Universidad Autónoma de Sinaloa

Colegio en Ciencias Agropecuarias

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

Doctorado en Ciencias Agropecuarias

TESIS:

"Efecto de la composición proximal, clorofilas, y carotenoides totales de cuatro especies de microalgas sobre la calidad nutricional de juveniles de Artemia franciscana"

Que para obtener el grado de Doctora en Ciencias Agropecuarias

PRESENTA: M. en C. MARTHA IRENE MILLÁN ALMARAZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. MARIO NIEVES SOTO

CO-DIRECTORA DE TESIS: DRA. DIANA JUDITH LÓPEZ PERAZA

ASESORES: DR. JOSÉ ÁNGEL LÓPEZ VALENZUELA, DRA. MARTHA ELISA RIVAS VEGA, DR. ANSELMO MIRANDA BAEZA

Culiacán, Sinaloa, México; a 11 de noviembre de 2024

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

Dirección General de Bibliotecas
Ciudad Universitaria
Av. de las Américas y Blvd. Universitarios
C. P. 80010 Culiacán, Sinaloa, México.
Tel. (667) 713 78 32 y 712 50 57
dgbuas@uas.edu.mx

UAS-Dirección General de Bibliotecas

Repositorio Institucional Buelna

Restricciones de uso

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de esta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando al o los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial Compartir Igual, 4.0 Internacional

ESTA TESIS FUE REALIZADA POR **MARTHA IRENE MILLÁN ALMARAZ**, BAJO LA DIRECCIÓN DEL CONSEJO PARTICULAR QUE SE INDICA, Y HA SIDO APROBADA POR EL MISMO, COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

CONSEJO PARTICULAR

DIRECTOR(A) _____
DR. MARIO NIEVES SOTO

CO-DIRECTOR(A) _____
DRA. DIANA JUDITH LÓPEZ PERAZA

ASESOR(A) _____
DR. JOSÉ ÁNGEL LÓPEZ VALENZUELA

ASESOR(A) _____
DRA. MARTHA ELISA RIVAS VEGA

ASESOR(A) _____
DR. ANSELMO MIRANDA BAEZA

CULIACÁN, SINALOA, NOVIEMBRE DE 2024

DEDICATORIA

A mi esposo y a mi hija…

A mi mamá y a mi papá…

A mi hermano…

A mi tití…

¡Los amo! ♥

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por permitirme terminar este proyecto que empecé hace años.

A la Universidad Autónoma de Sinaloa, por formar parte de tan reconocida institución.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por darme la oportunidad de entrar a su posgrado.

A la Facultad de Ciencias del Mar, por permitirme hacer uso de sus instalaciones para la realización de este proyecto.

Al Laboratorio de Ecofisiolgía de Organismos Acuáticos y Cultivos de Apoyo para la Acuicultura (Laboratorio de Microalgas), por el lugar de trabajo que me asignaron, así como los equipos y reactivos que me proporcionaron para llevar a cabo los experimentos y análisis de muestras.

Al Conahcyt, por el apoyo económico que me otorgó durante cuatro años a través de la beca.

A mi director y codirectora de tesis, el Dr. Mario Nieves Soto y la Dra. Diana Judith López Peraza, por aceptarme como su estudiante y por sus sugerencias para el desarrollo y terminación de esta tesis.

A los miembros de mi comité tutorial, al Dr. José Ángel López Valenzuela, la Dra. Martha Elisa Rivas Vega y el Dr. Anselmo Miranda Baeza, por sus valiosas observaciones en cada evaluación semestral, las cuales hicieron de este un mejor trabajo.

Al Dr. Pablo Piña Valdez y a la M. en C. María Alejandra Medina Jasso, por resolver dudas sobre algunos análisis y por sus consejos para mejorar ciertas técnicas.

Al personal administrativo de ambas facultades: Gaby, Nerika, Alejandro, por ayudarme con los trámites necesarios para mi ingreso y titulación. A los compañeros de laboratorio y practicantes, que de alguna u otra manera ayudaron a la realización de este trabajo.

A mi familia, por apoyarme en todo momento y darme ánimos para terminar la tesis.

CONTENIDO

PÁGINA

ÍNDICE DE CUADROS…..……. vii

ÍNDICE DE FIGURAS…..……... x

RESUMEN…..……..... xi

ABSTRACT…..……..... xii

1. INTRODUCCIÓN……. 1

2. REVISIÓN DE LITERATURA…… 5

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA……. 11

4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN…… 11

5. HIPÓTESIS……... 12

6. OBJETIVOS……. 12

6.1. Objetivo general……. 12

6.2. Objetivos específicos…… 12

7. ORGANIZACIÓN DEL TRABAJO…… 13

8. CAPÍTULO 1: CURVA DE CRECIMIENTO Y COMPOSICIÓN PROXIMAL DE LAS MICROALGAS…… 14

8.1. Objetivos particulares del capítulo…… 14

8.2. Materiales y métodos……. 14

8.2.1. Cultivo de las microalgas……. 14

8.2.2. Determinación de peso seco y peso orgánico…… 16

8.2.3. Composición proximal…….. 16

8.2.4. Análisis estadísticos…….. 17

8.3. Resultados……... 17

8.3.1. Densidad celular……. 17

8.3.2. Tasa de división celular diaria acumulada (∑μ)…….. 18

8.3.3. pH…… 19

8.3.4. Peso seco y peso orgánico…….. 20

8.3.5. Composición proximal…….. 23

8.3.6. Comparación de las variables durante la fase de crecimiento exponencial de los cultivos……. 30

8.4. Discusión…….. 34

8.4.1. Curva de crecimiento……. 34

8.4.2. Densidad celular……. 34

8.4.3. Tasa de división celular diaria acumulada (∑μ)……. 35

8.4.4. pH…… 35

8.4.5. Peso seco y peso orgánico……. 36

8.4.6. Composición proximal……. 37

8.4.6.1. Proteínas…… 37

8.4.6.2. Carbohidratos…….. 38

8.4.6.3. Lípidos…… 39

8.4.6.4. Porcentajes de la composición proximal……. 40

8.5. Conclusiones…….. 40

9. CAPÍTULO 2: TASA DE INGESTIÓN Y CONTENIDO DE PROTEÍNAS Y LÍPIDOS DE LOS JUVENILES DE *A. franciscana*…….. 41

9.1. Objetivos particulares del capítulo……... 41

9.2. Materiales y métodos. …….. 41

9.2.1. Cultivo de *Artemia franciscana*……... 41

9.2.2. Tasa de ingestión (TI) de los juveniles de *A. franciscana* 43

9.2.3. Proteínas y lípidos en juveniles de *A. franciscana*……. 45

9.2.4. Dieta isolipídica……. 45

9.2.5. Análisis estadísticos…… 45

9.3. Resultados……. 46

9.3.1. Tasa de ingestión (TI) de los juveniles de *A. franciscana* 46

9.3.2. Concentración de lípidos y proteínas de los juveniles de *A. franciscana*…….. 48

9.3.3. Equivalencia lipídica entre las cuatro especies de microalgas…… 50

9.4. Discusión…….. 51

9.4.1. *Artemia franciscana*…… 51

9.4.2. Tasa de ingestión de los juveniles de *A. franciscana*…... 52

9.4.3. Composición proximal de *Artemia*……. 53

9.5. Conclusiones…… 54

10. CAPÍTULO 3: EFECTO DE LA DIETA ISOLIPÍDICA SOBRE EL VALOR NUTRICIONAL DE JUVENILES DE *A. franciscana*……... 55

10.1. Objetivo particular del capítulo…….. 55

10.2. Materiales y métodos…… 55

10.2.1. Diseño del experimento…… 55

10.2.2. Análisis de pesos seco, orgánico y composición proximal…… 56

10.2.3. Análisis de clorofilas y carotenoides totales…….. 56

10.2.4. Análisis estadísticos……. 57

10.3. Resultados…….. 58

10.3.1. Densidad celular de las microalgas…….. 58

10.3.2. Peso seco (PS) y peso orgánico (PO) de las cuatro especies de microalgas……. 58

10.3.3. Composición proximal de las microalgas…….. 60

10.3.4. Clorofilas *a* y *b* y carotenoides totales en microalgas… 62

10.3.5. Longitud y supervivencia de *Artemia franciscana*……. 65

10.3.6. Peso seco y peso orgánico de los juveniles de *A. franciscana*…….. 65

10.3.7. Composición proximal de los juveniles de *A. franciscana*…….. 66

10.3.8. Porcentaje de la composición proximal con base al peso seco de los juveniles de *A. franciscana*……..... 67

10.3.9. Clorofilas *a* y *b* y carotenoides totales en los juveniles de *A. franciscana*…… 69

10.4. Discusión…….. 71

10.4.1. Composición proximal en las microalgas……. 71

10.4.2. Clorofila *a* en microalgas……... 73

10.4.3. Clorofila *b* en microalgas……... 75

10.4.4. Carotenoides totales en microalgas……... 75

10.4.5. Composición proximal en los juveniles de *A. franciscana* 76

10.4.6. Carotenoides totales y clorofilas en los juveniles de *A. franciscana*…….. 78

10.4.7. Inclusión de carotenoides sobre la fisiología de los organismos acuáticos…….. 79

10.5. Conclusiones…… 81

11. RECOMENDACIONES……. 82

12. LITERATURA CITADA……...……. 82

13. ANEXOS……. 105

13.1. Effect of light and feed density on ingestion rate, protein and lipid content of *Artemia franciscana* juveniles…… 105

13.2. Effect of four microalgal diets on the proximal composition, chlorophylls, and total carotenoids of *Artemia franciscana*…… 113

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Título	Página
1	**Peso seco en µg·mL^{-1} y en pg·cel^{-1} de las microalgas *T. weissflogii* (TH-W-1), *C. muelleri* (CH-M-1), *T. suecica* (TE-S-1) y *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1) cultivadas con el medio f. Los resultados son valores promedio ± E.S. (n = 4)…….....**	**21**
2	**Peso orgánico en µg·mL^{-1}, pg·cel^{-1} y en mg·g^{-1} de PS de las microalgas *T. weissflogii* (TH-W-1), *C. muelleri* (CH-M-1), *T. suecica* (TE-S-1) y *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1) cultivadas con el medio f. Los resultados son valores promedio ± E.S. (n = 4)……**	**23**
3	**Proteínas, carbohidratos y lípidos en µg·mL^{-1} de las microalgas *T. weissflogii* (TH-W-1), *C. muelleri* (CH-M-1), *T. suecica* (TE-S-1) y *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1) cultivadas con el medio f. Los resultados son valores promedio ± E.S. (n = 4)……**	**25**
4	**Proteínas, carbohidratos y lípidos en pg·cel^{-1} de las microalgas *T. weissflogii* (TH-W-1), *C. muelleri* (CH-M-1), *T. suecica* (TE-S-1) y *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1) cultivadas con el medio f. Los resultados son valores promedio ± E.S. (n = 4)……**	**26**
5	**Proteínas, carbohidratos y lípidos en mg·g^{-1} de PS de las microalgas *T. weissflogii* (TH-W-1), *C. muelleri* (CH-M-1), *T. suecica* (TE-S-1) y *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1) cultivadas con el medio f. Los resultados son valores promedio ± E.S. (n = 4)……**	**28**
6	**Proteínas, carbohidratos y lípidos en % con base a la composición orgánica total, de las microalgas *T. weissflogii* (TH-W-1), *C. muelleri* (CH-M-1), *T. suecica* (TE-S-1) y *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1) cultivadas con el medio f. Los resultados son valores promedio ± E.S. (n = 4)……**	**30**
7	**∑µ, pH, PS en µg·mL^{-1} y en pg·cel^{-1}; PO en µg·mL^{-1}, pg·cel^{-1} y en mg·g^{-1} de PS de las microalgas *T. weissflogii* (TH-W-1), *C. muelleri* (CH-M-1), *T. suecica* (TE-S-1) y *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1) cultivadas durante su fase exponencial. Los resultados son valores promedio ± E.S. (n = 4)……..**	**31**

8 **Proteínas, carbohidratos y lípidos en µg·mL^{-1}, pg·cel^{-1}, mg·g^{-1} de PS y % con base a la composición orgánica total de las microalgas *T. weissflogii* (TH-W-1), *C. muelleri* (CH-M-1), *T. suecica* (TE-S-1) y *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1) cultivadas durante su fase exponencial. Los resultados son valores promedio ± E.S. (n = 4)……..... 33**

9 **Cuadro de alimentación para *A. franciscana* alimentada con la microalga *C. muelleri* (CH-M-1)…….. 42**

10 **Tasa de ingestión (cel·ind^{-1}·h^{-1}) de juveniles de *Artemia franciscana*, alimentados con tres densidades celulares de *C. muelleri* y expuestos a dos niveles de iluminación: con luz (CL) y sin luz (SL), después de 3 horas. Los resultados son valores promedio ± E.S. (n = 3)……..... 47**

11 **Tasa de ingestión (cel·ind^{-1}·h^{-1}) de juveniles de *Artemia franciscana*, alimentados con tres densidades celulares de *C. muelleri* y expuestos a dos niveles de iluminación: con luz (CL) y sin luz (SL), después de 6 horas. Los resultados son valores promedio ± E.S. (n = 3)……... 48**

12 **Proteínas y lípidos (µg·org^{-1}) de juveniles de *Artemia franciscana* alimentados con tres densidades celulares de *C. muelleri* y expuestos a dos niveles de iluminación: con luz (CL) y sin luz (SL), después de 6 horas. Los resultados son valores promedio ± E.S. (n = 3)……... 49**

13 **Contenido de lípidos en pg·cel^{-1} y equivalencia en cel·mL^{-1} de las microalgas *C. muelleri* (CH-M-1), *T. weissflogii* (TH-W-1), *T. suecica* (TE-S-1) y *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1)……. 50**

14 **Densidad celular de las microalgas *T. weissflogii* (TH-W-1), *C. muelleri* (CH-M-1), *T. suecica* (TE-S-1) y *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1) cultivadas durante su fase exponencial. Los resultados son valores promedio ± E.S. (n = 4)…….. 58**

15 **Peso seco en µg·mL^{-1} y pg·cel^{-1} de las microalgas *T. weissflogii* (TH-W-1), *C. muelleri* (CH-M-1), *T. suecica* (TE-S-1) y *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1) cultivadas durante su fase exponencial. Los resultados son valores promedio ± E.S. (n = 4)…… 59**

16 **Peso orgánico en µg·mL^{-1}, pg·cel^{-1} y mg·g^{-1} de PS de las microalgas *T. weissflogii* (TH-W-1), *C. muelleri* (CH-M-1), *T.**

suecica (TE-S-1) y *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1) cultivadas durante su fase exponencial. Los resultados son valores promedio ± E.S. (n = 4)…… 60

17 Proteínas, carbohidratos y lípidos en mg·g^{-1} de PS de las microalgas *T. weissflogii* (TH-W-1), *C. muelleri* (CH-M-1), *T. suecica* (TE-S-1) y *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1) cultivadas durante su fase exponencial. Los resultados son valores promedio ± E.S. (n = 4)…… 61

18 Proteínas, carbohidratos y lípidos en % con base a la composición orgánica total, de las microalgas *T. weissflogii* (TH-W-1), *C. muelleri* (CH-M-1), *T. suecica* (TE-S-1) y *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1) cultivadas durante su fase exponencial. Los resultados son valores promedio ± E.S. (n = 4)…… 62

19 Clorofila *a*, clorofila *b* y carotenoides totales en µg·mL^{-1}, pg·cel^{-1} y pg·ng^{-1} de PS de las microalgas *T. weissflogii* (TH-W-1), *C. muelleri* (CH-M-1), *T. suecica* (TE-S-1) y *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1) cultivadas durante su fase exponencial. Los resultados son valores promedio ± E.S. (n = 4)……. 64

20 Peso seco en µg·org^{-1} de los juveniles de *A. franciscana* al inicio (0 h) y después (6 h) de alimentarlos con las microalgas *T. weissflogii* (TH-W-1*), C. muelleri* (CH-M-1), *T. suecica* (TE-S-1) y *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1). Los resultados son valores promedio ± E.S. (n = 4)…….. 65

21 Peso orgánico en µg·org^{-1} de los juveniles de *A. franciscana* al inicio (0 h) y después (6 h) de alimentarlos con las microalgas *T. weissflogii* (TH-W-1), *C. muelleri* (CH-M-1), *T. suecica* (TE-S-1) y *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1). Los resultados son valores promedio ± E.S. (n = 4)…….. 66

22 Proteínas, lípidos y carbohidratos en µg·org^{-1} de los juveniles de A. franciscana al inicio (0 h) y después (6 h) de alimentarlos con las microalgas *T. weissflogii* (TH-W-1), *C. muelleri* (CH-M-1), *T. suecica* (TE-S-1) y *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1). Los resultados son valores promedio ± E.S. (n = 4)……. 67

23 Proteínas, lípidos y carbohidratos en % con base al peso seco de los juveniles de *A. franciscana* al inicio (0 h) y

después (6 h) de alimentarlos con las microalgas *T. weissflogii* (TH-W-1), *C. muelleri* (CH-M-1), *T. suecica* (TE-S-1) y *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1). Los resultados son valores promedio ± E.S. (n = 4)……... 68

24 Clorofila *a*, clorofila *b* y carotenoides totales en ng·org^{-1} y en ng·µg^{-1} de PS de los juveniles de *A. franciscana* al inicio (0 h) y después (6 h) de alimentarlos con las microalgas *T. weissflogii* (TH-W-1), *C. muelleri* (CH-M-1), *T. suecica* (TE-S-1) y *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1). Los resultados son valores promedio ± E.S. (n = 4)……... 71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Metabolismo oxidativo del β-caroteno en crustáceos……..	4
2	Producción de las microalgas *Thalassiosira weissflogii* (TH-W-1), *Chaetoceros muelleri* (CH-M-1), *Tetraselmis suecica* (TE-S-1) y *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1)……	15
3	Densidad celular (x10^{6} cel·mL^{-1}) de las microalgas *T. weissflogii* (TH-W-1), *C. muelleri* (CH-M-1), *T. suecica* (TE-S-1) y *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1) cultivadas con el medio f. Los resultados son valores promedio ± E.S. (n = 4)……...	18
4	Tasa de división celular diaria acumulada (∑µ) de las microalgas *T. weissflogii* (TH-W-1), *C. muelleri* (CH-M-1), *T. suecica* (TE-S-1) y *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1) cultivadas con el medio f. Los resultados son valores promedio ± E.S. (n = 4)…….	19
5	pH de las microalgas *T. weissflogii* (TH-W-1), *C. muelleri* (CH-M-1), *T. suecica* (TE-S-1) y *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1) cultivadas con el medio f. Los resultados son valores promedio ± E.S. (n = 4)…….	20
6	Producción de juveniles *Artemia franciscana*…….	42
7	Diseño del experimento para evaluar la tasa de ingestión de juveniles de *A. franciscana* alimentados con tres densidades celulares de la microalga *C. muelleri* y	

expuestos a dos niveles de iluminación: con luz (CL) y sin luz (SL)…… 44

8 Diseño del experimento para evaluar el efecto de la dieta isolipídica sobre juveniles de *A. franciscana* de 9 días. (PS = peso seco, PO = peso orgánico, Cl*a* = clorofila *a*, Cl*b* = clorofila *b* y CT = carotenoides totales)…….. 56

RESUMEN

Efecto de la composición proximal, clorofilas, y carotenoides totales de cuatro especies de microalgas sobre la calidad nutricional de juveniles de *Artemia franciscana*

MARTHA IRENE MILLÁN ALMARAZ

Las microalgas y la *Artemia* son consideradas la principal fuente de alimento vivo de diversas especies marinas, sobre todo en las primeras etapas de vida. La *Artemia* presenta ventajas sobre otros organismos, destacando su fácil manejo, la posibilidad de obtener grandes cantidades de biomasa en cualquier época del año y su capacidad de bioencapsulación con componentes de interés para las especies en cultivo. Sin embargo, presenta deficiencias en cuanto a carotenoides y nulo contenido de clorofilas, los cuales pueden suplementarse a través de la dieta, como las microalgas que contienen estos compuestos y también pueden mejorar la composición proximal (proteínas, carbohidratos y lípidos) de la *Artemia*. Es por esto, que el presente estudio tuvo como objetivo caracterizar la composición proximal, el contenido de carotenoides totales y las clorofilas *a* y *b* de las microalgas *Thalassiosira weissflogii*, *Chaetoceros muelleri*, *Tetraselmis suecica* y *Nannochloropsis* sp. y evaluar su efecto sobre los juveniles de *Artemia franciscana* alimentados durante 6 horas. Para esto la tesis se dividió en tres capítulos, el primero fue sobre la curva de crecimiento de las microalgas para determinar la fase exponencial y la composición proximal de cada especie, en particular el contenido lipídico de cada microalga con la finalidad de elaborar una dieta isolipídica. En el segundo se determinó la tasa de ingestión de los juveniles de *A. franciscana* en diferentes condiciones de alimentación e iluminación, probando tres densidades celulares: 600,000 cel·mL^{-1}, 900,000 cel·mL^{-1} y 1,200,000 cel·mL^{-1} de alimento de la microalga *C. muelleri* y dos condiciones de iluminación: luz y oscuridad durante 3 y 6 horas. En el tercer capítulo, se evaluó el efecto de la dieta isolipídica de las cuatro especies de microalgas sobre el valor nutricional de los juveniles de *A. franciscana* en términos de composición proximal, carotenoides totales y clorofilas *a* y *b*. Con base en los resultados, se observó que la fase de crecimiento exponencial de las microalgas se alcanzó el día dos para *T. weissflogii*, *C. muelleri* y *T. suecica* y el día cuatro para *Nannochloropsis* sp. (Cap. 1). Por otra parte, se determinó que 900,000 cel·mL^{-1} es la densidad adecuada para alimentar a los juveniles y en condiciones de oscuridad (Cap. 2). Por último, se observó que los juveniles de *Artemia* alimentados con las diferentes especies de microalgas mostraron un efecto positivo, ya que mejoraron su calidad nutricional con respecto a los controles (Cap. 3), observándose

una relación entre los resultados de la composición de las microalgas y los resultados en los juveniles de *Artemia*, siendo los organismos alimentados con *T. suecica* aquellos que presentaron mejores resultados en términos de composición proximal y clorofila *b*, y aquellos que recibieron las dietas de *T. weissflogii* y *C. muelleri* mostraron los mejores resultados en términos de carotenoides totales y clorofila *a*.

Palabras clave: Microalgas, *Artemia*, composición proximal, carotenoides, clorofilas.

ABSTRACT

Effect of proximal composition, chlorophylls, and total carotenoids of four microalgae species on the nutritional quality of juvenile *Artemia franciscana*

MARTHA IRENE MILLÁN ALMARAZ

Microalgae and *Artemia* are considered the main source of live food for various marine species, especially in early stages of life. *Artemia* presents advantages over other organisms, highlighting its easy handling, the possibility to obtain large amounts of biomass at any time of the year and its bioencapsulation capacity with components of interest for the species in culture. However, it presents deficiencies of carotenoids and zero chlorophyll content, which can be supplemented through the diet, such as microalgae that contain these compounds and can also improve the proximal composition (proteins, carbohydrates, and lipids) of *Artemia*. For this reason, the present study aimed to characterize the proximal composition, total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of the microalgae *Thalassiosira weissflogii*, *Chaetoceros muelleri*, *Tetraselmis suecica* and *Nannochloropsis* sp. and to evaluate their effect on *Artemia franciscana* juveniles fed for 6 hours. For this, the thesis was divided in three chapters, the first was about the microalgae growth curve to determine the exponential phase and the proximal composition of each species, in particular the lipid content of each microalga to prepare an isolipidic diet. In the second, the ingestion rate of *A. franciscana* juveniles was determined at different feeding and lighting conditions, testing three cell densities: 600,000 cell·mL^{-1}, 900,000 cell·mL^{-1} and 1,200,000 cell·mL^{-1} of food from the microalga *C. muelleri* and two lighting conditions: light and dark for 3 and 6 hours. In the third chapter, the effect of the isolipid diet of the four microalgae species on the nutritional value of *A. franciscana* juveniles was evaluated in terms of proximal composition, total carotenoids and chlorophylls *a* and *b*. Based on the results, it was observed that the exponential growth phase of the microalgae was achieved at day two for *T. weissflogii*, *C. muelleri* and *T. suecica* and at day four for *Nannochloropsis* sp. (Chap. 1). On the other hand, it was determined that 900,000 cell·mL^{-1} is the adequate density to feed juveniles and in dark conditions (Chap. 2). Finally, it was observed that *Artemia* juveniles fed with the different species of microalgae showed a positive effect, since they improved their nutritional quality with respect to the controls (Chap. 3), observing a relationship between the results of the composition of the microalgae and the results in the *Artemia* juveniles, being the organisms fed with *T. suecica* those that presented the best results in terms of proximal

composition and chlorophyll *b*, and those that received the *T. weissflogii* and *C. muelleri* diets showed the best results in terms of total carotenoids and chlorophyll *a*.

Keywords: Microalgae, *Artemia*, proximal composition, carotenoids, chlorophylls.

1. INTRODUCCIÓN

Uno de los factores más importantes a considerar en el cultivo de organismos marinos es la calidad y cantidad del alimento suministrado. Por lo que durante los últimos años se han desarrollado una gran variedad de alimentos balanceados. No obstante, diversos estudios han reportado un crecimiento y supervivencia inferior al obtenido cuando los organismos son alimentados con dietas vivas (Luna-Figueroa *et al*. 2010). El alimento vivo se caracteriza por presentar diversas ventajas sobre el alimento balanceado, entre las cuales destaca su alto valor nutricional. Además de tener la posibilidad de mejorarlo con complementos nutricionales requeridos por los organismos en cultivo, dando como resultado altas tasas de asimilación, una mayor tolerancia a enfermedades, un rápido crecimiento y mayores porcentajes de supervivencia (Ocampo *et al*. 2010; Sánchez-Estudillo, 2011). Los organismos más utilizados como alimento vivo en la acuicultura son las microalgas y algunas especies de zooplancton, como rotíferos y *Artemia* (Martínez-Córdova *et al*. 2014).

Las microalgas son consideradas la principal fuente de alimentación de bivalvos y de estadios tempranos de camarones, así como de otros crustáceos como *Artemia*, cladóceros y copépodos (Martínez-Córdova *et al*. 2014; Guevara *et al*. 2011). Sin embargo, para ser usadas como alimento, las microalgas deben tener algunos atributos, como fácil ingestión y digestión, ausencia de toxinas, así como tamaño, forma y una composición bioquímica adecuada para los organismos en cultivo (Collantes y Oliva, 2013). En este sentido, se sabe que la composición química de las microalgas puede variar según la especie, hábitat, etapa del ciclo de vida y factores ambientales; que en conjunto determinan su valor nutricional (Hira *et al*. 2017).

Asimismo, las microalgas son capaces de acumular macromoléculas como proteínas, carbohidratos y lípidos mediante el uso eficiente de energía solar, CO_2 y nutrientes (Becker, 2013; Matos *et al*. 2015). Además, las microalgas pueden sintetizar productos de valor agregado como ácidos grasos poliinsaturados (AGPIs), aminoácidos, carotenoides, vitaminas y minerales (Koller *et al*. 2014; Gunerken *et al*. 2015). Entre las propiedades nutricionales que deben tener las microalgas para ser utilizadas como alimento vivo en larvas de crustáceos están: contenido proteico superior al 25% de

masa seca, 8-30% de carbohidratos y alrededor de un 10% de lípidos (Guevara-Acosta, 2011).

