



**Centro de Investigación en
Alimentación y Desarrollo, A.C.**

EVALUACIÓN DEL COPÉPODO *Pseudodiaptomus euryhalinus* COMO ALIMENTO VIVO EN JUVENILES DE CABALLITO DE MAR *Hippocampus ingens* (GIRARD, 1859).

Por:

Jarintzin Mones Saucedo

**TESIS APROBADA POR LA:
UNIDAD MAZATLÁN
EN ACUICULTURA Y MANEJO AMBIENTAL.**

Como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRÍA DE CIENCIAS

Mazatlán, Sinaloa

Diciembre del 2011

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

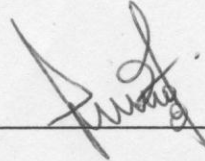
Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.

Dr. Ramón Pacheco Aguilar

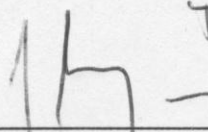
Director General

APROBACIÓN

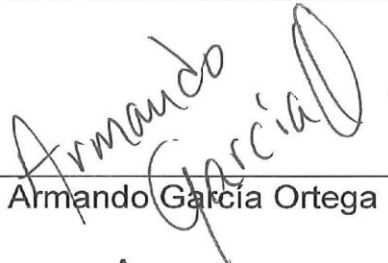
Los miembros del comité asignados para revisar la tesis de Jarintzin Mones Saucedo, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias con especialidad en Acuicultura.



M. en C. Ana C. Puella Cruz
Director de Tesis



Dr. Pablo Almazán Rueda
Asesor



Dr. Armando García Ortega
Asesor



Dr. Bruno Gómez Gil Rodríguez Sala
Asesor



Dr. Domenico Voltolina
Asesor



Dr. Miguel Planas Oliver
Asesor

DEDICATORIA

A Dios por darme un día nuevo de vida.

A mis padres, que son mis mejores amigos, seres luchadores con los que siempre contaré, que me han llenado de amor, sabios consejos y ante todo han confiado en mí incondicionalmente. Gracias a ellos he logrado todo.

A mi amiga y compañera por ese espíritu positivo y entusiasta que transmitiste día a día, que anima y motiva las metas y logros en mi vida. Con mucho cariño gracias.

*La capacidad de asombro no debe perderse
porque la curiosidad es la semilla de la ciencia*

AGRADECIMIENTOS

Principalmente y con mucho cariño quiero agradecer a mi directora de tesis y amiga M. en C. Ana C. Puello Cruz por haberme otorgado la oportunidad de formar parte de su laboratorio y equipo de trabajo y sobre todo por sus valiosos consejos, enseñanzas, tiempo, paciencia y apoyo durante mi formación y elaboración de mi tesis. Muchas gracias.

De manera muy especial al Dr. Pablo Almazán Rueda, por su gran apoyo, orientación, asesorías, consejos y amistad durante la maestría.

A los miembros de mi comité el Dr. Domenico Voltolina por su paciencia, valiosos consejos y grandes enseñanzas, al Dr. Miguel Planas Oliver por brindarme la oportunidad de enriquecer mis conocimientos al formar parte de su equipo de laboratorio durante mi estancia académica y al Dr. Armando García Ortega y el Dr. Bruno Gómez Gil por sus sugerencias y observaciones.

Al laboratorio de Biología y Fisiología Larvaria de Peces Marinos del Instituto de Investigaciones Marinas (CSIC) en Vigo España, en especial a la Dr. Patricia Quintas, a los técnicos Biol. Alejandro Chamorro y los estudiantes de doctorado el Biol. Andreu Blanco Cartagena y Sonia Valladares, por brindarme su amistad y grandes conocimientos.

A las Biol. Blanca González Rodríguez, Biol. Patricia Domínguez Jiménez, M. en C. Estela Rodríguez y M. en C. Carmen Bolán por su apoyo, sugerencias y consejos. A Valerie Williams por su apoyo para traducir el poster de 11th ICOC 2011.

A los técnicos de mantenimiento de CIAD Mazatlán Felipe Hernández Peinado y Jesús Antonio Angulo Armenta, por su apoyo en la instalaciones e implementaciones de los sistemas experimentales.

Un gran agradecimiento a los técnico del laboratorio de reproducción y microalga Don Juan Huerta Ortega y Don Manuel Cruz Aramburo por las facilidades otorgadas, ayuda y consejos durante la etapa experimental así como a la M. en C. Gabriela Velasco.

Con cariño a mis compañeros y amigos de maestría, Efrén Astorga, Citlalic Pimentel, Allan Flores, Teresa Pineda, Martín Valverde, Oscar Echegaray, Linda Echegaay, Carlos Zuñiga y Rocío Quezada por todos los momentos especiales.

Gracias a mis profesores de maestría por brindarme sus valiosos conocimientos y permitirme crecer personal y académicamente.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada durante el periodo de la maestría, así como al Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología (CECYT) por la extensión de tres meses de la beca para culminar la tesis y al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Unidad Mazatlán, por las facilidades y el apoyo brindados en la realización de este postgrado.

Y por último a todo el personal del CIAD Mazatlán, por su gran amabilidad, cordialidad y por brindarme diariamente una sonrisa.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1. Biología del Caballito de Mar <i>Hippocampus ingens</i>	4
2.1.2. Taxonomía	4
2.1.3. Morfología	5
2.1.4. Distribución	5
2.2. Nutrición de los Caballitos de Mar	6
2.2.1. Nutrición y Alimentación de <i>H. ingens</i>	7
2.3. Comportamiento Alimentario de los Caballitos de Mar	7
2.4. Copépodos y <i>Artemia</i> como Alimento Vivo	9
2.5. Enfermedades de Origen Bacteriano en los Caballitos de Mar	11
3. JUSTIFICACIÓN	13
4. HIPÓTESIS	13
5. OBJETIVOS	14
5.1. Objetivos General	14
5.1.1. Objetivos Particulares	14
6. MATERIALES Y MÉTODOS	15
6.1. Experimentos Preliminares en Ciad Mazatlán	15
6.2. Experimento en Granja Comercial	21
6.3. Cultivo de Copépodos <i>Pseudodiaptomus euryhalinus</i>	21
6.4. Cultivo de <i>Artemia</i>	23
6.5. Obtención de Organismos.	23

6.6. Determinación de Consumo de Copépodos y de <i>Artemia</i>	23
6.7. Diseño Experimental	25
6.7.1. Cultivo Experimental de Juveniles	25
6.7.2. Sistema Experimental	25
6.7.3. Muestreos	27
6.8. Análisis del Comportamiento Alimentario	27
6.8.1. Tasa de Alimentación por Día	27
6.8.2. Comportamiento y Estrategia Alimentaria	28
6.9. Determinación de Crecimiento y Supervivencia	28
6.10. Conteo Total Viable de Heterótrofas Totales y <i>Vibrio</i> .	29
6.11. Análisis Estadístico	30
7. RESULTADOS	31
7.1. Tasa de Alimentación por Día	31
7.2. Comportamiento y Estrategia Alimentaria	33
7.3. Crecimiento y Supervivencia	35
7.4. Conteo Total Viable de Heterótrofas Totales y <i>Vibrio</i>	37
8. DISCUSIÓN	39
8.1. Sistema Experimental	39
8.2. Tasa de Alimentación por Día	40
8.3. Comportamiento y Estrategia Alimentaria	41
8.4. Crecimiento y Supervivencia	43
8.5. Conteo Total Viable de Heterótrofas Totales y <i>Vibrio</i>	45
9. CONCLUSIONES	48

10. LITERATURA CITADA	59
11. Anexos	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Conteo total viable de bacterias en TCBS potencialmente del género <i>Vibrio</i> y bacterias en agar marino de heterótrofas totales en agua de cultivo, <i>Artemia</i> , piel y órganos de <i>Hippocampus ingens</i> .	17
Tabla 2.	Talla inicial, talla final y tasa de crecimiento (TC) en las diferentes longitudes de juveniles de caballito de mar <i>Hippocampus ingens</i> bajo diferentes tratamientos alimenticios.	36
Tabla 3.	Conteo total viable de bacterias en TCBS potencialmente del género <i>Vibrio</i> y bacterias en agar marino de heterótrofas totales para el agua de los tres tratamientos de alimentación de <i>Hippocampus ingens</i> durante las cuatro semanas de cultivo.	37
Tabla 4.	Conteo total viable de bacterias en TCBS potencialmente del género <i>Vibrio</i> y bacterias en agar marino de heterótrofas totales para el alimento vivo (copépodos y <i>Artemia</i>) durante cuatro semanas.	38
Tabla 5.	Talla inicial, talla final y tasa de crecimiento en las diferentes longitudes de juveniles de caballito de mar <i>Hippocampus ingens</i> bajo diferentes tratamientos alimenticios	61
Tabla 6.	Incremento en las diferentes longitudes de juveniles de caballito de mar <i>Hippocampus ingens</i> bajo diferentes tratamientos alimenticios.	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Morfología y un tipo de coloración de macho de <i>Hippocampus ingens</i> . (Lourie <i>et al.</i> , 1999)	5
Figura 2.	Sistema experimental para el cultivo de juveniles de caballito de mar <i>Hippocampus ingens</i> .	15
Figura 3.	Caballito de mar <i>Hippocampus ingens</i> liofilizado.	16
Figura 4.	Sistema experimental para juveniles de 0 dpn de <i>Hippocampus ingens</i> con recirculación de agua y flujo de desagüe de filtro de tambor.	18
Figura 5.	Juvenil de 1 dpn de <i>Hippocampus ingens</i> con problema de la burbuja en el área abdominal.	18
Figura 6.	Medidas morfométricas de juveniles de <i>Hippocampus ingens</i> de 0 hasta 20 dpn.	19
Figura 7.	Sistema experimental para juveniles de 0 dpn recién nacidos de <i>Hippocampus ingens</i> . A la izquierda jarras eclosionadoras con sistema de recirculación., A la derecha tuvo de PVC con malla de 200µm adaptado en la parte superior de la jarra eclosionadora	20
Figura 8.	Diseño experimental para el cultivo de juveniles de caballitos de mar <i>Hippocampus ingens</i> . a) sistema experimental de acuarios, b) filtros en acuarios, c) sistema de recirculación, d) espumador de proteínas (Skimmer) y e) filtro mecánico (colector de alimento residual).	26
Figura 9.	Medidas morfométricas del caballito de mar <i>Hippocampus ingens</i> . (Modificado de Lourie <i>et al.</i> , 1999).	28

Figura 10. Tasa de alimento por día (TCD^{-1}) de juveniles de caballito de mar <i>Hippocampus ingens</i> durante 4 semanas de cultivo con tres tratamientos: <i>Artemia</i> únicamente, copépodos únicamente y mezcla (copépodos y <i>Artemia</i>).	31
Figura 11. Biomasa de alimento consumido por juveniles de caballito de mar <i>Hippocampus ingens</i> durante 4 semanas de cultivo con tres tratamientos: <i>Artemia</i> únicamente, copépodos únicamente y mezcla (copépodos y <i>Artemia</i>).	32
Figura 12. Comportamiento alimentario de caballitos de mar <i>Hippocampus ingens</i> durante cuatro semanas de cultivo bajo diferentes tratamiento alimenticios. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$).	34
Figura 13. Valores medios de las diferentes medidas morfométricas (a: Altura, b: longitud cabeza y c: longitud hocico) del caballito de mar <i>Hippocampus ingens</i> durante 30 días de cultivo bajo diferentes tratamientos alimenticios. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$)	35
Figura 14. Resultados histopatológicos de branquias de juveniles de <i>H. ingens</i> .	58
Figura 15. Valores medios de las diferentes medidas morfométricas (a: Longitud tronco, b: longitud cola y c: ancho) del caballito de mar <i>Hippocampus ingens</i> durante 30 días de cultivo bajo diferentes tratamientos alimenticios. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$)	60

RESUMEN

En el medio natural los caballitos de mar son depredadores carnívoros visuales que consumen principalmente copépodos, anfípodos, carideos y misidáceos y se ha demostrado que los copépodos calanoides mejoran el crecimiento y supervivencia de las primeras etapas de vida; sin embargo, los copépodos no son utilizados comúnmente para el mantenimiento de caballitos de mar ya que pueden llegar a ser difíciles de producir en números apropiados. Por el contrario, *Artemia* es el alimento más utilizado a pesar de no ser parte de su dieta natural. Además la información de los requerimientos nutricionales, el comportamiento alimentario y las enfermedades relacionadas con los caballitos de mar es escasa. *Hippocampus ingens* se distribuye desde las costas de San Diego, California, hasta las de Perú, por lo que se le conoce como caballito del pacífico. Actualmente en México se ha identificado el potencial de *H. ingens* para la acuicultura; sin embargo, su cultivo es aun relativamente nuevo en nuestro país, por lo cual lograr el mantenimiento y el cultivo exitoso de esta especie es un gran reto para los acuicultores. Por lo anterior, el presente estudio tiene como objetivo evaluar al copépodo calanoide *Pseudodiaptomus euryhalinus* como alimento vivo para juveniles de caballitos de mar del Pacífico *H. ingens*. Para ello se evaluaron tres dietas, la primera de las cuales consistió en el suministro de copépodos únicamente, para la segunda se usaron adultos de *Artemia* y la tercera consistió en la mezcla en partes iguales de las dos primeras y se determinaron sus efecto en la tasa diaria de alimentación, comportamiento alimentario y en el crecimiento. Además se monitoreó la concentración de las bacterias *Vibrio* y heterótrofas totales presentes en el cultivo de *H. ingens* y su relación con enfermedades. Se cultivaron *H. ingens* de 41 días de edad en un sistema de recirculación semi-cerrado, y se alimentaron con las tres dietas durante 30 días. Durante el experimento se usó un régimen de alimentación de 2500 copépodos·juvenil⁻¹·día⁻¹ y 130 *Artemias*·juvenil⁻¹·día⁻¹ (relación 1:1 en biomasa), el cual resultó adecuado para el mantenimiento de juveniles de *H. ingens*. Los resultados mostraron un incremento con el tiempo de las tasas de ingestión de las tres dietas y más consumo de biomasa de *Artemia* que de copépodos. El número de organismos sujetos al sustrato, que continuaban alimentándose 30 min después de la incorporación del alimento, fue significativamente mayor para la dieta de copépodos durante 3 semanas. La tasa de crecimiento en la longitud de hocico y altura de los caballitos alimentados con copépodos fue significativamente menor que con *Artemia* y con la mezcla, mientras que la longitud de hocico en el tratamiento de mezcla fue significativamente mayor al resto de los tratamientos. Por último los juveniles de *H. ingens* presentaron altos porcentajes de supervivencia sin signos de enfermedades en las tres dietas evaluadas, aun con registros aislados de concentraciones elevadas de bacterias ($> 10^5$ UFC mL⁻¹) en el agua del cultivo. De acuerdo con los resultados de este estudio se considera que las tres dietas evaluadas son un alimento vivo adecuado para el mantenimiento de *H. ingens* de entre 41 y 70 días de edad, aunque la tasa de crecimiento disminuye si se suministran copépodos únicamente.

1. INTRODUCCIÓN.

Los caballitos de mar son un grupo de peces marinos muy particulares e inusuales, agrupados en el género *Hippocampus* y pertenecientes a la familia Syngnathidae. Se encuentran en una gran diversidad de hábitats, desde arrecifes coralinos hasta lagunas y estuarios, praderas de pastos marinos y mantos de macroalgas (Lourie y Randall, 2003; Lourie *et al.*, 2004; Lourie y Kuitert, 2008; Randall y Lourie, 2009). Algunas características únicas en su biología los diferencian del resto de los peces marinos. Entre estas, destacan su desplazamiento vertical lento, ojos con movimiento independiente, capacidad de mimetismo mediante cambios de coloración de la piel y estrategia de reproducción, ya que en lugar de la hembra, es el macho quien incuba y libera a las crías (Lourie *et al.*, 1999).

Actualmente existen 33 especies de caballito de mar identificadas y distribuidas en mares tropicales, subtropicales y templados entre los 50° de latitud norte y los 50° de latitud sur (Lourie *et al.*, 2004). Su distribución tiende a ser irregular, abarcando un gran número de áreas en las cuales presenta bajas densidades (Kuitert, 2009).

La mayoría de las especies se comercializa con fines diversos, ya que los caballitos son utilizados en la medicina tradicional china, como peces de ornato y en las artesanías como organismos secos, además de ser considerados como un afrodisiaco en algunos países asiáticos. Esta gran variedad de usos ha originado una gran demanda en todo el mundo, por lo cual su comercialización, así como la degradación y vulnerabilidad de su hábitat ha generado un tráfico no sustentable, posiblemente causando también la sobreexplotación de algunas especies (Vincent, 1996).

A partir del establecimiento de CITES (iniciales de: Convention on International Trade of Endangered Species: Convención Internacional sobre el Comercio de Especies Amenazadas de Flora y Fauna Silvestre) en el año 2004, todas las especies de caballito de mar se encuentran enlistadas en el Apéndice II que

reúne las especies protegidas por posibles problemas relacionados con la supervivencia de la especie por motivos diversos (CITES, 2011), y están incluídas también en la Lista Roja de Especies Amenazadas de la Unión Internacional de la Conservación Natural (IUCN, por sus siglas en Inglés) (IUCN, 2011).

En aguas mexicanas se encuentran *H. zosterae*, *H. erectus*, *H. reidi* e *H. ingens*, las tres primeras de las cuales se encuentran en el Golfo de México, mientras que *H. ingens* es la única especie de caballito conocida en las aguas del Pacífico Mexicano, por lo cual se le conoce también como caballito del Pacífico (Lourie *et al.*, 1999). En general, la captura de estas especies es incidental, principalmente por barcos camaroneros y se estima que las flotas camaroneras que operan en las costas del Océano Atlántico y el Golfo de México capturan incidentalmente 125-140 kg de caballitos secos al año (53,000-60,000 organismos). En las costas del Océano Pacífico las capturas son mayores, y alcanzan entre 835 y 1,590 kg de caballitos secos (199,000-380,000 organismos) (Baum y Vincent, 2005), que se debe al mayor número de barcos camaroneros que operan en estas costas, principalmente en el área del Golfo de California (SAGARPA, 2008).

