



Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C.

Uso del copépodo *Pseudodiaptomus euryhalinus* para el mejoramiento del crecimiento y supervivencia en el cultivo piloto de pargo flamenco *Lutjanus guttatus*.

Por:

Aldo Alan Flores Rojas

TESIS APROBADA POR LA:

UNIDAD MAZATLÁN
EN ACUICULTURA Y MANEJO AMBIENTAL.

Como requisito para obtener el grado de:

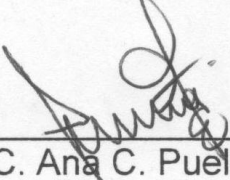
MAESTRÍA EN CIENCIAS

MAZATLÁN, SINALOA.

OCTUBRE DEL 2011

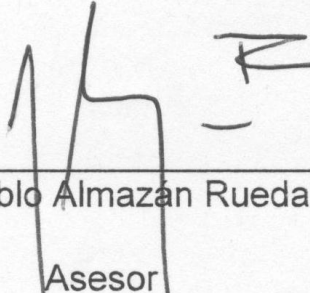
APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Aldo Alan Flores Rojas, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias, con especialidad en Acuicultura.



M. en C. Ana C. Puello Cruz

Directora de Tesis




Dr. Pablo Almazan Rueda

Asesor



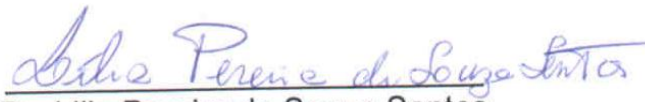
Dr. Armando Garcia Ortega

Asesor



M. en C. Isabel Abdo de la Parra

Asesor



Dr. Lilia Pereira de Souza Santos

Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten citas breves sin permiso especial del autor, siempre y cuando se otorgue el crédito correspondiente. Se podrá solicitar permiso al Director del Centro o Jefe del Área correspondiente del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. apartado postal 1735, Hermosillo, Sonora C.P. 83000 México, para citas o consultas más completas con fines académicos. En otras circunstancias, se deberá solicitar permiso del autor.

La publicación en comunidades científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa aprobación escrita del director.

Dr. Ramón Pacheco Aguilar
Director General del CIAD, A. C.

DEDICATORIA

Con mucho amor esta tesis es dedicada:

A mis padres Maricruz y Ernesto

A mis Tías

Y a mí nueva familia

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada durante el periodo de la maestría 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.

Quiero agradecer infinitamente el gran apoyo a la M. en C. Ana C. Puello Cruz por todo este tiempo en mi estancia en el CIAD, además de escucharme y darme consejos como la gran persona que la caracteriza.

Quiero agradecer al Dr. Armando García Ortega y a la M. en C. Isabel Abdo de la Parra por su asesoría y sugerencias en el experimento de larvicultura de pargo.

También, quiero expresar mi agradecimiento, a los miembros de mi comité de tesis Dr. Pablo Almazán Rueda y a mi asesora de Brasil Dra. Lilia Pereira de Souza Santos por sus valiosas sugerencias y observaciones.

A la Biol. Blanca González Rodríguez técnico del Laboratorio de Bromatología del CIAD, por su apoyo en la parte de análisis proximales y en el experimento de larvicultura. Así mismo, le agradezco a la maestra M. en C. Noemí García Aguilar por proporcionar los huevos de pargo flamenco para la experimentación y por sus sugerencias para el cultivo.

Por su invaluable colaboración durante la realización de los experimentos de larvicultura y cultivo de copépodos quiero agradecer a la Biol. Virginia Patricia Domínguez Jiménez, M. en C. Héctor Canseco, IBQ Jarintzin Mones Saucedo, IBQ Jesús Efrén Astorga Rodríguez. Muy especialmente a la M. en C. Gabriela Velasco Blanco por apoyarnos monitoreando y suministrando rotíferos, junto con el Sr. Juan Francisco Huerta Ortega por proporcionarnos microalgas y finalmente al Sr. Manuel Cruz Aramburo por proporcionarnos los nauplios de *Artemia*.

Me gustaría también reconocer el trabajo del equipo del CIAD-Culiacán que lidera la Dra. Dolores Muy Rangel para determinación de aminoácidos (M. en C. Laura Aracely Contreras Angulo y M. en C. Rosabel Vélez de la Roca) y ácidos grasos (M. en C. Verónica Pérez Rubio y M. en C. Eduardo Sánchez Valdez).

A todos los profesores de maestría, por brindarme los conocimientos necesarios y la formación científica, para la realización de esta investigación.

Al encargado de cómputo Jorge Alberto Durán Niebla y los técnicos en mantenimiento Felipe Hernández Peinado y Jesús Antonio Angulo Armenta, por proporcionarme su gran disponibilidad cuando la requeríamos. A Valerie Williams por su apoyo en la traducción de mi poster (11th ICOC 2011).

Agradezco a mis amigos de maestría, Citlalic, Tere, Jarintzin, Efrén, Martin, Oscar, Linda, Elda, Sarahi, Carlos por acompañarme en esta etapa de formación profesional.

Contenido	páginas
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	7
2.1 <u>Supervivencia de peces marinos</u>	10
2.2 <u>Crecimiento en peces marinos</u>	11
2.3 <u>Contenido nutricional</u>	12
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
4. HIPÓTESIS	16
5. OBJETIVO GENERAL	17
5.1 <u>Objetivos particulares</u>	18
6. MATERIAL Y MÉTODOS	19
6.1 <u>Cultivo de microalgas</u>	19
6.2 <u>Cultivo del copépodo <i>Pseudodiaptomus euryhalinus</i> (1000 L)</u>	20
6.2.1 Conteo de copépodos	21
6.2.2 Cultivo continuo de 1000 L a 7000 L de <i>P. euryhalinus</i>	22
6.2.3 Cultivo de 7000 L del copépodo <i>P. euryhalinus</i>	22
6.2.4 Proceso de depuración de los copépodos antes de darlos como alimentos	23
6.2.5 Producción de <i>B. rotundiformis</i> y <i>Artemia</i> sp.	23
6.3 <u>Cultivo larval de pargo flamenco <i>Lutjanus guttatus</i></u>	24
6.3.1 Colecta y siembra de huevos de <i>L. guttatus</i>	25
6.3.2 Protocolo de alimentación larval de <i>L. guttatus</i>	26
6.4 <u>Análisis proximales</u>	29
6.5 <u>Análisis de Aminoácidos</u>	29
6.6 <u>Análisis de Ácidos grasos</u>	29
6.7 <u>Determinación de tasa de crecimiento absoluta</u>	30
6.8 <u>Análisis estadísticos</u>	30
7. RESULTADOS	31
7.1 <u>Cultivo piloto del copépodo <i>Pseudodiaptomus euryhalinus</i></u>	31
7.1.1 Experimento 1	31
7.1.2 Experimento 2	33
7.1.3 Experimento 3	36

7.2 <u>Resultados del cultivo larval del pargo flamenco <i>L. guttatus</i></u>	40
7.2.1 Tasas de crecimiento en longitud total	40
7.2.2 Supervivencia	45
7.3 <u>Composición proximal, aminoácidos y ácidos grasos</u>	46
7.3.1 Alimento vivo	46
7.3.2 Larvas 30 dpe	47
7.3.3 Ácidos grasos de los alimentos vivos	48
7.3.4 Ácidos grasos en las larvas de pargo	50
7.3.5 Aminoácidos en alimento vivo	52
7.3.6 Aminoácidos en larvas de pargo	53
8. DISCUSIÓN	55
9. CONCLUSIÓN	69
10. RECOMENDACIONES	70
11. BIBLIOGRAFÍA	71

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1.-** Protocolo de alimentación de larvicultura de pargo flamenco *L. guttatus*, probado en tres diferentes tratamientos. 28
- Figura 2.-** Producción de *P. euryhalinus* (copépodos·L⁻¹) al final del experimento, mediante dos métodos de cultivo (de relleno y de volumen fijo) con temperatura media de 21.4 °C 31
- Figura 3.-** Porcentajes por estadios de *P. euryhalinus* al final del experimento, mediante dos métodos de cultivo (relleno y de volumen fijo) a temperatura de 21.4 °C 32
- Figura 4.-** Producción de *P. euryhalinus* (copépodos·L⁻¹) al final del experimento, mediante dos métodos de cultivo (de relleno y de volumen fijo) a temperatura de 25.4 °C 34
- Figura 5.-** Porcentajes de estadios de *P. euryhalinus* al final del experimento, mediante dos métodos de cultivo (relleno y de volumen fijo) a temperatura de 25.4 °C 35
- Figura 6.-** Producción de *P. euryhalinus* (copépodos·L⁻¹) al final del experimento, mediante dos métodos de cultivo (relleno y de volumen fijo) a temperatura de 29.5 °C 37
- Figura 7.-** Porcentajes por estadios de *P. euryhalinus* al final del experimento, mediante dos métodos de cultivo (relleno y de volumen fijo) a temperatura de 29.5 °C 38
- Figura 8.-** Longitud total (mm) de larvas de pargo flamenco *L. guttatus* alimentadas con tres dietas: copépodos, copépodos+rotíferos y rotíferos únicamente, cultivados durante 30 días. Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas. 41
- Figura 9.-** Peso húmedo (mg·larva⁻¹) durante los 30 dpe de larvas de pargo flamenco *L. guttatus* alimentadas con tres dietas: copépodos, copépodos+rotíferos y rotíferos únicamente. Letras distintas representan diferencias significativas (p<0.05). 43

Figura 10.- Porcentaje de supervivencia a los 30 dpe, del cultivo larval de pargo flamenco *L. guttatus* alimentadas con tres dietas. Letras distintas indican diferencia significativa.

45

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Parámetros de siembra determinadas para el cultivo larval de pargo flamenco *L. guttatus* al inicio del experimento. 25

Tabla 2.- Temperatura (T°C) y oxígeno disuelto (OD) durante los tres diferentes experimentos realizados para la producción del cultivo piloto del copépodo calanoide *P. euryhalinus*. Letras distintas presentan diferencias estadísticamente significativas. 39

Tabla 3.- Porcentaje de eclosión (1 dpe) y supervivencia (2 dpe) a las 24 y 48 horas respectivamente, posteriores a la siembra de huevos. En los tres diferentes tratamientos. Letras distintas presentan diferencias estadísticamente significativas. 40

Tabla 4.- Tasa de crecimiento absoluto (TCA), tasa de crecimiento específico (TCE), en longitud total (mm) durante 30 días de cultivo de larvas de pargo flamenco *L. guttatus*

Las distintas letras dentro de una misma fila indican diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos ($p < 0.05$). 42

Tabla 5.- Tasa de crecimiento absoluto (TCA), tasa de crecimiento específico (TCE), en peso húmedo ($\text{mg} \cdot \text{larva}^{-1}$) durante 30 días de cultivo de larvas de pargo flamenco *L. guttatus*.

Las distintas letras dentro de una misma fila indican diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos ($p < 0.05$). 44

Tabla 6.- Composición proximal (proteínas, grasas, ceniza y humedad) base seca del alimento vivo suministrado a larvas de pargo flamenco *L. guttatus*.

Letras diferentes representan diferencia estadísticamente significativa. 46

Tabla 7.- Composición proximal final (proteínas, grasas, ceniza y humedad) base seca de larvas de pargo flamenco *L. guttatus* cultivadas al final del experimento por 30 días, alimentadas con las tres dietas, copépodos, copépodos+rotíferos y rotíferos. Letras distintas representan diferencia estadísticamente significativa. 47

Tabla 8.- Valores medios del total de ácidos grasos (peso seco) expresados en porcentaje, para los diferentes alimentos vivos utilizados en larvas de pargo flamenco *L. guttatus*. Letras distintas representan diferencia estadísticamente significativa. 49

Tabla 9.- Porcentajes de ácidos grasos relativos al total de ácidos grasos (peso seco), para las larvas de pargo flamenco *L. guttatus* al final 30 días de cultivo alimentadas con tres dietas: copépodos, copépodos+rotíferos y rotíferos. Letras distintas representan diferencia significativa. 51

Tabla 10a.- Total de aminoácidos en porcentaje (%) en relación con la cantidad de proteína en base seca, en los tres alimentos vivos utilizados para la alimentación de pargo flamenco *L. guttatus*. Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas. 52

Tabla 10b.- Total de aminoácidos en porcentaje (%) en relación con la cantidad de proteína en base seca, en los tres tratamientos al final del experimento (30 dpe). Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas. 54

Resumen

La producción de copépodos ha sido complicada debido a los altos costos de los sistemas y los grandes volúmenes que se necesitan para llevar a cabo su cultivo. A pesar de estas dificultades se han logrado su cultivo para la alimentación de larvas de peces marinos y camarón. El objetivo de este trabajo es evaluar y comparar dos métodos de producción del cultivo piloto del copépodo *Pseudodiaptomus euryhalinus* para el mejoramiento del crecimiento y supervivencia de las larvas de pargo flamenco *Lutjanus guttatus*. Durante el cultivo masivo del copépodo se utilizaron tanques cilíndrico-cónicos con paredes internas blancas y capacidad de 1000 L. Se probaron dos métodos: el primer método fue el de volumen fijo con un volumen inicial de 900 L y el segundo método fue el de incremento, con un volumen inicial de 300 L que consistió en rellenar cada 5 días hasta el volumen final de 900 L. Las microalgas utilizadas fueron: *Chaetoceros muelleri*, *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis oculata* el uso de cada una dependió de la temperatura ambiental. La cantidad de copépodos sembrados en los dos métodos fue de $0.1 \text{ org}\cdot\text{ml}^{-1}$. A lo largo de 5 meses, se realizaron 3 experimentos en diferentes tiempos y cada uno tuvo una duración de 15 días, durante este tiempo, se mantuvo una aireación constante. Los resultados obtenidos del cultivo piloto del copépodo fueron: experimento 1; volumen fijo de $9\,400 \text{ cop}\cdot\text{ml}^{-1}$ y método de relleno de $8\,900 \text{ cop}\cdot\text{ml}^{-1}$, para el experimento 2; volumen fijo obtuvo una concentración de $7\,500 \text{ cop}\cdot\text{ml}^{-1}$ y para el método de relleno de $1\,300 \text{ cop}\cdot\text{ml}^{-1}$, para el experimento 3 en el método de volumen fijo $6\,200 \text{ cop}\cdot\text{ml}^{-1}$ y $6\,100 \text{ cop}\cdot\text{ml}^{-1}$ para el método de relleno. Solo se presentaron diferencias estadísticamente significativas en el experimento 1 y 3 ($p < 0.05$). Posteriormente se realizó el experimento de cultivo larval de pargo flamenco *L. guttatus*, el cual fue realizado al exterior y fue cubierto con malla-sombra de 30 % de sombra donde se utilizaron 12 tanques de 3 000 L de fondo blanco y paredes negras. Para el cultivo larval fue empleado el método de agua verde (*N. oculata* $500,000 \text{ cel}\cdot\text{ml}^{-1}$ e *I. galbana* $50,000 \text{ cel}\cdot\text{ml}^{-1}$), en esta técnica se incorporaron los tres tratamientos con cuatro replicas, el tratamiento 1 (T1) se alimentó con $1 \text{ copepodo}\cdot\text{ml}^{-1}$, tratamiento 2 (T2): $5 \text{ rotíferos}\cdot\text{ml}^{-1} + 0.5 \text{ copépodos}\cdot\text{ml}^{-1}$ y el tratamiento 3 (T3): $10 \text{ Rot}\cdot\text{ml}^{-1}$ desde el día 0 pe hasta el día 15 pe. Desde el día 16 pe al 30 dpe, se alimentó con *Artemia* ($1 \text{ Art}\cdot\text{ml}^{-1}$). El cultivo larval tuvo una duración de 30 días. Se midió la longitud total y peso húmedo cada 3 días tomando una muestra de 10 larvas por cada tanque. Al final del experimento (30 dpe) se determinó la supervivencia final. Durante el cultivo larval, todos los tratamientos presentaron diferencias significativas en longitud total y peso húmedo, el T1 obtuvo mejores resultados con una tasa de crecimiento absoluta en longitud total y peso húmedo de 23.4 mm y $332.1 \text{ mg}\cdot\text{larva}^{-1}$, respectivamente. Para T2 fue de 15.6 mm y $96.2 \text{ mg}\cdot\text{larva}^{-1}$. Y para T3 fue el que obtuvo menor tasa de crecimiento absoluto con 6.8 mm y $10.5 \text{ mg}\cdot\text{larva}^{-1}$. En el caso de la supervivencia quien obtuvo mejores resultados fue para T3 con 2.6 %, mientras que para T2 fue de 1.1 % y para T1 fue la menor con 0.7 %. Los resultados demuestran que el copépodo *P. euryhalinus* produce buen crecimiento, mientras que los rotíferos incrementan la supervivencia.

1. Introducción

El cultivo de larvas de peces marinos depende de un alimento de calidad y disponible en toda su etapa de crecimiento desde la eclosión hasta el destete. El desarrollo de las técnicas de larvicultura se ha visto limitado por el poco conocimiento en requerimientos nutricionales para larvas (Watanabe y Kiron, 1994; Yúfera *et al.*, 1996; Shields, 2001) así como, el poco suministro de alimento vivo durante la primera alimentación exógena. El uso de alimento vivo, sigue siendo indispensable en la mayoría de los laboratorios de producción larvaria de peces marinos. Los organismos vivos deben cumplir con una óptima calidad (aspectos nutricionales), además de asegurar el abastecimiento y contar con tamaño adecuado. El alimento vivo de uso frecuente en larvas de peces marinos han sido rotíferos, seguido de *Artemia*. Esto es debido a que su cultivo es relativamente fácil. Sin embargo, no siempre producen buen crecimiento en las larvas. Esto se atribuye a su inadecuado perfil de ácidos grasos, contenido proximal y en algunos casos tallas inapropiadas (Kahan, 1980; Sargent *et al.* 1999; Holt, 2003; Faulk y Holt, 2005; Olivotto *et al.* 2003, 2005, 2006).

Es por ello, que los copépodos han sido empleados satisfactoriamente en la primera alimentación larval de peces marinos, (May, 1970; Hunter, 1981; Kraul. 1993; Bent, 1993; Alvarez-Lajonchère *et al.* 1996). Obteniendo resultados significativos en crecimiento y supervivencia durante esta etapa, al incluirlos junto con rotíferos y nauplios de *Artemia* (Støttrup y Norsker, 1997; Helland *et al.* 2003; Evjemo *et al.* 2003; Hamrea *et al.* 2005).

Por lo tanto, los copépodos han sido reconocidos por la superioridad nutricional frente a los otros alimentos vivos convencionales, debido a que presentan

carotenoides, astaxantinas, (Kraul *et al.* 1992), grandes cantidades de ácidos grasos esenciales altamente insaturados (HUFA's) y antioxidantes naturales (Sargent *et al.* 1997). Además, presentan altos niveles de proteína (44-52%) con adecuado perfil de aminoácidos (Hopp y Bleher, 1997; Støttrup, 2000) y son fuentes naturales de vitaminas C y E (van der Meeren, 2003).

A pesar de todas las ventajas nutricionales que representan los copépodos en larvicultura no se ha podido establecer el cultivo intensivo de este organismo a gran escala, para reemplazar el uso de nauplios de *Artemia* y de rotíferos, (Alvarez-Lajonchère y Hernández-Molejón 2001). En la mayoría de los casos el uso de estos organismos está restringido a sistemas extensivos dificultando el suministro, donde el copépodo es colectado mediante diferentes redes para la selección de tamaños. Esto solo permite abastecer ciertas cantidades en los cultivos larvales. Por otro lado, el uso de zooplancton silvestre permite la entrada de organismos indeseables y/o enfermedades, además de sus fluctuaciones en los valores nutricionales (Mørehead *et al.*, 2005). Ya que no siempre se extraen los mismos organismos.

Dentro del zooplancton, los harpacticoides presentan eficiencia para desarrollar cultivos intensivos en tanques relativamente pequeños, siendo capaces de producir cultivos volumétricamente densos. Su proliferación depende de un incremento de área mediante sustratos sólidos, no de volumen. Mientras que los copépodos calanoides son planctónicos y su cultivo depende de grandes volúmenes de agua, siendo cultivados a bajas densidades (Støttrup y Norsker, 1997)

Los copépodos harpacticoides más comúnmente empleados en larvicultura incluye a *Euterpina acutifrons* (Kraul *et al.*, 1992); *Tisbe spp.* (Støttrup y Norsker, 1997; Nanton y Castell, 1998) y dentro de los calanoides está *Acartia spp.* (Toledo *et al.* 1997; Schipp *et al.* 1999); *Pseudodiaptomus spp.* (Doi *et al.* 1997; Toledo *et al.* 1999), estos últimos, han demostrado tener potencial de cultivo, ya que sus nauplios son completamente pelágicos y tienen un comportamiento de nado discontinuo, el cual es un importante estímulo visual para las larvas marinas (Delbare *et al.* 1996; Schipp, 2006). Además, los nauplios son suficientemente pequeños 71 μm (Puello *et al.* 2008), para ser ingeridos por las larvas de peces durante los primeros días de la alimentación exógena, (Payne y Rippingale, 2001).

