

UNIVERSIDAD DEL MAR



PRODUCCIÓN DE QUISTES Y CALIDAD DE NAUPLIOS DE *Artemia franciscana* ECOTIPO LAGUNA GRANDE.

**TESIS PRESENTADA A LA DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO DE LA
UNIVERSIDAD DEL MAR, COMO REQUISITO NECESARIO PARA OBTENER
EL GRADO DE MAESTRIA EN CIENCIAS, CON ESPECIALIDAD
EN ECOLOGIA MARINA.**

JOSÉ ANGEL RONSON PAULIN

Enero de 2003.

RESUMEN de la Tesis de **JOSÉ ÁNGEL RONSON PAULÍN**, presentado como requisito necesario para la obtención del Título de **MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN ECOLOGÍA MARINA**. Puerto Ángel, Oaxaca, México. Enero de 2003.

“PRODUCCIÓN DE QUISTES Y CALIDAD DE NAUPLIOS DE *Artemia franciscana* ECOTIPO LAGUNA GRANDE”.

Resumen aprobado por:

M. en C. Carlos Enrique Medina Reyna.
Director de Tesis.

Los quistes y nauplios de *Artemia* representan un importante alimento vivo para la acuicultura; como tal, esta sujeto a la variabilidad debida a su producción, obtención y manejo. Esto provoca, que continuamente se busquen nuevas fuentes de este crustáceo. Este trabajo evalúa la producción de quistes de *Artemia franciscana* en Laguna Grande, Oaxaca durante un ciclo anual así como su calidad de eclosión, composición bioquímica y carga bacteriológica; además se evaluó la eficiencia de enriquecimiento con micropartículas secas. Se tuvo que la producción media de quistes fue de $155 \text{ g PS m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ y $0.006 \text{ g PS m}^{-2}$ para la ribera (DT) y columna de agua, respectivamente; con un máximo medio de $516.63 \text{ g PS m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ en la ribera de febrero a mayo; esta no presentó relación con los parámetros hidrológicos pero con las variables meteorológicas se pudo describir mediante $DT = -14.063 + 13.874 \cdot \text{Temperatura} - 0.278 \cdot \text{Precipitación} - 2.219 \cdot \text{Radiación}$ ($R^2=0.95$). La calidad de eclosión fue menor que una cepa comercial a 24 h de incubación pero a 48 h no se detectaron diferencias significativas. El valor nutricional de los quistes y nauplios obedeció a la utilización ontogenética de proteínas, lípidos y ácidos grasos; de éstos últimos, se notó el incremento de los poli-insaturados, notablemente el 20:5 y 22:2, pero ausencia de 22:6; La calidad bacteriana de los quistes fue menor de 10^3 y 10^5 UFC mL^{-1} para bacterias *Vibrio* sp. y heterótrofas totales, respectivamente. La bioencapsulación de ácidos grasos poli-insaturados en los nauplios resultó adecuada con enriquecedores microparticulados secos ya que incrementaron el 22:6, hasta 15% del total de ácidos grasos totales, y la razón DHA:EPA a 2.7. Los resultados permiten establecer que *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande es de buena calidad nutricional y que el grado de catabolismo del DHA permite un adecuado enriquecimiento.

Palabras claves: Quistes, Nauplios, *Artemia*, Calidad, Laguna Grande, Ácidos grasos.

DEDICATORIA

A mi madre:

Gran señora,
la presente es para agradecerte eternamente el papel que me conferisteis como hijo,
lo cual me ha abierto la perspectiva para superarme día a día.

Este documento es otro paso más.
Te lo dedico en la lejanía y en esta carrera contra el tiempo y la circunstancia.

A ti,
personita
espero que algún día puedas leer estas líneas,
sea mi agradecimiento pues contigo se fue el letargo que me atormentaba.

Santiago de Compostela. 2002

AGRADECIMIENTOS

Vaya mi *aeternum* agradecimiento a Carlos Enrique Medina Reyna, Ivonne Sandra Santiago Morales, Ruth Pedroza Islas, Pablo Jacinto Nolasco, Ricardo Klimek Gamas, Aída Sánchez Malpica, Rafael Villalobos, Andrés Hernández Santiago, Jesús Madrid González, Alejandro Espinoza Tenorio, Noe Ruiz García y a muchas personas, cuyos nombres omito por extensión, que directa o indirectamente me ayudaron, en múltiples y diversas formas, a concluir este trabajo.

JARP

RECONOCIMIENTOS

Esta disertación fue posible al apoyo parcial de los siguientes proyectos:

1.- Procesado de quistes de *Artemia sp* var. *Istmo* de la salina “Laguna Grande”, Santiago Astata, Tehuantepec, Oaxaca México. Clave 97SIBEJ-01-010 dirigido por José Ángel Ronsón Paulín;

2.- Evaluación de alimentos microparticulados para las larvas, postlarvas y juveniles de crustáceos de interés comercial en base a productos pesqueros regionales. Clave 1998-0500506 dirigido por Carlos Enrique Medina Reyna, con extensión como proyecto interno de la UMAR;

3.- Evaluación de alimentos microparticulados para las larvas y postlarvas de crustáceos. Proyecto interno UMAR dirigido por Carlos Enrique Medina Reyna;

4.- Proyecto grupal de la Universidad Iberoamericana Santa Fé, México dirigido por Ruth Pedroza Islas.

CONTENIDO

Página

I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. Consideraciones generales	1
I.1.1. Descripción biológica de <i>Artemia</i> sp.	1
I.1.2. Importancia de <i>Artemia</i> sp. en acuicultura	5
I.1.3. Valor nutricional de <i>Artemia</i> sp.	7
I.1.4. La paradoja de la dependencia de <i>Artemia</i> sp.	8
I.2. Antecedentes	9
I.2.1. Distribución de <i>Artemia</i> sp. en México	9
I.2.2. <i>Artemia</i> sp. en la costa de Oaxaca	10
I.3. Objetivos	13
I.4. Establecimiento de las hipótesis de trabajo	14
II. MATERIALES Y MÉTODOS	15
II.1. Área de estudio	15
II.2. Trabajo en campo	18
II.2.1. Ubicación del transecto de muestreo	18
II.2.2. Diseño de muestreo	18
II.2.2.1. Colecta de quistes en sedimento	18
II.2.2.2. Colecta de quistes en la columna de agua	19
II.2.2.3. Registro de datos hidrológicos y meteorológicos	21
II.3. Trabajo en laboratorio	21
II.3.1. Preparación general de muestras	21
II.3.2. Conservación de muestra para análisis <i>a posteriori</i>	22
II.3.3. Calidad de quistes y nauplios de <i>Artemia</i>	23
II.3.3.1. Indicadores de la calidad de eclosión de quistes de <i>Artemia</i>	23
II.3.3.2. Análisis proximal de quistes y nauplios de <i>Artemia</i>	24
II.3.3.3. Carga bacteriana en nauplios de <i>Artemia</i>	26

CONTENIDO (continuación)	<u>Página</u>
II.3.3.4. Análisis de ácidos grasos en quistes y nauplios de <i>Artemia</i>	27
II.4. Experimento de bioencapsulación	28
II.4.1. Técnica de bioencapsulación	28
II.4.2. Diseño experimental para la comparación de enriquecedores	28
II.5. Análisis estadístico	30
III. RESULTADOS	32
III.1. Producción de quistes de <i>Artemia franciscana</i> ecotipo Laguna Grande	32
III.2. Relación de la producción de quistes de <i>Artemia franciscana</i> ecotipo Laguna Grande con factores ambientales	36
III.2.1. Variación temporal de factores hidrológicos	36
III.2.2. Relación de factores hidrológicos con producción de quistes de <i>Artemia franciscana</i> ecotipo Laguna Grande	38
III.2.3. Relación de factores climatológicos con producción de quistes de <i>Artemia franciscana</i> ecotipo Laguna Grande	39
III.3. Calidad de nauplios de <i>Artemia franciscana</i> ecotipo Laguna Grande	41
III.4. Bioencapsulación de nauplios de <i>Artemia franciscana</i> ecotipo Laguna Grande con distintos enriquecedores	46
III.4.1. Caracterización físico-química de enriquecedores	46
III.4.2. Enriquecimiento de <i>Artemia franciscana</i> ecotipo Laguna Grande	48
IV. DISCUSIÓN	51
IV.1. Producción de quistes de <i>Artemia franciscana</i> ecotipo Laguna Grande	51
IV.2. Relación de la producción de quistes de <i>Artemia franciscana</i> ecotipo Laguna Grande con factores ambientales	52
IV.3. Calidad de nauplios de <i>Artemia franciscana</i> ecotipo Laguna Grande	53
IV.4. Bioencapsulación de nauplios de <i>Artemia franciscana</i> ecotipo Laguna Grande con distintos enriquecedores	55

CONTENIDO (continuación)	<u>Página</u>
V. CONCLUSIONES	59
LITERATURA CITADA	61

LISTA DE FIGURAS

<u>FIGURA</u>		<u>Página</u>
1	Distintas fases del ciclo de vida de <i>Artemia</i> . A) Etapa adulta. B) Embrión en estadio umbrella y nauplio instar I. (1) ojo naupliar; (2) anténula; (3) antenas; (4) mandíbula.	3
2	Ubicación de cuerpos costeros productores de sal y con presencia de quistes de <i>Artemia</i> sp. en el Sureste del estado de Oaxaca (Modificado de Porras <i>et al.</i> , 1997).	12
3	Localización de la salina Laguna Grande, Santiago Astata, Oaxaca.	16
4	Ubicación del transecto de muestreo en Laguna Grande Santiago, Astata.	20
5	Deposición quincenal de quistes de <i>Artemia franciscana</i> ecotipo Laguna Grande en tierra. El eje en X ilustra la escala quincenal de muestreo de 1998 a 1999. PS: Peso seco.	33
6	Deposición quincenal de quistes de <i>Artemia franciscana</i> ecotipo Laguna Grande en la columna de agua. El eje en X ilustra la escala quincenal de muestreo de 1998 a 1999. PS: Peso seco.	34
7	Variación estacional de la producción de quistes de <i>Artemia franciscana</i> ecotipo Laguna Grande en el biotopo agua durante el periodo de estudio.	35

LISTA DE FIGURAS (Continuación)

Página

- | | | |
|----|--|----|
| 8 | Variación temporal de los factores hidrológicos del agua subsuperficial de la Laguna Grande de Junio de 1998 a Septiembre 1999. | 38 |
| 9 | Microfotografía de las microcápsulas empleadas como enriquecedores de <i>Artemia franciscana</i> ecotipo Laguna Grande. A) OrbiCap, B) Algamac. | 47 |
| 10 | Contenido medio de lípidos totales (% en base seca) de <i>Artemia franciscana</i> ecotipo Laguna Grande enriquecida con diferentes micropartículas durante 48 de incubación. | 49 |

LISTA DE TABLAS

<u>TABLA</u>		<u>Página</u>
I	Sumario de la deposición quincenal de quistes de <i>Artemia franciscana</i> ecotipo Laguna Grande colectada de Junio de 1998 a Septiembre de 1999. E. E.: Error estándar. PS: Peso seco	32
II	Sumario de la deposición estacional media (E. E.) de quistes de <i>Artemia franciscana</i> ecotipo Laguna Grande en agua y tierra; colectada de Junio de 1998 a Septiembre de 1999 E. E.: Error estándar. PS: Peso seco	35
III	Cuadrados medios (CM) del análisis de varianza de una vía de la deposición en tierra de los quistes ($\text{g PS m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) de <i>Artemia franciscana</i> ecotipo Laguna Grande y la estación climática. Se indica la probabilidad de la comparación <i>a posteriori</i> . La deposición en tierra se transformó mediante $\text{Log}(X+1)$. g. l.= grados de libertad. PS: Peso seco.	36
IV	Valores del coeficiente de correlación de Pearson entre la producción de quistes de <i>Artemia franciscana</i> ecotipo Laguna Grande encontrada en agua y tierra con los factores ambientales del agua subsuperficial de dicha laguna	39

<u>TABLA</u>	LISTA DE TABLAS (Continuación)	<u>Página</u>
V	Análisis de regresión lineal múltiple por pasos entre la deposición mensual de quistes de <i>Artemia franciscana</i> ecotipo Laguna Grande (DT; g PS m ⁻² d ⁻¹) en tierra de la salina Laguna Grande y los parámetros meteorológicos, durante el periodo de muestreo (Junio de 1998 a Septiembre de 1999). Las variables se logaritizaron antes del análisis estadístico. PS: Peso seco	40
VI	Análisis de Regresión Lineal Simple entre la deposición mensual de quistes de <i>Artemia franciscana</i> ecotipo Laguna Grande en agua (DA; g PS m ⁻²) y la precipitación pluvial, durante el periodo de muestreo (Junio de 1998 a Septiembre de 1999). Las variables se logaritizaron antes del análisis estadístico. PS: Peso seco	40
VII	Sumario de la calidad de eclosión de quistes de <i>Artemia franciscana</i> ecotipo Laguna Grande; después de aplicar técnicas estándares de calidad. Se empleó a la cepa SFB como testigo	42
VIII	Composición proximal media (Error estándar: E.E, N=4, % en base seca) y contenido energético total (KJ g ⁻¹) de los quistes y nauplios de <i>Artemia franciscana</i> ecotipo Laguna Grande; después de aplicar técnicas estándares de eclosión. Carbohidratos (CHO)	43
IX	Composición media (E. E.) de ácidos grasos mayoritarios (% de ácidos grasos totales) de <i>Artemia franciscana</i> ecotipo Laguna Grande en sus primeras fases de vida	44

<u>TABLA</u>	LISTA DE TABLAS (Continuación)	<u>Página</u>
X	Carga media (E. E.) de bacterias heterótrofas (UFC mL ⁻¹) encontradas en los nauplios de <i>Artemia franciscana</i> ecotipo Laguna Grande; después del tratamiento empleado en este estudio	45
XI	Características físico-químicas de los enriquecedores empleados en este estudio. Composición proximal en base seca	47
XII	Composición de ácidos grasos mayoritarios (% de ácidos grasos mayoritarios de las micropartículas usadas como enriquecedores en este estudio)	48
XIII	Composición media (E.E.) de ácidos grasos mayoritarios (% de ácidos grasos totales) de <i>Artemia franciscana</i> ecotipo Laguna Grande mantenida con diferentes enriquecedores después de 48 h de incubación	50
XIV	Composición proximal media (% en base seca de <i>Artemia</i> . CHO: Carbohidratos.	58

PRODUCCIÓN DE QUISTES Y CALIDAD DE NAUPLIOS DE *Artemia franciscana*

ECOTIPO LAGUNA GRANDE

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Consideraciones generales

I.1.1. Descripción biológica de *Artemia* sp.

Artemia es un pequeño artrópodo incluido en la Clase Crustácea Entomostrácea, perteneciente a la subclase Branquiópoda, orden Anostraca, familia Artemiidae y género *Artemia*. Los Anostrácos son crustáceos muy antiguos que han sobrevivido en la actualidad, por lo que es común encontrar características primitivas en ellos como: gran cantidad de segmentos corporales, ausencia de artejos articulados en las extremidades, mezclados con otros caracteres propios de un alto grado de especialización como apéndices para la filtración de partículas en suspensión y antenas en los machos especializadas para el proceso de cópula.

Artemia habita lagos y lagunas hipersalinas caracterizados por una baja diversidad de especies. Una peculiaridad del género es la producción de quistes flotantes. Los quistes son metabólicamente inactivos y no se desarrollan mientras permanezcan secos. En contacto con el agua, los quistes se hidratan y el embrión contenido dentro, inicia su metabolismo; a las 20 h inicia el rompimiento del quiste. Mientras el embrión arrastra el quiste vacío (etapa umbrella; Figura 1B), termina el desarrollo del embrión y, después de un corto tiempo, ocurre la eclosión culminando con la aparición del nauplio. El primer estadio naupliar (instar I; 400-500 μm de longitud) posee un color parduzco, un ojo

naupliar rojo en la región cefálica y tres pares de apéndices (Figura 1B). La larva instar I no se alimenta ya que su sistema digestivo todavía no es funcional. Después de 8 horas el animal muda al segundo estadio naupliar (instar II) en el cual ya es fitoplanctófago. El crecimiento de la larva continúa con otras 15 mudas que se agrupan en estadios metanaupliares, postmetanaupliares y postlarvarios. La *Artemia* adulta (± 1 cm de longitud) tiene un cuerpo alargado con dos ojos pedunculados complejos, un tracto digestivo lineal, anténulas sensoriales y 11 pares de toracópodos funcionales (Figura 1A). Posee 11 somitos torácicos con toracópodos también nombrados filópodos, los cuales están seguidos de dos somitos modificados, en los cuales se encuentran los órganos reproductores que normalmente se consideran como parte del tórax; en las hembras adultas se observan dos pequeños sacos translúcidos donde se aprecian los quistes o pequeños huevecillos. Al somito genital le siguen 7 abdominales sin apéndices; el telson termina en una furca compuesta por un par de cercopoditos. Los apéndices torácicos típicos, cuyo tamaño va disminuyendo hacia la parte posterior, tienen un eje principal llamado “cormo”, un exopodito conocido con el nombre de “flabellum” y un endopodito. Los apéndices torácicos cumplen una triple función: i) sirven como órganos natatorios, ii) permiten la respiración por intercambio de gases y iii) filtran el agua para atrapar partículas alimenticias. El tamaño corporal varía según la raza pero en general parece estar relacionado con el nivel de ploidía.

Como ya se describió, los huevecillos fertilizados normalmente desarrollan un nauplio que es liberado por el progenitor (reproducción ovovivípara). En condiciones extremas, típicas de salinas, los embriones se llegan a desarrollar hasta la etapa de gástrula.

