuerpo del organismo y, que al contraerse, hacen que el ano se abra para dar paso a las cápsulas fecales.

Cuando la concentración de alimento es mucha dentro

del tracto digestivo, el esfínter no puede funcionar y se mantiene abierto, por lo cual, el alimento es expulsado por medio de la presión, que provoca el alimento que esta siendo ingerido por la boca.

El estudio de las cápsulas fecales, sirve en último caso como indicador del grado de asimilación del alimento por parte del organismo.

2.5 Enzimas Digestivas.

En general, los procesos digestivos de los crustáceos se realizan mediante enzimas, las cuales en forma global están constituidas de proteasas, amilasas y lipasas.

En *Artemia*, es un indicador de sus requerimientos nutritivos, de tal forma que durante el desarrollo del organismo, existen altos niveles de actividad enzimática que reflejan altos niveles de necesidad alimenticia.

Sin embargo, otros factores influyen en la síntesis de enzimas digestivas, al menos esto sucede en otros organismos como insectos y crustáceos. La composición bioquímica del alimento, influye en la síntesis de las enzimas digestivas, por lo cual dependiendo de la naturaleza del alimento el organismo sintetizará las enzimas

específicas.

Tomando en cuenta que el organismo en su alimentación no es selectiva, deberá tener la capacidad de asimilar casi todo lo que ingiere, sintetizando enzimas conforme al tipo de alimento ingerido.

Las tripsinas y amilasas se sintetizan independientemente y dependen de las características del alimento, por lo tanto, los mecanismos adaptativos de máxima asimilación implican :

- 1). Que la modulación de la tasa de ingestión sea función de las propiedades fisicoquímicas de la partícula alimenticia; partículas de mayor tamaño influyen en una menor ingestión y partículas de menor tamaño representan una mayor ingestión.
- 2). La regulación de la síntesis de enzimas digestivas por el volumen de alimento ingerido y por la composición bioquímica del mismo.

La regulación de las enzimas durante el desarrollo de Artemia optimiza el uso de alimento disponible en función de los requerimientos nutritivos.

3. REQUERIMIENTOS NUTRITIVOS.

3.1. Proteínas

Las Proteínas son utilizadas por Artemia para la formación de estructuras, síntesis de hemoglobinas, síntesis de ácidos nucleicos, crecimiento, secreción del corión y exoesqueleto, aprovechando la mayor parte de los aminoácidos presentes en el alimento.

Los aminoácidos encontrados en Artemia con más frecuencia son :

Acido Glutámico	Glicina	Prolina
Acido Aspártico	Histidina	Serina
Alanina	Isoleucina	Tirosina
Arginina	Leucina	Treonina
Fenilalanina	Lisina	Valina

La composición de aminoácidos de Artemia puede variar con el tipo de alga que usa como alimento, lo que puede alterar la química del organismo y puede afectar su valor nutricional (Claus et al., 1979; Landau et al., 1985).

Con respecto a la proporción de proteínas en el alimento, se ha reportado un crecimiento lento al usar

alimentos pobres en proteínas (Sick 1976; Claus et al., 1979); y a la vez, un exceso de proteína (niveles mayores de 28 %) han retardado el crecimiento, además de aumentar el nivel de amoníaco en el medio (Hancock, 1973).

Los requerimientos proteínicos de las distintas razas geográficas de Artemia están relacionados a su grado de ploidia, siendo mayor la necesidad de proteínas en las razas partenogenéticas diploides (o poliploides) que para las bisexuales haploides.

Algunas razas de Artemia partenogenética, así como bisexuales, tienen dificultad para sintetizar ácidos nucleicos, así como purinas o pirimidinas; tal es el caso de Artemia parthenogenética de Levalduc, y Artemia del Gran Lago Salado (Utah). La falta de ácidos nucleicos implica ausencia de transmisión genética, y la falta de purinas o pirimidinas además ocasiona severas malformaciones morfológicas.

De particular importancia para el buen crecimiento de Artemia son las purinas, en especial Adenina, y la Pirimidinas (Citosina, Timina) pues son las bases de los nucleósidos y nucleótidos (Acido Adenilico y Acido Citidilico). Sin embargo debe conservarse una proporción constante entre el Acido Adenilico y el Acido Citidilico,

pués en abundancia de éste (y deficiencia de Adenilico) se induce la morfogénesis de gonopodos abdominales (Hernandorena, 1980).

Pavillon et al., (1980) describieron la absorción activa de aminoácidos disueltos en el medio por parte de los huevos y nauplios de Artemia, durante las primeras 48 horas. Notaron diferencias en los aminoácidos más absorbidos por larvas, nauplios de 24 hs. y nauplios de 48 hrs. Las larvas absorbieron sólo Glicina, Serina y Triptófano, durante las primeras 6 horas. Después de 24 horas, la absorción en orden decreciente fué de Glicina, Lisina, Metionina, Arginina, Acido Glutámico, Aspargina, Serina, Treonina y Triptofanos. A las 48 horas: Metionina, Lisina, Glicina, Aspargina y Arginina.

Ahora bien, es claro que si añadimos aminoácidos en forma disuelta, el valor alimenticio de alimentos inertes se verá favorecido, al igual que el alimento vivo. Pero en altas concentraciones, los aminoácidos disueltos pueden ser inhibitorios para el desarrollo de los organismos, debido a su toxicidad inherente. En pequeñas cantidades, al contrario, favorecen el desarrollo (Pavillon et al., 1980).

3.2 Lípidos

Son un recurso energético y de reserva, que *Artemia* adquiere a partir de los vegetales (microalgas). Los lípidos más importantes en *Artemia* son : Ácidos grasos, terpenos, esteroides y glicolípidos.

Ácidos grasos.

Los incorpora al alimentarse, por ello depende de que el alimento contenga los ácidos grasos que necesita, o bien sus precursores, y su asimilación varía con la raza geográfica de *Artemia* (Schauer et al., 1980).

Los ácidos grasos que se han determinado más importantes son los del grupo de 14 a 20 carbonos :

14:0	Acido Myristico	Saturado
16:0	Acido Palmítico	Saturado
16:1 (9)	Acido Palmitoleico	Insaturado
16:4 (6, 9, 12, 15)	Acido Hexadecatetraenoico	Insaturado
18:0	Acido Esteárico	Saturado
18:1 (9)	Acido Oléico	Insaturado
18:2 (9, 12)	Acido Linoléico	Insaturado
18:3 (9, 12, 15)	Acido Linolénico	Insaturado

Series C20 y C22.

Para los ácidos grasos se usa la siguiente nomenclatura abreviada : La primer cifra es el número de átomos de carbono en la molécula, el número que sigue a los dos puntos, es el número de dobles ligaduras y los números entre paréntesis, muestran las posiciones de éstas, contando desde el grupo carboxilo numerado 1.

En muchos zooplanctones, se ha observado la similitud entre su propio patrón de ácidos grasos, y el de su alimento, tal es el caso de Artemia. Claus et al., (1979), demostraron que este patrón de ácidos grasos, incluso depende de las condiciones ambientales y nutricionales en que fueron producidos los quistes, contando con la facultad de asimilar selectivamente ácidos grasos y sintetizar ácidos insaturados, cuando éstos están ausentes de la dieta, o presentes en pequeñas cantidades, a través de procesos determinados, como alargamiento de cadenas o introducción de dobles ligaduras (Hinchcliffe and Riley, 1972.)

Los niveles de algunos ácidos grasos saturados se mantienen constantes, como el ácido palmitico, que ocurre en igual proporción que en el alimento. El ácido myrístico se mantiene en un nivel de 1.3-3.0 % sin importar el contenido de éste en la dieta. Por el contrario, el ácido esteárico es siempre varias veces más abundantes en Artemia

que en su alimento (Hinchcliffe et al., 1972).

De los ácidos grasos insaturados, para Artemia el más importante es el ácido oléico, que frecuentemente es minoritario en la dieta, lo cual sugiere que Artemia lo puede sintetizar (Hinchcliffe et al., 1972; Claus et al., 1979). El ácido linoléico parece mantenerse a nivel constante.

Entre las especies de microalgas ensayadas como alimento, se recomienda el uso de aquellas cuyo patrón de ácidos grasos es más uniforme.

Terpenos.

Este grupo de lípidos, también llamado carotenos, son esenciales en Artemia, debido a que no puede sintetizarlos. Muchos terpenos forman parte de las reservas energéticas del quiste, y pueden ser considerados como precursores de algunas vitaminas.

Los terpenos reconocidos como más importantes para Artemia son :

B-Caroteno : A partir del cual se sintetiza Equinona, y de ésta la Cantaxantina los cuales son esenciales para la

síntesis de vitamina A (Retinol) y vitamina E (Tocoferol), que favorecen la fecundidad y viabilidad de los cigotos.

Ubiquinona (Coenzima Q) un derivado benzoquinónico, presente en procesos de óxido-reducción; ayuda al transporte de electrones en el proceso de fosforilación oxidativa para la formación de ATP.

Criptoxantina, Zoaxantina y Astaxantina, compuestos poco conocidos, pero considerados esenciales.

Esteroides. Artemia tiene pequeñas cantidades de Colesterol y Ergosterol, siendo éste último precursor para la formación de vitamina D (calciferol).

Glicolípidos. Artemia posee glicolípidos combinados con el glicerol, que son utilizados como recursos energéticos, cuando recién eclosiona, antes de incorporar alimento exógeno.

3.3. Carbohidratos.

Junto con los lípidos y proteínas, constituyen las fuentes de energía en organismos vivos, así como un elemento de almacenamiento. Artemia no utiliza carbohidratos simples como sacarosa o glucosa, sino que

hace uso de almidón como fuente energética. Es de primordial importancia durante los tres primeros días de crecimiento, y posteriormente cede su importancia a proteínas y lípidos (Johnson, 1980). La falta de almidón en la dieta ocasiona muerte en los adultos a los tres días, y en un metanauplio en 1 ó 2 días.

La proporción de carbohidrato y proteína recomendada es 5:1, (almidón : albúmina, generalmente).

3.4 Vitaminas

Las vitaminas son sustancias orgánicas, formadas por los elementos de la química del carbón, algunas de las cuales también contienen S, Cl. Las vitaminas del grupo "E", son sustancias orgánicas, esenciales para el mantenimiento de funciones metabólicas normales, pero que, no son sintetizadas en el organismo y por tanto deben ser obtenidas de fuentes exógenas. Satisfacen necesidades específicas diferentes. Experimentos llevados a cabo en medios asépticos (axénicos) han permitido encontrar cuales son las vitaminas que son necesarias para el desarrollo de *Artemia* (Provasoli, and Shiraishi 1959). Entre las que se mencionan están :

- Tiamina (B1)
- Riboflavina (B2)
- Piridoxina (B6)
- Cianocobalamina (B12)
- Acido fólico
- Biotina
- Acido ascórbico
- Carnitina
- Acido nicotínico (niacina)
- Pantotenato de calcio
- Vitamina "A"
- Vitamina "D"
- Vitamina "E"

Es raro encontrar una microalga que cumpla con todos los requerimientos nutritivos de un predador, ya que incluso microalgas del mismo género son distintas en composición. Por otro lado, microalgas adecuadas a un predador pueden ser inadecuadas para otros predadores. Para Artemia se encontraron las siguientes microalgas, que cumplen con un máximo de sus requisitos como alimento :

Monochrysis lutheri

Tetraselmis maculata

Isochrysis galbana

Rhodomonas sp. (Provasoli et al., 1970)

Una vez que la presa es ingerida, la eficiencia del alga como alimento varia con la composición y los requerimientos nutritivos del predador, (Provasoli et al., 1970).