Los beneficios del uso del copépodo en la industria de larvicultura comercial pueden incrementar la supervivencia larval (Shields *et al.* 1999), tasas de crecimiento (Støttrup y Norsker, 1997) y promover buen desarrollo (Luizi *et al.* 1999). Uno de las especies de copépodos del orden de los calanoides es *Pseudodiaptomus euryhalinus* (Johnson, 1939), es un organismo que presenta variación de tamaño, adecuado contenido de lípidos totales (10.53%) y proteína (70.57%) y consume gran variedad de microalgas *Chaetoceros muelleri*, *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica*, *Nannochloropsis oculata* (Puello *et al.* 2008). Son tolerantes al manejo además, tienen potencial de adaptación a cultivo. *P. euryhalinus* es un copépodo planctónico tropical, sus nauplios son planctónicos, lo cual los hacen más conveniente para la alimentación de larvas de peces marinos (Puello *et al.* 2008). Es una de las especies que se ha utilizado para la primera alimentación en la larvicultura del pargo flamenco

Diversos autores han considerado al pargo como una especie con gran potencial para la acuicultura (Tucker y Jory, 1991; Bennetti y Wilson, 1996; Leu *et al.* 2003; Dumas *et al.* 2004; Ogle y Lotz, 2006). Generalmente, la dificultad en su producción es la mortandad masiva de larvas durante los primeros días después de la eclosión o durante la metamorfosis. Esto es debido a que no cuentan con un sistema digestivo desarrollado y requieren de presas de tamaño pequeño entre 50-100 μm de longitud ya que cuentan con una boca pequeña (Detwyler y Houde, 1970; Yúfera y Pascual, 1984, Tucker, 1998; Galaviz *et al.* 2011).

Es por eso, que los rotíferos como dieta única en larvicultura de la familia lutjanidae no son los más adecuados (Doi *et al.* 1994; Schipp *et al.* 1999; Payne y Ripplingale, 2001), así, como en la serranidae (Toledo *et al.* 1997, 1999), ya que los rotíferos recién eclosionados miden entre 100 – 200 μm y son demasiado grandes para su boca (Boza-Abarca *et al.* 2008). Los estudios enfocados en los requerimientos nutricionales para la alimentación larval de peces marinos, considera la cantidad y calidad de los nutrientes que permiten asegurar crecimiento y supervivencia: principalmente basados en contenido de proteína, aminoácidos, lípidos (ácidos grasos), carbohidratos, vitaminas y minerales.

En el periodo larvario, los peces marinos requieren mayor cantidad de proteína para la formación de los tejidos (Civera-Cerecedo *et al.* 2004) ésta debe ser mayor del 50 % aproximadamente (Tucker, 1998). Sin embargo, esa cantidad debe de ajustarse a cada una de las especies de estudio. Por otra parte, la importancia de los aminoácidos esenciales y no esenciales son considerados,

debido a su relevancia en las etapas embrionarias, larvarias y postlarvarias (Fyhn, 1989; Fyhn *et al.* 1993).

A su vez, los lípidos también son indispensables en las primeras etapas larvales de los peces ya que son la fuente principal de energía (Vetter *et al.* 1983) permitiendo mantener muchas funciones básicas (Cowey y Sargent, 1979; Kanazawa, 1985). De todos los ácidos grasos, los más estudiados son los altamente insaturados (HUFA) de cadena larga, en particular los ácidos grasos de la serie n-3 y n-6 que son considerados esenciales. Los alimentos vivos utilizados comúnmente carecen de ácidos grasos esenciales y deben ser enriquecidos con alimento o productos comerciales, caso contrario para los copépodos que naturalmente incluye estos ácidos (Støttrup y Norsker, 1997), ya que tienden a mantener constante la cantidad y composición bioquímica de los ácidos grasos (Fukusho *et al.* 1980). Al parecer el ácido graso de mayor importancia para algunas especies marinas es el ácido docosahexaenoico (DHA siglas en inglés), seguido del ácido eicosapentaenoico (EPA), debido a que son precursores del crecimiento en las primeras etapas de desarrollo de peces marinos, como en *Gadus morhua*, *Caranx sp.*, *Seriola dumerili* (Kroyer, 1845).

En los estudio de larvicultura de pargo flamenco y botete diana se han empleado los copépodos harpacticoides y calanoides, registrando incrementos significativos en las tasas de crecimiento y supervivencia (García-Ortega *et al.* 2005; Flores-Rojas, 2009).

Este estudio está enfocado en optimizar el método de cultivo a nivel piloto para establecer un sistema confiable de alta producción, calidad y fácil manejo del

copépodo *Pseudodiaptomus euryhalinus*, para abastecer en cantidad y calidad al cultivo larval de pargo flamenco *Lutjanus guttatus* a nivel piloto.

2. Antecedentes

La acuicultura marina (en el mar y en estanques) ha generado el 32,3 % de la producción acuícola mundial en cantidad y el 30,7 % en valor de la producción mundial del 2008. La cual, produjo una gran variedad de peces y crustáceos de gran valor. Sin embargo, los peces de agua dulce fueron los que dominaron con una producción de 28,8 millones de toneladas seguido de moluscos (13,1 millones de toneladas), crustáceos (5 millones de toneladas), quedando en último lugar el cultivo de peces marinos con 1,8 millones de toneladas. La contribución de la acuicultura a la producción mundial de los principales grupos de especies se ha incrementado considerablemente desde 1950, excepto en el caso de los peces marinos. En 2008 la acuicultura a nivel internacional en relación con la producción total de peces marinos fue de tan sólo el 2,6 %, la cual, domina la producción principalmente de peces planos, falsos halibut del Japón, el múgil, la dorada, la dorada del Japón, la lubina, el rodaballo, la cobia y el corvinón ocelado. Los países productores de las especies antes mencionadas son Asiáticos y Europeos, hoy en la actualidad en países latinoamericanos se ha incrementado notablemente la acuicultura marina. (FAO, 2011).

En los últimos años, la acuicultura en México ha crecido y alcanzado producciones record para especies de camarón y tilapia. Pero en el año 2006, fue un momento importante, debido a que CONAPESCA planteó como objetivo la diversificación y reconversión productiva enfocada al cultivo de peces marinos principalmente. El cual tomo como especies de partida al botete diana *Sphoeroides annulatus* producido por CIAD Mazatlán, quienes lograron la producción de alevines y el escalamiento a nivel piloto. En el caso de la

acuicultura marina es un paso a seguir para la sustentabilidad de especies marinas y la generación de nuevas tecnologías de cultivo, ya que aún no se han probado las factibilidades de especies marinas y algunos elementos críticos que no han sido optimizados como la primera alimentación durante los cultivos larvales. Debido a los bajos perfiles nutricionales de algunos alimentos vivos y otros a las dificultades de cultivo. La tendencia actual para desarrollar nueva tecnologías de alimentación, principalmente en larvicultura de peces marinos. (Seijo y Martínez-Cordero, 2006)

Es por ello, que los copépodos calanoides y harpacticoides han sido los más estudiados para intensificar sus cultivos para ser usados en cultivos larvales de peces marinos (Nanton y Castell, 1998). Los harpacticoides son predominantemente bentónicos lo que los hace poco disponibles para aquellas larvas que se alimentan en la columna de agua (Kitajima, 1973), a diferencia los calanoides que son planctónicos más adecuados para las larvas de peces (Payne y Ripplingale, 2000). Conociendo estas características, en acuicultura se han desarrollado técnicas de cultivo para la producción masiva de diversas especies de copépodos, así, como su empleo en la alimentación larval de peces marinos, obteniendo buenos resultados en crecimiento y supervivencia en comparación con el alimento más utilizado (rotíferos y *Artemia*) (Sargent *et al.*, 1997).

El copépodo harpacticoide del genero *Tisbe sp.* ha sido mantenido en tanques de 100 L durante 2 a 3 semanas, alimentándolo con *Isochrysis galbana*, alcanzando densidades de (1 000 organismos·L⁻¹) para alimentar larvas de *Amphiprion clarkii* (Olivotto *et al.*, 2008). Ogle, (1979) y Støttrup *et al.* (1986) mencionan que la mayoría de los copépodos calanoides pueden alcanzar

densidades de 100 a 200 adultos·L⁻¹. Schipp *et al.* (1999) lograron cultivos del copépodo *Acartia sp.* en tanques de 1000 L, obteniendo 752 copepoditos·L⁻¹ y 319 adultos·L⁻¹ y un promedio de 2000 nauplios·L⁻¹ durante 8 días de cultivo, alimentándolos con mezcla de *Rhodomonas sp.*, *Tetraselmis sp.* e *Isochrysis sp.*

Payne y Rippingale, (2001) produjeron 878 nauplios·L⁻¹ cada 21 días del copépodo calanoide *Gladioferens imparipes* en tanques automatizados de 500 L durante 420 días. A diferencia de los copépodos harpacticoides, estos pueden crecer a densidades mayores de 115 000 organismos·L⁻¹ (Kahan *et al.*, 1982). McKinnon *et al.* (2003) mantuvieron 3 especies de copépodos en 3 contenedores de 20 L, alimentados con la mezcla de *Isochrysis sp.*, *Tetraselmis chuii*, *Rhodomonas sp.* y *Heterocapsa niei* en proporciones de 2:1:1:1 para *Bestiolina similis* y *Parvocalanus crassirostris* y 1:2:1:1 para *Acartia sinjiensis*, obtuvieron 8 000 organismos·L⁻¹, 6 000 organismos·L⁻¹ y 2 000 organismos·L⁻¹, respectivamente.

Puello *et al.*, (2008) para el copépodo calanoide *Pseudodiaptomus euryhalinus* produjeron una concentración de 1 460 y 3 930 organismos·L⁻¹ en tanques experimentales de 300 L y piloto 1000 L respectivamente, con la posibilidad de incrementar las concentraciones al incrementar los volúmenes.

Ohno y Okamura, (1988) mencionan que el cultivo de copépodos es necesario emplear estanques de grandes dimensiones. Sin embargo, es posible lograr cultivos intensivos de copépodos con producciones adecuadas, controlando las variables de cultivo especialmente la alimentación y el volumen. (Sun y Fleeger, 1995; Støttrup y Norsker, 1997; Schipp *et al.*, 1999) con el objetivo de

lograr mantener constante la fuente alimenticia durante un cultivo larval en especies marinas, logrando mejores supervivencias y crecimientos.

2.1. Supervivencia de peces marinos

Durante los cultivos de peces marinos se han reflejado las principales dificultades, en la primera alimentación y por consiguiente las bajas supervivencias ocasionadas por alimentos bajos en nutrimentos. Por lo tanto, las experiencias en diversos estudios realizados en varias especies y en específico pargo, han reportado supervivencias desde 0% hasta 12.5% (Ogle y Lotz, 2000). Como en el caso de las larvas de pargo rojo (*Lutjanus campechanus*) donde se obtuvo una supervivencia de 12.5% al utilizar un mesocosmos con los copépodos *Acartia sp.* y *Pseudodiaptomus sp.* (Ogle y Lotz, 2000).

Singhagraiwan y Doi (1993) reportaron supervivencias de 3.4% a los 8 días post eclosión (dpe) y 1.6% a los 12 dpe para larvas de *L. argentimaculatus*, alimentadas con nauplios de copépodos (*Acartia* y *Oithona*). Emata *et al.* (1994, 1999) alimentaron a esta misma especie con rotíferos (*Brachionus sp.*), obtuvieron mortalidad total a los 28 dpe, sin alcanzar metamorfosis. Mientras que para *L. griseus*, Cabrera *et al.* (1998) obtuvieron supervivencias de 79% al 1 dpe y de 2.5% a los 5 dpe, alimentando con rotíferos, trocóforas de ostras y *Tetraselmis chuii*. Watanabe *et al.* (1998) lograron supervivencias de 14.3% a los 38 dpe alimentando larvas de *Lutjanus analis* con rotíferos Super Small (SS).

La supervivencia de larvas de lenguado (*Psetta maxima*) se incrementó de 14% utilizando rotíferos en la forma tradicional, a 45% utilizando mezcla de

copépodos de la especie *Tisbe holothuriae*, con microalgas y rotíferos (Støttrup y Norsker, 1997), Payne *et al.* (2000) reportaron supervivencias del 37% alimentando larvas de *Glaucosoma hebraicum* con una mezcla del copépodo *Gladioferens imparipes* y el rotífero *Brachionus plicatilis* comparado con el 5% de supervivencia alimentadas solamente con rotíferos. Hernández y Álvarez-Lajonchère, (2003) reportaron en dos experimentos supervivencias de 30% y 50% con la mojarra marina (*Eugerres brasiliensis*) utilizando cinco diferentes especies de microalgas, rotíferos y el copépodo *Oithona oculata*.

Sierra-de la Rosa, (2007) registraron una supervivencia de 1.8 % a los 44 dpe larvas de *L. guttatus* alimentadas con rotíferos, *Artemia* enriquecida, diferente zooplancton y diferentes alimentos formulados. Boza-Abarca *et al.* (2008) obtuvo una supervivencia de 1.5 % en larvas de *L. guttatus* alimentadas con huevos de ostión, zooplancton y rotífero. Abdo de la Parra *et al.* (2010) reportaron un promedio de supervivencias para larvas de *L. guttatus* de 1.90 % a los 45 dpe alimentadas con *Artemia sp.*, rotíferos *Brachionus rotundiformis* y los copépodos *Pseudodiaptomus euryhalinus* y *Tisbe monozota*.

2.2. Crecimiento en peces marinos

Singhagraiwan y Doi (1993) reportaron para *L. argentimaculatus* un crecimiento de $0.47 \text{ mm} \cdot \text{dia}^{-1}$ a los 23 dpe alimentados con una combinación de nauplios de copépodos *Acartia sp.* y *Oithona sp.*, mientras que Emata *et al.* (1994), para la misma especie lograron $0.37 \text{ mm} \cdot \text{dia}^{-1}$ a los 28 dpe. Watanabe *et al.* (1998) reportaron $0.23 \text{ mm} \cdot \text{dia}^{-1}$ a los 21 dpe para larvas de *L. analis* alimentadas con rotíferos SS. Abdo de la Parra *et al.* (2005) reportaron para larvas del botete diana *Sphoeroides annulatus* alimentadas con la mezcla de rotíferos y

copépodos un crecimiento de $0.35 \text{ mm}\cdot\text{día}^{-1}$ a los 21 dpe y para la dieta únicamente de rotíferos obtuvieron $0.24 \text{ mm}\cdot\text{día}^{-1}$.

Sierra-de la Rosa, (2004) reportó un crecimiento en longitud total de 48.6 mm y un peso de 580 mg a los 44 dpe para larvas de *L. guttatus* alimentadas con rotíferos, *Artemia* enriquecida, variedad de zooplancton y alimento formulado.

Boza-Abarca *et al.* (2008) consiguieron una longitud total de 10.23 mm y una tasa de crecimiento en longitud de $0.24 \text{ mm}\cdot\text{día}^{-1}$ a los 25 dpe en larvas de *L. guttatus* alimentadas con huevos de ostión, zooplancton y rotífero.

García-Ortega *et al.* (2005) para larvas de *L. guttatus* obtuvieron una longitud de 4.86 mm a los 15 dpe y 48.8 mm a los 58 dpe alimentadas con rotíferos seguido de *Artemia* y microdieta. En este estudio se mejoró la supervivencia de larvas utilizando el copépodo *Tisbe monozota* hasta el 19 dpe. Así mismo, Abdo de la Parra *et al.* (2010) observaron una longitud total de 42.7 mm, 48.2 mm, 45.9 mm en diferentes densidades de siembra, no presentando diferencia significativa, a los 45 dpe alimentadas con una mezcla de rotíferos *Brachionus rotundiformis*, los copépodos *Pseudodiaptomus euryhalinus* y *Tisbe monozota* y *Artemia sp.* en los tres tratamientos.

2.3. Contenido nutricional

Existen nutrientes que necesariamente deben ser adquiridos con el alimento, ya que los organismos no tienen la capacidad de sintetizarlos. Entre estos se encuentran las vitaminas, algunos aminoácidos y varios ácidos grasos insaturados de cadena larga (Kleppel, 1993; Lazo, 2000) Los ácidos grasos más importantes para estadios larvales de peces marinos son los poliinsaturados de cadena larga, ácidos grasos altamente insaturados

(HUFA's) C20 y C22:n-3 y n-6 predominando en sus tejidos, el ácido eicosapentaenoico (EPA) 20:5n-3, ácido docosahexaenoico (DHA) 22:6n-3 y el ácido araquidónico (ARA) 20:4n-6. (Cowey y Sargent, 1972; Watanabe *et al.*, 1983, 1989; New, 1986; Watanabe, 1993; Izquierdo, 1996; Sargent *et al.*, 1997).

Los factores de crecimiento y supervivencia están influenciados por la cantidad de nutrientes proporcionados a los organismos durante las fases de desarrollo embrionario, larval, juvenil, y adulto. La alimentación en larvicultura de cualquier especie marina o dulce acuícola se encuentra limitada por el desconocimiento de los contenidos de nutrientes como lo son las proteínas, carbohidratos y lípidos, los cuales son los factores determinantes en el éxito de larvicultura. (Fox, 1983; Watanabe *et al.*, 1983; Wolkman, *et al.*, 1989; Brown y Miller, 1992; Reitan *et al.*, 1994; Lavens y Sorgeloos, 1996), El contenido proximal del alimento vivo es muy variado, esto dependiendo del tipo de alimentación suministrada. Rosas *et al.* (1997) determinaron el contenido proximal del rotífero *B. plicatilis* y del copépodo *Oithona ovalis* durante cultivo mixto, alimentados con la microalga *Tetraselmis chuii* obteniendo 1.6 ± 0.2 % y 12.1 ± 0.7 % de lípidos totales y proteína cruda, respectivamente, mientras que para el copépodo obtuvieron 5.7 ± 0.2 % y 13.1 ± 0.7 % de lípidos y proteína cruda respectivamente.

Puello *et al.* (2004) Demostraron que los copéodos harpacticoides (*Tisbe monozota*) (65.73 % de proteína y 7.35 % de lípidos) y calanoide (*Pseudodiaptomus euryhalinus*) (70.57 % de proteína y 10.53 % de lípidos) tienen altos contenidos de proteínas y lípidos totales. Así mismo, la alimentación con copéodos promueven un mejor crecimiento y supervivencia

comparado con las larvas alimentadas con *Artemia* no enriquecida en el botete diana *Sphoeroides annulatus* (Abdo de la Parra *et al.*, 2005) y con el pargo flamenco *L. guttatus* (García-Ortega *et al.* 2005).

Ishizaki *et al.* (1998) reportaron bajas supervivencias y crecimientos para larvas de *Seriola dumerili* alimentando con *Artemia* enriquecida con ácido araquidónico comparado con las enriquecidas con DHA, EPA o ácido oleico. Las larvas de peces marinos requieren EPA y DHA mientras que otras aparentemente requieren más de un solo ácido graso. Watanabe y Kirón, (1994) establecieron el requerimiento de *Paralichthys olivaceus* y *Seriola quinqueradiata* alimentada con alimento vivo en 1 % solo de DHA.

3. Planteamiento del problema

La gran demanda de un alimento vivo que cumpla con todos los requerimientos nutricionales, hace que el copépodo *Pseudodiaptomus euryhalinus* sea un buen candidato para su cultivo a gran escala. Ya que es factible optimizar la tecnología de su cultivo y contar con un abastecimiento adecuado para un cultivo a escala piloto de peces marinos. Esto con el fin de obtener larvas de mejor calidad, con mejor crecimiento y supervivencia y así, ofrecer un alimento libre de patógenos y parásitos, con producciones constantes y de fácil manejo.

3. Hipótesis

El crecimiento y supervivencia de larvas de pargo flamenco *L. guttatus* se incrementarán al ser alimentadas con el copépodo *Pseudodiaptomus euryhalinus*.

4. Objetivo general

Evaluar el efecto del copépodo calanoide *Pseudodiaptomus euryhalinus* empleado como alimento vivo en larvicultura de pargo flamenco *Lutjanus guttatus* desde su primera ingesta hasta el destete a una escala piloto.

5.1. Objetivos particulares

- ❖ Comparar la producción entre dos métodos de cultivo a escala piloto del copépodo *Pseudodiaptomus euryhalinus* (volumen fijo y de relleno).

- ❖ Evaluar la producción de los dos métodos de cultivo a lo largo de 5 meses.