En este momento, se protegen de una cáscara delgada (corión), entran a un estadio de pausa metabólica o dormancia (diapausa) y pueden ser liberados por la hembra (reproducción ovípara). En principio, ambos tipos de reproducción pueden presentarse en todas las cepas de *Artemia* de manera continua o alternada.

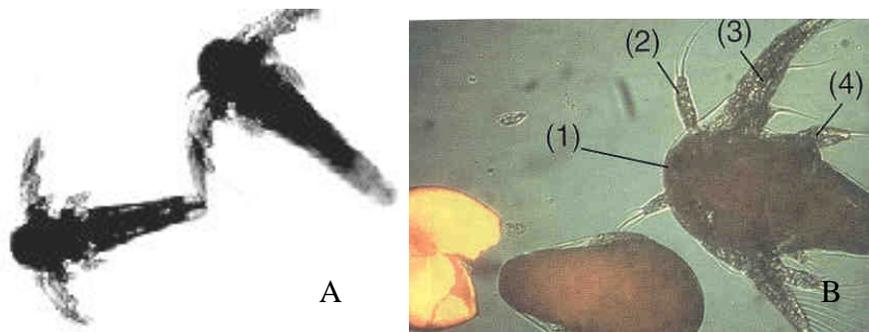


Figura 1. Distintas fases del ciclo de vida de *Artemia*. A) Etapa adulta. B) Embrión en estadio umbrella y nauplio instar I. (1) ojo naupliar; (2) anténula; (3) antenas; (4) mandíbula.

En este punto es oportuno aclarar el uso del nombre *Artemia*. Por convención, se debe hacer empleando solo el nombre genérico, evitando utilizar los nombres específicos debido a la incertidumbre sobre la existencia de diferentes especies o géneros. Es por ello que para designar a *Artemia* originaria de un lugar, tenga o no características morfológicas y bioquímicas diferentes, además de que sea o no capaz de hibridarse, debe referirse a una cepa. Tal convenio, en vigencia desde 1979, llegó a la conclusión de que las diferencias genéticas entre distintas razas de *Artemia* son de importancia suficiente como para anular la clasificación anterior que las agrupaba en una sola especie, *Artemia salina* (L.) (Bowen y Sterling, 1978; Bowen *et al.*, 1980). La diferencia fundamental entre las distintas razas de *Artemia* es su forma de reproducción; ya que es posible encontrar razas bisexuales y otras

con reproducción partenogenética. Una segunda diferenciación es la que se basa en que tales organismos tiendan a la ovíparidad u ovoviviparidad, aunque esta característica pueda variar en una misma raza dependiendo de las condiciones fisicoquímicas y ambientales del biotopo. La salinidad del biotopo ejerce un efecto muy marcado en el desarrollo morfológico de *Artemia*.

Se ha intentado relacionar las características reproductivas con las características ambientales (Stearns, 1977). Debido a la diversidad de los hábitats que coloniza este organismo, no es extraño que las características del ciclo de vida varíen entre las distintas razas debido a las condiciones ambientales específicas (Browne *et al.*, 1984).

La mayoría de las razas de *Artemia* no parecen sobrevivir a temperaturas inferiores a 6 °C, excepto en la forma de quistes. La temperatura máxima que tolera es 38 °C aunque existen márgenes entre razas. Los quistes resisten un rango de temperaturas más amplio de -273⁰C a 100⁰C (Hinton, 1954; Skoultchi y Morowitz, 1964).

Este branquiópodo puede sobrevivir en ambientes en los que la relación de aniones y cationes principales (K^{*1} , CO_3^{-2} , SO_4^{-2}) es totalmente diferente a la del agua de mar, alcanzando valores máximos si se compara con la misma (Cole y Brown, 1967; Bowen *et al.*, 1980). *Artemia* puede soportar hábitats con una hipersalinidad de 340 g L⁻¹ (Post y Youssef, 1977). Los quistes empiezan su desarrollo cuando las condiciones del medio tienden a ser salobres (25 g L⁻¹), tal umbral dependerá de las razas, y detienen su desarrollo cuando el medio se torna hipersalino por encima de los 75 g L⁻¹.

Artemia puede sobrevivir en ambientes hipóxicos; se le considera un euroxibionte típico ya que sobrevive en ambientes con menos de 1 mg L⁻¹ de oxígeno y hasta 150% de saturación (Bernaets *et al.*, 1981; Decler *et al.*, 1989).

I.1.2. Importancia de *Artemia* sp. en acuicultura

La importancia para la acuicultura que *Artemia* sp. posee es ampliamente reconocida desde los años 20's entre los técnicos y científicos de todo el mundo (Lavens y Sorgeloos, 2000). Las razones de tal hecho son varias, entre las que se destaca su tiempo de almacenaje (Léger, *et al.*, 1987); su valor altamente nutricional como alimento para larvas y postlarvas de peces y crustáceos marinos (Sorgeloos, 1979; Jones y Houde, 1981; Hontoria *et al.*, 1989; Ortiz *et al.*, 1991; Newmark, 1992; Bhat, 1992; Castro *et al.*, 1995; Rosenberry, 1997); como inductor a la maduración sexual de crustáceos (Léger, *et al.*, 1987); como vehículo de compuestos alimenticios esenciales, pigmentos y profilácticos (Ulloa-Gómez, 2001); además de emplearse como atrayente organoléptico en conjunto con dietas inertes para alevines (Persoone, 1978; Metailler, 1981; Levine, 1983). El empleo de *Artemia* sp. sigue vigente aun cuando existan productos alimenticios alternativos (biomasa viva, congelada, liofilizada, flakes, pellets, etc.) que intentan suplir los estándares nutricionales requeridos (Abalde *et al.*, 1995; Vinatea-Arana, 1999); por lo que el valor de *Artemia* sp. ya sea en forma naupliar, metanaupliar, quistes descapsulados o biomasa adulta, resulta innegable (Eagles, 1984; Trotta *et al.*, 1987; García, 2000); sin embargo, su alto costo resulta restrictivo a nivel comercial debido al mercado especulativo de quistes impuesto por los *trusts* estadounidenses que controlan cerca del 90% del mercado mundial (CYTED, 2000; Álvarez y Sánchez, 1994; Ulloa-Gómez, 1998; Vinatea-Arana, 1999; Lavens y Sorgeloos, 2000). Tal monopolio deriva en que EEUU fue el pionero en la explotación con fines comerciales de este recurso en la década de los 50's mediante las cosechas naturales en la Bahía de San Francisco (SFB, de aquí en adelante) y en el Gran Lago Salado (GSL, en lo sucesivo) de Utah.

La demanda mundial de quistes de *Artemia* sp. aumenta con el paso del tiempo. Algunas estimaciones han señalado un incremento anual del 15% debido al crecimiento en el desarrollo biotécnico y de producción en la acuicultura en las distintas regiones del planeta (Lai, 1991). Como ejemplo está Japón que basa su producción de maricultura con el 40 % de la producción mundial de quistes de *Artemia* (Watanabe, 1987). En paralelo a su demanda, es relevante establecer la reducción en la producción de quistes en la última década en el GSL, el máximo productor mundial (Sorgeloos y Van-Stappen 1995; CYTED, 2000). Al respecto, se estima que la demanda mundial de quistes de este crustáceo supera las 2,000 toneladas por año; de las cuales el 85% es empleada tan solo en el desarrollo larvario de peneidos marinos y macruros continentales; 10% en la piscicultura; y el restante 5% en acuariofilia (Cámara, 1996; Lavens y Sorgeloos, 2000). Por lo que respecta a esta última actividad, se calcula que a nivel mundial puede llegar a consumir más de 4,000 toneladas de peso húmedo anualmente (Lai, 1991), lo que da como resultado una gran actividad de extracción a partir de poblaciones naturales provenientes de salinas (Vos y De-La-Rosa, 1980; Flores, 1987; Jumalon *et al.*, 1987).

Artemia sp. existe en diversos biotopos como lagos, lagunas, pozas, saladares y salinas de origen atalosalino y talasosalino. Estos sistemas costeros al sufrir desequilibrios ambientales provocados por fenómenos a gran escala como lo es “El Niño” combinados con aspectos biológicos específicos de las poblaciones de *Artemia* causan una disminución considerable de la biomasa enquistada producida con el consecuente aumento de su precios en el mercado, lo que algunos autores traducen como verdaderos cuellos de botella en el sector acuícola. Ante tal panorama es pertinente buscar sitios alternativos de extracción de tan valioso recurso a nivel regional y mundial.

I.1.3. Valor nutricional de *Artemia* sp.

El creciente desarrollo de la industria del larvicultura de especies acuáticas en todo el mundo ha estimulado la explotación de quistes de diferentes poblaciones naturales de *Artemia* sp. con la que se pueden obtener nauplios con relativa facilidad (Ronsón-Paulín *et al.*, 2001); sin embargo, en la práctica se ha podido constatar que aun cuando *Artemia* sp. proporciona buenas tasas de sobrevivencia, éstas no son constantes a través del tiempo ni entre lotes de la misma salina debido a las variaciones medioambientales (Sorgeloos *et al.*, 1998). Como consecuencia de lo anterior, se desencadenan modificaciones de ciertos componentes nutricionales que son heredados de progenitores a la prole y, más aun el valor nutritivo de los nauplios de *Artemia* sp. para los diversos tipos de depredadores, variará según las diferentes razas geográficas (Sorgeloos, 1980; Sorgeloos *et al.*, 1986,1998; Gelabert, 2001).

La variabilidad en los contenidos proximales en nauplios de diferentes razas geográficas no difieren considerablemente (Léger *et al.*,1986; Gelabert, 2001) pero se han confirmado notables diferencias en el valor bioquímico entre cepas. Tales diferencias están enmarcadas principalmente en el bajo contenido de ácidos grasos altamente poli-insaturados (AGPI), siendo éste el factor que explica claramente las variaciones en sobrevivencia en la industria de la larvicultura (Sorgeloos *et al.*, 1986, 1998; Léger *et al.*, 1987). Watanabe *et al.* (1978) han confirmado que la presencia de ácidos grasos esenciales (AGE) es el principal factor en el valor alimenticio de *Artemia* sp. Es conocido que bajos niveles del AGPI específicamente el ácido eicosapentaenoico, 20:5 ω 3, producen una pobre

sobrevivencia así como un crecimiento débil en todas las especies de peces marinos y crustáceos.

I.1.4. La paradoja de la dependencia de *Artemia* sp.

Artemia sp. tiene una amplia distribución geográfica y es posible encontrarla en varios países de América Latina y el Caribe (Sorgeloos *et al.*, 1986). Dada su amplia distribución geográfica en el continente, emerge la paradoja de la dependencia de una sola fuente de quistes como es el GSL. La variabilidad natural de la población, la sobreexplotación, los conflictos de extracción, los cambios ecológicos del cuerpo lagunar y las fluctuaciones climáticas, le confieren a cada sistema en cuestión una inestabilidad como fuente de abastecimiento continuo para la industria mundial de la larvicultura.

En suma a las debilidades intrínsecas de cada vaso lagunar, se agrega el hecho de la calidad de la cepa. Es común tomar una muestra de quistes de *Artemia* sp. de algún biotopo salino cercano y eclosionarlos de acuerdo al protocolo básico de producción de nauplios; situación que se debe tomar con reserva ya que estas indicaciones son únicas para la población comercial 100% ensayada y conocida. El primer inconveniente que resulta es el no obtener la cantidad esperada de nauplios, ni el tamaño y el tiempo de eclosión, situación que hace que muchos larvicultores concluyan que la *Artemia* local sea imposible de utilizarse y que se siga dependiendo del uso de quistes importados a pesar de su alto costo y escasez en el mercado. La experiencia ha confirmado que esta apreciación puede resultar errónea ya que si bien al comparar los resultados de eclosión entre una cepa nativa y una comercial no son los mismos, no significa que la población nativa sea ineficiente, sino que

la biotecnia empleada no corresponde más que para la cepa comercial (De Wolf *et al.*, 1998; Ronson-Paulin *et al.*, 2001); por lo que habrá que buscar y diseñar la mejor técnica que incluya la colecta y procesado de quistes hasta la eclosión para tratar de encontrar resultados similares de eficiencia con la población del GSL, si es el caso.

I.2. Antecedentes

I.2.1. Distribución de *Artemia* sp. en México

Vanhaecke y Sorgeloos (1981), Vanhaecke *et al.* (1987) y Amat *et al.* (1992) han generado numerosos trabajos para localizar y caracterizar nuevas cepas de *Artemia* sp. con el objeto de definir el potencial de explotación y mejoramiento de su calidad nutritiva para larvicultura y cultivos de diversas especies acuáticas. En México, se han reportado 19 poblaciones naturales de *Artemia* sp. distribuidas en los estados de Baja California Sur, Sonora, Sinaloa, San Luis Potosí, Yucatán, Chiapas y Oaxaca. Destacando las presentes en éste último estado, que posee un total de 28 cuerpos de agua entre atalosalinos y talosalinos de origen natural (Figura 2), más los de origen artificial, se desconoce la cantidad de quistes que se producen en cada localidad y calidad de ellos (Castro y Gallardo, 1993; Castro *et al.*, 1995).

I.2.2. *Artemia* sp. en la costa de Oaxaca

Artemia franciscana presente en la franja costera del estado de Oaxaca ha sido estudiada por diversos autores como Castro *et al.*(1995), Porras *et al.* (1997), Malpica *et al.* (1995), Band-Schmidt *et al.* (1996) y Band Schmidt (1999), quienes se enfocaron a la evaluación de la calidad de los quistes y a su análisis proximal. Malpica *et al.* (1997) reportaron la capacidad reproductiva de la población de Laguna La Colorada en laboratorio para emular su comportamiento en el medio natural y concluyeron que posee una baja capacidad reproductiva pero que si se cruzase con la población de *Artemia franciscana* del GSL de Utah aumentaría su capacidad reproductiva por efecto de heterosis o de vigor híbrido y produciría hasta 759 Kg ha⁻¹. de quistes peso seco. Hasta el momento, se desconoce el potencial extractivo real y de procesamiento de quistes silvestres de estos sistemas. Sorgeloos *et al.* (1987) y Bengston *et al.* (1991) mencionaron que aun cuando la producción en este tipo de salinas suele ser pequeña, podrían ser oportunidades para el desarrollo del comercio local de cepas de *Artemia* nativas, especialmente en países en vías de desarrollo con restricciones de importación debido a los riesgos microbiológicos que implica la presencia de bacterias endémicas en simbiosis con los quistes, así como de otros microorganismos (CYTED, 2000). La existencia de quistes en la zona costera de Oaxaca y su susceptibilidad de ser cultivados representa un gran potencial (Castro *et al.*, 1997). Con base en lo anterior, Castro *et al.* (1987) en estudios hechos en la década de los 80's calcularon que la demanda de quistes de *Artemia* en México para el desarrollo de la larvicultura de peces y crustáceos, superó los 500 Kg por año, estimando un requerimiento futuro cercano a los 3000 Kg por año para el Pacífico, en tanto que para el Golfo, más de

700 Kg. por año. De lo anterior, se desprende que la importancia de la búsqueda de nuevas localidades de *Artemia*.

SITIO	MUNICIPIO	TIPO SISTEMA.	ORIGEN.	PRESENCIA CISTOS.	SUPERFICIE (Ha.).
1.-Salinas del Marqués	Salina Cruz.	Talasoalino	Natural.	√	750.0
2.-Guelagueachi.	Morro Mazatán.	Talasoalino.	Natural.	—	70.0
3.-Garrapatero.	Morro Mazatán.	Talasoalino.	Natural.	√	100.0
4.-La Blanca	Morro Mazatán	Talasoalino.	Natural.	√	75.0
5.-La Colorada.	Santiago Astata.	Talasoalino.	Natural.	√	131.8
6.-Laguna Grande.	Santiago Astata.	Atalasoalino	Natural.	√	580.0
7.-Laguna del Rosario	Coyul	Talasoalino	Natural.	—	289.0
8.-Rancho Paraíso	Morro Ayuta.	Talasoalino	Artificial.	—	30.0
9.-El Roble.	Santiago Astata	Atalosoalino	Natural	—	65.0
10.-Llano Redondo.	Santiago Astata.	Atalosoalino	Artificial.	√	6.468
11.-Laguna San Diego.	Santiago Astata.	Talasoalino	Natural.	—	25.0
12.-El Fraile.	Morro Mazatán	Talasoalino.	Natural.	√	165.9
13.-Yucla.	Juchitán.	Talasoalino.	Natural.	—	6.0
14.-San Ramón.	Juchitán.	Talasoalino.	Natural.	—	15.0
15.-El Amparo.	Juchitán.	Talasoalino.	Natural.	—	156.0
16.-Santa Cruz.	Juchitán.	Talasoalino.	Natural.	—	32.93
17.-Pta Agua.	Juchitán.	Talasoalino.	Natural.	—	50.0
18.-Guelahuichana	Unión Hidalgo.	Talasoalino.	Natural.	—	6.0
19.-Duvaguichi.	Unión Hidalgo.	Talasoalino.	Natural.	—	20.0
20.-Cascalote.	Unión Hidalgo.	Talasoalino.	Natural.	√	204.68
21.-Suvacina	Xadani.	Talasoalino.	Natural.	—	0.90
22.-IV Mezquite.	Ixhuatán	Talasoalino.	Natural.	—	9.0
23.-Conchalito	Ixhuatán	Talasoalino.	Natural.	—	9.46
24.-Tireongo.	Ixhuatán	Talasoalino.	Natural.	—	11.98
25.-Laguna Vichi.	Ixhuatán	Talasoalino.	Natural.	—	12.48
26.-Isla de León	Ixhuatán	Talasoalino.	Natural.	—	28.59
27.-Buena Vista.	San Dionisio Mar	Talasoalino.	Natural.	—	3.92
28.-Contreras.	San Dionisio Mar	Talasoalino.	Natural.	—	13.74

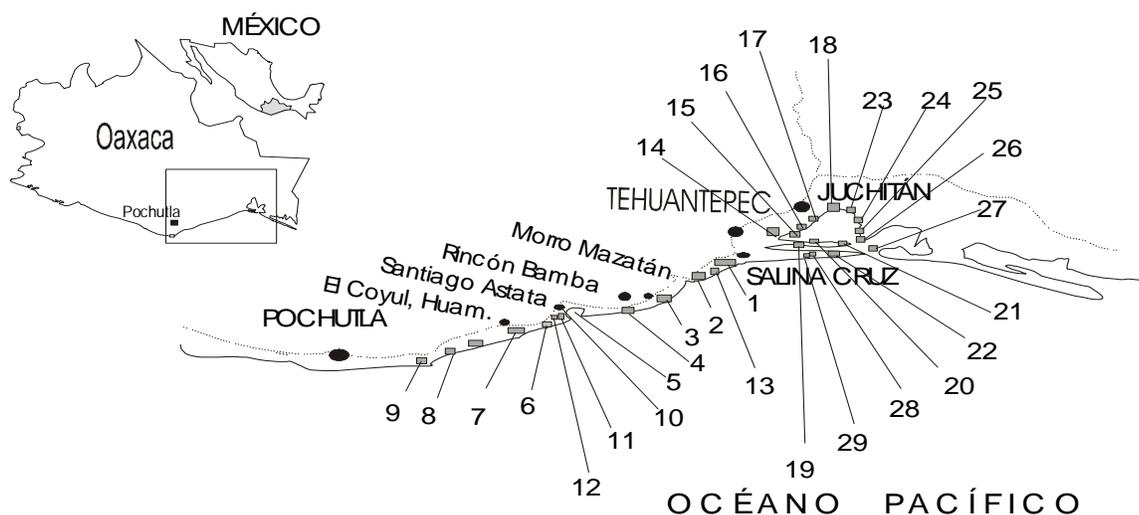


Figura 2. Ubicación de cuerpos costeros productores de sal y con presencia de quistes de *Artemia* sp. en el Sureste del estado de Oaxaca (Modificado de Porras *et al.*, 1997).