La insuficiencia en el alimento puede ser debido a deficiencias nutricionales tóxicas o digestivas; Prymnesium parvum es tóxica para Artemia, también algunos dinoflagelados incluyendo especies no tóxicas para peces o mamíferos, como Gyrodinium aureolum que causa efectos inhibitorios en el desarrollo de Artemia.

Se ha visto que en cultivos axénicos este organismo puede adquirir del medio las vitaminas que necesita, cuando son suministradas en forma directa, (solubilizadas), pero en su medio natural, generalmente las fuentes principales son las microalgas y las bacterias. Además, la osmotrofia en Artemia es limitada para otros solutos mayoritarios, y es en un 50% más eficiente la asimilación de los nutrientes, al proporcionárselos en forma particulada (Provasoli, 1969).

Se ha reportado también que en cultivos asépticos, (axénicos) este crustáceo, después de tres o cuatro generaciones, se vuelve infértil, al parecer es necesaria la presencia de bacterias, para proveer de algunos

elementos necesarios en la alimentación, como son las vitaminas. También se ha encontrado que agregando extracto de hígado y levaduras, las Artemia infértiles se restablecen.

La fuente de vitaminas "A" y "K" que necesita el organismo las obtiene de los carotenos. El recurso principal de carotenos para Artemia es exclusivo de las microalgas, ya que el alimento de origen animal es pobre en carotenos, y además no los sintetiza.

La fecundidad y la viabilidad de Artemia está favorecida por la vitamina "A" y "E". Otra vitamina importante para dicho organismo, es el ácido fólico, que interviene en la síntesis de purinas y pirimidinas. Se ha visto que al emplear Artemia como alimento, pobre en contenido de ácido fólico, produce parálisis, falta de coordinación en los movimientos y fallas en el ciclo de mudas de crustáceos decapodos.

4. TIPOS DE ALIMENTO

Siendo Artemia un organismo filtroalimentador, no existen muchas opciones a escoger, en cuanto a la manera de darle de comer, sin embargo esto se compensa con la gran variedad de formas de alimento que se pueden proporcionar.

Cualquier organismo heterótrofo, selecciona el tamaño de aquello que habrá de llevarse a la boca para sobrevivir, algunos serán capaces de fraccionarlo, otros no. Esto es precisamente lo que sucede con Artemia pues solo tomará del medio, partículas de 40 a 50 micras, cuando adulto. (Dobbeleir et al., 1980).

4.1. Inerte

La dieta inerte, comprende aquél alimento no vivo que ha sufrido un proceso de adecuación, para ser consumido, o sea, que ha sido secado, molido y tamizado a un tamaño que pueda ser ingerido.

Las dietas más comunes son las harinas de algunos cereales, y productos de desecho agrícola, como la cascarilla (salvado) de arroz y trigo.

Dobbelier et al., (1980) probaron algunas dietas,

inertes en el cultivo masivo de Artemia, y observaron que, la harina de salvado de trigo no era de lo más apropiado para un buen crecimiento como alimento único, en cambio, el salvado de arroz mostró resultados mucho mejores en cuanto a sobrevivencia, rendimiento y costos.

Además, utilizaron frijol de soya, notando que a los pocos días, sube la concentración de amoníaco, debido al gran contenido de proteínas soluble que favorece el crecimiento de bacterias.

Algunas macroalgas, como Enteromorpha, han probado ser buen alimento, cuando se mezclan con salvado de arroz, arrojando datos de sobrevivencia de hasta el 85% (Johnson, 1980).

Claus et al., (1979), trabajando con dos dietas algales diferentes demostraron que el polvo de spirulina comparada con scenedesmus daba un mejor rendimiento, quizá debido a su mayor contenido protéico. Spirulina tiene un 72% y scenedesmus un 55%.

Sorgeloos (1974) hizo pruebas con Dunaliella procesada encontrando poca diferencia entre homogenizar con Ultrason, congelar y evaporarla, en lo que se refiere al valor energético del alimento. Sin embargo, menciona que el uso

de Ultrason puede reducir la partícula alimenticia a un tamaño menor que el mínimo atrapable por Artemia.

Empleando Scenedesmus, encontró que el organismo no puede romper la capa celular de la alga congelada, lo que explica que tengan un menor grado de conversión alimenticia que con Dunaliella.

En este curso se probó la macroalga, (Porphyra perforata) como alimento inerte para Artemia, observándose un crecimiento más rápido que cuando se proporcionó Tetraselmis suecica.

4.2 Vivo

Prácticamente como única fuente de alimento vivo — se pueden considerar las microalgas, esto es cuando se trata de cultivos controlados, ya que en el medio natural algunas bacterias y materia orgánica forman parte de su dieta natural.

Sin embargo, aunque el alimento vivo es una de las mejores dietas, resulta todavía demasiado cara su producción masiva, debido al alto costo de los nutrientes básicos como la tiamina, biotina, vitamina B-12, nitratos, fosfatos y otros.

Landau et al., (1985) sustituyeron algunos macronutrientes por componentes orgánicos, como biodigeridos de vaca en cultivos de Tetraselmis, para alimentar Artemia, comparándola contra el medio tradicional, F/2 de Guillard y Ryther (1962). Este último, resultó mejor en cuanto a crecimiento, sin embargo, el contenido de aminoácidos de Artemia con las dos dietas, no fué significativamente distinto.

Algunas microalgas que reportan buen crecimiento para Artemia, son las siguientes :

Diatomeas : Chaetoceros, Thalassiosira, Nitzschia.

Phaeodactylum

Chrysofitas : Isochrysis, Monochrysis Pavlova.

Stychochrysis

Cloroficeas : Dunaliella, Platymonas Tetraselmis.

Chlamidomonas

Siempre es recomendable mezclar dos o tres microalgas al elaborar una dieta, guardando proporciones semejantes según su contenido protéico y sobretodo su disponibilidad.

4.3 Solubilizado.

Es posible disolver en el agua, donde se mantiene el

cultivo de Artemia, ciertos componentes que vendrán a enriquecer dicho medio. Este beneficio se va aumentando durante los 3 primeros estadios de crecimiento del nauplio, cuando aún puede ingerir eficientemente el alimento soluble (Provasoli y D'Agostino, 1969).

Regularmente éstos compuestos, son productos de desecho, como el suero de leche de la industria de los quesos. Algunas levaduras, son también usadas para enriquecer éstos cultivos.

Sushchenya (1962), trabajó con soluciones de células de levadura en Artemia juvenil, (15 días de edad) y adulta, (más de 15 días de edad), encontrando que los juveniles ingerían entre el 32-166% de su peso en alimento, y los adultos ingerían entre 12-141% de su peso diariamente.

Pavillon et al., (1980), recurrieron al uso de aminoácidos disueltos, para enriquecer dietas vivas de Phaeodactylum tricornutum, y dietas inertes de polvo de Spirulina, indicando que hubo un efecto positivo en el crecimiento, sin embargo también observaron que la presencia de dichos aminoácidos contribuye a la mortalidad de Phaeodactylum tricornutum.

Provasoli y D'Agostino (1962), han utilizado medios

artificiales (con alimento soluble) para criar Artemia, consistentes en: Sales minerales, Aminoácidos, DNA-RNA hidrolizados, Vitaminas, Azúcares, Factores lipo-solubles y una fase fina particulada, (formada de almidón, alfa-gamaglobulinas y albúmina).

Notaron además, la necesidad de 8 vitaminas para producir adultos maduros, siendo las más importantes la Tiamina y el Acido Fólico.

En ausencia de la primera, no crece más allá de Metanauplio IV y en ausencia de la segunda, se queda en juvenil. La deficiencia de otras vitaminas detiene el crecimiento y la diferenciación a distintas etapas del desarrollo entre estos dos extremos. Mencionan que el Inositol, la Colina y la Carnitina, podrían participar en la producción de huevos, porque cuando existen en el medio, hay más hembras cargando huevos.

4.4 Encapsulado.

Un régimen particulado, será regularmente inerte, una vez que se haya pasado por un tratamiento previo, y será casi siempre administrado a organismos adultos, que no tendrán mayor problema para tomarlo del medio.

Una alternativa para este tipo de dietas particuladas, es la microencapsulación, ya que esta presentación, protege al alimento de la contaminación bacteriana, y evita que se disperse en el medio.

Jones, et al., 1975 demostraron, que dietas simples, encapsuladas dentro de una membrana de proteína, podrían ser usadas para darle de comer, y mantuvieron cultivos de Artemia con dietas microencapsuladas, (en pared permeable), consistentes en un 10% proteína, (albúmina o caseína), 5% almidón y 0.3 %, colesterol. Así mismo, mencionan que este método tiene muchas aplicaciones aún no exploradas, como son la administración de antibióticos y de vitaminas.

4.5 Preparación de dietas.

La elaboración de un régimen alimenticio, para cualquier organismo, implica tener un conocimiento previo de sus necesidades nutricionales, al menos en cuanto a lípidos y proteínas, para así estructurar la dieta más adecuada.

Es conocido que uno de los factores que más encarecen una empresa acuicultural, en la mayoría de las veces, es la preparación y administración de alimento, ya sea natural o artificial. El nivel trófico en que se encuentren situados

como la presentación seca del polvo de spirulina o, macroalgas molidas. Otra alternativa a la dieta artificial, es solubilizar en el agua, donde se mantiene a Artemia, ciertos aminoácidos, lípidos y carbohidratos.

Al momento de preparar una dieta para Artemia, es de vital importancia proveerle de aquello que no puede sintetizar por si misma. Una dieta ideal, deberá ser rica en lípidos y proteínas. Lípidos tales como ácidos grasos, (esenciales), terpenos, (esenciales), esteroides, (esenciales), triglicéridos, fosfátidos y glicolípidos (glicerol). El almidón también debe estar presente cuando menos en proporción 5:1 con la albúmina, ya que de carecer ésta moriría en un término no mayor de tres días.

De los ácidos grasos que no deben de faltar en la dieta ideal se tiene ácido palmítico (saturado 16:0), ácido palmitoléico (no saturado 16:1), ácido margárico (17:0), ácido esteárico (saturado 18:0), ácido oléico (no saturado 18:1), ácido linoléico (no saturado 18:2), ácido linolénico (no saturado 18:3).