Las proteínas tienen un importante papel como unidad estructural básica. Además, son necesarias para el metabolismo, la producción de hormonas, anticuerpos y ADN (Guedes *et al*. 2015). La calidad nutricional de una proteína está determinada por el contenido, la proporción y la disponibilidad de los aminoácidos (Enzing *et al*. 2014). Los carbohidratos desempeñan numerosas funciones en los organismos vivos. Los polisacáridos, por ejemplo, sirven para el almacenamiento de energía en forma de almidón y glucógeno y como componentes estructurales en forma de celulosa en plantas/algas (Sadovskaya *et al*. 2014; Turu *et al*. 2016). Los lípidos son componentes de todas las células de microalgas y las principales funciones biológicas incluyen almacenar energía, señalizar y actuar como componentes estructurales de las membranas celulares (Tasic *et al*. 2016).

En otro sentido, las microalgas se caracterizan por tener gran cantidad de carotenoides, los cuales funcionan como pigmentos secundarios en los fotosistemas y están involucrados en la captación de luz, donde actúan como fotoprotectores contra el estrés oxidativo y el fotodaño (Takaichi, 2011; Varela *et al*. 2015). Además, su importancia se debe a que ningún animal puede producir estos compuestos, o al menos no de manera eficiente, por lo que deben obtenerlos a partir del alimento, mediante la transferencia a través de la cadena trófica (Paniagua-Michel *et al*. 2012; Rodrigues *et al*. 2015).

Entre los principales carotenoides se encuentra el β-caroteno, el cual cumple funciones tales como: secuestrador de especies reactivas de oxígeno, precursor de vitamina A y participa en la transferencia de energía en el proceso de fotosíntesis. Asimismo, tiene un efecto positivo sobre la visión y el sistema inmunológico (Ruiz-Soto, 2017). De igual manera, la inclusión de astaxantina en la dieta mejora el crecimiento de los organismos y aporta notables beneficios en la reproducción y desarrollo larvario (Chávez-Cabrera *et al*. 2010). A su vez, la astaxantina tiene un importante papel como antioxidante, puesto que protege a las células de radicales libres altamente agresivos para los organismos (De la Vega-Naranjo, 2014).

Por otro lado, las clorofilas son pigmentos verdes constituidos por un anillo de clorina y un átomo de magnesio (Mg) unidos con una larga cadena hidrófoba de fitol. Las clorofilas desempeñan un papel importante en la fotosíntesis al absorber y transferir energía luminosa (Blankenship, 2014). Estas moléculas contienen estructuras similares, con variaciones en las cadenas laterales y/o estados de reducción. Tales alteraciones en los anillos o cadenas laterales en varios tipos de clorofilas dan como resultado diferentes propiedades de absorción. La presencia de varios tipos de clorofilas permite a los organismos fotosintéticos recolectar la luz solar en diferentes longitudes de onda y aprovechar la energía lumínica presente (Chen, 2013).

Actualmente se conocen cinco tipos de clorofila: *a*, *b*, *c*, *d* y *f*. La clorofila *a* es la más abundante de todas. Está presente en el centro de reacción y en los complejos de captación de luz de casi todos los organismos fotosintéticos oxigenados, incluidas las plantas superiores, las algas y las cianobacterias (Björn *et al*. 2009). La clorofila *b* es la segunda más abundante en plantas y microalgas verdes (La Roche *et al*. 1996); la clorofila *c* se encuentra en muchos grupos de algas marinas, como diatomeas, algas pardas y dinoflagelados (Zapata *et al*. 2006). La clorofila *d* es predominante en la cianobacteria *Acaryochloris marina* (Tomo *et al*. 2011); mientras que la clorofila *f* se encuentra en la cianobacteria *Halomicronema hongdechloris* (Chen *et al*. 2012).

En lo que respecta a la *Artemia*, dicho organismo se utiliza ampliamente como alimento vivo en más del 85% de las especies marinas, desde nauplio hasta su etapa adulta (Lakshmana-Senthil *et al*. 2011). Su importancia como alimento se debe a que tolera diversas condiciones de cultivo, es de fácil digestión y puede usarse como transportador de compuestos de interés. Además, sus huevos se pueden enquistar y eclosionar cuando sea necesario y así obtener grandes biomasas en cualquier temporada del año (Viciano-Delibano, 2015). Sin embargo, a pesar de que la *Artemia* tiene la capacidad de convertir el β-caroteno ingerido de dietas algales en astaxantina a través de reacciones metabólicas, la tasa de conversión es muy baja, por lo que tiene que suplementarse a través de la dieta (Meyers, 2000). Las principales conversiones metabólicas de los carotenoides encontradas en los animales son: oxidación,

reducción, traslado de dobles enlaces, escisión oxidativa de dobles enlaces y escisión de enlaces epoxi (Britton *et al*. 2008; Maoka, 2011).

La ruta biosintética del metabolismo de carotenoides en crustáceos es una secuencia oxidativa, la cual consiste en oxidar las posiciones 3,3' y 4,4' de los anillos β-ionona del β-caroteno (Britton, 1998; Matsuno, 2001). La conversión de β-caroteno a astaxantina se lleva a cabo por la acción combinada de las enzimas β-hidroxilasa y β-cetolasa, que actúan sobre los diferentes carotenoides intermediarios. La β-caroteno, 3,3'-hidroxilasa introduce un grupo hidroxilo en las posiciones 3 y 3' de cada uno de los dos anillos de β-ionona del β-caroteno y la β-caroteno, 4-4'-cetolasa, introduce grupos ceto en los carbonos 4 y 4 'de los anillos β-ionona de la molécula de β-caroteno (Martin *et al.,* 2008). De esta manera, el β-caroteno ingerido en la dieta, se convierte en astaxantina teniendo como compuestos intermediarios a la equinenona, 3-hidroxiequinenona, cantaxantina, y adonirrubina (Figura 1).

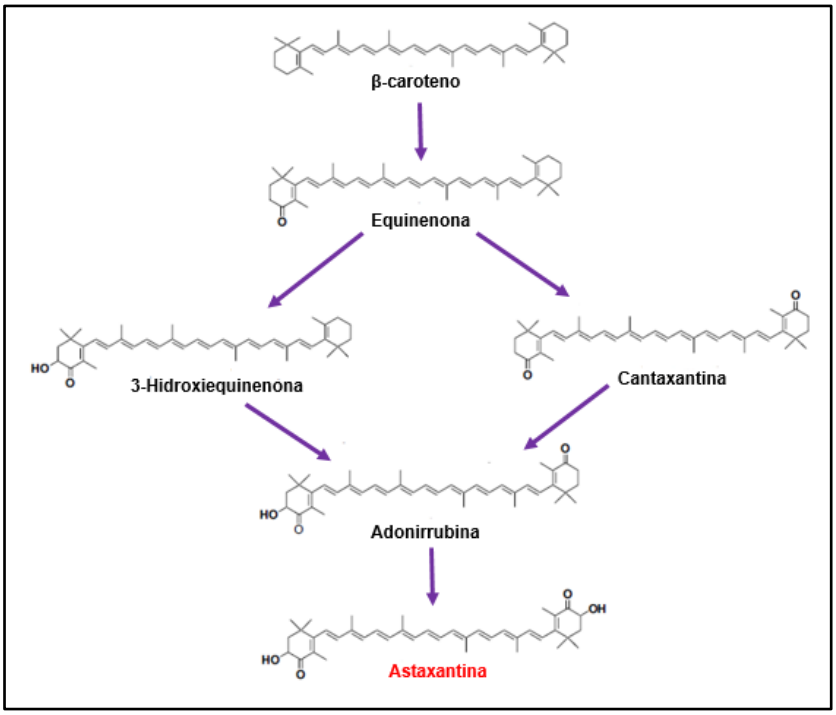

Figura 1. Metabolismo oxidativo del β-caroteno en crustáceos.

Los carotenoides están implicados en un gran número de funciones fisiológicas en las plantas y en los animales, y estas funciones se basan en gran medida en la estructura del carotenoide. La mayoría de los tejidos de los crustáceos atribuyen su coloración a

la presencia de varios carotenoides, siendo la astaxantina el carotenoide principal. Dicho compuesto desempeña diversas funciones en estos organismos, las cuales incluyen: pigmentación, fotoprotección, antioxidante y fuente de provitamina A (Britton, 2008). Además, mejora el crecimiento, supervivencia, capacidad reproductiva, resistencia a las enfermedades y resistencia al estrés de los crustáceos (Niu *et al*. 2011; Niu *et al*. 2014).

Debido a la importancia que tienen las clorofilas, así como las proteínas, carbohidratos, lípidos y carotenoides para las especies marinas, y a que los pocos estudios que existen sobre el valor nutricional de *Artemia* alimentada con microalgas son en etapa de metanauplio y no en juveniles; el presente trabajo tiene como objetivo caracterizar la composición proximal (proteínas, carbohidratos y lípidos), así como la concentración de clorofilas *a* y *b* y carotenoides totales de las microalgas *Thalassiosira weissflogii*, *Chaetoceros muelleri*, *Tetraselmis suecica* y *Nannochloropsis* sp. Además de usar a estas microalgas como alimento para juveniles de *Artemia franciscana*, con la finalidad de mejorar su calidad nutricional y determinar la especie de microalga con la cual se obtienen las concentraciones más altas de estos compuestos de interés.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos unicelulares o multicelulares simples y representan aproximadamente el 50% de la actividad fotosintética global (Chiu *et al*. 2015). Se pueden agrupar en microalgas procariotas (cianobacterias *Chloroxybacteria*), microalgas eucariotas (algas verdes *Chlorophyta*), algas rojas (*Rhodophyta*) y diatomeas (*Bacillariophta*). Además del crecimiento en entornos naturales, las microalgas también se pueden cultivar artificial y comercialmente en sistemas de agua dulce, marinos y de aguas residuales dentro de estanques abiertos (canales) y fotobiorreactores cerrados (Sambusiti *et al*. 2015). En los últimos años, el cultivo de microalgas se ha vuelto importante por producir una variedad de compuestos de interés para diferentes sectores industriales, como la acuicultura y alimentación animal, nutrición humana, cosmética y nutracéutica, así como farmacéutica y de biorrefinería (Acien *et al*. 2013; Zhu, 2015).

Entre los géneros más utilizados en acuicultura se encuentran: *Thalassiosira*, *Chaetoceros*, *Tetraselmis* y *Nannochloropsis*, mismas que son consumidas vivas (Cisneros, 2012; Hernández y Labbé, 2014). *T. weissflogii* y *C. muelleri* son diatomeas marinas. Las diatomeas son microalgas unicelulares con una pared celular de sílice biomineralizada llamada frústula y sus funciones naturales incluyen protección mecánica, protecciones biológicas, filtración, protección del ADN de los rayos UV y optimización de la captación de luz (Aguirre *et al*. 2018). Las diatomeas marinas desempeñan un papel importante en la producción primaria en los océanos contribuyendo con casi el 20% de la producción neta primaria (Gao *et al*. 2018). Asimismo, tienen un papel vital en la bomba de carbono biológico marino, así como en el ciclo biogeoquímico del nitrógeno y silicio (Moore *et al*. 2013; Young y Morel, 2015).

T. weissflogii es una microalga marina unicelular con un papel ecológico relevante, ya que es un productor primario y es consumida por varias especies de zooplancton. Además, se utiliza en el tratamiento de aguas residuales, pruebas de toxicidad y producción de biodiesel (Araújo y Souza-Santos, 2013). *T. weissflogii* tiene forma cilíndrica o de disco de 15-20 µm de longitud y se encuentra como células solitarias o formando cadenas de células unidas con mucílago. Mientras que *C. muelleri* es una diatomea marina que generalmente se encuentra como células aisladas con dimensiones de 4-6 x 6-8 µm y se distribuye de forma ubicua en todo el mundo. Debido a su rápido crecimiento y fácil mantenimiento, *C. muelleri* se ha utilizado en la acuicultura como alimento para el zooplancton y las larvas de camarón en criaderos comerciales en muchas regiones (Wang *et al*. 2014; Malibari *et al*. 2018), lo que convierte a esta especie en una de las microalgas más importantes de la industria acuícola (Wang *et al*. 2014; Rahmadi *et al*. 2020).

Por otra parte, la microalga *T. suecica* tiene forma comprimida y elipsoidal y sus células se mantienen aisladas. Es de color verde brillante, presenta cuatro flagelos apicales y sus dimensiones varían de 7-8 × 12-16 µm. Esta especie se utiliza ampliamente en la acuicultura como alimento para moluscos bivalvos, etapas larvarias de crustáceos y en el cultivo de rotíferos y *Artemia* (Sansone *et al*. 2017; Di Lena *et al*. 2019). En tanto que, *Nannochloropsis* sp. es una microalga que se encuentra como células aisladas,

verdosas, inmóviles y sin flagelos. Sus células son esféricas y tienen un diámetro medio bastante pequeño (≈ 2.5 µm), por lo que pueden clasificarse como picoplancton (Zhang *et al*. 2018). Es apreciada en la acuicultura por tener ácidos grasos esenciales, por lo que se emplea para la alimentación de organismos pertenecientes al zooplancton (Olmstead *et al*. 2013; Ryckeboscha *et al*. 2014).

Los principales componentes de las microalgas son lípidos, proteínas y carbohidratos (Yang *et al*. 2014). Asimismo, las microalgas se consideran una fuente potencial de nutrientes de alto valor como carotenoides, vitaminas y ácidos grasos (Ghosh *et al*. 2016; Hamed, 2016). La composición química de las microalgas varía entre especies (Schulze *et al*. 2019; Shanmugam *et al*. 2020). Pero también puede variar ampliamente debido a la luz, temperatura y la etapa/condiciones de crecimiento (Becker, 2013). La modulación de las condiciones de crecimiento regula la composición macromolecular de la biomasa, que a su vez regula el crecimiento y la síntesis de metabolitos secundarios (Singh *et al*. 2019). Por ejemplo, la limitación de nitrógeno en los medios de cultivo promueve la acumulación de lípidos (Franz *et al*. 2013), y el exceso de la temperatura o la intensidad de la luz inducen la síntesis de carotenoides (Panis y Carreon, 2016).

En general, la biomasa de microalgas contiene un 30-50% de proteínas, 20-40% de carbohidratos y 8-15% de lípidos (Wang *et al*. 2013; Zhu *et al*. 2014; Matos *et al*. 2016). Las proteínas que componen las microalgas contienen aminoácidos esenciales (Safi *et al*. 2014; Gutierrez-Salmean *et al*. 2015); por lo que pueden utilizarse como una fuente alternativa de proteína para integrarse en las dietas balanceadas de los camarones (Ju *et al*. 2012), salmón y carpa (Kiron *et al*. 2012). Varias especies de microalgas pueden sintetizar un alto contenido de proteínas con base al peso seco. Por ejemplo, *Spirulina platensis* (60-65%) y *Chlorella vulgaris* (51-58%) (Henrikson, 2009).

Con respecto a los carbohidratos, diferentes microalgas oleaginosas como *Scenedesmus* sp., *Chlorella* sp., *Chlamydomonas* sp. y *Desmodesmus* sp., acumulan carbohidratos en condiciones favorables de crecimiento. Por ejemplo, *Chlorella* sp. mostró un contenido de carbohidratos del 45.57% de la biomasa seca en condiciones

de crecimiento con nutrientes suficientes, mientras que, en condiciones de carencia de nitrógeno, los lípidos neutros dominaron con el 65% (Muthuraj *et al*. 2014).

Se ha demostrado que la acumulación de lípidos en microalgas generalmente ocurre en el rango del 20% al 50% de la biomasa total con base al peso seco (Katiyar y Arora, 2020). No obstante, cuando las microalgas son cultivadas bajo condiciones de estrés (p. ej. limitación de nutrientes) generalmente acumulan lípidos (Yen *et al*. 2013), pudiendo almacenar ≥70% de su peso. En este sentido, el estrés por nitrógeno aumentó el contenido de lípidos de especies como *Nannochloropsis oculata* (Converti *et al*. 2009) y *Chlorella pyrenoidosa* (Fan *et al*. 2014) en aproximadamente un 15% sobre el control. Mientras que, en el caso del estrés por fósforo, *Nannochloropsis* sp. y *Scenedesmus* sp. exhibieron una inducción de lípidos máxima de hasta ~ 50% en condiciones de falta de fosfato (Rodolfi *et al*. 2009; Xin *et al*. 2010).

Por otra parte, los pigmentos de las algas son responsables de procesos tales como: recolección de luz, fijación de CO_2, protección de las células contra daños por iluminación excesiva y, macroscópicamente, de su coloración (Koller *et al*. 2014). Las microalgas contienen tres grupos de pigmentos fotosintéticos mayoritarios: clorofilas, que absorben las longitudes de onda correspondientes a la luz azul y roja; carotenoides, que absorben en la región del verde y el azul; y ficobilinas, que absorben luz verde, amarilla y anaranjada. Estos pigmentos están asociados a proteínas en el cloroplasto, y es por medio de ellos que se lleva a cabo la absorción de la luz en toda la zona del espectro visible y se realiza el proceso de la fotosíntesis (Koller *et al*. 2014).

Las clorofilas son los pigmentos fotosintéticos principales de las algas y en las microalgas se encuentran en una proporción del 0.5% al 1.5% de la materia seca (Christaki *et al*. 2015). Desempeñan funciones importantes, como la captación de luz, la transferencia de energía y la transferencia de electrones en los organismos fotosintéticos (Kato *et al.* 2020). Estas moléculas contienen estructuras similares de anillos de cinco miembros, con variaciones en las cadenas laterales y/o estados de reducción. Tales alteraciones en los anillos o cadenas laterales resultan en varios tipos de clorofilas con diferentes propiedades de absorción (Chen y Scheer, 2013).

En el caso de los carotenoides, la concentración máxima en las algas varía entre 0.1% y 2% (Christaki *et al*. 2015). Sin embargo, se han reportado especies capaces de bioacumular grandes cantidades de β-caroteno, entre ellas destacan *Dunaliella bardawil* y *Dunaliella salina*, las cuales pueden registrar hasta un 10% del peso seco, cuando estas son expuestas a intensidades lumínicas elevadas, altas concentraciones salinas y condiciones limitadas de oxígeno y nitrógeno. Este compuesto le da una apariencia rojiza intensa a la célula, en lugar del usual verde que se produce por las clorofilas (Sadeq, 2012).

Tomando en cuenta el aporte de carotenoides, la astaxantina tiene un papel muy importante. Diversos autores han documentado los efectos positivos que presenta este carotenoide en los organismos en cultivo. Se ha demostrado que fuentes naturales de astaxantina, como la microalga *Haematococcus pluvialis* y los nauplios de *Artemia*, dan mejores resultados en el crecimiento, supervivencia y resistencia a la salinidad de larvas de *Penaeus monodon,* en comparación con suplementos sintéticos o suplementos sin astaxantina (Darachai *et al*. 1998). En otro estudio realizado por Chien *et al*. (2003) evaluaron el efecto de un suplemento de astaxantina en la dieta de *P. monodon* sobre su capacidad antioxidante y la resistencia a pruebas de estrés térmico y osmótico, encontrando que dicho suplemento mejoró la resistencia del camarón en comparación a aquellos alimentados sin él. Por su parte, Chien y Shiau (2005) utilizaron *H. pluvialis* y *Spirulina pacifica* como fuentes de astaxantina natural para evaluar la supervivencia de juveniles de *Marsupenaeus japonicus*, obteniendo como resultado una mayor tasa de supervivencia al suplementar dietas ricas en astaxantina, en comparación con aquellas dietas sin carotenoides.

En lo que se refiere a la *Artemia*, dicho organismo es un microcrustáceo branquiópodo adaptado a vivir en aguas hipersalinas. Especies como *A. salina* y *A. franciscana* son filtradores no selectivos, que consumen prácticamente cualquier material particulado que entra en su boca (Mohebbi *et al*. 2015). En los cultivos experimentales de *A. franciscana* alimentada con la microalga *Chaetoceros* sp., se ha logrado obtener una tasa de supervivencia del 94.1% y altos niveles de proteínas (33.8%), carbohidratos (21.4%) y lípidos (37.6%); en comparación a las que fueron alimentadas con *Dunalliella*

sp. o *Spirulina máxima* (Arriaga y Re, 1997). Además, Godínez *et al*. (2004) encontraron que al suministrar *T. suecica* en la fase larvaria de *Artemia*, se obtuvo mayor longitud total (4.5 mm de LT), en comparación al tratamiento donde se suministró *C. muelleri* (3.7 mm de LT). Asimismo, Rivera-Reyes (2013) realizó un cultivo de *Artemia* sp. con una duración de 11 días y determinó que el mayor crecimiento de los organismos se obtuvo con la dieta compuesta por la microalga *Schyzothyrium* sp., alcanzando una longitud promedio de 4.7 mm, en comparación a los registrados con *C. muelleri* (2.8 mm de LT), sin embargo, con esta última microalga se registraron los mejores resultados de supervivencia (78.90%).

Por otra parte, los nauplios de *Artemia* presentan un color anaranjado debido a la presencia de carotenos en el vitelo, siendo la cantaxantina el pigmento más abundante (Ruiz-Pérez, 2008). También, se ha observado que la *A. franciscana* alimentada con *D. salina* presentó mayores porcentajes de supervivencia (91.6%) cuando los organismos fueron expuestos a radiación ultravioleta, en comparación a aquellos que fueron alimentados con levadura (63.6% de supervivencia). Lo que indicó que el alto contenido del β-caroteno presente en la microalga *D. salina* tuvo un efecto fotoprotector para las células (Garcés-Llantín, 2009). Por último, Aguirre-Hinojosa *et al*. (2012) utilizaron diferentes dietas (sin suplemento, con suplemento y con nauplios de *Artemia*) en postlarvas de *Penaeus vannamei* y encontraron que la dieta suplementada con xantofilas y la dieta con nauplios de *Artemia* produjo un incremento significativo en la supervivencia de los organismos (87.1 y 80.2%, respectivamente). Además, el peso individual promedio final de los organismos fue más alto en las poblaciones que recibieron nauplios de *Artemia*, el cual alcanzó los 8.17 mg. Asimismo, se determinó que las xantofilas incluidas en el suplemento y la cantaxantina de los nauplios de *Artemia*, fueron transformadas en astaxantina por las postlarvas de *P. vannamei*.

Finalmente, en cuanto al contenido de clorofilas en crustáceos, no hay estudios reportados en los cuales se utilicen las clorofilas como suplemento en animales. Sin embargo, incluir las clorofilas en la dieta de los organismos podría tener un efecto antioxidante y protegerlos del daño oxidativo causado por los radicales libres.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La *Artemia franciscana* es uno de los alimentos vivos más utilizados en acuicultura, desde nauplio hasta su etapa adulta, debido a las características que presenta, tales como: tolerancia a diversas condiciones de cultivo, fácil digestión, obtención de grandes biomasas y a que es utilizada como transportador de compuestos de interés para las especies en cultivo. A su vez, la principal fuente de alimento de la *Artemia* son las microalgas, las cuales contienen proteínas, carbohidratos, lípidos, carotenoides y clorofilas *a* y *b*, que son considerados esenciales para el crecimiento y supervivencia de la *Artemia* y, además, están relacionados a la tolerancia a condiciones de estrés, actúan como antioxidantes y mejoran la respuesta del sistema inmune de los organismos.

Sin embargo, a pesar de que en diversas investigaciones se ha evaluado la composición química de la *Artemia* en nauplios y en metanauplios alimentados con diferentes especies de microalgas, no existe información suficiente sobre cómo afecta la calidad nutricional en las etapas tardías, en particular la composición proximal, carotenoides totales y clorofilas de juveniles de *Artemia*. Con base en lo anterior, este estudio tiene como objetivo caracterizar la composición proximal, el contenido de carotenoides totales y clorofilas *a* y *b* de las microalgas *T. weissflogii*, *C. muelleri*, *T. suecica* y *Nannochloropsis* sp. y evaluar su efecto sobre el valor nutricional de juveniles de *A. franciscana*; con la finalidad de determinar la especie de microalga que contiene las concentraciones más altas de los compuestos de interés y que a su vez, mejora la calidad nutricional de la *Artemia*, misma que podría ser utilizada en futuras investigaciones para mejorar el estado fisiológico y la respuesta productiva de larvas y juveniles de peces y crustáceos.

4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

- ¿Qué especie de microalga tiene mayor valor nutricional con relación a la composición proximal y al contenido de clorofilas y carotenoides totales?

- ¿La especie de microalga que presenta mayor valor nutricional da como resultado la concentración más alta de los compuestos de interés en los juveniles de *A. franciscana*?

5. HIPÓTESIS

- El contenido de la composición proximal, clorofilas y carotenoides totales de las cuatro especies de microalgas es diferente y al menos una de ellas aumenta la concentración de los compuestos de interés en los juveniles de *Artemia franciscana*.

- Las proteínas son los compuestos más abundantes en todas las especies de microalgas, siendo las microalgas verdes las que tienen una mayor concentración de este compuesto, así como también de carbohidratos y lípidos, en comparación con las diatomeas.

- En relación con las clorofilas, la clorofila *a* es el pigmento más abundante en todas las especies de microalgas. No obstante, *T. suecica* y *Nannochloropsis* sp. presentan concentraciones más altas de clorofila *b* que *T. weissflogii* y *C. muelleri*.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

- Caracterizar la composición proximal, el contenido de clorofilas *a* y *b* y los carotenoides totales de las microalgas *Thalassiosira weissflogii*, *Chaetoceros muelleri*, *Tetraselmis suecica* y *Nannochloropsis* sp. y evaluar su efecto sobre el valor nutricional de los juveniles de *Artemia franciscana*.

6.2. Objetivos específicos

Evaluar la composición proximal de las cuatro especies de microalgas.
Determinar la concentración de clorofilas *a* y *b* y de carotenoides totales de las cuatro especies de microalgas.
Evaluar la composición proximal de los juveniles de *A. franciscana* alimentados con las cuatro especies de microalgas.
Determinar la concentración de clorofilas *a* y *b* y de carotenoides totales de los juveniles de *A. franciscana* alimentados con las diferentes especies de microalgas.

7. ORGANIZACIÓN DEL TRABAJO

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Ecofisiología de Organismos Acuáticos y de Cultivos de Apoyo para la Acuicultura, de la Facultad de Ciencias del Mar, perteneciente a la Universidad Autónoma de Sinaloa, ubicada en Mazatlán, Sinaloa. El trabajo consistió en tres fases, las cuales se presentan en este documento de tesis en tres capítulos, siendo los dos primeros de resultados preliminares y el tercero del experimento principal. En la primera fase (Capítulo 1), se realizaron cultivos de las cuatro especies de microalgas: *Thalassiosira weissflogii* (TH-W-1), *Chaetoceros muelleri* (CH-M-1), *Tetraselmis suecica* (TE-S-1) y *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1), donde se evaluó la densidad celular cada 24 horas, tasa de división celular diaria acumulada, y se determinó la curva de crecimiento de cada especie, con el fin de identificar la fase de crecimiento exponencial. Además, se tomaron muestras para la determinación del peso seco, peso orgánico y composición proximal, datos que se usaron posteriormente para suplementar una dieta isolipídica a los juveniles de *A. franciscana*. En la segunda fase (Capítulo 2), se llevaron a cabo cultivos de *A. franciscana,* la cual se alimentó durante 9 días con *C. muelleri* hasta alcanzar la etapa de juvenil, donde se alimentaron con tres densidades celulares: 600,000 cel·mL^{-1}, 900,000 cel·mL^{-1} y 1,200,000 cel·mL^{-1} de la microalga *C. muelleri* y dos condiciones de iluminación: luz y oscuridad durante 3 y 6 horas, para determinar la tasa de ingestión de la *Artemia* y la condición óptima de iluminación y así proporcionar la cantidad de alimento adecuado a los juveniles durante el experimento principal. En la tercera fase (Capítulo 3), primeramente, los cultivos de *Artemia* y microalgas se sincronizaron, de manera que los juveniles estuvieron disponibles para cuando las microalgas alcanzaron la fase de crecimiento exponencial. Posteriormente se iniciaron los experimentos para evaluar el efecto de la dieta isolipídica de las distintas microalgas sobre el valor nutricional de los juveniles de *A. franciscana*. Al inicio y al final del experimento (6 h) se tomaron muestras de las microalgas y los juveniles para determinar el peso seco y orgánico, la composición proximal (proteínas, carbohidratos y lípidos), las clorofilas *a* y *b* y los carotenoides totales, con la finalidad de determinar la especie de microalga con mayor valor nutricional en relación con estos compuestos y que, por ende, mejora la calidad nutricional de los juveniles de *A. franciscana*.