A nivel nacional, la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 incluye las cuatro especies de *Hippocampus* en su lista de especies “Sujetas a Protección Especial” (DOF, 2010). Sin embargo, sus capturas y comercialización continúan y siguen siendo la mayor fuente de problemas para los caballitos de mar de las aguas mexicanas. Por este motivo, disminuir el efecto de la presión sobre las poblaciones silvestres de *H. ingens* causada por la pesca incidental mediante programas de repoblamiento con organismos producidos por acuicultura, pudiera servir como una medida de remediación aunque sin modificar la presión de las flotas camaroneras sobre las poblaciones silvestres. Además, esta estrategia pudiera contribuir a disminuir la presión de la pesca dirigida a satisfacer la demanda del mercado de peces de ornato.

Actualmente en México se ha identificado el potencial de *H. ingens* para la acuicultura. Sin embargo, su cultivo es aun relativamente nuevo en nuestro país, por lo cual lograr el mantenimiento y el cultivo exitoso de esta especie es un gran reto para los acuicultores. Aunque, de acuerdo a Gomezjurado (2005), no existen motivos para considerarla una especie difícil de cultivar, la información relacionada con su ecología y biología es muy escasa (Lourie *et al.*, 2004). En especial, los temas que requieren ser investigados con prioridad son los que pueden contribuir a un cultivo exitoso, como el diseño de acuarios adecuados para el mantenimiento en cautiverio, las técnicas y condiciones de cultivo, los requerimientos de condiciones ambientales, incluyendo la calidad del agua, y principalmente el alimento a suministrar, ya que al suministrar alimento adecuado se podrá aumentara su supervivencia en cultivo.

En el medio natural los caballitos de mar son depredadores carnívoros visuales que consumen principalmente copépodos (Tipton y Bell, 1988; Vincent, 1994) y se ha demostrado que los copépodos calanoides mejoran el crecimiento y supervivencia de las primeras etapas de vida (Payne y Rippingale, 2000); sin embargo, los copépodos no son utilizados comúnmente para el mantenimiento de caballitos de mar ya que pueden llegar a ser difíciles de producir en números apropiados. Por el contrario, *Artemia* es el alimento más utilizado a pesar de no ser parte de su dieta natural (Job *et al.*, 1997; Holt, 2003; Olivotto *et al.*, 2006; Foster y Vincent, 2004), aunque en etapas avanzadas pueden ser alimentados con otras especies de zooplancton preservado por congelación (Koldewey, 2005; Lin *et al.*, 2009a). Por otra parte, en ambos casos se trata de alimentos que no hacen parte de su dieta natural principal, por lo cual existe la posibilidad de incrementar el éxito de su cultivo usando el alimento vivo que utilizan en el ambiente natural que, de acuerdo a la información disponible para otras especies, consiste principalmente en copépodos calanoides. Por lo anterior, el presente estudio tiene como objetivo evaluar al copépodo calanoide *Pseudodiaptomus euryhalinus* como alimento vivo para juveniles de caballitos de mar del Pacífico *H. ingens*.

2. ANTECEDENTES.

2.1. Biología de *Hippocampus ingens*.

Hippocampus ingens es comúnmente conocido como caballito del Pacífico. Presenta una gran variedad de colores, desde verde, café, marrón y gris hasta amarillo y dorado, y la mayoría del cuerpo está cubierto por manchas negras (Lourie *et al.*, 1999)

La longitud total de los adultos puede variar entre 13.0 y 19.0 cm, pero en el medio natural puede llegar hasta 30 cm (Lourie *et al.*, 1999), por lo que también se conoce como caballito gigante. La hembra sexualmente madura presenta en ocasiones parches oscuros en la aleta anal. En cautiverio, la actividad reproductiva se ha observado después de los tres meses de edad y el periodo de gestación es de 14 días (Lourie *et al.*, 1999 Gomezjurado, 2005). El macho libera en cada evento aproximadamente 400 crías, aunque existen registros de hasta 2000 crías por evento (Téllez-Mohedano *et al.*, 1997; Lourie *et al.*, 1999). Las crías al nacer miden aproximadamente 8.5 mm (Lourie *et al.*, 1999) y en las primeras etapas de vida (uno a dos meses) presentan un comportamiento pelágico ya que no utilizan su cola prensil para sujetarse.

2.1.1. Taxonomía.

La clasificación taxonómica del caballito de mar *H. ingens* es la siguiente:

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Clase: Actinopterygii

Orden: Syngnathiformes

Familia: Syngnathidae

Género: *Hippocampus*

Especie: *ingens* (Girard, 1859).

2.1.2. Morfología.

La morfología tan peculiar de los caballitos de mar los distingue del resto de todos los peces marinos. La variabilidad morfológica intraespecífica es limitada mientras que la interespecífica es pronunciada. El cuerpo de *H. ingens* está conformado de placas óseas sin escamas. Posee a lo largo de tronco y cola anillos rígidos que lo protegen y adopta una postura semirrecta con la cabeza ligeramente inclinada hacia abajo, formando casi un ángulo de 90° (Lourie *et al.*, 1999).

Posee una cola prensil con 38-39 anillos, una aleta dorsal única con 11 anillos, una anal bajo el área ventral y dos pectorales de 16 radios a ambos lados de la parte posterior de la cabeza. La aleta dorsal, con 19 radios, hace la función de propulsión permitiendo un desplazamiento en línea vertical, mientras que las aletas pectorales proporcionan el equilibrio (Lourie *et al.*, 1999).

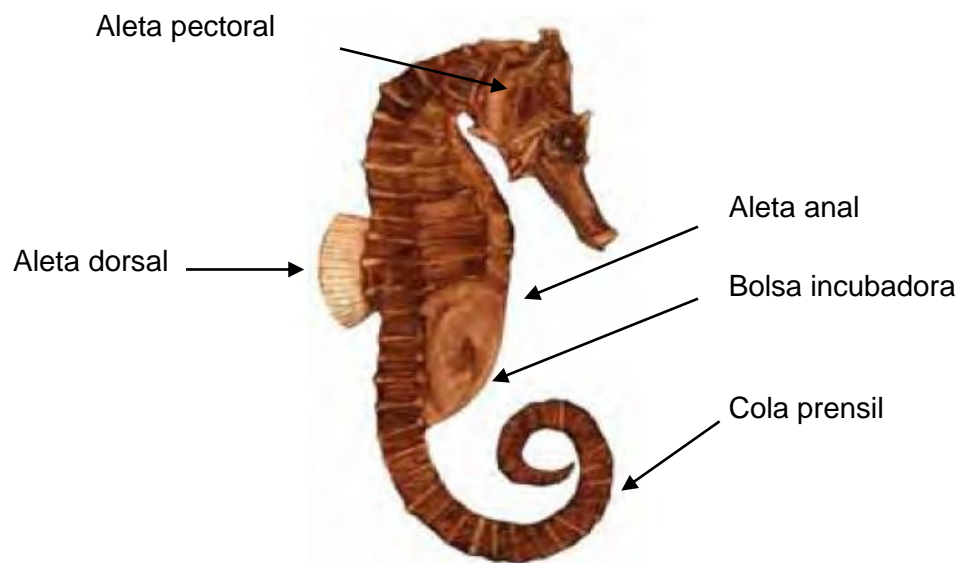


Figura 1. Morfología y un tipo de coloración de macho de *Hippocampus ingens* (Lourie *et al.*, 1999). Se señala la posición de la aleta anal, que no es visible en esta ilustración debido a la presencia de la bolsa incubadora.

2.1.3. Distribución.

Hippocampus ingens es el único caballito descrito hasta la fecha en el Océano Pacífico Oriental. Se distribuye desde las costas de San Diego, California, hasta

las de Perú. No presenta comportamiento migratorio, por lo cual cada población que se localice a lo largo de las costas del Pacífico Oriental debe ser considerada endémica (Lourie *et al.*, 1999).

2.2. Nutrición de los Caballitos de Mar.

Aunque poco se sabe acerca de los requerimientos nutricionales de los caballitos de mar, las primeras etapas de vida de la mayoría de las larvas y juveniles de peces marinos necesitan alimentos ricos en ciertos componentes nutricionales, principalmente en ácidos grasos altamente insaturados HUFAs (por sus siglas en Inglés) como los ácidos docosahexaenoico (DHA: 22:6n-3) y eicosapentaenoico (EPA: 20:5n-3) que, en el caso de los peces marinos deberían estar presentes en relación de aproximadamente 2:1 (Sargent *et al.*, 1997). Sin embargo, los requerimientos de HUFAs son desconocidos para los juveniles de caballitos de mar por lo que, como base para alimentarlos, se pueden considerar como una primera aproximación, los requerimientos de las larvas y juveniles de otras especies de peces marinos (Payne y Rippingale, 2000).

Chang y Southgate (2001) emplearon tres emulsiones comerciales (DC Selco, DC DHA y DC Super Selco) para enriquecer nauplios de *Artemia* y alimentar durante 30 días juveniles de *Hippocampus* spp de 3 días de edad. Los valores de n-3 HUFA en las tres emulsiones variaron de 200 hasta 450 mg g⁻¹ y los niveles de EPA y DHA variaron de 47 a 220 y 80 a 190 mg g⁻¹, respectivamente. Los caballitos alimentados con *Artemia* enriquecida con DC DHA y DC Super Selco mostraron mayores tasas de supervivencia (71.6 ± 6.0 y 78.3 ± 6.9 %, respectivamente) y de crecimiento en longitud total (20.2 ± 0.3 y 19.7 ± 0.3 mm, respectivamente) que los alimentados con *Artemia* sin enriquecer (48.3 ± 6.0 %; 18.1 ± 0.3 mm). De acuerdo a los resultados de este estudio, el contenido recomendable de DHA en la dieta de *Hippocampus* spp. es 9.3 mg DHA g⁻¹ de peso seco.

2.2.1. Nutrición y Alimentación de *H. ingens*.

No existen estudios específicos sobre los requerimientos nutricionales de *H. ingens*, mientras que en temas de alimentación se encontraron dos estudios en los cuales se establecieron protocolos de alimentación para esta especie.

Durante los primeros seis días después del nacimiento, Tellez-Mohedano *et al.* (1997) usaron un protocolo basado en el suministro de rotíferos (día 1-4), copépodos (días 3-5) y nauplios de *Artemia* (días 4-6), logrando una longitud total de 1.39 cm y una supervivencia de 70%. Después de este primer periodo los caballitos se mantuvieron en tanques de concreto de 120 000 L y se alimentaron durante las dos primeras semanas con copépodos colectados en el medio silvestre y con nauplios de *Artemia*. La única fuente de alimento fueron nauplios de *Artemia* durante las seis semanas siguientes, logrando tallas de 6.47 cm de longitud total y supervivencia de 83%.

Ortega-Salas y Reyes Bustamante (2006) cultivaron juveniles de *H. ingens* durante 35 días alimentándolos con rotíferos y nauplios de *Artemia*. Posteriormente, a partir de ejemplares de 1, 12 y 20 días de edad, los organismos se mantuvieron en un tanque de concreto de 100 000 L y se alimentaron con *Artemia* adulta durante 60 días con supervivencias de 21.5, 61.9 y 59 %, respectivamente.

2.3. Comportamiento Alimentario de los Caballitos de Mar.

La alimentación es el proceso de captura e ingestión del material que contiene los compuestos necesarios para el funcionamiento de los organismos vivos. Una de las etapas de este proceso es el comportamiento durante la toma alimentaria, cuyo estudio corresponde a la etología o ciencia del comportamiento animal (Guillaume *et al.*, 2002).

El comportamiento de captura del alimento del caballito de mar es bastante complejo: mediante su hocico, tubular y carente de dientes, realiza una rápida y coordinada expansión de la cavidad bucal al mismo tiempo que efectúa una fuerte succión. Esto causa un flujo de agua que ayuda jalar a su presa hacia el

hocico completamente abierto (Roos *et al.*, 2009). Debido a que los caballitos silvestres consumen únicamente alimento vivo, utilizan este comportamiento de captura como una estrategia ante el constante movimiento del mismo (Vincent, 1994). Son nadadores muy lentos y permanecen la mayoría del tiempo sujetos a estructuras sumergidas esperando el momento adecuado para cazar a su presa. (Olivotto *et al.*, 2008; Payne y Rippingale, 2000; Woods, 2000). Otras características del comportamiento alimentario de los caballitos de mar son: depredación visual (Sheng *et al.*, 2006), camuflaje y caza sigilosa (Woods, 2002; Foster y Vincent, 2004).

Sin embargo, pocos son los estudios relacionados con el comportamiento alimentario de *Hippocampus*. Entre estos, Martínez-Cárdenas y Purser (2007) demostraron que no existe diferencias significativas en el consumo de *Artemia* de juveniles de *H. abdominalis*, debidas al color de las paredes de los acuarios (transparente, blanco, amarillo, naranja y verde). Sheng *et al.* (2006) evaluaron el efecto de la temperatura (óptimo 26 °C), la intensidad de luz (óptimo 1834, 1014 y 5101 lux en organismos de 1, 5 y 10 días, respectivamente) en *H. trimaculatus*, y observaron que organismos de edad diferente ingieren presas de tamaño progresivamente mayor y que también incrementa el tiempo de digestión (2.5, 3.5 y 4 horas en ejemplares de 5, 10 y 15 días de edad).

Por otra parte, Lin *et al.* (2009b) analizaron el efecto de la intensidad de luz (óptimo 1000 lx), la densidad en cultivo (óptimo 0.25 org L⁻¹), la salinidad (óptimo 31-33‰) y la frecuencia de alimentación (óptimo 3 veces al día) sobre el crecimiento de sub-adultos de *H. erectus*, y Storero y González (2009) observaron que en cautiverio *H. patagonicus* demuestra una mayor preferencia por anfípodos y *Artemia* que por decápodos juveniles como presas.

Las características del comportamiento alimentario que deben estudiarse con mayor detalle para lograr comprender mejor la biología de estas especies, son: tasas de alimentación, ritmos diarios de alimentación y selección del tipo de presa (Sheng *et al.*, 2006).

2.4. Copépodos y *Artemia* como Alimento Vivo.

El caballito de mar es un depredador visual. Por tanto, aparte de su disponibilidad en cantidad suficiente, sus presas deben cumplir con ciertas características básicas, como ser visualmente atractiva y tener forma, movilidad y tamaño adecuados y es posible que, como para otras larvas o juveniles de peces, los estímulos químicos también tengan importancia (Cunha y Planas, 1999; Civera-Cerecedo *et al.*, 2004). En el medio natural las principales presas de *Hippocampus* spp. son copépodos, anfípodos, carideos y misidaceos (Teixeira y Musick, 2001; Woods, 2002). Muy frecuentemente en cautiverio son alimentados con estas presas colectadas del medio natural (Payne y Rippingale, 2000; Woods, 2000), si bien esta fuente de alimento no es constante, ya que puede escasear en algunas estaciones del año, y es además insegura, ya que puede contener bacterias patógenas y parásitos entre otros microorganismos (Stottrup y Norsker, 1997, Planas y Cunha, 1999). Por ejemplo las bacterias presentes en el alimento vivo y principalmente aquellas del género *Vibrio* manifiestan un riesgo para los caballitos de mar, ya que las cepas patógenas tomaran ventaja de aquellos organismos enfermos o vulnerables por deficiencias nutricionales.

Por otra parte los nauplios de *Artemia* son utilizados comúnmente como alimento en los cultivos de los juveniles de diferentes especies de *Hippocampus* (Woods, 2003a,b) y de las larvas de otros peces marinos, debido a su disponibilidad y la facilidad de su producción y mantenimiento (Payne y Rippingale, 2000). Sin embargo, esta presa no es la más adecuada, principalmente por su bajo contenido de algunos ácidos grasos altamente insaturados de la serie n-3 (Merchie, 1996), por los precios fluctuantes de sus quistes y por los costos generados por su mantenimiento pues deben ser cultivados hasta metanauplios o adultos para alimentar a las fases más avanzadas de caballitos de mar (Woods y Valentino, 2003).

Para mejorar la calidad de *Artemia* se emplean enriquecedores comerciales (SELCO, Super-SELCO, ALGAMAC, emulsiones concentradas, entre otras) que

mejoran las tasas de supervivencia y el crecimiento en juveniles de *Hippocampus* (Shapawi y Purser, 2003) pero estos productos son caros, por lo cual su uso incrementa los costos de producción.

Una alternativa potencialmente viable sería el uso de una dieta más cercana a la natural, principalmente basada en copépodos, aunque los métodos de cultivo de algunos copépodos no están totalmente establecidos y su uso en la acuicultura no es muy frecuente. Sin embargo, los copépodos presentan diversas ventajas en comparación con los alimentos vivos empleados convencionalmente (rotíferos y *Artemia*), como:

- Movimiento zigzagueante, atractivo para los peces
- Amplio espectro de tallas. Algunos copépodos calanoides tropicales como *Parvocalanus crassirostris* presentan tallas menores de 100 μm hasta el tercer estadio naupliar (Mackinnon *et al.*, 2003), mientras que *Pseudodiaptomus euryhalinus*, cuyos nauplios recién eclosionados miden 71 μm , puede alcanzar tallas de 1735 μm en los adultos (Puello-Cruz, 2008).
- Una dieta basada en copépodos tiene como efecto una disminución de las deformidades y de la pigmentación deficiente de los peces.
- Son una fuente natural de antioxidantes, astaxantina, vitamina C y E.
- Tienen altos contenidos de HUFAs, principalmente DHA EPA y ácido araquidónico (ARA) (Schipp, 2006).