I.3. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo fue evaluar la producción de quistes de *Artemia franciscana* durante un ciclo anual en la Laguna Grande, Astata y la calidad de los quistes y nauplios obtenidos a partir del periodo de máxima producción con el fin de establecer las bases de explotación de este recurso.

Como objetivos específicos se plantean los siguientes:

- 1.- Evaluar la producción de quistes de *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande durante un ciclo anual;
- 2.- Evaluar la relación de los factores hidrológicos y meteorológicos que intervienen en la producción de quistes de *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande durante un ciclo anual;
- 3.- Determinar los parámetros de rendimiento de los quistes de *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande;
- 4.- Evaluar el valor nutricional de los quistes y nauplios de *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande;
- 5.- Evaluar la calidad bacteriana de los quistes de *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande;
- 6.- Evaluar la bioencapsulación de ácidos grasos poli-insaturados en los nauplios de *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande;

I.4. Establecimiento de las hipótesis de trabajo

Se establecieron cuatro hipótesis de trabajo para el presente estudio:

H₁: La producción de quistes de *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande es homogénea durante el año;

H₂: Existe relación entre los factores hidrológicos y meteorológicos y la producción de quistes de *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande;

H₃: La calidad de los quistes y nauplios de *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande es semejante a los quistes del SFB;

H₄: La bioencapsulación de ácidos grasos poli-insaturados en los nauplios de *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande es igual entre distintos enriquecedores.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1. Área de estudio

La salina denominada Laguna Grande se encuentra ubicada entre las coordenadas 15°55'974" N y 95°40'015" W (Figura 3); posee una altitud de 1 m s.n.m.m. y abarca una extensión de 580 Ha. Este cuerpo lagunar se encuentra a 12 Km al sur del municipio de Santiago Astata, Distrito de Tehuantepec, Oaxaca

La Laguna Grande es una laguna costera atalosalina cuyo origen se debe al proceso denominado costa de emersión de origen tectónico por colisión de las placas América del Norte y de Cocos, perteneciendo dicha laguna a la Región D tipo V (Lankford, 1977). Este sitio por ser un sistema o lago terminal no tiene ninguna saliente hacia el Océano Pacífico originando un fenómeno denominado "vaso solar" o depósito-evaporador de salmueras. Esta laguna posee depósitos de sal y otros minerales en capas ya que el agua que pierde es solamente por evaporación, situación que hace que el sistema sea más salado que el agua de mar. La dilución de esta sal y minerales en época de lluvias es por arroyos intermitentes además de ojos de agua constantes en el manto o por mareas vivas o mareas de tormenta. Debido a la presencia de rocas sedimentarias y calcáreas, se forman micro-picnoclinas, correspondiendo el fondo a salmueras saturadas.

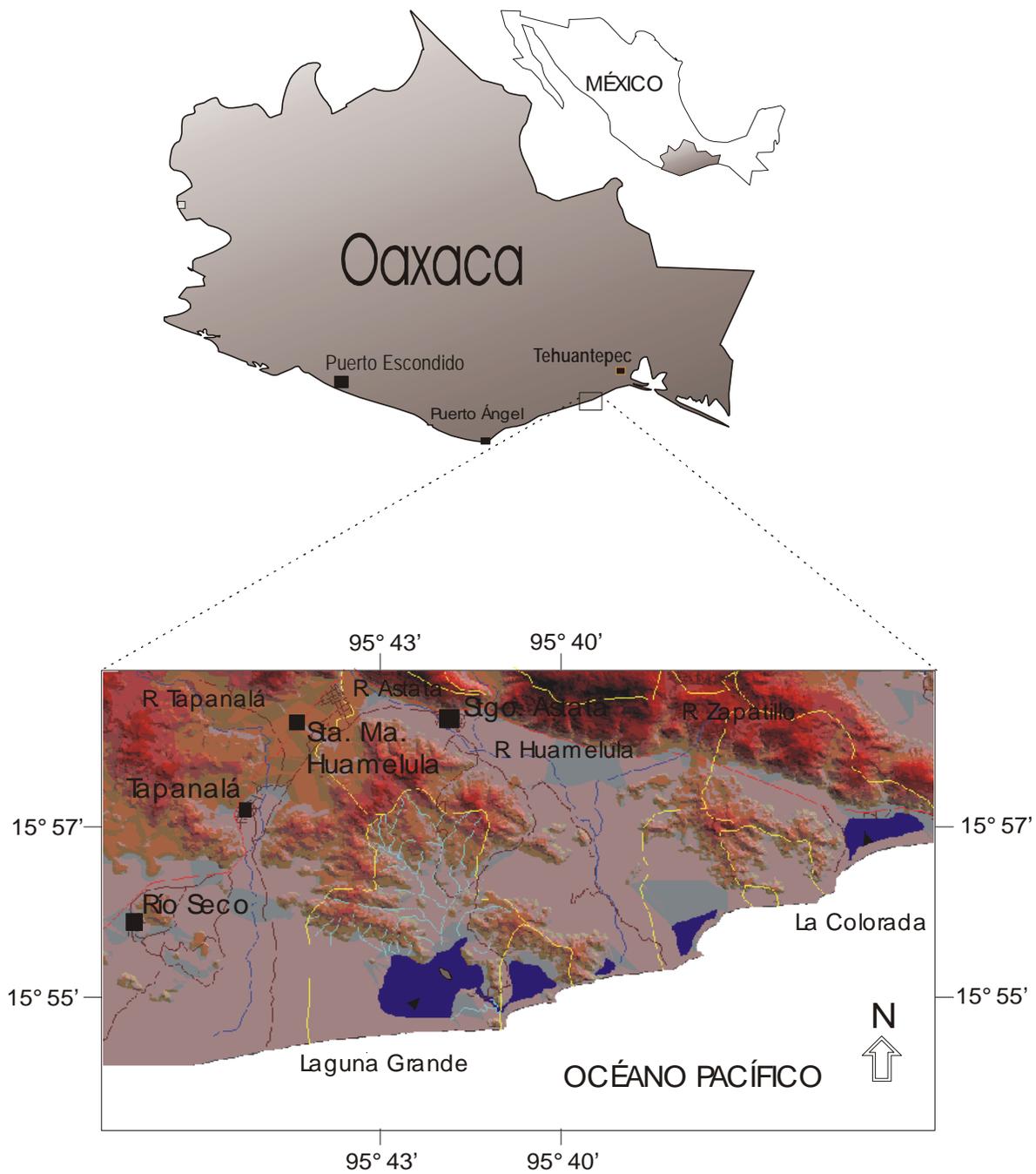


Figura 3. Localización de la salina Laguna Grande, Santiago Astata, Oaxaca.

El clima predominante en el área de estudio es del tipo Aw'' o(w)ig que corresponde a la región cálido subhúmedo de acuerdo con la clasificación de Köppen modificada por García-De Miranda (1981), con lluvias en verano y con invierno seco. La temperatura ambiente en los últimos 10 años ha estado entre los 41 °C como máximo y 16 °C como mínimo; con un grado de insolación máximo para el periodo de estudio de 321.63 h en Marzo de 1999 y un mínimo de 26.81 h para Mayo de 1998. El área se encuentra enmarcada en la isoterma media de los 26 °C promedio. La precipitación media anual fluctúa entre 855.4 y 1041.2 mm. La temporada de lluvias esporádicas inicia a mediados de Mayo y se intensifica en orden creciente de Junio a Septiembre y decrece de Octubre en adelante. El área se encuentra enmarcada en las isoyetas de 600 a 1000 mm promedio. Los vientos presentes a lo largo del año son en diferentes direcciones (N, NE, S, SE, SW, NNE) con una predominancia de los N, NE, y SW, dependiendo de la época del año y con velocidades de hasta 25 m s⁻¹. La zona es afectada por vientos dominantes provenientes del Noroeste debido a la presencia de los Nortes en el Istmo de Tehuantepec en los meses de Octubre a Abril (Roden, 1961), situación que intensifica la evaporación en este sistema salino, pues el cinturón de calmas ecuatoriales se desplaza más al Norte del Golfo de Tehuantepec, generando el arribo de vientos del sur.

Las características de la vegetación específica según la región corresponden a la selva baja caducifolia y selva baja subcaducifolia con presencia de matorral espinoso por sucesión secundaria (Rzedowski, 1981).

II.2. Trabajo en campo

II.2.1. Ubicación del transecto de muestreo

Se efectuó una prospección de campo en mayo y junio de 1998 en toda la periferia de la laguna con el fin de ubicar el transecto de estudio. Se realizó una encuesta a los lugareños para corroborar la persistencia espacio-temporal de *Artemia* sp. en dicho transecto. Una vez ubicado el transecto de estudio, se procedió a realizar el levantamiento topográfico con un teodolito digital. Con los datos de la poligonal se procedió a la georeferenciación del transecto con ayuda de un navegador por satélite y un sistema de información geográfica elaborado por Espinoza-Tenorio (2001). Con esta cartografía se localizaron las estaciones de muestreo (Figura 4).

II.2.2. Diseño de muestreo

Se realizó un muestreo aleatorio simple dentro del transecto de muestreo mediante el establecimiento de cinco estaciones señaladas con postes de madera. El periodo de estudio comprendió de Junio de 1998 a Septiembre de 1999 con una periodicidad catorcenal.

II.2.2.1. Colecta de quistes en sedimento

En cada estación de muestreo, se colectaron los quistes existentes en el suelo delimitados por cuadrantes de madera de 0.5 x 0.5 m, los cuales fueron limpiados y depurados *in situ*. La depuración consistió en depositar los quistes en recipientes de 20 litros con salmuera saturada a 200 g L^{-1} para después colocarlos en tinas de plástico reforzado de 100 L con salmuera de la laguna previamente filtrada por tamices de $35 \mu\text{m}$;

los quistes por diferencia de densidad con la salmuera, los quistes flotaron junto con materia orgánica e inorgánica de similar y mayor tamaño, en tanto que residuos más pesados precipitaron; se capturó la biomasa e impurezas de la superficie del contenedor y se filtro por tamices de acero inoxidable de 1000, 500, 250, 150, 100 y 80 μm de apertura, adicionando salmuera filtrada a 35 μm , con la finalidad de eliminar la mayoría de la materia acompañante. Una vez realizada la operación anterior, la muestra se depositó en una bolsa de plástico herméticamente sellada con sal de la misma laguna (1:1) para su posterior análisis en laboratorio.

II.2.2.2. Colecta de quistes en la columna de agua

A la par con el muestreo en tierra, se realizó la colecta de quistes en la columna de agua mediante arrastres con una red de plancton cuadrada de 0.1 x 0.1 m con luz de malla de 20 μm . Las estaciones fueron ubicadas con la ayuda de los postes de madera colocadas para el muestreo en tierra. En cada estación se realizó un lance sub-superficial de 10 m de longitud con ayuda de un cayuco de fibra de vidrio, paralelo a la dirección del viento dominante. La colecta fue limpiada y depurada como en el inciso precedente. Una vez realizada la operación anterior, la muestra se depositó en una bolsa de plástico herméticamente sellada con sal de la misma laguna (1:1) para su posterior análisis en laboratorio.

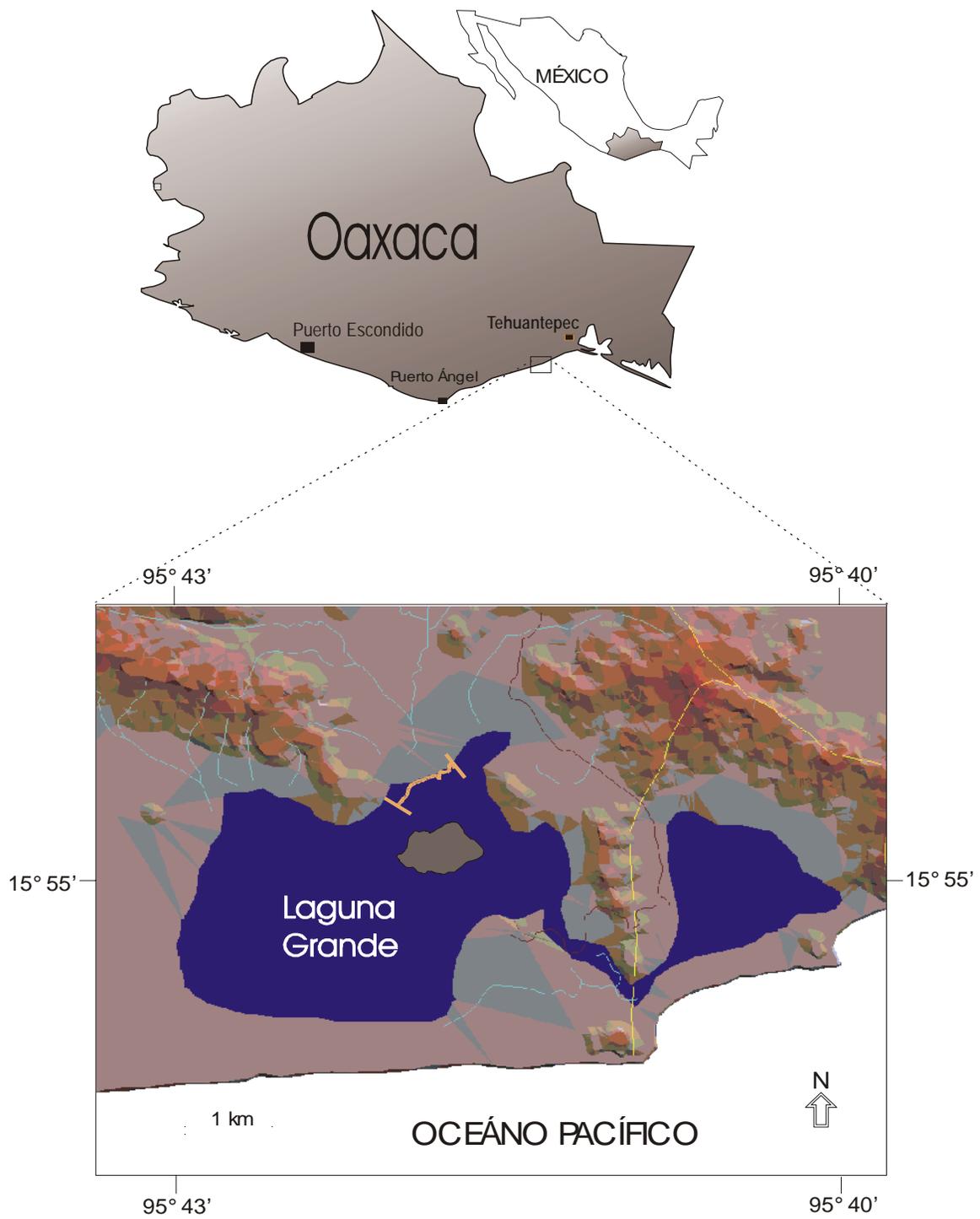


Figura 4. Ubicación del transecto de muestreo en Laguna Grande Santiago, Astata.

II.2.2.3. Registro de datos hidrológicos y meteorológicos

Se registró la temperatura del agua con la ayuda de un termómetro de cubeta; la salinidad con un refractómetro manual; el oxígeno disuelto en el agua con un oxímetro analógico; y el pH con un potenciómetro digital. Todos los instrumentos se calibraron previamente de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Se obtuvieron los registros diarios de temperaturas máximas y mínimas, precipitación pluvial, evaporación, horas de insolación y dirección e intensidad de los vientos de la estación climatológica de Salina del Marqués de la CNA de 1991 a 1999. Adicionalmente, se instaló un anemómetro digital (Weather Monitor II) para el registro diario de viento en el sitio de muestreo.

II.3. Trabajo en laboratorio

El trabajo en laboratorio consistió en evaluar los quistes de *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande colectada en campo y compararla, en donde fue pertinente, con quistes de *Artemia franciscana* de la Bahía de San Francisco marca San Francisco Bay Supreme 99 (Catálogo. No. 36892; Código de barras 0094536892).