- ❖ Evaluar la tasa de crecimiento específica en larvas de pargo *L. guttatus* hasta el destete, alimentadas con las dieta: T1) *P. euryhalinus* T2) rotíferos + copépodos y T3) rotíferos

- ❖ Evaluar la tasa de supervivencia en larvas de pargo *L. guttatus* hasta el destete, alimentadas con las dietas T1) *P. euryhalinus* T2) rotíferos + copépodos y T3) rotíferos.

- ❖ Comparar el contenido nutricional, incluyendo perfil de ácidos grasos y aminoácidos del alimento vivo y de las larvas alimentadas con las 3 dietas diferentes (T1, T2 y T3).

6. Material y métodos

6.1. Cultivo de microalgas

El cultivo de microalgas se llevó a cabo en el área de producción masiva de las instalaciones de CIAD-Unidad Mazatlán. Se utilizaron las cepas de *Chaetoceros muelleri*, *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis oculata* las cuales se cultivaron primero en matraces de 2 L con el medio F/2 Guillard, para posteriormente pasarlo a garrafones de 20 L dejándolos durante 3 días. Después, se pasaron a una columna con capacidad de 80 L a la cual previamente se añadió 3 g de cada nutriente (metasilicatos y Bayfolan®), dejándolos durante 4 días. Los cultivos se mantuvieron a una salinidad de 35 ‰, y una temperatura de 23 °C. Luego, mediante bombeo se pasaron los 80 L a una columna de 700 L a la cual se le agregó 26.2 g de Bayfolan® y la misma cantidad de metasilicatos como nutrientes. Durante este periodo de cultivo se utilizó agua de mar filtrada por cartuchos de 5 y 10 µm y se irradió con luz UV para eliminar organismos no deseados. Se mantuvo luz constante durante 24 horas y aireación. Posteriormente del volumen de 700 L se pasó la microalga mediante bombeo a los tanques de 1000 L donde se realizó el cultivo de copépodos.

Durante el cultivo piloto del copépodo se utilizaron tres microalgas, ya que se propuso primeramente utilizar *Chaetoceros muelleri* pero debido a las variaciones de temperatura presentadas en los primeros meses del 2010, la microalga no se mantenía durante los 15 días que se establecieron para el cultivo. Estas variaciones impidieron realizar los experimentos con una sola especie de microalgas durante los 5 meses, para ello se propuso utilizar alguna microalga dependiendo de la temperatura que se registrara.

El primer experimento fue el 19 Enero 2010 y se utilizó *Chaetoceros muelleri* registrándose una temperatura ambiente de $21,43 \pm 1,35$ °C, en el segundo experimento fue el 19 Febrero 2010 y se utilizó *Isochrysis galbana* y el tercero fue el 04 Mayo 2010 y se utilizó *Nannochloropsis oculata* con variaciones de temperatura ambiental de $25,39 \pm 0,84$ °C y $29,49 \pm 0,71$ °C respectivamente.

La microalga fue inoculada primeramente en los tanques de cultivo, posteriormente se fertilizó con Bayfolan® de Bayer en una proporción de 3.75 g por cada 100 L de agua y la misma cantidad para metasilicatos para uso con diatomeas. Se dejó durante 24 horas para que la microalga iniciara la fase de crecimiento y posteriormente se incorporaron los copépodos.

6.2. Cultivo del copépodo *Pseudodiaptomus euryhalinus* (1000 L).

Los experimentos del cultivo de copépodos se realizaron al exterior expuesto a variaciones climáticas naturales. Se utilizaron 6 tanques cilindro-cónicos de interior color blanco de fibra de vidrio con una capacidad de 1000 L, se usó agua de mar filtrada con filtros de cartucho de 5 y 10 μm e irradiada por UV. El copépodo *P. euryhalinus* fue obtenido del cultivo de mantenimiento y producción continua, del laboratorio de Nutrición del CIAD Mazatlán.

En el cultivo piloto del copépodo se probaron dos métodos. El primer método fue el de volumen fijo que consistió en iniciar con un volumen de 900 L y mantenerlo así durante los 15 días establecidos de experimentación. El segundo método consistió en iniciar con un volumen de 300 L, cada 5 días se incrementó el volumen con agua de mar con las características antes mencionadas hasta llegar a los 900 L. Ambos métodos fueron realizados por

triplicado y se siguió el mismo procedimiento para inocular la microalga descrito en la sección anterior. La cantidad de copépodos sembrados en los dos métodos fue de $0.1 \text{ copepodos}\cdot\text{ml}^{-1}$. Se colocó una piedra aireadora en el centro de cada tanque y se drenaron (aproximadamente 2 L) cada tres días, abriendo una llave situada en el extremo inferior del cono para eliminar materia orgánica muerta acumulada.

Posteriormente, se tomaron muestras diarias de microalgas determinando la concentración, así como se midieron los parámetros de oxígeno disuelto, temperatura con un multiparámetros YSI 85 y se realizaron las observaciones correspondientes.

6.2.1. Conteo de copépodos

Los copépodos fueron contados al final del experimento. Para determinar la producción se cosecharon los tanques en su totalidad, utilizando para cada tanque un colector de luz de malla de $70 \mu\text{m}$, para retener los nauplios de *P. euryhalinus*. Una vez obtenido las cosechas de cada tanque, se limpiaron los copépodos retirando cuidadosamente el exceso de materia orgánica. Posteriormente, se colocaron en un volumen de 2000 ml, éste se mezcló cuidadosamente y se tomaron alícuotas de 40 ml de cada uno. Después se tomaron 3 submuestras de $200 \mu\text{l}$, se colocaron por separado en caja de petri cuadrículada y se fijaron con solución Davidson's, para facilitar su conteo con ayuda de un microscopio estereoscopio. Este proceso se repitió para cada tratamiento y réplica. Se determinó el porcentaje de organismos de cada estadio y las concentraciones totales obtenidas ($\text{orgs}\cdot\text{ml}^{-1}$).

6.2.2. Cultivo escalonado de 1000 L a 7000 L del copépodo *Pseudodiaptomus euryhalinus*

El método que dio los mejores resultados tanto en producción y eficiencia mencionados anteriormente fue el utilizado para realizar el cultivo escalonado, este cultivo consistió en usar 3 tanques de 1000 L cilindro-cónicos de interior blanco, cada tanque fue sembrado con un intervalo de 3 días de diferencia y realizando la cosechas con el mismo intervalo. La microalga y los copéodos se sembraron realizando la misma metodología mencionada anteriormente. Durante este cultivo solamente se uso la microalga *Nannochloropsis oculata* y tuvo una duración de 15 días para cada tanque. Los copéodos obtenidos de las cosechas cada tanque fueron tamizados y limpiados, posteriormente se sembraron en tanques de 7 000 L.

6.2.3. Cultivo de 7000 L del copépodo *Pseudodiaptomus euryhalinus*.

La última escala de cultivo fue a un volumen de 7 000 L, para este cultivo se utilizaron 2 tanques circulares de paredes y fondo blanco. Este último volumen se mantuvo a la par con el cultivo escalonado mencionado en la sección anterior.

Esta escala se realizó con las cosechas del cultivo escalonado, iniciando a un volumen de 2000 L con agua de mar filtrada y se inoculó la microalga *Nannochloropsis oculata*, con el mismo método de fertilización descrito anteriormente y se dejó madurar 24 horas y luego se sembraron los copéodos conforme se realizaron las cosechas del cultivo escalonado. Para incrementar el volumen de cultivo, se agregó agua de mar filtrada o microalgas y de ser

necesario se fertilizado nuevamente ajustando la cantidad de nutriente al volumen determinado. Una vez alcanzado 6 000 L se mantuvo el cultivo durante 2 meses evitando contaminación de organismos no deseados, estimando el tiempo para el inicio de la larvicultura de pargo flamenco *L. guttatus* a escala piloto. Para proporcionar las cantidades de copépodos a las larvas se realizaron cosechas parciales, por lo que nos dio pauta para volver a incrementar los volúmenes en estos tanques.

6.2.4. Proceso de depuración de los copépodos antes de darlos como alimentos

Previamente a ser empleados como alimento para las larvas, los copépodos cosechados fueron depurados siguiendo la recomendación de (Puello *et al.*, 2002, 2006). La cual consiste en dejar a los organismos un periodo de 2 horas, en un tanque de 300 L con agua de mar filtrada y se alimentaron con microalga limpia del cepario. Posteriormente, una vez depurados los organismos se contaron para ajustar y proporcionar las concentraciones en el sistema de cultivo de pargo flamenco.

6.2.5. Producción de *B. rotundiformis* y *Artemia*

El proceso para obtener tanto *B. rotundiformis* como *Artemia sp.* es el establecido por los protocolos de CIAD-Mazatlán.

6.3. Cultivo larval de pargo flamenco *L. guttatus*.

Los bioensayos se llevaron a cabo al exterior en el área de investigación en nutrición acuícola del CIAD Mazatlán, en un sistema de flujo continuo de agua de mar que constó de 12 tanques cilíndricos de fibra de vidrio de 3 000 L de capacidad con fondo blanco y paredes internas oscuras. El área de tanques está cubierta con malla sombra de 30 % de paso de intensidad de luz. Cada uno de los tanques permaneció destapado durante el día (8:00 a.m. a las 17:00 p.m.) y durante la noche se cubrieron con una tapa realizada con la misma malla para evitar posible depredación por aves. Días previos a la siembra de los huevos se llevó a cabo la limpieza y desinfección de los tanques, empleando hipoclorito de sodio, agua dulce y se eliminó cualquier incrustación no deseada tallando con fibras. Una vez concluido este proceso se dejó reposar durante 24 horas para eliminar posibles residuos. Tres horas antes de ser sembrados los huevos fecundados se llenaron a 1000 L con agua de mar previamente filtrada mediante filtros de cartuchos de 10 y 5 μm respectivamente y esterilizada por luz UV. Se colocaron dos mangueras de 2 mm de diámetro con una piedra aireadora en el extremo para cada tanque. El burbujeo se mantuvo suave para reducir golpes entre los huevos y las mangueras se limpiaron diariamente para eliminar suciedad. Se colocaron mallas de nylon desechables de 150 μm para retener el alimento vivo al centro del tanque en los tubos de desagüe, las mallas se cambiaron cada 10 días. El flujo de agua permaneció cerrado hasta el 15^o dpe. Después de este periodo se abrió flujo con 30 % de recambio por día y en las noches se mantuvo cerrado, hasta el día 30 dpe.

Se midieron los parámetros diariamente con un oxímetro de campo YSI 85 obteniendo para oxígeno $4,19 \pm 1,43 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, salinidad $30,85 \pm 1,32 \text{ ‰}$ y temperatura $27,33 \pm 1,49 \text{ °C}$.

6.3.1. Colecta y siembra de huevos de pargo flamenco *L. guttatus*.

Los huevos del pargo fueron obtenidos de desoves naturales de los reproductores F1 del laboratorio de reproducción de CIAD, Unidad Mazatlán. Posteriormente se lavaron y se limpiaron, luego fueron colocados en una probeta donde se determinó el volumen de huevos viables, % de fertilización, huevos sembrados (ml), huevos por tanque y densidad de siembra (Tabla 1), la siembra fue realizada con una pipeta automática, sembrando la misma cantidad de huevos para los 12 tanques.

Tabla. 1.- Parámetros de siembra determinadas para el cultivo larval de pargo flamenco *L. guttatus* al inicio del experimento.

VARIABLES	CANTIDADES
Huevos viables ($\text{Huevos}\cdot\text{ml}^{-1}$)	3063,0
Fertilización (%)	100,0
huevos sembrados (ml)	21,5
Huevos \cdot Tanque ⁻¹	65 854,5
Densidad ($\text{Huevos}\cdot\text{L}^{-1}$)	65,9

6.3.2. Protocolo de alimentación larval del pargo flamenco *L. guttatus*.

Durante los primeros 15 días de experimentación se mantuvo el cultivo mediante la técnica de agua verde. Los huevos fueron sembrados el día 0 en agua clara la cual consistió solamente en agua de mar previamente filtrada por 5 y 10 μm y esterilizada por UV.

A las 24 horas (1 dpe) se determinó el porcentaje de eclosión, quitando la aireación y tomando 3 muestras al azar en los 12 tanques con un vaso de precipitado de 1 L y se contaron el total de organismos, identificando los organismos vivos con una tonalidad transparente y los muertos con una tonalidad blanquecina.

A las 48 horas (2 dpe) se cerró de nuevo la aireación y se determinó la supervivencia de 48 horas, al igual se tomaron 3 muestras con un vaso de precipitado de 1 L y se contaron el total de organismos vivos presentes.

En el cultivo larval se utilizó la técnica de agua verde que consistió en colocar microalga *Nannochloropsis oculata* a 500 000 cel·ml⁻¹ e *Isochrysis galbana* a 50 000 cel·ml⁻¹. El agua verde se mantuvo en todos los tratamientos, dando inició el día 1 dpe hasta los 15 dpe, durante este periodo se probaron los tratamientos (figura 1). Tomando como referencia los protocolos originales de Abdo de la Parra *et al.* (2010) y García-Ortega *et al.* (2005).

Dicha modificación fue la transición de los alimentos probados en los tratamientos a *Artemia*, proporcionando 5 g de quistes de *Artemia* descapsulada al día 14 pe hasta el día 18 pe. Los 5 g se proporcionaron en dos raciones una por la mañana (9:00 a.m.) y otra por la tarde (15:00 p.m.). Durante la transición se inició la alimentación de nauplios de *Artemia* (1 *Artemia*·ml⁻¹) a

los 16 dpe, este mismo día se abrió el flujo hasta el día 30 pe. Los nauplios de *Artemia* fueron proporcionados en dos raciones por día,

A los 20 dpe, se comenzó con un destete temprano proporcionando el alimento balanceado de marca INVE tamaño de partícula $\frac{3}{4}$, hasta el día programado para el fin del experimento (30 dpe).

Los tratamientos probados durante este estudio fueron el tratamiento uno (T1) inoculando a una concentración de $1 \text{ cops}\cdot\text{ml}^{-1}$ proporcionando adultos, copepoditos y nauplios. En el tratamiento dos (T2) (Referencia CIAD) consistió en sembrar $5 \text{ rotíferos ml}^{-1} + 0.5 \text{ cops}\cdot\text{ml}^{-1}$. Por último, el tratamiento tres (T3) fue inocularon a una concentración de $10 \text{ rotíferos}\cdot\text{ml}^{-1}$, fueron cuatro replicas para los tres tratamientos.

Para el 15 dpe, al abrir el flujo, tanto rotíferos como nauplios de copépodos pasaron por los filtros de desagüe, eliminándolos como fuente de alimento. A lo largo del experimento se tomaron muestras de 2 L, y de éstas, alícuotas de 40 ml para monitorear diariamente el alimento vivo (microalgas, copépodos y rotíferos) contando bajo un microscopio estereoscópico el número de células y organismo $\cdot\text{ml}^{-1}$ y manteniendo el número deseado de alimento vivo. Los conteos se realizaron desde el día 1 pe hasta el día 30 pe.

Los muestreos de las larvas se realizaron cada 3 días. Se tomaron 10 larvas al azar de cada tratamiento y réplica. Posteriormente, se midió la longitud total (LT) mediante un microscopio con micrómetro integrado de $\pm 0.01 \text{ mm}$ de margen de error, a partir de que las larvas midieron cerca de 10 mm se utilizó un vernier digital. En la determinación del peso, desde el primer muestreo se les extrajo el excedente de agua a cada larva, y posteriormente se colocaron

en charolas de aluminio pre-pesadas, para pesarlas en una microbalanza Mettler MT5 (Mettler instrument corp., P.O. Hightstown, N.J. 08520, Switzerland).

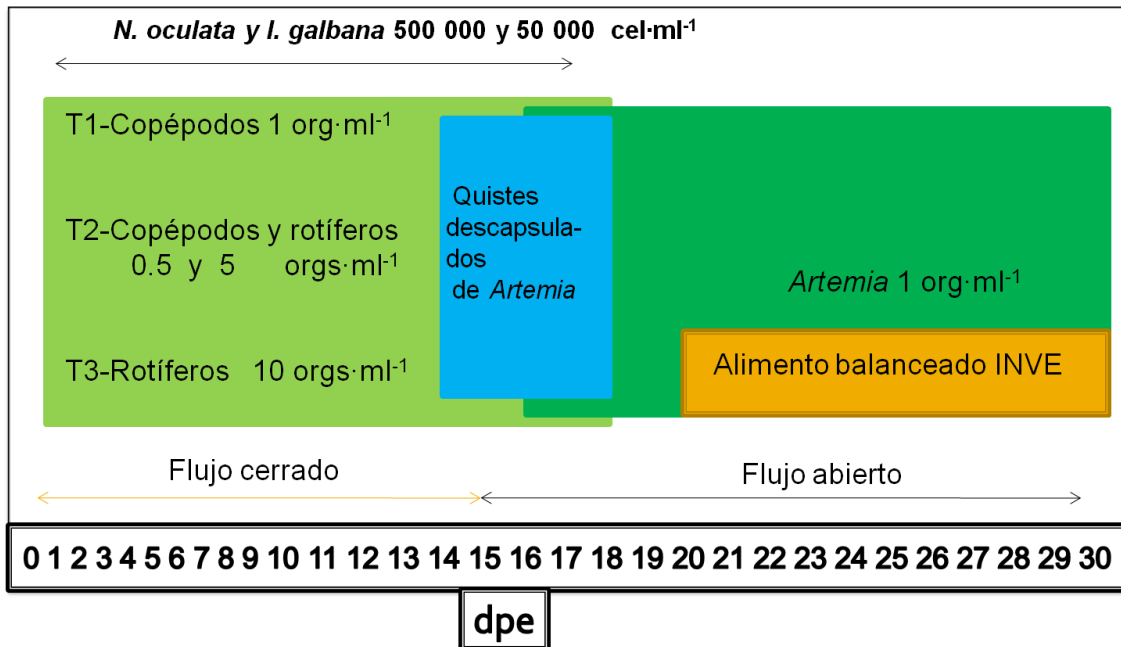


Figura 1.- Protocolo de alimentación de larvicultura de pargo flamenco *L. guttatus*, probado en tres diferentes tratamientos.

6.4. Análisis proximales

Al final del experimento (30 dpe) se tomaron muestras de larvas de pargo (T1, T2, T3), copépodos, rotíferos y *Artemia* para determinar su contenido nutricional. Se determinó humedad, secando las muestras en un horno para calcular por diferencia de pesos entre el material seco y material húmedo. El contenido de cenizas se realizó mediante calcinación de las muestras en una mufla y el cálculo se determinó por diferencia de pesos, ambos métodos basados en las técnicas de AOAC (1984). El contenido proteico se determinó mediante el método de combustión de Dumas (Ebling, 1986) utilizando un equipo Leco FP-528 (Método No. 990.03, AOAC 1984). El contenido de lípidos se realizó de acuerdo con el método 920.39 (AOAC, 1984) utilizando un equipo de extracción Micro Soxhlet, mediante la extracción de las grasas de las muestras con éter de petróleo.

6.5 Análisis de aminoácidos

Se realizó mediante la técnica de detección y cuantificación de aminoácidos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), se utilizó 3 gr de cada muestra a la cual se le extrajo el total de humedad y grasa mediante el método establecido por la AOAC. (Método 920.39. 1998). Estos análisis fueron realizados en CIAD-Culiacán bajo la supervisión de la Dra. Dolores Muy.

6.6. Análisis de ácidos grasos

La técnica que se utilizó para detección y cuantificación de ácidos grasos mediante cromatografía de gases, la extracción de grasa se realizó por el

método de Folch, la metilación por la AOAC, 969.33. Estos análisis fueron realizados en CIAD-Culiacán bajo la supervisión de la Dra. Dolores Muy.

6.7. Determinación de tasa de crecimiento absoluto

$$TCA = \frac{\text{Peso o Longitud total Final} - \text{Peso o Longitud total Inicial}}{\text{Tiempo final} - \text{Tiempo inicial}}$$

Tasa de crecimiento específica

$$TCE = 100 \times \frac{\ln(\text{Peso Final}) - \ln(\text{Peso Inicial})}{\text{Tiempo (días)}}$$

6.8. Análisis estadísticos

Se utilizó el paquete estadístico Sigma Stat 3.0, y se realizó un ANDEVA de una vía. Determinando la prueba de normalidad de Lilieford y de homocedasticidad de Bartlett.

En la producción de copépodos, se utilizó la prueba t-Student y la prueba de U- de Man Whitney, con un nivel de significancia de $p < 0.05$.

En el cultivo larval de pargo, se utilizó la estadística descriptiva para determinar la normalidad de Lilieford y homocedasticidad de Bartlett en el caso de cumplir con los supuesto, se procedió a realizar el ANDEVA paramétrico de una vía. Al no cumplirse los supuesto se usó el ANDEVA no paramétrico de Kruskal-Wallis y la prueba de comparaciones múltiples de Student-Newman-Keuls con un nivel de significancia de $p > 0.05$.