Debido al gran potencial y beneficios de los copépodos como alimento vivo, se han realizado muchas investigaciones para conocer las condiciones óptimas de su cultivo para la alimentación de etapas juveniles de diferentes especies de peces (Stottrup y Norsker, 1997; Schipp, 2006; Puello-Cruz *et al.*, 2004, 2006, 2009).

Existen también muchos ejemplos que confirman que los copépodos pueden ser utilizados con éxito como alimento para los juveniles de caballito de mar: por

ejemplo, según Liang (1992) los copépodos son indispensables para el cultivo de juveniles y de acuerdo a los resultados de Payne y Rippingale (2000), el uso del calanoide *Gladiferens imparipes* mejoró el crecimiento y la supervivencia de juveniles de *H. subelongatus*.

Resultados similares fueron reportados en años más recientes por Olivotto *et al.* (2008) y Blanco *et al.* (2010, 2011) para juveniles de *H. reidi* y *H. guttulatus*, que confirma la posibilidad de mejorar la supervivencia y la tasa de crecimiento de los juveniles de la especie objeto de este estudio.

2.5. Enfermedades de Origen Bacteriano en los Caballitos de Mar.

La abundancia de bacterias heterótrofas indica la cantidad de materia orgánica presente en un determinado tipo de ambiente y su importancia reside en que su actividad contribuye al reciclaje de los metabolitos biogénicos. De este modo se establece una relación entre la cantidad de materia orgánica presente y la cantidad de bacterias que la utilizan y la reciclan en nueva biomasa (Williams, 2000). Entre las bacterias presentes en el cultivo de organismos marinos es común la presencia de algunas especies del género *Vibrio*, el cual se encuentra comúnmente en agua marinas y puede ser fuente de problemas sanitarios, dependiendo principalmente de su concentración y del estado de salud de los organismos cultivados (Nealson *et al.*, 1993; Thompson *et al.*, 2004; Thomson, 2005; Austin, 2006).

Existen varios estudios que describen la asociación entre organismos cultivados y bacterias, las cuales pueden influenciar significativamente el crecimiento y la supervivencia especialmente en el caso de juveniles (Cahill, 1990; Hansen y Olafsen, 1999), pero la información sobre una posible relación de las bacterias con los caballitos de mar está limitada a pocos trabajos recientes, entre los cuales destaca el realizado por Balcázar *et al.* (2010) sobre la presencia de *Vibrio* en ejemplares enfermos.

En condiciones de cultivo, el alimento de los caballitos consiste principalmente en *Artemia* sp. cultivada o preservada, y en misidáceos y copépodos

generalmente colectados del medio natural (Payne y Rippingale, 2000; Planas *et al.*, 2008; Woods y Valentino, 2003), que son una fuente de vectores potencialmente patógenos en el sistema de cultivo (Puello-Cruz *et al.*, 2006). Por ello, es importante verificar la concentración de microorganismos asociados con el alimento y con el medio de cultivo de los caballitos de mar.

En quistes de *Artemia* sp. se han encontrado bajos niveles de bacterias, particularmente de Vibrionaceae, que aumentan drásticamente después de la eclosión de los nauplios. Esto sugiere que este grupo se encuentra latente y solo espera condiciones óptimas para reproducirse (Dehasque *et al.*, 1991). Por otro lado, Puello-Cruz *et al.* (2006) demostraron que el número de bacterias heterótrofas y de *Vibrio* en el agua del cultivo de copépodos puede reducirse significativamente mediante un proceso de depuración.

3. JUSTIFICACIÓN.

La demanda de caballitos de mar ha incrementado al grado de convertirlos en organismos vulnerables a la depredación por pesca. Por lo anterior, parece necesario disminuir esta presión mediante su cultivo, principalmente de las primeras etapas de vida, mejorando el crecimiento y la supervivencia mediante el suministro de alimento vivo que cumpla con las exigencias nutricionales de estos organismos. Por otra parte, en el caso del caballito del Pacífico, *Hippocampus ingens*, no existe suficiente información sobre el régimen de alimentación más adecuado, que es el tema del presente estudio.

4. HIPÓTESIS.

El suministro de una dieta basada en el copépodo *Pseudodiaptomus euryhalinus* tiene un efecto positivo sobre el crecimiento y la supervivencia de juveniles de *H. ingens*, en comparación con los que se logran suministrando el alimento vivo utilizado convencionalmente (*Artemia*).

5. OBJETIVOS.

5.1 Objetivo General.

Evaluar los copépodos *Pseudodiaptomus euryhalinus* como alimento vivo y su efecto en el crecimiento y la supervivencia en juveniles de caballito de mar *Hippocampus ingens*.

5.1.1 Objetivos Particulares.

1. Evaluar la tasa de alimentación y comportamiento alimentario en juveniles de *Hippocampus ingens* alimentados con copépodos y *Artemia*, durante 30 días bajo condiciones semicontroladas.
2. Comparar la tasa de crecimiento en juveniles de *Hippocampus ingens* alimentados con copépodos y *Artemia*, durante 30 días bajo condiciones semicontroladas.
3. Comparar la tasa de supervivencia en juveniles de *Hippocampus ingens* alimentados con copépodos y *Artemia* durante 30 días bajo condiciones semicontroladas.
4. Monitorear semanalmente el conteo total viable de heterótrofas totales y *Vibrio* en el agua de los cultivos de *Hippocampus ingens*, en copépodos y en *Artemia*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1. Experimentos Preliminares en CIAD Mazatlán.

Todos los caballitos de mar *Hippocampus ingens* que se utilizaron en los experimentos (incluyendo los preliminares) fueron proporcionados por el Biólogo Eliezer Zuñiga Villareal, propietario de la granja de caballitos de mar "INGENS Cultivo Marinos", ubicada en la Isla de la Piedra en Mazatlán. Se realizaron experimentos preliminares en las Instalaciones del CIAD - Mazatlán, para obtener mayor información y estandarizar métodos de cultivo para el caballito de mar, con los cuales se obtuvieron los siguientes resultados:

Preliminar 1.

En Mayo del 2010 se realizó el primer experimento preliminar con 50 juveniles de 3 meses de edad. Después de su aclimatación los organismos se repartieron en seis acuarios de acrílico de 50 L de capacidad, con paredes laterales oscuras y pared frontal transparente (dimensiones aprox. (LXaXh) 85 X 25 X 25 cm), los cuales no contaban con sistema de recirculación de agua, por lo que se realizaron recambio diarios del 30 % del volumen total con agua marina filtrada a través de cartuchos de 2 y 5 µm y esterilizada por UV. El fotoperiodo fue 12 h luz /12 h oscuridad.

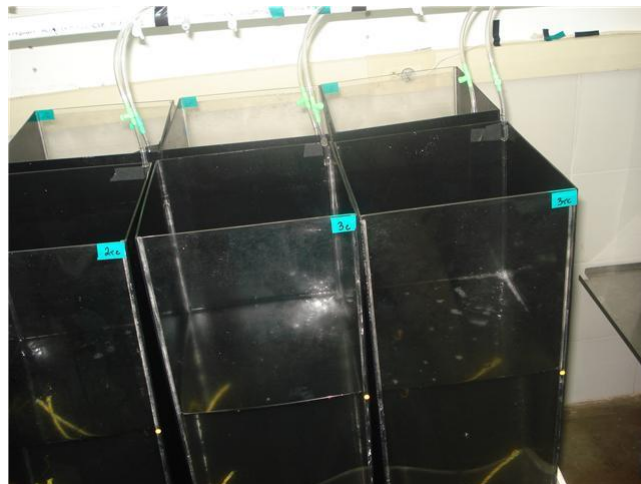


Figura 2. Sistema experimental para el cultivo de juveniles de caballito de mar *Hippocampus ingens*.

Los valores medios de talla inicial fueron 12.06 ± 1.06 mm de longitud de cabeza, 20.72 ± 2.36 mm de longitud de tronco, 28.58 ± 3.31 mm de longitud de cola, 49.30 ± 4.50 mm de altura y el peso húmedo medio fue 0.23 ± 0.05 g.

Durante las cuatro semanas de experimentación las condiciones de cultivo de *H. ingens* se mantuvieron aproximadamente constantes (temperatura de 26 ± 1.89 °C, salinidad de 34 ± 1.41 ‰, oxígeno disuelto de 6.36 ± 0.35 mg L⁻¹, nitritos de 0 mg L⁻¹ y amonio de < 0.4 mg L⁻¹). Los organismos se alimentaron con nauplios y metanauplios de *Artemia*, copépodos calanoides (*Pseudodiaptomus euryhalinus*) y harpacticoides (*Tisbe monozota*) a saciedad aparente tres veces al día (9:00, 13:00 y 18:00 hrs).

Se registraron altas mortalidades, logrando únicamente 2% de supervivencia de organismos de 4 meses de edad. Antes de morir, los caballitos presentaron coloración rojiza-rosácea en todo el cuerpo, desprendimiento de la piel únicamente en el área de la cola, nado errático permaneciendo la mayoría del tiempo en la superficie de la columna de agua, espasmos y después de morir un desprendimiento de grandes segmentos de piel en todo el cuerpo.



Figura 3. Caballito de mar *Hippocampus ingens* liofilizado.

Los resultados bacteriológicos mostraron la presencia de bacterias en la piel de los organismos (Tabla 1), las cuales resultaron sensibles a los antibióticos Cloranfenicol (prohibido por la FAO, 2002) y Florfenicol.

Tabla 1. Conteo total viable de bacterias en TCBS potencialmente del género *Vibrio* y bacterias en agar marino de heterótrofas totales en agua de cultivo, *Artemia*, piel y órganos de *Hippocampus ingens*.

Análisis	Agua UFC mL ⁻¹	Artemia UFC Org ⁻¹	Piel <i>H. ingens</i>	Órganos <i>H. ingens</i>
<i>Vibrio</i> (Agar TCBS)	1.63 x 10 ⁴	5.7 x 10 ³	Presencia	Presencia
Heterótrofas Totales (Agar Marino)	Incontable	Incontable	Presencia	Presencia

Preliminar 2 (Febrero 2011).

En objetivo fue adaptar un sistema de cultivo adecuado para juveniles de 0 días post-nacimiento (dpn) de *H. ingens* debido a las dificultades con los acuarios de acrílico del sistema anterior, como la limpieza por el diseño de los mismos, además de la necesidad de incluir un sistema de recirculación de agua.

El sistema consistió de acuarios cilíndricos de 50 L de capacidad con fondo blanco y paredes oscuras, conectados a un sistema de recirculación semicerrado con flujo de 500 mL min⁻¹ (100% de recambio del volumen total aproximadamente en un hora y media). El sistema de recirculación se componía de un filtro mecánico, filtro biológico, calentadores y espumador (Skimmer) (Figura 4a). En el sistema de cultivo se sembraron 2 org L⁻¹ de 0 dpn de 6.18 ± 1.05 mm de altura, y se mantuvieron a una temperatura de 20.07 ± 0.33 °C y oxígeno disuelto de 3.98 ± 0.61mg L⁻¹.



Figura 4. Sistema experimental para juveniles de 0 dpn de *Hippocampus ingens* con recirculación de agua y flujo de desagüe de filtro de tambor.

Durante 20 días de experimentación los organismos se alimentaron con copépodos *Pseudodiaptomus euryhalinus* a una densidad de 2 cop mL⁻¹. El protocolo de alimentación fue nauplios de copépodos del día 1 al 4, copepoditos del día 5 al 8 y copépodos adultos el resto de la fase experimental. Se decidió utilizar únicamente el copépodo *P. euryhalinus* ya que tanto los juveniles recién nacidos de *H. ingens* como estos copépodos tienen un comportamiento pelágico, además de observar en el preliminar 1 mejor aceptación de los copépodos calanoides que de los harpacticoides.

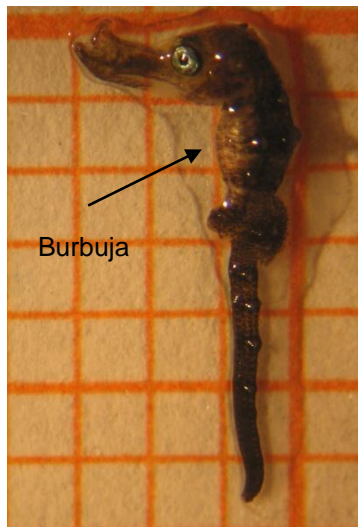


Figura 5. Juvenil de 1 dpn de *Hippocampus ingens* con problema de la burbuja en el área abdominal.

La supervivencia al final del experimento fue de 1% y la longitud de las diferentes medidas morfométricas fueron de 36.72, 23.14, 13.58, 9.75 y 5.53 mm de altura, longitud de cola, tronco, cabeza y hocico respectivamente (Figura 6).

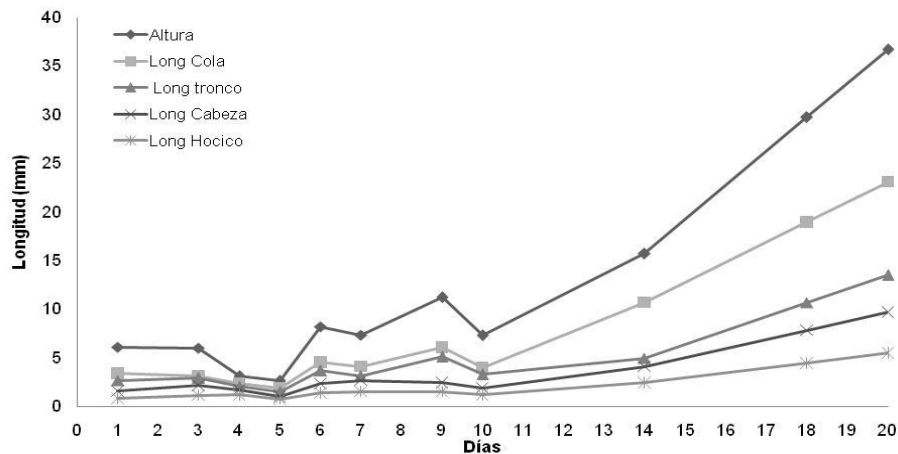


Figura 6. Medidas morfométricas de juveniles de *Hippocampus ingens* de 0 hasta 20 dpn.

Las altas mortalidades que se presentaron durante la etapa experimental se atribuyen al flujo del agua debido a que los caballitos de mar quedaban atrapados en la malla del tambor de desagüe, limitando su nado y alimentación, además se observó la presencia de una burbuja en el área del abdomen y vejiga natatoria (Figura 5), lo que provocó que los organismos se mantuvieran flotando en la superficie sin lograr alimentarse.

Preliminar 3 (Marzo 2011).

Con la intención de evitar las altas mortalidades y los problemas presentados en el preliminar 1 y 2 se adaptó un sistema experimental diferente. El diseño consistió en 9 jarras eclosionadoras (McDonalds) de huevos de 6 L de capacidad, cada tratamiento con 3 replicas adaptado a un sistema de recirculación independiente similar al descrito anteriormente. A cada jarra se le colocó un tubo de PCV con una malla de 200 μm en la parte superior para evitar que los organismos pudieran ir a la superficie y tomar aire (Figura 7).

En este preliminar se probaron tres dietas, dos de las cuales son utilizadas convencionalmente (rotíferos y nauplios de *Artemia*) en juveniles (0 a 30 dpn) de caballitos de mar, debido a los tamaños adecuados de las presas para esta etapa y la tercera consistió en la misma especie de copépodos usada en los experimentos previos, la cual había mostrado buena aceptación. El protocolo de alimentación para los juveniles recién nacidos de *H. ingens* durante la primera semana fue 2 cop mL⁻¹ para la dieta 1, rotíferos *B. plicatilis* (20 rot mL⁻¹) para la dieta 2 y mezcla de copépodos y rotíferos (50%-50%) para la dieta 3.



Figura 7. Sistema experimental para juveniles de 0 dpn recién nacidos de *Hippocampus ingens*. A la izquierda jarras eclosionadoras con sistema de recirculación., A la derecha tuvo de PVC con malla de 200 µm adaptado en la parte superior de la jarra eclosionadora.

Se sembraron 2 org L⁻¹ en cada tratamiento, sin embargo a los 6 días de cultivo se registró 100% de mortalidad en todos los tratamientos. Los organismos nuevamente presentaron el problema de la burbuja, por lo que se buscó analizar los organismos por medios de procesos histológicos en el laboratorio de histopatología de CIAD Mazatlán, los cuales mostraron hiperplasia lamelar en el área de las branquias de *H. ingens* (Anexo I).

6.2. Experimento en Granja Comercial

A pesar de lograr obtener información con los experimentos preliminares, las modificaciones realizadas a los sistemas de cultivo en el CIAD no fueron suficientes para lograr supervivencias adecuadas, por lo que se tomó la decisión de realizar el estudio en las instalaciones de la Granja “INGENS Cultivo Marinos” ubicada en la Isla de la Piedra en Mazatlán, la cual actualmente produce caballitos de mar *Hippocampus ingens* y otros peces marinos de ornato y se encuentra registrada en los formularios del CITES, por lo que los organismos permanecen protegidos y su manejo se encuentra dentro de las normas reglamentarias. El experimento se realizó con los juveniles de 41 días disponibles en la granja.

6.3. Cultivo de Copépodos *Pseudodiaptomus euryhalinus*.

En las Instalaciones de CIAD – Mazatlán.