II.3.1. Preparación general de muestras

Una vez en el laboratorio de alimento vivo de la UMAR, la biomasa semi-limpia fue vertida en tanques cilindro-cónicos de fibra de vidrio con 20 L de salmuera saturada a 200 g L⁻¹. Posteriormente se aplicó aireación por 15 min desde el fondo para deshacer grumos y separar en la medida de lo posible el material en adsorción con los quistes de *Artemia* sp. Transcurrido el periodo mencionado y dejado en reposo la columna de agua con los quistes

llenos, cáscaras vacías y materia de igual densidad, se retiraron manualmente los quistes llenos con un tamiz de 100 μm , a los cuales además se les exprimió y colocó en otro tanque con las características del anterior pero con agua dulce. A éste se le aplicó aireación con una soplador de 1 HP desde el fondo por 5 min; se dejó reposar la columna de agua por 5 min, y los quistes llenos se precipitaron por densidad, lo que permitió su recolección mediante la válvula en el fondo de la tina, mientras que cáscaras y materia de igual densidad permanecieron flotando. Finalmente, se aplicó a los quistes ya limpios un baño con peróxido de hidrógeno al 3% y 5% para su desinfección y desactivación de diapausa, alternando dicho tratamiento con baños de agua corriente por 5 min.

II.3.2. Conservación de muestra para análisis *a posteriori*

Se separaron 100 g de quistes del muestreo de Junio de 1999, considerado el periodo de máxima deposición. A dicha muestra se le aplicó el siguiente tratamiento de desactivación de diapausa: baño con H_2O_2 (5%) seguido por congelación ($-40\text{ }^\circ\text{C}$) y por 3 ciclos de hidratación por 15 min. y deshidratación por 12 h a $35\text{ }^\circ\text{C}$.

El secado de la muestra consistió en deshidratar quistes húmedos esparcidos en charolas de aluminio en un horno con flujo de aire laminar por espacio de 12 h a $35\text{ }^\circ\text{C}$, para después colocar la biomasa en un cernidor de 1 HP equipado con un juego de tamices de acero de 1000, 500, 250, 150, 100 y 80 μm (cada tamiz estuvo provisto de 20 balines de acero así como un paquete de sílica-gel de 5 x 5 cm) por espacio de 15 minutos. Posteriormente, la biomasa nuevamente se introdujo en el horno antes mencionado por 4 h.

El almacenamiento al vacío de la biomasa se realizó en bolsas de nylon poliamida de alta barrera calibre 300 Pouch barrera (BC200PAB-2N) de la marca Filmpack S.A. de C. V.

II.3.3. Calidad de quistes y nauplios de Artemia

II.3.3.1. Indicadores de la calidad de eclosión de quistes de Artemia

Se siguió el procedimiento de la hoja de trabajo 4.2.7. de Lavens y Sorgeloos, 1996. Este procedimiento consistió en incubar, por triplicado, 1.6 g de quistes en 800 mL de agua de mar a 33 g L^{-1} con iluminación continua (2000 Lux) en eclosionadores tipo Imhoff provistos con aireación fuerte. Después de 24 h de incubación, se tomaron 6 submuestras de 250 μL de cada eclosionador. Cada submuestra fue vertida en un vial, donde fue fijada con una solución de lugol. Con ayuda de un microscopio, se contabilizaron los nauplios (n_i) y embriones umbrelas (u_i); posteriormente se determinó el promedio de nauplios (N) y el de embriones umbrelas (U). Enseguida se descapsularon los quistes no eclosionados y se disolvieron los quistes vacíos mediante la adición de una gota de una solución de NaOH (40 g en 100 mL de agua destilada) y 5 gotas de Cloralex a cada vial; en éstos, se contaron los embriones no eclosionados de color naranja (e_i) y se calculó su valor medio (E). Con estos datos se procedió a calcular para cada submuestra :

$$\text{Porcentaje de eclosión } H\% = (N \times 100) (N + U + E)^{-1}$$

$$\text{Eficiencia de eclosión } HE = (N \times 4 \times 800) (1.6)^{-1}$$

Posteriormente se dejaron los eclosionadores por 24 h adicionales y se tomaron submuestras para volver a calcular el H% y HE para 48 h de incubación y así poder

determinar en porcentaje de eclosión (HR). Del procedimiento anterior, se tomaron muestras para calcular el HE después de 12 h de incubación. Se siguieron tomando submuestras hasta que el valor medio de HE permaneció constante por 3 horas consecutivas. Luego, la HE medio por cada 3 horas se expresó como porcentaje del HE máximo. Se determinó el T_{10} , T_{90} y T_s mediante una gráfica acumulativa.

II.3.3.2. Análisis proximal de quistes y nauplios de Artemia

El contenido de humedad, proteína y cenizas de los quistes de *Artemia* se determinaron de acuerdo a los métodos estándares establecidos por la AOAC (1990). La humedad se determinó por desecación en estufa. Se pesaron 2 g de muestra en una charola de aluminio previamente tarada, la cual se colocó en un horno a $100\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 6 horas, al término de este tiempo, se pesó nuevamente y se obtuvo el porcentaje de humedad mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Humedad} = ((W_{mh} - W_{ms}) / W_m) * 100$$

En donde: W_{mh} = Peso del recipiente con la muestra húmeda.

W_{ms} = Peso del recipiente con la muestra seca.

W_m = Peso de la muestra.

El contenido de proteína, grasa y cenizas de la muestra, se determinaron del residuo obtenido en el análisis de humedad.

Las cenizas se calcularon por calcinación en mufla eléctrica. Se pesaron 0.15 g de muestra seca en un crisol de porcelana a peso constante, carbonizando la muestra antes de

colocarla en una mufla a 550 °C por 2 h. Después de este tiempo se pesó nuevamente el crisol y se calculó el porcentaje de cenizas mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Cenizas} = ((W_{cc} - W_c) / W_m) * 100$$

En donde: W_{cc} = Peso del crisol con cenizas.

W_c = Peso del crisol vacío.

W_m = Peso de la muestra.

La proteína cruda se cuantificó con el método micro Kjeldahl. A 0.2 g de muestra seca y 1.5 g de mezcla digestora se le adicionaron 5 mL de H₂SO₄ concentrado. Calentando dicha mezcla hasta que el contenido tomó una coloración verde claro, continuándose el calentamiento durante media hora. Se disolvió la muestra con agua destilada y se transfirió al microdestilador, añadiéndose 8 mL de NaOH (1:1) durante la ebullición. El destilado se recibió en un matraz conteniendo 10 mL de ácido bórico al 4% y 10 gotas de indicador Wesslow, para finalmente titular con HCl 0.1N. El porcentaje de proteína se expresó como el % de nitrógeno multiplicado por el factor de conversión correspondiente (promedio del contenido de nitrógeno en la proteína). Para este trabajo se utilizó el valor de 6.25.

$$\% \text{ Proteínas} = (VN (0.014) / W_m) * 625$$

En donde: V = Volumen de HCl utilizado en la titulación.

N = Normalidad del HCl.

W_m = Peso de la muestra.

0.014 = Miliequivalente del nitrógeno.

El contenido de lípidos se determinó por el método de Bligh y Dyer (1959). A 0.2 g de muestra seca, se le realizaron dos extracciones con una mezcla cloroformo:metanol (2:1).

El contenido de lípidos se calculó a partir de la fórmula siguiente:

$$\% \text{ Grasa} = ((W_g - W) / (W_m)) * 100$$

En donde: W_g = Peso del tubo con grasa.

W = Peso del tubo.

W_m = Peso de la muestra.

Los carbohidratos (Extracto Libre de Nitrógeno) se determinaron cuantitativamente en términos de porcentaje, considerando que el total de materia de un alimento está dado por la humedad, cenizas, proteínas, y grasas. El contenido de carbohidratos se calculó con la fórmula siguiente:

$$\% \text{ Carbohidratos} = 100 - (\% \text{ Humedad} + \% \text{ Cenizas} + \% \text{ Proteínas} + \% \text{ Grasa}).$$

La energía disponible se calculó en base seca, usando los factores de conversión 18.0, 35.2 y 17.2 kJ g⁻¹ para las proteínas, lípidos y carbohidratos, respectivamente (Mourente y Rodríguez, 1997).

II.3.3.3. Carga bacteriana en nauplios de Artemia

Para determinar la carga bacteriana en los nauplios de Artemia, se descapsuló 1 g de quistes de *Artemia* siguiendo la técnica de Van Stappen (1996). Enseguida se homogeneizaron los quistes con 3 mL de solución salina estéril al 0.85% utilizando morteros previamente esterilizados. Se tomaron 100 µl de cada muestra y se sembraron por

triplicado en agar marino y agar TCBS (Tiosulfato, Citrato, Sales Biliares y Sacarosa), incubándose a 30 °C de 18 a 24 h.

Los eclosionadores, mangueras y tubos de vidrio utilizados en el ensayo, se desinfectaron por inmersión en una solución de NaOCl al 6 % durante 12 h, enjuagando con HNO₃ 0.1 M. Se adicionaron 500 mL de agua previamente desinfectada a los eclosionadores, se agregaron los quistes de acuerdo en la proporción de 1 g L⁻¹ a cada eclosionador. Los parámetros de la eclosión fueron: temperatura de 30 °C, pH de 8-8.5, iluminación de 2000 lux como mínimo, nivel de oxígeno arriba de 2 g·L⁻¹ (2-3 burbujas de aire por segundo) y tiempo de incubación de 48 horas (Van Stappen, 1996).

II.3.3.4. Análisis de ácidos grasos en quistes y nauplios de Artemia

La extracción de lípidos se realizó con la técnica de Bligh y Dyer (1959), posteriormente se aplicó la derivatización analítica de los lípidos (Knapp, 1979; Sato y Murata, 1988). Se empleó un cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas (GC-MS), Varian Start 3380CP, acondicionado con una columna capilar DB-23 de 30 m por 0.53 mm. Se utilizó Helio como eluyente. y el método de detección por ionización de flama. La temperatura del inyector fue de 170 °C; la del detector de 300 °C con un rango de 11. El horno se programó para elevar la temperatura a 150 °C a una razón de 0.5 °C por min., de 150 a 220 °C a 10 °C por min., de 220 a 290 °C a 4 °C por min con una duración total de corrida de 25 min. Los ácidos grasos presentes en las muestras se identificaron mediante la comparación de los espectros de masas con los espectros contenidos en la librería de espectro de masa NIST/NBS. Esta identificación se confirmó al comparar los tiempos de

retención de los picos con los tiempos de retención de un patrón comercial de metil-ésteres de ácidos grasos poli-insaturados (Supelco 37 FAME Mix). Para el cálculo de la concentración de los ácidos grasos presentes en la muestra, se realizó la integración del área bajo los picos, que en el sistema GC-MS es directamente proporcional a la masa.

II.4. Experimento de bioencapsulación

II.4.1. Técnica de bioencapsulación

Se siguió el protocolo de enriquecimiento sugerido en la hoja de trabajo 4.3.1. de Lavens y Sorgeloos, 1996. En términos generales, el procedimiento de bioencapsulación consistió en desinfectar el agua y eclosionar a los quistes. Posterior a la eclosión de quistes, se tomaron nauplios activos, previo enjuague con agua de mar filtrada y se sembraron por triplicado en un cono de vidrio con 0.25 L provisto de aireación a una densidad de 200 nauplios mL⁻¹. Se agregó 0.15 g de enriquecedor en T₀ y T₁₂. Se incubó a 28 °C por 24 h durante cuales se registró el contenido de oxígeno disuelto. Después del enriquecimiento, se procedió al análisis químico o de AGPI, según el caso y a la estimación de sobrevivencia de nauplios.

II.4.2. Diseño experimental para la comparación de enriquecedores

Este experimento consistió en la bioencapsulación, de acuerdo al punto anterior, de los nauplios de Artemia con tres tipos de enriquecedores, siendo el primer tratamiento el novedoso para el enriquecimiento de Artemia:

- a) OrbiCap: Microcápsulas hechas a base de tres gomas como encapsulantes y orbital de barrilete negro como dieta (Jacinto-Nolasco, 2002);

b) Algamac: Proteína mono-celular de *Schizochytrium* sp. secada por aspersión (Barclay y Zeller, 1996) y distribuida comercialmente por Aquafauna Bio-Marine Inc.;

c) Levadura de cerveza seca adquirida en comercio local.

Como testigo se tuvo a los nauplios de *Artemia* en inanición.

Para la elaboración del OrbiCap se colectaron cabezas frescas de barrilete negro (*Euthynnus lineatus*) capturados en el área de Puerto Ángel, Oaxaca. Se retiró manualmente el tejido adiposo circundante a la orbita del ojo, se empacó al vacío en bolsas de polietileno de alta densidad y se almacenó manteniéndose a $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso o análisis. El OrbiCap se micro-encapsulo mediante la técnica de secado por aspersión (*Spray-drying*) con goma de mezquite (17%), goma arábica (66%) y maltodextrina (17%) en relación 3:1 de encapsulante:dieta (Pedroza-Islas, 2000) con un secador marca Niro modelo Mobile Minor atomizer (Gea Niro Atomizer, Copenhagen, Dinamarca).

El tamaño de partícula del OrbiCap se obtuvo de las distribuciones volumétricas (volumen de partículas) y acumulativas de tamaño del OrbiCap registradas con un analizador de tamaños de partículas Malvern 2600 SBOD (Malvern Instruments, Malvern, Inglaterra). Dicho equipo proporcionó un estimado del valor medio del diámetro al 50% de la fracción acumulativa de volumen (FAV). El diámetro medio (d_{50}) y la desviación estándar aritmética ($\sigma_a=0.5 [d_{84}-d_{16}]$) se determinaron a partir de la curva de distribución acumulativa (Alexakis *et al.*, 1995; Sun *et al.*, 1995).

Para analizar la morfología micro-estructural del OrbiCap, este se cubrió con grafito por medio de un evaporador de metales JEOL. El OrbiCap cubierto se observó con un

microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-35CF). Las características por observar fueron: forma, poros, dimples, fracturas, y caps (Rosenberg *et al.*, 1988).

La determinación del lavado consistió en pesar la muestra de OrbiCap y colocarla en un tubo de ensaye previamente tarado, adicionando 25 mL de agua de mar e incubando sin agitación a 29 °C durante 20, 40, 75, 100, 130 y 240 min. Después de la incubación se filtró la muestra de alimento a través de un filtro Whatman GF/C, previamente secado y pesado. El material filtrado se llevó a peso constante a 70 °C. Se corrió un blanco de 25 ml de agua de mar. Esta prueba se realizó por duplicado. Para ajustar los datos experimentales de disolución, se empleó el modelo propuesto por Pedroza-Islas (2000):

$$D = D_s (1 - e^{-T/\tau_d})$$

Donde D es la concentración del soluto al tiempo T, D_s es la concentración de equilibrio del soluto a la temperatura experimental y τ_d es la constante de tiempo de disolución.

II.5. Análisis estadístico

Se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov (K-S) como bondad de ajuste a la distribución normal, y la prueba de Bartlett que evalúa la igualdad de varianza (Zar, 1984; Sokal y Rohlf, 1995). En el caso en donde no se cumplieron estas premisas del modelo general lineal aditivo, se empleó la transformación logarítmica o arcoseno (Steel y Torrie, 1960), según el caso.

Para la búsqueda de la relación entre la dinámica de deposición anual de quistes de *Artemia* sp. y los parámetros meteorológicos que inciden en la salina Laguna Grande, se

aplicó el análisis de regresión múltiple por pasos (“*stepwise*”) a un nivel de confiabilidad del 95%.

La significancia de las diferencias en los tratamientos se determinó usando un análisis de varianza (ANOVA). Se compararon todas las medias por pares siguiendo el método de Tukey. En la última prueba, el error de la comparación global se controló vía Bonferroni (Wilkinson, 1987; Day y Quinn, 1989). Para todos los casos, el nivel de significancia nominal fue del 5%.

III. RESULTADOS

III.1. Producción de quistes de *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande

La producción quincenal de quistes de *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande en la columna de agua no superó 0.03 g PS m^{-2} y tuvo un valor medio de $0.006 \text{ g PS m}^{-2}$ (Tabla I); en cambio, la producción quincenal de dichos quistes depositados en la ribera de la laguna (en tierra) varió de 0.007 a $912 \text{ g PS m}^{-2} \text{ d}^{-1}$, con valor medio de $155.01 \text{ g PS m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ (Tabla I).

Tabla I. Sumario de la deposición quincenal de quistes de *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande colectada de Junio de 1998 a Septiembre de 1999. E. E.: Error estándar. PS: Peso seco.

Parámetro	Agua (g PS m^{-2})	Tierra ($\text{g PS m}^{-2} \text{ d}^{-1}$)
Media (E. E.)	0.006 (0.0006)	155.01 (17.77)
Mínimo	0.0001	0.007
Máximo	0.0303	912
Rango	0.0301	911.99
Numero de muestras	140	140

La variación temporal de la producción de quistes de *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande en ambos biotopos mostró un comportamiento estacional. Se observó que la deposición de quistes en tierra tiene un máximo de Enero a Junio con un valor superior a

100 g PS m⁻² d⁻¹ mientras que en el resto del año, ésta no superó 10 g PS m⁻² d⁻¹ (Figura 5). Se evidenció un patrón en la densidad de quistes en la columna de agua donde se encontró un máximo de 1 g PS m⁻² de Enero a Junio; mientras que en el resto del año, dicha abundancia no fue excedida (Figura 6).