8. CAPÍTULO 1: CURVA DE CRECIMIENTO Y COMPOSICIÓN PROXIMAL DE LAS MICROALGAS

8.1. Objetivos particulares del capítulo:

- Determinar la fase de crecimiento exponencial de cada una de las cuatro especies de microalgas.

- Evaluar la composición proximal de las microalgas durante la fase de crecimiento exponencial.

8.2. Materiales y métodos

8.2.1. Cultivo de las microalgas

Los cultivos de las microalgas se realizaron en agua de mar tomada de la bahía de Mazatlán, la cual pasó por tres filtros de cartucho colocados en serie con capacidad de retención de 10, 5 y 1 µm de diámetro y después el agua fue pasada por un cartucho de carbón activado con el propósito de eliminar la materia orgánica disuelta. Posteriormente, el agua filtrada se desinfectó con hipoclorito de sodio comercial al 5% a razón de 1 $mL \cdot L^{-1}$ y se dejó reposar por un mínimo de 24 h. Antes de su utilización, se eliminó el cloro residual adicionando 60 mg de tiosulfato de sodio por cada litro de agua de mar clorada (Hemerick, 1973).

La preparación del medio f se realizó de acuerdo con la formulación de Guillard y Ryther (1962) empleándose la metodología descrita en Voltolina *et al*. (1989).

Durante toda la fase experimental, la salinidad del agua de mar se mantuvo a 35 ups (unidades prácticas de salinidad). El aire comprimido para los cultivos se suministró en forma continua con un soplador (blower) de 2.5 HP y antes de entrar a los cultivos fue pasado por un filtro de cartucho de 1 µm de poro. La aireación facilitó el intercambio de gases y además permitió mantener a las microalgas en suspensión, procurando con esto que todas las células estuvieran expuestas a la misma cantidad de iluminación, misma que fue continua y suministrada por seis lámparas fluorescentes de luz blanca que proporcionaron una intensidad de 6,000-6,500 luxes. Además, se

mantuvieron a una temperatura de 25 °C, utilizando aparatos de aire acondicionado en la sala de cultivos.

Para la producción de las microalgas (Figura 2), primeramente, se realizaron inóculos del cultivo, utilizando la técnica de transferencias sucesivas. A partir del contenido de un tubo de ensayo de aproximadamente 15 mL de cultivo con las cepas de: *T. weissflogii*, *C. muelleri*, *T. suecica* y *Nannochloropsis sp.,* se inocularon 500 mL de medio en un matraz Erlenmeyer con una capacidad de 3 L. Después de 48 h o del tiempo necesario para cada especie, se inocularon 3 L de medio en un recipiente de plástico transparente y de ahí se inoculó en garrafones de plástico transparentes con un volumen de trabajo de 15 L (Zazueta-Patrón, 2016). La densidad inicial de los cultivos fue de 10,000 cel·mL^{-1}, 200,000 cel·mL^{-1}, 25,000 cel·mL^{-1} y 300,000 cel·mL^{-1} para TH-W-1, CH-M- 1, TE-S-1 y NN-X-1, respectivamente.

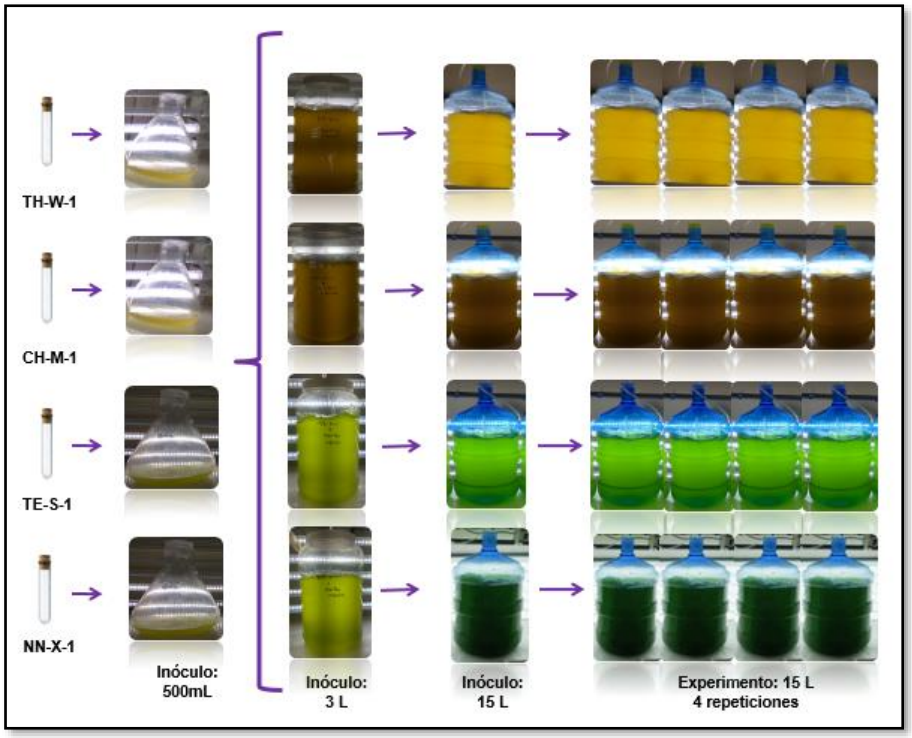

Figura 2. Producción de las microalgas *Thalassiosira weissflogii* (TH-W-1), *Chaetoceros muelleri* (CH-M-1), *Tetraselmis suecica* (TE-S-1) y *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1).

En los cultivos preliminares, la densidad celular y la tasa de división celular diaria acumulada (∑μ) se determinaron cada 24 horas hasta que finalizaron los cultivos.

También, cada 24 h se midió el pH con un potenciómetro Corning Checkmite modelo pH-10 precalibrado con estándares de pH conocidos de 7 y 10. La densidad celular de los cultivos de las microalgas se evaluó mediante conteos directos con un microscopio compuesto Olympus CH30RF100, utilizando un hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad, equipado con reglilla de Neubauer. Además, durante la fase del crecimiento exponencial de los cultivos, se tomaron muestras de volumen y densidad celular conocidos, para determinar el peso seco (PS) y el peso orgánico (PO); así como la composición proximal.

8.2.2. Determinación de peso seco y peso orgánico

Para la estimación del peso seco y orgánico, se utilizaron filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C de 47 mm, los cuales fueron lavados previamente con agua destilada para eliminar residuos e impurezas y a su vez, quemados en una mufla Thermolyne modelo 48000 a una temperatura de 450 °C para calcinar cualquier vestigio orgánico. Luego fueron precalibrados a peso constante en una balanza analítica Denver Instruments modelo M-220D con precisión de lectura de 0.01 mg. Ya que las muestras estuvieron concentradas sobre los filtros, se lavaron con 3-4 mL de una solución de formiato de amonio al 4%, el cual es isosmótico con el agua de mar y permite eliminar los residuos de sal marina que interfieren en el cálculo final de los pesos, a la vez que preserva la integridad de las microalgas.

Los filtros con las muestras se colocaron en una estufa Thermo Scientific Lindberg/Blue M a una temperatura de 60 °C. Posteriormente se pesaron cada 24 horas hasta verificar que alcanzaron un peso constante. Después, los filtros con las muestras se calcinaron en la mufla a 450 °C durante 8 horas y se pesaron, repitiendo el procedimiento hasta obtener el peso constante correspondiente a la cantidad de cenizas. La cantidad de sustancia orgánica fue calculada a partir de la diferencia entre el peso seco de las microalgas retenidas en el filtro y el peso de las cenizas obtenidas (Sorokin, 1973).

8.2.3. Composición proximal

La composición proximal de las microalgas se determinó en términos de proteínas, lípidos y carbohidratos. La concentración de proteínas se determinó con el método de

Lowry *et al.* (1951), previo a realizar una extracción en calor durante 15 minutos con hidróxido de sodio 0.1 N. La extracción de los carbohidratos se realizó con ácido sulfúrico de acuerdo con Whyte (1987), procediendo posteriormente a la cuantificación con el procedimiento de Dubois *et al*. (1956). La extracción de los lípidos totales se llevó a cabo según la metodología propuesta por Bligh y Dyer (1959) y su cuantificación se hizo con el método de Pande *et al*. (1963). En todos los métodos descritos anteriormente se consideraron las modificaciones sugeridas por López-Elías *et al*. (1995).

8.2.4. Análisis estadísticos

Primeramente, se aplicaron pruebas de normalidad y homocedasticidad a las distintas variables, para determinar la aplicación de un método estadístico paramétrico o no paramétrico (Zar, 2010). Los datos de peso seco, peso orgánico y composición proximal se compararon entre especies de microalgas por número de muestreo. Se realizó un análisis de varianza de una vía para datos paramétricos o un Kruskal-Wallis para datos no paramétricos, cuando los datos no cumplieron con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas. Cuando los análisis revelaron la existencia de diferencias significativas, estas se determinaron mediante la prueba de comparaciones múltiples de Student-Newman-Keuls (SNK). Todos los análisis estadísticos se hicieron en los programas SigmaStat 3.5 y Statistica10, con un nivel de significancia del 5%.

8.3. Resultados

8.3.1. Densidad celular

En el caso de TH-W-1 el cultivo se inició con una densidad celular de 10,000 cel·mL^{-1}, la cual fue aumentando hasta alcanzar un máximo de 398,438 cel·mL^{-1} al tercer día. Posteriormente, la densidad celular disminuyó paulatinamente hasta llegar a un mínimo de 249,375 cel·mL^{-1} al décimo día (Figura 3a). Para el caso de CH-M-1, el inóculo inicial fue de 200,000 cel·mL^{-1} y alcanzó su densidad celular máxima al tercer día con 3,567,188 cel·mL^{-1}, mientras que la densidad celular final (séptimo día) fue de 2,281,250 cel·mL^{-1} (Figura 3b). Los cultivos de TE-S-1 (Figura 3c) se iniciaron con una densidad celular de 25,000 cel·mL^{-1} y la densidad celular fue incrementando hasta

1,438,438 cel·mL^{-1} al cuarto día. Los días siguientes la concentración celular disminuyó hasta llegar a 1,062,500 cel·mL^{-1} al séptimo día. Finalmente, para NN-X-1 (Figura 3d) se inició el cultivo con una densidad de 300,000 cel·mL^{-1} y para el día 13 alcanzó una concentración celular máxima de 54,140,625 cel·mL^{-1}. Al finalizar el cultivo (día 15) la densidad celular fue de 46,132,813 cel·mL^{-1}.

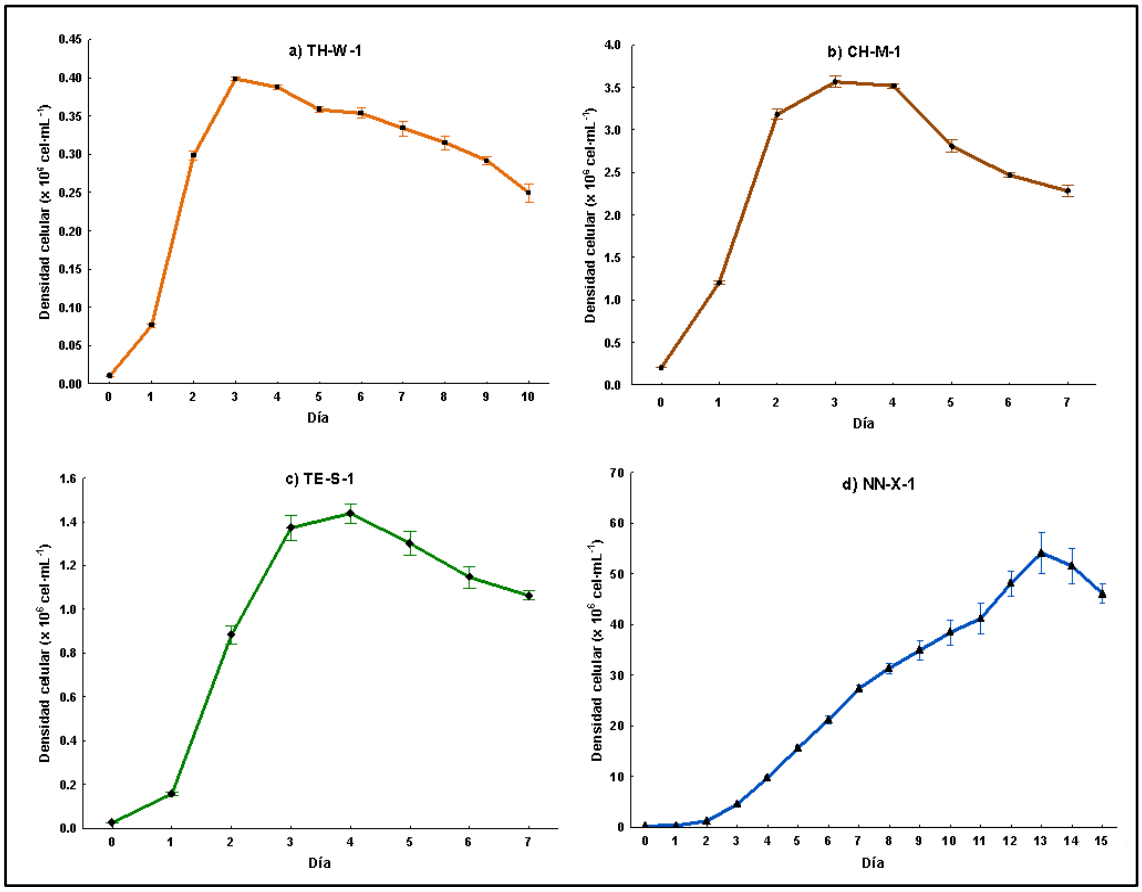

Figura 3. Densidad celular (x10^6 cel·mL^{-1}) de las microalgas *T. weissflogii* (TH-W-1), *C. muelleri* (CH-M-1), *T. suecica* (TE-S-1) y *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1) cultivadas con el medio f. Los resultados son valores promedio ± E.S. (n = 4).

8.3.2. Tasa de división celular diaria acumulada (∑μ)

El mayor número de divisiones celulares se observó durante el tercer día de cultivo tanto para TH-W-1 como para CH-M-1. En tanto que las microalgas TE-S-1 y NN-X-1 registraron su máxima ∑μ los días 4 y 13 del cultivo, respectivamente (Figura 4). NN-X-1 fue la especie que tuvo el mayor número de divisiones celulares, alcanzando una ∑μ de 7.5, lo que indicó que la población celular se dividió poco más de 7 veces hasta llegar a alcanzar su máxima densidad celular. Por su parte, TH-W-1 y TE-S-1

registraron poco más de 5 divisiones celulares, cuyos valores más altos fueron de 5.3 y 5.8. Por último, las divisiones celulares de CH-M-1 fueron menores a las registradas por las otras especies, logrando un máximo de 4.2 divisiones celulares (Figura 4).

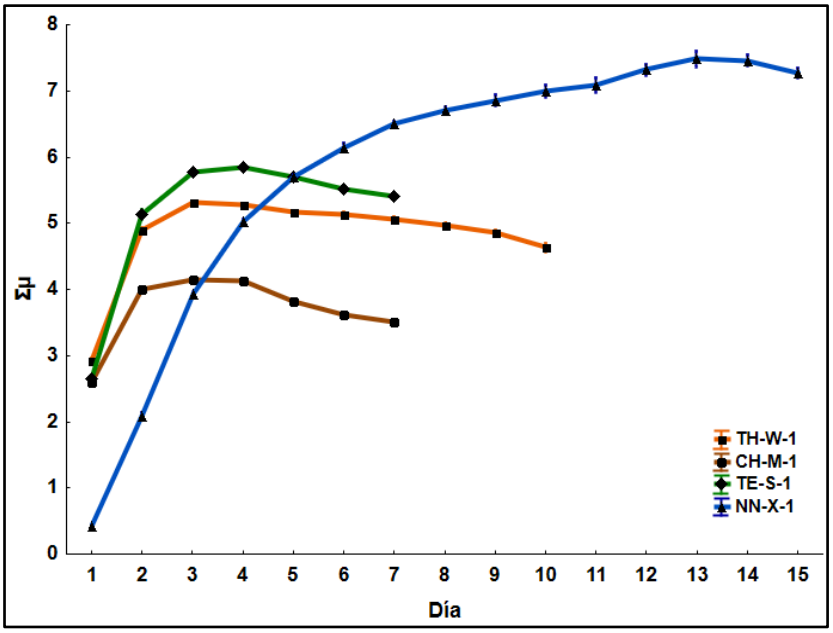

Figura 4. Tasa de división celular diaria acumulada (∑μ) de las microalgas *T. weissflogii* (TH-W-1), *C. muelleri* (CH-M-1), *T. suecica* (TE-S-1) y *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1) cultivadas con el medio f. Los resultados son valores promedio ± E.S. (n = 4).

8.3.3. pH

En lo que respecta al pH, los valores registrados fluctuaron entre los 7.9±0.0 y 10.4±0.1 (Figura 5). En general, el pH tendió a incrementar conforme avanzaban los días de cultivo y aumentaba la densidad celular. Posteriormente, al entrar en la fase estacionaria, los valores de pH empezaron a decaer; con excepción de CH-M-1, que mostró una tendencia fluctuante. Para TH-W-1 el pH fue de 8.4 a 9.4, mientras que para CH-M-1 el valor mínimo fue de 8.6 y el máximo de 10.4. En el caso de TE-S-1 el valor menor fue de 7.9 y el mayor de 9.5. Por su parte, el pH de NN-X-1 varió entre 8.1 y 9.0.

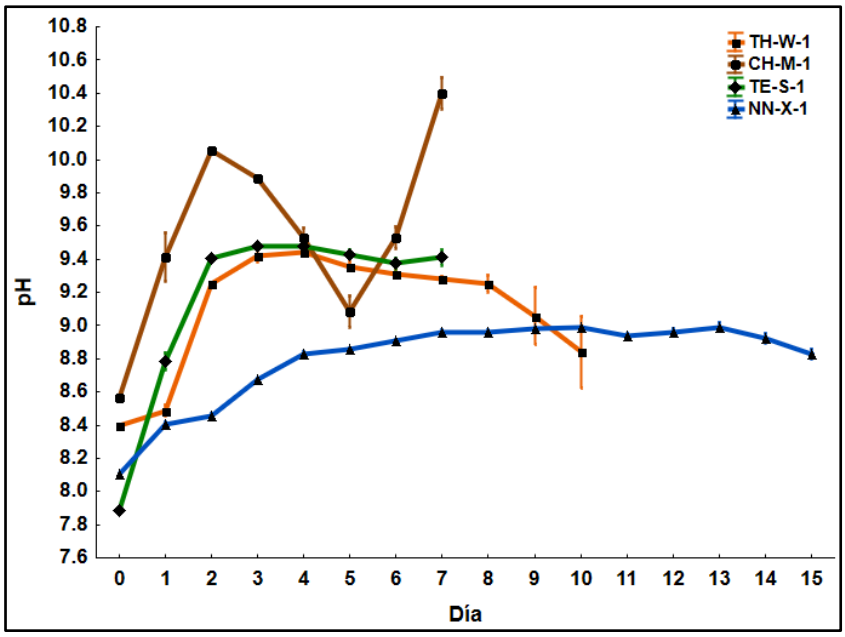

Figura 5. pH de las microalgas *T. weissflogii* (TH-W-1), *C. muelleri* (CH-M-1), *T. suecica* (TE-S-1) y *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1) cultivadas con el medio f. Los resultados son valores promedio ± E.S. (n = 4).

8.3.4. Peso seco y peso orgánico

Los valores de peso seco y peso orgánico se compararon entre las cuatro especies de microalgas por día de muestreo. Para TH-W-1, CH-M-1 y TE-S-1, los muestreos se realizaron durante el segundo, tercero y cuarto día del cultivo. Sin embargo, para NN-X-1 los muestreos fueron del cuarto al sexto día, debido a que su crecimiento es mucho más lento que el de las otras especies. En el caso del volumen de producción de biomasa seca, TH-W-1 tuvo valores que fueron de los 89.63 a los 179.89 $\mu g \cdot mL^{-1}$ (Cuadro 1). Por su parte, CH-M-1 presentó poca variación respecto a los días de muestreo, pues los valores de peso seco estuvieron entre 244.92 y 275.56 $\mu g \cdot mL^{-1}$. Para TE-S-1 fluctuaron entre los 68.69 y 108.75 $\mu g \cdot mL^{-1}$. Y para NN-X-1 se registró un mínimo de 75.25 y un máximo de 144.05 $\mu g \cdot mL^{-1}$. Cabe señalar que, durante los tres días de muestreo, CH-M-1 fue la microalga que registró los valores más altos de peso seco, mostrando diferencias significativas ($P < 0.05$) con las otras especies. En contraste, TE-S-1 fue la especie que registró los valores más bajos, siendo estos significativamente inferiores al resto de las microalgas.

Por otra parte, tomando en cuenta la producción de biomasa seca por célula, TH-W-1 registró valores que fueron de los 300.87 a los 461.00 $pg \cdot cel^{-1}$, mismos que fueron

estadísticamente superiores al resto de las microalgas (Cuadro 1). Las concentraciones de PS unitario para CH-M-1 (74.22-77.29 pg·cel^{-1}) y TE-S-1 (65.50 - 78.80 pg·cel^{-1}) no presentaron diferencias significativas entre sí, pero estas especies si mostraron diferencias con los valores registrados por NN-X-1 (6.79-7.68 pg·cel^{-1}), los cuales fueron significativamente inferiores ($P < 0.05$).

Cuadro 1. Peso seco en µg·mL^{-1} y en pg·cel^{-1} de las microalgas *T. weissflogii* (TH-W-1), *C. muelleri* (CH-M-1), *T. suecica* (TE-S-1) y *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1) cultivadas con el medio f. Los resultados son valores promedio ± E.S. (n = 4).

PESO SECO en µg·mL^{-1}				
MUESTREO	TH-W-1	CH-M-1	TE-S-1	NN-X-1
1	89.63^{b} ±1.80	244.92^{c} ±4.76	68.69^{a} ±3.41	75.25^{a} ±2.20
2*	146.09^{c} ±1.93	275.56^{d} ±9.73	89.20^{a} ±1.77	114.49^{b} ± 4.18
3*	179.89^{c} ±2.52	261.44^{d} ±10.62	108.75^{a} ± 2.48	144.05^{b} ± 6.14
PESO SECO en pg·cel^{-1}				
1*	300.87^{c} ±7.09	76.98^{b} ±1.85	78.80^{b} ±7.26	7.68^{a} ±0.23
2*	366.64^{c} ±3.44	77.29^{b} ±2.66	65.50^{b} ±3.66	7.31^{a} ±0.13
3	461.00^{c} ±4.83	74.22^{b} ±2.52	75.82^{b} ±2.89	6.79^{a} ±0.07

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre las especies por día de muestreo ($P < 0.05$).
* prueba no paramétrica. Los muestreos se realizaron del segundo al cuarto día del cultivo para TH-W-1, CH-M-1 y TE-S-1 y del cuarto al sexto día para NN-X-1.

Con relación al volumen de producción de biomasa orgánica, las concentraciones de PO para las microalgas TH-W-1 (63.59-133.98 µg·mL^{-1}) y NN-X-1 (68.63-129.07 µg·mL^{-1}) no mostraron diferencias significativas entre sí. Sin embargo, CH-M-1 registró valores que fueron de 156.13 a 178.57 µg·mL^{-1}, mismos que fueron estadísticamente superiores al resto de las microalgas (Cuadro 2). En el caso de TE-S-1 (49.86-89.50 µg·mL^{-1}), los valores fueron inferiores a los registrados por las otras especies.

En cuanto al contenido del peso orgánico celular o unitario, TH-W-1 registró valores entre 213.39 y 343.14 pg·cel^{-1}, los cuales fueron significativamente mayores a los obtenidos por las otras microalgas durante los tres días de muestreo (Cuadro 2). Para CH-M-1 los valores fueron de 49.06 a 50.51 pg·cel^{-1} y para TE-S-1 el valor mínimo registrado fue de 52.93 pg·cel^{-1} y el máximo de 62.35 pg·cel^{-1}, no encontrándose diferencias significativas entre estas dos especies, con excepción del último día de muestreo, donde TE-S-1 fue mayor a CH-M-1. Por otra parte, los valores de NN-X-1 (6.08-7.00 pg·cel^{-1}), fueron menores en comparación con los obtenidos por las otras especies.

De acuerdo con los resultados de biomasa obtenida como mg de peso orgánico por g de peso seco, para TH-W-1 se tuvieron valores entre 696.39 y 744.42 mg·g^{-1} (Cuadro 2). Para CH-M-1 los valores fueron de 638.07 a 682.33 mg·g^{-1}. Por su parte, el valor mínimo registrado para TE-S-1 fue de 727.60 mg·g^{-1} y el máximo de 823.34 mg·g^{-1}. En el caso de NN-X-1, los valores fluctuaron entre 851.50 y 913.30 mg·g^{-1}. Contrario a lo que sucedió con el peso seco, NN-X-1 fue la microalga que registró los mayores valores de biomasa orgánica durante los tres días de muestreo, presentando diferencias significativas ($P < 0.05$) respecto a las otras especies.

Cuadro 2. Peso orgánico en µg·mL^{-1}, pg·cel^{-1} y en mg·g^{-1} de PS de las microalgas *T. weissflogii* (TH-W-1), *C. muelleri* (CH-M-1), *T. suecica* (TE-S-1) y *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1) cultivadas con el medio f. Los resultados son valores promedio ± E.S. (n = 4).