7. Resultados

7.1. Cultivo piloto del copépodo *Pseudodiaptomus euryhalinus*.

7.1.1. Experimento 1

Los resultados se evaluaron respecto a la concentración de organismos por mililitro. El primer experimento, que se realizó en enero del 2010 duró 3 semanas y se produjeron con el método de volumen fijo 9 407 copépodos·L⁻¹ y comparado con el método por relleno 8 901 copépodos·L⁻¹, no presentaron diferencias significativas $p < 0.05$ (Figura 2). El porcentaje por estadios para el método de volumen fijo tuvo una porcentaje de producción de $42.4 \pm 3.0 \%$, $21.3 \pm 3.7 \%$ y $36.3 \pm 6.7 \%$, nauplios, copepoditos y adulto respectivamente (Figura 3) y para el método de relleno fue de $45.8 \pm 4.4 \%$, $27.1 \pm 2.2 \%$ y $27.0 \pm 2.3 \%$ de nauplios, copepoditos y adultos respectivamente (Figura 3)

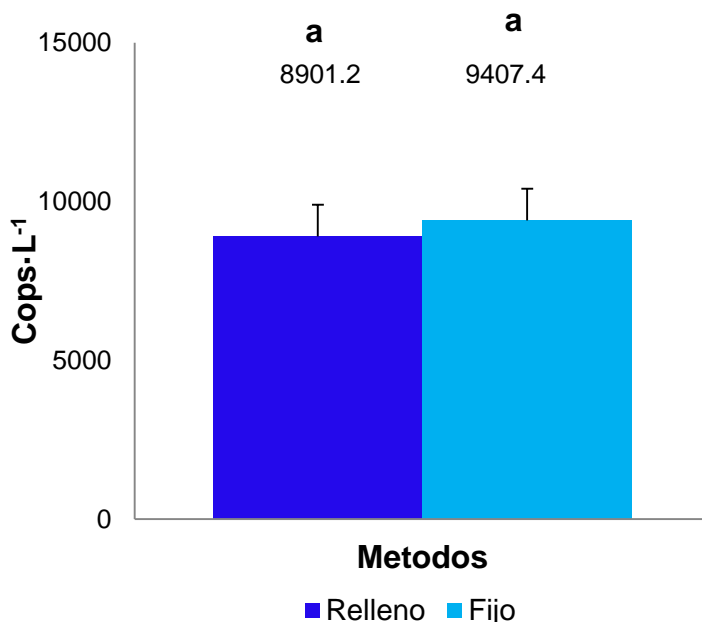


Figura 2.- Producción de *P. euryhalinus* (copépodos·L⁻¹) al final del experimento, mediante dos métodos de cultivo (de relleno y de volumen fijo) con temperatura media de 21.4 °C

Los parámetros promedios registrados durante el primer experimento fueron de oxígeno disuelto $7.8 \pm 1.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, y la temperatura de $21.4 \pm 1.4 \text{ }^\circ\text{C}$ y teniendo como alimentación dieta mono específica de *Chaetoceros muelleri*.

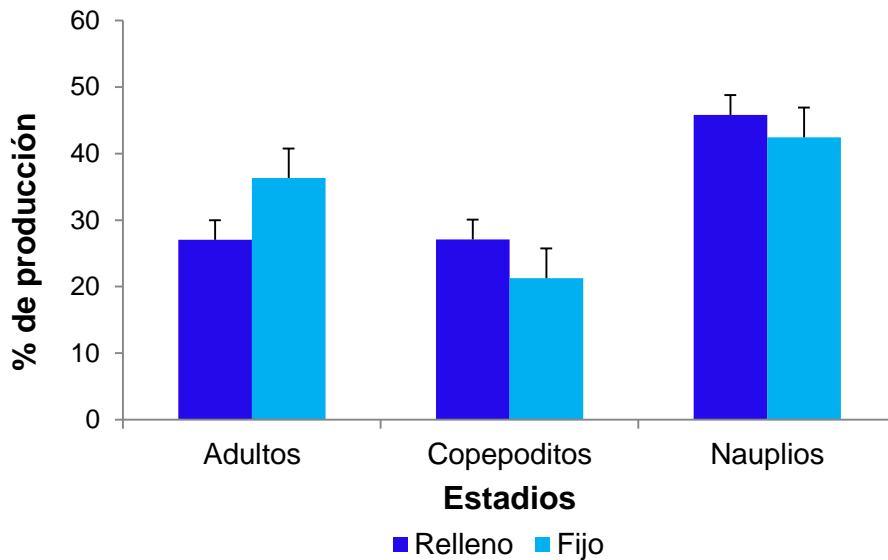


Figura 3.- Porcentajes por estadios de *P. euryhalinus* al final del experimento, mediante dos métodos de cultivo (relleno y de volumen fijo) a temperatura de $21.4 \text{ }^\circ\text{C}$

En este experimento se inició con una concentración de microalga para el método de volumen fijo de $192,083 \text{ cel}\cdot\text{ml}^{-1}$ y aumentó hasta una concentración máxima de $1'248,750 \text{ cel}\cdot\text{ml}^{-1}$. Para el día 7 de experimentación, después la microalga entró en fase de desaceleración hasta el día 15 finalizando con una concentración de $804,167 \text{ cel}\cdot\text{ml}^{-1}$, para el método de relleno inicio con una concentración de $467,083 \text{ cel}\cdot\text{ml}^{-1}$ y aumentó hasta el día 5 con una concentración de $1'625,833 \text{ cel}\cdot\text{ml}^{-1}$. En este día se le adiciono agua para incrementar el volumen a 600 L por consiguiente, la concentración de microalga se redujo a $677,917 \text{ cel}\cdot\text{ml}^{-1}$, para el día 10 de experimentación

incremento nuevamente la concentración pero ya en menor número a 770 833 cel·ml⁻¹ y ese mismo día se realizó el último incremento de volumen con agua a 900 L, dejándolo hasta el día 15 cuando finalizó con una concentración de 211,250 cel·ml⁻¹.

7.1.2. Experimento 2

Durante el experimento dos, las producciones obtenidas fueron diferentes con el primer experimento, se registró una producción para el método de volumen fijo de 7 518 copépodos·L⁻¹. Mientras, que para el método de relleno se obtuvo 1,346 copépodos·L⁻¹ observándose diferencias significativas $p < 0.05$. (Figura 4).

Durante este experimento las temperaturas fueron ligeramente más altas, $25,39 \pm 0,84$ °C, con una concentración de oxígeno disuelto de $8,57 \pm 2,52$ mg·l⁻¹. Se alimentó con *Chaetoceros muelleri*, sin embargo, debido a las variaciones en temperatura la microalga no duraba más de 4 días presentando la fase de muerte o colapso de cultivo, por consiguiente, se decidió cambiar a *Isochrysis galbana*, con lo cual se logró llegar a los tiempos esperados de duración del experimento.

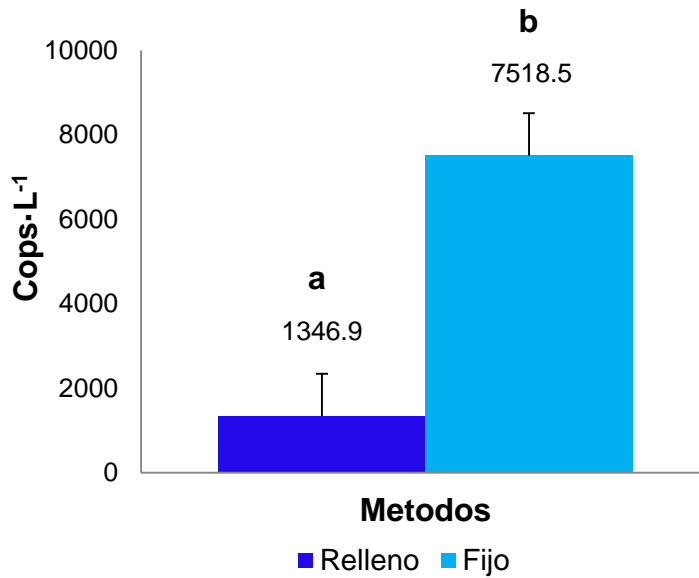


Figura 4.- Producción de *P. euryhalinus* (copéodos·L⁻¹) al final del experimento, mediante dos métodos de cultivo (de relleno y de volumen fijo) a temperatura de 25.4 °C

El porcentaje obtenido para método de volumen fijo se obtuvo un porcentaje de 51.2 ± 23.7 , 21.8 ± 7.7 y $26.9 \pm 16.0\%$ nauplios, copepoditos y adultos, respectivamente (Figura 5). para el método volumen de relleno fue de 64.6 ± 7.1 , 13.3 ± 1.4 y $22.0 \pm 8.1 \%$ nauplios, copepoditos y adultos, respectivamente. Durante los dos primeros experimentos se notó claramente que la producción de nauplios fue mayor que la producción de copepoditos y adultos en ambos métodos de cultivo (Figura 5).

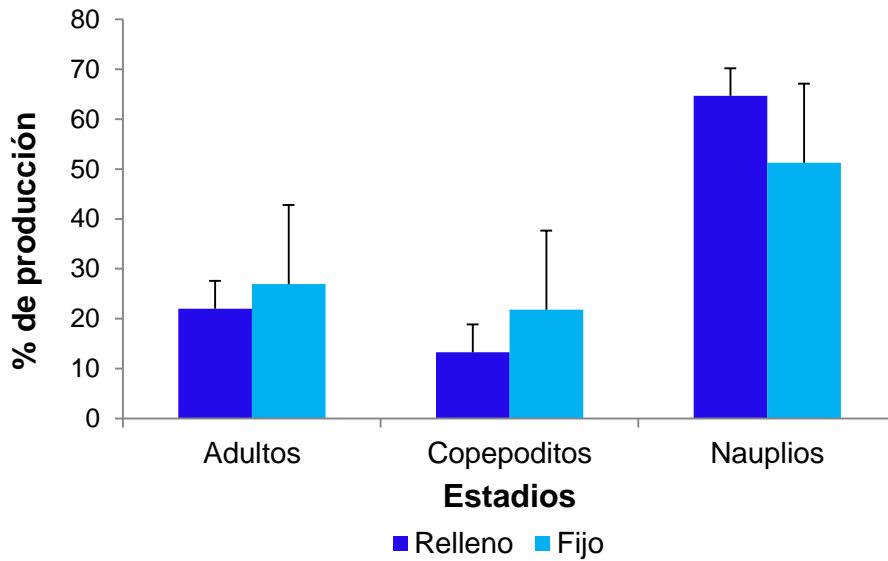


Figura 5.- Porcentajes de estadios de *P. euryhalinus* al final del experimento, mediante dos métodos de cultivo (relleno y de volumen fijo) a temperatura de 25.4 °C

Al inicio del experimento dos se registró una concentración inicial de microalga para el método de volumen fijo de $334,861 \text{ cel}\cdot\text{ml}^{-1}$ y aumentó hasta una concentración máxima de $837,917 \text{ cel}\cdot\text{ml}^{-1}$. Para el día 6 de experimentación después la microalga entro en fase de desaceleración hasta el día 15 finalizando con una concentración de $511,667 \text{ cel}\cdot\text{ml}^{-1}$ y para el método de relleno inicio con una concentración de $1'010,417 \text{ cel}\cdot\text{ml}^{-1}$ e incremento su concentración el día 5, a $1'415,417 \text{ cel}\cdot\text{ml}^{-1}$. Posteriormente, de saber la concentración, se le adicionó agua para incrementar el volumen a 600 L por consiguiente, la concentración de microalga se redujo a $621,250 \text{ cel}\cdot\text{ml}^{-1}$. Al día 10 de experimentación tuvo la misma tendencia que el experimento anterior, la concentración incremento de nuevo a $871,667 \text{ cel}\cdot\text{ml}^{-1}$, ese mismo día se adiciono agua para incrementar el volumen a 900 L, dejándolo hasta el día 15. Este experimento finalizó con una concentración de $345\ 000 \text{ cel}\cdot\text{ml}^{-1}$ durante

todo el experimento solamente se le incorporo agua dejando el ciclo natural de la microalga.

7.1.3. Experimento 3

Debido a la temperatura registrada en los meses de marzo y abril de 2010, la microalga *I. galbana* no logro desarrollarse, por lo que, antes del día 15 de experimentación se moría. Debido a esto, se tomó la decisión de utilizar la microalga *N. oculata* la cual es utilizada en los meses de verano, este experimento se realizó a inicios de mayo del 2010, registrándose una temperatura promedio en el agua de 29.5 ± 0.7 °C, para oxígeno disuelto fue de 6.9 ± 1.0 mg·L⁻¹. De la concentraciones obtenidas de organismos no se detectaron diferencias significativas $p < 0.05$, registrándose una concentración media de (6 217 copépodos·L⁻¹) para el método de volumen fijo y (6 069 copépodos·L⁻¹) para el método de relleno (Figura 6).

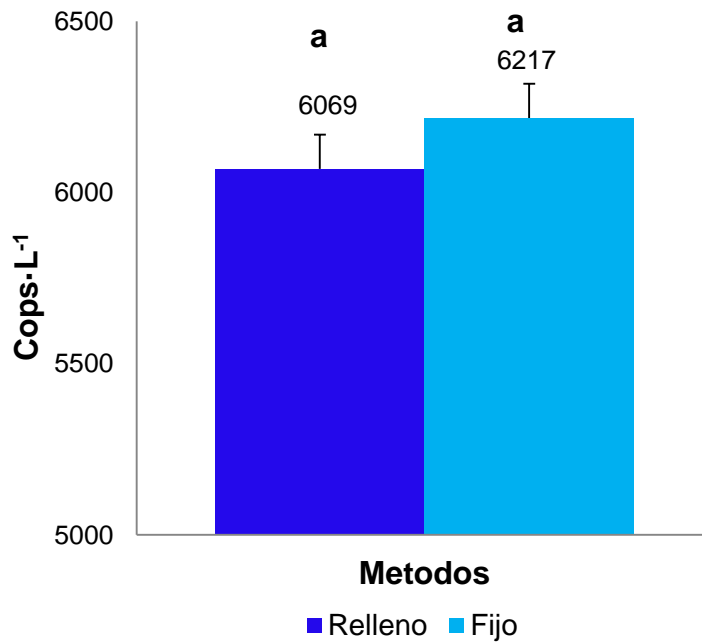


Figura 6.- Producción de *P. euryhalinus* (copéodos·L⁻¹) al final del experimento, mediante dos métodos de cultivo (relleno y de volumen fijo) a temperatura de 29.5 °C

El porcentaje obtenido para el método de volumen fijo fue de 35.5 ± 22.8 % de nauplios, y para copepoditos fue de 24.2 ± 4.4 % y 40.3 ± 20.6 % para adultos (Figura 7). Mientras que para nauplios en el método de relleno fue de 12.0 ± 4.0 y 25.6 ± 9.3 % de copepoditos y de adultos de 62.4 ± 13.1 % (Figura 7).

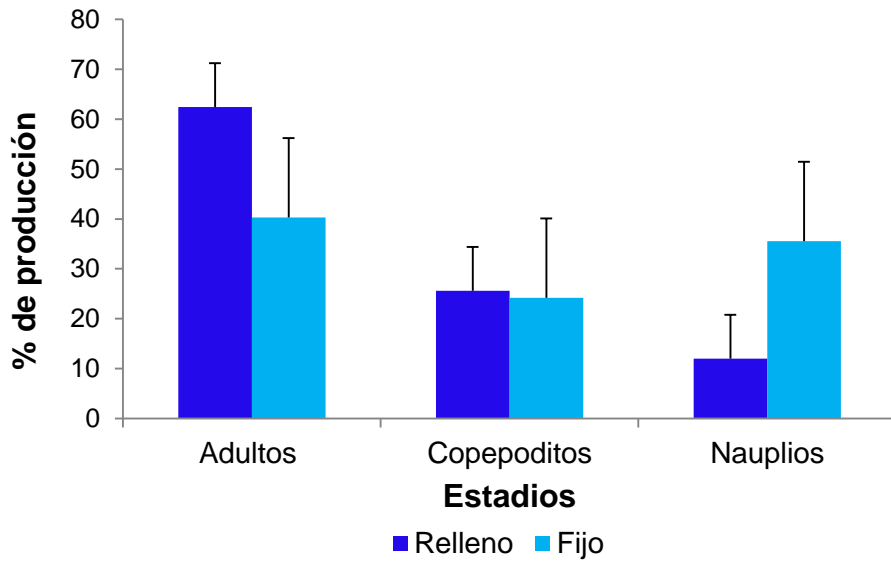


Figura 7.- Porcentajes por estadios de *P. euryhalinus* al final del experimento, mediante dos métodos de cultivo (relleno y de volumen fijo) a temperatura de 29.5 °C

En el método de volumen fijo, la microalga fue agregada en una concentración promedio de $190,000 \text{ cel}\cdot\text{ml}^{-1}$ al inicio del experimento, continuo incrementando la concentración hasta $657,083 \text{ cel}\cdot\text{ml}^{-1}$ en el día 4. Después del día 4 inicio a disminuir la concentración hasta el final del experimento el día 15 con una concentración final de $87,425 \text{ cel}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Para el método de relleno, inicio con una concentración de $273,333 \text{ cel}\cdot\text{ml}^{-1}$, para el día 5 se tuvo una concentración de $1'130,833 \text{ cel}\cdot\text{ml}^{-1}$, posteriormente se le adicionó agua como en los otros experimentos para incrementar su volumen a 600 L. Al adherir el agua disminuyó la concentración a $626,735 \text{ cel}\cdot\text{ml}^{-1}$ posteriormente incrementó la concentración al día 10 a $818,750 \text{ cel}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Luego de haber incrementado el día 10 a 900 L la concentración de microalga fue disminuyendo hasta el término del experimento el día 15, a una

concentración de 356,667 cel·ml⁻¹. El porcentaje de producción en este experimento en los dos métodos de cultivo, tuvo una tendencia diferente a los experimentos anteriores, teniendo una producción mayor de adultos comparado con la producción de copepoditos y nauplios.

Las concentraciones de oxígeno se mantuvieron dentro de lo normal para cultivo del copépodo, manteniendo buen nivel de oxigenación, durante los tres experimentos, la única variable que mostró diferencias a lo largo de los meses de experimentación fue la temperatura variando desde 21.43 °C hasta 29.49 °C de enero a mayo (Tabla 2).

Tabla 2.- Temperatura (T°C) y oxígeno disuelto (OD) durante los tres diferentes experimentos realizados para la producción del cultivo piloto del copépodo calanoide *P. euryhalinus*. Letras distintas presentan diferencias estadísticamente significativas.

	19/01/2010	19/02/2010	04/05/2010
Fechas de experimentación			
Variables	Exp 1	Exp 2	Exp 3
OD	7,78 ± 1,14	8,57 ± 2,52	6,93 ± 0,98
T°C	21,43 ± 1,35	25,39 ± 0,84	29,49 ± 0,71

7.2. Resultados de cultivo larval de pargo flamenco *Lutjanus guttatus*.

El porcentaje de fertilización de los huevos de *L. guttatus* fue de 100 %, a las 24 h después de la fertilización se determinó la tasa de eclosión en los diferentes tratamientos, obteniendo para el tratamiento de copépodos 28.1 %, para el tratamiento de copépodos+rotíferos fue de 36.8 % y para el tratamiento de rotíferos únicamente fue de 55.7 % (Tabla 3). Posteriormente a las 48 h a los 2 dpe se determinó el porcentaje de supervivencia (Tabla 3). La tendencia que mostró fueron los valores más altos para el tratamiento de rotíferos.

Tabla 3.- Porcentaje de eclosión (1 dpe) y supervivencia (2 dpe) a las 24 y 48 horas respectivamente, posteriores a la siembra de huevos. En los tres diferentes tratamientos. Letras distintas presentan diferencias estadísticamente significativas.

Tratamientos	% de eclosión 24 h	% de supervivencia 48 h
Copépodos	28.1 ± 16.9 ^a	58.5 ± 5.3 ^a
Copépodos+rotíferos	36.8 ± 6.1 ^b	60.2 ± 7.3 ^a
Rotíferos	55.7 ± 7.5 ^c	66.8 ± 17.2 ^a

7.2.1. Tasa de crecimiento en Longitud Total

Los resultados demostraron un mayor crecimiento para las larvas de pargo alimentadas únicamente con el copépodos *P. euryhalinus*. A partir del segundo muestreo (6 dpe) se registró diferencias significativas $p < 0.05$ para este tratamiento respecto a los otros dos tratamientos, presentando una longitud total promedio de 2.9 ± 0.2 mm en comparación con el tratamiento de mezcla copépodos+rotíferos de 2.4 ± 0.0 mm y el control (rotíferos) de 2.2 ± 0.3 mm.