La diferencia entre un ácido graso saturado y uno no saturado, es su capacidad para oxidarse, aquellos con más dobles ligaduras se oxidarán más fácilmente.

define de primera intención el tipo y calidad de su dieta.

Artemia se encuentra dentro del segundo nivel de la cadena alimenticia, porque es organismo filtro-alimentador, ya que atrapa de su medio ambiente, partículas que se encuentran en suspensión. Para éstos se vale de los toracópodos, mediante el movimiento rítmico de éstos.

Artemia está en constante movimiento ya que para que tenga un efectivo control de intercambio de iones, es necesaria una continua circulación de agua, la cual ocurre al mover los toracópodos. Por lo tanto, todo el tiempo está pasando agua por su tracto digestivo, intercambiando iones con el medio, y tomando partículas, sean alimenticias o no, de aquí que sea un filtrador no selectivo.

Como ya se mencionó, la preparación de una dieta, sea natural, (viva) ó artificial, (inerte) implica altos costos de producción, por lo tanto es válido hacer uso de la alta tasa de filtración de Artemia para darle a comer productos de desecho de alguna industria alimenticia local, como salvado de trigo, arroz, cebada, coco (copra) y otros, abaratando un poco este rubro.

Dentro de las dietas naturales, encontramos como primera opción los cultivos de microalgas y bacterias. Así

Los terpenos (carótenos) que también son esenciales para Artemia, deben ser incluidos en la dieta, ya que no los sintetiza. Forman cadenas largas de 30 a 40 carbonos, muchas dobles ligaduras y anillos de 5 carbonos, algunos de los más importantes son : beta-caroteno, ubiquinona, criptoxantina, zeaxantina, y la astaxantina. La cantaxantina también es importante pues de ella se derivan las vitaminas A y B que cumplen funciones básicas para la fecundidad y vitabilidad de los cigotos.

Se ha visto que Artemia no puede progresar si se mantiene en un medio de cultivo axénico, en ocasiones muere en estadio juvenil. En parte, esto es debido a la falta de vitaminas sintetizadas por las bacterias, que existen en todo medio de cultivo no axénico (Johnson, 1980).

Von Hentig (1971), reporta que los carbohidratos, son fuente de energía primaria para embriones de Artemia, mientras, que para el desarrollo posterior la fuente principal son los lípidos y las proteínas.

Las proteínas, que son una secuencia ordenada de aminoácidos, no deben de faltar en dieta alguna que se considere completa. Artemia no es la excepción y debemos de proveerle los 20 aminoácidos pues los requiere casi todos.

Algunos de los más abundantes son: ácido glutámico, lisina, arginina, ácido aspártico, serina, alanina, leucina, prolina, glicina, isoleucina, fenilalanina, treonina, valina, tirosina, histidina y otros.

Es interesante notar la interacción que existe entre algunos componentes esenciales en la dieta de Artemia, tales como los ácidos nucleicos adenilico y citidilico que deben de estar en proporción constante. Sin el primero y abundancia del segundo, se generan gonópodos abundantes.

Una dieta compuesta por microalgas proporciona ácido fólico, sin el cual no es posible sintetizar el ácido adenilico, el cual a su vez depende de la presencia de albúmina. Ahora bien, si aumentan la temperatura y salinidad disminuyen los requerimientos del ácido adenilico, con las consecuencias antes vistas.

4.6 Alimento Complementario

Consideramos alimento complementario aquello que vendrá a enriquecer una dieta ya establecida para Artemia.

En su medio natural Artemia se alimenta de microalgas, bacterias y materia orgánica en suspensión, en cambio, en cultivos regulados se le proporcionará alimento según las

posibilidades con que cuente el acuicultor en cuestión, que como ya se mencionó antes, hay una gran variedad de opciones.

Lo más común es realizar cultivos anexos de microalgas, y mejor aún, es mezclar éstos con algún tipo de harina, ya sea de algún cereal o de macroalgas.

Provasoli y D'Agostino (1969), realizaron estudios tendientes a elaborar una dieta artificial para *Artemia* utilizando partículas de almidón de arroz, gel de almidón, varios azúcares y soluciones asépticas de proteínas como: albúmina de huevo cristalina, gama-globulina y beta-lactoglobulina disueltas en agua de mar, filtradas y esterilizadas, así como proteínas particuladas (las mismas citadas anteriormente) disolviendo un gramo de ellas en 50 ml de agua de mar, extracto de hígado de vaca, usado como complemento y compuestos gelados, esto es mezclas de grasas solubilizadas. Los resultados de lo anterior | fueron satisfactorios, sin embargo el manejo y materiales aplicados no compensan.

Es posible también añadir pequeñas concentraciones del complejo B como biotina, tiamina, B-12, a nuestro medio de cultivo, aunque sin embargo no siempre será posible dado su alto costo.

5. EFECTOS DE FACTORES FISICO-QUIMICOS EN LA NUTRICION DE ARTEMIA.

El crecimiento de los organismos ciertamente esta influenciado por el conjunto de factores bióticos y abióticos del medio donde vive. El efecto de éstos tiene profunda repercusión a niveles bioquímicos de tal forma que en los procesos de nutrición, la influencia de los factores ambientales es indiscutible.

En Artemia los fenómenos recién descritos no hacen la excepción.

Sabiendo que los requerimientos energéticos, son provistos principalmente por carbohidratos y proteínas, se mencionaran los efectos de la temperatura y salinidad sobre la utilización de almidón, lecitina, y albúmina.

El conocer las variaciones de los niveles de AMP (Adenosin Mono Fosfato), con los cambios de temperatura y salinidad, tiene utilidad puesto que la morfogénesis del AMP puede tomarse como indicador de síntesis protéica en Artemia, debido a que el metabolismo oxidativo y la producción de ATP, son requeridos para incorporación de aminoácidos en proteínas tisulares. (Hernandorena, 1974).

Debido a la gran diversidad de biotopos, que suele ocupar por su gran capacidad de adaptación, resulta difícil asignar una temperatura óptima general para el desarrollo de todo el género. Probablemente existen tantos óptimos como razas de Artemia. Sin embargo, en base a la literatura disponible, es posible situar este óptimo en un rango de 25 a 30 g.c.

La temperatura es el factor ambiental que está fuertemente correlacionado con el crecimiento, siempre y cuando sea en el rango adecuado, para determinada especie, pues en temperaturas bajas Artemia puede seguir viviendo, aunque su desarrollo es más lento. La influencia de la temperatura sobre el metabolismo, es directamente sobre los procesos bioquímicos, que son catalizados por enzimas. La variación de la tasa de crecimiento, entre distintas razas de Artemia, ha sido estudiada y se ha comprobado que tal variabilidad existe (Reeve, 1963a; Von Hentig, 1971).

En Artemia, la acción general de la temperatura, ha sido medida por el metabolismo de AMP, puesto que un aumento de temperatura, no aumenta la tasa de crecimiento en un medio deficiente de AMP. (Hernandorena, 1976).

Se conoce que a 30 g.c. el máximo crecimiento se

obtiene, con mayor cantidad de AMP y menos almidón, (o más albúmina) que a 25 g.c. con un incremento de salinidad, se requiere menos AMP. El requerimiento de AMP puede ser la base bioquímica de la relación entre temperatura y salinidad.

El hecho de que a 25 g.c. (con salinidad de 24ppm) los requerimientos de AMP y de nutrientes energéticos, aumenta con el incremento de la concentración de albúmina en la dieta, puede interpretarse como un aumento del requerimiento de ATP, para biosíntesis protéica, ya que el ATP producido por el metabolismo energético es necesario para la incorporación de aminoácidos en tejidos protéicos.

Cuando la temperatura alcanza los 30 g.c. (a salinidad de 24 ppm), la tasa de crecimiento de *Artemia*, presenta un aumento con el incremento de la concentración de albúmina, y AMP, sin necesitar más nutrientes energéticos.

Es sabido que *Artemia*, criada en diferentes salinidades, muestra modificaciones en su forma. En particular, con un aumento de salinidad el abdómen se hace largo y angosto (Gilchrist, 1960).

Otros cambios, reportados por variaciones de salinidad, incluyen modificaciones de la actividad de la

enzima succionodeshidrogenasa, con el consumo de oxígeno, y disminución del consumo de oxígeno, con el aumento de la salinidad (Eliassen, 1952; Dutrieu, 1960; Engel y Angelovic, 1968). Entonces también puede esperarse que la salinidad modifique el metabolismo del AMP, y consecuentemente su desarrollo.

La variación de la salinidad afecta los requerimientos de almidón y albúmina. Con el aumento de salinidad, se reducen los requerimientos de almidón y parece ser que los requerimientos energéticos, ya no son provistos por el almidón. Con el aumento de salinidad, se incrementa el requerimiento de albúmina, indicando la importancia particular de la biosíntesis de prolina en la adaptación de Artemia a la salinidad (Huggins, 1969).

De acuerdo a Provasoli y D'Agostino (1959), a medida que aumenta, el nivel de albúmina, se necesita más almidón para un crecimiento óptimo. La razón óptima de almidón-albúmina, se encuentra entre 5:1 y 3.3:1, pero Hernandezrena (1974), encontró que esto no se cumple, para el caso de salinidades altas, (120 ppm), en que para un medio deficiente en almidón, se necesita mucho más albúmina, para un crecimiento óptimo.

Esto suele estar correlacionado, con el mecanismo de control osmótico de Artemia, que puede utilizar aminoácidos libres, como osmolitos orgánicos para contrarrestar la presión osmótica del medio.

Con el aumento de salinidad, el requerimiento de nutrientes energéticos (almidón) disminuye, y el requerimiento de albúmina aumenta, (Hernández, 1974). Sin embargo, la razón almidón-albúmina es característica de cada variedad o raza de Artemia.

En estudios de la Artemia del Gran Lago de Utah, se observó su crecimiento a diferentes salinidades, mostrando que a salinidades abajo de 3 ppm la fecundidad baja, aunque el alimento sea abundante. La Artemia de Comacchio es más sensitiva, ya que se inhibe su desarrollo a bajas salinidades. La reducida fecundidad a bajas salinidades, puede ser contrarrestada agregando el cultivo pequeñas cantidades de glucosa, extracto de hígado, extracto de levadura y vitaminas (D'Agostino et al., 1968).

Artemia es un eurioxibionte típico, ya que se ha reportado que sobrevive en medios ambientes, con menos de 1 ppm de oxígeno disuelto, y en otro extremo, en situaciones donde el exceso de fitoplancton incrementa el nivel de oxígeno, más allá del 150% de saturación.

La concentración óptima de oxígeno, no obstante que es desconocida, deberá lógicamente, estar cercana al nivel de saturación.