El cultivo de copépodos a escala piloto en las instalaciones de CIAD - Mazatlán, se realizó en tanques cilíndricos de fondo cónico de 1000 L y en tanques cilíndricos de 7000 L de capacidad (ambos con paredes y fondo blanco) ubicados a la intemperie (con malla-sombra de 30% de eliminación de luz) con fotoperiodo natural, de 10 h luz / 14 h oscuridad. Los tanques fueron llenados a tres cuartas partes del volumen total con agua marina bombeada de playa Bruja, la cual se filtró con cartuchos de 5 y 2 μm y esterilizó con luz UV. Después se procedió a fertilizar con Bayfolan® y metasilicatos (3.75 g por 100 L de cada uno), se colocó una manguera con piedra aireadora en el centro y fondo de cada tanque y posteriormente se sembró la microalga *Chaetoceros muelleri*. Cuando la concentración de la microalga alcanzó aproximadamente 320 cel μl^{-1} (de 1 a 2 días) se colocó 1 cop mL^{-1} obtenidos del cepario de del laboratorio de nutrición de CIAD - Mazatlán.

En la Granja INGENS Cultivos Marinos

En la Granja INGENS Cultivos Marinos el sistema de cultivo consistió en 11 tanques cilíndricos con paredes y fondo blanco de 200 L y una pileta de cemento de 2000 L de capacidad, ambos ubicados a la intemperie. Se aplicó la misma metodología de cultivo descrita anteriormente, la microalga empleada fue *Chaetoceros calcitrans* y los parásitos, bacterias, copépodos u otros organismos que pudieran contaminar el cultivo de *Pseudodiaptomus euryhalinus* se eliminaron con 200 mL de cloro (Cloralex®), y el agua del cultivo (previo a la siembra de microalga y copépodos) se dejó reposar durante 24 horas. Posteriormente se agregaron 5 g de tiosulfato de sodio para neutralizar el cloro.

Las condiciones del cultivo fueron: temperatura de 24.48 ± 0.59 °C, salinidad de 34.38 ± 0.74 ‰ y oxígeno disuelto de 4.84 ± 0.20 mg L⁻¹. El tiempo estimado del cultivo para que los organismos se reprodujeran y se obtuvieran densidades adecuadas para realizar la cosecha total fue de 15 días. Además cuando fue necesario se cosecharon copépodos del cultivo de mantenimiento a escala piloto de las instalaciones de CIAD, los cuales se concentraron en contenedores plásticos de 5 L de capacidad para ser transportados a la granja donde se colocaron en el sistema de depuración, se sembraron en los tanques de crecimiento o se dieron de alimento inmediatamente a los caballitos de mar según fuera el caso.

Proceso de Depuración.

El proceso de depuración consistió en cosechar completamente el tanque de cultivo de copépodos y colocar los organismos en un tanque de 200 L con agua marina previamente filtrada y desinfectada bajo las condiciones descritas anteriormente. Se agregaron 6 L de un cultivo de microalgas del cepario al tanque de depuración el cual alcanzó aproximadamente una concentración de 80 cel µl⁻¹. Y finalmente los organismos se dejaron depurar durante 24 horas

previo a la alimentación de los caballitos de mar (proceso de depuración modificado de Puello-Cruz *et al.*, 2006).

6.4. Cultivo de *Artemia*.

En la Granja INGENS Cultivos Marinos.

Por motivos de confidencialidad, la información sobre la técnica para el cultivo de *Artemia* no es disponible para el público en general. Los organismos usados como dieta se mantuvieron desde el momento de su eclosión hasta etapa adulta en piletas de cemento de 2000 L y se alimentaron con cebada. Antes de ofrecerla como se depuraba en agua dulce por media hora (Anexo II).

6.5. Obtención de Organismos.

Los organismos que se utilizaron para la determinación del consumo de alimento diario y el experimento principal, se obtuvieron del cultivo de juveniles de *H. ingens* en cautiverio los cuales se encontraban en jaulas dentro de piletas de 7000 L.

6.6. Determinación de Consumo de copépodos y de *Artemia*.

Previo al experimento principal se determinó el consumo de alimento diario de los caballitos para establecer un régimen de alimentación. Con el propósito de verificar si el consumo diario de biomasa era similar, independientemente del tipo de alimento, se determinó el peso seco individual de las dos especies usadas en este estudio.

Para determinar el peso seco de los copépodos se concentraron 15 copépodos adultos en charolas de aluminio (previamente llevadas a peso constante) por quintuplicado, las muestras se secaron a 105 °C durante 24 horas y se pesaron hasta verificar que el peso era constante. La biomasa de un copépodos adulto fue de 0.033 mg y se comparó con datos de literatura para *Artemia* adulta, que es de 0.68 mg.

Para determinar el consumo de biomasa se seleccionaron al azar 10 juveniles de 45 días de edad de las jaulas, con una longitud total promedio de 45 mm, que se distribuyeron al azar en 10 frascos vitroleros de un litro, cinco de los cuales recibieron 5 cop mL⁻¹ con talla entre 1520 y 1735 µm y los cinco restante 0.59 *Art* mL⁻¹ con talla media de 2000 µm. Las condiciones en cada recipiente se mantuvieron constantes (25.98 ± 0.12 °C de temperatura, 36.8 ± 0.14 ‰ de salinidad y 2.42 ± 0.34 mg L⁻¹ de oxígeno disuelto).

Después de 24 horas los copépodos y *Artemias* remanentes fueron contados para calcular con la siguiente formula el consumo total en ese lapso de tiempo.

$$\text{TCD} = (A_S - A_R) N^{-1} \quad (1)$$

Dónde:

TCD = Tasa de Consumo por Día (copépodos•juvenil⁻¹ y/o *Artemias*•juvenil⁻¹)

A_R = Alimento Remanente

A_S = Alimento Suministrado

N = Número de caballitos

Los valores máximos de la tasa de consumo de copépodos y *Artemias* fueron utilizados para ajustarse a una relación de 1: 1, multiplicando la TCD⁻¹ (Tasa de consumo por Día) con el peso seco de cada presa y así lograr ofrecer la misma biomasa a cada caballito. Las tasas de consumo máximas ajustadas fueron de 2500 copépodos•juvenil⁻¹ y 130 *Artemias*•juvenil⁻¹, es decir la biomasa seca de un juvenil de *Artemia* corresponde aproximadamente a 20 copépodos adultos, que fueron los valores usados para el régimen de alimentación.

6.7. Diseño Experimental.

Durante 30 días de experimento se probaron tres tratamientos de alimentación con 3 replicas, en el tratamiento 1 (T1) se alimentó únicamente con una ración diaria de copépodos equivalente a 1 TCD^{-1} de copépodos•juvenil⁻¹, en el tratamiento 2 con *Artemia* a una densidad de 1 TCD^{-1} de *Artemias*•juvenil⁻¹ y en el tratamiento 3 con una mezcla de copépodos y *Artemia* a una densidad de 0.5 TCD^{-1} de copépodos•juvenil⁻¹ y 0.5 TCD^{-1} de *Artemias*•juvenil⁻¹.

La ración diaria se aumentó 20% en la segunda y tercera semana del experimento.

6.7.1. Cultivo Experimental de Juveniles.

Entre los organismos de menor edad (41 días de nacimiento), se seleccionaron 99 especímenes de entre 32 y 36 mm de altura, que se concentraron en una cubeta de 20 L y se sembraron aleatoriamente a una densidad de 11 caballitos por acuario ($1 \text{ juvenil} \cdot 10 \text{ L}^{-1}$).

El área de cultivo se ubicaba en un cuarto cerrado con ventanas las cuales proporcionaban luz natural (fotoperiodo de 10 horas luz - 14 horas oscuridad) y una temperatura ambiente, no se controló ningún factor ambiental.

6.7.2. Sistema Experimental.

El sistema experimental consistió de 9 acuarios rectangulares de cristal de 110 L de volumen útil, cada tratamiento con sus tres repeticiones estaban conectados a un sistema de recirculación semicerrado independiente. Los acuarios del sistema experimental (Figura 8) fueron llenados con agua marina previamente filtrada y esterilizada (mismas especificaciones previas). El flujo del agua fue de 1.8 L min^{-1} haciendo un cambio del 100% del total del volumen del acuario (110 L) cada hora. Además cada acuario contaba con tubos plastificados de aproximadamente 2 mm de diámetro como sustrato para que los organismos pudieran sujetarse y un tubo de PVC con perforaciones continuas (2 cm de separación entre una perforación y otra) alrededor de toda el área del tubo, al cual se le colocaba durante el día (10:00 – 17:00hrs) una

mallita de 200 μm para evitar la pérdida de caballitos o alimento vivo y por las noches (17:00 – 10:00hrs) se cambiaba esta mallita por una de poro ancho (aproximadamente 6 mm) para que el alimento vivo pudiera filtrarse eliminando de los acuario todos los copépodos y/o *Artemia* para el día siguiente.

El sistema de recirculación se conformaba de una java plástica de 100 L de capacidad a la cual se adaptaron: a) Un filtro mecánico (mallita de 100 μm), b) una cama de tela de perlón, c) un filtro biológico (tubos de PVC cortados en aros dentro de costales), d) un eliminador de proteínas (Skimmer) y e) una bomba sumergible, para recirculación del agua en los acuarios (Figura 8). Si el nivel del agua de la java llegaba a bajar este se reponía con agua nueva. La circulación del agua en tratamiento fue de acuerdo al orden (a, b, c, d, e) descrito anteriormente

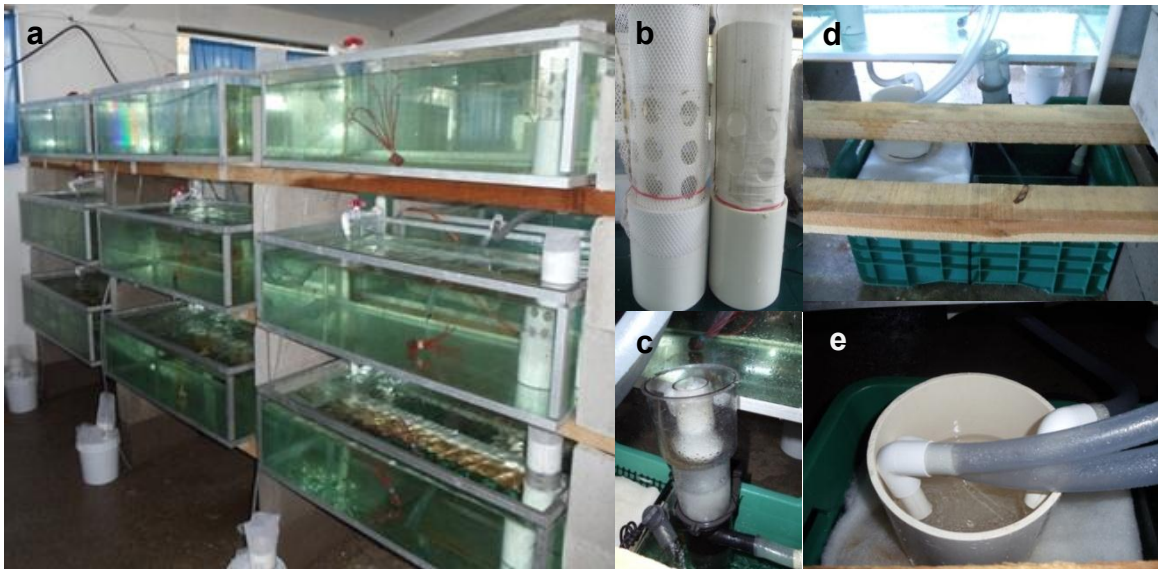


Figura 8. Diseño experimental para el cultivo de juveniles de caballitos de mar *Hippocampus ingens*. a) sistema experimental de acuarios, b) filtros en acuarios, c) sistema de recirculación, d) eliminador de proteínas (Skimmer) y e) filtro mecánico (colector de alimento remanente).

Diariamente se sifoneaban todos los acuarios eliminando las heces, se revisaba el nivel de agua de los acuarios, y el buen funcionamiento del sistema de recirculación. Por las mañanas (11:30 hrs) se medían con un multimedidor YSI 85, la temperatura, salinidad, oxígeno disuelto y con un potenciómetro marca

Hanna Modelo *pHep* el pH de cada acuario. Los valores medios registrados durante todo el experimento fueron 24.22 ± 0.06 °C, 32.45 ± 2.52 ‰, 5.39 ± 1.428 mg L⁻¹ y 8.55 respectivamente.

El amonio y nitrito se midieron cada 2 días y se mantuvieron en 0.35 y 0.24 mg L⁻¹.

6.7.3. Muestreos.

Semanalmente se midieron la altura, longitud de cabeza y longitud de hocico de cada uno de los caballitos de los diferentes tratamientos. Los organismos vivos se concentraron en vasos de 1 L y sin ningún efecto anestésico evitando el mayor estrés se colocaron sobre una hoja milimétrica intentando que estuvieran lo más rectos posible y se tomaron fotografías individuales.

En los muestreos bacteriológicos, semanalmente se tomaron 40 copépodos y 40 *Artemia* de cada cultivo respectivamente y el agua de cultivo de *H. ingens* se tomó de un acuario al azar de cada tratamiento con ayuda de bolsas esterilizadas. Únicamente al final del experimento se muestrearon 12 caballitos por tratamiento. .

6.8. Análisis del Comportamiento Alimentario.

6.8.1. Tasa de Alimentación por Día.

El consumo diario de alimento de cada tratamiento se calculó por diferencia entre la concentración de alimento suministrado y remanente con la fórmula descrita en la sección 6.6.

El alimento remanente de los 3 acuarios de cada tratamiento se concentraba diariamente de manera independiente entre tratamientos en un tamiz de 100 µm (filtro mecánico), ubicado en el sistema de recirculación, de donde se contabilizaba el número de copépodos y/o *Artemia* no consumidos por los caballitos de mar. Este valor se sustituyó en la fórmula dando como resultado las tasas de consumo diario por caballito.

6.8.2. Comportamiento y Estrategia Alimentaria.

Diariamente, media hora después de la incorporación del alimento en cada acuario se observó el comportamiento de los caballitos en cada tratamiento, con el propósito de conocer la acción y reacción de los organismos ante la presa, así como la estrategia de alimentación y captura de acuerdo al número de caballitos que se sujetaron al sustrato para continuar la alimentación de esta forma.

6.9. Determinación de Crecimiento y Supervivencia.

La supervivencia se determinó contabilizando diariamente el número total de caballitos de mar en cada tratamiento, y el crecimiento analizando cada una de las fotografías con la ayuda del programa Image-Pro Plus 6.0. En la Figura 9 se pueden observar las variables de crecimiento analizadas.

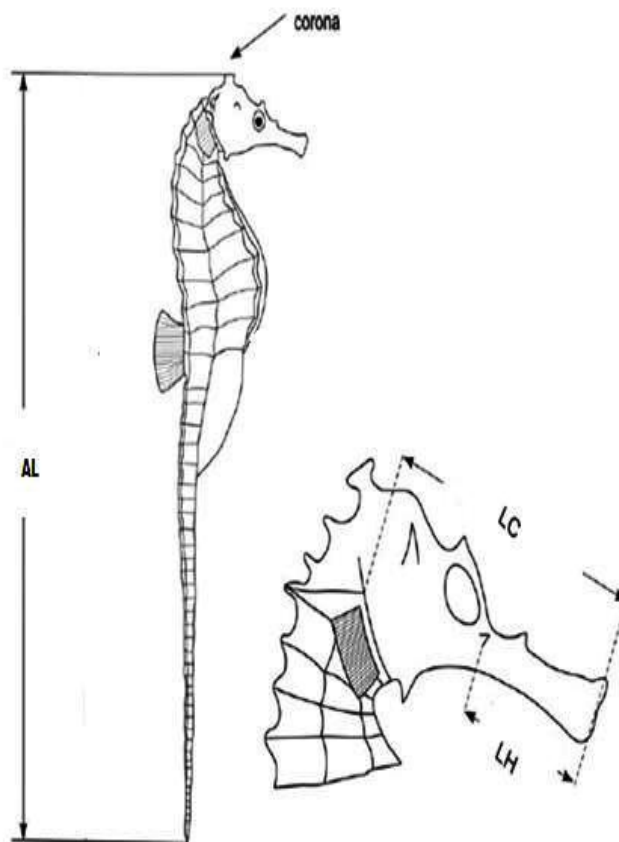


Figura 9. Medidas morfométricas del caballito de mar *Hippocampus ingens*. (Modificado de Lourie *et al.*, 1999).

Dónde:

AL= Altura

LC:=Longitud de Cabeza

LH =Longitud de Hocico

Con los valores medios de cada una de las variables de crecimiento se calculó la tasa de crecimiento con ayuda de la fórmula de regresión lineal

$$y = mx + b \quad (4)$$

Donde:

y= Tasa de Crecimiento (mm)

b= Talla inicial (mm)

m= Pendiente de la recta

x= Tiempo (días)

6.10. Conteo Total Viable de Heterótrofas Totales y *Vibrio*.

El material usado para estas pruebas fue previamente esterilizado en una autoclave (STERILMATIC, MarketForge Industries), a una temperatura de 115 – 121 °C por 15 minutos y a una atmósfera de presión.

En los análisis de heterótrofas totales se utilizó el medio de cultivo agar marino (Medio Zobell) y para los análisis presuntivos del género *Vibrio* se utilizó el agar Tiosulfato Citrato de Sales de Bilis (TCBS).

En el caso de las muestras de agua se realizaron diluciones seriales (10^{-3} y 10^{-4}) de cada tratamiento y se sembraron 100 µL con un rastrillo de vidrio en los medios de cultivo TCBS y agar Marino.

Para las muestras de copépodos y *Artemia* se tomaron 40 organismos de cada uno, se enjuagaron con solución salina y posteriormente se maceraron y homogeneizaron para realizar las dos diluciones seriales (10^{-4} y 10^{-5}) en tubos

ependorf y sembrar 100 μL en los medios de cultivo correspondientes (TCBS y agar Marino).

Con los caballitos de mar (12 por tratamiento), se realizó un frotis en vivo de la piel con un hisopo estéril y la muestra se sembró en forma de estría directamente en los 2 medios de cultivo utilizados (TCBS y agar Marino), para identificar la presencia o ausencia de bacterias.