PESO ORGÁNICO en µg·mL^{-1}				
MUESTREO	TH-W-1	CH-M-1	TE-S-1	NN-X-1
1	63.59^{b} ±1.59	156.13^{c} ±1.38	49.86^{a} ±1.65	68.63^{b} ±2.01
2	101.76^{b} ±2.57	178.57^{c} ±3.05	72.29^{a} ±0.93	97.52^{b} ±4.02
3	133.98^{b} ±3.74	177.82^{c} ±3.31	89.50^{a} ±1.60	129.07^{b} ± 5.97
PESO ORGÁNICO en pg·cel^{-1}				
1*	213.39^{c} ±5.28	49.06^{b} ±0.54	57.07^{b} ±4.29	7.00^{a} ±0.02
2*	255.32^{c} ±4.98	50.10^{b} ±1.15	52.93^{b} ±1.84	6.22^{a} ±0.10
3*	343.14^{d} ±6.20	50.51^{b} ±0.69	62.35^{c} ±1.81	6.08^{a} ±0.05
PESO ORGÁNICO en mg·g^{-1} de PS				
1	709.28^{b} ±5.60	638.07^{a} ±11.18	727.60^{b} ±13.06	913.30^{c} ±27.84
2	696.39^{a} ±12.08	649.61^{a} ±16.67	811.31^{b} ±18.59	851.50^{b} ±12.65
3	744.42^{b} ±12.45	682.33^{a} ±18.98	823.34^{c} ±8.81	895.63^{d} ±7.50

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre las especies por día de muestreo ($P < 0.05$). * prueba no paramétrica. Los muestreos se realizaron del segundo al cuarto día del cultivo para TH-W-1, CH-M-1 y TE-S-1 y del cuarto al sexto día para NN-X-1

8.3.5. Composición proximal

Respecto a los resultados de proteínas en términos de volumen de producción, en todos los días de muestreo, CH-M-1 registró valores (58.68-70.92 µg·mL^{-1}) significativamente superiores ($P < 0.05$) al resto de las microalgas. Mientras que los

valores para TH-W-1 fueron desde 24.67 a 47.64 µg·mL^{-1}, para TE-S-1 de 23.23 a 51.28 µg·mL^{-1} y para NN-X-1 de 24.09 a 41.24 µg·mL^{-1}. Cabe señalar que, en todas las especies, la concentración de proteínas tendió a incrementar conforme avanzaban los días del cultivo (Cuadro 3).

En cuanto a las concentraciones de carbohidratos, TH-W-1 registró valores que fueron de los 29.86 a los 61.91 µg·mL^{-1}, siendo, en todos los casos, significativamente superiores ($P < 0.05$) respecto a los registrados en las otras especies de microalgas. CH-M-1 presentó concentraciones entre 18.93 y 20.24 µg·mL^{-1}. TE-S-1 registró un mínimo de 15.50 µg·mL^{-1} y un máximo de 30.22 µg·mL^{-1}. En tanto que para NN-X-1 las concentraciones variaron de 10.71 a 20.12 µg·mL^{-1}, siendo estas concentraciones, inferiores al resto de las microalgas (Cuadro 3).

Referente a las concentraciones de lípidos, TH-W-1 presentó una concentración mínima de 44.35 µg·mL^{-1} y una máxima de 69.72 µg·mL^{-1}, siendo la microalga que registró las mayores concentraciones ($P < 0.05$) de lípidos en comparación con las otras especies para los tres días de muestreo. CH-M-1 registró valores entre 40.90 y 60.24 µg·mL^{-1}. TE-S-1 alcanzó concentraciones que fueron de los 22.15 a los 39.66 µg·mL^{-1}. Finalmente, NN-X-1 obtuvo valores entre 23.91 y 40.58 µg·mL^{-1} (Cuadro 3).

Cuadro 3. Proteínas, carbohidratos y lípidos en µg·mL^{-1} de las microalgas *T. weissflogii* (TH-W-1), *C. muelleri* (CH-M-1), *T. suecica* (TE-S-1) y *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1) cultivadas con el medio f. Los resultados son valores promedio ± E.S. (n = 4).

PROTEÍNAS				
MUESTREO	TH-W-1	CH-M-1	TE-S-1	NN-X-1
1	24.61^{a} ±2.01	58.68^{b} ±4.57	23.23^{a} ±0.66	24.09^{a} ±1.90
2	37.45^{a} ±0.49	63.15^{b} ±2.91	35.93^{a} ±2.31	33.63^{a} ±1.58
3	47.64^{ab} ±1.30	70.92^{c} ±2.17	51.28^{b} ±3.41	41.24^{a} ±1.60
CARBOHIDRATOS				
1	29.86^{d} ±1.29	19.07^{c} ±0.90	15.50^{b} ±1.51	10.71^{a} ±0.40
2*	44.60^{d} ±2.16	18.93^{b} ±0.49	24.25^{c} ±0.68	15.87^{a} ±0.88
3*	61.91^{c} ±2.97	20.24^{a} ±1.00	30.22^{b} ±0.39	20.12^{a} ±0.64
LÍPIDOS				
1	44.35^{d} ±0.65	40.90^{c} ±0.85	22.15^{a} ±0.20	23.91^{b} ±0.11
2	64.53^{c} ±2.43	48.77^{b} ±0.49	35.22^{a} ±0.78	33.19^{a} ±1.91
3	69.72^{c} ±2.82	60.24^{b} ±2.01	39.66^{a} ±0.87	40.58^{a} ±1.24

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre las especies por día de muestreo ($P < 0.05$).
* prueba no paramétrica. Los muestreos se realizaron del segundo al cuarto día del cultivo para TH-W-1, CH-M-1 y TE-S-1 y del cuarto al sexto día para NN-X-1

El contenido de proteínas expresado por unidad celular mostró que TH-W-1 presentó concentraciones significativamente más altas respecto al resto de las microalgas, con valores de los 82.69 a los 122.99 pg·cel^{-1} de proteínas. Seguida de los valores obtenidos por TE-S-1 (26.36-35.62 pg·cel^{-1}), CH-M-1 (17.73-20.16 pg·cel^{-1}) y, por último, NN-X-1 presentó los valores más bajos de proteínas, los cuales fueron de 1.95 a 2.45 pg·cel^{-1} (Cuadro 4).

De igual manera que para las proteínas, los contenidos de carbohidratos y lípidos en TH-W-1, 100.18-159.70 pg·cel^{-1} y 149.03-179.81 pg·cel^{-1}, respectivamente, fueron significativamente superiores en comparación al resto de las microalgas, seguida de TE-S-1 con (17.73-21.07 pg·cel^{-1} y 25.26-27.59 pg·cel^{-1}) y de CH-M-1 con (5.31-5.99 pg·cel^{-1} y 12.84-17.12 pg·cel^{-1}). Mientras que los valores más bajos se registraron en NN-X-1 con 0.95-1.09 pg·cel^{-1} y 1.92-2.44 pg·cel^{-1}, esto para carbohidratos y lípidos, respectivamente (Cuadro 4).

Cuadro 4. Proteínas, carbohidratos y lípidos en pg·cel^{-1} de las microalgas *T. weissflogii* (TH-W-1), *C. muelleri* (CH-M-1), *T. suecica* (TE-S-1) y *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1) cultivadas con el medio f. Los resultados son valores promedio ± E.S. (n = 4).

PROTEÍNAS				
MUESTREO	TH-W-1	CH-M-1	TE-S-1	NN-X-1
1*	82.69^{d} ±7.23	18.49^{b} ±1.61	26.46^{c} ±1.25	2.45^{a} ±0.15
2	93.99^{d} ±0.77	17.73^{b} ±0.93	26.36^{c} ±2.17	2.15^{a} ±0.05
3*	122.99^{d} ±3.86	20.16^{b} ±0.74	35.62^{c} ±1.95	1.95^{a} ±0.04
CARBOHIDRATOS				
1*	100.18^{d} ±4.06	5.99^{b} ±0.26	17.92^{c} ±2.55	1.09^{a} ±0.03
2*	111.85^{d} ±4.76	5.31^{b} ±0.10	17.73^{c} ±0.52	1.01^{a} ±0.03
3*	159.70^{d} ±7.04	5.74^{b} ±0.24	21.07^{c} ±0.72	0.95^{a} ±0.01
LÍPIDOS				
1*	149.03^{d} ±4.79	12.84^{b} ±0.12	25.26^{c} ±1.21	2.44^{a} ±0.06
2*	161.99^{d} ±6.33	13.69^{b} ±0.28	25.78^{c} ±0.97	2.12^{a} ±0.12
3*	179.81^{d} ±6.13	17.12^{b} ±0.64	27.59^{c} ±0.30	1.92^{a} ±0.06

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre las especies por día de muestreo ($P < 0.05$). * prueba no paramétrica. Los muestreos se realizaron del segundo al cuarto día del cultivo para TH-W-1, CH-M-1 y TE-S-1 y del cuarto al sexto día para NN-X-1.

Respecto a la concentración de proteínas en la biomasa algal, expresada en $mg \cdot g^{-1}$ de peso seco, TE-S-1 presentó concentraciones significativamente superiores respecto al resto de las microalgas, con valores de 341.66 hasta 471.66 $mg \cdot g^{-1}$. Mientras que CH-M-1 registró los valores más bajos, con una concentración mínima de 231.16 $mg \cdot g^{-1}$ y una máxima de 273.62 $mg \cdot g^{-1}$; pero sin mostrar diferencias significativas con los valores registrados para TH-W-1 y con el primer y tercer muestreo de NN-X-1 (Cuadro 5).

Con relación a los carbohidratos; TH-W-1 registró valores entre 305.06 y 343.74 $mg \cdot g^{-1}$, los cuales fueron significativamente superiores durante los tres días de muestreo, respecto a los valores registrados con el resto de las microalgas. En tanto que CH-M-1 registró los valores inferiores, los cuales estuvieron entre 69.06 y 77.96 $mg \cdot g^{-1}$, siendo diferentes a los encontrados en las otras especies de microalgas (Cuadro 5).

Respecto a los lípidos, TH-W-1 presentó una concentración mínima de 387.65 $mg \cdot g^{-1}$ y una máxima de 495.48 $mg \cdot g^{-1}$, no obstante, las concentraciones registradas por esta especie durante los tres días muestreados fueron significativamente mayores en comparación con las otras especies. Por otra parte, las concentraciones registradas por CH-M-1 (167.11 - 232.09 $mg \cdot g^{-1}$), fueron significativamente menores a las obtenidas por las otras especies (Cuadro 5).

Cuadro 5. Proteínas, carbohidratos y lípidos en mg·g^{-1} de PS de las microalgas *T. weissflogii* (TH-W-1), *C. muelleri* (CH-M-1), *T. suecica* (TE-S-1) y *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1) cultivadas con el medio f. Los resultados son valores promedio ± E.S. (n = 4).

MUESTREO	TH-W-1	CH-M-1	TE-S-1	NN-X-1
PROTEÍNAS				
1	274.55^{ab} ±21.64	239.64^{a} ±17.87	341.66^{b} ±24.09	320.76^{ab} ±25.71
2*	256.44^{a} ±3.31	231.16^{a} ±19.19	402.51^{c} ±22.54	293.47^{b} ±5.72
3	264.85^{a} ±7.00	273.62^{a} ±19.76	471.66^{b} ±29.98	286.81^{a} ±8.53
CARBOHIDRATOS				
1	332.86^{d} ±9.19	77.96^{a} ±3.89	224.80^{c} ±15.28	142.50^{b} ±4.71
2	305.06^{d} ±12.55	69.06^{a} ±3.83	272.42^{c} ±11.62	138.53^{b} ±5.32
3*	343.74^{d} ±12.48	77.42^{a} ±2.12	278.35^{c} ±7.67	139.94^{b} ±2.84
LÍPIDOS				
1	495.48^{c} ±13.37	167.11^{a} ±4.00	324.71^{b} ±15.87	318.57^{b} ±10.03
2	441.73^{d} ±15.99	177.85^{a} ±8.18	395.83^{c} ±16.51	290.13^{b} ±14.92
3	387.65^{c} ±15.74	232.09^{a} ±15.00	365.40^{c} ±13.19	282.64^{b} ±10.15

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre las especies por día de muestreo ($P < 0.05$). * prueba no paramétrica. Los muestreos se realizaron del segundo al cuarto día del cultivo para TH-W-1, CH-M-1 y TE-S-1 y del cuarto al sexto día para NN-X-1.

Adicionalmente a la comparación proximal que se realizó entre especies de microalgas por día de muestreo expresada en distintas unidades, se compararon los porcentajes de la composición proximal (proteínas, carbohidratos y lípidos) con relación a la composición orgánica total (Cuadro 6). En el caso del porcentaje de proteína, CH-M-1

fue la especie que registró los mayores valores durante los tres días muestreo, mostrando diferencias significativas respecto a las otras especies. Dicha microalga alcanzó un 49.27%; en tanto que TH-W-1 fue la microalga que obtuvo la menor producción de proteínas, con un valor de 26.61%.

En lo que se refiere a carbohidratos, el mayor porcentaje se registró con la microalga TH-W-1, la cual alcanzó un 34.49% y mostró diferencias significativas con las otras especies. Por otro lado, CH-M-1 fue la microalga con el menor porcentaje de carbohidratos, registrando un máximo de 16.09% (Cuadro 6).

Finalmente, el mayor porcentaje de lípidos se encontró en la microalga TH-W-1, con 44.99% y fue significativamente ($P < 0.05$) mayor durante los tres días de muestreo, en comparación con las demás especies de microalgas. En tanto que TE-S-1 fue la especie que registró el menor porcentaje de lípidos, alcanzando un 37% (Cuadro 6).

Cuadro 6. Proteínas, carbohidratos y lípidos en % con base a la composición orgánica total, de las microalgas *T. weissflogii* (TH-W-1), *C. muelleri* (CH-M-1), *T. suecica* (TE-S-1) y *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1) cultivadas con el medio f. Los resultados son valores promedio ± E.S. (n = 4).

PROTEÍNAS				
MUESTREO	TH-W-1	CH-M-1	TE-S-1	NN-X-1
1	24.79[a] ±1.30	49.27[c] ±1.95	38.22[b] ±1.43	40.85[b] ±1.57
2	25.57[a] ±0.35	48.19[d] ±0.88	37.57[b] ±1.54	40.68[c] ±0.63
3	26.61[a] ±0.95	46.82[c] ±0.72	42.18[b] ±1.44	40.43[b] ±0.45
CARBOHIDRATOS				
1*	30.22[d] ±0.84	16.09[a] ±0.59	25.35[c] ±2.00	18.26[b] ±0.33
2	30.41[d] ±1.20	14.48[a] ±0.31	25.43[c] ±0.41	19.20[b] ±0.68
3*	34.49[d] ±0.93	13.41[a] ±0.87	25.02[c] ±0.74	19.74[b] ±0.18
LÍPIDOS				
1	44.99[c] ±1.37	34.64[a] ±1.51	36.43[a] ±0.79	40.89[b] ±1.43
2	44.02[b] ±1.38	37.33[a] ±0.67	37.00[a] ±1.26	40.12[a] ±1.21
3	38.90[b] ±1.37	39.77[b] ±0.74	32.80[a] ±0.88	39.83[b] ±0.47

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre las especies por día de muestreo ($P < 0.05$).
* prueba no paramétrica. Los muestreos se realizaron del segundo al cuarto día del cultivo para TH-W-1, CH-M-1 y TE-S-1 y del cuarto al sexto día para NN-X-1.

8.3.6. Comparación de las variables durante la fase de crecimiento exponencial de los cultivos

Se realizó una comparación de los valores obtenidos durante la fase de crecimiento exponencial para los distintos parámetros analizados, con la finalidad de analizar la

existencia de diferencias entre las especies de microalgas. Los valores que se compararon corresponden a los registrados en el segundo día para TH-W-1, CH-M-1 y TE-S-1 y el cuarto día para NN-X-1, debido a que en estos días se presentó dicha fase.

Con relación a la ∑μ, las microalgas TE-S-1 y NN-X-1 obtuvieron el mayor número de divisiones celulares, siendo significativamente diferentes a TH-W-1 y CH-M-1 (Cuadro 7). Para el pH, CH-M-1 registró el pH más alto y NN-X-1 el más bajo. Respecto al PS y PO en volumen de producción ($\mu g \cdot mL^{-1}$), CH-M-1 fue la microalga que registró los mayores valores, en comparación con las otras especies. En cuanto a la cantidad de biomasa obtenida por célula ($pg \cdot cel^{-1}$), TH-W-1 obtuvo las concentraciones más altas de PS y PO. Por otra parte, tomando en cuenta los mg de peso orgánico obtenidos por g de peso seco ($mg \cdot g^{-1}$), NN-X-1 fue la microalga que presentó una mayor concentración (Cuadro 7).

Cuadro 7. ∑μ, pH, PS en $\mu g \cdot mL^{-1}$ y en $pg \cdot cel^{-1}$; PO en $\mu g \cdot mL^{-1}$, $pg \cdot cel^{-1}$ y en $mg \cdot g^{-1}$ de PS de las microalgas *T. weissflogii* (TH-W-1), *C. muelleri* (CH-M-1), *T. suecica* (TE-S-1) y *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1) cultivadas durante la fase de crecimiento exponencial. Los resultados son valores promedio ± E.S. (n = 4).

VARIABLE	**ESPECIE**			
	TH-W-1	CH-M-1	TE-S-1	NN-X-1
*∑μ	4.90^{b} ± 0.03	3.99^{a} ± 0.03	5.14^{c} ± 0.07	5.03^{c} ± 0.04
pH	9.25^{b} ± 0.01	10.06^{d} ± 0.01	9.40^{c} ± 0.02	8.83^{a} ± 0.02
PS en $\mu g \cdot mL^{-1}$	89.63^{b} ±1.80	244.92^{c} ±4.76	68.69^{a} ±3.41	75.25^{a} ±2.20
PO en $\mu g \cdot mL^{-1}$	63.59^{b} ±1.59	156.13^{c} ±1.38	49.86^{a} ±1.65	68.63^{b} ±2.01
*PS en $pg \cdot cel^{-1}$	300.87^{c} ±7.09	76.98^{b} ± 1.85	78.80^{b} ± 7.26	7.68^{a} ± 0.23
*PO en $pg \cdot cel^{-1}$	213.39^{c} ±5.28	49.06^{b} ±0.54	57.07^{b} ±4.29	7.00^{a} ±0.02

PO en mg·g^{-1}	709.28^{b} ±5.60	638.07^{a} ±11.18	727.60^{b} ±13.06	913.30^{c} ±27.84

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre las especies por día de muestreo ($P < 0.05$). * prueba no paramétrica. Los valores que se compararon corresponden a los registrados en el segundo día del cultivo para TH-W-1, CH-M-1 y TE-S-1 y el cuarto día para NN-X-1.

Además, se compararon las concentraciones de proteínas carbohidratos y lípidos en distintas unidades, así como los porcentajes obtenidos para dichas determinaciones durante la fase de crecimiento exponencial de cada microalga, de acuerdo con los días mencionados anteriormente (día 2 para TH-W-1, CH-M-1 y TE-S-1 y día 4 para NN-X-1) (Cuadro 8). Donde se observó que el contenido de proteínas varió en dependencia de la unidad en la que se presentaron los resultados. Siendo significativamente superior en CH-M-1 con relación al volumen (µg·mL^{-1}), mientras que por unidad celular (pg·cel^{-1}), la mayor concentración se registró en TH-W-1, siendo superior al resto de las microalgas. Respecto a la biomasa por peso seco (mg·g^{-1}), TE-S-1 fue la microalga con mayor concentración de proteínas, mostrando diferencias únicamente con CH-M-1. En lo que se refiere a las concentraciones de carbohidratos y lípidos en las distintas unidades, la microalga TH-W-1 presentó los valores más altos para estas determinaciones, mostrando diferencias significativas con las otras especies. Finalmente, el porcentaje de proteínas con relación a la materia orgánica de CH-M-1 fue significativamente mayor a las otras especies; en tanto que, para carbohidratos y lípidos, la microalga TH-W-1 fue la que obtuvo los porcentajes más altos de dichos compuestos.

Cuadro 8. Proteínas, carbohidratos y lípidos en µg·mL^{-1}, pg·cel^{-1}, mg·g^{-1} de PS y % con base a la composición orgánica total de las microalgas *T. weissflogii* (TH-W-1), *C. muelleri* (CH-M-1), *T. suecica* (TE-S-1) y *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1) cultivadas durante la fase de crecimiento exponencial. Los resultados son valores promedio ± E.S. (n = 4).

		ESPECIES			
Variable	Unidad	TH-W-1	CH-M-1	TE-S-1	NN-X-1
PROTEÍNAS	µg·mL^{-1}	24.61^{a} ±2.01	58.68^{b} ±4.57	23.23^{a} ±0.66	24.09^{a} ±1.90
	pg·cel^{-1}	82.69^{d} ±7.23	18.49^{b} ±1.61	26.46^{c} ±1.25	2.45^{a} ±0.15
	mg·g^{-1}	274.55^{ab} ±21.64	239.64^{a} ±17.87	341.66^{b} ±24.09	320.76^{ab} ±25.71
	%	24.79^{a} ±1.30	49.27^{c} ±1.95	38.22^{b} ±1.43	40.85^{b} ±1.57
CARBOHIDRATOS	µg·mL^{-1}	29.86^{d} ±1.29	19.07^{c} ±0.90	15.50^{b} ±1.51	10.71^{a} ±0.40
	pg·cel^{-1}	100.18^{d} ±4.06	5.99^{b} ±0.262	17.92^{c} ±2.55	1.09^{a} ±0.03
	mg·g^{-1}	332.86^{d} ±9.19	77.96^{a} ±3.89	224.80^{c} ±15.28	142.50^{b} ±4.71
	%	30.22^{d} ±0.84	16.09^{a} ±0.59	25.35^{c} ±2.00	18.26^{b} ±0.33
LÍPIDOS	µg·mL^{-1}	44.35^{d} ±0.65	40.90^{c} ±0.85	22.15^{a} ±0.20	23.91^{b} ±0.11
	pg·cel^{-1}	149.03^{d} ±4.79	12.84^{b} ±0.12	25.26^{c} ±1.21	2.44^{a} ±0.06
	mg·g^{-1}	495.48^{c} ±13.37	167.11^{a} ±4.00	324.71^{b} ±15.87	318.57^{b} ±10.03
	%	44.99^{c} ±1.37	34.64^{a} ±1.51	36.43^{a} ±0.79	40.89^{b} ±1.43

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre las especies por día de muestreo ($P < 0.05$).

8.4. Discusión

8.4.1. Curva de crecimiento

En el cultivo discontinuo o por lotes, la población pasa por las distintas fases de crecimiento, ajustándose generalmente a una función logística, produciéndose cambios fisiológicos en la población a medida que transcurre el tiempo de cultivo (Hu, 2013). Esto se observó en las curvas de crecimiento de las cuatro especies de microalgas cultivadas; pues la densidad celular aumentó hasta llegar a la fase exponencial, en la cual la velocidad de crecimiento adquirió su valor máximo y la concentración celular aumentó rápidamente. Para TH-W-1, CH-M-1 y TE-S-1, la fase exponencial se presentó el primer día de cultivo, mientras que para NN-X-1 dicha fase inició el tercer día. Conforme avanzaron los días, los cultivos entraron en la fase de desaceleración, donde la tasa de división celular comenzó a disminuir. Esto debido a que los nutrientes se fueron consumiendo y, por lo tanto, las microalgas tuvieron una menor disponibilidad de estos. Al entrar en la fase estacionaria, las densidades celulares se mantuvieron relativamente constantes. Los cultivos se finalizaron cuando entraron a la fase de muerte, donde las células experimentaron limitación de nutrientes y la densidad celular disminuyó rápidamente (García-Romeral *et al*. 2017).

8.4.2. Densidad celular

Con relación a las densidades celulares, se pudo observar que la microalga de menor tamaño, NN-X-1, fue la que alcanzó una concentración celular mucho mayor en comparación con las demás, llegando a más de $50x10^6$ cel·mL^{-1}. En contraste con TH-W-1 que, al ser la especie de mayor tamaño, registró las densidades celulares más bajas (< $0.40x10^6$ cel·mL^{-1}).

Por otra parte, al sexto día de cultivo, las densidades celulares de TH-W-1 ($0.353x10^6$ cel·mL^{-1}) y CH-M-1 ($2.468x10^6$ cel·mL^{-1}) de este estudio fueron más altas que las obtenidas por Gómez *et al*. (2016), donde se tuvieron concentraciones de $0.202x10^6$ cel·mL^{-1} y $0.930x10^6$ cel·mL^{-1}, respectivamente, para las mismas especies. Asimismo, la concentración obtenida en TE-S-1 ($1.146x10^6$ cel·mL^{-1}) fue mayor a la reportada por dichos autores para la microalga *T. chuii* ($0.500x10^6$ cel·mL^{-1}). En el caso de NN-X-1,

la densidad celular ($21.225x10^6$ cel·mL^{-1}) fue menor a la observada por Zazueta-Patrón (2016), quien registró densidades celulares mayores a $30x10^6$ cel·mL^{-1} para esta misma especie. Esto pudo deberse a las condiciones experimentales utilizadas, además a que el volumen experimental de este estudio fue de 15 L, mientras que el volumen utilizado en dicha referencia fue de 3 L, lo cual contribuye a que haya mayor incidencia de luz y, por ende, mayor concentración celular. Es por esto que, si se desean obtener mayores biomasas algales, es imprescindible tener en cuenta tanto la profundidad de los recipientes como la concentración con la que se trabajará, a manera de garantizar que la luz llegue a la mayor cantidad de células posibles. A pesar de que una mayor profundidad permite el almacenamiento de un mayor volumen, la luz no será capaz de llegar a las zonas más interiores. Asimismo, se debe tomar en cuenta que, concentraciones elevadas de biomasa algal en el reactor perjudicarán la transferencia de la luz a través del medio líquido (Lores-Subirats, 2015).

8.4.3. Tasa de división celular diaria acumulada (∑μ)

En este estudio las tasas de división celular diaria acumulada más altas fueron de 5.8 y 7.5 para las microalgas TE-S-1 y NN-X-1, respectivamente, las cuales son similares a las reportadas por Zazueta-Patrón (2016), quien obtuvo valores de ∑μ superiores a 5 divisiones celulares para TE-S-1 durante el cuarto día y valores cercanos a 8 divisiones para NN-X-1 el día 13 del cultivo. De igual forma, los resultados de ∑μ para la microalga CH-M-1 (4.2) concuerdan con lo reportado por López-Elías *et al*. (2015), quienes obtuvieron valores de 4.6 para dicha microalga. Por otra parte, la ∑μ de TH-W-1 (5.3) de este estudio fue superior a la registrada por López-Elías *et al.* (2009), quienes utilizaron la microalga *T. pseudonana* (3.23).

8.4.4. pH

Por otro lado, el intervalo óptimo de pH de la mayoría de las microalgas se encuentra entre 7 y 9 (Pástor y Pozo, 2013), por lo que valores menores o mayores de pH influyen en la productividad del crecimiento algal. Las microalgas son capaces de tolerar incrementos de pH, más no su descenso, ya que los valores ácidos suelen ser letales (Park *et al*. 2011). Esto no representó un problema en el presente estudio, ya que todos los valores de pH registrados fueron superiores a 7. Asimismo, se observó que al inicio

del experimento los valores de pH eran relativamente más bajos respecto a los siguientes días, lo cual se relaciona con la captación de nutrientes y fijación fotosintética de CO_2 en los cultivos de microalgas, puesto que provoca un aumento en el pH del medio (Franchino *et al*. 2013).

Los valores de pH de este estudio para las microalgas CH-M-1 (8.6-10.4) y TH-W-1 (8.4-9.4) fueron superiores a los encontrados por Villa *et al*. (2014) y Aké-Castillo (2015), quienes utilizaron a las microalgas *C. calcitrans* (6.7-7.5) y *T. cedarkeyensis* (6.7-8.2), respectivamente. De igual forma, los resultados de pH para NN-X-1 (8.1-9.0) y TE-S-1 (7.9-9.5) concuerdan con lo reportado por Zazueta-Patrón (2016), quien tuvo valores de (8.0-8.6) y de (7.9-9.1) para dichas microalgas. Es importante mencionar que CH-M-1 presentó una tendencia diferente en comparación con las otras especies de microalgas, ya que el quinto día registró un valor muy bajo y después aumentó considerablemente. Esta variación puede deberse a que el pH del cultivo está influenciado por varios factores como la productividad algal, la respiración, la alcalinidad y composición iónica del medio de cultivo, así como la actividad microbiana autotrófica y heterotrófica y la eficiencia del sistema de adición de CO_2 (Park *et al.* 2011).