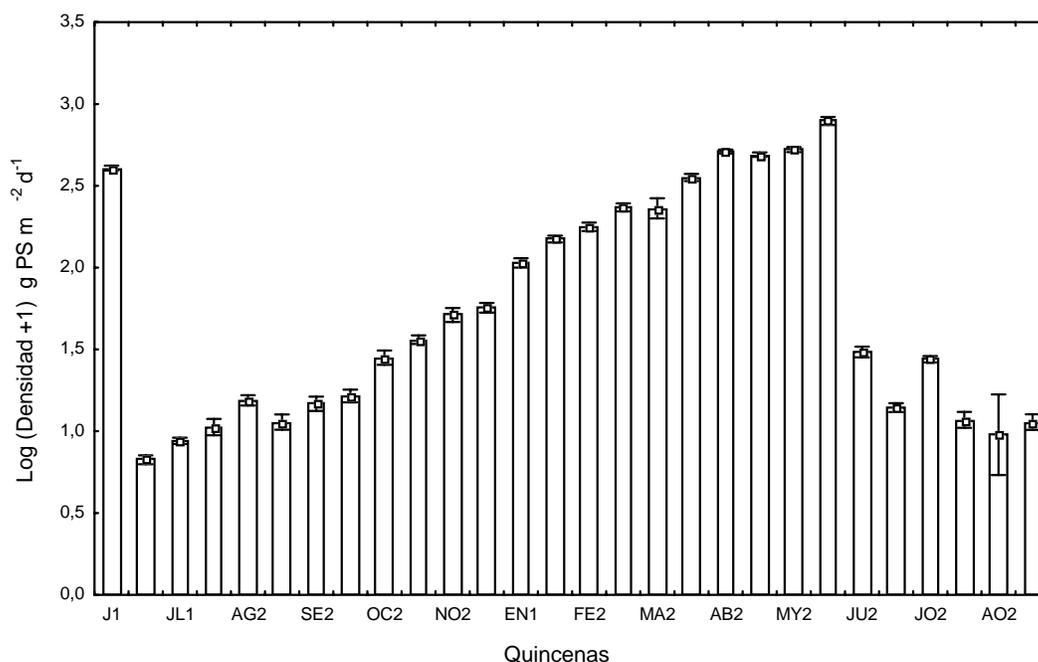


Figura 5. Deposición quincenal de quistes de *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande en tierra. El eje en X ilustra la escala quincenal de muestreo de 1998 a 1999. PS: Peso seco.

Al comparar la producción de quistes de *Artemia franciscana* en esta laguna, se notó que la densidad en tierra es mayor en dos órdenes de magnitud que en agua. Asimismo, la deposición de quistes en tierra es continua en el año con una producción de 10 g PS m⁻² d⁻¹ (Figura 5).

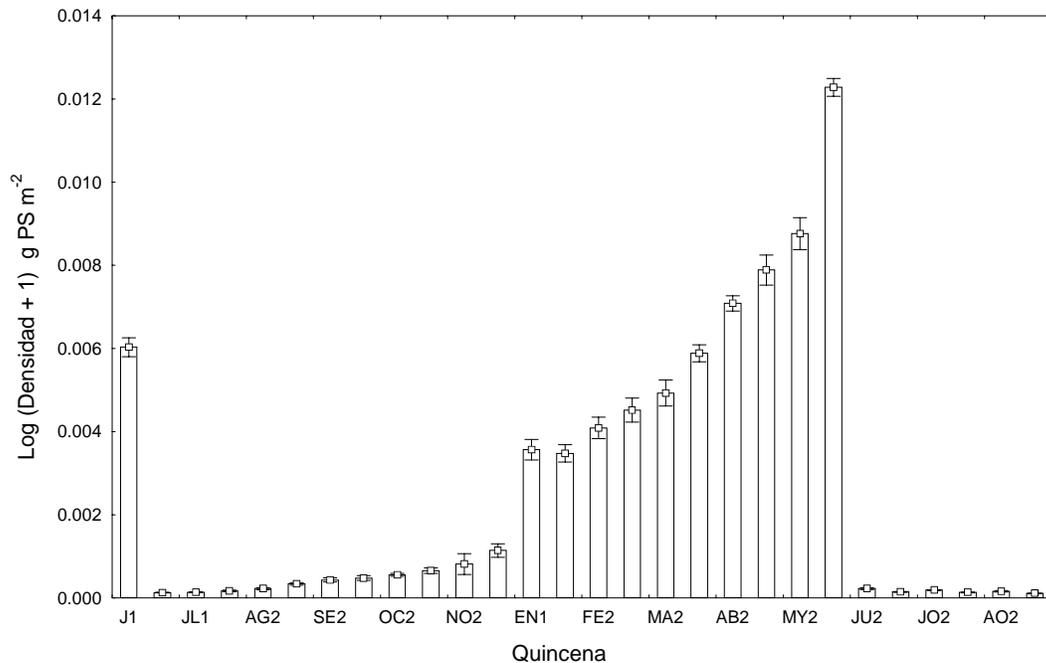


Figura 6. Deposición quincenal de quistes de *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande en la columna de agua. El eje en X ilustra la escala quincenal de muestreo de 1998 a 1999. PS: Peso seco.

La variación estacional mostró que la mayor abundancia de quistes de *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande ocurrió en la época de pre-lluvias, con una densidad promedio de 0.018 y 513.63 g PS m⁻², para los biotopos agua y tierra, respectivamente (Tabla II; Figura 7). Se encontró que la abundancia de quistes de *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande es estadísticamente diferente entre las épocas del año, siendo mayor en la época de pre-lluvias seguida de la época de Nortes, y finalmente en la temporada lluviosa (Tabla III).

Tabla II. Sumario de la deposición estacional media (E. E.) de quistes de *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande en agua y tierra; colectada de Junio de 1998 a Septiembre de 1999. E. E.: Error estándar. PS: Peso seco.

Estación climática	Agua (g PS m ⁻²)	Tierra (g PS m ⁻² d ⁻¹)
Pre-Lluvias	0.01857 (0.0006)	513.63 (15.14)
Lluvias	0.0005 (0.0004)	14.02 (10.29)
Nortes	0.0061 (0.0005)	119.56 (12.36)

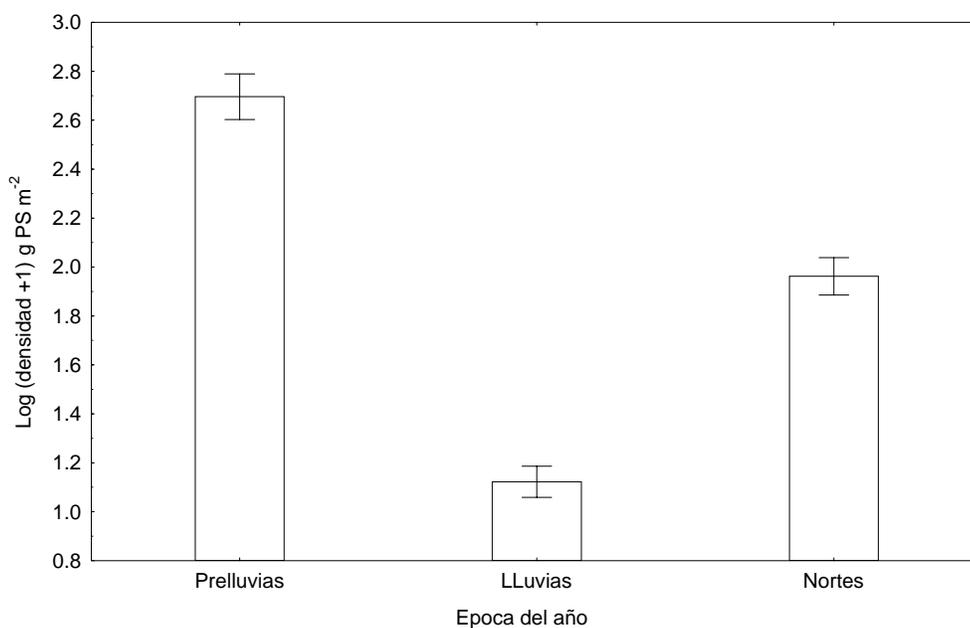


Figura 7. Variación estacional de la producción de quistes de *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande en el biotopo agua durante el periodo de estudio.

Tabla III. Cuadrados medios (CM) del análisis de varianza de una vía de la deposición en tierra de los quistes ($\text{g PS m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) de *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande y la estación climática. Se indica la probabilidad de la comparación *a posteriori*. La deposición en tierra se transformó mediante $\text{Log}(X+1)$. g. l.= grados de libertad. PS: Peso seco.

Fuente de variación (g. l.)	CM	F	P
Estación climática (2)	470.999	406.898	0.0001
<i>A posteriori:</i>			
Pre-Lluvias > Lluvias			0.0002
Pre-Lluvias > Nortes			0.0002
Nortes > Lluvias			0.0002
Error (137)	0.066		

III.2. Relación de la producción de quistes de *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande con factores ambientales

III.2.1. Variación temporal de factores hidrológicos

La salinidad subsuperficial del agua en la Laguna Grande (LG, de aquí en adelante) siguió la variación estacional del clima regional durante el periodo de estudio (Figura 8a). Se observó un valor máximo de 105 g L^{-1} en la primera época de pre-lluvias. Con la llegada de la temporada de lluvias, la salinidad de la LG disminuyó hasta 20 g L^{-1} , y de este valor se incrementó paulatinamente hasta 125 g L^{-1} en la época de Nortes. Después de este

máximo de salinidad, nuevamente se evidenció el efecto de las lluvias en este parámetro (Figura 8a).

El oxígeno disuelto en el agua subsuperficial de la LG varió de 5.6 mg L⁻¹ a 8.6 mg L⁻¹ durante el periodo de estudio. Se observó que los valores más bajos de oxígeno disuelto en el agua se presentaron en las épocas de máxima salinidad (Figura 8b).

El comportamiento de la temperatura subsuperficial del agua en la LG durante el periodo de estudio mostró tres grupos de datos distinguibles (Figura 8c): Junio 1998 a Octubre 1998 con una tendencia a la baja, de 37 a 33 °C; en tanto, de Diciembre 1998 a Abril 1999 existió un incremento gradual de 33 a 37 °C; y finalmente para cerrar el ciclo, se evidenció una reducción de este parámetro, de 35 a 32 °C.

El potencial de Hidrógeno (pH) del agua subsuperficial de la LG estuvo dentro del rango de 7.60 a 8.45 (Figura 8d). Se observó que los valores más bajos de pH correspondieron a las primeras lluvias ocurridas en Junio 1998 y Junio 1999.

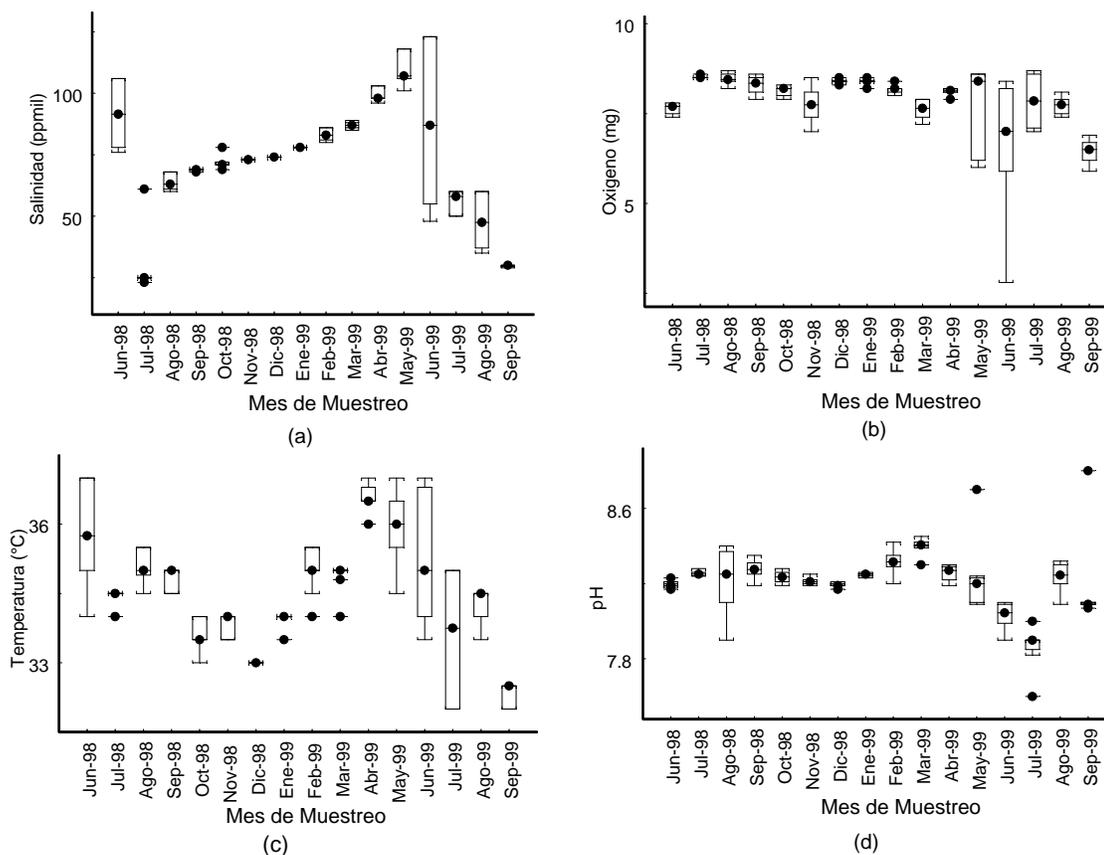


Figura 8. Variación temporal de los factores hidrológicos del agua subsuperficial de la Laguna Grande de Junio de 1998 a Septiembre de 1999.

III.2.2. Relación de factores hidrológicos con producción de quistes de *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande

Durante el periodo de estudio, no se encontró una correlación significativa entre la producción de quistes de *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande registrada en los biotopos agua y tierra con la temperatura, salinidad, oxígeno disuelto y potencial de Hidrógeno del agua superficial de dicha laguna (Tabla IV).

Tabla IV. Valores del coeficiente de correlación de Pearson entre la producción de quistes de *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande encontrada en agua y tierra con los factores ambientales del agua subsuperficial de dicha laguna.

Variable	En agua	En tierra
Temperatura	0.15	0.11
Salinidad	0.12	0.09
Oxígeno disuelto	-0.07	-0.07
Potencial de Hidrógeno	-0.11	-0.14

Valores con asterisco son estadísticamente diferentes a una $P < 0.05$

III.2.3. Relación de factores climatológicos con producción de quistes de *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande

El análisis de regresión múltiple por pasos (*stepwise*) señaló que la producción de quistes de *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande en tierra (DT) está relacionada con las siguientes variables climáticas: temperatura, precipitación y radiación. Asimismo, este análisis excluyó a la evaporación y el nivel de insolación ($P > 0.05$). Finalmente, se encontró el siguiente modelo predictivo:

$$DT = -14.063 + 13.874 (\text{Temperatura}) - 0.278 (\text{Precipitación}) - 2.219 (\text{Radiación})$$

Dada esta ecuación, se tiene que la temperatura, precipitación y radiación permiten describir el 95% de la variación de DT (Tabla V).

La producción de quistes de *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande en agua (DA) está asociada negativamente con la precipitación (Tabla VI). El modelo predictivo de dicha relación esta dada por la siguiente ecuación:

$$DA = -0.129 - 1.009 (\text{Precipitación}).$$

En donde la variable precipitación tiene la habilidad de describir el 83% de la variabilidad de DA (Tabla VI).

Tabla V. Análisis de regresión lineal múltiple por pasos entre la deposición mensual de quistes de *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande (DT; g PS m⁻² d⁻¹) en tierra de la salina Laguna Grande y los parámetros meteorológicos, durante el periodo de muestreo (Junio de 1998 a Septiembre de 1999). Las variables se logaritizaron antes del análisis estadístico. PS: Peso seco.

	b	Error estándar	t (8)	P
Intercepto	- 14.063	4.019	-3.499	0.008
Temperatura	13.847	2.820	4.910	0.001
Precipitación	- 0.278	0.062	-4.463	0.002
Radiación	-2.129	0.258	- 8.259	0.000

Tabla VI. Análisis de Regresión Lineal Simple entre la deposición mensual de quistes de *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande en agua (DA; g PS m⁻²) y la precipitación pluvial, durante el periodo de muestreo (Junio de 1998 a Septiembre de 1999). Las variables se logaritizaron antes del análisis estadístico. PS: Peso seco.

	b	Error Estándar	t (11)	P
Intercepto	- 0.13	0.29	-0.44	0.67
Precipitación	1.009	0.133	7.55	0.000

III.3. Calidad de nauplios de *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande

El porcentaje de eclosión (H%) de quistes de *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande incubado a 24 h fue menor comparado con los quistes de SFB; en tanto que a 48 h de incubación, el H% de ambos ecotipos fueron similares (Tabla VII).

La eficiencia media de eclosión (HE) de quistes de *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande incubado a 24 h fue menor a los quistes de SFB, 79 155 vs. 145 222 nauplios g^{-1} , respectivamente: sin embargo, este criterio de calidad de eclosión mostró que *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande fue similar a los quistes de SFB a un tiempo de incubación mayor, esto es, 48 h (Tabla VII).

La tasa de eclosión se refiere al tiempo necesario para la eclosión total a partir de la hidratación de los quistes hasta la aparición del nauplio. Para *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande, el 10% de eclosión (T_{10}) se alcanzó a 15 horas, y el 90% de eclosión (T_{90}) se alcanzó a 22 h. Con esta información se calculó el lapso de tiempo al cual eclosiona la mayoría de nauplios; lo que se conoce como sincronía de eclosión (T_s). El T_s de *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande fue de 7 h.

El peso seco medio naupliar de *Artemia franciscana* incubado a 24 h fue superior en el ecotipo de Laguna Grande (1.9 μg) comparado con el ecotipo SFB (1.63 μg). Se observó que después de 48 h de incubación, el peso seco medio naupliar del ecotipo Laguna Grande se incrementó a 6.06 μg (Tabla VII).