Sorgeloos (1975), menciona experimentos hechos con hembras de Artemia, en diferentes concentraciones de oxígeno, dando los siguientes resultados: todas las hembras que se pusieron en medios, cuya concentración de oxígeno disuelto era de 4, 6, y 8 ppm produjeron nauplios. Las hembras que se pusieron a 2 ppm, la primera reproducción, fué ovovivípara, mientras que las tres subsecuentes reproducciones, fueron de quistes, observándose una coloración rojiza, causada por el acumulamiento de una alta concentración de hemoglobina en la sangre. La concentración crítica de oxígeno disuelto para Artemia, esta entre 2 y 4 ppm y la hemoglobina se sintetiza cuando se alcanza una concentración de 4 ppm, (Sorgeloos 1975).

Cuando hay suficiente oxígeno en el medio ambiente, Artemia tiene la capacidad de regular su consumo de oxígeno, no así cuando hay poco oxígeno, por lo cual se dice que es un organismo oxiregulador. Cuando existen condiciones de "stress", causadas por la escasez de oxígeno, el organismo, puede sintetizar tipos diferentes de hemoglobina, para compensar dicha escasez en el medio.

V. L I T E R A T U R A C I T A D A

V. LITERATURA CITADA.

- Abreu-Grobois, R.A. and J.A. Beardmore, 1980. International study of Artemia II. Genetic characterization of Artemia populations an electrophoretic approach. p 133-146 In: The Brine Shrimp Artemia Vol.I Morphology, Genetics, Radiobiology, Toxicology. Persoone G., P. Sorgeloos, O. Roels y E. Jaspers (Eds.) Universa Press, Wetteren, Belgium. 634 p.
- Adams, J.A. and J.H. Steele, 1966. Shipboard experiments on the feeding of Calanus finmarchicus (Gunnerus) p. 19-13. In: Some contemporary studies in marine science. Barnes H. (Ed.) Allen and Unwin, London, 716.p.
- Amat, F., 1985a. Biología de Artemia Inf. Tecn, Inst. Inv. Pesq. 126-127: 1-60
- Amat, F., 1985b. Utilización de Artemia en acuicultura. Inf. Tecn. Inst. Inv. Pesq. 128-129.
- Anderson, J.W., and G.C. Stephens, 1969. Uptake of material by aquatic invertebrates. VI. Role of epiflora in apparent uptake of glycine by marine crustaceans. Mar. Biol., 4: 243-249.

Anderson, J.W., and J.M. Neff, B.A. Cox, H.E. Tatem and G.M. Hightower, . 1974. The effects of oil on estuarine animals : Toxicity, Uptake and depuration, respiration P. 285-310. In : Pollution and Physiology of Marine Organisms. Vennberg, F.J. and W.B. Vennberg (Eds.). Academic Press. New York.

Anderson, Dit. 1967. Larval Development and Pigment formation in the branchiopod crustaceans Limnadia stanleyana king (conchostraca) and Artemia salina (L.) (Anostraca). Austr. J. Zool., 15:47-91.

Atkins, R.R.G. and P. G. Jenking, 1953. Seasonal changes in the phytoplankton during the year 1951-2 as indicated by Spectrophotometric chlorophyll estimation. J. Mar. Biol. Ass. UK, 31: 495-508.

Ayala F.J., and J.R. Powell, 1972. Allozymes as diagnostic characters of sibling species of Drosophila. Proc Nat. Acad. Sci. (USA) 69: 1094-1096

Bagshaw, J.C. 1980. Biochemistry of Artemia development. Report on a symposium held in Toronto (Canada) in July 1979. p 3-9 In The brine Shrimp Artemia. Vol. 2 Physiology, Biochemistry, Molecular Biology. Persoone G., P. Sorgeloos, O. Roels y E. Jaspers (Eds.) Universa Press. Wetteren, Belgium.

Bainbridge, R. 1957. The size, shape and density of marine phytoplankton concentrations. Biol. Rev., 32:91-115.

Barigozzi, C. 1939. La biologia di Artemia salina studiata in aquario. Atti, Soc. Ital. Sci. Nat., 78: 137-160

Barigozzi, C. 1980. Genus Artemia : problems of systematics, p. 147-153 In : The Brine Shrimp Artemia. Vol. I Morphology, Genetics, Radiobiology, Toxicology, Persoone G. P. Sorgeloos, O. Roels, E. Jaspers (Eds) Universa Press. Wetteren, Belgium. 3-15 p.

Barker - Jorgensen, C. 1966. Feeding In : Marine Biology. pag 69-133. 3rd Int. Interdisciplinary conference on marine Biology. Edmonson W.T. (Ed.) New York Academy of Sciences. Interdisciplinary Communications Program. New York.

- Barnes, D. R., 1977. Zoología de los Invertebrados. Tercera edición. Editorial Interamericana, S.A. 826 p.
- Baros, J., and J. Liston. 1968. Isolation of Vibrio parahemolyticus from the Northwest Pacific. Nature, 217: 1263-1264.
- Bayly, A.E. 1972. Salinity tolerance and osmotic behavior of animals in athalassic saline and marine hyper saline waters. Ann. Rev. Ecol. Syst., 3:233-268
- Beck, A.D., A. Bengston, and W.H. Howell, 1980. International study on Artemia V. Nutritional value of five geographical strains of Artemia : Effects on survival and growth of larval Atlantic silverside Menidia menidia. p 249-259 In : The Brine Shrimp Artemia Vol. 3 Ecology, Culturing, Use in Aquaculture. Persoone G., P. Sorgeloos, O. Roels y E. Jaspers (Eds.) Universal Press. Wetteren, Belgium. 426 p.

Beck, A.D. and D.A. Bengston, 1981. International Study on Artemia XXII. Nutrition in Aquatic toxicology : Diet quality of geographical strains of the brine shrimp Artemia sp. in: Aquatic toxicology and Hazard evaluation. Fisch Conference Pearson, J.G., R.B. Foster and W.E. Bishop (Eds). American Society for Testing and material. Philadelphia. 139 p.

Benijts F, E. VanVoorden, and P. Sorgeloos, 1975. Changes in the biochemic composition of the early larval stages of the brine shrimp Artemia salina (L.). European Symp. Mar. Biol., 10th Proc. Ostend, Belgium. Sept. 17-23, 1975. 1: 1-9

Benijts, F., G. Vandeputte and P. Sorgeloos. 1977. Energetic aspects of the metabolism of hydrated Artemia cysts, In: Fundamental and Applied Research on the brine shrimp Artemia salina (L.) in Belgium. Jaspers E.G. Persoone, (Eds.). European Mariculture Society Spec. Publ. NO. 2. Bredene, Belgium.

- Bossuyt, E. and P. Sorgeloos, 1980. Technological aspects of the batch culturing of Artemia in high densities. p. 133-152 In : The Brine Shrimp Artemia. Vol. 3. Ecology, Culturing, Use in Aquaculture. Persoone G., P. Sorgeloos, O. Roels y E. Jaspers (Eds.) Universa Press. Wetteren, Belgium. 426 p.
- Bowen, S.T. 1965. The genetics of Artemia salina II. Crossing over between X and Y chromosomes. *Genetics*. 52:695-710.
- Bowen, S.T., H.G. Lebererz, M.C. Poon, V.H.S. Chow and T.S. Grigliatti, 1969. The hemoglobins of Artemia salina. I. Determination of phenotype by genotype and environment. *Comp. Biochem. Physiol*, 31: 733-747.
- Bowen, S.T., J.P. Durkin, G. Sterling, L. S. Clark, 1978. Artemia hemoglobins: genetic variation in parthenogenetic and zigogenetic populations. *Biol. Bull.*, 155:273-287.
- Bowen S.T., and G. Sterling, 1978. Esterase and malate dehydrogenase isozyme polymorphisms in 15 Artemia. populations. *Comp. Biochem. Physiol*. 61B:593-595.

Bowen, S.T., M.L. Davis, S.R. Fensterm, G.A. Lindwall,
1980. Sibling species of Artemia p 155-167 In : The
Brine Shrimp Artemia Vol. I. Morphology, Genetics,
Radiobiology, Toxicology. Persoone G., P. Sorgeloos,
O) Roels, E. Jaspers (Eds.) Universa Press. Wetteren,
Belgium. 315 p.

Bowman, T.E. and C.G. Abele, 1982. Classification of the
recent crustacea. in : The Biology of Crustacea, Vol.
I. Academic Press. Inc. New York.

Braun, J.G., 1980. The feeding of Artemia on Phaeodactylum
tricornutum. p 197-208 In : The Brine Shrimp Artemia.
Vol. 2. Physiology, Biochemistry, Molecular Biology.
Persoone G., P. Sorgeloos, O. Roels, E. Jaspers (Eds.)
Universa Press. Wetteren, Belgium. 634 p.

Brisset, P., D. Versichele, E. Bossuyt, L. De Ruyck and P.
Sorgeloos, 1982. High density flow through culturing
of brine shrimp Artemia on inert feed-preliminary
results with new culture system. Aquacultural Eng.,
1:115.

Brune, D.E. 1982. Design and development of a flowing bed reactor for brine shrimp culture. *Aquacultural Engineering* 1:63-70

Bruggeman, E., M. Baeza-Mesa, E. Bossuyt, and P. Sorgeloos, 1974. Improvements in the decapsulation of Artemia cysts. Ems Special Publ. No. 4, en Cultivation of fish fry and its live food. Beckiel, Jaspers, Persoone (Eds.)

Bruggeman, E., P. Sorgeloos, and P. Vanhaecke, 1980. Improvements in the decapsulation technique of Artemia cysts. p 261-269 In : The Brine Shrimp Artemia. Vol. 3 Ecology, Culturing, Use in aquaculture. Persoone G., P. Sorgeloos, D. Roels, E. Jaspers (Eds.) Universa Press, Wetteren, Belgium 426 p.

Brune, W., and J. Crowe, 1983 Intracellular pH regulates transitions between dormancy and development of brine shrimp (Artemia salina) embryos. *Science*, 221:366-368.

- Butler, P.A. 1966. The problem of pesticides in estuaries.
In : A Symposium on estuarine fisheries, p. 110-115.
Am. Fish. Soc. spec. Publ. 3.
- Carlberg, J.M., and J.C. VanOlst, 1976. Brine Shrimp
(Artemia salina) consumption by the larval stages of
the american lobster (Homarus americanus) in relation
to food density, and water temperature. Proc. World
Mar Soc., 7: 379-389.
- Castro, T., 1980. Curso de Actualización y Capacitación
sobre Artemia salina. Universidad Autónoma
Metropolitana Unidad Xochimilco. Dirección de
Acuacultura. Departamento de Pesca.
- Castro, T., y C. Gallardo, 1983. Artemia sp. y su
utilización en la acuicultura. V Congreso Nacional de
Ingeniería Bioquímica. México, D.F.
- Chow, V. 1968. Physiology of Artemia: Effect of Nutrition
and oxygen tension on survival and Hemoglobin
production. Thesis, San Francisco State College.
- Clark, L.S., and S.T. Bowen, 1976. The genetics of Artemia
salina. VII. Reproductive isolation. J.H. Hered
67:385-388.