Todas las cajas petri sembradas de los procesos descritos anteriormente, se incubaron durante 24 horas a 30 °C y a las 12 y 24 horas se realizó el conteo de las colonias usando un contador de colonias Darkfield Québec de American Optical. El conteo de colonias se reporto para el alimento como UFC Org⁻¹ para el agua como UFC mL⁻¹ y para la piel de los caballitos como presencia o ausencia de bacterias.

6.11. Análisis Estadístico.

Los datos de comportamiento y estrategia alimentaria, crecimiento (longitudes finales y tasa de crecimiento) y de supervivencia se compararon mediante pruebas de análisis de varianza de una vía (ANOVA) después de verificar su normalidad y homogeneidad de varianzas con las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Bartlett, respectivamente y, cuando se encontraron diferencias significativas entre tratamientos se aplicó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Se trabajó con un nivel de confianza de 95%. Se utilizo el paquete estadístico SigmaPlot 11.0.

7. RESULTADOS.

7.1. Tasa de Alimentación por Día.

En la Figura 10 se pudo observar una tendencia al aumento de la tasa de consumo diario de alimento en los tres tratamientos al aumentar la edad de los caballitos. Iniciando con valores medios de tasas de alimentación de 87 *Artemias*•juvenil⁻¹•día⁻¹ la primera semana hasta 184 *Artemias*•juvenil⁻¹•día⁻¹ durante la última semana para el tratamiento de *Artemia*, de 1202 hasta 1742 *Artemias*+copépodos•juvenil⁻¹•día⁻¹ para el tratamiento de mezcla y de 2085 hasta 2486 copépodos•juvenil⁻¹•día⁻¹ para el tratamiento de copépodos.

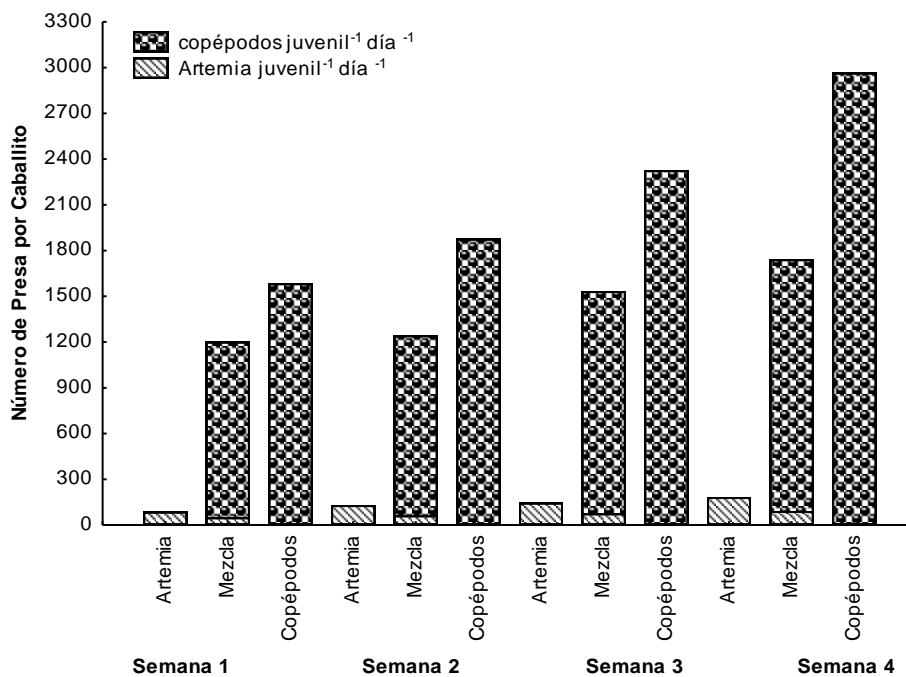


Figura 10. Tasa de alimento por día (TCD) de juveniles de caballito de mar *Hippocampus ingens* durante 4 semanas de cultivo con tres tratamientos: *Artemia* únicamente, copépodos únicamente y mezcla (copépodos y *Artemia*).

En el tratamiento de mezcla los valores medios de tasa de consumo de *Artemia* y copépodos también mostraron para ambas presas un aumento conforme al tiempo con tasas de 49 *Artemias*•juvenil⁻¹•día⁻¹ y 1152 copépodos•juvenil⁻¹•día⁻¹ en caballitos de entre 41 y 48 días post nacimiento (primera semana), hasta, 91

Artemias·juvenil¹·día⁻¹ y 1651 copépodos·juvenil¹·día⁻¹ en caballitos de entre 63 y 70 días post nacimiento (cuarta semana).

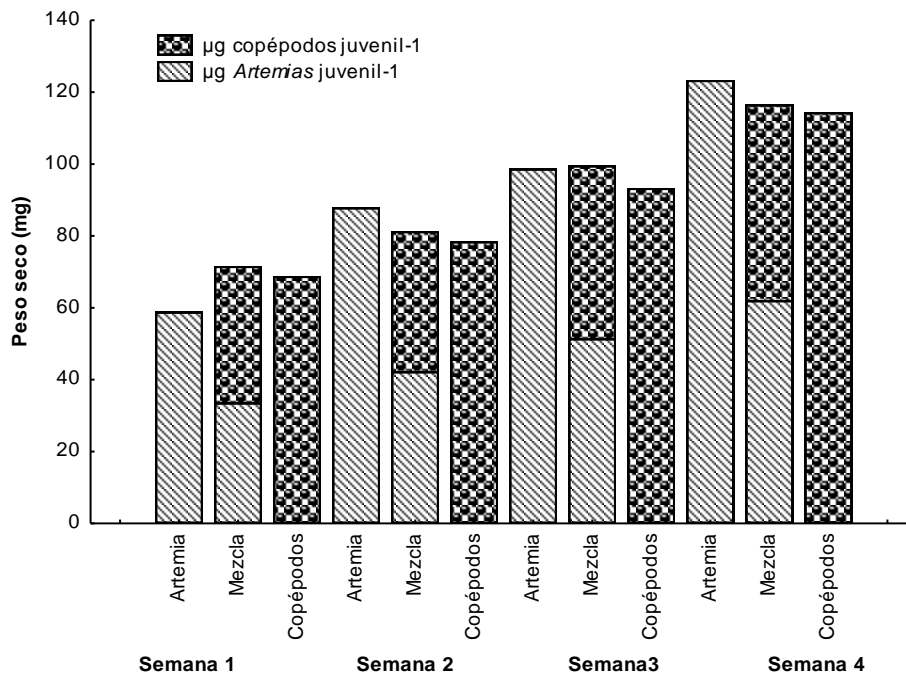


Figura 11. Biomasa de alimento consumido por juveniles de caballito de mar *Hippocampus ingens* durante 4 semanas de cultivo con tres tratamientos: *Artemia* únicamente, copépodos únicamente y mezcla (copépodos y *Artemia*).

La biomasa de alimento consumido por los caballitos también mostró una tendencia al aumento con el tiempo. Únicamente durante la primera semana el consumo de biomasa de copépodos (68.80 mg de peso seco) por caballito fue mayor al consumo *Artemia* (58.85 mg de peso seco). Ya que durante el resto de las semanas *H. ingens* mostró más consumo de biomasa de *Artemia* (Figura 11).

Mientras que para el tratamiento de mezcla durante todo el experimento el consumo de biomasa de *Artemia* fue mayor al de copépodos.

7.2 Comportamiento y Estrategia Alimentaria.

Inmediatamente después de ofrecer el alimento, los caballitos presentaron un comportamiento y estrategia de captura de presa similar al descrito por Felício *et al.* (2006) para *H. reidi* y Storero y González (2009) para *H. patagonicus*:

1. Inspección: el caballito de mar hace una inspección del área mientras está nadando o está sujeto de su cola.
2. Espera: se encuentra sin movimiento generalmente sujeto de su cola al sustrato.
3. Emboscada: ubica visualmente a la presa y lentamente se posiciona para el ataque
4. Captura: hace un movimiento rápido de elevación de cabeza y hocico hasta succionar a la presa.
5. Retorcer: hace giros y movimientos bruscos con todo el cuerpo
6. Remover la Presa: realiza diferentes movimientos con la cola para retirar la presa de su cuerpo u hocico.

Los organismos de los tres tratamientos alimenticios presentaron los primeros cuatro pasos descritos, sin ningún tipo de movimiento brusco (paso 5), y únicamente en el tratamiento de *Artemia* se observó en algunas ocasiones el comportamiento seis, donde el caballito de mar intentaba retirarse la *Artemia* del hocico al no poder tragarla. De acuerdo al paso 4, el promedio de succiones por minuto de *H. ingens* en el tratamiento de copépodos fue más del doble que en el de *Artemia* (13 y 6, respectivamente).

El número de organismos sujetos al sustrato media hora posterior a la incorporación del alimento mostró que los caballitos del tratamiento de copépodos eran los que se sujetaban más, seguidos de la mezcla. Y aquellos que se alimentaron de *Artemia* tenían en menor número de organismos sujetos al sustrato después de comer y la tendencia de organismos sujetos que continuaban alimentándose fue copépodos>mezcla>*Artemia*.

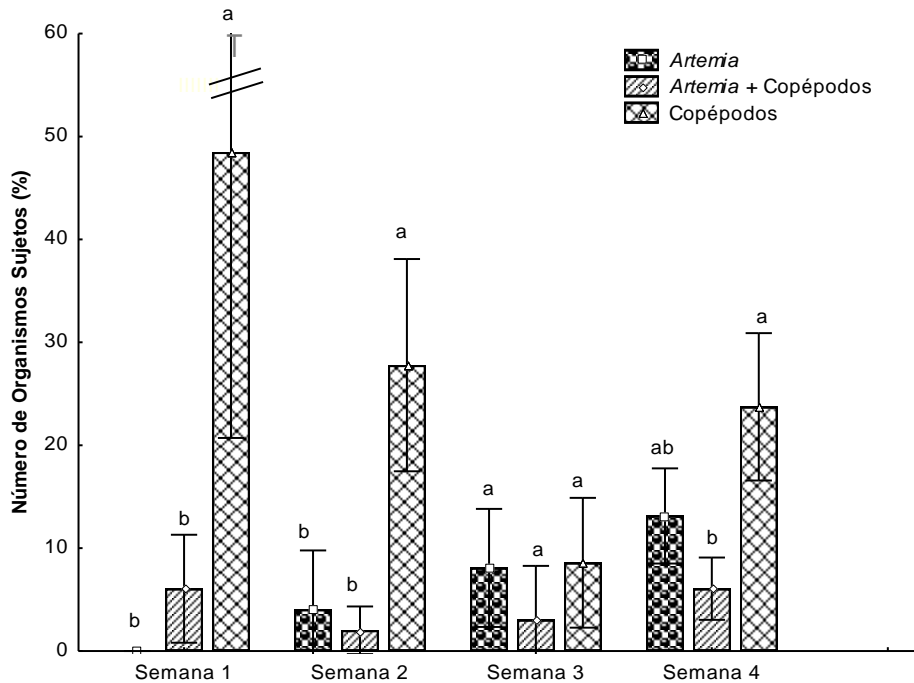


Figura 12. Comportamiento alimentario de *Hippocampus ingens* durante cuatro semanas de cultivo bajo diferentes tratamiento alimenticios. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$).

Durante la primera y segunda semana del experimento el porcentaje de organismos sujetos en el tratamiento de copépodos (48.48 ± 27.77 y 27.78 ± 10.31 % respectivamente) fue significativamente mayor (ANOVA y prueba de Tukey, $p < 0.05$) al tratamiento de *Artemia* (0.0 ± 0.0 y 4.04 ± 4.74 % respectivamente) y mezcla (6.06 ± 5.25 y 2.02 ± 2.31 % respectivamente). Sin embargo en la tercera semana ninguno de los tratamientos fue significativamente diferente, y en la última semana los organismos del tratamiento de copépodos mostraron diferencias significativas (23.74 ± 7.16 %) (ANOVA Tukey, $p < 0.05$) únicamente con el tratamiento de mezcla (6.06 ± 3.03 %) (Figura 12).

7.3. Crecimiento y Supervivencia.

Los valores medios de las diferentes medidas morfométricas en *H. ingens* (altura, cabeza y hocico) al final del experimento no mostraron diferencias significativas (ANOVA, $p > 0.05$) entre los tratamientos (Figura 13 a, b y c, respectivamente) (Anexo III).

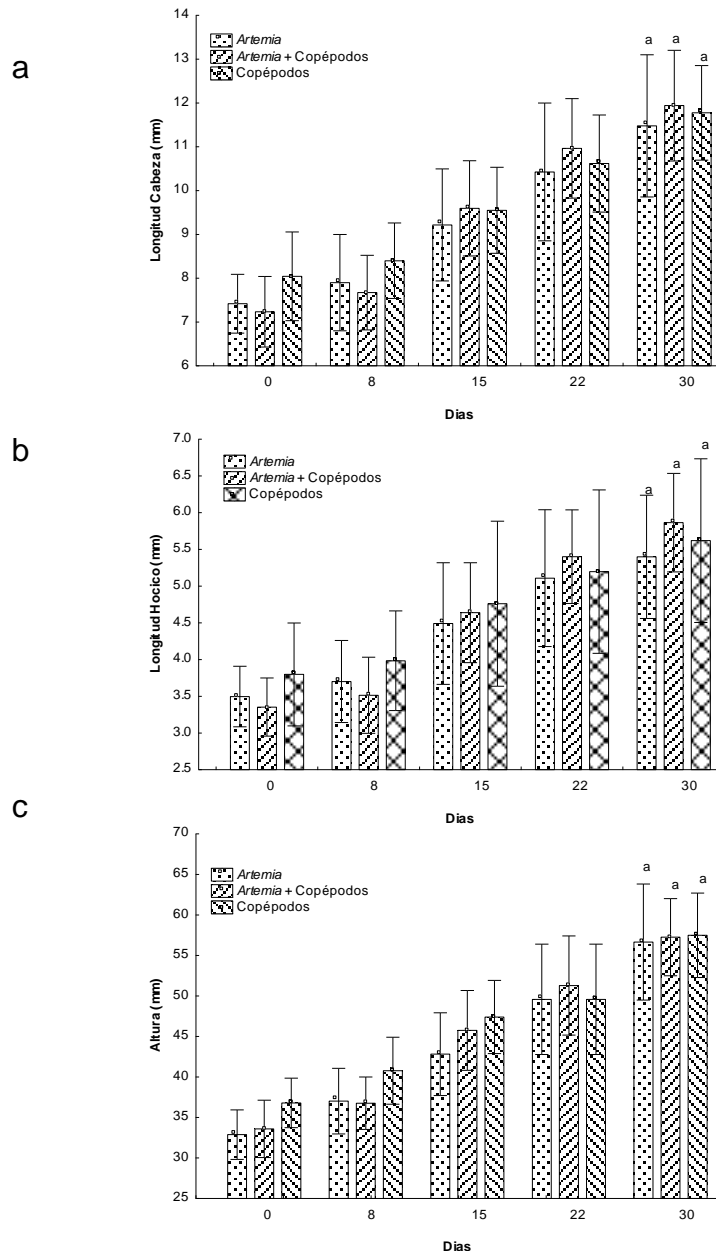


Figura 13. Valores medios de las diferentes medidas morfométricas (a: Altura, b: longitud cabeza y c: longitud hocico) del caballito de mar *Hippocampus ingens* durante 30 días de cultivo bajo diferentes tratamientos alimenticios. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$)

La tasa de crecimiento (TC) en altura del tratamiento de copépodos fue significativamente menor respecto a los tratamientos de *Artemia* y mezcla, mientras que la longitud del hocico en el tratamiento de mezcla fue significativamente mayor al resto de los tratamientos (Tabla 2).

Tabla 2. Talla inicial, talla final y tasa de crecimiento (TC) en las diferentes longitudes de juveniles de caballito de mar *Hippocampus ingens* bajo diferentes tratamientos alimenticios.

Longitud / Tratamiento	<i>Artemia</i>	<i>Artemia + Copépodos</i>	Copépodos
Cabeza			
Talla Inicial (mm)	7.42 ± 0.71	7.24 ± 0.85	8.05 ± 1.07
Talla Final (mm)	11.48 ± 1.71	11.94 ± 1.33	11.78 ± 1.14
TC (mm día ⁻¹)	0.15 ± 0.01 ^{ab}	0.18 ± 0.02 ^a	0.14 ± 0.01 ^b
Hocico			
Talla Inicial (mm)	3.50 ± 0.43	3.38 ± 0.42	3.80 ± 0.74
Talla Final (mm)	5.40 ± 0.88	5.86 ± 0.71	5.62 ± 1.17
TC (mm día ⁻¹)	0.07 ± 0.01 ^b	0.10 ± 0.00 ^a	0.07 ± 0.01 ^b
Altura			
Talla Inicial (mm)	32.88 ± 3.22	33.59 ± 3.72	36.80 ± 3.22
Talla Final (mm)	56.65 ± 7.54	57.26 ± 5.01	57.48 ± 4.48
TC (mm día ⁻¹)	0.84 ± 0.03 ^a	0.86 ± 0.06 ^a	0.70 ± 0.04 ^b

Filas con letras distintas indican diferencias significativas (p < 0.05)

En el tratamiento de mezcla la longitud de cabeza presentó una tasa de crecimiento significativamente mayor (ANOVA Tukey, p < 0.05) al tratamiento de copépodos, (Tabla 2) (Anexo IV y VI).

Por otra parte la proporción entre los valores medios finales de la longitud de cabeza y la longitud de hocico (LC/LH) fue de 2.12, 2.00 y 2.09 para el tratamiento de *Artemia*, mezcla y copépodos respectivamente

Lo que respecta a las supervivencias estas fueron altas hasta el final del experimento con valores de 98.99 ± 1.75 para el tratamiento de copépodos y 97.98 ± 3.50 para el tratamiento de *Artemia* y mezcla, sin diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (ANOVA, $p > 0.05$).