El rendimiento medio de eclosión de quistes de *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande resultó inferior (150.39 mg nauplio g^{-1} quiste) con respecto al ecotipo SFB (236.71 mg nauplio g^{-1} quiste), incubados a 24 h. En ese orden, se obtuvo que a una incubación de

48 h, el ecotipo Laguna Grande incrementó su rendimiento a 1244.83 mg nauplio g⁻¹ quiste (Tabla VII)

El número medio de quistes por gramo de *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande fue de 254 397.5.

Tabla VII. Sumario de la calidad de eclosión de quistes de *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande; después de aplicar técnicas estándares de calidad. Se empleó a la cepa SFB como testigo.

Fuente de quiste	24 h	48 h
Porcentaje de eclosión, H%		
Ecotipo Laguna Grande	33.71 (0.96)	83.84 (0.98)
SFB	42.63 (1.04)	84.04 (1.14)
Eficiencia de eclosión, HE (nauplios g ⁻¹)		
Ecotipo Laguna Grande	79 155.62 (3837.4)	205 418.51 (3837.37)
SFB	145 222.22 (5306.5)	217 955.6 (5306.5)
Peso seco naupliar (μg)		
Ecotipo Laguna Grande	1.90 (0.21)	6.06 (0.29)
SFB	1.63	N. D.
Rendimiento de eclosión (mg nauplios g ⁻¹ quiste)		
Ecotipo Laguna Grande	150.39	1244.83
SFB	236.71	N. D.

N. D. No determinado

El valor nutricional de los quistes y nauplios de *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande no fueron comparables entre ellos, salvo en la fracción proteínica, que se mantuvo en el rango de 31.63 a 43.74% (Tabla VIII). El contenido de lípidos se redujo 6 veces conforme el desarrollo naupliar, de 36.29 a 6.42% (Tabla VIII); sin embargo, se notó que el contenido energético global se mantuvo en el rango de 15 a 20 KJ g⁻¹ en las tres fases de vida analizadas. En general, se observó una reducción en el contenido bioquímico de quistes a nauplios de *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande a 48 h (Tabla VIII).

Tabla VIII. Composición proximal media (Error estándar: E.E, N=4, % en base seca) y contenido energético total (KJ g⁻¹) de los quistes y nauplios de *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande; después de aplicar técnicas estándares de eclosión. Carbohidratos (CHO).

	Quistes	Nauplios a 24 h	Nauplios a 48 h
Proteínas	43.74 (1.17) ^b	42.28 (0.68) ^b	31.63 (0.635) ^a
CHO	6.52 (2.20) ^a	22.53 (2.11) ^b	47.84 (2.69) ^c
Lípidos	36.29 (2.85) ^c	12.41 (0.77) ^b	6.42 (0.42) ^a
Cenizas	13.45 (2.85) ^a	22.78 (0.77) ^b	14.11 (0.42) ^a
Energía total	21.79 (0.47) ^b	15.92 (0.62) ^a	16.33 (0.34) ^a

Las medias en la misma fila con diferente superíndice son significativamente diferentes a $P < 0.05$

La composición media de los ácidos grasos (AG) hallados en los quistes y nauplios de *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande se presentan en la Tabla IX. Es evidente que la proporción de los AG saturados y mono-insaturados siguen el patrón de los lípidos

totales (Tabla VIII y IX), sucediendo lo contrario para los AG poli-insaturados, en especial, los ácidos grasos altamente insaturados (>20:3). La especie de ácidos grasos dominante es el ácido oleico (18:1, OA). El ácido docosahexaenoico (22:6, DHA) no estuvo presente en ninguna de las fases de vida analizadas. Es importante mencionar que el ácido eicosapentaenoico (20:5, EPA) aumentó conforme el animal se desarrolló.

Tabla IX. Composición media (E. E.) de ácidos grasos mayoritarios (% de ácidos grasos totales) de *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande en sus primeras fases de vida.

	Quistes	24 h	48 h
Saturados			
14:00	2.35 (0.37)	1.29 (0.37)	0.99 (0.21)
15:00	0.61 (0.07)	0.41 (0.07)	0.31 (0.47)
16:00	20.40 (1.47)	13.74 (1.46)	8.03 (0.84)
18:00	11.05 (1.74)	8.47 (1.74)	8.92 (1.00)
Mono-insaturados			
16:01	9.79 (1.16)	11.36 (1.16)	4.83 (0.67)
18:01	20.14 (2.67)	21.35 (2.67)	17.84 (1.54)
Poli-insaturados			
18:02	11.19 (2.61)	14.73 (2.61)	14.79 (1.51)
18:03	8.09 (1.04)	8.06 (1.04)	6.74 (0.59)
20:03	1.15 (1.89)	0.62 (1.89)	3.52 (1.59)
20:04	5.05 (1.75)	11.42 (1.75)	10.61 (1.01)
20:05	2.27 (0.96)	3.68 (0.96)	5.78 (0.56)
22:02	0	0.99	9.41 (3.78)
22:06	0	0.21	0
24:02	1.01 (1.72)	1.95 (2.43)	3.77 (1.09)
Σ Saturados	37.06 (3.35)	25.56 (3.24)	20.27 (1.94)
Σ Mono-insaturados	32.10 (3.34)	33.63 (4.37)	24.30 (1.93)
Σ Poli-insaturados	30.83 (5.78)	40.81 (5.78)	55.42 (3.33)
DHA/EPA	0.08 (0.04)	0.06	0.02 (0.02)

La carga de bacterias heterótrofas y bacterias del género *Vibrio* en nauplios recién eclosionados de *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande fue de 125 ± 95 y 10^4 UFC mL^{-1} , respectivamente. Se encontró que la carga de bacterias heterótrofas totales aumentó en un orden de magnitud después de incubar por 24 h adicionales (Tabla IX). En el caso de las bacterias que crecieron en el medio selectivo TCBS sucedió el mismo patrón, aumentando la carga de 125 a 1045 UFC mL^{-1} (Tabla X).

Tabla X. Carga media (E. E.) de bacterias heterótrofas (UFC mL^{-1}) encontradas en los nauplios de *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande; después del tratamiento empleado en este estudio.

Tratamiento	Agar TCBS		Agar Marino.	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Carga de bacterias (UFC mL^{-1})	125 (95)	1045 (15)	10^4	10^5

III.4. Bioencapsulación de nauplios de *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande con distintos enriquecedores

III.4.1. Caracterización físico-química de enriquecedores

La caracterización físico-química de los enriquecedores empleados en el estudio se presenta en la Tabla XI. Las partículas denominadas OrbiCap y Algamac resultaron semejantes en la morfología externa debido al proceso de secado (Figura 9). Se pueden describir como partículas esféricas, con indentaciones notables la primera y libres de fracturas. El Algamac presentó tamaño de partícula inferior al OrbiCap aunque el rango puede considerarse muy semejante (Tabla XI). Es muy evidente que la fracción lipídica y proteínica del OrbiCap es casi tres veces menor que la del Algamac (Tabla XI).

La composición de los AG del OrbiCap y Algamac mostró que la especie de ácido graso más abundante fue el DHA seguida del 16:0 (Tabla XII). La razón DHA/EPA del Algamac fue mayor que la del OrbiCap (Tabla XII).

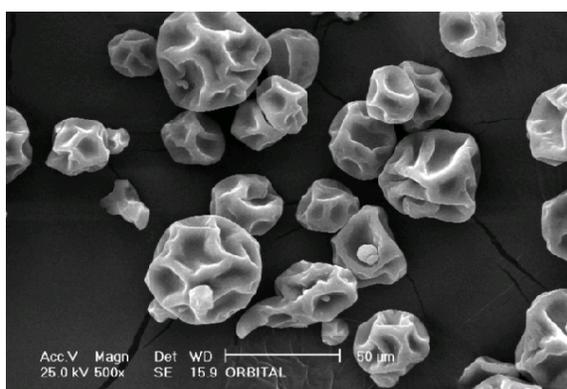
Tabla XI. Características físico-químicas de los enriquecedores empleados en este estudio.
Composición proximal en % de base seca.

Variable	OrbiCap [*]	Algamac ⁺	Levadura ⁺⁺
Tamaño medio (μm)	29.93	7	200
Rango (μm)	5-50	3-18	50-300
Forma	Esférica	Esférica	Irregular
Lavado (min)	45.73	360	N. D.
Proteínas	4.21	39	45
Carbohidratos	84.66	13	34.3
Lípidos	9.49	32	1.2
Cenizas	1.6	12	7.0

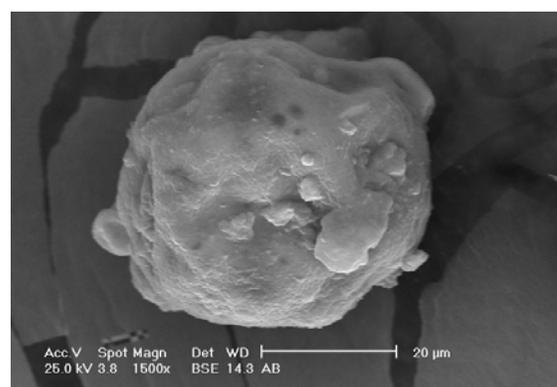
* Jacinto-Nolasco, 2002

+Barclay y Zeller, 1996

++ Datos de etiqueta.



A



B

Figura 9. Microfotografía de las micropartículas empleadas como enriquecedores de *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande. A) OrbiCap; B) Algamac.

Tabla XII. Composición de ácidos grasos mayoritarios (% de ácidos grasos totales) de las micropartículas usadas como enriquecedores en este estudio.

Especie	Algamac ^a	Orbicap ^b
14:0	11.0	4.46
16:0	38.5	18.16
16:1	7.3	4.64
18:0	1.1	6.68
18:1	4.1	12.35
20:3 (n-6)	0.4	1.57
20:5 (n-3) (EPA)	0.6	3.33
22:5 (n-6) (DPA)	12.9	ND
22:6 (n-3) (DHA)	24.0	28.70
DHA/EPA	40	8.67

a: Barclay y Zeller, 1996

b: Presente estudio

III.4.2. Enriquecimiento de *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande

El contenido medio de lípidos totales de *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande después del enriquecimiento indicó que no se encontraron diferencias significativas entre los nauplios alimentados con OrbiCap, Algamac y Levadura de cerveza (Figura X). Es notorio el incremento de la grasa corporal en *Artemia* debido al enriquecimiento con dichas partículas comparado al tratamiento con nauplios en inanición. Los nauplios de *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande redujeron su contenido de lípidos después de 24 h de incubación debido a la inanición a la que fueron sometidos, esto es, de 28% al inicio a 17% al final del experimento (Figura 10).

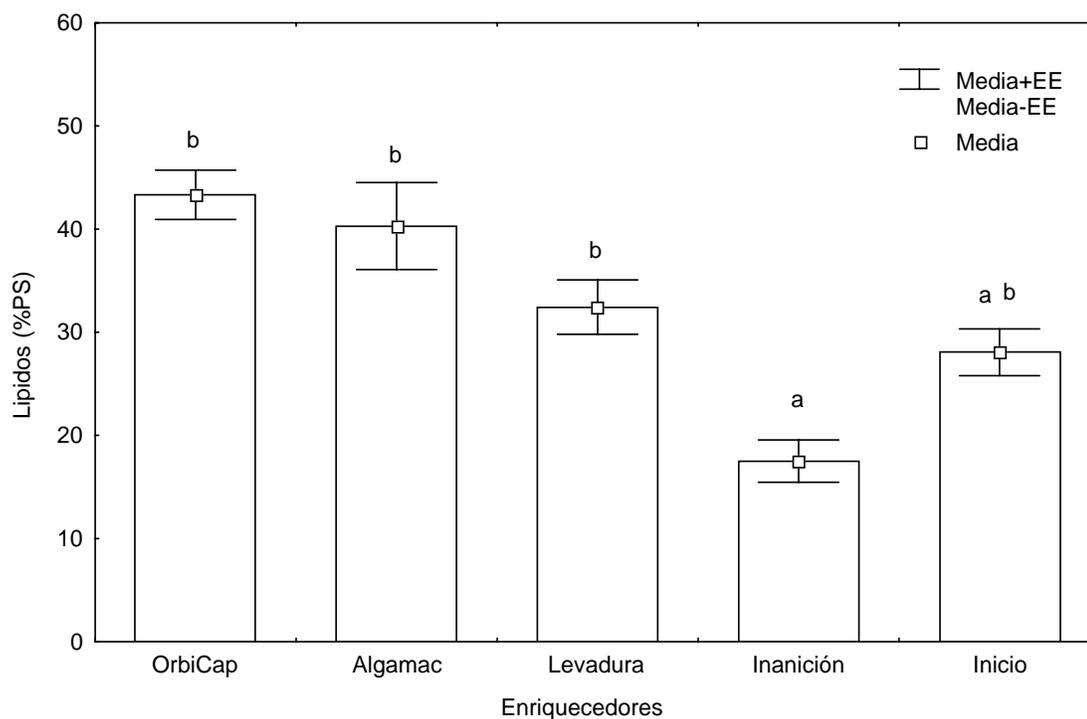


Figura 10. Contenido medio de lípidos totales (% en base seca) de *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande enriquecida con diferentes micropartículas durante 48 de incubación.

La eficiencia de bioencapsulación de AG en *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande se presenta en la Tabla XIII. Se observó que las especies de AG dominantes fueron 16:0, 18:1, 20:4 y 22:6 para los nauplios alimentados con OrbiCap y Algamac; mientras que para los mantenidos con Levadura de cerveza predominaron el 16:0, 18:0, 18:1, 18:2 y 18:3. Para los nauplios incubados en el régimen de inanición fue evidente la abundancia de 16:0, 18:0, 18:2 y 20:4 (Tabla XIII). Los AG esenciales y de importancia en la larvicultura marina como el 20:4 y 20:5 mantuvieron una abundancia constante en los nauplios alimentados con Algamac, Levadura de cerveza e inanición. Solo la concentración de 20:5 se mantuvo constante en todos los tratamientos ($P>0.05$). El ácido docosahexaenoico (22:6)

resultó abundante en los nauplios crecidos con OrbiCap y Algamac, lo que redundó en razones DHA/EPA de 2.7 para ambos ($P>0.05$), lo que indica un buen nivel de bioencapsulación de éstos AG (Tabla XIII). Para el resto de los tratamientos, la razón DHA/EPA es nula, lo que resulta acorde a la naturaleza de dichos regímenes de alimentación (Tabla XIII).

Tabla XIII. Composición media (E. E.) de ácidos grasos mayoritarios (% de ácidos grasos totales) de *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande mantenida con diferentes enriquecedores después de 48 h de incubación.

	Orbicap	Algamac	Levadura	Inanición
Saturados				
14:00	1.00 (0.01) ^a	2.70 (.03) ^b	0.60 (0.1) ^a	1.00 (0.2) ^a
15:00	0.35 (0.04)	0.22 (0.04)	0.23 (0.04)	0.31 (0.04)
16:00	10.50 (0.8) ^{ab}	13.37 (0.8) ^b	9.37 (0.68) ^a	8.03 (0.73) ^a
18:00	6.39 (0.69) ^{ab}	5.56 (0.69) ^a	9.30 (0.58) ^c	8.92 (0.63) ^{bc}
Mono-insaturados				
16:01	7.10 (0.55) ^b	6.71 (0.55) ^{ab}	6.65 (0.46) ^{ab}	4.83 (0.50) ^a
18:01	19.02 (1.30) ^b	10.01 (1.30) ^a	17.71 (1.10) ^b	17.84 (1.19) ^b
Poli-insaturados				
18:02	8.55 (1.42) ^a	8.86 (2.0) ^{ab}	15.72 (1.27) ^b	14.80 (1.16) ^b
18:03	11.43 (3.85)	13.39 (3.85)	16.09 (3.26)	6.74 (3.52)
20:03	1.30 (0.91)	3.13 (0.91)	2.18 (0.77)	3.52 (0.84)
20:04	14.07 (0.83) ^b	10.81 (0.83) ^{ab}	11.37 (0.70) ^{ab}	10.60 (0.76) ^{ab}
20:05	5.51 (0.40)	5.15 (0.40)	5.50 (0.34)	5.58 (0.37)
22:02	ND	7.05 (3.49)	3.72 (2.47)	9.41 (2.47)
22:06	15.48 (0.54)	13.83 (0.48)	ND	ND
24:02	1.89 (1.15)	5.20 (1.15)	3.15 (0.97)	3.77(3,15)
Σ Saturados	19.33 (1.48) ^b	23.04 (1.48) ^a	21.67 (1.25) ^b	20.27 (1.35) ^b
Σ Mono-insaturados	26.59 (1.52)	18.04 (1.52)	25.51 (1.28)	24.30 (1.38)
Σ Poli-insaturados	54.06 (2.85)	58.90 (2.85)	52.80 (2.41)	55.41 (2.60)
DHA/EPA	2.76 (0.13) ^a	2.70 (0.11) ^a	0.00 (0.10) ^b	0.01 (0.10) ^b

Valores en la misma fila con diferentes superíndices denotan diferencias significativas ($P<0.05$)

IV. DISCUSIÓN

IV.1. Producción de quistes de *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande

La producción de quistes de *Artemia franciscana* es, sin duda, un reflejo de las condiciones ambientales que imprimen su efecto en la hidrología de este cuerpo lagunar. Aunado al ciclo de vida y a la imposición de fronteras donde los movimientos de la masa de agua están plenamente restringidos, la acumulación de quistes de este branquiopodo debe obedecer a patrones espacio-temporales recurrentes y discretos. Dado el escenario anterior, el muestreo de la producción de quistes evidenció el acople de dichos factores mediante la acumulación de esta fase de vida en la ribera de la laguna, donde el *fetch* del viento provocó el apilamiento de los quistes de *Artemia*. De esta manera, fue muy escasa la abundancia de quistes de *Artemia* en la columna de agua durante todo el año (Tabla I). Porras-Díaz *et al.*, 1997 han documentado el mismo patrón en la producción de éstos para la Laguna La Colorada. Tal producción estacional en ambos biotopos tratados es mayor en la época de pre-lluvias, lo que concuerda con las mayores salinidades, baja abundancia y diversidad de alimento dentro del sistema (Newmark, 1992; Amat *et al.*, 1992; Baitchorov y Nagorskaja, 1999; Vinatea-Arana, 1999). Ante este ambiente hostil, los reproductores de *Artemia* responden con producir descendencia con estructuras de resistencia para la siguiente generación. Esta es la adaptación típica de *Artemia*, la cual se manifestó en la Laguna Grande mediante la generación de quistes en la época de pre-lluvias.