- Claus, C. 1976. Onderzoek naar de toxiciteit van drie herbiciden op het aquatisch ecosysteem. Thesis. State University of Ghent. 197 p.
- Claus, C., F. Benijts, G. Vandeputte, 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
- Clegg, J.S. 1962. Free glycerol in dormant cysts of the brine shrimp Artemia salina and its disappearance during development. Biol. Bull., 123: 295-301.
- Clegg, J.S. 1964. The control of emergence and metabolism by external osmotic pressure and the role of the free glycerol in developing cysts of Artemia salina. J. Exp. Biol., 41: 879-892.
- Clegg, J.S. 1965. The origin of trehalose and its significance during the formation of encysted dormant embryos of Artemia salina. Comp. Biochem. Physiol., 14: 135-143.

- Clegg, J.S. 1974. Interrelationships between water and metabolism in Artemia cysts. I. Hydration-dehydration from the liquid and vapor phase. J. Exp. Biol., 61: 291-308.
- Clegg, J.S., and F.P. Conte, 1980. A review of the cellular and developmental biology of Artemia. The Brine Shrimp Artemia. vol. 2. Physiology, Biochemistry, Molecular, Biology. Persoone G., P. Sorgeloos, O. Roels and E. Jaspers (Eds.) Universa Press Wetteren, Belgium, 634 p.
- Coleman, D.E., L.K. Nakagawa, R.M. Nakamura and E. Chang, 1980. The effect of antibiotics on the hatching of Artemia cysts. p-153-158. In : The Brine Shrimp Artemia. vol. 3 Ecology, culturing, use in Aquaculture. Persoone G., P. Sorgeloos, O. Roels y E. Jaspers (Eds.) Universa Press Wetteren, Belgium. 426 p.
- Conte, F.P. 1977. Molecular mechanisms in the branchiopod larval salt gland (crustacea) p. 143-159. In : Water relations in membrane transport in plants and animals. Academic Press. New York.

- Conte, F.P. S.R. Hootman and P.J. Harris, 1972a. Neck organ of Artemia salina nauplii. J. Comp. Physiol., 80: 239-246.
- Conte, F.P. P.C. Droukas and R.D. Ewing, 1977. Development of sodium regulation and de novo synthesis of Na K⁺ activated ATPase in larval brine shrimp. J. Exp. Zool., 202: 339-362.
- Conte, F.P., J. Lowry, J. Carpenter, A. Edwards, R. Smith and R.D. Ewing, 1980. Aerobic and anaerobic metabolism of Artemia nauplii as a function of salinity in The Brine Shrimp Artemia, vol. 2.
- Cook, D.W. and S.R. Lofton, 1973. Chitinoclastic bacterid associated with shell disease in Penaeus shrimp and blue crab (Callinectes sapidus). J. Wildl. Dis., 9: 154-159.
- Coppage, D.L. and E. Matthews, 1974. Short term effects of organophosphate pesticides on Cholinesterases of estuarine fishes and pink shrimp. Bull. Environ. Contam. Toxicolo, 11: 483-488

- Cox, J.L. 1974. The use of the dilution water effect as a water quality criterion. Bull. Environmental contamination and toxicology. 11(3): 256-257.
- Croghan, P.C., 1957. The survival of Artemia salina (L) in various media. J. Exp. Biol. 35: 213-218.
- Croghan, P.C. 1958b. The osmotic and ionic regulation of Artemia salina. J. Exp. Biol., 35: 219-233.
- Croghan, P.C., 1958c. The mechanism of osmotic regulation in Artemia salina. The physiology of the branchiae. J. exp. Biol., 35: 234-242.
- Croghan, P.C. 1958d. The mechanism of osmotic regulation in Artemia salina. The physiology of the gut. J. exp. Biol., 35: 243-249.
- Couch, J.A., 1978. Diseases, parasites, and toxic responses of commercial penaeid shrimps of the Gulf of Mexico and South Atlantic coasts of North America. Fishery Bulletin, 76(1): 1-44.

- Couch, J.A., M.D. Summers and L. Courtney, 1975. Environmental significance of Baculovirus infections in estuarine and marine shrimp. Ann. N.Y. Acad. Sci., 266: 529-536.
- Curtis, R.F., D.T. Coxon and G. Levett, 1974. Toxicity of fatty acids in assays for mycotoxins using the brine shrimp (Artemia salina). Food Cosm. Toxicol., 12(2): 233-235.
- Cushing, D.H. 1959a. On the nature of production in the sea. Fish. Invest. Lond. Ser. 2, 22:1-40.
- D'Agostino, A.S., and L. Provasoli, 1968. Effects of salinity and nutrients on mono and diaxenic cultures of two strains of Artemia salina. Biol. Bull., 134:1-4
- D'Agostino, A.S., 1980. The vital requirements of Artemia physiology and nutrition. The Brine Shrimp Artemia, vol.2. Physiology, Biochemistry, Molecular Biology. Persoone G., P. Sorgeloos, O. Roels and E. Jaspers (Eds.) Universa Press, Wetteren, Belgium. 634 p.

- Dall, M. 1967. Hypo osmoregulation in crustacea. *Comp. Biochem. Physiol.*, 21: 653-678.
- Decler, W., J. Vos, F. Bernaerts and C. Van den Branden, 1980. The respiratory physiology of Artemia. p 137-145
In : The Brine Shrimp Artemia. Vol. 2. Physiology, Biochemistry Molecular Biology. Persoone G., R. Roels and E. Jaspers (Eds.) Universa Press, Wetteren, Belgium., 634 p.
- Delcambe, L. 1955. Activités biologiques des actinomycines de streptomycetes 5-67. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 101: 358-366.
- De los Santos, C. Jr., P. Sorgeloos, E. Lavilla and A. Bernardino, 1980. Successful inoculation of Artemia and production of cysts in man-made salterns in the Philippines. In : The Brine Shrimp Artemia. Vol. 3 Ecology, Culturing, Use in Aquaculture. Persoone G., P. Sorgeloos, D. Roels and E. Jaspers. Universa Press, Wetteren, Belgium. 426 p.

- Dobbeleir, J., N. Adam, E. Bossuyt, E. Bruggeman and P. Sorgeloos, 1980. New aspects of the use of inert diets for high density culturing brine shrimp. p 165-174 In: The Brine Shrimp Artemia Vol. 3 Ecology, Culturing, use in aquaculture. Persoone G., P. Sorgeloos O. Roels, E. Jaspers (Eds). Universa Press, Wetteren, Belgium. 426 p.
- Doudoroff, P., E.G. Anderson, G.E. Burdeck, P.S. Galstoff, W.B. Hart, R. Patrick, E.R. Strong, E.W. Surber and W.M. Van Horn, 1951. Bio-assay methods for the evaluation of acute toxicity of industrial wastes to fish. Sewage Industrial Wastes. 23: 1380-1397.
- Dutrieu, J. 1960. Observations biochimiques et physiologiques sur le développement d'Artemia salina Leach. Arch. Zool. exp. gen., 99: 1-134.
- Dwivedi, S.N., S.K.R. Ansari, and M.Q. Ahmed, 1980. Mass culture of brine shrimp under controlled conditions in cement pools at Bombay, India. p 175-183 In : The Brine Shrimp Artemia. Vol. 3. Ecology, culturing, Use in aquaculture. Persoone G., P. Sorgeloos, O. Roels, E. Jaspers (Eds). Universa Press, Wetteren, Belgium. 426 p.

- Engel, D.W., and J.W. Angelovic, 1968. The influence of salinity and temperature upon the respiration of brine shrimp nauplii. *Comp. Biochem. Physiol.*, 26: 749-752
- Eliassen, E. 1952. The energy-metabolism of Artemia salina in relation to body size seasonal rhythms and different salinities. *Univ. Bergen, Arb. naturv. R.* 11: 1-17.
- Fores, C.A., and H.G. Coffin, 1960. The use of the brine shrimp Artemia salina as food for the laboratory culture of decapods. *Publ. Walla Walla College Dept. Biol. Sci. Biol. Sta.* , No. 26 April 26, 1960.
- Geddes, M.C. 1980. The brine shrimp Artemia and Parartemia in Australia. p. 57-65. In : *The Brine Shrimp Artemia*, vol. 3. Ecology, culturing, use in aquaculture. Persoone G., P. Sorgeloos, O. Roels and E. Jaspers (Eds.) Universa Press. Wetteren, Belgium. 426 p.
- Gilchrist, B.M., 1954. Hemoglobin in Artemia. *Proc. Roy. Soc. Lond. B* 143:136-146.
- Gilchrist, B.M. 1956. The Oxygen consumption of Artemia salina (L.) in different salinities. *Hydrobiologia*, 8:54-65.

- Gilchrist, B.M. 1958. The oxygen consumption of Artemia salina (L.) Hydrobiologia, 12:25-37
- Gilchrist, B.M., 1960. Growth and form of the brine shrimp Artemia salina (L.) Proc. Zool. Soc. of London. 134(2) :221-235.
- Gould, D.T. 1951. The grazing rates of Planktonic copepods. J. Mar. Biol. Ass. UK, 29: 695-706
- Granade, H.R., P.C. Cheng and N.J. Doorenbos, 1976. Ciguatera. I. Brine shrimp Artemia salina larval assay for ciguatera toxins. J. Pharm. Sci., 65(9): 1414-1415.
- Grigliatti, T.A. 1969. Differential induction of hemoglobin synthesis in Artemia salina. Thesis, San Francisco State College.
- Grosch, D.S., 1980. Alterations to the reproductive performance of Artemia caused by antifouling paints, algaecides, and an aquatic herbicide. p 201-211 In : The Brine Shrimp Artemia Vol. 1. Morphology, Genetics, Radiobiology, Toxicology. Persoone G., P. Sorgeloos, O. Roels, E. Jaspers (Eds.) Universa Press, Wetteren, Belgium. 315 p.

- Gunther, D.C. A. Catena, 1980. The interaction of Vibrio with Artemia nauplii. p 213-221 In : The Brine Shrimp Artemia, Vol. 1. Morphology, Genetics, Radiobiology, Toxicology. Persoone G, P. Sorgeloos, O. Roels, E. Jaspers (Eds.) Universa Press, Wetteren, Belgium. 315 p.
- Halfer-Cervini, A.M., M. Piccinelli, T. Prodoscimi, and L. Baratelli Zambruni, 1968. Sibling species in Artemia (Crustacea, Branchipoda). Evolution. 22:37-38
- Hanaoka, H. 1973. Cultivation of three species of pelagic micro-crustacean plankton. Bull. Plankton. Soc. Japan. 20: 19-29.
- Harvey, H.W., L.H.N. Cooper, M.V. Lebour and F.S. Russel, 1935. Plankton production and its control. J. Mar. Biol. Ass. UK, 20: 407-442.
- Harvey, H.W. 1937. Notes on selective feeding by Calanus. J. Mar. Biol. Ass. UK., 22: 97-100.
- Heath, H., 1924. The external development of certain phyllopods. J. Morph., 38(4): 453-483.