8.4.5. Peso seco y peso orgánico

Las concentraciones de PS y PO por volumen de producción para TE-S-1 y NN-X-1 fueron menores a las registradas por Zazueta-Patrón (2016) con estas mismas especies. Estas diferencias pudieron deberse a que, en el presente estudio, los muestreos se realizaron durante la fase exponencial y el autor en cuestión realizó los muestreos durante la fase de desaceleración. De igual manera, los resultados obtenidos en esta investigación fueron inferiores a los registrados por Soto-León *et al*. (2014) para TE-S-1 y por Botte *et al*. (2017) para TH-W-1.

Por otra parte, si se considera el PS y PO por célula, los valores de CH-M-1 de este estudio fueron inferiores a los reportados por Cázares-Salazar (2014). Asimismo, los valores de TE-S-1 y NN-X-1 obtenidos en esta investigación fueron menores a las concentraciones registradas por Anzueto-Sánchez (2014) para TE-S-1 y *N. oculata.*

Sin embargo, los valores de NN-X-1 fueron similares a los encontrados por Rojo-Cebreros *et al*. (2012) para esta misma especie.

8.4.6. Composición proximal

8.4.6.1. Proteínas

Es importante mencionar que cuando las concentraciones de la composición proximal (proteínas, carbohidratos y lípidos) se miden por volumen de producción, éstas estuvieron en función de la densidad celular de los cultivos. Tomando en cuenta el volumen de producción de proteínas, los resultados obtenidos en este estudio fueron superiores para CH-M-1 a los reportados por Rosales-Loaiza *et al*. (2012) con la microalga *Chaetoceros* sp. Por otra parte, los resultados de proteínas por célula obtenidos en este estudio para CH-M-1 fueron menores en comparación a las concentraciones registradas por Piña *et al.* (2007) para esta misma especie. En cuanto al contenido de proteínas por biomasa de CH-M-1, Duy *et al*. (2017) y Carbajal-López (2008), registraron concentraciones superiores a las obtenidas en este estudio para las microalgas CH-M-1 y *C. calcitrans,* respectivamente.

Por otro lado, los valores de proteínas por volumen de producción para TE-S-1 de este estudio fueron inferiores a los registrados por Ochoa-García (2016) y por Soto-León *et al*. (2014) con esta misma especie; pero superiores a los reportados por Palacios-Bohórquez (2016) con *Tetraselmis* sp. Respecto a los resultados de proteínas por célula obtenidos en este estudio para TE-S-1, estos fueron menores en comparación a las concentraciones registradas por Piña *et al.* (2007) y por Montoya-Vallejo y Acosta-Cárdenas (2016), para las microalgas TE-S-1 y *Tetraselmis* sp., respectivamente; pero mayores a los obtenidos por Palacios-Bohórquez (2016) con *Tetraselmis* sp. En tanto que las concentraciones de proteínas de TE-S-1 y NN-X-1 con base al peso seco obtenidas en esta investigación, fueron superiores a las reportadas por Carbajal-López (2008) con las microalgas TE-S-1 y *N. oculata.*

Al considerar las concentraciones de proteínas de TH-W-1 por célula obtenidas en este estudio, estas fueron menores en comparación a las registradas por Piña *et al.* (2007)

para esta misma especie. No obstante, al considerar la producción de proteínas por peso seco, la concentración más alta de TH-W-1 obtenida en esta investigación, fue similar a la registrada por García *et al.* (2012) con esta misma especie durante la fase estacionaria y con el medio de cultivo f/2.

8.4.6.2. Carbohidratos

En el caso de los carbohidratos, los valores obtenidos en este estudio para CH-M-1 fueron similares a los encontrados por Nieves *et al*. (2009) para esta misma especie, pero superiores a los reportados por Rosales-Loaiza *et al*. (2012) para *Chaetoceros* sp. Respecto a las concentraciones de carbohidratos de CH-M-1 por célula, los valores obtenidos en este estudio fueron menores a los registrados por Piña *et al.* (2007) para esta misma especie. Por último, los resultados de carbohidratos con base al peso seco de este estudio para CH-M-1 fueron mayores a los reportados por Carbajal-López (2008) para *C. calcitrans.*

En cuanto a los carbohidratos de TE-S-1 por volumen de producción, los valores obtenidos en este estudio fueron inferiores a los registrados por Soto-León e*t al.* (2014) para esta misma especie; pero superiores a los encontrados por Palacios-Bohórquez (2016) para *Tetraselmis* sp. Respecto a las concentraciones de carbohidratos de TE-S-1 por célula, estas fueron menores a las reportadas por Montoya-Vallejo y Acosta-Cárdenas (2016) y Palacios-Bohórquez (2016), respectivamente, quienes utilizaron la microalga *Tetraselmis* sp. Además, los valores unitarios para TE-S-1 fueron similares a los reportados por Piña *et al.* (2007). Por otro lado, cuando se evaluaron a los carbohidratos de TE-S-1 y NN-X-1 en $mg \cdot g^{-1}$ de peso seco, los valores obtenidos en este estudio fueron superiores a los registrados por Carbajal-López (2008) para TE-S-1 y *N. oculata.*

Respecto a las concentraciones de carbohidratos por célula, los valores obtenidos en esta investigación para TH-W-1 fueron similares a los reportadas por Piña *et al.* (2007) para la misma especie. Por otra parte, cuando se evaluaron a los carbohidratos de TH-W-1 en $mg \cdot g^{-1}$ de peso seco, el valor obtenido en este estudio fue superior al registrado por García *et al.* (2012) para la misma especie.

8.4.6.3. Lípidos

Con relación al contenido de lípidos, los volúmenes de producción de TH-W-1 encontrados en este estudio fueron inferiores a los encontrados por Botte *et al*. (2017), para esta misma especie; pero superiores a las concentraciones obtenidas por Lin *et al*. (2018) con la misma microalga. Tomando en cuenta la producción de lípidos por célula, las concentraciones registradas en este trabajo fueron similares a las encontradas por Piña *et al.* (2007) para la microalga TH-W-1. En cuanto a la producción de mg de lípidos·g^{-1} de peso seco, los valores obtenidos en este trabajo para TH-W-1 fueron superiores a los obtenidos por García *et al*. (2012) para esta misma especie.

Tomando en cuenta los lípidos de CH-M-1 por volumen de producción, los valores encontrados en este estudio fueron superiores a los registrados por Rosales-Loaiza *et al*. (2012) y Nieves *et al*. (2009), para las microalgas *Chaetoceros* sp. y CH-M-1, respectivamente. Asimismo, las concentraciones obtenidas en este estudio fueron mayores que las reportadas por Lin *et al*. (2018) para esta misma especie. Respecto a la producción de lípidos por célula, las concentraciones obtenidas en este trabajo fueron similares a las encontradas por Piña *et al.* (2007) para la microalga CH-M-1. En cuanto a la producción de mg de lípidos·g^{-1} de peso seco, las concentraciones obtenidas en este estudio para CH-M-1, fueron superiores a las registradas por Carbajal-López (2008) para *C. calcitrans* y a las reportadas por Duy *et al*. (2017) para CH-M-1.

Por otro lado, los valores de lípidos por volumen de producción de TE-S-1 encontrados en este estudio fueron inferiores a los registrados por Soto-León *et al*. (2014) y Escobar-Gil y Cano-Manrique (2015) para esta misma especie; pero superiores a los encontrados por Palacios-Bohórquez (2016) para *Tetraselmis* sp. Al considerar la producción de lípidos por célula, las concentraciones obtenidas en este trabajo fueron similares a las encontradas por Piña *et al.* (2007) para la misma especie. En cuanto a la producción de lípidos con base al peso seco, las concentraciones registradas en este estudio para TE-S-1 fueron superiores a las registradas por Carbajal-López (2008) con la misma microalga.

Respecto al contenido de lípidos de NN-X-1 por célula, los valores encontrados en este estudio fueron similares a las concentraciones registradas por Martínez-Brown (2001) para esta misma especie. En cuanto a la producción de lípidos de NN-X-1 por biomasa, las concentraciones obtenidas en este estudio fueron superiores a las registradas por Carbajal-López (2008) para *N. oculata*.

8.4.6.4. Porcentajes de la composición proximal

De acuerdo con los porcentajes de la composición proximal obtenidos en este estudio, TH-W-1 presentó un mayor contenido de lípidos, seguido de carbohidratos y en menor cantidad de proteínas. Por su parte, para CH-M-1 y TE-S-1*,* el mayor porcentaje fue para proteínas, seguido de lípidos y en menor proporción los carbohidratos. En tanto que para NN-X-1, los porcentajes de proteínas y lípidos fueron muy similares, siendo los carbohidratos los de menor porcentaje. No obstante, al comparar los porcentajes de composición proximal obtenidos en este estudio con otros autores, se puede observar que los porcentajes de lípidos y carbohidratos para TH-W-1*,* fueron superiores a los encontrados por Vázquez-Suárez *et al*. (2013) con la microalga *T. pseudonana*. Para CH-M-1, los porcentajes de carbohidratos y lípidos obtenidos en este trabajo fueron mayores a los registrados por Velasco *et al*. (2016) para esta misma especie. Asimismo, los porcentajes de carbohidratos y lípidos de TE-S-1 obtenidos en el presente trabajo, fueron mayores a los encontrados por Zazueta-Patrón (2016), pero inferiores en el caso de las proteínas. En tanto que para NN-X-1, el porcentaje de proteínas fue similar al registrado en esta investigación y al obtenido por Zazueta-Patrón (2016), pero el contenido lipídico fue mayor al registrado por el autor mencionado anteriormente.

8.5. Conclusiones

Se identificó la fase de crecimiento exponencial de las especies de microalgas analizadas, lo cual permitió seleccionar el día en que se utilizó a las microalgas como alimento para los juveniles de *A. franciscana*, siendo el día 2 para *T. weissflogii*, *C. muelleri* y *T. suecica* y el día 4 para *Nannochloropsis* sp. Además, se determinó el contenido lipídico de las cuatro especies de microalgas en la fase de crecimiento

exponencial para elaborar una dieta isolipídica que se usó para alimentar a juveniles de *Artemia franciscana*. Dicho contenido fue de 149.03 pg·cel^{-1} para *T. weissflogii*, 12.84 pg·cel^{-1} para *C. muelleri*, 25.26 pg·cel^{-1} para *T. suecica* y de 2.44 pg·cel^{-1} para *Nannochloropsis* sp.

9. CAPÍTULO 2: TASA DE INGESTIÓN Y CONTENIDO DE PROTEÍNAS Y LÍPIDOS DE LOS JUVENILES DE *A. franciscana*

9.1. Objetivos particulares del capítulo:

- Evaluar la tasa de ingestión de los juveniles de *A. franciscana* alimentados con tres densidades celulares de *C. muelleri* y dos niveles de iluminación (con luz y sin luz) después de 3 y 6 horas.

- Realizar las equivalencias lipídicas entre las cuatro especies de microalgas de interés (TH-W-1, CH-M-1, TE-S-1 y NN-X-1) tomando en cuenta la densidad celular seleccionada y el contenido lipídico de *C. muelleri* durante la fase de crecimiento exponencial.

9.2. Materiales y métodos

9.2.1. Cultivo de *Artemia franciscana*

Para la obtención de los nauplios de *A. franciscana* se siguió el procedimiento estándar de hidratación-descapsulación-incubación de los quistes (Figura 6), siguiendo algunas de las recomendaciones propuestas por Sorgeloos *et al.* (1986). La hidratación se realizó en recipientes de plástico transparentes durante 1 h en agua dulce (1 L) y suministrando aireación constante. Posteriormente se retiró la aireación y se desechó el sobrenadante (agua, residuos y quistes no viables). Después, los quistes fueron cosechados con la ayuda de un tamiz provisto con una malla de luz de 105 µm y transferidos a un recipiente con una capacidad de un litro para su descapsulación. Como solución decapsuladora, se utilizó hipoclorito de sodio comercial al 5% a razón de 125 mL de cloro por cada 10 gramos de quistes. Una vez agregado el hipoclorito, se mantuvo agitación intensa durante aproximadamente 3 minutos, hasta que la coloración de los quistes se tornó naranja, indicando con ello la degradación del corión. Inmediatamente después, los quistes se lavaron con abundante agua dulce para

eliminar el cloro residual y evitar cualquier daño. Los quistes descapsulados se incubaron durante 24 horas en un recipiente de plástico cónico, con una capacidad de 1.5 L de agua de mar a 35 ups, aireación e iluminación constante y una temperatura de 28 °C. Una vez eclosionada la *A. franciscana*, fue cosechada y transferida a un recipiente con un volumen útil de 14 L y una densidad de 2 *Artemia*·mL^{-1}.

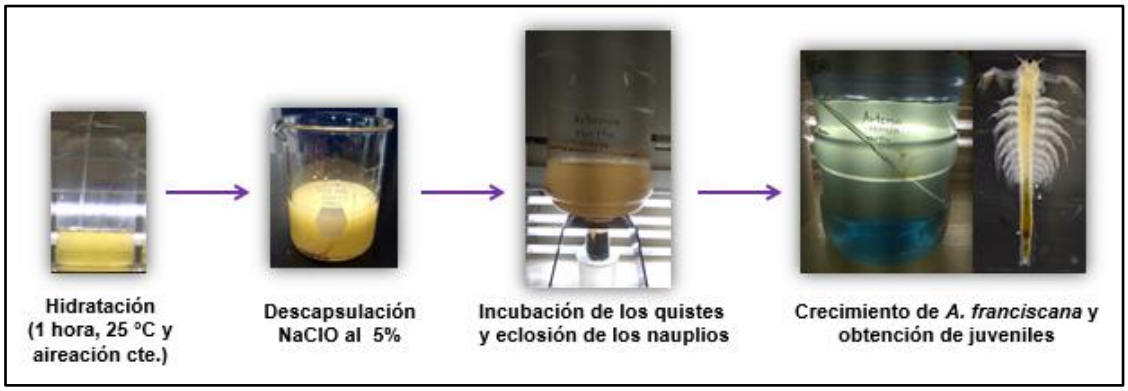

Figura 6. Producción de juveniles *Artemia franciscana.*

La *A. franciscana* se alimentó diariamente con la microalga *C. muelleri*, durante un periodo de 8 días para su crecimiento y la obtención de juveniles, de acuerdo con la tasa de alimentación obtenida de estudios previos (Cuadro 9). Asimismo, durante el cultivo de crecimiento de la *Artemia*, se realizaron recambios diarios del 30% con agua de mar, con la finalidad de eliminar los residuos de materia orgánica contenidos en el recipiente.

Cuadro 9. Cuadro de alimentación para *A. franciscana* alimentada con la microalga *C. muelleri* (CH-M-1)**.**

DÍA	**CH-M-1** cel·mL^{-1}
0	100,000
1	150,000
2	200,000
3	250,000
4	300,000
5	400,000

6	550,000
7	650,000
8	750,000

9.2.2. Tasa de ingestión (TI) de los juveniles de *A. franciscana*

Una vez que se obtuvieron los juveniles de *A. franciscana*, se realizó el ensayo para evaluar la tasa de ingestión. Estos se iniciaron al día 9 de edad de los juveniles, y antes de iniciar el experimento, se revisó bajo el estereoscopio compuesto el intestino de los organismos y se verificó que estuviera vacío. Durante el experimento, se utilizó a la microalga *C. muelleri* como alimento y se probaron tres densidades celulares: 600,000 cel·mL^{-1}, 900,000 cel·mL^{-1} y 1,200,000 cel·mL^{-1}. Así como dos niveles de iluminación: con luz (CL) y sin luz (SL). Para los tratamientos CL, la iluminación fue continua y suministrada por dos lámparas fluorescentes de luz blanca que dieron una intensidad de 2000 luxes. En el caso de los tratamientos SL, los recipientes no tuvieron ningún tipo de iluminación. Además, estuvieron cubiertos con una cortina negra de plástico, esto para evitar cualquier interferencia de luz. La densidad de los juveniles de *A. franciscana* fue de 0.5 *Artemia*·mL^{-1} en cada uno de los tratamientos. Cada tratamiento constó de 3 repeticiones con un volumen útil de 1 L, por lo tanto, se tuvieron 9 unidades experimentales CL y 9 SL. También, se contó con un testigo (microalga sin *Artemia*) para cada unidad experimental, dando un total de 36 unidades experimentales. Se tomaron muestras a las 3 y a las 6 horas para realizar conteos de la microalga y determinar la tasa de ingestión de la *Artemia* (Figura 7).

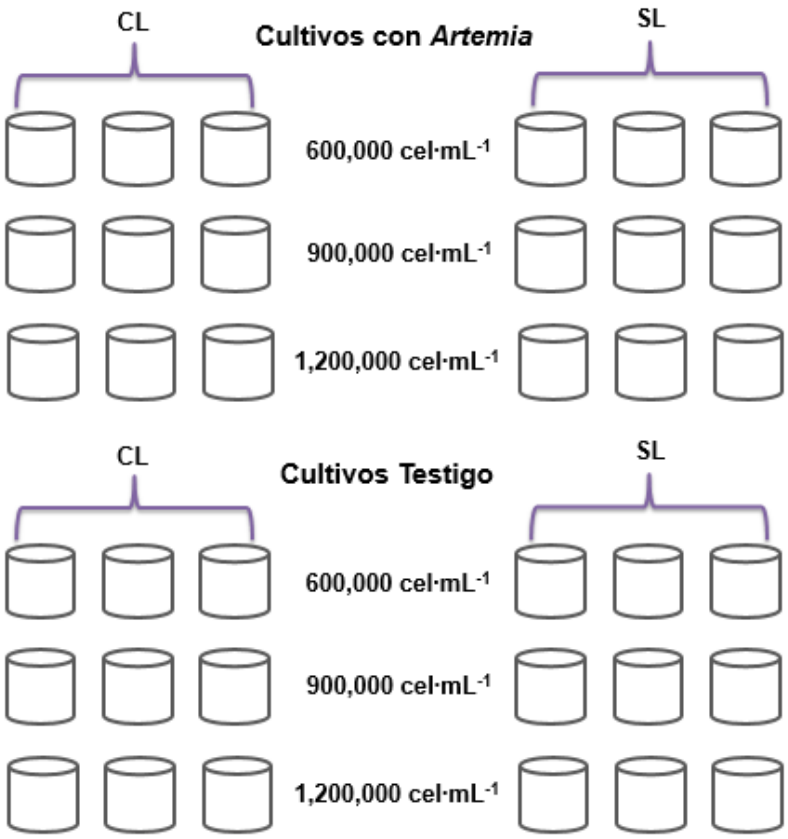

Figura 7. Diseño del experimento para evaluar la tasa de ingestión de juveniles de *A. franciscana* alimentados con tres densidades celulares de la microalga *C. muelleri* y expuestos a dos niveles de iluminación: con luz (CL) y sin luz (SL).

La tasa de ingestión de los juveniles de *A. franciscana* se determinó mediante la fórmula propuesta por Paffenhofer (1971):

$$I = \frac{V\,(Co - Ct)}{nt}$$

Donde:

TI = Tasa de ingestión en cel·ind^{-1}·h^{-1}

V = Volumen por unidad experimental en mL

Co = Concentración celular del testigo en cel·mL^{-1}

Ct = Concentración celular de la muestra en cel·mL^{-1}

n = Número de individuos por unidad experimental

t = Tiempo en horas

9.2.3. Proteínas y lípidos en juveniles de *A. franciscana*

El contenido de proteínas y lípidos de los juveniles de *Artemia* se determinó al finalizar el experimento (6 horas), empleando los métodos descritos anteriormente en el Capítulo 1, apartado 8.2.3.

9.2.4. Dieta isolipídica

Una vez determinado el tratamiento con el cual se obtuvo la mayor tasa de ingestión de los juveniles de *A. franciscana*, se calcularon las equivalencias lipídicas entre las cuatro especies de microalgas de interés de este estudio (*T. weissflogii*, *C. muelleri*, *T. suecica* y *Nannochloropsis* sp.), tomando como referencia el contenido lipídico de la microalga *C. muelleri* y la densidad celular seleccionada (Cuadro 13). Cabe señalar que para estas equivalencias se tomaron como referencias los contenidos lipídicos de las microalgas durante su fase de crecimiento exponencial, mismos que fueron determinados anteriormente, y cuyos valores se muestran en la Cuadro 8.

9.2.5. Análisis estadísticos

A los datos obtenidos de la tasa de ingesta, proteínas y lípidos, se les aplicó la prueba de normalidad de Lilliefors y la prueba de homocedasticidad de Bartlett (Zar, 2010) para definir la aplicación de métodos de análisis estadístico paramétrico o no paramétrico. Como los datos cumplieron con los supuestos estadísticos, se aplicó un análisis de varianza de dos factores para determinar las diferencias estadísticas entre los tratamientos, donde los factores fueron la densidad celular y la iluminación. Cuando los análisis revelaron la existencia de diferencias significativas, se aplicó la prueba de comparaciones múltiples de Student-Newman-Keuls (SNK) para determinar las diferencias entre los tratamientos. El efecto por factor (densidad celular e iluminación) se presenta como los promedios de los datos. Todos los análisis estadísticos se realizaron en el programa SigmaStat 3.5, con un nivel de significancia del 5%.

9.3. Resultados

Los nauplios de *A. franciscana* recién eclosionados registraron una longitud promedio de 0.23±0.01 mm, mientras que, al finalizar el cultivo, los juveniles alcanzaron una longitud promedio de 3.5± 0.12 mm y una supervivencia del 90% el día 9.

9.3.1. Tasa de ingestión (TI) de los juveniles de *A. franciscana*

La TI fue influenciada tanto por la densidad de alimento como por la condición de iluminación, ya que se observó una interacción entre los dos factores (densidad celular y luz) en ambos muestreos: a las 3 h (P = 0.013) y a las 6 h (P = 0.029).

La tasa de ingestión más alta de los juveniles de *Artemia* a las 3 h se registró con el tratamiento de 900,000 cel·mL^{-1} CL, alcanzando una tasa de ingestión de 253,118 ± 12,123 cel·ind^{-1}·h^{-1}, la cual mostró diferencias significativas con los otros tratamientos (Cuadro 10). En contraste, las menores tasas de ingestión se registraron con los tratamientos de 600,000 cel·mL^{-1}, tanto en condiciones CL como SL; así como con el tratamiento de 1,200,000 cel·mL^{-1} SL, cuyos valores fueron significativamente inferiores a los registrados por los otros tratamientos. Al evaluar los factores por separado (iluminación y densidad celular), se determinó que las tasas de ingestión más altas se obtuvieron en condiciones CL y con 900,000 cel·mL^{-1}, siendo significativamente mayores (P < 0.001) a las obtenidas por los otros tratamientos.

Cuadro 10. Tasa de ingestión (cel·ind^{-1}·h^{-1}) de juveniles de *Artemia franciscana*, alimentados con tres densidades celulares de *C. muelleri* y expuestos a dos niveles de iluminación: con luz (CL) y sin luz (SL), después de 3 horas. Los resultados son valores promedio ± E.S. (n = 3).

	Densidad celular (cel·mL^{-1})			
Iluminación	**600,000**	**900,000**	**1,200,000**	**Promedio**
CL	129,833^{a} ±10,191	253,118^{c} ±12,123	221,799^{b} ±17,150	201,583^{b} ±19,688
SL	124,993^{a} ±1,993	194,181^{b} ±2,482	148,910^{a} ±7,419	156,028^{a} ±10,408
Promedio	127,413^{a} ±4,768	223,649^{c} ±14,294	185,354^{b} ±18,316	
Valor de *p*				
Efecto cel·mL^{-1}	<0.001			
Efecto luz	<0.001			
cel·mL^{-1} *vs.* luz	0.013			

Letras diferentes en superíndice entre los dos factores (densidad celular y luz) indican diferencias significativas ($P < 0.05$). Prueba ANOVA de dos vías y prueba de comparaciones múltiples de SNK.

Respecto a las 6 horas, la mayor tasa de ingestión para los juveniles de *A. franciscana* se obtuvo con el tratamiento de 900,000 cel·mL^{-1} y SL, logrando un consumo de 164,712 ± 3,593 cel·ind^{-1}·h^{-1}, el cual fue significativamente mayor a los otros tratamientos (Cuadro 11). Por el contrario, la tasa más baja de ingestión se registró con el tratamiento de 1,200,000 cel·mL^{-1} y CL. Dicho valor fue significativamente menor ($P < 0.001$) a los registrados por los otros tratamientos. Cuando se evaluaron los efectos por separado (iluminación y densidad celular), se determinó que las tasas de ingestión más altas se obtuvieron SL y con 900,000 cel·mL^{-1}, presentando diferencias significativas ($P < 0.05$) respecto a los otros tratamientos.

Cuadro 11. Tasa de ingestión (cel·ind^{-1}·h^{-1}) de juveniles de *Artemia franciscana*, alimentados con tres densidades celulares de *C. muelleri* y expuestos a dos niveles de iluminación: con luz (CL) y sin luz (SL), después de 6 horas. Los resultados son valores promedio ± E.S. (n = 3).

	Densidad celular (cel·mL^{-1})			
Iluminación	**600,000**	**900,000**	**1,200,000**	**Promedio**
CL	66,767^{b} ±6,052	134,389^{c} ±10,239	45,413^{a} ±2,433	82,190^{a} ±13,859
SL	121,292^{c} ±2,502	164,712^{d} ±3,593	65,201^{b} ±5,482	117,068^{b} ±14,544
Promedio	94,030^{b} ±12,539	149,550^{c} ±8,338	55,307^{a} ±5,174^{a}	
Valor de *p*				
Efecto cel·mL^{-1}	<0.001			
Efecto Luz	<0.001			
cel·mL^{-1} *vs.* Luz	0.029			

Letras diferentes en superíndice entre los dos factores (densidad celular y luz) indican diferencias significativas ($P < 0.05$). Prueba ANOVA de dos vías y prueba de comparaciones múltiples de SNK.

9.3.2. Concentración de lípidos y proteínas de los juveniles de *A. franciscana*

Tanto la densidad celular como la iluminación influyeron en los resultados obtenidos de la concentración de lípidos, pues se encontró una interacción ($P = 0.038$) entre ambos factores. La concentración más alta de lípidos por organismo se obtuvo con el tratamiento de 900,000 cel·mL^{-1} SL alcanzando una concentración de 13.52±0.10 µg·org^{-1}, la cual mostró diferencias significativas con los otros tratamientos (Cuadro 12). En contraste, la menor concentración de lípidos se registró con el tratamiento de 1,200,000 cel·mL^{-1} CL, cuyo valor fue significativamente inferior ($P < 0.05$) a los registrados por el resto de los tratamientos. También se observó un efecto por factor; pues el contenido de lípidos fue significativamente mayor en los tratamientos SL. Asimismo, el mayor contenido de lípidos se obtuvo cuando los juveniles fueron alimentados con la densidad de 900,000 cel·mL^{-1}.

En el caso de las proteínas, no existió una interacción (*P* = 0.761) entre la densidad celular y la iluminación, por lo que las diferencias significativas se señalaron de manera general en los promedios de cada factor. Respecto a la densidad celular, la concentración más alta de proteínas por organismo se obtuvo con el tratamiento de 900,000 cel·mL^{-1}, alcanzando una concentración de 37.34±0.50 µg·org^{-1}, valor que fue significativamente superior a los otros tratamientos (Cuadro 12). Al evaluar el factor de la iluminación, se observó que la concentración más alta de proteínas (35.79 ± 0.76 µg·org^{-1}), se obtuvo en condiciones SL, la cual fue significativamente mayor a la obtenida en condiciones CL.