Al 12 dpe se siguieron mostraron diferencias significativas $P < 0.05$ en todos los tratamientos, teniendo una promedio de longitud total para el tratamiento de copépodos de 6.6 ± 0.2 mm, para el tratamiento de copépodos+rotíferos de 3.4 ± 0.2 mm y para el tratamiento de rotíferos únicamente de 3.1 ± 0.1 mm. (Figura 8). A lo largo de todo el experimento se mostró una tendencia de crecimiento mayor para el tratamiento de copépodos hasta el 30 dpe (final del experimento) mostrando diferencias significativas $p < 0.05$, obteniendo una longitud total promedio de 26.5 ± 0.7 mm para el tratamiento de copépodos, 18.7 ± 1.3 mm para copépodos+rotíferos y 9.8 ± 1.3 mm para rotíferos

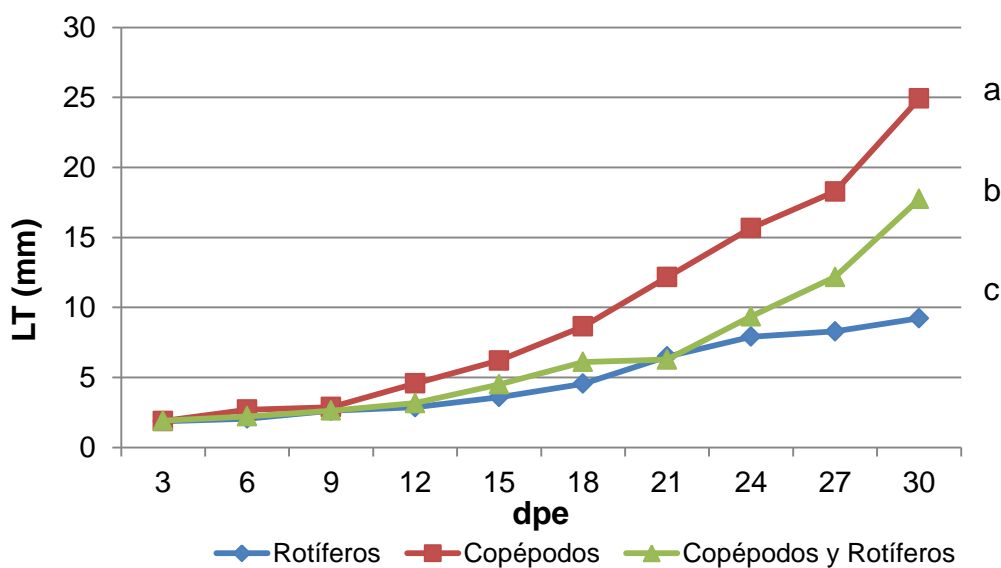


Figura 8.- Longitud total (mm) de larvas de pargo flamenco *L. guttatus* alimentadas con tres dietas: copépodos, copépodos+rotíferos y rotíferos únicamente, cultivados durante 30 días. Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas.

Las tasas de crecimiento de la longitud total de las larvas en los diferentes tratamientos tuvieron diferencia significativa ($p < 0.05$), en todas las variables medidas. La tasa de crecimiento absoluta (TCA) en el tratamiento de copépodo

fue de 23.42 ± 0.68 mm, valor 3 veces más grande que en el tratamiento de rotíferos con 6.72 ± 1.31 mm. Al igual que la TCA, la tasa de crecimiento específica (TCE) en los copépodos registró 3.72 ± 0.11 %·día⁻¹, para este tratamiento se presentaron los valores más altos comparados con los demás (copépodos+rotíferos y rotíferos) (Tabla 4).

Tabla 4.- Tasa de crecimiento absoluto (TCA), tasa de crecimiento específico (TCE), en longitud total (mm) durante 30 días de cultivo de larvas de pargo flamenco *L. guttatus*.

Las distintas letras dentro de una misma fila indican diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos ($p < 0.05$).

Tratamientos	Copépodos	Copépodos y Rotíferos	Rotíferos
TCA (mm)	$23,42 \pm 0,68^a$	$15,59 \pm 1,34^b$	$6,72 \pm 1,31^c$
TCE (%·día ⁻¹)	$3,72 \pm 0,11^a$	$3,21 \pm 0,08^b$	$2,29 \pm 0,22^c$

A partir del 6 dpe se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en el peso húmedo (Figura 9), en el tratamiento de copépodos (0.1 ± 0.0 mg larva⁻¹) con respecto a los tratamientos de copépodos+rotíferos con 0.03 ± 0.1 mg·larva⁻¹ y rotíferos con 0.03 ± 0.1 mg·larva⁻¹, hasta el 27 dpe se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre todos los tratamientos, con un peso húmedo para el tratamiento de copépodos de 71.4 ± 10.9 mg·larva⁻¹, para copépodos+rotíferos de 26.4 ± 11.9 mg· larva⁻¹ y para el tratamiento de rotíferos de 7.5 ± 1.5 mg· larva⁻¹.

Al final del experimento (30 dpe) se obtuvo un peso húmedo total de 332.1 ± 31.8 mg· larva⁻¹ para el tratamiento de copépodos, considerablemente más elevado respecto a los tratamientos de copépodos+rotíferos y rotíferos con un peso húmedo de 96.2 ± 23.1 mg· larva⁻¹ y 10.5 ± 4.6 mg· larva⁻¹

respectivamente (Figura 9). Debido a que se registró un crecimiento exponencial drástico en el peso de las larvas.

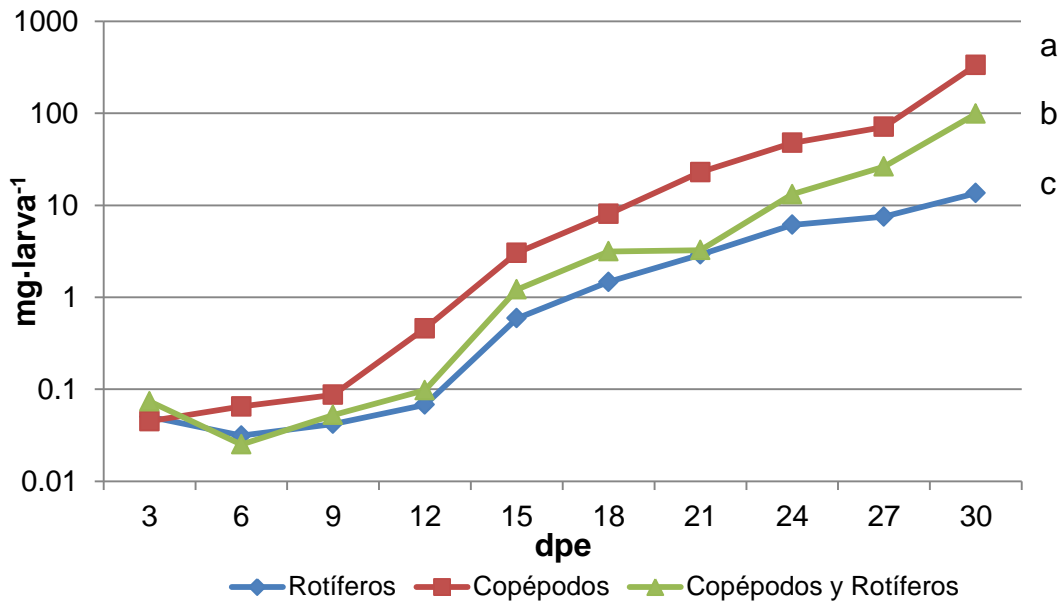


Figura 9.- Peso húmedo (mg-larva⁻¹) durante los 30 dpe de larvas de pargo flamenco *L. guttatus* alimentadas con tres dietas: copépodos, copépodos+rotíferos y rotíferos únicamente. Letras distintas representan diferencias significativas ($p < 0.05$).

Las tasas de crecimiento del peso húmedo (Tabla 5) al igual que en las tasas de crecimiento en longitud total, se obtuvieron diferencia significativa ($p < 0.05$) entre todos los tratamientos, en todas las variables medidas para la tasa de crecimiento absoluta (TCA) en el tratamiento de copépodo se obtuvieron $332.08 \pm 31.79 \text{ mg}\cdot\text{larva}^{-1}$, superando por mucho el valor obtenido con el tratamiento de rotíferos de $10.54 \pm 4.63 \text{ mg}\cdot\text{larva}^{-1}$. La tasa de crecimiento específica (TCE) para el tratamiento de copépodos fue de $12.98 \pm 0.63 \text{ \%}\cdot\text{día}^{-1}$, mientras que los valores para el tratamiento de copépodos+rotíferos y rotíferos fueron de $10.4 \pm 0.5 \text{ \%}\cdot\text{día}^{-1}$ y $8.3 \pm 1.0 \text{ \%}\cdot\text{día}^{-1}$.

Tabla 5.-Tasa de crecimiento absoluto (TCA), tasa de crecimiento específico (TCE), en peso húmedo ($\text{mg}\cdot\text{larva}^{-1}$) durante 30 días de cultivo de larvas de pargo flamenco *L. guttatus*.

Las distintas letras dentro de una misma fila indican diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos ($p < 0.05$).

Tratamientos	Copépodos	Copépodos y Rotíferos	Rotíferos
TCA (mg)	$332,08 \pm 31,79^a$	$96,18 \pm 23,06^b$	$10,54 \pm 4,63^c$
TCE ($\text{\%}\cdot\text{día}^{-1}$)	$12,98 \pm 0,63^a$	$10,44 \pm 0,52^b$	$8,27 \pm 1,05^c$

7.2.2. Supervivencia

La supervivencia obtenida durante los 30 dpe de larvicultura de pargo flamenco se vio reflejada notoriamente en el tipo de alimento vivo consumido a lo largo de todo este periodo. Se registraron diferencias significativas ($p < 0.05$), teniendo una supervivencia para el tratamiento de copépodos de $0.66 \pm 0.13 \text{ \%}$, para el tratamiento de copépodos+rotíferos de $1.08 \pm 0.31 \text{ \%}$ y $2.56 \pm 0.79 \text{ \%}$ para el tratamiento de rotíferos

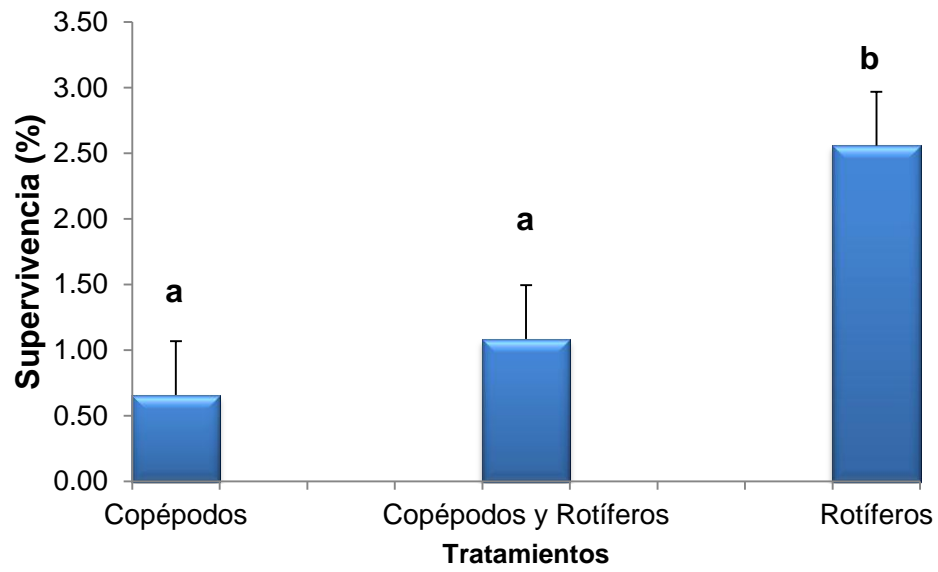


Figura 10.- Porcentaje de supervivencia a los 30 dpe, del cultivo larval de pargo flamenco *L. guttatus* alimentadas con tres dietas. Letras distintas indican diferencia significativa.

7.3. Composición proximal, aminoácidos y ácidos grasos.

7.3.1. Alimento vivo

La composición nutricional de los organismos suministrados como alimento de larvas al final del experimento presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$). El copépodo *Pseudodiaptomus euryhalinus* presentó un porcentaje de proteína del 73.7 %, el rotífero de 63.34 % y *Artemia* de 55.74 % (Tabla 6). El mayor porcentaje de grasas y cenizas fue para *Artemia* 15.7 % y 8.7 % respectivamente. Mientras que el menor porcentaje de grasas se obtuvo con el rotífero (9.4 %). El mayor porcentaje de humedad (89.1 %) se encontró en el copépodo (Tabla 6).

Tabla 6.- Composición proximal (proteínas, grasas, ceniza y humedad) base seca del alimento vivo suministrado a larvas de pargo flamenco *Lutjanus guttatus*. Letras diferentes representan diferencia estadísticamente significativa

Análisis	Organismo		
	Rotíferos	Artemia	Copéodos (<i>Pseudodiaptomus euryhalinus</i>)
%Proteína	63.3±0.0 ^a	55.7±0.1 ^b	73.7±0.1 ^c
%Grasa	9.4±0.1 ^a	15.7±0.1 ^b	10.6±0.1 ^c
%Ceniza	5.7±0.0 ^a	8.7±0.1 ^b	5.3±0.2 ^a
%Humedad	79.0±2.4 ^a	74.0±0.1 ^b	89.1±0.3 ^c

7.3.2. Larvas 30 dpe

El porcentaje de proteína más alto se encontró en las larvas de pargo alimentadas solamente con el rotífero (67.2 %), los cuales también reportaron los valores más bajos de grasas (9.1 %). En las larvas de pargo alimentadas con copépodos se detectó la mayor concentración de grasas (12.7 %), mientras que en el porcentaje de proteína fue el más bajo (63.5 %). Los porcentajes de cenizas y humedad no presentaron diferencias significativas (Tabla 7).

Tabla 7.- Composición proximal final (proteínas, grasas, ceniza y humedad) base seca de larvas de pargo flamenco *Lutjanus guttatus* cultivadas al final del experimento por 30 días, alimentadas con las tres dietas, copépodos, copépodos+rotíferos y rotíferos. Letras distintas representan diferencia estadísticamente significativa.

Análisis	Tratamientos alimenticios con larvas de pargo de 30 dpe)		
	Pargos Finales Alimentados con Rotíferos	Pargos Finales Alimentados con Mezcla	Pargos Finales Alimentados con Copépodos
%Proteína	67.2±0.1 ^a	64.3±0.1 ^b	63.5±0.1 ^c
%Grasa	9.1±0.1 ^a	11.1±0.1 ^b	12.7±0.1 ^c
%Ceniza	16.7±0.1 ^a	16.1±0.0 ^b	15.9±0.1 ^b
%Humedad	81.0±0.1 ^a	80.3±0.5 ^b	79.1±0.1 ^b

7.3.3. Ácidos grasos de los alimentos vivos

Los copépodos presentaron los valores más altos en los ácidos palmítico C16:0; ácido palmitoleico C16:1, cis-9; ácido esteárico C18:0; ácido araquidónico C20:4, cis-5, 8, 11,14 (ARA); ácido docosahexaenoico C22:6 n3 (DHA). Mientras que para *Artemia* fue 7.9 %, los ácidos grasos más altos se reportaron en ácido palmítico C16:0; ácido esteárico C18:0; ácido oleico C18:1, cis-9; ácido linolenico C18:3, cis-9, 12,15 presentando un porcentaje de 12.7 % ambos casos del total de ácidos grasos reportados. En rotíferos solamente se dieron valores mayores en dos ácidos palmítico C16:0, ácido esteárico C18:0, representando el 4% del total de ácidos.

La relación ARA/DHA que presentó el menor valor fue para los copépodos (1.0). Siendo casi similar para rotíferos (1.1) y la relación mayor (2.0) fue para las *Artemia* en comparación con la relación DHA/EPA se encontró el mayor valor en los copépodos (7.0), seguido de la de rotíferos (4.0) y la menor relación fue para la *Artemia* (0.5) (Tabla 8). En los copépodos los ácidos grasos ARA (1.4) y DHA (1.4) fueron dominantes sobre *Artemia* y rotíferos, mostrando estos una tendencia menor a 1 % en los dos ácidos grasos, así como diferencias significativas en todas las dietas.

Tabla 8.- Valores medios del total de ácidos grasos (peso seco) expresados en porcentaje, para los diferentes alimentos vivos utilizados en larvas de pargo flamenco *Lutjanus guttatus*. Letras distintas representan diferencia estadísticamente significativa.

MUESTRA	Rotíferos	Artemia	Copépodos (<i>Pseudodiaptomus euryhalinus</i>)
(C14:0)	0.24	0.1	0.8
(C15:0)	0.08	0.1	0.1
(C16:0)	1.3	2.0	2.4
(C16:1,cis-9)	1.2	0.5	1.6
(C17:0)	0.1	0.3	0.1
(C17:1)	0.1	0.2	0.1
(C18:0)	2.7	4.8	1.1
(C18:1,cis-9)	0.7	1.3	0.3
(C18:2,cis-9,12)	0.0	0.2	0.1
(C18:3,cis-9,12,15)	0.1	4.6	0.3
(C18:3,cis-6,9,12)	0.0	0.9	0.7
(C20:1)	0.4	0.1	0.0
(C20:2)	0.1	0.1	0.0
(C20:3)	0.3	0.1	0.2
(C20:3)	0.1	0.2	0.0
(C20:4,cis-5,8,11,14)	0.9	0.2	1.4
(C20:5)n3	0.2	0.2	0.2
(C22:0)	0.1	0.0	0
(C22:6)n3	0.8	0.1	1.4
(C22:2)	0.2	0.0	0.0
Grasa Total (%)	9.4 ^a	15.7 ^b	10.6 ^c
ARA/DHA	1.1	2.0	1.0
DHA/EPA	4.0	0.5	7.0
EPA/ARA	0.2	1	0.1

7.3.4. Ácidos grasos en larvas de pargo

En la Tabla 9 se describen con detalle la composición de ácidos grasos, expresado en porcentajes en las larvas del pargo flamenco *L. guttatus* alimentadas con las 3 dietas diferentes durante 30 días de cultivo.

En los tres tratamientos se observó mayor presencia de los ácidos grasos palmítico C16:0, ácido esteárico C18:0, ácido oleico C18:1, cis-9, ácido eicosapentaenoico C20:5n3 (EPA), ácido docosahexaenoico C22:6n3 (DHA). Los pargos alimentados únicamente con copépodos presentaron 12.66 % y 11.10 % para la mezcla de copépodos+rotíferos y 9.09 % para las larvas alimentadas solamente con rotíferos.

La relación ácido araquidónico/ácido docosahexaenoico (ARA/DHA) presento valores iguales para el tratamiento de pargos alimentados solo con los rotíferos (0.4) y de pargos alimentados solo con copépodos (0.4) y la relación para el tratamiento alimentado con la mezcla de copépodos y rotíferos fue de 0.5, no presentando diferencia significativa. Y esta tendencia se invirtió cuando se comparó con la relación ácido docosahexaenoico/ácido eicosapentaenoico (DHA/EPA) encontrándose el menor valor en el tratamiento alimentado con la mezcla de copépodos+rotíferos (0.8), seguido de la dieta de copépodos (2.1) y la mayor relación fue de aquellos alimentados con en la dieta de rotíferos (3.5), donde hubo diferencias significativas (Tabla 9). El porcentaje de ácidos grasos ARA, EPA en los pargos alimentados con copépodos es de 0.6 %y 0.7 %, respectivamente, manteniéndose por encima de los demás tratamientos. Para el ácido graso DHA el mayor valor con 1.5 % fue del tratamiento de copépodos (Tabla 9)

Tabla 9.- Porcentajes de ácidos grasos relativos al total de ácidos grasos (peso seco), para las larvas de pargo flamenco *L. guttatus* al final 30 días de cultivo alimentadas con tres dietas: copépodos, copépodos+rotíferos y rotíferos. Letras distintas representan diferencia significativa.