Heip, J.L. Moens, and M. Kondo, 1978a. ²⁶² Effect of concentrations of salt and oxygen on the synthesis of extracellular hemoglobins during development of Artemia salina. Develop-Biol., 63: 247-251.

Heip, J.L. Moens, M. Joniav and M. Kondo, 1978b. Ontogenical studies on extracellular hemoglobins of Artemia salina. Develop. Biol., 64: 73-81.

Heip, J.L. R. Moens, R. Hertsens, E.J. Wood, H. Heyligen, A. Van. Broekhoven, R. Vrints, D. de Chaffoy and M. Kondo, 1980. Artemia extracellular hemoglobins: ontogeny, structure and "in vivo" radiolabeling. p. 427-448. In : The Brine shrimp Artemia. Vol. Physiology, Biochemistry, Molecular Biology. Persoone G., P. Sorgeloos, O. Roels and E. Jaspers (Eds.) Universa Press. Wetteren, Belgium. 426 p.

Hentschel, C.C. and J.R. Tata, 1976. The molecular embryology of the brine shrimp. Trends in Biochemical Sciences, 1(5): 97-100.

Hernandorena, A. 1974. Effects of salinity on nutritional requirements of Artemia salina. Biol. Bull., 146: 238-248.

- Hernandorena, A., 1975. Metabolic significance in nucleic acid metabolism and protein synthesis of dietary AMP requirement in Artemia salina (L.) Biol. Bull. 148: 416-428.
- Hernandorena, A., 1976. Effects of temperature on the nutritional requirements of Artemia salina (L.) Biol. Bull. 151: 314-321.
- Hernandorena, A., 1980. Programmation of postembryonic development in Artemia by dietary supplies of purine and pyrimidine. p 209-218 In : The Brine Shrimp Artemia, Vol. 2. Physiology, Biochemistry, Molecular Biology. Persoone G., P. Sorgeloos, O. Roels, E. Jaspers (Eds.) Universa Press, Wetteren, Belgium. 664 p.
- Hessinger, D.A., and J.A. Hessinger, 1981. Methods for rearing sea anemones in the laboratory. In : Marine Invertebrates. National Academy of Sciences. Washington D.C. 153p.
- Hinchcliffe, P.R., J. P. Riley, 1972. The effect of diet on the component fatty-acid composition of Artemia salina. J. Mar. Biol. Ass. U.K. 52: 203-211.

- Hinton, H.E., 1954. Resistance of the dry eggs of Artemia salina (L). To high temperatures. The animals and magazine of Natural History. 7: 158-160
- Horne, F.R., 1966. The effect of digestive enzymes on the hatchability of Artemia salina eggs. Trans. Amer. Microsc. Soc. 85(2): 271-274.
- Hudson, R.A. and J.C. Bagshaw, 1978. Toxicity of di-N-butylphthalate for developing larvae of the brine shrimp Artemia salina. Fed. Proc., 37:1702.
- Huggins, A.K., 1969. The metabolism of ¹⁴C sodium acetate by the brine shrimp Artemia and the effect of alterations in salinity Comp. Biochem. Physiol., 29-439-445.
- Isenmann, P. 1975. Observations sur la mouette pygmée (Larus minutus) en camargue de 1971 à 1974. Terre et vie 29(1): 77-88.
- Ivleva, I.V. Brachiopoda, 1969. p 62-95 In: Mass culture of Invertebrates. Biology and methods. Acad. Sci. of the USSR. All Union Hydrobiological Society. Izdatel'stvo "Nauka" Moskva. Translated in English by : "Israel Program for Scientific Translations", Jerusalem (Israel). 1973. 148 pp.

- Iwasaki, T. 1970. Incorporation of 3H-thymidine during oogenesis in Artemia salina. Annotnes. Zool. Jap., 43(3): 132-141.
- Jahning, C.E. 1977. Artemia culture at commercial pilot scale. Proc. World Maric Soc. 8: 169-172.
- Jennings, R.H. and D.M. Whitaker, 1941. The effect of salinity upon the rate of excystment of Artemia. Biol. Bull., 80: 194-201.
- Jensen, K. 1975. Hatching rate as bioassay. Proposal for a standar technique. Bull. Environ. Contam. toxicol., 14(5): 562-564.
- Johns, D.M., M.E. Peters, D. Beck, 1980. International study on Artemia VI. Nutritional value of geographical and temporal strains of Artemia: effects on survival and growth of two species of brachyuran larvae. p 291-304 In : The Brine Shrimp Artemia, Vol. 3. Ecology, Culturing, Use in Aquaculture. Persoone G., P. Sorgeloos, O. Roels, E. Jaspers (Eds.) Universa Press, Wetteren, Belgium. 426 p.

Johns, D.M., W. Berry, and W. Walton, 1981. International study on Artemia XVI. Survival, growth and reproductive potential of the mysid, Mysidopsis bahia Molenock fed various geographic strains of the brine shrimp, Artemia. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 53:209-219.

Johns, D.M., W.J. Berry, S. McLean, 1981. International study on Artemia XXI. Investigations into why some strains of Artemia are better food sources than others. Further nutritional work with larvae of the mud crab, Rhithropanopeus harrisi. J. World Maric Soc. 12(1): 303-314

Johnson, S.K. 1974. Ectocommensals and parasites of shrimp from Texas rearing ponds. Texas ARM Univ., Sea Grant Publ. TAMU-SG-74-207, 19p.

Johnson, D.A. 1980. Evaluation of various diets for optimal growth and survival of selected life-stages of Artemia. p 185-192 In : The Brine Shrimp Artemia. Vol. 3. Ecology, Culturing, Use in Aquaculture. Persoone G., P. Sorgeloos, O. Roels, E. Jaspers (Eds.) Universa Press, Wetteren, Belgium. 426 p.

- Jones, A.J. 1972. An inexpensive apparatus for the large scale hatching of Artemia salina. (L.). J. cons. perm. int. Explor. Mer 34(3): 351-356
- Jones, D. A., T.H. Moller, R.J. Campbell, J.G. Munford, and P.A. Gabbot, 1975. Studies on the design and acceptability of micro-encapsulated diets for marine particle feeders. I. Crustacea. European Symp. Mar. Biol. Proc. 10th. Ostend, Belgium, 1:229-239.
- Kinne, O. 1971. Marine Ecology. Vol. I, Environmental Factors. Part 2. O. Kinne Ed. John Wiley and sons New York, 561 p.
- Klein-MacPhee G., W.H. Howell, and A.D. Beck, 1980. International study on Artemia VII. Nutritional value of 5 geographical strains of Artemia to winter flounder Pseudopleuronectes americanus larvae. p 305-312 In : The Brine Shrimp Artemia, Vol. 3. Ecology, Culturing, Use in Aquaculture. Persoone G., P. Sorgeloos, O. Roels, E. Jaspers (Eds.) Universa Press, Wetteren, Belgium. 426 p.

Kratowich, N.R. 1964. The effect of metabolic inhibitors on osmoregulation by nauplii of Artemia salina at various salinities. Am. Zool., 4: 389-390.

Kuener, D.J., 1939. Systematical and physiological notes on the brine shrimp Artemia. Arch. Neerl. Zool. 3: 365-449.

Landau, M., G. Miyamoto, and C. Bolis, 1985. Growth and amino-acid composition of Artemia salina (L.1758) fed algae grown in different media. (Anostraca). Crustaceana 49(3): 318-321.

Lavens, P., and P. Sorgeloos, 1984. Controlled production of Artemia cysts under standard conditions in a recirculating culture system. Aquacultural Engineering 3: 221-235.

Lavens, P. and S. Sorgeloos, 1984. Controlled production of Artemia cysts under standar conditions in a recirculating culture system Aquacultural Engineering, 3: 221-235.

- Lavens, P., P. Baert, A. De Meulemeester, E. Van Ballaer and P. Sorgeloos, 1985. New developments in the high density Flow-Through. Culturing of brine Shrimp Artemia. J. World Maricult. Soc. 16: 498-508.
- Léger, P., P. Vanhaecke, P. Sorgeloos, 1983. International study on Artemia XXIV. Cold storage of live Artemia nauplii from various geographical sources : potentials and limits in aquaculture. Aquacultural Engineering 2: 69-78.
- Litchfield, J.T. Jr. and F. Wilcoxon, 1949. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. J. Pharmac. exp. Ther. 96: 99-113.
- Lochhead, J.H. 1941. Artemia the brine shrimp. Turtox News, 19(2): 41-45.
- Lochhead, J.H. and M.S. Lochhead, 1940. The eggshells of the brine shrimp Artemia. Ann. Rec., 78 (4 suppl.): 75-76.
- Lochhead, J.H. and M.S. Lochhead, 1941. Studies on the blood and related tissues in Artemia (Crustacea, Anostraca). J. Morph. 68: 593-632.

- Löffler, H. 1964. Vogelzug and crustaceenverbreitung. Zool. Anz. suppl., 27: 311-316.
- MacDonald, G.H. 1980. The use of Artemia cysts as food by the flamingo (Phaemicopterus ruber roseus) and the shelduck (Tadorna tadorna) p. 97-104 In: The Brine Shrimp Artemia. Vol. 3 Ecology, culturing, use in aquaculture. Persoone G., P. Sorgeloos, O. Roels, and E. Jaspers (Eds.) Universa Press. Wetteren Belgium. 634 p.
- Marco, R., R. Garesse and C.G. Vallejo, 1980, Mitochondrial unmasking and yolk platelets metabolization during early development in Artemia. In: The Brine Shrimp Artemia. Vol. 2. Physiology, Biochemistry, molecular Biology. Persoone G., P. Sorgeloos, O. Roels and E. Jaspers (Eds.). Universa Press. Wetteren, Belgium. 634 p.
- Marco, R., C.G. Vallejo, R. Garesse and R. Perona, 1980. A hypothesis on the activation process of proteolytic activities during Artemia early development. In: The Brine Shrimp Artemia vol. 2. Physiology, Biochemistry, molecular Biology. Persoone G., P. Sorgeloos, O. Roels and E. Jaspers (Eds.). Universa Press. Wetteren, Belgium. 634 p.

- Marshall, S.M. and Orr, 1956. On the biology of Calanus finmarchicus. IX. Feeding and Digestion in the young stages. J. Mar. Biol. Ass. UK 35: 587-603.
- Marshall, S.M. and Orr, 1962. Food and feeding in Copepods. Rapp. P.-V. Reun. Cons. Perm. Int. Explor. Mer, 153: 92-98.
- Mathias, P. 1932. Sur le développement de L'oeuf d'un crustacé phyllopode (Artemia salina L.). Compt. Rend hebdom. des séances de l'Acad. Sciences. Paris T.194: 1195-1197.
- Modermott, M.J., 1974. Trehalose and glycogen accumulation in cryptobiotic states of three invertebrates. M.S. Thesis. Biology. St. Johns University, New York. 62 p.
- Metalli, P. and E. Ballardini, 1972. Radiobiology of Artemia: radiation effects and ploidy. Current Topic in Radiation Research Quarterly, 7(2) 181-240.