7.4. Conteo Total Viable de Heterótrofas Totales y *Vibrio*.

Se observó un incremento en el número de colonias potencialmente del género *Vibrio* y heterótrofas totales en el agua del tratamiento de copépodos para la segunda y la última semana (1.72×10^6 y 1.95×10^7 y 6.55×10^5 y 3.14×10^6 UFC mL⁻¹ respectivamente) Siendo estos valores Los registros más altos de toda la etapa experimental se registraron en la última semana y el valor más bajo de heterótrofas totales se encontró en la tercera semana, en el tratamiento de mezcla (1.70×10^4 UFC mL⁻¹) (Tabla 3).

Tabla 3. Conteo total viable de bacterias en TCBS y bacterias en agar marino de heterótrofas totales para el agua de los tres tratamientos de alimentación de *Hippocampus ingens* durante las cuatro semanas de cultivo

Tratamientos/ Bacterias	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
Artemia				
Vibrio*	0	1.16×10^5	7.00×10^3	4.50×10^3
Heterotrofas*	2.27×10^5	8.53×10^5	1.24×10^5	2.33×10^5
Artemia + Copépodos				
Vibrio	1.00×10^4	3.19×10^5	0	2.10×10^4
Heterotrofas	4.36×10^5	1.00×10^5	1.70×10^4	1.33×10^5
Copépodos				
Vibrio	1.50×10^3	1.72×10^6	0	6.55×10^5
Heterotrofas	5.51×10^5	1.95×10^7	5.55×10^4	3.14×10^6

*Unidades en UFC mL⁻¹

Los *Vibrios* en el agua de los tratamientos de *Artemia* y mezcla presentaron la misma tendencia de crecimiento durante las cuatro semanas de experimentación, iniciando con valores de 0 UFC mL⁻¹ en el tratamiento de

Artemia y 1.0×10^4 UFC mL⁻¹ en el de mezcla, los cuales aumentaron drásticamente la segunda semana, disminuyeron la tercera semana y volvieron a aumentar la última semana (Tabla 3). Es importante resaltar que después del segundo muestreo se realizó un recambio total de agua de los acuarios de cada tratamiento, que pudo provocar esta disminución colonias para la tercera semana.

Tabla 4. Conteo total viable de bacterias en TCBS potencialmente del género *Vibrio* y bacterias en agar marino de heterótrofas totales para el alimento vivo (copépodos y *Artemia*) durante cuatro semanas.

Alimento/ Bacterias	Artemia		Copépodos	
	Vibrio*	Heterotrofas*	Vibrio	Heterotrofas
Semana 1	3.68×10^5	8.88×10^6	2.61×10^6	3.35×10^6
Semana 2	1.50×10^7	Incontable	7.96×10^5	4.74×10^5
Semana 3	5.97×10^5	1.03×10^6	1.24×10^5	9.32×10^5
Semana 4	1.60×10^5	3.00×10^6	1.54×10^5	5.01×10^5

*Unidades en UFC Org⁻¹

En el alimento vivo, el mayor valor en TCBS fue en *Artemia* (1.5×10^7 UFC Org⁻¹) durante la segunda semana (Tabla 4), mostrando la misma tendencia descrita para el agua de los tratamientos. En los copépodos tanto *Vibrios* como heterótrofas totales presentaron los valores más bajos de 1.24×10^5 UFC Org⁻¹ en la tercera semana y 4.74×10^5 UFC Org⁻¹ en la segunda semana respectivamente (Tabla 4).

Para los análisis de piel de *H. ingens*, en todos los tratamientos se detectó la presencia de bacterias heterótrofas y de colonias de color amarillas y verdes en agar TCBS.

8. DISCUSIÓN.

8.1. Sistema Experimental.

En comparación con los sistemas que se probaron en los experimentos preliminares en CIAD, el sistema experimental semicerrado con recirculación de agua que se implementó para el mantenimiento de *H. ingens* durante la etapa experimental, dio buenos resultados, manteniendo los organismos sin problemas de aparición de burbuja y altas supervivencias, así como condiciones adecuadas de flujo para eliminar alimento y mantener el agua recirculando y la calidad de agua constantes a lo largo de todo el periodo de experimentación, Actualmente para el mantenimiento y cultivo de peces ornamentales en los laboratorios de investigación y en grandes acuarios públicos y privados se implementan diferentes sistemas de recirculación (cerrados, abiertos, semicerrados, entre otros) que ayudan al buen mantenimiento de la calidad del agua. Sin embargo para el caballito de mar *Hippocampus ingens* únicamente se encuentra el reporte de Tellez-Mohedano *et al.* (1997) con información de la calidad de agua para evitar las altas mortalidades. Diversas investigaciones han reportado diseños para el cultivo exitoso de otras especies de *Hippocampus* (Wood *et al.*, 2003 a, b; Planas *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2009a) proporcionando opciones que deben probarse con *H. ingens* y evaluar su eficiencia.

El diseño del sistema empleado en el presente estudio, ha sentado las bases para futuras investigaciones en el mantenimiento de esta especie bajo condiciones semicontroladas.

Como se describió anteriormente los acuarios del sistema experimental contaban con un tubo de PVC con áreas perforadas protegidas con una malla de 200 μ m entre 10:00 y 17:00 hrs para retener el alimento y una de 6 mm entre las 17:00 – 10:00 hrs . El criterio de ofrecer el alimento únicamente durante el horario diurno y eliminarlo paulatinamente durante la noche, fue que los juveniles de caballito de mar son depredadores visuales (Hoang *et al.*, 1998),

por lo que se esperaría mayor alimentación durante los periodos de luz, además no existen estudios específicos para *H. ingens* por lo cual el estudio se basó en lo reportado para *H. kuda* alimentados con *Artemia* (Hoang *et al.*, 1998; Lu *et al.*, 2002) y *H. trimaculatus* alimentado con copépodos (Sheng *et al.*, 2006) ambos durante el día. Al contar con consumos adecuados y mortalidades bajas durante el estudio es probable que este régimen alimenticio diurno sea aceptable, aunque se recomienda realizar estudios puntuales sobre este punto.

8.2. Tasa de Alimentación por Día.

Establecer un buen régimen de alimentación es de vital importancia para optimizar la cantidad de alimento que realmente necesita el organismo para crecer a lo largo del desarrollo de su cultivo, y así minimizar los gastos que se pudieran generar por la pérdida de alimento no consumido (Woods y Valentino, 2003), sobre todo cuando se trata de alimento vivo el cual implica altos costos de producción y mantenimiento (Wilson y Vincent, 1999). Sin embargo este tema ha sido poco estudiado en todo el género *Hippocampus* (Felicio *et al.*, 2006) y el régimen de alimentación solo se encuentra bien establecido para unas cuantas especies (Woods y Valentino, 2003), como *H. trimaculatus* (Murugan *et al.*, 2009; Sheng *et al.*, 2007), *H. subelongatus* (Payne y Rippingale, 2000), y *H. kuda* (Sheng *et al.*, 2007), y entre estos, el consumo de copépodos ha sido reportado para *H. subelongatus* (a los 5 dpn) con 214 nauplios de cop•juvenil⁻¹•h⁻¹ (Payne y Rippingale, 2000), y *H. trimaculatus* y *H. kuda* (0 dpn) con 5 y 7 cop•juvenil⁻¹•h⁻¹ (datos estimado de la grafica) respectivamente (Sheng *et al.*, 2007).

H. ingens mostró una tendencia a un consumo creciente de alimento con el incremento de la edad, que coincide con los resultados calculados a partir de las gráficas del trabajo de Murugan *et al.* (2009) en *H. trimaculatus* alimentado únicamente con copepoditos (7 a 13 dpn: consumo de 137 a 156 copepoditos•juvenil⁻¹•h⁻¹), mientras que fue decreciendo cuando se alimentaron con nauplios de *Artemia* (8 a 13 dpn: de 159 a 128 *Artemia*•juvenil⁻¹•h⁻¹).

Por otra parte las presas que se ofrecen como alimento tienen diferentes pesos que hacen variar en gran medida la biomasa de la ración del alimento, por ejemplo los nauplios de copépodos y nauplios de *Artemia* que utilizaron Payne y Rippingale (2000) para alimentar juveniles de *H. subelongatus* tenían un peso seco de 0.10 y 2.64 μg respectivamente, que corresponde aproximadamente a 24 veces el peso de *Artemia* que de copépodos, sin embargo solo alimentaron 2 veces la equivalencia de copépodos por *Artemia*. En el presente estudio el peso seco del copépodo adulto de *Pseudodiaptomus euryhalinus* fue de 0.033 mg, mientras que el de *Artemia* fue de 0.68 mg, equivalente a 20 veces más el peso de la *Artemia* que el del copépodo, por lo que fue necesario ajustar la relación a 1:1 y así se ofreció la misma biomasa de alimento equivalente a 82.5 y 88.4 mg de peso seco de copépodos y *Artemia* respectivamente. El promedio del consumo por caballito de biomasa de *Artemia* (92.17 mg de peso seco) fue mayor que el de copépodos (88.72 mg de peso seco) durante todo el experimento.

8.3. Comportamiento y Estrategia Alimentaria.

El comportamiento alimentario de *H. ingens* inmediatamente después de detectar el alimento en el acuario, fue nadar hacia las presas y comenzar la captura. En promedio realizó el doble de succiones por minuto en el tratamiento de copépodos (13) que para el de *Artemia* (6). En el caso de *H. abdominalis* el número de succiones por minuto de copépodos cicloides fue de 0 mientras que de *Artemia* fue de 2.5 ± 0.12 para organismos de 1 mes de edad (Woods, 2003a) lo anterior demuestra que *P. euryhalinus* representa una presa adecuada para *H. ingens* pues nunca se observó “regurgitación” y en todos los ataques el consumo fue exitoso, sin embargo se recomiendan estudios puntuales que incluyan caballitos de mayor de menor edad para comprobar su eficiencia durante su ciclo de vida.

Otra estrategia de alimentación del caballito de mar es sujetarse de su cola prensil al sustrato y esperar el momento indicado para atacar a su presa, apoyándose de ciertos comportamientos como el camuflaje y el ataque sigiloso.

Este comportamiento le permite tomar ventaja de muchas presas vulnerables (Storero y González, 2009), por lo que los *Hippocampus* son considerados depredadores estrategas y oportunistas (Woods 2002; Foster and Vincent, 2004; Storero y González, 2008).

Durante periodos de observación de 30 minutos de la estrategia alimentaria (inspección, espera, emboscada y captura) en los caballitos de mar de los tres tratamientos, los organismos comenzaron a sujetarse al sustrato pero sin dejar de alimentarse en ningún caso. La tendencia de organismos sujetos durante las cuatro semanas entre tratamientos fue copépodos>*Artemia*>mezcla y la tendencia de organismos sujetos que continuaban alimentándose fue copépodos>mezcla>*Artemia*.

Al parecer los organismos al disponer de un mayor número de presas desarrollaron un comportamiento de estrategia (sujetarse al sustrato) que requiera de la menor energía desperdiciada en la etapa de depredación o captura (Felicio *et al.*, 2006). O probablemente las presas de menor tamaño provocaron un mayor esfuerzo de captura y fue necesario continuar la alimentación sujetos al sustrato (Cividanes da Hora y Joyeux, 2009). *H. ingens* del tratamiento de copépodos resultó con mayor número de organismos sujetos, significativamente mayor al resto de los tratamientos durante 3 semanas.

Observaciones en el comportamiento alimenticio en cautividad de *H. patagonicus* revelan que aun cuando se encuentra libre de competencia o depredadores gasta más del 50 % del tiempo inmóvil, y posteriormente comienza una estrategia activa (Storero y González, 2009) mientras que Payne y Rippingale (2000) plantean que los caballitos de mar pueden prestar demasiada atención en presas pequeñas las cuales contiene menor valor energético. Por lo que Job *et al.* (2002) y Sheng *et al.* (2006) sugieren ofrecer gran densidad y variedad de zooplancton para poder cumplir con las necesidades de tamaño de presa.

Por otra parte en el medio natural los caballitos de mar se encuentran en áreas con vegetación (Lourie *et al.*, 1999) lo que facilita el refugio de las presas y disminuye el éxito de alimentación, mientras que en cautiverio, en acuarios con poca o nula vegetación como en el presente estudio, pueden inspeccionar toda el área del acuario y nunca usar la estrategia de sujetarse al sustrato para alimentarse (Storero y González, 2009), *H. ingens* no presentó este comportamiento. Algunos caballitos de mar como *H. zosterae* (Tipton y Bell, 1988) y *H. reidi* (Felício *et al.*, 2006) en acuarios con poca vegetación presentan la misma estrategia de captura de presas, gastando la mayoría del tiempo de alimentación en movimiento, mientras que en acuarios con mucha vegetación se sujetan al sustrato para alimentarse.

De acuerdo a lo anterior es de vital importancia proporcionar a *H. ingens* un sustrato adecuado y más aún si durante el comportamiento alimenticio se valen de este medio para cazar a sus presas. Por lo que un sustrato de tamaño y material indicado puede reducir la energía utilizada en la búsqueda de presa.

Algunos autores han reportado el sustrato adecuado para la alimentación de algunos caballitos, como mallasombras (1 mm de diámetro) para *H. abdominalis* (Woods, 2003), corales y plantas de plástico para *H. erectus* (Lin *et al.*, 2009), cuerdas y plantas de plástico (12 mm) para *H. guttulatus* (Planas *et al.*, 2008) y en el presente estudio tubos de plástico de 2 mm para juveniles de entre 41 y 70 dpn, con buenos resultados. Sin embargo se sugiere hacer estudios mas puntuales del tema ya que no hay datos para esta especie que lo corroboren.

8.4. Crecimiento y Supervivencia.

La altura máxima registrada en las diferentes especies de *Hippocampus* varía desde 2.1 cm con *H. denise* hasta 31.0 y 35 cm con *H. ingens* y *H. abdominalis* respectivamente (Lourie *et al.*, 1999), por lo que es recomendable hacer comparaciones de crecimiento con especies de tallas similares como *H. abdominalis* y/o *H. kelloggi* (altura 28 cm; Lourie *et al.*, 1999). Por ejemplo *H. ingens* en el presente estudio presento una altura promedio de 45 mm a los 56

días de edad y *H. abdominalis* a la misma edad presento 40 mm (Woods, 2000). Sin embargo lo más adecuado es comparar únicamente con la especie estudiada, Tellez-Mohedano *et al.*, (1997) obtuvieron tallas de 39 mm en juveniles de *H. ingens* también a los 56 días.

El crecimiento en juveniles de *Hippocampus* puede estar influenciado por diversos factores como la dieta, que pueden redundar en diferencias de crecimiento en organismos de la misma edad (Woods, 2000, 2003a,b), por lo que varios autores han analizado el efecto de diferentes dietas en el crecimiento de juveniles para poder encontrar la más adecuada para cierta edad, algunas especies estudiadas son *H. trimaculatus* (Murugan *et al.*, 2009), *H. kuda* (Garcia y Hilomen-Garcia, 2009), *H. erectus* (Lin *et al.*, 2009a), *H. ingens* (Ortega-Salas y Reyes-Bustamante 2006) y *H. subelongatus* (Payne and Rippingale, 2000).

La dieta de copépodos en este estudio mostró una tasa de crecimiento baja para la altura de los organismos. Lo que sugiere que tanto la dieta de *Artemia* como la de mezcla (*Artemia* + copépodos) y copépodos pueden mantener a caballitos de *H. ingens* de 41 a 70 días de edad, aunque con bajas tasas de crecimiento cuando son utilizados únicamente los copépodos. *Artemia* ha sido utilizada para el mantenimiento de diferentes *Hippocampus* registrando tasas de crecimiento adecuadas para *H. trimaculatus* con 1.27 mm dia^{-1} (Murugan *et al.*, 2009), *H. ingens* con 0.5 mm dia^{-1} (Ortega-Salas y Reyes-Bustamante, 2006), *H. whitei* con $0.216 \pm 0.01 \text{ mm dia}^{-1}$ (Wong y Benzie, 2003), y *H. kuda* con 0.90 mm dia^{-1} (Job *et al.*, 2002).

Consecuentemente Lin *et al.* (2009a) comentan que las especies de mayor tamaño de caballitos de mar tienen rápidas tasas de crecimiento. Por lo que una dieta única de copépodos para *H. ingens* de 41 a 70 días de edad no sería la más adecuada. Sin embargo diversos estudios en caballitos menores al mes obtuvieron los mejores resultados al utilizar copépodos calanoides como *Acartia tonsa* (Blanco *et al.*, 2010, 2011), *Pseudodiaptomus* spp. (Murugan *et al.*, 2009) *Gladioferense imparipes* (Payne y Rippingale, 2000) y *Pseudodiaptomus annandalei* (Sheng *et al.*, 2006). Por lo que se recomienda que para futuros

estudios se evalúe nuevamente estos tratamientos empleando *P. euryhalinus* para las primeras cuatro semanas después de nacer, ya que de acuerdo al productor Eliezer Zuñiga (comentario personal) la etapa crítica es cuando *H. ingens* presenta alimentación y comportamiento principalmente pelágico.