IV.2. Relación de la producción de quistes de *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande con factores ambientales

Los sistemas atalashalinos se caracterizan por ser cuencas de evaporación sin conexión con el mar. Este rasgo permite que la única variable que determina la diversidad de vida es la salinidad, la cuál, adicionalmente se considera un parámetro conservativo y, como tal, puede ser descrito con cierta facilidad (Lenz y Browne, 1991; Lavens y Sorgeloos, 1996).

Artemia en la mayoría de los hábitats de Norte-América está caracterizada por la interrupción de la época de crecimiento debido a la aparición del régimen hipersalino (Lavens y Sorgeloos, 2000). La Laguna Grande no es la excepción a este patrón. La salinidad determinó los ciclos de abundancia y reproducción de este micro-crustáceo (Figura 5 y 8), aunque estadísticamente no existió una correlación significativa (Tabla IV); sin embargo, los máximos y mínimos de salinidad parecen provocar lo propio con la producción de quistes de *Artemia* en tierra. La respuesta temporal de la producción de quistes de *Artemia* está muy relacionada al patrón climático local (Tabla III), lo que concuerda con Lenz y Browne (1991) y Tackaert y Sorgeloos (1991). Aun a pesar de dichas características, Laguna Grande recibe los acarrees continentales por la época de lluvias que permite la eclosión de los quistes producidos en la época de pre-lluvias (CNA, 1999). Respecto al pH, oxígeno disuelto y temperatura, por ser parámetros no conservativos, estos no poseen una marcada influencia en la producción de quistes de *Artemia* en tierra o en agua (Tabla IV); sin embargo, la frecuencia de muestreo puede ser el factor que impidió asociar dichas variables, esto es, la escala de los cambios de estas variables son menores a las empleadas en este estudio.

En relación a los factores climatológicos, la información aquí generada se considera novedosa ya que la mayoría de los autores que han estudiado sobre la dinámica de deposición solo la han relacionado con variables hidrológicas separando el efecto que variables meteorológicas también pudiesen tener sobre el proceso de deposición de quistes de *Artemia*. En este estudio fue posible detectar el efecto de las variables meteorológicas mediante el análisis de regresión múltiple por pasos en donde variables como la temperatura, precipitación, y radiación resultaron en modelos adecuados de predicción (Tabla V). En ese orden, es obvio que la temperatura, precipitación, y radiación produjeran dicha respuesta en la producción de quistes de *Artemia* pues son los factores que determinan la salinidad del agua en los sistemas atalosalinos, una variable conservativa que por si sola esta relacionada a la oviparidad o viviparidad de esta especie (Sorgeloos y Lavens, 1996).

IV.3. Calidad de nauplios de *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande

La calidad de los quistes de *Artemia* se determina a partir de procesos que tienen como origen una reacción bioquímica entre la pared del quiste y el ambiente, esto es, la desactivación de la diapausa (Drinkwater y Clegg, 1991). Se han desarrollado indicadores que tienen relación con el grado de síntesis de glicerol necesario para la eclosión del quiste, a partir del cuál se determinan estimadores de dicho proceso. Entre esta categoría se encuentra el porcentaje de eclosión (H%), eficiencia de eclosión (HE), tasa de eclosión, sincronía de eclosión (T_s) y rendimiento de eclosión (Lavens y Sorgeloos, 1996). Existen otros tipos de indicadores de calidad que se relacionan con el uso de los nauplios de *Artemia* como alimento en acuicultura propiamente, entre estos destaca el peso y tamaño

naupliar (Sorgeloos *et al.*, 1993; Sorgeloos *et al.*, 2001). Recientemente, la composición bioquímica ha recibido gran atención debido a la aparente variabilidad de los quistes de *Artemia* y representan una valiosa herramienta para la determinación de la calidad de quistes (Lavens y Sorgeloos, 1996).

Este estudio intenta conceptualizar la calidad del quiste de *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande como pilar para una futura explotación. En ese orden, mediante la revisión de la Tabla VII, se puede notar que, después de 24 h de incubación, la *Artemia* nativa de la Laguna Grande es de inferior calidad con respecto a la cepa SFB. En cambio, a 48 h de incubación, esa diferencia es casi imperceptible. En este sentido, no se encontró ningún antecedente que corroborara dicha información. Diversos autores atribuyen dicha variabilidad a las condiciones propias del ecotipo, el cual sirve como rasgo distintivo de calidad. A esta variabilidad se le agrega el hecho de la falta de una técnica de eclosión *ad hoc* al ecotipo. Es bien conocido que la técnica estándar de eclosión aumenta el grado de variación cuando el fin último es la comparación entre cepas. Dadas las condiciones de esta disertación, se presume que la baja calidad de los quistes de *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande pudo deberse al tratamiento del quiste, a las condiciones ambientales y a la falta de una adecuada técnica de eclosión.

El valor nutricional de los quistes y nauplios de *Artemia* sigue un patrón ontogénico que se manifiesta por igual entre cepas (Tabla XIV). Está documentado que las proteínas y lípidos disminuyen conforme se realiza el desarrollo naupliar (Leger *et al.*, 1987; Coutteau y Mourente, 1997). Los lípidos han recibido gran atención dado el papel que desempeñan en el desarrollo temprano de las larvas de muchas especies de importancia para la acuicultura (Sorgeloos *et al.*, 1993; Sorgeloos *et al.*, 1998; Sorgeloos *et al.*, 2001; Jacinto-

Nolasco, 2002). La composición proximal de los quistes y nauplios de *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande puede considerarse satisfactoria en comparación a otras cepas de *Artemia* de la misma especie (Tabla XIV). Siguiendo este orden, la composición de AG resultó acorde al patrón descrito por diversos autores (Lavens y Sorgeloos, 1996; Coutteau y Mourente, 1997). El hecho de hallar un incremento del ácido eicosapentaenoico (20:5) conforme avanzó el desarrollo naupliar de esta cepa puede atribuirse a la elongación de los ácidos palmítico, oleico, linolénico y linoleico (Teshima *et al.*, 1992; Han *et al.*, 2000).

Con respecto a la carga bacteriana de los nauplios de *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande puede considerarse dentro del rango aceptable para las operaciones comerciales de larvicultivos; de hecho, resultaron inferiores a lo reportado para otras cepas (Lavens y Sorgeloos, 1996).

IV.4. Bioencapsulación de nauplios de *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande con distintos enriquecedores

Existe una vasta información sobre el enriquecimiento de *Artemia* con diversos productos (Sorgeloos *et al.*, 1993; Sorgeloos *et al.*, 1998; Han *et al.*, 2000; Gelabert, 2001). Se ha dado especial énfasis a la bioencapsulación de compuestos lipídicos debido a la importancia que tienen en la nutrición de larvas de peces, crustáceos y moluscos (McEvoy *et al.*, 1998). Este hecho ha generado el desarrollo de productos que aumenten el contenido de ácido eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA) en los nauplios de *Artemia* (Leger *et al.*, 1986; McEvoy *et al.*, 1996; Sorgeloos *et al.*, 2001). Las características que dichos productos deben satisfacer son: el tipo de dieta, condición de enriquecimiento y calidad de la cepa de *Artemia* (Han *et al.*, 2000). Actualmente diversos autores

recomiendan el uso de dietas microparticuladas como vehículo para el enriquecimiento de *Artemia* debido a su facilidad de uso y control de oxidación (Walford y Lam, 1987; Ozkizilcik y Chu, 1994; Barclay y Zeller, 1996).

En esta disertación, se aplicó la bioencapsulación de un compuesto lipídico microencapsulado (OrbiCap) obtenido de la pesquería artesanal de barrilete negro de Puerto Ángel, Oaxaca (Jacinto-Nolasco, 2002), como una estrategia para mejorar la calidad de los nauplios de *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande. Bajo esa premisa, se realizó la evaluación comparativa del OrbiCap, Algamac y Levadura de cerveza como enriquecedores. Los resultados indicaron la superioridad del OrbiCap en el enriquecimiento de EPA y DHA en los nauplios de *Artemia* comparado al Algamac (Tabla XII). Esta riqueza de AG se debe al origen de dichos compuestos (McEvoy *et al.*, 1996). El OrbiCap representa el almacén de EPA y DHA de las tramas tróficas marinas (Ackman y Howie, 1997), donde el barrilete se considera el nivel superior.

Dadas las condiciones del enriquecimiento y de la calidad de los enriquecedores empleados en este estudio, los resultados obtenidos con OrbiCap y Algamac sugieren que enriquecen a los nauplios de *Artemia* de manera semejante. La razón DHA/EPA confirma esta premisa ya que no se encontró diferencia estadística entre ellos (Tabla XIII), aun cuando existen estudios que establecen que los nauplios de *Artemia* catabolizan DHA según la cepa, el cual es menos eficiente comparado con el ARA (20:4) y EPA (Coutteau y Mourente, 1997; Sorgeloos *et al.*, 2001; Han *et al.*, 2001), y que los lípidos de origen marino (aceites purificados) no son fáciles de asimilar (McEvoy *et al.*, 1996). La razón DHA/EPA y cantidad de DHA de los nauplios enriquecidos con OrbiCap son suficientes para cumplir los requerimientos de las larvas de peces (McEvoy *et al.*, 1996)

Los resultados aquí presentados permiten establecer que *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande es de buena calidad nutricional y que el grado de catabolismo del DHA permite un adecuado enriquecimiento con OrbiCap semejante al Algamac, un producto comercial plenamente probado en la larvicultura marina (Barclay y Zeller, 1996).

V. CONCLUSIONES

Las conclusiones del presente estudio, en relación a *Artemia franciscana* ecotipo Laguna Grande, son:

1.- La producción media de quistes fue de $155 \text{ g PS m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ y $0.006 \text{ g PS m}^{-2}$ para la ribera y columna de agua, respectivamente; con un máximo medio de $516.63 \text{ g PS m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ en la ribera de febrero a mayo;

2.- Los factores hidrológicos que intervienen en la producción de quistes durante un ciclo anual estuvieron acoplados al régimen climático regional aunque no asociados a ella; sin embargo, la salinidad fue el factor más determinante. Fue posible predecir la producción media de quistes en la ribera mediante el modelo:

$$DT = -14.063 + 13.874 (\text{Temperatura}) - 0.278 (\text{Precipitación}) - 2.219 (\text{Radiación});$$

3.- Los parámetros de rendimiento de los quistes nativos fueron menores que una cepa comercial a 24 h de incubación pero a 48 h no se detectaron diferencias significativas;

4.- El valor nutricional de los quistes y nauplios obedeció a la utilización ontogenética de proteínas, lípidos y ácidos grasos; de éstos últimos, se notó el incremento de los poli-insaturados, notablemente el 20:5 y 22:2; pero ausencia de 22:6;

5.- La calidad bacteriana de los quistes fue menor de 10^3 y 10^5 UFC mL⁻¹ para bacterias *Vibrio* sp. y heterótrofas totales; respectivamente;

6.- La bioencapsulación de ácidos grasos poli-insaturados en los nauplios resultó adecuada con enriquecedores microparticulados secos ya que incrementaron el 22:6, hasta 15% del total de ácidos grasos totales, y la razón DHA:EPA a 2.7.

LITERATURA CITADA

- Abalde, J., A. Cid, J. P. Fidalgo, E. Torres y C. Fierro. 1995. Microalgas: Cultivo y aplicación. Lab. de Microbiología. Depto. de Biología Celular y Molecular. Facultad de Ciencias. La Coruña, España. 210 p.
- Ackman, R. G. y J. Kean-Howie. 1997. Fatty acids in aquaculture: Are ω -3 fatty acids always important? En: D. J. Sessa y C. Lim (Eds.). Nutrition and Utilization Technology in Aquaculture. AOCS. Press, Champaign, Illinois, U.S.A. p. 82-103.
- Alexakis, T., D. K. Boadi, O. Qoung, A. Groboillot, I. O. Neill, D. Poncelet y R. J. Neufeld. 1995. Microencapsulation of DNA within Alginate microspheres and crosslinked Chitosan membranes for in vivo application. Applied Biochem. and Biotech. 50:93-106.
- Álvarez, Z. y R. Sánchez. 1994. Evaluación de la calidad de la cepa de *Artemia*. Las Cumaraguas, Paraguaná, Venezuela. Ciencias Marítimas 20 (3): 287-299.
- Amat, F. D., F. Hontoria y J. C. Navarro. 1992. Valor nutritivo de nauplios de *Artemia* como alimento de larvas de peces y crustáceos. 81-93 p. En Larvicultura de camarones peneidos. Producción de postlarvas, cultivo y evaluación de microorganismos como alimento. Vol 1 CYTED subprograma II Acuicultura.
- AOAC, 1990. Official methods of analysis. Vol. 1. 15 edition. Association of Official Analytical Chemists. Washington. D.C.

- Band Schmidt, C. J. 1999. Efecto de la composición bioquímica de microalgas sobre el valor nutritivo de dos cepas de *Artemia*. Tesis de Maestría. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. Instituto Politécnico Nacional. 70 p.
- Band-Schmidt, C. J., L. Crisóstomo-Vázquez y B. O. Arredondo-Vega. 1996. Valor nutritivo de tres microalgas sobre una cepa regional de *Artemia*. En: Memorias del Primer Encuentro sobre Investigación y Desarrollo Costero: Oaxaca, Guerrero y Chiapas. 14, 15, y 16 de noviembre. p. 25.
- Baitchorov, V. M. y L. L. Nagorskaja 1999. The reproductive characteristics of *Artemia* in habitats of different salinity. Int. J. of Salt Lake Res. 8(4): 287-291.
- Barclay, W. y S. Zeller. 1996. Nutritional Enhancement of n-3 and n-6 fatty acids in Rotifers and *Artemia* Nauplii by Feeding spray-dried *Schizochytrium* sp. J. of the World Aquacult. Soc. 27(3):314-322.
- Bengston, D. A., P. Leger y P. Sorgeloos. 1991. Use the *Artemia* as food source for the aquaculture 255-285 p. En *Artemia Biology*. Brown, R.A.; Sorgeloos, P., y Trotman, C.N.A. Eds. CRC Press 374 p.

- Bernaets, F., Van Den Branden y W. Declair. 1981. The aerobic metabolism in *Artemia* sp. En: Exogenous and Endogenous Influences on Metabolism and Neural Control. A. D. F. Addink (Ed.). Pergamon Press, New York.
- Barclay, W. y S. Zeller. 1996. Nutritional Enhancement of n-3 and n-6 Fatty Acids in Rotifers and *Artemia* Nauplii by Feeding Spray-dried *Schizochytrium* sp. J. W. Aquacult. Soc. 27(3): 314-322.
- Bhat, B. V. 1992. Potentials and prospects for an *Artemia* aquabusiness in Indian. Seafood-Export-J. 24:27-31.
- Bligh, E. G. y W. J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37:911-917.
- Bowen, S. T. y S. Sterling. 1978. Esterase and malate dehydrogenase isozyme polymorphisms in 15 *Artemia* populations. Comp. Biochem. Physiol. 61: 593-595.
- Bowen, S. T., M. L. Davis, S. R. Fenster y Lindwall. 1980. Sibling species of *Artemia*. 155-167 p. En: The brine shrimp *Artemia*. Vol. 1 Morphology, Genetics, Radiobiology, and Toxicology. Persoone, G; P. Sorgeloos y E. Jaspers. (Eds). Universa Press, Wetteren, Belgium. 318 p.
- Browne, R. A., S. E Sallee, D. S. Grosch, W. O. Segreti y S. M. Purser. 1984. Partitioning genetic and environmental components of reproduction and lifespan in *Artemia*. Ecology. 65: 949-960.

- Cámara, M. 1996. *Artemia* do Brasil: em busca de um modelo auto-sustentável de producao. *Panorama da Aqüicultura*,6(36):48.
- Castro, B. T. y R. C. Gallardo. 1993. *Artemia* sp. Cuaderno No. 31 CBS. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. México D. F.
- Castro, M. J., S. A. Malpica, G. S. A. Rodríguez, B. R. Castro y A. R. De Lara. 1995. Análisis morfométrico de la *Artemia* spp en la salina Las Coloradas , Oaxaca, México. *Oceanología* 2 (6): 117-128.
- Castro, M. J., S. A. Malpica, B. T. Castro, A. R. De Lara y M. G. Castro. 1997. El uso de Nauplios y Quistes de la Población de *Artemia* de Oaxaca en el Desarrollo de la Acuicultura en la región del Istmo. *Ciencia y Mar* 1(2).
- Castro, T., L. Sánchez y R. De Lara. 1987. Natural sources of brine shrimp (*Artemia*) in México. En: Sorgeloos, P., Bengston., Declair, W. y Jaspers, E. (Eds.). *Artemia Research and Its Applications*. Vol. 3. Ecology. Universa Press, Watteren, Belgium.
- Cole, G. A. y J. Brown. 1967. Chemistry of *Artemia* habitats. *Ecology* 48 (5): 858-861.
- Coutteau, P. y G. Mourente. 1997. Lipid classes and their content of *n*-3 highly unsaturated fatty acids (HUFA) in *Artemia franciscana* after hatching, HUFA-enrichment and subsequent starvation. *Mar. Biol.* 130: 81-91.