MUESTRA	Pargos Finales Alimentados con Rotíferos	Pargos Finales Alimentados con Mezcla	Pargos Finales Alimentados con Copépodos
(C14:0)	0.1	0.3	0.3
(C15:0)	0.0	0.1	0.1
(C16:0)	2.0	2.9	2.5
(C16:1,cis-9)n9	0.4	0.6	0.5
(C17:0)	0.1	0.0	0.0
(C17:1)	0.1	0.1	0.1
(C18:0)	2.8	3.3	3.3
(C18:1,cis-9) n-9	1.0	1.2	1.3
(C18:2,cis-9,12) n-6	0.1	0.0	0.002
(C18:3,cis-9,12,15) n-6	0.6	0.4	0.3
(C18:3,cis-6,9,12) n-3	0.1	0.1	0.1
(C20:1)	0.2	0.4	0.5
(C20:2) n-6	0.1	0.1	0.1
(C20:3) n-3	0.0	0.1	0.1
(C20:3)	0.2	0.0	0.1
(C20:4,cis-5,8,11,14)n-6	0.3	0.2	0.6
(C20:5) n3	0.2	0.5	0.7
(C22:0)	0.0	0.1	0.2
(C22:6) n3	0.7	0.4	1.5
(C22:2)	0.0	0.1	0.2
Grasa Total (%)	9.1 ^a	11.1 ^b	12.7 ^c
ARA/DHA	0.4	0.5	0.4
DHA/EPA	3.5	0.8	2.1
EPA/ARA	0.6	2.5	1.2

7.3.5. Aminoácidos en alimentos vivos.

El mayor porcentaje de aminoácidos en los alimentos vivos utilizados fue para copépodos con un 58.3 % del total de proteína en base seca seguido de *Artemia* con 45.0 % y el que obtuvo menor fueron los rotíferos con 40.5 %. Los aminoácidos que tuvieron mayor presencia en los copépodos fueron ácidos aspártico, ácido glutámico, arginina, glicina-treonina, alanina, metionina, isoleucina y lisina. Y para *Artemia* fueron fenilalanina y serina-histidina. Y para los rotíferos el único aminoácido fue leucina (Tabla 10a).

Tabla 10a.- Total de aminoácidos en porcentaje (%) en relación con la cantidad de proteína en base seca, en los tres alimentos vivos utilizados para la alimentación de pargo flamenco *L. guttatus*. Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas.

Aminoácido	Alimentos vivos		
	Rotíferos (%)	Copépodos (%)	Artemia (%)
Esenciales			
Arginina	1,52	2,91	2,07
Serina-Histidina	6,62	7,19	7,89
Isoleucina	2,24	3,56	3,45
Leucina	2,66	0,00	0,00
Lisina	1,39	5,69	1,46
Metionina	1,58	3,27	2,23
Fenilalanina	0,93	0,00	1,28
Glicina-Treonina	3,94	8,50	5,57
Valina	0,75	0,95	0,23
No esenciales			
Ácido Aspártico	7,28	8,74	7,47
Ácido Glutámico	8,61	11,75	9,89
Tirosina	1,04	1,68	0,88
Alanina	1,82	4,10	2,63
Total	40,39	58,34	45,05

7.3.6. Aminoácidos en larvas de pargo flamenco *Lutjanus guttatus*.

Los organismos que presentaron mayor porcentaje de aminoácidos se registró en los pargos alimentados con copépodos con un 66.6 % seguido de los pargos alimentados con la mezcla de copépodos+rotíferos con un 57.3 % del total de aminoácidos y el que obtuvo menor porcentaje fueron los organismos alimentados con rotíferos con un 48 % de aminoácidos en base seca. Los aminoácidos con mayor presencia fueron ácidos aspártico con 11.2 % para los organismos alimentados con copépodos, posteriormente los pargos alimentados con rotíferos con 8.7 % y seguido de los pargos alimentados con mezcla con 7.8 %. A su vez, el ácido glutámico fue el que mostró un porcentaje mayor comparado con los demás aminoácidos presentando los pargos alimentados con copépodos 15.6 %, seguido de los pargos alimentados con la mezcla 11.6 % y por último los pargos alimentados con rotíferos con 10.7 %. Para los demás aminoácidos con mayor presencia en el tratamiento de copépodos en comparación con los otros tratamientos fueron serina-histidina, glicina-treonina, tirosina, alanina, isoleucina y lisina. Los aminoácidos con mayores valores en el tratamiento de rotíferos fueron solamente lisina, leucina, serina-histidina. Mientras que para el tratamientos de la mezcla lo aminoácidos con valores mayores fueron arginina, valina, fenilalanina y leucina (Tabla 10b).

Tabla 10b.- Total de aminoácidos en porcentaje (%) en relación con la cantidad de proteína en base seca, en los tres tratamientos al final del experimento (30 dpe). Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas.

Aminoácido	Pargos finales alimentados con Rotíferos (%)	Pargos finales alimentados con Copépodos (%)	Pargos finales alimentados con mezclas (Rot+Cops) (%)
Esenciales			
Arginina	0,66	2,94	7,76
Serina-Histidina	2,08	8,24	6,36
Isoleucina	0,53	4,75	2,28
Leucina	0,59	0,00	3,21
Lisina	0,17	2,68	1,05
Metionina	0,26	3,37	1,35
Fenilalanina	0,73	0,29	0,63
Glicina-Treonina	2,29	9,55	8,07
Valina	0,66	0,96	2,21
No esenciales			
Ácido Aspártico	2,28	11,23	7,81
Acido Glutámico	3,41	15,62	11,62
Tirosina	0,31	1,38	1,05
Alanina	1,15	4,46	3,87
Total	15,12	66,57	57,27

8.-Discusión

Cultivo de copépodos

En el presente trabajo se estudió la optimización del cultivo del copépodo calanoide *Pseudodiaptomus euryhalinus* mediante dos métodos. Se probaron dos sistemas, uno en el cual se manipulaba el volumen de agua y el otro, en el cual, solamente se manejó un único volumen de agua. Ambos métodos fueron sembrados a las mismas densidades, para demostrar si las producciones podrían variar de acuerdo al método de cultivo. La intención fue analizar si las cantidades de copépodos eran suficientes para abastecer, tanto en calidad, como cantidad a un cultivo piloto de larvas de pargo flamenco *L. guttatus*. Debido a que gran variedad de copépodos han demostrado buenos resultados como alimento vivo en diversas especies de larvas de peces, atribuyéndole adecuados requerimientos nutricionales (Evjemo *et al.*, 2003).

Hoy en día, los nuevos estudios son enfocados en intensificar los cultivos de copépodos con sistemas automatizados para reducir espacios, mejorar las producciones de copépodos y lograr abastecer en cantidades adecuadas a los cultivos larvales de peces marinos (Payne y Rippingale, 2001). Otro aspecto importante a desarrollar es minimizar las labores de mantenimiento y a su vez reducir los costos de producción.

Støttrup *et al.* (1986) mencionaron que uno de los problemas es mantener altas densidades en cultivo de copépodos. Por lo regular, las altas densidades se logran con grandes volúmenes. En este estudio, probando los dos métodos por periodos de cultivo de 3 semanas, Comparado con lo reportado por Schipp *et al.* (1999) para el copépodo calanoide *Acartia spp.* en un sistema de 3 tanques

de 1000 L durante 7 semanas, donde obtuvieron cosechas cada 8 días de 1,071 copepodos·L⁻¹ los métodos propuestos en este trabajo resultan ser más productivos en un menor tiempo que otros sistemas. Rippingale y Payne (2001) reportaron para el copépodo calanoide tropical *G. imparipes* 1000 copepodos·L⁻¹ en un sistema automatizado que va de 500 L a 1000 L. Al compararlo con los resultados de McKinnon *et al.* (2003) en volúmenes de 20 L. Nuestros métodos son menos eficientes por el volumen de agua que se necesita para producirlos.

Dcaupa y Mazzocchi (2004) obtuvieron producciones con los copépodos calanoides *Temora stylifera* de 370 nauplios L⁻¹ y *Centropages typicuss* de 100 nauplios·L⁻¹ ambos en el mismo volumen. Støttrup (2006) obtuvo para el copépodo *A. tonsa* 2000 copepodos·L⁻¹. Olivotto *et al.* (2008) produjeron para *Tisbe sp.* (1 000 copepodos·L⁻¹) de 2 a 3 semanas alimentados con *Isochrysis galbana* en volumen de 100 L. En este estudio los resultados reportados son mayores que los obtenidos por los autores antes citados, considerando aquellos volúmenes menores y similares, otro factor a considerar es la producción que se obtuvo cada 3 semanas (15 días) en los tres experimentos probados a lo largo del periodo de estudio (5 meses), lo que demuestra la eficiencia de los métodos de cultivo probados.

El copépodo calanoide tropical *P. euryhalinus* logró mantener altas producciones a pesar de las condiciones de cultivo. Por una parte las variaciones de temperatura a lo largo de 5 meses (21.4 hasta 29.5 °C) y por otra parte, las diferentes microalgas utilizadas para su alimentación. Con esto se demostró su capacidad adaptativa a varios factores antes mencionados, sin repercusiones en su producción. Estos resultados demuestran que *P. euryhalinus* tiene potencial de cultivo a lo largo del año, bajo regímenes

alimenticios variados para emplearlo como complemento de la alimentación de larvas de diversas especies tropicales, promueve mejoras en crecimientos. Y además, los dos métodos de cultivos en cuestión de manejo y actividades a realizar en cada uno de ellos da a entender que el método de volumen fijo se emplea poca o nula manipulación de los organismos y esfuerzo laboral, mientras que en el método de relleno al estar incrementando los volúmenes se realizan un par de actividades más que en el otro, obteniendo en los dos métodos similares producciones, es por ello que se puede deducir que mientras menos actividades se realicen en los cultivos, menor será la manipulación y el estrés generado en los organismos.

Las operaciones del sistema consistieron en drenar los tanques cada 3 días mediante una válvula en la parte inferior del cono del tanque, para eliminar la acumulación de materia orgánica, limpiar la manguera de aireación, toma de parámetros y revisión del sistema, por lo que, solo se tarda 2 h por día, dando opción a realizar otras actividades.

Crecimiento y supervivencia

En años recientes, diversos estudios durante la primera alimentación larval han demostrado que para un gran número de especies de peces marinos, las dietas compuestas de nauplios de copépodos obtienen mejor, crecimiento y supervivencia, reducen el estrés, comparado con las dietas que consisten solamente de rotíferos y *Artemia* (Watanabe *et al.*, 1983; Støttrup *et al.*, 1986; Kraul *et al.*, 1992, 1993; Støttrup and Norsker 1997; Schipp *et al.*, 1999; Shields *et al.*, 1999; Støttrup 2000; Payne *et al.*, 2001; Evjemo *et al.*, 2004), incluyendo

los estudios realizados con larvas de pargo flamenco *L. guttatus* (Abdo de la Parra *et al.* 2010; García-Ortega, 2009).

En este estudio, solo se les proporcionó copépodos durante 15 dpe posteriormente se les incluyó *Artemia* hasta el 30 dpe, durante este último periodo resultó notorio que aun cuando todos los tratamientos recibían la misma presa, las que fueron previamente alimentadas con copépodos, presentaban mayor crecimiento. Este tratamiento obtuvo el mayor peso húmedo ($332.1 \text{ mg}\cdot\text{larva}^{-1}$) seguido de la mezcla ($96.2 \text{ mg}\cdot\text{larva}^{-1}$) y el menor para aquellas larvas alimentadas únicamente con rotíferos ($10.5 \text{ mg}\cdot\text{larva}^{-1}$) a los 30 dpe. Así mismo, en longitud total se obtuvo 26.5 mm alimentando solamente con copépodos, 18.7 mm con la mezcla de copépodos+rotíferos y 9.8 mm con el rotífero al final del experimento. Los resultados obtenidos por otros autores para la misma especie de pez y de alimento vivo, presentaron tendencias similares, Abdo de la Parra *et al.* (2010) obtuvieron pesos promedio de 1.3 a 1.6 g y una longitud total de 42.7 a 48.2 mm alimentando con mezcla de copépodos (*P. euryhalinus* y *T. monozota*) y rotíferos a los 45 dpe. Flores-Rojas, (2009) reportó un peso de $2.1 \text{ mg}\cdot\text{larva}^{-1}$ alimentadas con una mezcla de copépodos y rotíferos comparado con otra dieta alimentadas únicamente con rotíferos con un peso promedio de $0.31 \text{ mg}\cdot\text{larva}^{-1}$ a los 21 dpe.

Resultados similares obtuvieron Payne *et al.* (2001) para larvas de pargo rosa *Pagrus auratus* con una longitud total mayor (6.6 y 6.8 mm) para aquellas alimentados con mezcla de copépodos y rotíferos comparándolas con las larvas alimentas solo con rotíferos (5.8 mm) a los 18 dpe. También Wilcox *et al.* (2006) al utilizar el copépodo *Acartia tonsa* junto con rotíferos para alimentar larvas de *Paralichthys lethostigma* obtuvieron una mayor longitud total (5.15

mm) y peso (2.2 mg-larva⁻¹) comparado con aquellas larvas donde solamente utilizó el rotífero S (4.3 mm y 0.9 mg-larva⁻¹ respectivamente) y aun mayor con aquellas larvas alimentadas con el rotífero SS (3.8 mm y 0.7 mg-larva⁻¹ respectivamente). Otros estudios también reportan uso de copépodos como dieta con diversas especies de meros (Hussain y Higuchi, 1980) y pargos (Doi *et al.*, 1994). Esto nos demuestra que al incluir el copépodo junto con otros alimentos vivos utilizados convencionalmente incrementa significativamente el crecimiento y en algunos casos la supervivencia.

En cuanto a la supervivencia, contrario a lo esperado, la menor se obtuvo en el tratamiento de larvas alimentadas solo con copépodos (0.66 %), seguido del tratamiento donde se incluyó el copépodo+rotífero (1.1 %) y con la mejor supervivencia el tratamiento donde solamente se alimentó con rotíferos (2.6 %). Resultados presentados por otros autores en pargos demuestran similitudes/diferencias con los obtenidos en este estudio. Sierra-de la Rosa, (2007) obtuvieron una supervivencia de 1.8 % a los 44 dpe larvas de *L. guttatus* alimentadas con rotíferos, *Artemia* enriquecida, diferente zooplancton y diferentes alimentos formulados. Boza-Abarca *et al.*, (2008) obtuvo una supervivencia de 1.5 % en larvas de *L. guttatus* alimentadas con huevos de ostión, zooplancton y rotífero. Así mismo, Abdo de la Parra *et al.* (2010) obtuvieron tasas de supervivencia para *L. guttatus* de 1.4 a 2.8 % a los 45 dpe empleando mezcla de copépodos, rotíferos y posteriormente *Artemia*, los valores registrados en nuestro estudio fueron similares, recalcando que las larvas fueron alimentadas por tratamientos individuales y no en conjunto de alimento vivo como lo reportado en los autores anteriores y el periodo de estudio fue menor (30 dpe).

Los principalmente factores físicos que afectan la supervivencia son cambios estacionales, morfometría, edad, variaciones medioambientales y cantidad de alimento. Por otra parte, Wilcox *et al.* (2006) explican que un factor determinante para la supervivencia es el tamaño de la presa proporcionada. Las bocas pequeñas de las larvas limitan el tamaño de las mismas, por lo que los nauplios de copépodos (74 μm) (Puello *et al.*, 2008) son el estadio más adecuado para mejorar la ingestión de presas vivas (Luizi *et al.*, 1999). De igual manera, el rotífero tiene un tamaño pequeño (<150 μm) a lo largo de su ciclo de vida, resultando ser también un candidato idóneo para diversas larvas de peces marinos durante la primera alimentación.

Las bajas supervivencias de este estudio en los tratamientos donde se incluyó copépodos se atribuyen a dos factores, uno donde se incluyó mayormente adultos de *P. euryhalinus* y escasos copepoditos y nauplios. Por lo tanto, en el cultivo de larvas de pargo flamenco *L. guttatus*, es imprescindible que el estadio dominante proporcionado sea nauplios para asegurar su consumo desde el inicio hasta el 15 dpe del experimento. Considerando los resultados en este estudio, podemos sugerir que durante los primeros días de cultivo es necesario incrementar el número de nauplios de copépodos de 3 a 4 organismos por mililitro, como lo mencionan Lee *et al.* (2003), donde al aumentar la tasas de alimentación puede resultar un incremento en la supervivencia y talla en las larvas cultivadas con copépodos. Y el segundo factor, así como lo mencionan Olivotto *et al.* (2008) que las bajas supervivencias en larvas simplemente, pueden estar relacionado con la distribución espacial del copépodo en el tanque de cultivo. Debido a que existen copépodos bentónicos y planctónicos y algunos de los copépodos son

sensibles a la luz. Por lo tanto, unos son atraídos por esta y otros son repelidos.

Por otra parte, la supervivencia no solamente está influenciada directamente con la cantidad de presas o la distribución espacial, sino también con el contenido nutricional, la alta supervivencia obtenida en el tratamiento de larvas alimentadas con rotíferos puede estar relacionada con los diversos componentes bioquímicos tales como los lípidos y proteínas presentes o ausentes en este alimento vivo, ya que cumplen diversas funciones en los seres vivos, tanto a nivel estructural (formando parte de membranas y tejidos musculares), reparando fibras dañadas y para el crecimiento o catálisis (Flores-Santana, 2008.)

Por consiguiente, Pike y Brown (1975) mencionan que el catabolismo de las proteínas puede ser mínimo, cuando el organismo carece de energía (lípidos) este se convierte en un factor limitante, ya que para realizar este proceso (catabolismo) necesita un aporte de nutrientes y energía muy elevados. Esto podría explicar los resultados obtenidos en las larvas alimentadas únicamente con rotíferos que recibieron bajo aporte de proteínas y lípidos (Tabla 6). Debido a lo anterior, las larvas como estrategia reducen su consumo proteico y reponen la energía de fuentes lipídicas para mantenimiento del organismo durante el crecimiento y aseguran la supervivencia.

Estos resultados a su vez, demostraron que no puede ser el único componente para incrementar significativamente la supervivencia. Por lo que es necesario incluir el copépodo por lo menos en los primeros 15 dpe en combinación con

rotífero y posteriormente incorporar *Artemia* (Abdo de la Parra *et al.*, 2010 y García-Ortega, 2009).

En el presente estudio el nivel proteico en las presas utilizadas resultó mayor en los copépodos seguidos de rotíferos y *Artemia* con el menor valor. Respecto al contenido de lípidos el mayor valor lo obtuvo *Artemia* sin enriquecer, seguido de copépodos y el menor fue para rotífero. Podría suponerse que al incluir *Artemia* al 15 dpe a todos los tratamientos, los organismos se encontraban bajo el denominado “efecto de proteína limitada” en donde los bajos niveles de proteína en *Artemia* y altos de lípidos en comparación con los copépodos y rotíferos produjo el uso de los lípidos como fuentes energéticas reduciendo la oxidación de las proteínas Watanabe, (1988). Siendo este factor el que intervino a su vez, en el contenido de proteína en las larvas, mostraron una tendencia mayor para aquellas larvas alimentadas con rotíferos, seguido de mezcla y finalmente copépodo (Tabla 6 y 7).

Rønnestad *et al.* (1999) mencionan que muchas especies exhiben un crecimiento extremadamente rápido durante la etapa larvaria, por lo cual requieren de grandes cantidades de aminoácidos para la producción de proteínas que conforman los tejidos durante el crecimiento y suplirán además la energía requerida para el metabolismo. Sin embargo, en el tratamiento alimentado con rotíferos registró mayor contenido de proteínas pero no un crecimiento rápido, esto puede estar atribuido, a la baja cantidad de lípidos suministrados en la dieta. Sargent *et al.* (1989) mencionan que los lípidos facilitan el metabolismo de las proteínas. Por lo que, en este caso en particular la falta de lípidos, no facilitaron el metabolismo de las proteínas, sino solamente

fueron empleadas para mantenerse vivos y producir un crecimiento más lento (Roman, 1984).

En el presente estudio el menor contenido total de proteínas se registró en el tratamiento de larvas alimentadas con copépodos, los cuales presentaron los valores más altos en lípidos, caso contrario con los tratamientos alimentados con rotíferos donde se registró un alto contenido de proteínas y bajo contenido de lípidos. Evjermo *et al.*, (2003) registró que la mayoría de las dietas enriquecidas contienen solamente lípidos y el contenido de proteínas decrece conforme el contenido total de lípidos incrementa, esto demuestra una relación proteínas/lípidos que afecta tanto en las presas como en los consumidores.

Velázquez *et al.* (2006) mencionan que la degradación de proteína, incrementa el metabolismo de los aminoácidos esenciales y no esenciales para la síntesis de tejidos corporales. Sin embargo, cuando los requerimientos de proteínas para el crecimiento ha sido cubierto y este nutriente se proporciona en exceso, los peces tienden a utilizarla como sustrato energético, lo que disminuye la eficiencia alimenticia. En cambio, los lípidos además de ser utilizado para elementos estructurales de los peces, representan un concentrado de energía potencialmente almacenable (Halver, 1989; Jobling, 1994). En contraste, la relación que se observó en los contenidos de proteína y de lípidos dependiendo de la alimentación puede estar atribuida a lo mencionado por los autores anteriores donde al momento de alimentar con una fuente rica de proteína (copépodos), las larvas usaron la proteína como fuente de energía, consumiéndola en gran medida, mientras que los lípidos solamente los utilizaron para almacenamiento. En comparación con lo observado en las larvas donde solamente se alimentaron con rotíferos, que no presentaban una

fuelle rica de proteína, la proteína consumida por el organismo la utilizaron solamente para el crecimiento y no como sustrato energético. Sin embargo los lípidos fueron usados como fuente de energía lo que no les permitió a los organismos almacenarla.