Por otra parte la mayoría de los estudios analizan únicamente el alto (longitud estándar y/o longitud total) de los caballitos al ser esta la variable que determina si los organismos tiene los 10 cm de venta (CITES, 2004). Sin embargo las proporciones del cuerpo del caballito de mar cambian a través del tiempo (Lourie *et al.*, 1999), por lo que es importante considerar otras medidas morfométricas, tales como la longitud de cabeza y hocico. Otero *et al.* (2010) midieron la longitud de cabeza y hocico en *H. hippocampus* y Sheng *et al.* (2007) únicamente la longitud de cabeza en *H. trimaculatus* y *H. kuda*. En este estudio se realizaron estas medidas, obteniendo mejor tasa de crecimiento en los juveniles de *H. inges* alimentados con la dieta de mezcla. Sin embargo, con el tratamiento de *Artemia* se obtuvieron longitudes finales dentro del intervalo observado por Lourie *et al.* (2004) en *H. ingens* donde estableció una proporción de la longitud de cabeza y la longitud del hocico (LC/LH) con un intervalo de entre 2.1 y 2.5, mientras que las medidas para el tratamiento de copépodos y mezcla no entran en estos intervalos.

8. 5. Cuento Total Viable de Heterótrofas Totales y *Vibrio*.

Pocas son las referencias del número de colonias de *Vibrio* y heterótrofas en cultivos de diversas especies de peces marinos. De tal manera que no hay muchos datos para considerar las condiciones de salud de los organismos. En el caso de caballitos de mar algunas de las pocas especies estudiadas han sido *H. kuda* (Tanu *et al.*, 2011), *H. hippocampus* y *H. guttulatus* (Balcazar *et al.*, 2010a) y *H. reidi* (Alcaide *et al.*, 2001), pero sin información de conteos totales viables. Por ejemplo (Gómez-Gil, año) reporta valores de *Vibrio* $>10^5$ UFC ml^{-1} y valores de heterótrofas totales $>10^6$ UFC mL^{-1} como elevados en muestras de agua de cultivo de camarones.

Haciendo una comparación y de acuerdo a los valores reportados por Gómez-Gil (año), el agua del cultivo de *H. ingens* presentó en algunas semanas registros de *Vibrio* y heterótrofas totales a niveles considerados elevados, sin embargo ninguno de los organismos presentó signos de enfermedades, comportamiento o aspectos anormales, como por ejemplo letargia, pérdida de apetito, manchas blancas en la piel y en algunos casos lesiones de necrosis en la cola, las cuales son asociadas con algunas especies de *Vibrio* como *V. alginolyticus* y *V. splendidus* presentes en el agua del cultivo (Balcazar *et al.*, 2010a).

Por otra parte aun cuando se encontraron eventos aislados de concentraciones elevadas en el agua del cultivo de *H. ingens* las supervivencias fueron elevadas en los tres tratamientos, Martins *et al.* (2010) encontraron 100% de mortalidad y lesiones en el hocico, branquias, hígado y riñón en adultos de *H. reidi* al someterlos durante 15 min a un baño de 1.0×10^7 CFU of *V. alginolyticus* mL⁻¹. Además en las placas de TCBS del agua del cultivo de *H. ingens* se presentó un crecimiento tipo *swarming* que Colwell y Grimes (1984) asocian con *V. alginolyticus* y *V. carcharia*, esto remarca la importancia de identificar las especies de *Vibrio* para poder caracterizarlas como nocivas, benéficas o inocuas en los cultivos de las diferentes especies de caballitos de mar.

El alimento vivo se considera un vector potencial de patógenos y puede presentar un posible riesgo para sus depredadores, por lo que analizar su carga bacteriana es de gran importancia para mantener control de las mismas en beneficio del cultivo de caballitos de mar.

Mezo-Villalobos (2005) reporta valores de *Vibrio* de 1.08 UFC Org⁻¹ y heterótrofas totales de 3.92 UFC Org⁻¹ en los copépodos *P. euryhalinus* al alimentarlos con *C. muelleri*. Estos valores fueron mucho más bajos a los obtenidos en este estudio para *Vibrio* (1.24×10^5 UFC Org⁻¹) y heterótrofas totales (4.74×10^5 UFC Org⁻¹) aun empleando la misma especie de copépodos y microalga. Sin embargo en el estudio de Mezo- Villalobos los cultivos de

copépodos fueron en volúmenes menores (500 mL) y bajo un proceso de depuración cada 3 días, mientras que en el presente estudio los volúmenes manejados fueron de 200 L y los análisis bacteriológicos se realizaron antes del proceso de depuración. Lo que resalta la importancia de la depuración aun cuando se trata de otras especies de copépodos, ya que se ha comprobado una reducción significativa en los niveles de bacterias *Vibrio* (1.33×10^3 UFC org⁻¹) y heterótrofas totales (5.5×10^3 UFC org⁻¹) en los copépodos *Tisbe monozota* al someterlos bajo un proceso de depuración (Puello-Cruz *et al.*, 2006).

Aun cuando el número de bacterias *Vibrio* y heterótrofas totales en los copépodos (7.96×10^5 y 4.74×10^5 UFC org⁻¹ respectivamente) fue menor al encontrado en la *Artemia* (1.50×10^7 UFC org⁻¹ e incontable respectivamente) durante la segunda semana, el agua del tratamiento de cultivo de *H. ingens* donde se utilizaron los copépodos (1.72×10^6 y 1.95×10^7 respectivamente) mostró el valor más elevado para la misma semana. Lo que señala una relación opuesta en este estudio respecto a la densidad de alimento vivo agregado y los niveles de UFC (bacterianas) en el agua del cultivo de *H. ingens*.

9. CONCLUSIONES.

- Un régimen de alimentación de 2500 copépodos•juvenil⁻¹•día⁻¹ y 130 *Artemias*•juvenil⁻¹•día⁻¹ (relación 1:1 en biomasa) resulto adecuado para el mantenimiento de juveniles de *H. ingens*.
- La tasa de alimentación de *H. ingens* aumentó con el tiempo y el promedio del consumo de biomasa de *Artemia* (92.17 mg de peso seco) fue mayor que el de copépodos (88.72 µg de peso seco) durante todo el experimento.
- Después de 30 min de alimentación, los juveniles de *H. ingens* comienzan un comportamiento alimentario sujetos al sustrato, en especial cuando son alimentados únicamente de copépodos.
- Las tres dietas evaluadas son un alimento vivo adecuado para el mantenimiento de *H. ingens* de entre 41 y 70 días de edad.
- La tasa de crecimiento de la altura de juveniles de *H. ingens* es menor cuando son utilizados únicamente los copépodos como dieta.
- Una dieta combinada de *Artemia* mas copépodos (mezcla) mejora la tasa de crecimiento de la longitud de cabeza y hocico en juveniels de *H. ingens*.
- Los juveniles de *H. ingens* presentaron altos porcentajes de supervivencia sin signos de enfermedades en las tres dietas evaluadas, aun con registros aislados de concentraciones elevadas de bacterias (> 10⁵ UFC mL⁻¹) en el agua del cultivo.
- La densidad de alimento vivo agregado al cultivo de *H. ingens* no influye en los niveles de bacterias presentes en el agua, aun cuando los cultivos de copépodos y *Artemia* muestren concentraciones elevadas de heterótrofas totales y de *Vibrio*.

10. LITERATURA CITADA.

- Alcaide, E., Gil-Sanz, C., Sanjuán, E., Esteve, D., Amaro, C., Silveira, L., 2001. *Vibrio harveyi* causes disease in seahorse, *Hippocampus* sp. Journal of Fish Diseases 24: 311-313.
- Austin, B., 2006. The bacterial microflora of fish. Scientific World Journal 6: 931-945.
- Balcazar, J.L., Gallo-Bueno, A., Planas, M., Pintado, J., 2010. Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from captive-bred seahorses with disease symptoms. Antonie Van Leeuwenhoek 97: 207-210.
- Baum, J.K., Vincent, A.C.J., 2005. Magnitude and inferred impacts of the seahorse trade in Latin America. Environment Conservation 32: 305-319.
- Blanco, A., Nozzi, V., Planas, M, Carnevali, O, Buttino, I., Olivotto, I., 2010. Cultured harpacticoid and calanoid copepods as potential live preys in *Hippocampus reidi* aquaculture: a short term feeding study. European Aquaculture Society. Aquaculture Europe 10, Porto, Octubre 2010. 197-198.
- Blanco, A., Quintas, P., Planas, M. 2011. Enhancement in the rearing of the seahorse *Hippocampus guttulatus* by feeding on copepods. 5th International Husbandry Symposium. Poster session. The Husbandry, Management and Conservation of Signathids. Chicago, Noviembre 2011.
- Cahill, M.M., 1990. Bacterial flora of fishes: a review. Microbial Ecology 19: 21-41.
- Chang, M., Southgate, P.C., 2001. Effects of varying dietary fatty acid composition on growth and survival of seahorse, *Hippocampus* sp., juveniles. Aquarium Sciences and Conservation 3: 205–214.
- CITES. 2004. Seahorses and other members of the family *Syngnathidae* (decision 12.54) Report of the North America working group. AC20 Doc. 17. Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES), Twentieth Meeting of the Animals Committee

- Johannesburg (South Africa). 29 March–2 April 2004. Disponible online en: <http://www.cites.org/eng/com/ac/20/E20-05-5.pdf>
- CITES. 2011. Acerca de CITES. Disponible online en: <http://www.cites.org/esp/index.php>
- Civera-Cerecedo, R., Alvarez-González, C.A., Moyano-Lopez, F.J., 2004. Nutrición y alimentación de larvas de peces marinos. pp 7-94. En: Cruz Suárez, L.E., Ricque Marie, D., Nieto López, M.G., Villareal, D., Scholz, U., González, M., (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 16-19 Noviembre, 2004. Hermosillo, Sonora, México.
- Cividanes da Hora, M.D.C., Joyeux, J.C., 2009. Closing the reproductive cycle: Growth of the seahorse *Hippocampus reidi* (Teleostei, Syngnathidae) from birth to adulthood under experimental conditions. *Aquaculture* 292: 37-41.
- Colwell, R.R., Grimes, D.J., 1984. *Vibrio* diseases of marine fish populations. *Helgolander Meeresunters.* 37: 265-287.
- Cunha, I., Planas, M., 1999. Optimal prey size for early turbot larvae (*Scophthalmus maximus* L.) based on mouth and ingested prey size. *Aquaculture* 175: 103-110.
- Dehasque, M., Verdonck, L., Sorgeloos, P., Swings, J., Léger, P., Kersters, K., 1991. Determination of the bacterial contamination in live food production systems in marine fish hatcheries in southern Europe. pp. 339–402. En Lavens, P., Sorgeloos, P., Jaspers, E., Ollevier, F., (Eds.), LARVI '91, European Aquaculture Society Special Publication no. 15. Ghent.
- DOF. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación, Segunda sección, 30 diciembre 2010. México, D.F. También disponible online en: http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/435/1/NOM_059_SEMARNAT_2010.pdf

- FAO, 2002. The State of World Fisheries and Aquaculture - 2002 (SOFIA, Parte 2. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponible online en: <http://www.fao.org/docrep/005/y7300s/y7300s06a.htm> f
- Felício, A.K.C., Rosa, I.L., Souto, A., Freitas, R.H.A., 2006. Feeding behavior of the longsnout seahorse *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933. Journal of Ethology 24: 219- 225.
- Foster, S.J., Vincent, A.C.J., 2004. Life history and ecology of seahorses: implications for conservation and management. Journal of Fish Biology 65: 1-61.
- Garcia, B.L.M., Hilomen-Gracia, V.G., 2010. Grow-out of juvenile seahorse *Hippocampus kuda* (Bleeker; Teleostei: Syngnathidae in illuminated sea cages. Aquaculture Research 40: 211-217.
- Gomezjurado, J., 2005. Pacific seahorse *Hippocampus ingens*. Project Seahorse. pp. 72-74 En: Koldewey, H. (Ed.), Syngnathid husbandry in public aquariums. Project Seahorse and Zoological Society of London, London.134 pp.
- Gomez-Gil, R.S.B., Bolán, M.C., (1997). Manual de bacteriología de cultivos de camarón. 80 pp. Manual de uso interno del laboratorio de bacteriología de CIAD Mazatlán.
- Guillaume, J., Kaushik, S., Bergot, P., Métailler, R., 2001. Nutrition and feeding of fish and crustaceans. Praxis Publishing Ltd., Chichester. 408 p.
- Hansen, G.H., Olafsen, J.A., 1999. Bacterial interactions in early life stages of marine cold water fish. Microbial Ecology 38: 1–26.
- Hoang, D.H., Sy, T.S., Hoa, H.T., 1998. Feeding behaviour and food of seahorses in Vietnam. pp. 458–464. En: Morton, B. (Ed.). Marine biology of the South China Sea. Proceedings of the 3rd Conference on the Marine Biology of the South China Sea. Hong Kong University Press, Hong Kong.
- Holt, G.J., 2003. Research on culturing the early life history stages of marine ornamental species. pp. 251-254. En: Cato, J.C., Brown, C.L. (Eds.), Marine ornamental species: collection, culture and conservation. Iowa State University Press, Ames.

- IUCN. 2011. The IUCN red list of threatened species. Disponible online en: <http://www.iucnredlist.org/>
- Job, S., Arvedlund, M., Marnane, M., 1997. Captive breeding of coral reef fishes. *Austasia Aquaculture* 11 (3): 56–59.
- Job, S.D., Do, H.H., Meeuwig, J.J., Hall, H.J., 2002. Culturing the oceanic seahorse, *Hippocampus kuda*. *Aquaculture* 214: 333-341.
- Koldewey, H. (ed.), 2005. *Syngnathid husbandry in public aquariums*. Project Seahorse and Zoological Society of London, London. 134 pp.
- Kuiter, R.H., 2009. *Seahorses and their relatives*. Aquatic Photographics, Seaford, Victoria. 334 pp.
- Liang, B., 1992. Research on the culture of *Hippocampus*. *Journal of the Ocean University of Qingdao* 22: 39-44.
- Lin, Q., Lin, J.D. Zhang, D., Wang, Y., 2009a. Weaning of juvenile seahorses *Hippocampus erectus* Perry, 1810 from live to frozen food. *Aquaculture* 291: 224- 229.
- Lin, Q., Zhang, D., Lin, J., 2009b. Effects of light intensity, stocking density, feeding frequency and salinity on the growth of sub-adult seahorses *Hippocampus erectus* Perry, 1810. *Aquaculture* 292: 111-116.
- Lourie, S., Kuiter, R.H., 2008. Three new pygmy seahorse species from Indonesia (Teleostei: Syngnathidae: Hippocampus). *Zootaxa* 54-68.
- Lourie, S.A., Randall, J.E., 2003. A new pygmy seahorse, *Hippocampus denise* (Teleostei: Syngnathidae) from the Indo-Pacific. *Zoological Studies* 42: 284-291.
- Lourie, S.A., Vincent, A.C.J., Hall, H.J., 1999. *Seahorse: an identification guide to the world's species and their conservation*. Project Seahorse and Zoological Society of London, London. 214 pp.
- Lourie, S.A., Foster, S.J., Cooper, E.W., Vincent, A.C.J., 2004. *A guide to the identification of seahorses*. Project Seahorse, TRAFFIC North America, University of British Columbia and World Wildlife Fund. Washington, D.C. 114 pp.

- Lu, J-Y., Li, B-J., Sun, Y-Y., Yang, D-W., Huang, K., 2002. The ingestion, growth and ecological conversion efficiency of *Hippocampus kuda* under the intensive rearing conditions. *Journal of Fisheries of China* 26: 62-66.
- Martinez-Cardenas, L., Purser, G.J., 2007. Effect of tank colour on *Artemia* ingestion, growth and survival in cultured early juvenile pot-bellied seahorse (*Hippocampus abdominalis*). *Aquaculture* 264: 92-100.
- Martins, M.L., Mouriño, J.L.P., Fezer, G.P., Buglione, N.C.C., Garcia, P., Silva, B.C., Jatobá, A., Vieira, F.N., 2010. Isolation and experimental infection with *Vibrio alginolyticus* in the sea horse *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933 (Osteichthyes: Syngnathidae) in Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 70: 205-209.
- McKinnon, A.D., Duggan, S., Nichols, P.D., Rimmer, M.A., Semmens, G., Robino, B., 2003. The potential of tropical paracalanoid copepods as live feeds in aquaculture. *Aquaculture*. 223: 89-106.
- Merchie, G., 1996. Use of nauplii and meta-nauplii. pp. 137-163. En: Manual on the production and use of live food for aquaculture. (Lavens, P. y Sorgeloos, P., Eds). FAO Fisheries Technical Paper. 361. FAO, Roma.
- Mezo-Villalobos, S., 2005. Evaluación de la producción y de la carga bacteriana en cultivos del copépodo calanoide tropical *Pseudodiaptomus euryhalinus* alimentado con diferentes microalgas. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Sinaloa, Facultad de Ciencias del Mar, Mazatlán, México. 46 pp.
- Murugan, A., Dhanya, S., Sreepada, R.A., Rajagopal, S. Balasubramanian, T., 2009. Breeding and mass-scale rearing of three spotted seahorse, *Hippocampus trimaculatus* Leach under captive conditions. *Aquaculture* 290: 87-96.
- Nealson, K.H., Wimpee, B., Wimpee, C., 1993. Identification of *Vibrio splendidus* as a member of the planktonic luminous bacteria from the Persian Gulf and Kuwait Region with *luxA* probes. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 2684-2689.