Cuadro 12. Proteínas y lípidos (µg·org^{-1}) de los juveniles de *Artemia franciscana* alimentados con tres densidades celulares de *C. muelleri* y expuestos a dos niveles de iluminación: con luz (CL) y sin luz (SL), después de 6 horas. Los resultados son valores promedio ± E.S. (n = 3).

		Densidad celular (cel·mL^{-1})			
		600,000	**900,000**	**1,200,000**	**Promedio**
Lípidos	**CL**	9.57^{b} ±0.15	12.10^{d} ±0.08	8.73^{a} ±0.11	10.13^{a} ±0.51
	SL	11.30^{c} ±0.13	13.52^{e} ±0.10	9.72^{b} ±0.17	11.52^{b} ±0.55
	Promedio	10.43^{b} ±0.40	12.81^{c} ±0.32	9.23^{a} ±0.24	
	Valor de *p*				
	Efecto cel·mL^{-1}	<0.001			
	Efecto luz	<0.001			
	cel·mL^{-1} *vs.* Luz	0.038			
Proteínas	**CL**	33.55^{a} ±0.36	36.41^{a} ±0.50	31.37^{a} ±0.37	33.78^{a} ±0.76
	SL	35.89^{a} ±0.32	38.28^{a} ±0.36	33.19^{a} ±0.36	35.79^{b} ±0.76
	Promedio	34.72^{b} ±0.57	37.34^{c} ±0.50	32.28^{a} ±0.47	
	Valor de *p*				

Efecto cel·mL^{-1}	<0.001
Efecto luz	<0.001
cel·mL^{-1} *vs.* Luz	0.761

Letras diferentes en superíndice entre los dos factores (densidad celular y luz) indican diferencias significativas ($P < 0.05$). Pruebas ANOVA de dos vías y prueba de comparaciones múltiples de SNK.

9.3.3. Equivalencia lipídica entre las cuatro especies de microalgas

Con base a los resultados preliminares obtenidos, se seleccionó la densidad celular de 900,000 cel·mL^{-1} para llevar a cabo el experimento con juveniles de *A. franciscana* alimentados con las cuatro especies de microalgas (Cap. 3). Dicho valor permitió determinar dietas isolipídicas, tomando como base el contenido lipídico de la microalga *C. muelleri* (12.84 pg de lípidos·cel^{-1}) durante la fase de crecimiento exponencial. Por lo tanto, si multiplicamos la densidad celular seleccionada (900,000 cel·mL^{-1}) por la cantidad de lípidos por célula (12.84 pg de lípidos·cel^{-1}), da como resultado 11,556,000 pg de lípidos·mL^{-1}, cantidad que tiene que ser equivalente para cada especie de microalga. Por consiguiente, para obtener esta cantidad de lípidos, se necesitaron: 900,000 cel·mL^{-1} de *C. muelleri*, 77,541 cel·mL^{-1} de *T. weissflogii*, 457,482 cel·mL^{-1} de *T. suecica* y 4,736,065 cel·mL^{-1} de *Nannochloropsis* sp. (Cuadro 13).

Cuadro 13. Contenido de lípidos en pg·cel^{-1} y equivalencia en cel·mL^{-1} de las microalgas *C. muelleri* (CH-M-1), *T. weissflogii* (TH-W-1), *T. suecica* (TE-S-1) y *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1).

	CH-M-1	**TH-W-1**	**TE-S-1**	**NN-X-1**
Contenido de lípidos en pg·cel^{-1}	12.84	149.03	25.26	2.44
Equivalencia en cel·mL^{-1}	900,000	77,541	457,482	4,736,065

9.4. Discusión

9.4.1. *Artemia franciscana*

La microalga *C. muelleri* es considerada una de las dietas vivas más apropiada para el cultivo de *A. franciscana*, debido a que dichos organismos presentan un desarrollo óptimo y altos porcentajes de supervivencia al ser alimentados con esta especie (Naegel, 1999; De Micco y Hubbard, 2001). Es por esta razón que se utilizó dicha microalga para la producción de los juveniles de *Artemia* y como base para determinar la dieta isolipídica con las otras tres especies de microalgas del presente trabajo.

Los resultados del crecimiento de *A. franciscana* (3.53 ± 0.12 mm) alimentada con la microalga *C. muelleri* fueron superiores a los encontrados por Rivera-Reyes (2013), quien obtuvo una longitud promedio de 2.80 mm para la *Artemia,* utilizando la misma microalga que en el presente estudio. De igual manera, la supervivencia registrada fue mayor (90%) en comparación con la obtenida por este autor (78.90%). Por otra parte, la longitud obtenida fue similar a la reportada por Godínez *et al*. (2004), quienes tuvieron una longitud de 3.72 mm, usando las mismas especies.

Cabe mencionar, que, durante los primeros días del crecimiento de la *A. franciscana*, los organismos mostraron una tendencia de ser atraídos hacia la luz; la cual posteriormente cambió, pues los organismos se alejaban de esta. A pesar de que los estudios sobre el efecto de la luz en el comportamiento de *Artemia* son escasos, los resultados de esta investigación son similares a los encontrados por Gallego-Galiano (2011), quien mantuvo un cultivo de *A. franciscana* durante quince días y observó que dichos organismos presentaron un comportamiento variable frente a la luz a lo largo de su desarrollo, hasta llegar a la etapa de adulto, mostrando inicialmente un fototropismo positivo, seguido de una fase de fototropismo negativo y finalmente fototropismo positivo.

Es posible que el comportamiento que presenta la *Artemia* en función de la iluminación y de la edad de los organismos, esté vinculado a las necesidades de las primeras fases larvarias, durante las cuales prefieren aguas superficiales, mismas que tienen mayor presencia de luz y temperaturas favorables para su desarrollo, pero que también les

permite alimentarse de la producción primaria (Cebrián y Valiela, 1999). Aunado a esto, el desarrollo de la *Artemia* requiere de la realización de varias mudas que permiten el desprendimiento del exoesqueleto quitinoso y el aumento de la masa muscular, así como el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios hasta llegar a la fase adulta (Castrejón *et al.*, 1993). Durante estas fases de muda los organismos son particularmente vulnerables, por lo que es posible que las larvas muestren un fototropismo negativo como respuesta a la búsqueda de aguas más profundas o refugio, que reduzca tal vulnerabilidad frente a posibles depredadores. Una vez que la *Artemia* ha alcanzado el tamaño de adulto, mostraría nuevamente un comportamiento de fototropismo positivo en busca de la capa más iluminada donde se concentra el fitoplancton que le sirve de alimento (Isenmann, 1975).

9.4.2. Tasa de ingestión de los juveniles de *A. franciscana*

Por otra parte, la tasa de ingestión de los organismos filtradores se define como la cantidad de alimento ingerido por un organismo por unidad de tiempo (Paffenhofer, 1971). De manera general, se observó que la tasa de ingestión de los juveniles de *A. franciscana* fue mayor durante el primero muestreo (3 h) y conforme pasó el tiempo esta tendió a disminuir, obteniendo valores de la TI menores durante el segundo muestreo (6 h). En el caso de los tratamientos CL, el consumo de las 6 horas respecto a las 3 horas, disminuyó en un 51% para la densidad de 600,000 cel·mL^{-1}, 53% para la de 900,000 cel·mL^{-1} y 80% para 1,200,000 cel·mL^{-1}. No obstante, en los tratamientos SL, la TI a las 6 horas disminuyó 3%, 15% y 56% para las densidades celulares de 600,000 cel·mL^{-1}, 900,000 cel·mL^{-1} y 1,200,000 cel·mL^{-1}, respecto a las 3 horas. La disminución del consumo conforme pasó el tiempo pudo deberse a que los organismos consumieron más alimento al inicio porque tenían el intestino vacío y requerían de la ingesta de alimento para cubrir sus necesidades energéticas y nutricionales, lo cual no fue así en el segundo muestreo.

Además, a las 3 h, la tasa de ingestión fue mayor en los tratamientos CL, mientras que a las 6 h los tratamientos que permanecieron SL fueron los que registraron la mayor tasa de ingestión. No obstante, durante ambos muestreos (3 y 6 h), la mayor tasa de ingestión se obtuvo con el tratamiento de 900,000 cel·mL^{-1}, por lo que esta densidad

celular podría ser la óptima para alimentar a juveniles de *A. franciscana*. En este sentido, determinar la tasa de ingestión es de gran utilidad, ya que es un índice que contribuye a desarrollar una buena estrategia alimenticia. Si la TI aumenta, esto significa que la cantidad de alimento suministrado debe aumentar también, por otro lado, si la TI disminuye, se debe disminuir la cantidad de alimento suministrado. Un aumento en la TI puede ser un reflejo de una mejora en el suministro de alimento (You *et al*., 2008).

Para el caso de la mayor densidad celular (1,200,000 cel·mL^{-1}), el consumo fue menor en comparación a las otras densidades, lo cual pudo ser debido a que dicha concentración superó el límite de consumo de la *Artemia*. Desde el punto de vista de la respuesta funcional del consumidor, la tasa de ingestión es directamente proporcional a la concentración de alimento hasta la concentración limitante incipiente (CLI), a partir de la cual, la tasa de ingestión se hace independiente de la concentración de alimento (Ramos-Jiliberto, 1995).

Los resultados de este estudio no concuerdan con lo registrado por Lora-Vilchis (2004), quien observó que las tasas de ingestión de *A. franciscana* variaron de manera directamente proporcional con la ración suministrada, aunque es posible que dicho autor no alcanzó el límite de consumo por la *Artemia*. Este comportamiento se presenta solamente hasta alcanzar una concentración crítica, por arriba de esta, la ingestión permanece constante o disminuye, lo cual se ha observado en *Daphnia magna* (McMahon y Rigler 1963) y en el copépodo *Calanus pacificus* (Frost 1972).

9.4.3. Composición proximal de *Artemia*

En cuanto a la composición proximal de la *Artemia*, su contenido de proteínas y lípidos se ve afectado por las diferentes fases de desarrollo en las que se encuentre. Tal es el caso de Guevara y Lodeiros (2003), quienes analizaron el contenido de proteínas y lípidos en nauplios y metanauplios de *Artemia* sp. y *A. franciscana* sin alimentar y reportaron una mayor proporción de proteínas que de lípidos en los metanauplios de ambas poblaciones, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en este estudio. Sin embargo, en el caso de los nauplios sucedió lo contrario, ya que los lípidos fueron más abundantes que las proteínas (Guevara y Lodeiros, 2003). Con respecto a lo

anterior, algunos estudios sustentan la hipótesis de la acumulación de proteínas para efectos estructurales y energéticos en estadios avanzados, más que de lípidos, los cuales son utilizados en las fases más tempranas como la naupliar. Evidentemente los nauplios presentan mayores concentraciones de lípidos que los metanauplios, ya que éstos representan la forma de energía disponible para las primeras horas de vida, pues en esta etapa los organismos carecen de un aparato digestivo funcional (Katavic *et al*., 1985; Léger *et al*., 1986).

En este estudio, los componentes mayoritarios encontrados en los juveniles de *Artemia* fueron las proteínas y en menor proporción los lípidos (Cuadro 12), lo cual concuerda con Lora-Vilchis *et al*. (2004) y Sánchez-Saavedra y Paniagua-Chávez (2017), quienes encontraron una proporción similar para estos compuestos. Por otra parte, se observó que las concentraciones tanto de proteínas como de lípidos coincidieron con los datos de la tasa de ingestión, pues los organismos que consumieron más alimento presentaron la concentración más alta de estos compuestos. Asimismo, se ha demostrado que la constitución orgánica es similar entre las microalgas, siendo las proteínas los componentes predominantes (Parsons *et al.,* 1984; Lavens y Sorgeloos, 1996). Tal es el caso de la microalga *C. muelleri,* la cual se ha caracterizado por presentar mayor concentración de proteínas que de lípidos, registrando valores >20 $pg \cdot cel^{-1}$ y >10 $pg \cdot cel^{-1}$ para dichos compuestos (Lemus *et al*., 2006; Piña *et al*., 2007), información que concuerda con los resultados obtenidos en este estudio para los juveniles de *A. franciscana* alimentados con esta microalga.

9.5. Conclusiones

Existió una interacción entre la densidad celular y la ausencia o presencia de luz, pues ambos factores influyeron en la tasa de ingestión y en el contenido de lípidos. No obstante, la mayor tasa de ingestión de los juveniles de *Artemia franciscana* se registró con el tratamiento de 900,000 $cel \cdot mL^{-1}$, obteniendo mejores resultados con luz a las 3 horas y sin luz a las 6 horas. Además, se observó que la tasa de ingestión fue directamente proporcional a la concentración celular hasta alcanzar la concentración crítica, a partir de la cual la tasa de ingestión disminuyó considerablemente. Por otra parte, las proteínas fueron los componentes más abundantes en los juveniles y las

concentraciones más altas tanto de proteínas como de lípidos se obtuvieron con el tratamiento de 900,000 cel·mL^{-1} sin luz.

10. CAPÍTULO 3: EFECTO DE LA DIETA ISOLIPÍDICA SOBRE EL VALOR NUTRICIONAL DE JUVENILES DE *A. franciscana*

10.1. Objetivo particular del capítulo:

- Determinar el peso seco, peso orgánico, composición proximal, clorofila *a*, clorofila *b* y carotenoides totales de las microalgas y de los juveniles de *A. franciscana* alimentados con las dietas isolipídicas.

10.2. Materiales y métodos

10.2.1. Diseño del experimento

Los cultivos de microalgas y de *A. franciscana* se realizaron como se mencionó anteriormente en el Capítulo 1, apartado 8.2.1. y en el Capítulo 2, apartado 9.2.1, respectivamente. Dichos cultivos se sincronizaron, de manera que los juveniles de *A. franciscana* estuvieron disponibles para cuando las microalgas alcanzaron la fase exponencial, la cual fue el segundo día para TH-W-1, CH-M-1 y TE-S-1 y el cuarto día para NN-X-1; y así poder alimentar a los juveniles con las dietas isolipídicas.

Los juveniles de *Artemia franciscana* fueron obtenidos como se describe en el Capítulo 2, apartado 9.2.1. Los experimentos iniciaron con juveniles de 9 días. Previo al experimento, se revisó el intestino de los organismos y se verificó que estuviera vacío. Antes de iniciar el experimento (0 h) se tomaron muestras tanto de las microalgas como de los juveniles de *A. franciscana* para determinar el peso seco, peso orgánico, composición proximal, clorofilas *a* y *b* y carotenoides totales (Figura 8). Se evaluaron 4 tratamientos que consistieron en las 4 dietas isolipídicas (11,556,000 pg de lípidos·mL^{-1}), correspondientes a cada especie de microalga (TH-W-1, CH-M-1, TE-S-1 y NN-X-1). Además, se contó con un tratamiento testigo (sin microalga). Cada tratamiento constó de cuatro repeticiones, por lo que en total se contó con 20 unidades experimentales. Dichas unidades consistieron en recipientes de plástico transparente y de forma circular, con un volumen útil de 14 L y una densidad de siembra de 0.5 *Artemia*·mL^{-1}. Durante el experimento se mantuvieron 35 ups y 25 °C, así como

aireación constante y condiciones de oscuridad. Al cabo de 6 h, se tomaron muestras de los juveniles de todos los recipientes para determinar los análisis ya mencionados.

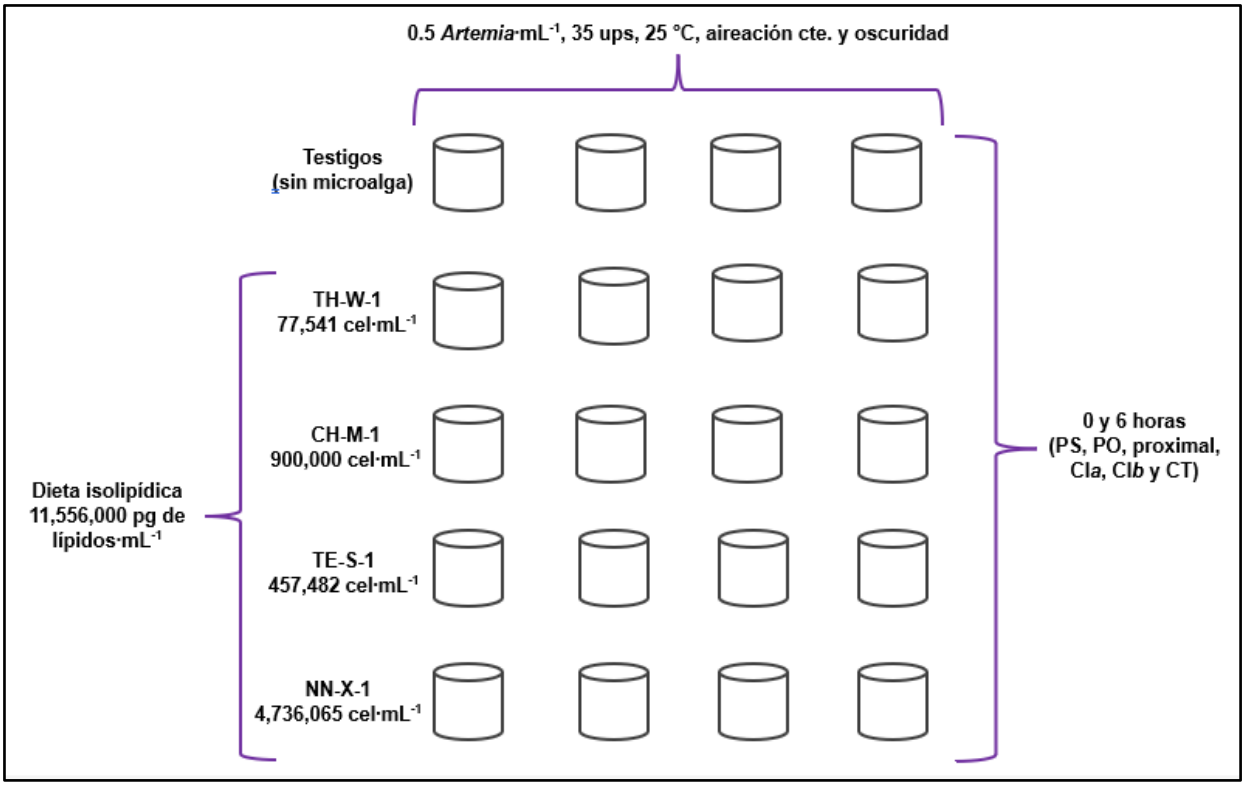

Figura 8. Diseño del experimento para evaluar el efecto de la dieta isolipídica sobre juveniles de *A. franciscana* de 9 días. PS = peso seco, PO = peso orgánico, Cl*a* = clorofila *a*, Cl*b* = clorofila *b* y CT = carotenoides totales.

10.2.2. Análisis de pesos seco, orgánico y composición proximal

Tanto a las muestras de microalgas como a los juveniles de *A. franciscana* se les determinó peso seco, peso orgánico y composición proximal (proteínas, carbohidratos y lípidos). Dichas determinaciones se realizaron siguiendo los procedimientos que se mencionaron anteriormente en el punto Capítulo 1, apartados 8.2.2. y 8.2.3.

10.2.3. Análisis de clorofilas y carotenoides totales

Las muestras de microalgas y *Artemia* se trituraron con una varilla de vidrio y se les añadió acetona al 100%, este procedimiento se realizó en baño de hielo y en oscuridad. Posteriormente se dejaron reposar durante 24 h en refrigeración a 4 °C y evitando la exposición a la luz. Después de las 24 h, se recuperó el sobrenadante

mediante centrifugación a 4,000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Luego se extrajo nuevamente para tener en total 2 extracciones, agregando nuevamente acetona al 100% y recuperando el sobrenadante por centrifugación. Al final se mezclaron los sobrenadantes obtenidos de las 2 extracciones y se leyeron las muestras en el espectrofotómetro a 662 nm para determinar la clorofila *a*, 645 nm para clorofila *b* y a 470 nm para carotenoides totales. La concentración de estos pigmentos se calculó de acuerdo con las ecuaciones propuestas por Lichtentaler y Wellburn (1983) y se expresaron en $\mu g \cdot mL^{-1}$.

$C_a = 11.75\ A_{662} - 2.350\ A_{645}$

$C_b = 18.61\ A_{645} - 3.960\ A_{662}$

$C_{x+C} = 1000\ A_{470} - 2.270\ C_a - 81.4\ C_b/227$

Donde:

C_a = Clorofila *a* en $\mu g \cdot mL^{-1}$

C_b = Clorofila *b* en $\mu g \cdot mL^{-1}$

C_{x+C} = Carotenoides totales en $\mu g \cdot mL^{-1}$

A = Absorbancia

10.2.4. Análisis estadísticos

A los datos obtenidos del peso seco, peso orgánico, composición proximal, concentración de clorofilas *a* y *b* y carotenoides totales de las cuatro especies de microalgas y de los juveniles de *A. franciscana* alimentados con las microalgas, previamente se les aplicaron las pruebas de normalidad de Lilliefors y homocedasticidad de Bartlett (Zar, 2010), para verificar la normalidad y homocedasticidad de los datos, respectivamente.

Para la comparación de los distintos parámetros (PS, PO, composición proximal, Cl*a*, Cl*b* y CT), se realizó un análisis de varianza de una vía para datos paramétricos o un Kruskal-Wallis para datos no paramétricos, cuando los datos no cumplieron con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas. Además, cuando los análisis

revelaron la existencia de diferencias significativas, se aplicó la prueba de comparaciones múltiples de Student-Newman-Keuls (SNK). Todos los análisis estadísticos se hicieron en el programa SigmaStat 3.5, con un nivel de significancia del 5%.

10.3. Resultados

10.3.1. Densidad celular de las microalgas

La densidad celular más alta fue la registrada por la microalga NN-X-1 (10,296,875 cel·mL^{-1}), mientras que la densidad celular más baja fue aquella obtenida por TH-W-1, la cual alcanzó solamente 358,438 cel·mL^{-1} (Cuadro 14).

Cuadro 14. Densidad celular de las microalgas *T. weissflogii* (TH-W-1), *C. muelleri* (CH-M-1), *T. suecica* (TE-S-1) y *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1) cultivadas durante su fase exponencial. Los resultados son valores promedio ± E.S. (n = 4).

Especie	Día	Densidad celular (cel·mL^{-1})
TH-W-1	2	358,438 ±12,571
CH-M-1	2	3,809,375 ±62,993
TE-S-1	2	831,563 ±21,556
NN-X-1	4	10,296,875 ±122,302

10.3.2. Peso seco (PS) y peso orgánico (PO) de las cuatro especies de microalgas

Los valores de peso seco y peso orgánico se compararon entre las cuatro especies de microalgas durante su fase exponencial. En el caso del volumen de producción de biomasa seca, CH-M-1 fue la especie que registró el valor más alto de peso seco (209.66 µg·mL^{-1}), mostrando diferencias significativas respecto a las otras especies (Cuadro 15). En contraste, TE-S-1 fue la especie que registró el valor más bajo, siendo significativamente ($P < 0.05$) inferior al resto de las microalgas.

Por otra parte, tomando en cuenta la producción de biomasa seca por célula, TH-W-1 registró el máximo valor (456.13 pg·cel^{-1}), mismo que fue estadísticamente superior al resto de las microalgas (Cuadro 15). En tanto que las concentraciones de PS unitario para CH-M-1 (55.10 pg·cel^{-1}) y TE-S-1 (79.57 pg·cel^{-1}) no presentaron diferencias entre sí, pero estas especies sí mostraron diferencias con el valor registrado por NN-X-1 (11.52 pg·cel^{-1}), el cual fue significativamente menor.

Cuadro 15. Peso seco en µg·mL^{-1} y pg·cel^{-1} de las microalgas *T. weissflogii* (TH-W-1), *C. muelleri* (CH-M-1), *T. suecica* (TE-S-1) y *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1) cultivadas durante su fase exponencial. Los resultados son valores promedio ± E.S. (n = 4).

UNIDAD	**PESO SECO**			
	TH-W-1	CH-M-1	TE-S-1	NN-X-1
µg·mL^{-1}	163.34^{c} ±6.83	209.66^{d} ±13.57	65.69^{a} ±7.52	118.51^{b} ±12.30
*pg·cel^{-1}	456.13^{c} ±15.33	55.10^{b} ±3.82	79.57^{b} ±10.68	11.52^{a} ±1.24

Letras diferentes indican que hay diferencias significativas entre las especies ($P < 0.05$). * prueba no paramétrica.

Con relación al volumen de producción de biomasa orgánica, la concentración de PO para la microalga CH-M-1 (134.53 µg·mL^{-1}) fue estadísticamente superior al resto de las microalgas (Cuadro 16). Mientras que TE-S-1 registró estadísticamente ($P < 0.05$) el valor más bajo de PO (43.41 µg·mL^{-1}) en comparación con las otras especies.

En cuanto al contenido del peso orgánico celular o unitario, TH-W-1 registró una concentración de 318.09 pg·cel^{-1}, la cual fue significativamente mayor a la obtenida por las otras especies (Cuadro 16). Por otra parte, el valor registrado por NN-X-1 (8.52 pg·cel^{-1}), fue significativamente menor comparado con el resto de las microalgas ($P < 0.05$).

De acuerdo con los resultados de biomasa obtenida como mg de peso orgánico por g de peso seco, no se encontraron diferencias significativas entre las especies de

microalgas ($P < 0.05$), registrándose valores que fueron de los 642.93 a los 747.02 mg PO·g^{-1} de PS (Cuadro 16).

Cuadro 16. Peso orgánico en µg·mL^{-1}, pg·cel^{-1} y mg·g^{-1} de PS de las microalgas *T. weissflogii* (TH-W-1), *C. muelleri* (CH-M-1), *T. suecica* (TE-S-1) y *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1) cultivadas durante su fase exponencial. Los resultados son valores promedio ± E.S. (n = 4).

UNIDAD	**PESO ORGÁNICO**			
	TH-W-1	CH-M-1	TE-S-1	NN-X-1
µg·mL^{-1}	114.02^{c} ±4.86	134.53^{d} ±7.36	43.41^{a} ±1.83	87.68^{b} ±6.37
*pg·cel^{-1}	318.09^{d} ±7.15	35.33^{b} ±2.00	52.29^{c} ±2.48	8.52^{a} ±0.64
mg PO·g^{-1} de PS	698.54^{a} ±15.99	642.93^{a} ±9.86	679.18^{a} ±55.79	747.02^{a} ±27.64

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre las especies ($P < 0.05$). * prueba no paramétrica.

10.3.3. Composición proximal de las microalgas

Respecto a los resultados de proteínas, carbohidratos y lípidos en términos de biomasa seca, TE-S-1 fue la especie que presentó las concentraciones más altas para estos compuestos, registrando 426.28 mg de proteínas·g^{-1} de PS, valor que fue estadísticamente mayor al obtenido con TH-W-1 y CH-M-1. En cuanto a carbohidratos, TE-S-1 (231.70 mg·g^{-1} de PS) registró una concentración significativamente superior a la encontrada en CH-M-1 y NN-X-1 (Cuadro 17). De igual manera, TE-S-1 registró la producción más alta de lípidos en PS (154.43 mg·g^{-1}) y dicho valor fue significativamente superior únicamente a NN-X-1.