Ácidos grasos

Al proporcionar las concentraciones correctas de ácidos esenciales existe mayor probabilidad de aumentar la supervivencia y el crecimiento de las larvas de peces, y este se relaciona directamente a su contenido de ácidos grasos en la larva, particularmente DHA/EPA (Watanabe *et al.*, 1983; Nanton y Castell 1998; McKinnon *et al.*, 2003; Payne *et al.*, 2001). El DHA presente en el copépodo *P. euryhalinus* fue el más alto (1.4 % del total de lípidos) debido a la capacidad que tienen de alargar o acortar las cadenas en los precursores de los ácidos grasos obtenidos en los alimentos consumidos por los copépodos (Norsker y Støttrup, 1994).

Posteriormente fueron los rotíferos (0.8 %) y finalmente el de *Artemia* (0.1 %), resultados similares por los reportados por Toledo *et al.*, (1999) y Rijkumar y Kumaraguru (2006) para el copépodo *Acartia clausi*. Así mismo, mencionan que la cantidad y la calidad de los n-3 HUFA's en *Pseudodiaptomus sp.* y *Acartia sp.* es alrededor de 2 a 3 veces más alto que rotíferos. Siendo en este caso *P. euryhalinus* casi el doble que para rotíferos. Existen diversos estudios sobre los requerimientos de n-3 HUFA en peces marinos (Reitan *et al.*, 1994, Rodríguez *et al.*, 1994; Estevez y Kanazawa, 1996) y se sugiere que los DHA son más importantes que los EPA para lograr larvas saludables. En este

estudio se obtuvieron los mayores valores tanto en DHA (1.5 %), EPA (0.7 %) y ARA (0.6 %) con larvas alimentadas con copépodos. El tratamiento de la mezcla de copépodos y rotíferos obtuvo el menor valor de ARA (0.2 %) y DHA (0.4 %) y para el tratamiento alimentado con rotíferos se obtuvo el menor valor de EPA (0.2 %). Salhi *et al.* (1995) mencionan que el ARA dietario parece ser importante para la supervivencia, pero no suficiente para promover un incremento en el crecimiento como DHA o EPA, por otro lado Izquierdo, (1996) menciona que la deficiencia de n-3 HUFA retrasa el crecimiento, induce altas mortalidades y reduce la resistencia al manejo en larvas. Caso similar fue observado en el tratamiento alimentado solamente con rotíferos a pesar que en este tratamiento se registró la mayor supervivencia al momento de manipularlas, las larvas no soportaban el manejo resultando en altas mortalidades. Lo que se puede deducir que mientras no se manipularon los organismos se mantuvieron vivos.

La relación DHA:EPA y su efecto en el desarrollo de los organismos es importante a observar en el tratamiento alimentado con rotíferos fue el que obtuvo la mayor relación de DHA:EPA (3.5:1). En las larvas alimentadas con copépodos se registró una relación DHA:EPA (2.1:1). Sin embargo, los resultados obtenidos no son suficientes para determinar los niveles óptimos de DHA y EPA para las larvas de pargo flamenco. Se puede sugerir de acuerdo a los resultados en el presente estudio, una dieta de DHA de 0.2-1.4 % del peso húmedo y una relación de DHA:EPA 7:1 presente en el copépodo *P. euryhalinus* podría promover el crecimiento y combinados junto con rotíferos (0.8 de DHA y una relación DHA:EPA de 4.0:1) ayudarían a incrementar la supervivencia en los primeros 15 dpe de larvas de *L. guttatus*. Zheng *et al.*

(1996) encontraron que ARA 20:4 n -6 no tiene efecto en el crecimiento de larvas de bacalao, sin embargo, una mezcla de niveles de n -3 HUFA y una proporción de 22:6 n -3 a 20:5 n -3, un nivel de 20:4 n -6 arriba de 1.5 y 1% del peso seco promueven el crecimiento en larvas de besugo (Bessonart *et al.*, 1999) y en larvas de platija japonesa (Estevez *et al.*, 1997).

Gaspasin y Duray, (2001) encontraron en larvas de *Chanos chanos* silvestres alimentados con copépodos una mayor abundancia de DHA en el tejido a diferencia de aquellos que se mantuvieron en cautiverio. Los silvestres mostraron una relativa superioridad en términos de calidad nutricional y cantidad comparado con los del laboratorio alimentados con organismos convencionales. Lo anterior refuerza la idea de que los copépodos son una fuente rica de nutrientes apta para larvicultura. Evjemo y Olsen (1997) encontraron en los copépodos *Eurytemora sp.* y *Temora longicornis* relaciones de DHA/EPA de 1.83-1.97. Por lo tanto, son de gran importancia la presencia de los ácidos grasos en los alimentos vivos y se deduce que los patrones de los ácidos grasos predominantes en los predadores generalmente están asociados con los de su presa.

Aminoácidos

Los aminoácidos también son importantes para el desarrollo de las larvas de peces (Fyhn, 1987). El alto contenido de aminoácidos libres en los organismos del zooplancton facilita la digestión y absorción de proteínas en las larvas de peces (Dabrowski y Rusiecki, 1983; Fyhn, 1989; Fyhn *et al.*, 1993; Walford y Lam, 1993; Segner *et al.*, 1994; Rønnestad *et al.*, 1999), además de que son

utilizados principalmente como fuente de energía para el metabolismo (Rønnestad *et al.*, 1992)

En este estudio los aminoácidos presentes en los alimentos (copépodos, *Artemia* y rotíferos) que obtuvieron el mayor porcentaje fueron para el ácido galotánico 11.8, 9.9 y 8.6 % respectivamente, el segundo valor es ácido aspártico 8.7, 7.5 y 7.3 respectivamente, en tercer lugar el serina-histidina con 7.2, 7.9 y 6.6. Los copépodos presentaron el mayor valor en Glicina-Treonina de 8.5%. Lisina presentó mayor valor en *Acartia clausi*, rotífero y *Artemia* (11.04, 10.29, 10.20 % respectivamente) así mismo para Leucina (9.92, 9.12, 8.81 % respectivamente). Rajkumar y Vasagam (2006) obtuvieron para rotíferos 98.18 % total de aminoácidos, para *Artemia* 97.41 % y para el copépodo *Acartia clausi* 99.09 % alimentados con *Chaetoceros affinis*, *Chlorella marina* e *Isochrysis galbana* en una proporción de 3:3:3. Estos porcentajes totales de aminoácidos fueron para rotífero 40.4 %, para *Artemia* 45.0 % y para el copépodo fue de 58.3 % alimentados con una sola microalga *N. oculata*, lo anterior sugiere una relación directa del organismo con el nivel nutricional del alimento y la inclusión de dietas poli o mono específicas de microalga.

Fyhn y Govoni (1995) determinaron que las larvas de peces marinos regulan la absorción de aminoácidos de manera similar a los invertebrados marinos. Lo anterior explica, el transporte de los nutrientes ingeridos por alimentos vivos hacia sus consumidores. Como se puede ver en los tratamientos, la mayor cantidad total de aminoácidos registrada en este estudio fue para el tratamiento de larvas alimentadas con copépodos (66.6 %), posteriormente el tratamiento

donde se suministró la mezcla (57.3 %) y por último el tratamiento alimentado con rotíferos (48.0 %) (Tabla 10 y 11).

Aragão *et al.*, (2004) mencionan que un balance en el perfil de aminoácidos incrementa la retención de aminoácidos e implementa el crecimiento y la utilización de nitrógeno, además, mencionan que durante la hidrólisis de proteína en las larvas de peces, su alta tasa de crecimiento, implica alta tasa de síntesis de proteína generando la suficiente energía para los primeros estadios de desarrollo.

Algunas proteínas son inevitablemente utilizadas por la energía directa de la oxidación de aminoácidos o después de la conversión de los aminoácidos en glucosa, pero estos procesos pueden ser minimizados por la inclusión de una fuente de energía (lípidos) en la dieta.

Los perfiles de aminoácidos en las larvas pueden tener fluctuaciones debido a los factores de inanición o por el consumo de microalga, en las técnicas de agua verde utilizadas, estos cambios en el perfil de aminoácidos durante el desarrollo larval han sido detectados para diversas especies de peces marinos (Conceição *et al.*, 1997, 1998) dichos cambios deben estar considerados para el organismo que va ser utilizado durante la primera alimentación que va en relación al perfil de aminoácidos de cada organismo y su contenido nutricional para determinar la cantidad de inclusión de nutrientes en las dietas larvales.

9. Conclusiones

- Los resultados mostraron que los dos métodos de cultivo son eficientes para producir altas concentraciones de copépodo, sin embargo el que presento mayor eficiencia respecto a las actividades realizadas fue el método de volumen fijo.
- El copépodo *P. euryhalinus* demostró mantener producciones constantes y adecuadas a lo largo de un periodo de 5 meses, previos al cultivo larval de pargo flamenco, a pesar de las variaciones de temperaturas y las diferentes microalgas utilizadas para su alimentación
- Con el cultivo escalonado de 1000 L a 7000 L del copépodo *P. euryhalinus*, se lograron obtener las cantidades suficientes para cubrir las concentraciones mínimas requeridas de un cultivo piloto de pargo flamenco *L. guttatus*.
- En el tratamiento donde se usó únicamente copéodos como alimento vivo en el cultivo larvario *L. guttatus* produjo el mejor crecimiento.
- En el tratamiento donde se usó únicamente rotíferos como alimento vivo en el cultivo larvario *L. guttatus* produjo la mejor supervivencia.
- Debido al rápido crecimiento obtenido en las larvas alimentadas con copéodos, se logró suministrar *Artemia* a los 16 dpe. Y se llevó a cabo un destete temprano a los 20 dpe.

10. Recomendaciones

- Es recomendable incrementar las concentraciones de copépodos establecida anteriormente en los protocolos de estudios, que incluya *P. euryhalinus* y rotíferos seguidos de *Artemia* para mejorar los resultados con larvas de pargo flamenco

11. Bibliografía

- Abdo-de la Parra I, Rodríguez-Ibarra E, Puello-Cruz A, González-Rodríguez B, Velasco G, García-Ortega A, Álvarez-Lajonchère L. 2005. Evaluación del crecimiento y supervivencia de larvas de botete diana (*Sphoeroides annulatus*) alimentadas con copépodos (*Tisbe monozota*). Paper presented at the 2nd Internacional Aquaculture Forum, Hermosillo, Sonora, Mexico, 1–3 December 2005.
- Abdo-de la Parra, M. I., Rodríguez-Ibarra, L.E., Campillo-Martínez, F., Velasco-Blanco, G., García-Aguilar, N., Álvarez-Lajonchère, L.S., Voltolina, D. 2010. Efecto de la densidad de siembra sobre el crecimiento y supervivencia larval del pargo flamenco *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869). *Revista Biología Marina y Oceanográfica*, 45 (1): 141-146.
- Álvarez-Lajonchère, L., Pérez Sánchez, L., Hernández Molejón, O.G., Torres Gómez, E., 1996. Mass production of striped patao *Eugerres brasilianus* juveniles in Cuba. *Journal of World Aquaculture Society*. 27 (3), 347– 352.
- Álvarez-Lajonchère, L., Ibarra-Castro, L. y García-Aguilar, N. 2011. Reproducción controlada en El pargo flamenco: *Lutjanus guttatus*. Producción controlada de huevos larvas y juveniles (eds. Álvarez-Lajonchère y Puello-Cruz). Clave Editorial México. Pág. 25-58.
- A.O.A.C. 1984. Association of oficial Analytical Chemists. Official Methods of Analysis, 14th Ed. The Association: Arlington, VA, 1141pp.
- Aragão, C., Conceição, L.E.C., Martins, D., Rønnestad, I., Gomes, E., Dinis, M.T., 2004. A balanced dietary amino acid profile improves amino acid retention in post-larval Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture*, 233: 293–304.

- Bent, U., 1993. Methods for production of turbot fry based on copepods as food organisms. In: Carrillo, M., Dahle, L., Morales, J., Sorgeloos, P., Svennevig, N., Wyban, J. (Eds.), From Discovery to Commercialization, Oosteden. European Aquaculture Society Special Publication, vol. 19. European Aquaculture Society. Oostende, Belgium, p. 609.
- Benetti, D., Wilson E. 1996. Estado actual y perspectivas del cultivo de peces marinos en el ecuador. In: Silva A, Merino G (eds.), Acuicultura en Latinoamérica. IX Congreso Latinoamericano de Acuicultura. 2° Simposio Avances y Perspectivas de la acuicultura en Chile. Coquimbo, Chile, pp. 5-14.
- Bessonart, M., Izquierdo, M.S., Salhi, M., Hernández-Cruz, C.M., González, M.M., Fernández- Palacios, H. 1999. Effect of dietary arachidonic acid levels on growth and survival of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larvae. *Aquaculture*, 179: 265-275.
- Boza-Abarca, J., Calvo-Vargas, E., Solís-Ortiz, N., Komen J. 2008. Desove inducido y crecimiento larval del pargo manchado, *Lutjanus guttatus*, en la estación de biología marina Puntarenas, Costa Rica. *Ciencias. Marinas*. 34: 239-252.
- Brown, M. y Miller, K. 1992. The ascorbic acid content of eleven species of microalgae used in mariculture. *Journal of Applied Phycology*, 4:205-215.
- Cabrera, J.R., Cabrera, T.B., Millán, J.Q. 1998. Spawning induction of the mangrove snapper, *Lutjanus griseus* Linnaeus (Pisces: Lutjanidae), maturated in captivity. *Arquivos do Ciências do Mar*, 31(1-2): 57-63.
- Civera-Cerecedo, R., Álvarez-González, C.A. y Moyano-López, F.J. 2004. Nutrición y alimentación de larvas de peces marinos. *Avances en*

Nutrición Acuícola VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 16-19 Noviembre, 2004. Hermosillo, Sonora, México.

Conceição, L.E.C., Van der Meeren, T., Verreth, J.A.J., Evjen, M. S., Houlihan, D. F. & Fyhn, H. J. 1997. Amino acid metabolism and protein turnover in larval turbot (*Scophthalmus maximus*) fed natural zooplankton or *Artemia*. *Marine Biology*, 129: 255–265.

Conceição, L. E. C., Ozório, R, Suurd, E.A., Verreth, J. A. J., 1998. Amino acid profiles and amino acid utilization in larval African catfish (*Clarias gariepinus*): effects of ontogeny and temperature. *Fish Physiology and Biochemistry*, 19:43-57.

Cowey, C.B., Sargent, J.R., 1972. Fish nutrition. *Adv. Marine. Biology*, 10, 383–492.

Cowey, C.B., Sargent, J.R. 1979. In: “Fish Physiology” (W. S. Hoar, D. J. Randall, and J. R. Brett, eds.), Vol. 8, pp. 1. Academic Press, New York.

Dabrowski, K., 1986. Ontogenic aspects of nutritional requirements in fish. *Composition Biochemistry. Physiology*, 85A, 639–655.

Dabrowski, K. y Rusiecki, M. 1983. Content of total and free amino acid in zooplanktonic food of fish larvae. *Aquaculture*, 30: 31-42.

Delbare D., Dhert P., Lavens P. 1996. In: Lavens P, Sorgeloos P. (eds.). *Manual on the production and use of live food for aquaculture*. FAO Fisheries Technical Paper. 361: 252-282.

- Detwyler, R., Houde, E. D. 1970. Food selection by laboratoryreared larvae of the scaled sardine *Harengula pensacolae* (Pisces, Clupeoidae) and the bay anchovy *Anehoa mitchilli* (Pisces, Engraulidae). *Marine Biology*, 7:214-222.
- Di Capua I. &MazzocchiM.G. 2004. Population structure of the copepods *Centropages typicus* and *Temora stylifera* in diferent environmental conditions. *ICES Journal of Marine Science*, 61:632-644.
- Doi, M., T. Singhagraiwan, S. Singhagraiwan, and A. Ohno. 1994. An investigation of copepods being applied as initial food organisms for red snapper larvae. *Thai Marine Fisheries Research Bulletin*, 5:21–26.
- Doi, M., Toledo, J.D., Golez, M.S.N., Santos, M.d.I., Ohno, A., 1997. Preliminary investigation of feeding performance of larvae of early red-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, reared with mixed zooplankton. *Hydrobiology*, 358:259–263.
- Dumas, S., Rosles-Velasquez, M., Contreras-Olguin, M., Hernández-Ceballos, D., Silverberg, N. 2004. Gonadal maturation in captivity and hormone-induced spawning of the Pacific red snapper *Lutjanus peru*. *Aquaculture*, 234: 615-623.
- Ebling, M. 1986. The Dumas method for nitrogen in feeds. *Journal of the Association of Official Analytical Chemist*, 51: 766-770.
- Emata, A., Eullaran, B., Bagarinao, T. 1994. Induced spawning and early life description of the mangrove red snapper, *Lutjanus argentimaculatus*. *Aquaculture*, 121: 381-287.

- Emata, A., Damaso, J., Eullaran, B. 1999. Growth, maturity and induced spawning of mangrove red snapper, *Lutjanus argentimaculatus* broodstock reared in concrete tanks. Israeli Journal of Aquaculture/Bamidgeh, 51: 58-64.
- Estévez, A., Kanazawa, A., 1996. Fatty acid composition of neural tissues of normal pigmented juveniles of Japanese flounder using rotifer and *Artemia* enriched in n-3 HUFA. Fish Science, 62: 88–93.
- Estévez, A., Ishikawa, M. y Kanazawa, A. 1997. Effects of arachidonic acid, pigmentation and fatty acid composition of japanese flounder, *Paralichthys olivaceous* (Temminck and Schlegel). Aquaculture Research, 28: 279-289.
- Evjemo, J.O., Olsen, Y., 1997. Lipid and fatty acid content in cultivated live feed organisms compared to marine copepods. Hydrobiology, 358, 159–162.
- Evjemo, J. O., K. I. Reitan, & Olsen. 2004. Copepods as live food organisms in the rearing of Atlantic halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.) with special emphasis on nutritional value. Aquaculture, 227(1–4):191–211.
- FAO, 2010. El estado mundial de la acuicultura y pesca. Roma. Italia. 219 p.
- Faulk, C.K., Holt, G.J., 2005. Advances in rearing cobia *Rachycentron canadum* larvae in recirculating aquaculture systems: live prey enrichment and greenwater culture. Aquaculture, 249: 231–243.
- Flores-Rojas, A.A. 2009. Evaluación del crecimiento en larvas de pargo flamenco *Lutjanus guttatus* (Steindachner 1869) empleando como primer alimento al copépodo *Pseudodiaptomus euryhalinus* (Jonson, 1939) y un estudio de la factibilidad financiera del uso del mismo. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias del Mar. UAS. Mazatlán, Sinaloa, México. 68 pp.

- Flores-Santana, R.E. 2008. Variación en el contenido de ácidos grasos del copépodo calanoide *Pseudodiaptomus euryhalinus* (Johnson, 1939) alimentado con las microalgas *Chaetoceros calcitrans* e *Isochrysis galbana*. Tesis de maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. 52 pp.
- Fukusho, K., Arakawa, T. y Watanabe, T. 1980. Food value of a copepod, *Tigriopus japonicus*, cultured with yeast for larvae and juveniles of mud dab *Limanda yokohamae*. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 46(4): 499-503.
- Fyhn, H.J., 1989. First feeding of marine fish larvae: are free amino acids the source of energy? Aquaculture, 80: 111–120.
- Fyhn, H.J. y Serigstad, B., 1987. Free amino acids as energy substrate in developing eggs and larvae of the cod *Gadus morhua*. Marine Biology, 96: 335-341.
- Fyhn, H.J. y Govoni, J.J. 1995. Endogenous nutrient mobilization during egg and larval development in two marine fishes- Atlantic menhaden and spot. ICES Marine Science Symposium, 201: 64-69.
- Fyhn, H.J., Finn, R., Helland, S., Rønnestad, I. & Lomslund, E.R. 1993. Nutritional value of phyto- and zooplankton as live food for marine fish larvae. In: Fish Farming Technology (ed. by H. Reinertsen, L.A. Dahle, L. Jørgensen & K. Tvinnerheim), pp. 121–126. Balkema, Rotterdam, the Netherlands.
- García-Ortega, A., Abdo, I., Duncan, N., Rodríguez, E., Velasco, G., González, B., Puello, A. & Martínez, I. 2005. Larval rearing of rose spotted snapper

Lutjanus guttatus under experimental conditions. En: Hendry CI, G van Stappen, M Wille & P Sorgeloos (eds). Larvi'05. Fish and shellfish larviculture symposium, Ghent, European Aquaculture Society, Oostende, Belgium. Special Publication 36: 591

García-Ortega, A. 2009. Nutrition and feeding research in the spotted rose snapper (*Lutjanus guttatus*) and bullseye puffer (*Sphoeroides annulatus*), new species for marine aquaculture. *Fish Physiology and Biochemistry*. 35(1): 69-80.