- Mock, C.R. L.R. Ross and B.R. Salser, 1977. Design and preliminary evaluation of a closed system for shrimp culture In : Proc 8th. Annual Meeting World Maricult. Soc. Avault, J.W. (Ed.) Louisiana State Univ., Baton Rouge. 335 p.
- Murai, J., J.W. Andrews, 1978. Comparison of feeds for larval stages of the giant prawn (Machrobrachium rosenbergii). World Mac. 9: 189-193.
- Nimura, Y. 1968. Note on hatching the cyst of Artemia. Aquaculture. 16(2): 105-115.
- Olney, C.E., P.S. Schaver, S. McLean, You Lu, and K.L. Simpson, 1980. International Study on Artemia. VIII. Comparison of chlorinated hydrocarbons and heavy metals in five different strains of newly hatched Artemia and laboratory reared marine fishes, p. 343-352 In : The Brine Shrimp Artemia. Vol. 3 Ecology, Culturing, Use in Aquaculture. Persoone G., P. Sorgeloos, D. Roels, E. Jaspers (Eds.) Universa Press, Wetteren, Belgium. 426 p.
- Palmegiano, G.B., P. Trotta, 1983. Artemia salina as pabulum for growing penaeids under laboratory conditions. Aquacultural Engineering, 2: 173-179.

Pavillon, J.F., N. Thuong Dao, and V. Tantue, 1980. One aspect of the nutrition of Artemia: The utilization of dissolved amino-acids. p 219-229. In : The Brine Shrimp Artemia. Vol. 2. Physiology, Biochemistry, Molecular Biology. Persoone G., P. Sorgeloos, O. Roels, E. Jaspers (Eds.) Universa Press, Wetteren, Belgium. 634 p.

Person Le-Ruyet., 1976. Elevage larvaire d'Artemia salina (Branchiopode) sur nourriture inerte : Spirulina maxima (Cyanophycée). Aquaculture. 8:157-167.

Persoone, G., P. Sorgeloos, 1972. An improved separator box for Artemia nauplii and other phototactic invertebrates. Helgolander wiss. Meer., 23: 243-247.

Persoone, G., P. Sorgeloos, 1980. General aspects of the ecology and biogeography of Artemia p 3-22 In : The Brine Shrimp Artemia. Vol. 3. Ecology, Culturing, Use in aquaculture. Persoone G., P. Sorgeloos, O. Roels, E. Jaspers (Eds.) Universa Press, Wetteren, Belgium. 456 p.

Persoone, G., P. Sorgeloos, O.A. Roels, E. Jaspers, 1980.
Editorial note on the taxonomy of Artemia. In : The
Brine Shrimp Artemia, Vols 1. Morphology, Genetics,
Radiobiology, Toxicology. Persoone G,P. Sorgeloos, O.
R, and E. Jaspers (Eds.) Universa Press, Wetteren,
Belgium. 315 p.

Persoone, G., 1980. Standardization of aquatic bio-assays:
Compromises between biological and economical
criteria. Proc. 6th. Ann. Aquatic Toxicity Workshop,
Winnipeg Manitoba, Canada.

Piccinelli, M., T. Prodosimi, 1968. Descrizioni tassonomica
delle due specie Artemia salina L. e Artemia
persimilis. sp. Rend Ist. Lomb. Sci. Lett. B102:170-
179.

Planel, J., Y. Gaubin. R. Kaiser, and E. Pianezzi, 1980.
Effects of space environmental factors on Artemia
eggs. p 189-198 In : The Brine Shrimp Artemia. Vol. 1.
Morphology, Genetics, Radiobiology, Toxicity. Persoone
G., P. Sorgeloos, O. Roels, E. Jaspers (Eds.) Universa
Press, Wetteren, Belgium. 315 p.

- Post, F.J. and N.N. Yousset, 1977. Prokaryotic intracellular symbiont of the Great Salt Lake brine shrimp Artemia salina (L.) Can. J. Microbiol., 23(9): 1232-1236.
- Proctor, V.W., 1964 Viability of crustacean eggs recovered from ducks. Ecology. 45(3):656-658.
- Proctor, V. W., and C.R. Malone, 1965. Further evidence of the passive dispersal of small aquatic organisms via the intestinal tract of birds. Ecology 46: 728-729.
- Prosser, L.C. y Brown, A.F., 1968. Fisiologia Comparada. Segunda Edición . Editorial Interamericana, S.A., 728 p.
- Provasoli L., and A. D'Agostino, 1962. Vitamin requirements of Artemia salina in aseptic culture. Am. Zool 2:439.
- Provasoli L., and A. D'Agostino, 1969. Development of artificial media for Artemia salina. Biol. Bull., 136: 434-453.

Provasoli, L., I. J. Pintner, 1980. Bifasic particulate media : for the parthenogenetic Artemia of Sète. p. 231 -238, The Brine Shrimp Artemia vol. 2, Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. Persoone G., P. Sorgeloos, O. Roels, E. Jaspers (Eds.) Universa Press, Wetteren, Belgium.

Provasoli, L., D.E. Conklin and A. D'Agostino, 1970. Factors inducing fertility in aseptic crustacea. Helgolander Wiss. Meeresunters. 20: 443-454.

Provasoli, L. and K. Shiraishi, 1959. Axenic cultivation of the brine shrimp Artemia salina. Biol. Bull., 117(1): 347-356.

Provasoli, L. K. Shiraishi and J.R. Lance, 1959. Nutritional idiosyncrasies of Artemia and Tigriopus in monoxenic culture. Ann. N.Y. Acad. Sci., 77: 250-261.

Raymont, J.E.G. and F. Gros, 1942. On the feeding and breeding of Calanus finmarchicus under laboratory conditions. Proc. Roy. soc. Eding. B, 61: 267-287.

- Reeve, M.R. 1963a. The filter feeding of Artemia. I. In pure culture of plant cells. J. exp. biol. 40: 195-205.
- Reeve, M.R. 1963b. The filter feeding of Artemia II In suspension of various particles. J. exp. Biol., 40: 207-214.
- Reeve, M.R. 1963c. The filter feeding of Artemia III. Faecal pellets and their associated membranes. J. Exp. Biol., 40: 215-221.
- Reeve, M.R. and M.A. Walter, 1977. Observations on the existence of lower threshold and upper critical food concentrations for the copepod Acartia tonsa Dana. J. exp. mar. Biol. Ecol., 29: 211-221.
- Robichaux, D.M. 1980. Design and operation of a recirculating culture system for Artemia. p. 215-221 In: The Brine Shrimp Vol. 3 . Ecology, Culturing, Use in aquaculture. Persoone G., P. Sorgeloos, O. Roels, E. Jaspers (Eds.) Universa Press, Wetteren, Belgium. 426 p.
- Rogers, L.O. y R.S. Johnston, 1977. The culture of brine shrimp (Artemia salina), under semi-controlled conditions. Proc. World Maricul. Soc. Vol 8: 185-194.

- Rooth, J. 1965. The flamingos in Bonaire (Netherlands Antilles) Habitat, diet and reproduction of Phoenicopterus ruber ruber. Vitgave Natuurwetenschappelijke studiekring in Suriname en de Nederlandse Antillen, Utrecht, No. 41, 171 p.
- Rosemark, R. 1978. Growth of Homarus americanus on Artemia salina diets with and without supplementation. J. World Maricul. Soc. 9: 251-257.
- Rosen, B. 1970. Shell disease of aquatic crustaceans. In: S.F. Snieszko (editor), A symposium on diseases of fishes and shellfishes, p. 409-415. Am. Fish. soc. Spec. Publ., 5.
- Royan, J.P. 1980. Laboratory and field studies on an indian strain of the brine shrimp Artemia. In: The Brine Shrimp Artemia. Ecology, Culturing, Use in aquaculture, Persoone G., P. Sorgeloos, O. Roels, E. Jaspers (Eds.) Universa Press, Wetteren, Belgium. 426 p.
- Ryther, J.H. 1969. Photosynthesis and Fish Production in the Sea. Science 1966: 72-76.

Saliba, L.J. and R.N. Krzyz, 1976a. Effects of heavy metals
In hatching of brine shrimp. Mar. Poll. Bull., 7(10):
181-182.

Sato, N.L. 1955a. Excystment of the eggs of Artemia salina
in artificial sea water of various conditions. Gunma
J. Med. Sci., 15: 102-112

Sato, N.L., 1967. Enzymatic Contributions to the Excystment
of Artemia salina. Sci Rep. Tohoku Univ. Ser. IV
(BIOL). 33: 319 - 327.

Schauver, P.S., D. M. Johns, C.E. Olney, and K.L. Simpson.
1980. International Study on Artemia. IX. Lipid level
energy content and fatty acid composition of the cysts
and newly hatched nauplii from five geographical
strains of Artemia. p. 365-373. In : The Brine Shrimp
Artemia. 3: Vol. 3 Ecology Culturing and use in
Aquaculture. Persoone G., P. Sorgeloos, O. Roels, E.
Jaspers (Eds.) Universa Press, Wetteren, Belgium.
426 p.

- Seitz, P. K., C. F. Hazelwood, J.S. Clegg, 1980. Proton magnetic resonance studies on the physical state of water in Artemia cysts. p: 545-555. In: The Brine Shrimp Artemia Vol. 2. Physiology Biochemistry, Molecular Biology. Persoone G., P. Sorgeloos, O. Roels, E. Jaspers (Eds.), Universa Press, Wetteren, Belgium. 634 p.
- Sharfstein, B.A., W.J. Tobias and O.A. Roels, 1979. The technical feasibility of mass culturing of the brine shrimp Artemia sp. in the St. Croix artificial upwelling system II. Maximum stocking density and yields and growth efficiency in flow-through raceway culture, Proc. World Maricult. Soc. 8: 185-194.
- Sick, L.V. 1976. Nutritional effect of five species of marine algae on the growth, development and survival of the brine shrimp Artemia salina Mar. Bio. 35:69-78.
- Siedel, C.R., J. Kryznowek, K.L. Simpson, 1980. International study on Artemia. XI. Amino-acid composition and electrophoretic protein patterns of Artemia from five geographical locations . P. 375-382 In : The Brine Shrimp Artemia, Vol. 3: Ecology, Culturing, use in Aquaculture. Persoone G., P. Sorgeloos, O. Roels, E. Jaspers (Eds.) Universa Press, Wetteren, Belgium. 426 p.