Cuadro 17. Proteínas, carbohidratos y lípidos en mg·g^{-1} de PS de las microalgas *T. weissflogii* (TH-W-1), *C. muelleri* (CH-M-1), *T. suecica* (TE-S-1) y *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1) cultivadas durante su fase exponencial. Los resultados son valores promedio ± E.S. (n = 4).

DETERMINACIÓN	**ESPECIES**			
	TH-W-1	CH-M-1	TE-S-1	NN-X-1
Proteínas	244.70^{a} ±22.17	286.05^{ab} ±19.19	426.28^{c} ±57.26	389.75^{bc} ±24.13
Carbohidratos	185.57^{b} ±10.89	77.42^{a} ±7.37	231.70^{b} ±30.00	116.50^{a} ±8.32
Lípidos	117.99^{ab} ±2.89	123.96^{ab} ±5.67	154.43^{b} ±19.64	105.89^{a} ±6.25

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre las especies ($P < 0.05$).

Adicionalmente a la comparación proximal que se realizó entre especies de microalgas, también se compararon los porcentajes de la composición proximal (proteínas, carbohidratos y lípidos) con relación a la composición orgánica total (Cuadro 18). En el caso del porcentaje de proteína, NN-X-1 fue la especie que registró el mayor valor, mostrando diferencias significativas respecto a las otras especies ($P < 0.05$). Dicha microalga alcanzó un 63.66%; en tanto que TH-W-1 fue la microalga que obtuvo la menor producción de proteínas, logrando solo un 44.42%.

Con relación a los carbohidratos, el mayor porcentaje se obtuvo con la microalga TH-W-1, la cual alcanzó un 33.93% y mostró diferencias significativas ($P < 0.05$) con las otras especies. Por otro lado, CH-M-1 y NN-X-1 fueron las microalgas con los menores porcentajes de carbohidratos (Cuadro 18).

Finalmente, el porcentaje más alto de lípidos se encontró en la microalga CH-M-1, con 25.51% y fue significativamente ($P < 0.05$) mayor, en comparación con las demás especies de microalgas. Mientras que TE-S-1 y NN-X-1 fueron las especies que registraron los porcentajes más bajos de lípidos (Cuadro 18).

Cuadro 18. Proteínas, carbohidratos y lípidos en % con base a la composición orgánica total, de las microalgas *T. weissflogii* (TH-W-1), *C. muelleri* (CH-M-1), *T. suecica* (TE-S-1) y *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1) cultivadas durante su fase exponencial. Los resultados son valores promedio ± E.S. (n = 4).

DETERMINACIÓN	**PORCENTAJES**			
	TH-W-1	CH-M-1	TE-S-1	NN-X-1
Proteínas	44.42[a] ±1.79	58.64[c] ±0.81	52.42[b] ±1.15	63.66[d] ±0.72
Carbohidratos	33.93[c] ±1.36	15.85[a] ±0.89	28.52[b] ±1.34	19.03[a] ±0.65
Lípidos	21.65[b] ±0.85	25.51[c] ±0.56	19.06[a] ±0.58	17.31[a] ±0.36

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre las especies ($P < 0.05$).

10.3.4. Clorofilas *a* y *b* y carotenoides totales en microalgas

Los valores de clorofilas *a* y *b* y carotenoides totales se compararon entre las cuatro especies de microalgas por unidad de medida. En el caso del volumen de producción de clorofila *a*, CH-M-1 fue la especie que registró la concentración más alta de este compuesto (1.552 $\mu g \cdot mL^{-1}$), mostrando diferencias significativas ($P < 0.05$) respecto a las otras especies (Cuadro 19). Por otra parte, tomando en cuenta la producción de clorofila *a* por célula, TH-W-1 presentó la mayor concentración (4.059 $pg \cdot cel^{-1}$), misma que fue estadísticamente superior a la obtenida por los otros tratamientos (Cuadro 19). En contraste, de acuerdo con los resultados de clorofila *a* obtenida como pg de clorofila *a* por ng de peso seco, TE-S-1 registró el valor más alto (12.593 pg Cl*a*$\cdot ng^{-1}$ PS), el cual fue significativamente mayor al conseguido por las otras microalgas (Cuadro 19).

Por otro lado, con relación al volumen de producción de clorofila *b* en las distintas microalgas, NN-X-1 fue la especie que presentó una mayor concentración ($P < 0.05$) de este compuesto (0.281 $\mu g \cdot mL^{-1}$), en comparación con las otras especies. No obstante, al considerar el contenido celular o unitario de clorofila *b*, TH-W-1 mostró la

concentración más alta (0.463 pg·cel^{-1}), siendo significativamente mayor a las otras especies (Cuadro 19). Sin embargo, al considerar las concentraciones de clorofila *b* en peso seco, TE-S-1 (3.639 pg Cl*b*·ng^{-1} PS) y NN-X-1 (2.452 pg Cl*b*·ng^{-1} PS) registraron los valores más altos de este compuesto, sin mostrar diferencias significativas ($P > 0.05$) entre ellas, pero sí con las otras especies de microalgas (Cuadro 19).

En cuanto al contenido de carotenoides totales en las microalgas, CH-M-1 fue la especie que registró la concentración más alta tomando en cuenta el volumen de producción, alcanzando 0.618 µg·mL^{-1}, valor que fue estadísticamente superior al resto de las microalgas ($P < 0.05$). En tanto que, TH-W-1 presentó la mayor concentración de carotenoides totales por célula (0.893 pg·cel^{-1}) en comparación con las otras especies (Cuadro 19). Por último, CH-M-1 (2.982 pg CT·ng^{-1} PS) y TE-S-1 (3.723 pg CT·ng^{-1} PS) mostraron las concentraciones más altas de carotenoides totales como pg por ng de peso seco, sin encontrarse diferencias significativas entre estas dos especies, pero sí con TH-W-1 y NN-X-1 (Cuadro 19).

Cuadro 19. Clorofila *a*, clorofila *b* y carotenoides totales en µg·mL^{-1}, pg·cel^{-1} y pg·ng^{-1} de PS de las microalgas *T. weissflogii* (TH-W-1), *C. muelleri* (CH-M-1), *T. suecica* (TE-S-1) y *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1) cultivadas durante su fase exponencial. Los resultados son valores promedio ± E.S. (n = 4).

CLOROFILA *a*				
UNIDAD	**TH-W-1**	**CH-M-1**	**TE-S-1**	**NN-X-1**
***µg·mL^{-1}**	1.449^{c} ±0.011	1.552^{d} ±0.041	0.796^{a} ±0.009	0.874^{b} ±0.003
***pg·cel^{-1}**	4.059^{d} ±0.148	0.407^{b} ±0.007	0.959^{c} ±0.024	0.085^{a} ±0.001
pg Cl*a*·ng^{-1} PS	8.925^{a} ±0.408	7.504^{a} ±0.539	12.593^{b} ±1.424	7.600^{a} ±0.723
CLOROFILA *b*				
µg·mL^{-1}	0.165^{a} ±0.008	0.157^{a} ±0.005	0.229^{b} ±0.005	0.281^{c} ±0.004
***pg·cel^{-1}**	0.463^{b} ±0.028	0.041^{a} ±0.001	0.218^{a} ±0.064	0.027^{a} ±0.001
***pg Cl*b*·ng^{-1} PS**	1.021^{b} ±0.081	0.759^{a} ±0.045	3.639^{c} ±0.456	2.452^{c} ±0.261
CAROTENOIDES TOTALES				
***µg·mL^{-1}**	0.318^{c} ±0.009	0.618^{d} ±0.004	0.235^{b} ±0.004	0.185^{a} ±0.002
***pg·cel^{-1}**	0.893^{d} ±0.050	0.162^{b} ±0.004	0.283^{c} ±0.003	0.018^{a} ±0.001
pg CT·ng^{-1} PS	1.963^{a} ±0.123	2.982^{b} ±0.183	3.723^{b} ±0.404	1.609^{a} ±0.143

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre las especies por unidad de medida ($P < 0.05$).
* prueba no paramétrica. Cl*a* = Clorofila *a*, Cl*b* = Clorofila *b*, CT = Carotenoides totales.

10.3.5. Longitud y supervivencia de *Artemia franciscana*

Los cultivos de *A. franciscana* tuvieron una duración de 9 días, durante los cuales se midió la longitud total al inicio, a la mitad y al final (días 0, 5 y 9) de este periodo, con la finalidad de tener un registro de la talla a través de los días, obteniéndose longitudes de 0.59 mm, 2.02 mm y 3.41 mm, respectivamente. Tal y como se mencionó anteriormente, la *Artemia* fue alimentada con *C. muelleri* hasta el día 8 y el día 9 se realizó un conteo donde se obtuvo una supervivencia del 82% y posteriormente se inició el experimento para evaluar la calidad nutricional de los juveniles de *A. franciscana,* alimentados con las cuatro especies de microalgas durante un periodo de 6 horas.

10.3.6. Peso seco y peso orgánico de los juveniles de *A. franciscana*

Los valores de peso seco y peso orgánico de los juveniles de *A. franciscana* se determinaron antes de iniciar el experimento (0 h) y después de 6 h de alimentar a los juveniles con la dieta isolipídica de las microalgas TH-W-1, CH-M-1, TE-S-1 y NN-X-1. Además, se tomaron muestras de los testigos. A las 0 h se obtuvo un peso seco por organismo de 67.39±0.18 $\mu g \cdot org^{-1}$. Por otra parte, después de un periodo de 6 h, todos los organismos alimentados con las distintas especies de microalgas presentaron una concentración de PS mayor que el testigo (Cuadro 20), siendo los juveniles de *Artemia* alimentados con CH-M-1 los que registraron la concentración más alta de PS por individuo (84.64 $\mu g \cdot org^{-1}$), valor que fue significativamente superior a los otros tratamientos ($P < 0.05$).

Cuadro 20. Peso seco en $\mu g \cdot org^{-1}$ de los juveniles de *A. franciscana* al inicio (0 h) y después (6 h) de alimentarlos con las microalgas *T. weissflogii* (TH-W-1), *C. muelleri* (CH-M-1), *T. suecica* (TE-S-1) y *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1). Los resultados son valores promedio ± E.S. (n = 4).

PESO SECO EN $\mu g \cdot org^{-1}$					
INICIAL	TESTIGO	TH-W-1	CH-M-1	TE-S-1	NN-X-1
67.39 ±0.18	64.07[a] ±0.47	71.04[b] ±0.86	84.64[d] ±0.48	76.02[c] ±0.78	69.65[b] ±0.32

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre las especies ($P < 0.05$).

Respecto al peso orgánico por individuo, antes de iniciar el experimento (0 h) se registró una concentración de 48.80±0.17 µg·org^{-1}. Después de 6 h suministrada la dieta isolipídica a base de microalgas, todos los juveniles de *A. franciscana* registraron una mayor concentración de PO que el testigo (Cuadro 21), obteniéndose la concentración más alta de PO con CH-M-1 (64.52 µg·org^{-1}), la cual fue significativamente mayor con respecto a los otros tratamientos ($P < 0.05$).

Cuadro 21. Peso orgánico en µg·org^{-1} de los juveniles de *A. franciscana* al inicio (0 h) y después (6 h) de alimentarlos con las microalgas *T. weissflogii* (TH-W-1), *C. muelleri* (CH-M-1), *T. suecica* (TE-S-1) y *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1). Los resultados son valores promedio ± E.S. (n = 4).

	PESO ORGÁNICO EN µg·org^{-1}				
INICIAL	TESTIGO	TH-W-1	CH-M-1	TE-S-1	NN-X-1
48.80 ±0.17	46.95^{a} ±0.51	53.63^{b} ±1.36	64.52^{d} ±0.59	58.09^{c} ±0.59	50.53^{b} ±0.51

Prueba no paramétrica. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre las especies ($P < 0.05$).

10.3.7. Composición proximal de los juveniles de *A. franciscana*

En el caso de las proteínas, a las 0 h se tuvo una concentración de 30.01±0.22 µg·org^{-1}; mientras que después de un periodo de 6 h, se pudo observar que los organismos alimentados con las distintas especies de microalgas presentaron una mayor concentración en comparación con los testigos (Cuadro 22). Siendo los juveniles alimentados con TE-S-1 los que registraron la concentración más alta de proteínas por organismo (41.12 µg·org^{-1}), valor que fue significativamente superior a aquellos organismos alimentados con las otras microalgas y a los testigos ($P < 0.05$).

Respecto a las concentraciones de lípidos por individuo, antes de iniciar el experimento (0 h) se registró una concentración de 5.55±0.04 µg·org^{-1}. En tanto que después de 6 h suministrada la dieta isolipídica de microalgas, en todos los tratamientos los juveniles de *Artemia* presentaron mayor concentración de lípidos que los testigos y, además, existieron diferencias significativas entre todas las especies de microalgas (Cuadro 22). La concentración más alta de lípidos en los juveniles de *A. franciscana* se obtuvo

con TE-S-1 (11.90 µg·org^{-1}) y dicho valor fue significativamente mayor al obtenido con los otros tratamientos ($P < 0.05$).

Por último, y concerniente al contenido de carbohidratos, los juveniles de *Artemia* registraron una concentración de 5.40±0.02 µg·org^{-1} a las 0 h. Luego de 6 h, todos los organismos alimentados con la dieta isolipídica tuvieron mayor concentración de carbohidratos que el testigo (Cuadro 22). La microalga TE-S-1 fue la que dio mejores resultados, pues los organismos alimentados con dicha especie presentaron la concentración más alta de carbohidratos (8.70 µg·org^{-1}), valor que fue significativamente superior a los otros tratamientos ($P < 0.05$).

Cuadro 22. Proteínas, lípidos y carbohidratos en µg·org^{-1} de los juveniles de *A. franciscana* al inicio (0 h) y después (6 h) de alimentarlos con las microalgas *T. weissflogii* (TH-W-1), *C. muelleri* (CH-M-1), *T. suecica* (TE-S-1) y *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1). Los resultados son valores promedio ± E.S. (n = 4).

Determinación	**Concentraciones en µg·org^{-1}**					
	Inicial	Testigo	TH-W-1	CH-M-1	TE-S-1	NN-X-1
Proteínas	30.01 ±0.22	27.89^{a} ±0.19	37.89^{c} ±0.25	39.79^{d} ±0.34	41.12^{e} ±0.31	34.33^{b} ±0.25
*Lípidos	5.55 ±0.04	5.11^{a} ±0.03	9.76^{c} ±0.06	11.15^{d} ±0.14	11.90^{e} ±0.07	7.58^{b} ±0.06
Carbohidratos	5.40 ±0.02	4.92^{a} ±0.02	8.04^{d} ±0.05	7.46^{c} ±0.03	8.70^{e} ±0.03	6.68^{b} ±0.05

Letras diferentes indican que hay diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$). * Prueba no paramétrica.

10.3.8. Porcentaje de la composición proximal con base al peso seco de los juveniles de *A. franciscana*

Además de presentar las concentraciones de proteínas, carbohidratos y lípidos en términos de biomasa por organismo, se compararon los porcentajes de la composición proximal con base al peso seco. En el caso del porcentaje de proteína, a las 0 h se tuvo un 44.54%, mientras que después de 6 h, todos los juveniles alimentados con las

distintas microalgas presentaron un mayor porcentaje de proteínas que los testigos (Cuadro 23). Sin embargo, aquellos que recibieron las dietas de TH-W-1 y TE-S-1, registraron los porcentajes significativamente más altos de proteínas (53.36% y 54.11%, respectivamente) en comparación con los otros tratamientos ($P < 0.05$).

Por otra parte, en cuanto al porcentaje de lípidos respecto al peso seco, a las 0 h se registró un 8.24%. Luego de un periodo de 6 h, todos los organismos alimentados con las microalgas presentaron mayor porcentaje de lípidos que el testigo, siendo los juveniles que recibieron la dieta de TE-S-1, los que presentaron el porcentaje más alto de lípidos (15.66%), el cual fue estadísticamente superior al resto de los tratamientos (Cuadro 23).

Finalmente, el porcentaje de carbohidratos registrado antes de iniciar el experimento fue de 8.01%, mientras que después de 6 h todos los organismos alimentados con las diferentes microalgas presentaron mayor porcentaje de carbohidratos que el testigo y fueron los juveniles alimentados con las dietas de TH-W-1 (11.32%) y TE-S-1 (11.45%) los que registraron los porcentajes más altos de carbohidratos en comparación con los otros tratamientos (Cuadro 23).

Cuadro 23. Proteínas, lípidos y carbohidratos en % con base al peso seco de los juveniles de *A. franciscana* al inicio (0 h) y después (6 h) de alimentarlos con las microalgas *T. weissflogii* (TH-W-1), *C. muelleri* (CH-M-1), *T. suecica* (TE-S-1) y *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1). Los resultados son valores promedio ± E.S. (n = 4).

DETERMINACIÓN	**PORCENTAJES**					
	INICIAL	TESTIGO	TH-W-1	CH-M-1	TE-S-1	NN-X-1
Proteínas	44.54 ±0.25	43.56[a] ±0.17	53.36[d] ±0.68	47.02[b] ±0.52	54.11[d] ±0.73	49.30[c] ±0.47
*Lípidos	8.24 ±0.04	7.98[a] ±0.04	13.74[c] ±0.24	13.18[c] ±0.23	15.66[d] ±0.19	10.88[b] ±0.11
Carbohidratos	8.01 ±0.02	7.68[a] ±0.03	11.32[d] ±0.17	8.81[b] ±0.06	11.45[d] ±0.15	9.59[c] ±0.09

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$). * no paramétrico.

10.3.9. Clorofilas *a* y *b* y carotenoides totales en los juveniles de *A. franciscana*

En el caso de las concentraciones de clorofila *a* por organismo, a las 0 h se tuvo una concentración de 0.690±0.010 ng·org^{-1}, mientras que después de un periodo de 6 h, se observó que existieron diferencias significativas entre los organismos alimentados con las distintas especies de microalgas y el testigo (Cuadro 24), siendo los juveniles alimentados con CH-M-1 los que presentaron la concentración más alta de clorofila *a* por organismo (36.964 ng·org^{-1}), valor que fue significativamente superior ($P < 0.05$) a los otros tratamientos. Por otra parte, al considerar la producción de clorofila *a* con base al peso seco, a las 0 h se registró una concentración de 0.010±0.000 ng·µg^{-1} PS; en tanto que al finalizar las 6 h todos los organismos alimentados con las diferentes microalgas presentaron mayor concentración que el testigo (Cuadro 24), obteniéndose la concentración más alta de clorofila *a* con TH-W-1 (0.482 ng·µg^{-1} PS), valor que fue estadísticamente superior al registrado por las otras especies de microalgas.

Respecto a las concentraciones de clorofila *b* por organismo, antes de iniciar el experimento (0 h) se registró una concentración de 0.334±0.008 ng·org^{-1}. Después de 6 h suministrada la dieta isolipídica a base de microalgas, todos los juveniles alimentados presentaron mayor concentración que el testigo (Cuadro 24), obteniéndose la concentración más alta de clorofila *b* en los organismos alimentados con TE-S-1 (9.943 ng·org^{-1}), valor que fue significativamente mayor ($P < 0.05$) al registrado con los otros tratamientos. No obstante, al tomar en cuenta la producción de clorofila *b* por peso seco, al iniciar el experimento se tuvo una concentración de 0.005 ng Cl*b*·µg^{-1} PS, pero al finalizarlo, todos los juveniles mostraron una concentración más alta que el testigo (Cuadro 24), siendo aquellos organismos alimentados con TE-S-1 los que presentaron el mayor valor (0.131 ng Cl*b*·µg^{-1} PS), el cual fue estadísticamente superior ($P < 0.05$) al registrado por las otras especies.

Por último, en cuanto a las concentraciones de carotenoides totales por organismo, se registró una concentración de 3.371±0.039 ng·org^{-1} a las 0 h. Luego de 6 h, todos los organismos alimentados presentaron mayor concentración de carotenoides totales que el testigo y fue CH-M-1 la especie con la que se registraron los mejores resultados (Cuadro 24), ya que los juveniles alimentados con dicha microalga presentaron la

concentración más alta de carotenoides totales (27.721 ng·org^{-1}), siendo estadísticamente superior al resto de los tratamientos. En otro sentido, la producción de carotenoides totales por peso seco a las 0 h fue de 0.050 ng CT·µg^{-1} PS, mientras que a las 6 h todos los organismos alimentados con las microalgas presentaron mayor concentración que el testigo (Cuadro 24), siendo los organismos alimentados con TH-W-1 los que registraron la concentración más alta ($P < 0.05$) de carotenoides totales (0.345 ng CT·µg^{-1} PS) en comparación con las otras especies de microalgas y el testigo.

Cuadro 24. Clorofila *a*, clorofila *b* y carotenoides totales en ng·org^{-1} y en ng·µg^{-1} de PS de los juveniles *de A. franciscana* al inicio (0 h) y después (6 h) de alimentarlos con las microalgas *T. weissflogii* (TH-W-1), *C. muelleri* (CH-M-1), *T. suecica* (TE-S-1) y *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1). Los resultados son valores promedio ± E.S. (n = 4).

DETERMINACIÓN	**CONCENTRACIONES EN ng·org^{-1}**					
	INICIAL	TESTIGO	TH-W-1	CH-M-1	TE-S-1	NN-X-1
Clorofila *a*	0.690 ±0.010	0.611^{a} ±0.003	34.236^{d} ±0.212	36.964^{e} ±0.316	18.813^{c} ±0.266	13.471^{b} ±0.218
*Clorofila *b*	0.334 ±0.008	0.277^{a} ±0.006	7.253^{b} ±0.281	6.827^{b} ±0.199	9.943^{d} ±0.347	8.453^{c} ±0.204
Carotenoides totales	3.371 ±0.039	2.775^{a} ±0.047	24.495^{d} ±0.360	27.721^{e} ±0.158	17.372^{c} ±0.288	15.855^{b} ±0.272
DETERMINACIÓN	**CONCENTRACIONES EN ng·µg^{-1} PS**					
	INICIAL	TESTIGO	TH-W-1	CH-M-1	TE-S-1	NN-X-1
*Clorofila *a*	0.010 ±0.000	0.010^{a} ±0.001	0.482^{e} ±0.009	0.437^{d} ±0.002	0.248^{c} ±0.006	0.193^{b} ±0.002
Clorofila *b*	0.005 ±0.000	0.004^{a} ±0.000	0.102^{c} ±0.004	0.081^{b} ±0.002	0.131^{e} ±0.004	0.121^{d} ±0.003
*Carotenoides totales	0.050 ±0.001	0.043^{a} ±0.001	0.345^{d} ±0.002	0.328^{c} ±0.001	0.229^{b} ±0.006	0.228^{b} ±0.004

Letras diferentes indican que hay diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$). * Prueba no paramétrica.

10.4. Discusión

10.4.1. Composición proximal en las microalgas

Respecto a la composición proximal, se podría esperar que las diatomeas presentaran una menor concentración de composición orgánica en comparación con las microalgas verdes, ya que poseen una frústula con altos porcentajes de materia inorgánica. Sin embargo, no se ha observado una tendencia donde las proteínas, los carbohidratos y

los lípidos sean más bajos en las diatomeas que en otras especies. Renaud *et al*. (1999), registraron concentraciones más altas de ceniza en diatomeas que en otras especies y determinaron que las proteínas fueron los compuestos más abundantes en todas las especies de microalgas, con excepción de las diatomeas. En este estudio, solo las proteínas fueron más altas en las microalgas verdes que en las diatomeas al considerar el peso seco.

El contenido de proteína de TH-W-1 (244.70 $mg \cdot g^{-1}$) fue similar al encontrado por García *et al*. (2012), quienes reportaron 289 $mg \cdot g^{-1}$. En cuanto a CH-M-1, el valor obtenido fue inferior al registrado por Carbajal-López (2008) para *Chaetoceros calcitrans*, mientras que para TE-S-1 y NN-X-1 los valores del presente estudio fueron superiores a los reportados (274.57 $mg \cdot g^{-1}$ para TE-S-1 y 169.34 $mg \cdot g^{-1}$ para *Nannochloropsis oculata)* por el autor en cuestión. Estas diferencias podrían deberse a que eran especies distintas para algunas microalgas y a que usaron el medio f/2. Además, utilizaron otra metodología para algunas determinaciones a la utilizada en este estudio. Del mismo modo, esto también se puede aplicar a los carbohidratos y lípidos.

En cuanto a los carbohidratos, el valor registrado para TH-W-1 (185.57 $mg \cdot g^{-1}$) fue similar al obtenido por García *et al*. (2012) con 207 $mg \cdot g^{-1}$ para esta misma especie. Por otra parte, Carbajal-López (2008) reportó concentraciones de carbohidratos de 42.55 $mg \cdot g^{-1}$ para *C. calcitrans*, 22.25 $mg \cdot g^{-1}$ para TE-S-1 y 18.96 $mg \cdot g^{-1}$ para *N. oculata*, valores que fueron inferiores a los obtenidos en esta investigación.

Con relación al contenido de lípidos de TH-W-1 (117.99 $mg \cdot g^{-1}$), los resultados obtenidos fueron inferiores a los registrados por García *et al*. (2012). Estas diferencias podrían deberse a las diferentes condiciones de cultivo, ya que los autores utilizaron el medio f/2, varias concentraciones de salinidad y una temperatura de 20 °C. No obstante, las concentraciones de CH-M-1 y TE-S-1 fueron superiores a las de Carbajal-López (2008) con 103.27 $mg \cdot g^{-1}$ para *C. calcitrans* y 86.63 $mg \cdot g^{-1}$ para TE-S-1, pero para NN-X-1 la concentración de este trabajo fue similar a la reportada por el mismo autor para *N. oculata*.

10.4.2. Clorofila *a* en microalgas

Con respecto a las clorofilas, la concentración de clorofila *a* (1.449 µg·mL^{-1}) por volumen de producción de TH-W-1 obtenida en este estudio fue mayor a la encontrada por Junior *et al*. (2006), quienes registraron una concentración de 0.96 µg·mL^{-1} para esta misma especie. Dicha diferencia pudo deberse a las condiciones de cultivo, ya que en este estudio se mantuvieron 25 °C, se utilizó el medio f y la extracción de clorofilas se realizó con acetona al 100%. Mientras que los autores en mención mantuvieron los cultivos a 18 °C, utilizaron el medio f/2 y realizaron la extracción con acetona al 90%.

Por otra parte, al considerar el contenido de clorofila *a* por célula de este trabajo, la microalga TH-W-1 registró 4.059 pg·cel^{-1}, valor que fue superior al reportado por Chansawang (2015), quien registró concentraciones que fueron de 0.2 a 3.0 pg·cel^{-1}, para esta misma especie cultivada durante 7 días bajo diferentes temperaturas e intensidades de luz y con distintas concentraciones de nitratos, observándose que el contenido celular de clorofila *a* disminuyó con el aumento de temperatura y con la deficiencia de nitratos. Las diferencias entre las concentraciones de clorofila pueden deberse a que dicho autor utilizó metanol al 100% para la extracción. No obstante, el resultado concuerda con lo obtenido por Katayama *et al*. (2011), quienes registraron valores de 4 a 11 pg·cel^{-1} de clorofila *a* para dicha microalga, sujeta a diferentes concentraciones de silicatos y a una previa aclimatación de ciclos de luz: oscuridad de 12 horas cada uno durante 6 días, para después pasarlas a un experimento donde se evaluó el efecto de la oscuridad durante 14 días.

En cuanto al contenido de clorofila *a* con base al peso seco de este trabajo, TH-W-1 registró 8.925 pg Cl*a*·ng^{-1} PS, valor superior a los reportados por Saxena *et al.* (2022), quienes registraron concentraciones que oscilaron entre 2.79 y 6.01 pg Cl*a*·ng^{-1} PS para esta misma especie.