Gasparin, R.S.J., y Duray, M.N. 2001. Effects of DHA-enriched live food on growth, survival and incidence of opercular deformities in milkfish (*Chanos chanos*). *Aquaculture*, 193:49-63.

Halver, J. (1989). In "Fish Nutrition," 2nd ed. (J. E. Halver, ed.), p. 31 Academic Press, New York.

Hamre, K., Moren, M., Solbakken, J., Opstad, I., Pittman, K. 2005. The impact of nutrition on metamorphosis in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquaculture*, 250: 555-565

Helland, S., Terjesen, B. F., Berg, L. 2003. Free amino acid and protein content in the planktonic copepod *Temora longicornis* compared to *Artemia franciscana*. *Aquaculture*, 215: 213-228.

Hernández Molejón, O.G., Alvarez-Lajonchère, L., 2003. Culture experiments with *Oithona aculeate* Faran, 1913 (Copepod: Cyclopedia), and its advantages as food for marine fish larvae. *Aquaculture*, 219: 471–483.

Holt, G.J. 2003. Research on culturing the early life history stages of marine ornamental species. In: Cato, J.C., Brown, C.L. (Eds.), *Marine Ornamental Species: Collection, Culture and Conservation*. Iowa State Press, Ames, IO, pp. 251–254.

- Hopp, U., Maier, G., Bleher, R. 1997. Reproduction and adult longevity of five species of planktonic cyclopoid copepods reared on different diets: a comparative study. *Freshwater Biology*, 38: 289–300.
- Hunter, J. R. 1981. Feeding, ecology and predation on marine fish larvae. *Marine fish larvae: Morphology, ecology and relation to fisheries*. Sea Grant Program, Seattle. Pags. 60-77 en R. Lasker.
- Hussain, N. A. y M. Higuchi. 1980. Larval rearing and development of the brown spotted grouper, *Epinephelus tauvina* Forska^ol. *Aquaculture*, 19(4):339–350.
- Ibarra-Castro, L. 2005. Desarrollo Gonadal e Inducción a la Maduración Final de *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869), Silvestres y de Cautiverio por Implante e Inyección de la Hormona LHRHa. M.Sc. diss., Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Mazatlán, Mexico. 160 pp.
- Ishizaki, Y., Takeuchi, T., Watanabe, T., Arimoto, M., and Shimizu, K. (1998). *Fishery Science*, 64, 295.
- Izquierdo, M.S. 1996. Essential fatty acid requirements of cultured marine fish larvae. *Aquaculture Nutrition*, 2:183-191.
- Jobling, M. 1994. *Fish Bioenergetics*. Chapman and Hall. London. 309 pp.
- Johnson, M. W. 1939. *Pseudodiaptomus (pseudodiaptallos) euryhalinus* a new subgenus and species of copepoda, with preliminary notes on its ecology. *Transactions of the American Microscopical Society*, 58(3): 349-355.
- Kahan, D., 1980. Mass cultivation of food organisms in hatcheries-problems and proposed solutions. *Symposium on Coastal Aquaculture*, Cochin, India.

- Kahan, D., Uhlig, G., Schwenzer, D., Horowitz, D. 1982. A simple method for culturing harpacticoid copepods and offering them to fish larvae. *Aquaculture*, 26: 303–310.
- Kanazawa, A. 1985. Essential fatty acid and lipid requirement of fish. In: Cowey, C.B., Mackie, A.M., Bell, J.G. (Eds.), *Nutrition and Feeding in Fish*. Academic Press, London, pp. 281– 298.
- Kitajima, C. 1973. Experimental trials on mass culture. 20(1): 54-60.
- Kleppel, G.S. 1993. On the diets of calanoid copepods. *Review Marine ecology Program Service*, 199: 183-195.
- Kraul, S. 1993. Larviculture of the Mahimahi, *Coryphaena hippurus* in Hawaii, USA. *Journal of World Aquaculture Society*, 24: 410-421.
- Kraul, S., Nelson, A., Brittain, K., Ako, H., Ogasawara, A. 1992. Evaluation of live feeds for larval and postlarval mahimahi *Coryphaena hippurus*. *Journal of World Aquaculture Society*, 23: 299–307.
- Kraul, S., K. Brittain, R. Cantrell, T. Nagao, H. Ako, A. Ogasawara, and H. Kitagawa. 1993. Nutritional factors affecting stress resistance in the larval mahimahi, *Coryphaena hippurus*. *Journal of World Aquaculture Society*, 24(2):186–193.
- Lavens, P. y sorgeloos. 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture. Patrick Lavens and Patrick Sorgeloos (Eds.) Published by: Food and Agriculture Organization of the United Nations. 375pp.
- Lazo, J. 2000. Conocimiento actual y nuevas perspectivas en el desarrollo de dietas para larvas de peces marinos. In: Cruz -Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R., (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium*

Internacional de Nutrición Acuícola. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán, México.

Lee, S. M., Lee, J. H., Kim, K. D. 2003. Effect of dietary essential fatty acids on growth, body composition and blood chemistry of juvenile starry flound (*Platichthys stellatus*). *Aquaculture*, 225: 269–281.

Leu, M.Y., Chen, I.H., Fang, L.S. 2003. Natural spawning and rearing of mangrove red snapper, *Lutjanus argentimaculatus*, larvae in captivity. *Israeli Journal of Aquaculture./Bamidgeh* 55: 22-30.

Luizi, F.S., Gara, B., Shields, R.J., Bromage, N.R. 1999. Further description of the development of the digestive organs in Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* larvae, with notes on differential absorption of copepod and *Artemia* prey. *Aquaculture*, 176 (1-2): 101-116.

May, R. 1970. Feeding larval marine fishes in the laboratory: a review. *California Marine Research Community CalCOFI Rep*, 14: 76-83.

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.

Morehead, D.T., Battaglione, S.C., Metillo, E.B., Bransden, M.P., Dunstan, G.A., 2005. Copepods as a live feed for striped trumpeter *Latris lineata* larvae. In: Lee, C.-S., O'Bryen, P.J., Marcus, N.H. (Eds.), *Copepods in Aquaculture*. Blackwell Scientific Publications Ltd, Melbourne, pp. 195–208.

Nanton, D.A., Castell, J.D., 1998. The effects of dietary fatty acids on the fatty acid composition of the harpacticoid copepod, *Tisbe* sp., for use as a live food for marine fish larvae. *Aquaculture*, 163, 251–261.

- New, M.B. 1986. Aquaculture diets of post-larval marine fish, with special reference to sea bass, sea bream, groupers and yellowtail: a review. *Kuwait Bulletin of Marine Science*, 7: 5-151.
- Norsker, N. H. y J. G. Støttrup. 1994. The importance of dietary HUFA's for fecundity and HUFA content in the harpacticoid, *Tisbe holothuriae* Humes. *Aquaculture*, 125, 155-166.
- Ogle, J. 1979. Adaptation of a brown water culture techniques to the mass culture of the copepod *Acartia tonsa*. *Gulf Research Report*, 6: 291-292.
- Ogle, J. and Lotz, J. 2000. Culture of red snapper. *Global Aquaculture Advocate*. 3: 23-26.
- Ogle, J.t. and Lotz, J.M. 2006. Characterization of an experimental indoor larval production system for the red snapper. *North America Journal Of Aquaculture*, 68: 86-91.
- Ohno, A., Okamura, Y., 1988. Propagation of the calanoid copepod, *Acartia tsuensis* in outdoor tanks. *Aquaculture*, 70: 39-51.
- Olivotto, I., Cardinali, M., Barbaresi, L., Maradonna, F., Carnevali, O. 2003. Coral reef fish breeding: the secrets of each species. *Aquaculture*, 224: 69–78.
- Olivotto, I., Zenobi, A., Rollo, A., Migliarini, B., Avella, M., Carnevali, O. 2005. Breeding, rearing and feeding studies in the cleaner goby *Gobiosoma evelynae*. *Aquaculture*, 250: 175–182.
- Olivotto, I., Rollo, A., Sulpicio, R., Avella, M., Tosti, L., Carnevali, O. 2006. Breeding and rearing the Sunrise Dottyback *Pseudochromis flavivertex*:

the importance of live prey enrichment during larval development. *Aquaculture*, 255, 480–487.

Olivotto I., Buttino I., Borroni M., Piccinetti C.C., Malzone M.G. & Carnevali O. 2008. The use of the Mediterranean calanoid copepod *Centropages typicus* in Yellowtail clown fish (*Amphiprion clarkii*) larviculture. *Aquaculture*, 284: 211-216.

Payne, M. F. and Rippingale, R. J. 2000. Rearing West Australian seahorse, *Hippocampus subelongatus*, juveniles on copepod nauplii and enriched *Artemia*. *Aquaculture*, 188(3-4):353–361.

Payne, M.F., Rippingale, R.J. 2000. Evaluation of diets for culture of the calanoid copepod *Gladioferens imparipes*. *Aquaculture*, 187: 85–96.

Payne, M.F. & Rippingale, R.J. 2001. Intensive cultivation of the copepod calanoid *Gladioferens imparipes*. *Aquaculture*. 201: 329-342.

Payne, M.F., Rippingale, R.J., Cleary, J.J. 2001. Culture copepods as food for westaustralian dhufish (*Glaucosoma hebraicum*) and pink snapper (*Pagrus auratus*) larvae. *Aquaculture*, 194: 137-150 pp.

Pike, L.R. and Brown, L.M. 1975. Nutrition : An Integrated Approach. John Wiley & Sons, New York (2 Ed.). 1082 pp.

Puello-Cruz, A.C., González-Rodríguez, B., Gómez-Gil, B., Bolán, M.C., Montoya, R.L., Gómez, S. 2002. Production of a tropical copepod *Tisbe* sp. With low levels of bacteria and free of WSSV. VI SINA, Cancún, Mexico.

Puello-Cruz, A. C., González, R. B., Velasco, G., Martínez, R. I., Abdo, I., Duncan, N., García-Ortega, A. 2004. Utilization of tropical copepod (*Tisbe monozota*) as live food in larviculture. *Aquaculture*, Hawaii, USA Pág. 484.

Puello-cruz, A.C., Yen-Ortega, E., 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 conditions. Pp. 13-24, in : M.E. Hendrickx (ed.) Contribuciones al Estudio de los Crustáceos del Pacífico Este 4 (1). Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM. 158pp.

Puello, A., González Rodríguez, B. y García-Ortega, A. 2008. Investigación en Producción y Uso de Copépodos en Larvicultura. 90-107 pp. Avances en Nutrición Acuícola IX. IX Simposio Internacional de Nutrición Acuícola. 24-27 Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México.

Rajkumar, M. y Kumaraguru vasagam, K.P. 2006. Suitability of the copepod, *Acartia clausi* as a live feed for seabass larvae (*Lates calcifer* Bloch) : Compared to traditional live-food organisms with special emphasis on the nutritional value. Aquaculture, 261: 649-658.

Reitan, K.I., Rainuzzo, J.R. & Olsen, Y. 1994. Influence of lipid composition of live feed on growth, survival and pigmentation of turbot larvae. Aquaculture International, 2:33-48.

Rodríguez, C., Pérez, J.A., Izquierdo, M.S., Mora, L., Lorenzo, A. y Fernández Palacios, H. 1994. Essential fatty acid requirements of larval gilthead sea bream, *Sparus aurata* (L.). Aquaculture Fisheries Management, 25(3): 295-304.

- Rønnestad, I., Fyhn, H.J., Gravningen, 1992. The importance of free amino acids to the energy metabolism of eggs and larvae of turbot *Scophthalmus maximus*. *Marine Biology*, 114, 517–525.
- Rønnestad, I., Thorsen, A., Finn, R.N., 1999. Fish larval nutrition: a review of recent advances in the roles of amino acids. *Aquaculture*. 177, 201-216.
- Roman, M.R. 1984. Utilization of detritus by the copepod *Acartia tonsa*. *Limnology and Oceanography*, 29: 949-959.
- Rosas, J., Millan, J. y Cabrera, T. 1997. Mix culture and chemical composition of the Rotifer *Brachionus plicatilis* and the copepodite *Oithona ovalis* rearing in the microalgae *Tetraselmis chuii*. *Island Aquaculture and Tropical Aquaculture* : 265-266. Les trois Islets, Martinique.
- Salhi, M., Kolkovski, S., Izquierdo, M.S., Tandler, A. 1995. Inclusion of lecithin and polar or neutral lipids high in n-3 HUFA in microdiets for gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. In: Lavens, P., Jaspers, E., Roelants, I. (Eds.), *Proceedings of the Fish and Shellfish Larviculture Symposium Larvi'95*. European Aquaculture Society, Special Publication, vol. 24. European Aquaculture Society, Gent, Belgium, pp. 184–187.
- Sargent, J. R., Henderson, R. J., and Tocher, D. R. 1989. In "Fish Nutrition," 2nd ed. (J. E. Halver, ed.), p. 153. Academic Press, New York.
- 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: 117–128.
- Sargent, J.R., McEvoy, L.A., Estevez, A., Bell, J.G., Bell, M.V., Henderson, R.J., Tocher, D.R. 1999. Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. *Aquaculture*, 179: 217–229.

- Schipp, G. 2006. The Use of Calanoide Copepods in Semi-Intensive, Tropical Marine Fish Larviculture. En: Editores: L. Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Salazar, Martha g. Nieto López, David A. Villarreal Cavazos, Ana C. Puello Cruz y Armando García Ortega. Avances en Nutrición Acuícola VIII. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 15-17 Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México. ISBN 970-694-333-5.
- Schipp, G., Bosmans, J. & Marshall, A.1999. A method for hatchery culture of tropical calanoid copepods, *Acartia spp.* Aquaculture, 174: 81–88.
- Seijo, C. y Martinez-Cordero, F. j. 2006. Análisis prospectivo de política para la acuicultura y la pesca. FAO. SAGARPA. 78 pp.
- Segner, H., Storch, V., Reinecke, M., Kloas, W., Hanke, W., 1994. The development of functional organ systems in turbot *Scophthalmus maximus* Limnology and Marine Biology, 119: 471–486.
- Shields, R.J. 2001. Larviculture or marine finfish in Europe. Aquaculture, 2000: 55-88.
- Shields, R. J., Bell, J. G., Luizi, F. S., Gara, B., Bromage, N. R. and Sargent, J. R. 1999. Natural copepods are superior to enriched *Artemia* nauplii as feed for halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus*) in terms of survival, pigmentation, and retinal morphology: relation to dietary essential fatty acids. Journal of Nutrition, 129: 1186–1194.
- Sierra-De la rosa, J. F. 2007. Inducción hormonal (HCG) al desove y larvicultura del pargo lunarejo *Lutjanus guttatus* como alternativa de diversificación para la maricultura en el pacifico colombiano. Revista de Ingeniería en producción acuícola, 2: 47- 60.

- Singhagraiwan, T. and Doi M. 1993. Induced spawning and larval rearing of the red snapper, *lutjanus argentimaculatus*, at the eastern Marine Fisheries Development Center. Thai Marine Fisheries Research Bulletin, 4: 45-57.
- Støttrup, J. 2000. The elusive copepods: their production & suitability in marine aquaculture. Aquaculture Research, 31: 703– 711.
- Støttrup, J.G. (2006) Review on the status and progress in rearing copepods for marine larviculture. Advantages and disadvantages. Among Calanoid, Harpacticoid and Cyclopoid copepods. In: Vances en Nutrición Acuícola VIII. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola, ISBN 970-694-333-5, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México, 15–17 Noviembre. (ed. by Suárez L.E. Cruz, D.R. Marie, M.T. Salazar, López M.G. Nieto, Cavadoz D.A. Villarreal, Cruz A.C. Puello & A.G. Ortega.), pp. 62–83. Monterrey, México.
- Støttrup, J. G. and Norsker, N. H. 1997. Production and use of copepods in marine fish larvicultura. Aquaculture, 155: 231-247.
- Støttrup, J.G., Richardson, K., Kirkegaard, E., Pihl, N.J., 1986. The cultivation of *Acartia tonsa* Dana for use as a live food source for marine fish larvae. Aquaculture, 52: 87–96.
- Sun, B., Fleeger, J.W., 1995. Sustained mass culture of *Amphiascooides atopus* a marine harpacticoid copepod in a recirculating system. Aquaculture, 136: 313–321.
- Toledo, J., Golez, S., Doi, M. & Ohno, A. 1997. Food selection of early grouper, *Epinephelus coioides*, larvae reared by the semi-intensive method. Suisanzoshoku 45; 327–337.

- Toledo, J., Golez, M., Doi, M., Ohno, A. 1999. Use of copepod nauplii during early feeding stage of grouper *Epinephelus coioides*. *Fisheries Science*, 65: 390-397.
- Tucker, JW Jr. 1998. *Marine Fish Culture*. 1st ed. Kluwer Academic, Netherlands, 750 pp.
- Tucker, J. and Jory, D. 1991. Marine fish culture in the Caribbean region. *World Aquaculture*, 22: 10-25.
- Van der Meeren, T. 2003. Analysis of biochemical components in copepods for evaluation of feed quality for juvenile production of marine fish. *Prosjektrapport nr 5. Havforsknings instituttet*. 39 pp.
- Velázquez. M., Zamora, S., Martínez, F.J. 2006. Effect of dietary energy content gilthead sea bream (*Sparus aurata*) feeding behavior and nutritional use of the diet. *Aquaculture Nutrition*, 12: 127-133.
- Vetter, R.D., Houdson, R.E. y Arnold, C. 1983. Energy metabolism in a rapidly developing marinefish eggs the red drum *Sciaenops ocellata*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 40:627-634.
- Volkman, J., Jeffrey, S., Nichols, P., Rogers, G. and Garland, C. 1989. Fatty acid and lipids classes of ten species of microalgae used in mariculture. *Journal of Marine Biology and Ecology*, 128:219-240.

- Yúfera, M. y Pascual, F. 1984. La producción de organismos zooplanctónicos para la alimentación larvaria en acuicultura marina. Inf. T&cn. Instituto de Investigaciones Pesqueras. 119: 3- 17.
- Yúfera, M., Sarasquete, M.C., Fernández-Díaz, C., 1996. Testing protein-walled microcapsules for the rearing of firstfeeding gilthead sea bream (*Sparus aurata*) larvae. Marine Freshwater Research. 47: 211-216.
- Walford, J., Lam, T.J., 1993. Development of digestive tract and proteolytic enzyme activity in seabass *Lates calcarifer*. Aquaculture, 109: 187–205.
- Watanabe, T., 1982. Lipid nutrition in fish. Comp. Biochemiatry and Physiology. 73B, 3– 15.
- Watanabe, T. 1988. Nutrition and growth. In: Intensive Fish Farming. Shepherd and Bromage (ed.), pp. 154-195.
- Watanabe, T., Kitajima, C. and Fujita, S. 1983. Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: a review. Aquaculture, 34(1–2): 115–143.
- Watanabe, T., Izquierdo, M.S., Taketichi, T., Satob, S. and Kitajima, C. 1989. Comparison between eicosapentanoic and docosahexaenoic acids in terms of essential fatty acid efficacy in larval red sea bream. Nippon Suisan Gakkaishi 55:1635-1640.
- Watanabe, T., 1993. Importance of docosahexaenoic acid in marine larval fish. Aquaculture Society, 24, 152– 161.
- Watanabe, T. y V. Kiron. 1994. Prospects in larval fish dietetics. Aquaculture, 124:223-251.

Watanabe, W., Ellis, E., Ellis, S., Chaves, J., Manfredi, C. 1998. Artificial propagation of mutton snapper *Lutjanus analis*, a new candidate marine fish species for aquaculture. *Journal of World Aquaculture Society*, 29: 176-187.

Wilcox, A. J., Tracy, L. P. y Marcus, H. N. 2006. Improving live feeds: effect of a mixed diet of copepod nauplii (*Acartia tonsa*) and rotifers on the survival and growth of first-feeding of the southern flounder, *Paralichthys lethostigma*. *Journal of world aquaculture society*, 37: 113-120.

Wilson, R. P. 1989. In "Fish Nutrition," 2nd ed (J. E. Halver, ed.), p. 111. Academic Press, San Diego.

Zheng, F., Takeuchi, T., Yoseda, K., Kobayashi, M., Hirokawa, J., and Watanabe, T. (1996). *Nippon Suisan Gakkaishi*, 62, 669.