- Siedel, C.R., D.M. Johns, P.S. Schaver, C.E. Olney, 1982. International study on Artemia XXVI. Food value of nauplii from reference Artemia cysts and four geographical collections of Artemia for mud crab larvae. Mar. Ecol. Prog. Ser.: 309-312.
- Siedel, C.R., K.L. Simpson, 1984. Rapid differentiation of Artemia sp. populations by thin layer isoelectric focusing. Aquacultural Engineering 3:303-316.
- Simpson, K.L., A.D. Beck, P. Sorgeloos, 1980. Workshop I. Characterization of Artemia strains for application in aquaculture. P. 409-411 In : The Brine Shrimp Artemia, Vol. 3. Ecology, Culturing, use in aquaculture. Persoone G., P. Sorgeloos, O. Roels, E. Jaspers (Eds.) Universa Press, Wetteren, Belgium. 426 p.
- Skoultchi, A.I. and H. J. Morowitz, 1964. Information storage and survival of biological systems at temperatures near absolute zero. Yale J. Biol. Med. 37: 158-163.

- Smith, T.I.J., J.S. Hopkins, P.A. Sandifer, 1978.
Development of a large scale Artemia hatching system
utilizing recirculated water. Proc. World Maricul.
Soc. 9:701-714.
- Sorgeloos, P. 1973a. First report on the triggering effect
of light on the hatching mechanism of Artemia salina
dry cysts. Mar. Biol. 22:75-76.
- Sorgeloos, P. 1973b. High density culturing of the brine
shrimp, Artemia salina L. Aquaculture 1: 385-391.
- Sorgeloos, P. 1974. The influence of algal food
preparation on its nutritional efficiency for Artemia
salina L. larvae. Thalassia Jugoslavica 10(1/2) : 313-
320.
- Sorgeloos, P. 1975. Research on the culturing of the brine
shrimp Artemia salina L. at the Univerity of Ghent
(Belgium). Proc. Vith Ann. Worksh. W.M.S. Seattle
(Washington).
- Sorgeloos, P. 1980. Availability of Reference Artemia
Cysts. Mar. Ecol. Progr. Ser. 3: 363-364.
- Sorgeloos, P. 1981. Availability of Preference Artemia
Cysts. Aquaculture 23: 381-382

- Sorgeloos, P. 1983. Brine shrimp Artemia in coastal saltworks is inexpensive food source. Aquaculture Magazine, nov-dec: 25-27.
- Sorgeloos, P. 1986. Excerpts of mission-report to Ecuador. Artemia Newsletter, 1:13.
- Sorgeloos P., M.Baeza-Mesa, F.Benijts, G. Persoone, 1976. Current research on the culturing of the brine shrimp Artemia salina. (L.) at the State University of Ghent (Belgium) p. 473-495 In : European Symposium on Marine Biology, 10th, Ostend, Belgium. Sept. 17-23. Vol. 1 on Marine Biology, 10th., Ostend, Belgium. Sept. 17-23. Vol. 1
- Sorgeloos P., M. Baeza-Mesa, C.Claus, G. Vandeputte, F.Benijts, E.Bossuyt, E. Bruggeman, G. Persoone, D. Verischele, 1977. Artemia salina as live food in aquaculture. p. 37-46 In : Fundamental and applied research on the brine shrimp Artemia salina. (L.) in Belgium. Jaspers E, G. Persoone (Eds.) EMS Special Publication No. 2, 110p.
- Sorgeloos P., E. Bossuyt, E. Laviña, M. Baeza-Mesa, G. Persoone, 1977. Decapsulation of Artemia cysts : a simple technique for the improvement of the use of brine shrimp in Aquaculture. Aquaculture 12 : 311-315.

- Sorgeloos, P., G. Persoone, M. Baeza-Mesa, E. Bossuyt, E. Bruggeman, 1978. The use of Artemia cysts in aquaculture; the concept of "hatching efficiency" and description of a new method for cyst processing. Proc. 9th Annual Meeting World Maricult. Soc. Avault, J. W. (Ed.). Louisiana State Univ. Baton Rouge. 9:715-721.
- Sorgeloos, P., C. Remicha-Van der Wielen and G. Persoone, 1978. The use of Artemia nauplii for toxicity test a critical analysis. Ecotoxicology and environmental safety. 2: 249-255.
- Sorgeloos, P., E. Bossuyt, P. Lavens, P. Léger, P. Vanhaecke, D. Verischele, 1983. The use of brine shrimp Artemia in crustacean hatcheries and nurseries. p 71-96 In: CRC Handbook of Mariculture. Vol. 1. Crustacean Aquaculture. Mc. Vey J.P. (Ed.) CRC Press. Boca Raton, Florida U.S.A. 456 p.
- Spotte, S. 1970. Fish and invertebrate culture. Water Management in closed systems. Wiley-Interscience. New York. 145 p.
- Steele, J.H. 1956. Plant production on the Fladen Ground. J. Mar. Biol. Ass. UK. 35: 1-33.

- Stewart, S., K. Schurr, 1980. Effects of asbestos on survival of Artemia. p. 233-251 In : The Brine Shrimp Artemia. Vol. 1. Morphology, Genetics, Radiobiology, Toxicology. Persoone G., P. Sorgeloos, O. Roels, E. Jaspers (Eds.) Universa Press, Wetteren, Belgium. 315 p.
- Sushchenya, L.M., 1962. Quantitative data on nutrition and energy balance in Artemia salina (L.). Akad. Nauk. Sssr, Dok. Biol. Sci Sect. 143: 329-330.
- Tarzwell, C.M., 1969. Standard Methods for the determination of relative toxicity of oil dispersants and mixtures of dispersants and various oils to aquatic organisms p. 179-186 in: Proc. Joint Conference Preventions and Control of oil spills. API and FWPCA.
- Teramoto K., and S. Kinoshita, 1961. Some informations on the culture of Artemia. Jap. Soc. Fish. Bull. 27(8): 801-804.
- Terpley, W.A. 1958. Studies on the use of the brine shrimp. Artemia salina (Leach) as test organism for bioassay. J. Econ. Ent. y 51(6): 780-783.

Tobias, W.J., P. Sorgeloos, E. Bossuyt, and O.A. Roels, 1979. The technical feasibility of mass culturing Artemia salina in the St. Croix "artificial upwelling" mariculture system. Proc. World. Maricul. Soc. 10:203-214.

Tobias, W.J., P. Sorgeloos, O.A. Roels, B.A. Sharfsein, 1980. International study on Artemia XIII. A comparison of production data of 17 geographical strains of Artemia in the St-Croix artificial upwelling-mariculture system. p 383-392 In: The Brine Shrimp Artemia. Vol. 3. Ecology, Culturing, Use in aquaculture. Persoone B., P. Sorgeloos, O. Roels, E. Jaspers (Eds.). Universal Press, Wetteren, Belgium. 426 p.

Vallejo, C.G., F. de Luchi, J. Laynez and R. Marco, 1980. The role of cytochrome oxidase in the resumption of the development of Artemia dormant cysts. In: The Brine Shrimp Artemia vol. 2 Physiology, Biochemistry, Molecular Biology. Persoone, G., P. Sorgeloos, O. Roels and E. Jasper (Eds.) Universa Press. Wetteren, Belgium 634 p.

Van Ballaer, E. 1986. Artemia Sauce. Artemia Newsletter, 3:12.

Vanhaecke, P., G. Persoone, C. Claus and P. Sorgeloos. 1980. Research on the development of a short term standard toxicity test with Artemia nauplii. p 263-285 In : The Brine Shrimp Artemia vol. 1.

Vanhaecke, P., P. Sorgeloos, 1980. International study on Artemia IV. The biometric of Artemia strains from differente geographical origin p. 393-405 In : The Brine Shrimp Artemia Vol. 3 Ecology, culturing, use in Aquaculture. Persoone G., P. Sorgeloos, O. Roels, E. Jaspers (Eds.) Universa Press. Wetteren, Belgium. 426 p.

Vanhaecke, P., A. Cooreman and P. Sorgeloos, 1981. International study on Artemia XV. Effect of light intensity on hatching rate of Artemia cysts from differente geographical origin. Mar. Ecol. Progr. Ser., 5: 111-114.

Vanhaecke, P., G. Persoone, C. Claus and P. Sorgeloos, 1981. Proposal for a short-term toxicity test with Artemia nauplii. Ecotox. Environ. Safety 5: 382-387.

Vanhaecke, P., and P. Sorgeloos, 1982. International study on Artemia. XVIII. The hatching rate of Artemia cysts. A comparative study. Acuacultural Engineering 1: 263-273.

Vanhaecke, P., and P. Sorgeloos, 1983. International study on Artemia XIX. Hatching data for ten commercial sources of Brine Shrimp cysts and re-evaluation of the "Hatching Efficiency" concept. *Aquaculture* 30:43-52.

Vanhaecke, P., and P. Sorgeloos, 1983. International study on Artemia XXX. Bioeconomic evaluation of the nutritional value for carp (Cyprinus carpio) larvae of nine Artemia strains. *Aquaculture* 32: 285-293.

Versichele, D. and P. Sorgeloos, 1980. Controlled production of Artemia cysts in batch cultures. In: Brine Shrimp Artemia, vol. 3.

Verrill, A.E. 1869. Observations on phyllopod Crustacea of the family Branchipodidae, with description some new genera and species from America. *Proc. Am. Ass. Advanc. Sci* 18: 230-247.

Vollmer, C. 1952. Kiemenfiss. Hupferling and Muschelkreb. *Die Neue Brehm-Bucherei* Band 57.

Von Hentig. 1971. Einfluss von Salzgehalt und temperatur auf Entwicklung, wachstum, Forthpflanzung und Energiebilnz von Artemia salina. *Mar. Biol.*, 9: 145-182.

- Watanabe, T., F. Oowa, C. Kitajima, and S. Fujita, 1980. Relationship between dietary value of brine shrimp Artemia salina and their content of w3 highly unsaturated fatty acids. Jap. Soc. Sci. Fish. Bull 46(1): 35-41.
- Wheaton, F.W. 1977. Aquacultural engineering Wiley Interscience, John Wiley and Sons, Inc. New York. 708 p.
- Wheeler, R., A. I. Yudin, W.H. Clark Jr., 1979. Hatching events in the cysts of Artemia salina. Aquaculture 18: 59-67.
- Wheeler, R., A.J. Yudin and W.H. Clark Jr., 1979. Hatching events in the cysts of Artemia salina. Aquaculture, 18: 59-67.
- Wolte, A.F. 1980. A light and electron microscopic study of the frontal knob of Artemia (crustacea, Branchiopoda). In: The Brine Shrimp Artemia, vol I. Morphology, Genetic, Radiobiology and Toxicology. Persoone, G., P. Sorgeloos, O. Roels, and E. Jasper (Eds.) Universa Press, Wetteren, Belgium. 315 p.

Zillioux. E.J., H.R. Foulk, J.C. Prager and J.A. Cardins,
1973. Using Artemia to assay oil dispersant
toxicities. J. Wat. Pollut. Control. Fed., 45(11):
2389-2396.