- Olivotto, I., Holt, S.A., Carnevali, O., Holt, J.G., 2006. Spawning, early development and first feeding in the Lemonpeel angel fish *Centropyge flavissimus*. *Aquaculture* 253: 270-278.
- Olivotto, I., Avella, M.A., Sampaolesi, G., Piccinetti, C.C., Navarro-Ruiz, P., Carnevali, O., 2008. Breeding and rearing the longsnout seahorse *Hippocampus reidi*: Rearing and feeding studies. *Aquaculture* 283: 92-96.
- Ortega-Salas, A.A., Reyes-Bustamante, H., 2006. Fecundity, growth and survival of the seahorse, *Hippocampus ingens* (Pisces: Syngnathidae) under semi-controlled conditions. *Revista de Biología Tropical* 54: 1099-1102.
- Otero, F.F., Molina, J., Socorro, J., Herrera, R., Fernández, P.H., Izquierdo, S., 2010. Live prey feeding regimes for short snouted seahorse *Hippocampus hippocampus* (Linnaeus, 1758) juveniles. *Aquaculture Research* 41: 8-19.
- Payne, M.F., Rippingale, R.J., 2000. Rearing West Australian seahorse, *Hippocampus subelongatus*, juveniles on copepod nauplii and enriched *Artemia*. *Aquaculture* 188: 353-361.
- Planas, M., Cunha, I. 1999. Larviculture of marine fish: problems and perspectives. *Aquaculture*, 177: 171-190.
- Planas, M., Chamorro, A., Quintas, P., Vilar, A., 2008. Establishment and maintenance of threatened long-snouted seahorse, *Hippocampus guttulatus*, broodstock in captivity. *Aquaculture* 283: 19-28.
- Puello-Cruz, A.C., 2008. Guía de procedimientos para el cultivo de *Tisbe monozota* y *Pseudodiaptomus euryhalinus*. CIAD, Mazatlán México. 25 pp.
- Puello-Cruz, A.C., Gonzáles-Rodríguez, B., Garcia-Ortega, A., Gómez, S., 2004. Use of tropical harpacticoid *Tisbe monozota* Bowman, 1962 (Copepoda: Harpacticoida: Tisbidae) as live food in marine larviculture. pp. 177-187 En: Hendrickx, M.E. (Ed.), Contributions to the study of East Pacific Crustaceans No 3. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM. México. 245 pp.
- Puello-Cruz, A.C., Mezo-Villalobos, S., González-Rodríguez, B., Velasco-Blanco, G., Nieves-Soto, M., Gómez-Gil, B., 2006. Recent advances in the production and use of *Tisbe monozota* Bowman, 1962 (Copepoda:

- Harpacticoida: Tisbidae) in high-density cultures and maintained under control condition. pp. 13-24, En: Hendrickx, M.E. (Ed.), Contribuciones al estudio de los crustáceos del Pacífico Este 4 (1) (Contributions to the study of East Pacific Crustacean 4 (1). Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM, Mazatlán, México. 158 pp.
- Puello-Cruz, A.C., Mezo-Villalobos, S., González-Rodríguez, B., Voltolina, D., 2009. Culture of the calanoid copepod *Pseudodiaptomus euryhalinus* (Johnson 1939) with different microalgal diets. *Aquaculture* 290: 317-319.
- Randall J.E., Lourie, S., 2009. *Hippocampus tyro*, a new seahorse (Gasterosteiformes: Syngnathidae) from the Seychelles. *Smithiana Bulletin* 10: 19-21.
- Roos, G., Wassenbergh V.S., Herrel, A., Aerts, P., 2009. Kinematics of suction feeding in the seahorse *Hippocampus reidi*. *The Journal of Experimental Biology* 212: 2490-3498.
- SAGARPA. 2008. Anuario estadístico de acuicultura y pesca. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. CONAPESCA. 213 p.
- Sargent, J.R., McEvoy, L.A., Bell, J.G., 1997. Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. *Aquaculture* 155: 117-127.
- Schipp G., 2006. The use of calanoid copepods in semi-intensive tropical marine fish larviculture. pp. 84-94. En: Cruz-Suárez. L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villareal-Cavazos, D., Puello-Cruz, A.C., García-Ortega, A., Avances en Nutrición Acuícola VII. VII Simposium International de Nutrición Acuícola. 15-17 Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León. México.
- Shapawi, R., Purser, G.J., 2003. The value of enriched *Artemia* in supporting growth and survival of juvenile pot-bellied seahorses *Hippocampus abdominalis*. *Journal of the World Aquaculture Society* 34(4): 533-541.

- Sheng, J., Lin, Q., Chen, Q., Gao, Y., Shen, L., Lu, J., 2006. Effects of food, temperature and light intensity on the feeding behaviour of three-spot seahorses, *Hippocampus trimaculatus* Leach. *Aquaculture* 256: 596-607.
- Sheng, J., Lin, Q., Chen, Q., Shen, L., Lu, J., 2007. Effect of starvation on the initiation of feeding, growth and survival rate of juvenile seahorses, *Hippocampus trimaculatus* Leach and *Hippocampus kuda* Bleeker. *Aquaculture* 262: 481-492.
- Storero, L.P., Gonzalez, R.A., 2008. Feeding habits of the seahorse *Hippocampus patagonicus* in San Antonio Bay (Patagonia, Argentina). *Journal of the Marine Biological Association of U.K.* 8: 1503-1508.
- Storero, L.P., Gonzalez, R.A., 2009. Prey selectivity and trophic behavior of the Patagonian seahorse, *Hippocampus patagonicus*, in captivity. *Journal of the World Aquaculture Society* 40: 394-401.
- Støttrup, J.G., Norsker, N.H., 1997. Production and use of copepods in marine fish larvae culture. *Aquaculture* 155: 231-247.
- Tanu., Deepti D.D., Rakhee, K, Rayadurga, A.S., Sushant, V.S., Hrishikesh, P.P., 2011. A study on bacteria associated with the intestinal tract of farmed yellow seahorse, *Hippocampus kuda* (Bleeker, 1852): characterization and extracellular enzymes. *Aquaculture Research* 42: 1-9.
- Teixeira, R.L., Musick, J.A., 2001. Reproduction and food habits of the lined seahorse, *Hippocampus erectus* (Teleostei: Syngnathidae) of Chesapeake Bay, Virginia. *Revista Brasileira de Biología* 61: 79-90.
- Téllez-Mohedano, V., Morán-Sánchez, K.L., S.K.L., Medina-González, D., Voltolina D., 1997. Cultivo a nivel piloto del caballito de mar *Hippocampus ingens* (Girard, 1859). *Oceanología* 3: 98-109.
- Thomson, R., Macpherson, H.L., Riaza, A., Birkbeck, T.H., 2005. *Vibrio splendidus* biotype as a cause of mortalities in hatchery-reared larval turbot *Scophthalmus maximus* (L.). *Journal of Applied Microbiology* 99: 243-250.
- Thompson, F.L., Lida, T., Swings, J., 2004. Biodiversity of vibrios. *Microbiology Molecular Biology Reviews* 68: 403-43.

- Tipton, K., Bell, S.S., 1988. Foraging patterns of two syngnathid fishes: importance of harpacticoid copepods. *Marine Ecology Progress Series* 47: 31-43.
- Vincent, A.C.J., 1994. The improbable seahorse. *National Geographic* 186: 126-140.
- Vincent, A.C.J., 1996. The international trade in seahorse. TRAFFIC International, Cambridge. 163 pp.
- Williams, P.J., 2000. Heterotrophic bacteria and the dynamics of dissolved organic material. pp. 153-200. En: Kirchman, D.L. (Ed.). *Microbial ecology of the oceans*. Wiley, New York.
- Wong, J.M., Benzie, J.A.H., 2003. The effects of temperature, *Artemia* enrichment, stocking density and light on the growth of juvenile seahorse, *Hippocampus whitei* (Bleeker, 1855), from Australia. *Aquaculture* 228:207-121.
- Woods, C.M.C., 2000. Improving initial survival in cultured seahorses *Hippocampus abdominalis* Leeson, 1827 (Teleostei: Syngnathidae). *Aquaculture* 190: 377-388.
- Woods, C.M.C., 2002. Natural diet of the seahorse *Hippocampus abdominalis*. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 36: 655-660.
- Woods, C.M.C., 2003a. Growth and survival of juvenile seahorse *Hippocampus abdominalis* reared on live, frozen and artificial foods. *Aquaculture* 220: 287-298.
- Woods, C.M.C., 2003b. Effects of varying *Artemia* enrichment on growth and survival of juvenile seahorses, *Hippocampus abdominalis*. *Aquaculture* 220: 537-548.
- Woods, C.M.C., Valentino, F., 2003. Frozen mysids as an alternative to live *Artemia* in culturing seahorses *Hippocampus abdominalis*. *Aquaculture Research* 34: 757–763.

11. ANEXOS.

Anexo I. Resultados histopatológicos de branquias de juveniles de *H. ingens*

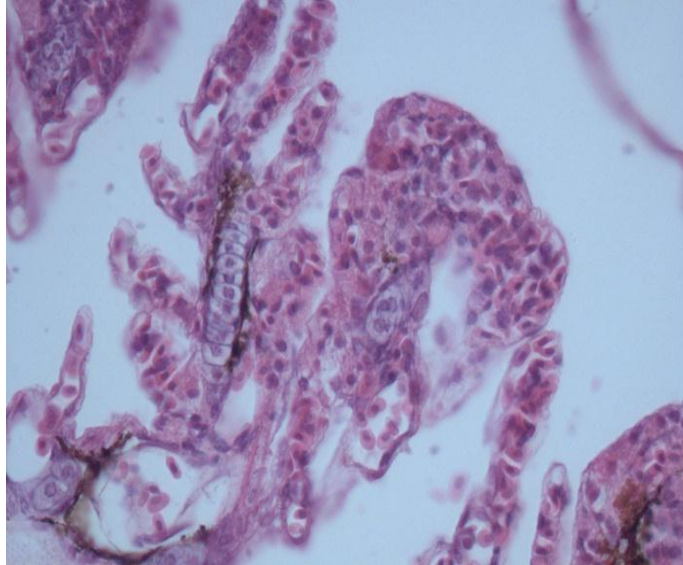


Figura 14. Laminilla con hiperplasia lamelar en el área de las branquias de juveniles de *H. ingens*

Anexo II. Cultivo de *Artemia* en las Instalaciones de CIAD- Mazatlán

Con el objetivo de establecer una metodología propia del cultivo de *Artemia* hasta etapa juvenil, se desarrolló su cultivo en las instalaciones de CIAD-Mazatlán. Se descapsularon 20 g de quistes EG Inve, iniciando con la hidratación de los quistes en agua dulce durante 30 min y fuerte burbujeo, posteriormente se introducían en una solución de 200 mL de cloro, 2.32 g de hidróxido de sodio y 300 mL de agua dulce, durante aproximadamente 3 min (o cambio del color del quiste de rojo a marrón) aplicando aireación vigorosa y constantemente con una piedra difusora. Finalmente se enjuagaron con agua dulce y 1.4 g de tiosulfato para neutralizar el cloro totalmente.

Una vez descapsulados los quistes se colocaban para su eclosión en un tanque cónico de paredes negras a un volumen de 50 L con temperatura de 28 °C y aireación constante durante 24 hrs. Una vez eclosionada se sembró en un tanque de 3000 L con aireación suave a cielo abierto con fotoperiodo natural de

14 h luz / 10 h luz, una densidad de 5.82 org mL^{-1} , temperatura promedio de $26.5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y salinidad de $34.9 \text{ }_{\text{‰}}$. Para la alimentación diaria de la *Artemia* se diluyeron 50 g de cebada (LA INDIA Verdeña®) en 2 L de agua dulce, se dejó reposar la solución durante aproximadamente 10 minutos, una vez que se sedimentaba el exceso, la suspensión era agregada a los tanque teniendo cuidado de no verter el concentrado del fondo. El octavo día de cultivo se desdoblaron los organismos a otro tanque del mismo volumen bajo las mismas condiciones, a una densidad de 3 org mL^{-1} y se duplico la alimentación para los dos tanques con 100g de cebada.

Para al catorceavo día se finalizó el cultivo logrando juveniles de 4 mm de longitud total.

Anexo III. Medidas morfométricas finales.

La figura muestra las diferentes medidas morfométricas (longitud de tronco, cola y ancho) de juveniles de *H. ingens* durante el experimento. Ninguno de los valores medios finales de las diferentes longitudes mostraron diferencias significativas (ANOVA, $p > 0.05$) entre los tratamientos (Figura 15 a, b, c).

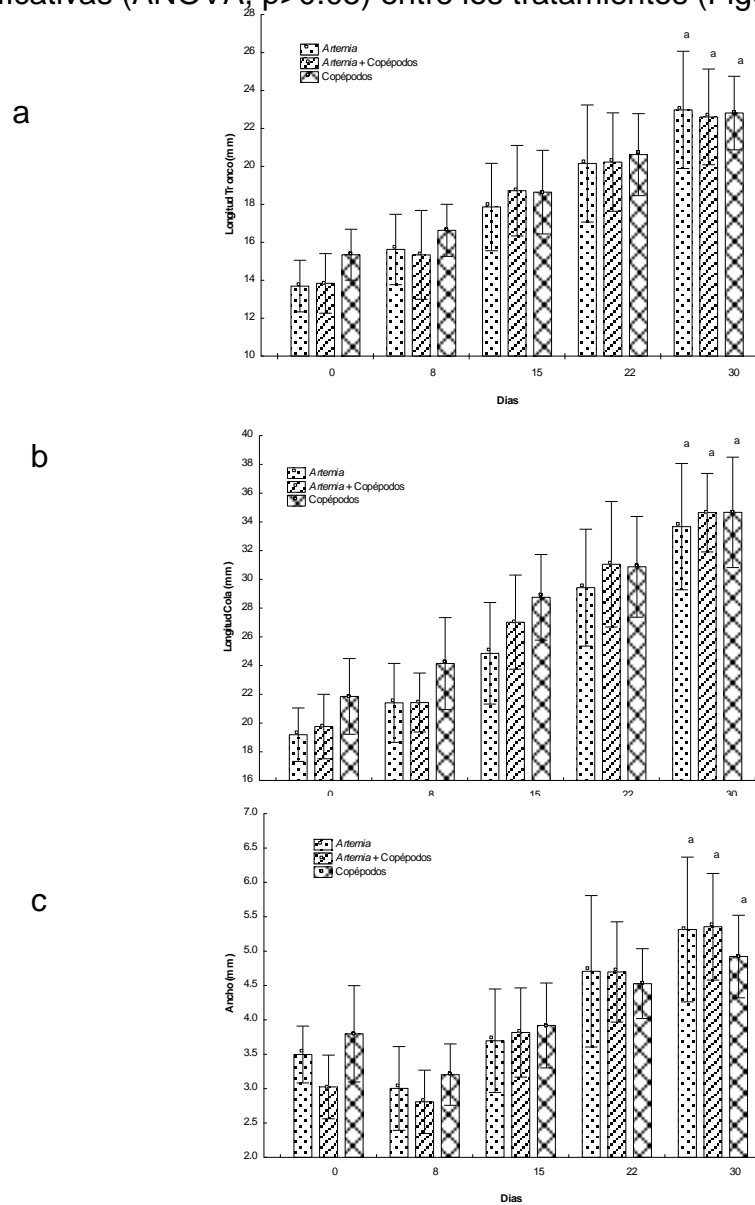


Figura 15. Valores medios de las diferentes medidas morfométricas (a: Longitud tronco, b: longitud cola y c: ancho) del caballito de mar *Hippocampus ingens* durante 30 días de cultivo bajo diferentes tratamientos alimenticios. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$)

Anexo IV. Tasa de crecimiento de las medidas morfométricas.

Tabla 5. Talla inicial, talla final y tasa de crecimiento (TC) en las diferentes longitudes de juveniles de caballito de mar *Hippocampus ingens* bajo diferentes tratamientos alimenticios.

Longitud / Tratamiento	Artemia	Artemia + Copépodos	Copépodos
Tronco			
Talla Inicial (mm)	13.69 ± 1.43	13.84 ± 1.66	15.35 ± 1.41
Talla Final (mm)	22.98 ± 3.25	22.61 ± 2.66	22.81 ± 2.04
TC (mm día ⁻¹)	0.32 ± 0.00 ^a	0.31 ± 0.02 ^a	0.26 ± 0.01 ^b
Cola			
Talla Inicial (mm)	19.19 ± 1.96	19.76 ± 2.36	21.86 ± 2.77
Talla Final (mm)	33.67 ± 4.62	34.65 ± 2.88	34.67 ± 4.05
TC (mm día ⁻¹)	0.51 ± 0.03 ^a	0.55 ± 0.05 ^a	0.45 ± 0.04 ^a
Ancho			
Talla Inicial (mm)	3.49 ± 0.43	3.03 ± 0.49	3.80 ± 0.74
Talla Final (mm)	5.32 ± 1.11	5.36 ± 0.82	4.92 ± 0.63
TC (mm día ⁻¹)	0.07 ± 0.01 ^c	0.09 ± 0.00 ^a	0.05 ± 0.01 ^b

Filas con letras distintas indican diferencias significativas (p< 0.05)

Anexo VI. Incremento en las medidas morfométricas.

Tabla 6. Incremento en las diferentes longitudes de juveniles de caballito de mar *Hippocampus ingens* bajo diferentes tratamientos alimenticios.

Longitud / Tratamiento	Artemia	Artemia + Copépodos	Copépodos
Tronco			
Incremento (mm)	9.29 ± 0.23 ^a	8.77 ± 0.75 ^{ab}	7.47 ± 0.59 ^b
Cola			
Incremento (mm)	14.48 ± 0.78 ^a	14.89 ± 0.67 ^a	12.81 ± 0.43 ^b
Ancho			
Incremento (mm)	1.82 ± 0.23 ^{ab}	2.33 ± 0.15 ^b	1.13 ± 0.26 ^c
Cabeza			
Incremento (mm)	4.06 ± 0.33 ^a	4.70 ± 0.92 ^a	3.73 ± 0.10 ^a
Hocico			
Incremento (mm)	1.90 ± 0.24 ^b	2.49 ± 0.20 ^a	1.82 ± 0.15 ^b
Altura			
Incremento(mm)	23.77 ± 0.92 ^a	23.66 ± 1.21 ^a	20.69 ± 0.29 ^b
Ancho			
Incremento (mm)	1.82 ± 0.23 ^a	2.33 ± 0.15 ^a	1.13 ± 0.26 ^b

Filas con letras distintas indican diferencias significativas (p< 0.05)