- CYTED. 2000. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Desarrollo y optimización de las tecnologías de cultivo de camarones peneidos en Ibero América. Subprograma II: Acuicultura proyecto II.3. Informe final CYTED.
- Comisión Nacional del Agua (CNA). 1999. Estación Metereológica Salinas del Márquez, Salina Cruz Oaxaca. Reportes internos.
- Day, R. W. y G. P. Quinn. 1989. Comparisons of treatments after an analysis of variance in Ecology. *Ecol. Monogr.* 59(4): 433-463.
- De Wolf, T., A. Carillo, P. Candreva, M. Deichmann, y P. Sorgeloos. 1998. Improvements in *Artemia* cysts decapsulation. *Aquaculture Europe 98. Book of Abstracts and Short Communications. European Aquaculture Society, Special Publication No. 28, Ostend, Belgium.*
- Decler, W., G. Wolf y B. De Wachter. 1989. Adaptation to hypoxia in *Artemia*. En *Cell and Molecular Biology of Artemia Development*. Warner, A. H., T. H. MacRae y J. C. Bagshaw. (Eds.). NATO ASI Series A: Life Sciences. Vol 174. Plenum Press, New York.
- Drinkwater, L. E, y J. S. Clegg. 1991. Experimental Biology of Cyst Diapause. En: *Artemia Biology*. Eds. Browne, A. R, Sorgeloos, P., and Trotman, C. N. A. CRC Press, Boca Raton Florida. 21-36 p.

- Eagles, M. 1984. Effect of food quality and feeding schedule on survival, growth and development of larval American lobster fed frozen Adult brine shrimp. *J. World Maricult. Soc.* 15: 142-143.
- Espinoza-Tenorio, A. 2001. Prospección metodológica para el ordenamiento ecológico-territorial de las zonas costeras. Una aplicación con énfasis en acuicultura comunitaria: Santiago Astata, Tehuantepec, Oaxaca. Tesis de Licenciatura. Biología Marina. Universidad del Mar. 102 p.
- Flores, T. A. 1987. Preliminary production results of *Artemia* to be used in local shrimp farming in La Paz (México). In: *Artemia, Research and its Applications*, Vol. 3: Ecology, Culturing, Use in Aquaculture. Universa Press. Wetteren, Bélgica. 535 p.
- García, A. 2000. Valor nutricional de los quistes de *Artemia* y su uso como fuente de proteína en dietas artificiales para larvas de peces En: Cruz-Suárez, L. E., Riquemarie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M. A. y Civera-Cerecedo, R., (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán.
- García-De Miranda, E. 1981. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen (Para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana.). México. Tercera Edición. 252 p.

- Gelabert, R. F. 2001. Bioencapsulación en *Artemia* y su efecto en la alimentación de postlarvas de camarón, *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Doctorado en Ciencias (Biología). UNAM. México D. F. 84 p.
- Han, K., I. Geurden y P. Sorgeloos. 2000. Enrichment strategies for *Artemia* using emulsions providing different levels of $n - 3$ highly unsaturated fatty acids. *Aquaculture*. 183:335-347.
- Han, K., I. Geurden y P. Sorgeloos. 2001. Fatty acid changes in enriched and subsequently starved *Artemia franciscana* nauplii enriched with different essential fatty acids. *Aquaculture*. 199: 93-105.
- Hinton, H. E. 1954. Resistance of the dry eggs of *Artemia salina* (L.) to high temperatures. *The Annals and Magazine of Natural History*. 7: 158-160.
- Hontoria, F., J. C. Navarro y D. F. Amat. 1989. Utilization of *Artemia* cysts in marine larvae culture: A model of quality evaluation. *Aquaculture Engineering*. 8: 127-138.
- INEGI. 1988. Anuario Estadístico del estado de Oaxaca. 1018 p.
- Jacinto-Nolasco, P. 2002. Evaluación del orbital de barrilete negro (*Euthynnus lineatus*) en el cultivo zoenario del camarón blanco. Tesis de Ingeniería en Acuicultura. UMAR. Puerto Angel Oaxaca. Enero de 2002. 75 p.

- Jones, A. y F. Houde. 1981. Mass rearing of fish fry for Aquaculture. In Book of Abstracts WCA. Italy 21-25 Septiembre.
- Jumalon, N. A., D. G. Estenor, y Ogburn. 1987. Commercial production of *Artemia* in the Philippines. En: *Artemia*, Research and its Applications, Vol. 3: Ecology, Culturing, Use in Aquaculture. Universa Press. Wetteren, Bélgica. 535 p.
- Knapp, D. R. 1979. Handbook of analytical derivatization reagents. John Wiley. New York.
- Lai, L. L. 1991. Production Methods and the Role of the Brine Shrimp *Artemia*. 66-77 p. En: World Animal Science C. Production of Aquatic Animals (Crustaceans, Mollusks, Amphibians and Reptiles). Ed. Elsevier. 402 p.
- Lankford, R. R. 1977. Coastal Lagoons, Their Origin and Classification. Ed. Estuarine Processes. Academic Press 183-215 p.
- Lavens, P. y P. Sorgeloos. 1987. Design, Operation and Potential of a Culture Systems for the Continuous Production of *Artemia* nauplii. In: *Artemia* Research and its Applications. Vol. 3. Ecology, Culturing, Use in aquaculture. Ed. Sorgeloos, P., Bengston, D. A., Declair, W. and Jaspers, E. Universa Press, Wetteren, Belgium. 556 p.
- Lavens, P. y P. Sorgeloos. 1996. Manual on the production and use on live food for aquaculture. FAO Fish. Tech. Pap. 211: 295.

- Lavens, P. y P. Sorgeloos. 2000. The history, present status and prospects of the availability of *Artemia* cysts for aquaculture. *Aquaculture*. 181:397-403 p.
- Léger, P., D. A. Bengtson, K. I. Simpson y P. Sorgeloos. 1986. The use and nutritional value of *Artemia* as a food source. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 24:521-623.
- Léger, P., D. A. Bengtson, P. Sorgeloos, K. L. Simpson y A. D. Beck. 1987. The nutritional value of *Artemia*: a review. En: Sorgeloos, P., Bengtson., Declair, W. y Jaspers, E. (Eds.). *Artemia* Research and Its Applications. Vol. 3. Use in aquaculture. Universa Press, Watteren, Belgium.
- Lenz, H. P, y Browne, R. A. 1991. Ecology of *Artemia*. en: *Artemia* Biology. Browne, R. A., Sorgeloos, P., y Trotman, C. N. A. CRC Press. 237-254 p.
- Levine, D. 1983. The design and development of microencapsulated diet for the study nutritional. In culture of marine invertebrate. (Ed.) Hutchinson Ross. 386 p.
- Malpica, S. A., M. J. Castro, B. T. Castro, A. R. De Lara y M. G. Castro. 1997. Datos de Capacidad Reproductiva de *Artemia franciscana* Variedad Oaxaca. *Ciencia y Mar*. 1(2):31-34.
- Malpica, S. A., M. J. Castro, G. I. Rodríguez, B. T. Castro, R. T. Gallardo y A. R. De Lara. 1995. Características de la reproducción y del periodo de vida en las hembras de la población de *Artemia spp* de la salina de Las Coloradas, Oaxaca México en condiciones de laboratorio. *Oceanología*, 3(7) 127-133.

- Metailler, R. 1981. Weaning of Sole (*Solea vulgaris*): Using artificial diets.
- Mourente, G. y A. Rodríguez. 1997. Effects of salinity and dietary DHA (22:6n-3) content on lipid composition and performance of *Penaeus kerathurus* postlarvae. Mar. Biol. 128:289-298.
- McEvoy, L. A.; J. C. Navarro; F. Hontoria; F. Amat y G. R. Sargent. 1996. Two novel *Artemia* enrichment diets containing polar lipid. Aquaculture. 144: 339-352.
- McEvoy, L. A; T. Naess; J. G. Bell y O. Lie. 1998. Lipid and fatty acid composition of normal and malpigmented Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) fed enriched *Artemia*: a comparison with fry fed wild copepods. Aquaculture. 163: 237-250.
- Newmark, F. 1992. Comparación experimental de las cepas colombianas de *Artemia* (Galerazamba, Manaure, Pozos Colorados). En Larvicultura de camarones peneidos. Producción de postlarvas, cultivo y evaluación de microorganismos como alimento. Vol 1 CYTED subprograma II Acuicultura.
- Ortiz de Ora, F. F., M. Sandoval-Quintero y G. Araneda-Vázquez. 1991. Metodologías y Recomendaciones Técnicas para la Calificación y Utilización de la cepas Nativas de *Artemia*. Boletín Red Regional de Acuicultura de América Latina CIID-Canadá. Vol.5. No. 3, Septiembre/Diciembre. Santa Fe de Bogota, Colombia. 15-23 p.

- Ozkizilcik, S. y F. L. E. Chu. 1994. Evaluation of Omega-3 Fatty Acid Enrichment of *Artemia* Nauplii as Food for Striped Bass *Morone saxatilis* Walbaum Larvae. J. World Aquacul. Soc. 25(1): 147-154.
- Pedroza-Islas R. 2000. Estudios de difusión de nutrimentos en alimentos microencapsulados para larvas de crustáceos. Tesis de doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 69 p.
- Persone, R. 1978. The generation 1977 a Turbot (*S. Maximus*). Comité des poissons de fond et de mariculture G. 55. 29p.
- Porras Díaz., L. Castrejón-Ocampo, A. Mendoza-Maravillas y C. J. Band-Schmidt. 1997. Bioecología de la *Artemia* de la Laguna de la Colorada, Oax. Ciencia y Mar 1 (1): 3-21.
- Post, F. J. y N. N. Youssef. 1977. A prokaryotic intracellular symbiont of the Great Salt Lake brine shrimp *Artemia salina* (L.). Can. J. Microbiol. 23(9): 1232-1236 .
- Roden, G. I. 1961. Sobre la circulación producida por el viento en el Golfo de Tehuantepec y sus efectos sobre las aguas superficiales. *Geofís. Int.* 1(3): 55-76.
- Ronsón-Paulín, J. A., N. Ruíz-García, C. E. Medina-Reyna, C. Villalobos-Pascual y J. G. Madrid-González. 2001. Procesado de quistes de *Artemia* sp. Var. Istmo de la salina Laguna Grande, Santiago Astata, Tehuantepec, Oaxaca, México. Informe final. UMAR-SIBEJ-01-010 104p. + Anexos.

- Rosenberg, M., Y. Talmon y I. J. Kopelman. 1988. The microstructure of spray-dried microcapsules. *Food Microstructure* 7:15-23.
- Rosenberry, B. 1997. *World Shrimp Farming*. Shrimp News International, San Diego. 283 p.
- Rzedowski, J. 1981. *Vegetación de México*. Limusa. México. 432 p.
- Sato, N. y N. Murata. 1988. Membrane lipids. *Met. and Enzimol.* 167:251-259.
- Skoultchi, A. I. y Morowitz. 1964. Information storage and survival of biological systems at temperatures near absolute zero. *Yale J. Biol. Med.* 37: 158-163.
- Sokal, R. R. y F. J. Rohlf, 1995. *Biometry. The principles and practice of statistics in biological research*. 3rd. Ed. W. H. Freeman and Co. New York, N. Y. USA. 881 p.
- Sorgeloos, P. 1979. The brine shrimp *Artemia salina*: a bottleneck in mariculture? En *FAO Technical conference on aquaculture. Kioto 1976*. (Eds) Pillar, T. V. R. y Wm.A. Dill. Farnham: Fishing news books 321-324 p.
- Sorgeloos, P. 1980. The use of brine shrimp *Artemia* in aquaculture. En *The Brine shrimp Artemia*. Vol. 3: Ecology, culturing, use in aquaculture. Persoone, G; P. Sorgeloos, O. Roels y S. E. Jaspers. Universa Press. Wetteren. Bélgica. 25-46 p.

- Sorgeloos, P., P. Lavens, P. Léger, W. Tackaert y D. Versichele. 1986. Manual para el uso de *Artemia* en la Acuicultura. FAO Programa Cooperativo Gubernamental. 301 p.
- Sorgeloos, P., D. A. Bengston, W. Decler y E. Jaspers. 1987. *Artemia* research and its applications, Vol. 3: Ecology, culturing, use in aquaculture. Universa Press. Wetteren, Bélgica.
- Sorgeloos, P. 1988. Brine shrimp *Artemia* in coastal saltworks: Hidrobiological key to improved salt production. Inexpensive source of food for vertically integrated aquaculture. In: L'Autelio, V. and Santulli (Eds), Atti del Convegno Internazionale Conversione delle saline in acquacoltura, Libera Universita Trapani. 238 p.
- Sorgeloos, P., P. Lavens, Ph. Léger y W. Tackaert. 1993. The Use of *Artemia* in Marine Fish Larviculture. TML Conf. Proc. 3: 73-86.
- Sorgeloos, P. y G. Van-Stappen. 1995. *Artemia* cysts shortage: the ARC's point of view. Larviculture and *Artemia* Newsletter. Vol. 35 ,19 p.
- Sorgeloos, P., P. Coutteau, P. Dhert, G. Merchie y P. Lavens. 1998. Use of brine shrimp, *Artemia* sp., in larval crustacean nutrition. Rev. in Fish. Sci. 6:55-68.
- Sorgeloos, P., P. Dhert y P. Candreva. 2001. Use of the brine shrimp, *Artemia* sp., in marine fish larviculture. Aquaculture. 200: 147-159.

- Stearns, S. C. 1977. The evolution of life history traits: a critique of the theory and a review of the data. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 8: 145-171.
- Steel, R. G. D. y J. H. Torrie, 1960. Principles and Procedures of Statistics with special reference to the biological sciences. McGraw-Hill Book Co. Inc. New York, N. Y. U. S. A. 481 p.
- Sun, Z. M., D. Poncelet, J. Conway y R. J. Neufeld. 1995. Microencapsulation of lobster carotenoids within poly(vinyl alcohol) and poly(D,L-lactic acid) membranes. *J. Microencapsulation*.
- Tackaert, W. y P. Sorgeloos. 1991. Semi-intensive culturing in fertilized ponds. En *Artemia Biology*. 287-315 p.
- Teshima, S., A. Kanazawa y S. Koshio. 1992. Ability for bioconversion of n-3 fatty acid in fish and crustaceans. *Oceanis* 18(1): 67-75.
- Trotta, P., P. Villani, G. B. Palmegiano, G. Forneris y C. Sarra. 1987. Laboratory-grow *Artemia* as reference food for weaning fish fry and shrimp postlarvae. En: *Artemia, Research and its Applications*, Vol. 3: Ecology, Culturing, Use in Aquaculture. Universa Press. Wetteren, Bélgica. 535 p.
- Ulloa-Gómez, M. G. 2001. Consideraciones en la producción de biomasa de *Artemia*. En *Panorama Acuícola*. Vol. 6, No. 3 Marzo-Abril. México, D. F. 62 p.

- Ulloa-Gómez, M. G. 1998. La *Artemia* en el Ojo del Huracán. Panorama Acuícola. Vol. 3-4: 43.
- Van Stappen, G. 1996. Introduction, Biology and Ecology of *Artemia*. En: Lavens, P. y P. Sorgeloos. Manual on the production and use live food for aquaculture. FAO, Fisheries Technical Paper. No. 361. Roma FAO. 107-135 p.
- Vanhaecke, P. y P. Sorgeloos. 1981. International study on *Artemia* IV. The biometrics of *Artemia* strains from different geographical origin 393-408 p. En: Persoone, G; Sorgeloos, P; Roels, O; Jaspers, E. The brine shrimp *Artemia*, Vol.3. Ecology Culturing. Use in Aquaculture. Universa Press, Wetteren, Belgium.
- Vanhaecke, P., W. Tackaert y P. Sorgeloos. 1987. The biogeography of *Artemia*: an updated review. In Sorgeloos, P., Bengtson., Declair, W. y Jaspers, E. (Eds.). *Artemia* Research and Its Applications. Vol. 1. Strain Characterization. Universa Press, Watteren, Belgium.
- Vinatea-Arana, L. 1999. CYTED. Manual de Producción de *Artemia* (Quistes y Biomasa) en Módulos de Cultivo. Proyecto II-A/2 Localización, Caracterización y Evaluación del Potencial Extractivo de *Artemia* en Ibero-América con destino a la Acuicultura. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, División de Ciencias Biológicas y de la Salud. México, D.F.63 p.

- Vos, J. y N. L. De La Rosa. 1980. Manual on *Artemia* production in salt ponds in Philippines. FAO/UNDP-BFAR, Quezon City Philippines. 48 p.
- Walford, J. y T. J. Lam. 1987. Effect of Feeding with Microcapsules on the Content of Essential Fatty Acids in Live Foods for the Larvae of Marine Fishes. *Aquaculture*. 61: 219-229.
- Watanabe, T. 1987. The use of *Artemia* in fish and crustaceans farming in Japan. En: Sorgeloos, P., Bengtson., Declair, W y Jaspers, E. (Eds.). *Artemia* Research and Its Applications. Vol. 3. Use in aquaculture. Universa Press, Watteren, Belgium.
- Watanabe, T., F. Okiwa, C. Kitajima y S. Fujita. 1978. Nutritional quality of brine shrimp, *Artemia salina*, as a living feed from the viewpoint of essential fatty acids for fish. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 44:1115-1121.
- Wilkinson, L. 1987. SYSTAT: The system for statistics. SYSTAT Inc. Evanston, IL.
- Zar, J. H. 1984. Biostatistical analysis. 2nd Ed. Prentice Hall. Englewood Cliffs, NJ. USA. 334 p.