Por otro lado, el volumen de producción de clorofila *a* de CH-M-1 (1.552 µg·mL^{-1}) conseguido en este estudio, fue menor al observado por Junior *et al*. (2006), quienes alcanzaron una concentración de 3.74 µg·mL^{-1} de clorofila *a* para *Chaetoceros gracilis.* Las diferencias en cuanto a las concentraciones pudieran deberse a que se trata de

diferentes especies con distintas densidades celulares. Además, de que utilizaron acetona al 90% para la extracción. En contraste, Lovio-Fragoso *et al*. (2019) registraron concentraciones de 0.1078 a 0.5064 µg·mL^{-1} de clorofila *a* para *C. muelleri* cultivada bajo diferentes concentraciones de fósforo. Dichos valores fueron menores al reportado en este estudio para la misma especie.

En el caso de la concentración celular de clorofila *a*, Leonardos y Geider (2004) reportaron valores que fueron de los 0.05 a los 0.52 pg·cel^{-1} de clorofila *a* para *C. muelleri* cultivada en condiciones de luz baja (50 µmol fotones m^{-2}·s^{-1}) y luz alta (700 µmol fotones m^{-2}·s^{-1}), donde las células que crecieron en luz baja presentaron mayor contenido de clorofila *a* que las que estuvieron expuestas a luz alta. La concentración de clorofila *a* registrada en este estudio (0.407 pg·cel^{-1}) coincide con lo obtenido por los autores mencionados en condiciones de luz baja.

Respecto a la concentración de clorofila *a* por biomasa, Saxena *et al.* (2022) reportaron valores que oscilaron entre 2.60 y 4.16 pg Cl*a*·ng^{-1} PS para *C. gracilis*. Estas concentraciones fueron inferiores a las registradas en esta investigación, donde CH-M-1 alcanzó 7.504 pg Cl*a*·ng^{-1} PS.

Al considerar el volumen de producción de clorofila *a* (0.796 µg·mL^{-1}) de TE-S-1 registrado en este proyecto, dicho valor estuvo dentro de las concentraciones reportadas por Fábregas *et al*. (1987), con valores de 0.44 a 4.40 µg·mL^{-1} para la misma especie, cultivada utilizando diferentes mezclas de un fertilizante de jardín común, extracto de suelo, micronutrientes y vitaminas.

Por otra parte, la concentración de clorofila *a* (0.959 pg·cel^{-1}) por célula de TE-S-1 alcanzada en este trabajo fue menor a la obtenida por Fábregas *et al*. (1985), cuyos valores estuvieron entre 2.03 y 3.80 pg·cel^{-1} para la misma especie cultivada con 4 diferentes concentraciones de nutrientes.

En cuanto a la concentración de clorofila *a* de TE-S-1 con base al PS, en este estudio se registró un valor de 12.593 pg Cl*a*·ng^{-1} PS, el cual estuvo dentro de las concentraciones obtenidas por Abiusi *et al*. (2013), quienes cultivaron esta misma especie durante 9 días utilizando diferentes colores de luz led (roja, verde, azul y

blanca) y reportaron valores de 7 a 16 pg Cl*a*·ng^{-1} PS al utilizar luz roja, mientras que con la luz azul alcanzaron una concentración superior a 25 pg Cl*a*·ng^{-1} PS.

Por último, respecto a la concentración de clorofila *a* (7.6 pg Cl*a*·ng^{-1} PS) de NN-X-1 con base al peso seco, el valor obtenido en este trabajo fue mayor al reportado por Ra *et al*. (2017), quienes presentaron concentraciones de 4 a 6 pg Cl*a*·ng^{-1} PS para *N. oceanica*. Sin embargo, dicho valor fue similar al obtenido por *N. salina* (6 a 10 pg Cl*a*·ng^{-1} PS). Los autores mencionados anteriormente evaluaron el efecto de longitudes de onda mixtas de LED blanco y LED verde sobre las microalgas.

10.4.3. Clorofila *b* en microalgas

Son pocos los estudios que han reportado clorofila *b* en diatomeas, tal es el caso de Ju *et al.* (2009), quienes trabajaron con *T. weissflogii* y Wang *et al.* (2019) quienes analizaron *Phaeodactylum tricornutu*. Ambos estudios registraron concentraciones inferiores a las obtenidas en este trabajo. En el caso del primero, estas diferencias podrían deberse a que el procedimiento utilizado para la obtención de la muestra y su determinación fue diferente al utilizado en este trabajo; mientras que, con el segundo, estas pueden deberse a que fueron especies diferentes y a que se cultivaron en medio f/2 y a una temperatura de 20 °C. Además, estuvieron expuestos a ciclos de luz/oscuridad y a cinco concentraciones de p-cloroanilina.

En el caso de la concentración de clorofila *b* de TE-S-1 con base al peso seco, en este estudio se registró un valor de 3.639 pg Cl*b*·ng^{-1} PS, el cual fue menor al obtenido por Abiusi *et al*. (2013) para esta misma especie, con valores que fueron de 6 a13 pg Cl*b*·ng^{-1} PS, al utilizar luz roja y azul, respectivamente.

Con respecto a la concentración de clorofila *b* de NN-X-1 con base al peso seco, el valor (2.452 pg Cl*b*·ng^{-1} PS) obtenido en este trabajo fue más alto que el reportado por Ra *et al*. (2017), quienes registraron concentraciones inferiores a 2 pg Cl*b*·ng^{-1} PS para *N. oceánica* y *N. salina.*

10.4.4. Carotenoides totales en microalgas

En cuanto a la concentración de carotenoides totales de TH-W-1 con base al peso seco, en este estudio se registró un valor de 1.963 pg CT·ng^{-1} PS, el cual fue similar

al encontrado por Bhattacharjya *et al.* (2020), quienes obtuvieron 1.5 pg CT·ng^{-1} PS para *Thalassiosira* sp., la cual se inoculó en medio f/2 y se mantuvo como cultivo axénico.

Al considerar la concentración de carotenoides totales de CH-M-1 (2.982 pg CT·ng^{-1} PS) por biomasa obtenida en este estudio, esta fue superior a la encontrada por Goiris *et al.* (2012), quienes obtuvieron 2.33 pg CT·ng^{-1} PS para muestras de biomasa liofilizada de *C. calcitrans*. Contrariamente, la concentración de este estudio fue inferior a la registrada por Ahmed *et al*. (2014), quienes reportaron una concentración de 4.457 pg CT·ng^{-1} PS para *C. muelleri* cultivada en matraces de 250 mL con medio f/2 hasta alcanzar su fase exponencial.

En el caso de la concentración de CT de TE-S-1 con base al peso seco; en este estudio se registró un valor de 3.723 pg CT·ng^{-1} PS, el cual fue menor al obtenido por Abiusi *et al*. (2013), quienes registraron 6 pg CT·ng^{-1} PS, los cuales se mantuvieron constantes durante el experimento y no fueron afectados por los diferentes colores de luz.

Finalmente, la concentración de CT (1.609 pg CT·ng^{-1} PS) de NN-X-1 con base al PS de esta investigación, fue más baja que la registrada por Ra *et al*. (2017), quienes reportaron valores entre 2 y 4 pg CT·ng^{-1} PS para *N. oceanica* y *N. salina*. Por otra parte, la concentración de carotenoides totales de este trabajo fue similar a aquellas reportadas por Goiris *et al*. (2012), quienes obtuvieron concentraciones de 1.65 pg CT·ng^{-1} PS para *N. oculata* y de 2.17 pg CT·ng^{-1} PS para *Nannochloropsis* sp. De igual manera, la concentración obtenida coincide con la registrada por Ahmed *et al*. (2014) para *Nannochloropsis* sp. (2.010 pg CT·ng^{-1} PS).

10.4.5. Composición proximal en los juveniles de *A. franciscana*

Por otro lado, se observó que los juveniles de *A. franciscana* alimentados con las dietas isolipídicas a base de las microalgas TH-W-1, CH-M-1, TE-S-1 y NN-X-1 presentaron mayor concentración y porcentaje de proteínas, carbohidratos y lípidos que el testigo, siendo los juveniles alimentados con TE-S-1 los que registraron mayor concentración y porcentaje de los compuestos mencionados anteriormente, en comparación con los alimentados con las otras especies, lo cual coincide con la composición proximal de

TE-S-1, ya que esta especie fue la que registró las concentraciones más altas de proteínas, carbohidratos y lípidos en términos de biomasa seca. Por el contrario, los juveniles de *A. franciscana* alimentados con NN-X-1 presentaron las concentraciones más bajas de proteínas, carbohidratos y lípidos por organismo, en comparación con los juveniles alimentados con las demás microalgas, lo que puede deberse a que en diversas investigaciones se ha demostrado que los nauplios de *Artemia* no puede digerir especies de *Nannochloropsis*, ya que tienen paredes celulares rígidas (Gerken *et al.* 2012).

El porcentaje de proteína de los juveniles alimentados con la dieta TE-S-1 (54.11%) obtenido en este estudio fue similar al encontrado por Maldonado-Montiel y Rodríguez-Canché (2005), quienes registraron un porcentaje de 53.1% para adultos de *Artemia* sp. alimentados con la misma microalga. Por otra parte, Shanmugam y Rajendran (2018) obtuvieron 55.55% de proteína para adultos de *A. franciscana* alimentados con *Chaetoceros* sp., valor superior al encontrado en este estudio con la microalga *C. muelleri* (47.02%).

Respecto al porcentaje de lípidos, Shanmugam y Rajendran (2018) registraron un porcentaje de lípidos de 19.38% para adultos de *A. franciscana* alimentados con *Chaetoceros* sp., valor superior al encontrado en este estudio para juveniles de *Artemia* alimentados con *C. muelleri* (13.18%). Mientras que los mismos autores registraron 16.06% de lípidos para los organismos alimentados con *Tetraselmis* sp., porcentaje similar al obtenido en este trabajo para los juveniles alimentados con *T. suecica* (15.66%).

Con relación al porcentaje de carbohidratos, Sánchez-Saavedra y Paniagua-Chávez (2017) registraron 18.83% de carbohidratos para adultos de *A. franciscana* alimentados con *C. muelleri*, porcentaje superior al obtenido en este estudio para juveniles alimentados con la misma especie (8.81%). Sin embargo, Shanmugam y Rajendran (2018) obtuvieron 15.11% de carbohidratos para organismos alimentados con *Tetraselmis* sp., valor similar al registrado en esta investigación (11.45%) para juveniles de *Artemia* alimentados con *T. suecica.*

10.4.6. Carotenoides totales y clorofilas en los juveniles de *A. franciscana*

En cuanto a las concentraciones de carotenoides totales de los juveniles de *A. franciscana* de este estudio, estas fueron superiores a las registradas por Cheban *et al*. (2020), quienes obtuvieron valores de 0.06 a 0.18 ng CT·µg $^{-1}$ PS para nauplios de *Artemia salina* enriquecidos con las microalgas *Desmodesmus armatus*, *Chlorella vulgaris* y *Dunaliella viridis* por un periodo de 24 horas. Por el contrario, las concentraciones de este trabajo fueron inferiores a la obtenida por Abdollahi *et al*. (2019), cuyo valor alcanzó 0.884 ng CT·µg $^{-1}$ PS para adultos de *A. franciscana* enriquecidos por un periodo de 4 h con β-caroteno de *Dunaliella salina*, por lo que la diferencia de concentración podría deberse a la etapa en la que se encontraba la *Artemia* y al β-caroteno suministrado.

En otro sentido, no se han encontrado referencias sobre la concentración de clorofilas en crustáceos y su posible función. Sin embargo, la actividad antioxidante es uno de los efectos benéficos de las clorofilas para prevenir el daño oxidativo del ADN y la peroxidación lipídica (Pangestuti y Kim, 2011).

Por otra parte, los alimentos de alta calidad, como la *Artemia* enriquecida con microalgas, son el factor clave para promover el cultivo de larvas de peces; estas dietas proporcionan elementos nutricionales para mantener la vida útil, el crecimiento ideal y el sistema inmunológico de los peces (Madkour *et al.* 2022). Del mismo modo, los juveniles de *Artemia* enriquecidos con carotenoides de las microalgas del presente estudio, también pueden servir como alimento para peces ornamentales, como *Xiphophorus maculatus*, ya que se ha comprobado que suplementar algunos carotenoides en su dieta promueven la coloración y mejoran la respuesta inmune de las mucosas (Abdollahi *et al.* 2019). Además, Pérez-Rodríguez *et al.* (2018) estudiaron el impacto de *Artemia* enriquecida con *Chaetoceros calcitrans* como fuente de alimento para larvas de *Macrobrachium americanum* y obtuvieron mejores tasas de crecimiento y supervivencia.

10.4.7. Inclusión de carotenoides sobre la fisiología de los organismos acuáticos

Los carotenoides se emplean en las dietas de crustáceos, salmónidos y otros peces ornamentales y de cultivo, para generar resistencia contra diversos factores estresantes y así aumentar la producción acuícola (Joy *et al.* 2021). Diversos estudios han demostrado que el crecimiento/desarrollo y la supervivencia mejoran significativamente cuando los organismos acuáticos se alimentan con una dieta con carotenoides en comparación con aquéllos que se alimentan con una dieta sin carotenoides (Lim *et al*. 2018; Liu *et al.* 2018; Wang *et al.* 2020).

Por otro lado, los carotenoides actúan como antioxidantes que ayudan a mitigar el estrés oxidativo (Joy *et al.* 2021); ya que los carotenoides pueden prevenir la peroxidación lipídica, reducir el estrés oxidativo celular y reducir la respuesta inflamatoria de los tejidos (Britton, 2020; Von Lintig *et al.* 2020). Esto significa que los carotenoides ayudan a combatir el estrés crónico causado por una sobreestimulación del sistema inmune. Además, los carotenoides pueden convertir especies reactivas de oxígeno (ERO) producidas endógenamente, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), los radicales hidroxilo (OH^-) y los aniones superóxido (O_2^-), en productos más estables que causan menos daño a las membranas celulares (Nakano y Wiegertjes, 2020).

Como se mencionó anteriormente, los organismos acuáticos comúnmente están sometidos a muchas condiciones de estrés, como pueden ser: enfermedades, uso de químicos, cambios repentinos de temperatura, presencia de metales pesados, y condiciones de cultivo, por lo que la actividad antiestrés de los carotenoides ha sido vista con interés por las granjas acuícolas (Wu *et al*. 2015; Nakano *et al*. 2018; Wu *et al.* 2019).

En el caso de la temperatura, se ha observado que esta puede actuar como uno de los factores estresantes comunes que potencialmente intervienen en los mecanismos fisiológicos de los organismos acuáticos, ya que un aumento en la temperatura ocasiona un mayor consumo de oxígeno por parte de los organismos, lo cual resulta en un incremento en la producción de ERO (Lushchak, 2011; Nakano *et al*. 2014).

Respecto al oxígeno, los niveles elevados de O_2 aumentan la generación de ERO debido a una mayor probabilidad de que los electrones escapen de las cadenas de transporte de electrones para combinarse con el oxígeno molecular. Sin embargo, los organismos poseen mecanismos adaptativos específicos para prevenir las consecuencias negativas de los altos niveles de oxígeno ambiental, ya que la exposición a la hiperoxia es un inductor de estrés oxidativo en los organismos acuáticos. A nivel de comportamiento pueden evitar las áreas sobresaturadas de oxígeno, mientras que a nivel de organismo pueden reducir su capacidad de extraer oxígeno ambiental (Lushchak, 2011).

En los organismos acuáticos, el estrés inducido por cambios de salinidad se ha asociado con una mayor generación de ERO, causando daño oxidativo y alteración de la fisiología normal (Liu *et al*. 2007; McGraw *et al.*, 2010). A nivel celular, los organismos se recuperan del daño oxidativo causado por los ERO inducidos por una alta salinidad, mediante la supresión y activación de ciertas transcripciones genéticas, la modulación de las actividades enzimáticas antioxidantes y la activación de proteínas mediante fosforilación (Giraud-Billoud *et al.* 2019).

En otro sentido, el aceite de pescado utilizado en los alimentos acuícolas contiene una gran cantidad de AGPIs, los cuales son fácilmente oxidados. Esto da como resultado que los peces alimentados con aceite altamente oxidable presenten concentraciones más elevadas de peróxidos lipídicos, actividad transaminasa y lípidos (triglicéridos, colesterol total y fosfolípidos), que aquellos alimentados con aceite menos propenso a ser oxidado (Nakano *et al*. 1999). A su vez, los productos mencionados anteriormente se descomponen en una variedad de ERO que atacan los componentes celulares e inducen estrés (Sies *et al*. 2017; Virág *et al.* 2019).

Por otra parte, se ha demostrado que la acumulación de carotenoides en los tejidos reproductivos a través de la suplementación dietética con carotenoides mejora el número de características de rendimiento, como el número de huevos, la calidad de los huevos y el número de larvas de varias especies de peces (Bjerkeng 2008). Asimismo, los carotenoides tienen función fotoprotectora, ya que pueden proteger las

membranas de los huevos del daño oxidativo causado por la radiación ultravioleta (Lim *et al.* 2018).

De igual forma, la inclusión de carotenoides en las dietas de los crustáceos tiene un efecto directo en medidas reproductivas como el número de huevos, la tasa de eclosión y el total de nauplios producidos (Wouters *et al.* 2001). Además, en los crustáceos, un agotamiento de carotenoides en el hepatopáncreas y el ovario, viene acompañado de una elevación de la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) en la hemolinfa de los camarones cautivos en comparación con los camarones silvestres (Linan-Cabello *et al.* 2003). Esto refleja la insuficiente actividad secuestradora para neutralizar los procesos de estrés oxidativo durante el desove, ya que los procesos fisiológicos y de desarrollo normales, como el desarrollo y la reproducción de los ovarios, también son fuentes potenciales de radicales libres de oxígeno (Wade *et al.* 2015).

10.5. Conclusiones

Con base en los resultados obtenidos de la composición proximal, se determinó que las proteínas (44.42% – 63.66%) fueron los compuestos más abundantes en las cuatro especies de microalgas, seguidos de carbohidratos (15.85% – 33.93%) y lípidos (17.31% – 25.51%). Además, se determinó que la clorofila *a* (7.50 pg Cl*a*·ng^{-1} PS – 12.59 pg Cl*a*·ng^{-1} PS) fue el compuesto más abundante en todas las especies de microalgas. Por otra parte, se observó un efecto positivo en las concentraciones de peso seco, peso orgánico, composición proximal (proteínas, carbohidratos y lípidos), clorofila *a*, clorofila *b* y carotenoides totales de los juveniles de *A. franciscana* después de 6 h de ser alimentados con las diferentes especies de microalgas, ya que su concentración fue mayor a la registrada por el testigo, siendo los organismos alimentados con *T. suecica* aquellos que presentaron los mejores resultados en términos de composición proximal y clorofila *b*, y aquellos que recibieron las dietas de *T. weissflogii* y *C. muelleri* en términos de clorofila *a* y carotenoides totales.

11. RECOMENDACIONES

Primeramente, se sugiere realizar estudios donde se someta a los juveniles de *A. franciscana* a diversas condiciones de estrés, con la finalidad de comprobar si los carotenoides presentes en las microalgas de este estudio funcionarían como antioxidantes y tendrían un efecto positivo en la respuesta inmune de los organismos, lo cual se vería reflejado en mejores resultados en cuanto a reproducción, crecimiento y supervivencia de los organismos con respecto al testigo. Posteriormente, sería conveniente hacer experimentos donde se utilice a los juveniles de *A. franciscana* enriquecidos con estas microalgas como alimento vivo para otras especies marinas, lo cual mejoraría su calidad nutricional. Tal es el caso del camarón blanco *P. vannamei*, el cual es uno de los más cultivados en granjas de camarón, debido a la gran demanda que tiene por parte de la población y a que genera importantes ingresos económicos en el estado de Sinaloa.

12. LITERATURA CITADA

Abdollahi, Y., N. Ahmadifard, N. Agh, K. Rahmanifarah and M. Amin-Hejazi. 2019. β-Carotene-enriched *Artemia* as a natural carotenoid improved skin pigmentation and enhanced the mucus immune responses of platyfish *Xiphophorus maculatus*. Aquaculture International. doi: 10.1007/s10499-019-00437-8

Abiusi, F., G. Sampietro, G. Marturano, N. Biondi, L. Rodolfi, M. D'Ottavio, and M. R. Tredici. 2013. Growth, photosynthetic efficiency, and biochemical composition of *Tetraselmis suecica* F&M-M33 grown with LEDs of different colors. Biotechnol. Bioeng. 111(5):956-964. doi:10.1002/bit.25014

Acien, F., J.M. Fernández Sevilla and Grima E. Molina, 2013. Photobioreactors for the production of microalgae. Rev. Environ. Sci. Biotechnol. 12(2):131–151.

Aguirre, L.E., L. Ouyang, A. Elfwing, M. Hedblom, A. Wul and O. Inganäs. 2018. Diatom frustules protect DNA from ultraviolet light. Sci. Rep. 8:5138.

Aguirre-Hinojosa, E., P. Piña-Valdez, M. C. Garza-Aguirre, L. D. Guzmán-Ramírez, R. Montoya-Olvera, J. O. Torres-Quiroga y M. Nieves-Soto. 2012. Efecto de las xantofilas de la flor de cempasúchil *Tagetes erecta* L. en la acumulación de

astaxantina y la sobrevivencia de postlarvas del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). Rev. Mex. Ing. Quim. 11(2):249-257.

Ahmed, F., K. Fanning, M. Netzel, W. Turner, Y. Li and P.M. Schenk. 2014. Profiling of carotenoids and antioxidant capacity of microalgae from subtropical coastal and brackish waters. Food Chem. 165: 300-306. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.05.107

Aké-Castillo, J.A. 2015. Descripción morfológica y autoecología de Thalassiosira cedarkeyensis A.K.S.K. Prasad (Bacillariophyta: Thalassiosirales), en la laguna de Sontecomapan, Veracruz, México. Cymbella. Revista de investigación y difusión sobre algas. 1(1): 12-18.

Anzueto-Sánchez, M.A. 2014. Efecto de la dieta y la temperatura en los parámetros poblacionales y en el valor nutricional del copépodo Pseudodiaptomus euryhalinus cultivado en laboratorio. Tesis doctorado en acuicultura. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California, México.

Araújo, C. F. C. and L.P. Souza-Santos. 2013. Use of the Microalgae Thalassiosira weissflogii to Assess Water Toxicity in the Suape Industrial-Port Complex of Pernambuco, Brazil. Ecotoxicol. Environ. Saf. 89: 212–221.

Arriaga, H. V. y A. A. Re. 1997. Uso de microalgas vivas e inertes como alimento para Artemia franciscana (Anostraca: Artemiidae). Rev. Biol. Trop. 45(2): 803-811.

Bachvaroff, T. R., M. V. S. Puerta and C. F. Delwiche. 2005. Chlorophyll c—containing plastid relationships based on analyses of a multigene data set with all four Chromalveolate Lineages. Mol Biol Evol. 22:1772–1782

Bhattacharjya, R., T. Kiran Marella, A. Tiwari, A. Saxena, P. Kumar Singh and B. Mishra. 2020. Bioprospecting of marine diatoms Thalassiosira, Skeletonema and Chaetoceros for lipids and other value-added products. Bioresour. Technol. 318:1-9. doi: 10.1016/j.biortech.2020.124073

Becker, E. W. 2013. Microalgae for human and animal nutrition. En Richmond A and Q. Hu (Eds.). Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology. Wiley-Blackwell, Oxford, UK.

Bjerkeng, B. 2008. Carotenoids in Aquaculture: Fish and Crustaceans. En Britton G, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander (Eds.). Carotenoids. Volume 4: Natural Functions. Birkhauser, Germany.

Björn, L. O., G. C. Papageorgiou, R. E. Blankenship and Govindjee. 2009. A viewpoint: Why chlorophyll a? Photosynth. Res. 99(2): 85–98. doi: 10.1007/s11120-008-9395-x

Bligh, E. G. and W. J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911–917.

Blankenship, R. E. 2014. Photosynthetic pigments: structure and spectroscopy. En Blankenship R. E. (Ed.). Molecular mechanisms of photosynthesis. John Wiley & Sons: Oxford. UK.

Botte, P., G. d'Ippolito, C. Gallo and A. Sardo. 2017. Combined exploitation of CO2 and nutrient replenishment for increasing biomass and lipid productivity of the marine diatoms Thalassiosira weissflogii and Cyclotella cryptica. J. Appl. Phycol. 30(1): 243–251.

Britton, G. 1998. Overview of carotenoid biosynthesis. En Britton, G., S. Liaaen-Jensen H. Pfander (Eds). Carotenoids, Vol. 3. Birkhäuser, Germany.

Britton, G. 2008. Functions of intact carotenoids. En Britton G, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander (Eds.). Carotenoids. Volume 4: Natural Functions. Birkhauser, Germany.

Britton, G. 2020. Carotenoid research: History and new perspectives for chemistry in biological systems. Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Biol. Lipids. 1865, 158699.

Carbajal-López, A. 2008. Producción en masa del rotífero Brachionus plicatilis alimentado con 4 diferentes microalgas, para su uso como alimento vivo de larvas de peces marinos. Tesis en licenciatura. Universidad de Guadalajara,

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Zapopan, Jalisco, México.

Castrejón, L., M. Soriano y E. Soto. 1993. Biología y aprovechamiento del camarón duende Streptocephalus (Crustacea branchiopoda). Universidad del Mar. Oaxaca, México.

Cázares-Salazar, A. 2014. Efecto de dietas mixtas de microalgas marinas en el cultivo y composición de ácidos grasos esenciales del copépodo Pseudodiaptomus euryhalinus. Tesis Maestría en acuicultura. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California, México.

Cebrián, J. and I. Valiela. 1999. Seasonal patterns in phytoplankton biomass in coastal ecosystems. J. Plankton Res. 21(3):429-444.

Chansawang, N. 2015. The effects of growth conditions on the elemental and biochemical composition of the diatom Thalassiosira weissflogii and the haptophyte Emiliania huxleyi. Ph. D. Thesis. School of Biological Sciences, University of Essex. Colchester, United Kingdon.

Chávez-Cabrera, C., Z. R. Flores-Bustamante y L. B. Flores-Cotera. 2010. Una Vista Integral de la Síntesis de Astaxantina en Phaffia rhodozyma. BioTecnol.14(3): 24-38.

Chen, M., Y. Li, D. Birch and R. D. Willows. 2012. A cyanobacterium that contains chlorophyll f – a red-absorbing photopigment. FEBS Lett. 586:3249–3254. doi:10.1016/j.febslet.2012.06.045

Chen, M. and H. Scheer. 2013. Extending the limits of natural photosynthesis and implications of technical light harvesting. J. Porphyr. Phthalocyanines. 17:1–15.

Chien, Y. H., C. H. Pan and B. Hunter. 2003. The resistance to physical stresses by Penaeus monodon juveniles fed diets supplemented with astaxanthin. Aquac. 216:177-191.

Chien, Y. H. and W. C. Shiau. 2005. The effects of dietary supplementation of algae and synthetic astaxanthin on body astaxanthin, survival, growth, and low

dissolved oxygen stress resistance of kuruma prawn, Marsupenaeus japonicus Bate. J. Exp. Mar. Bio. Ecol. 318:201-211.

Christaki E., E. Bonos and P. Florou-Paneri. 2015. Innovative Microalgae Pigments as Functional Ingredients in Nutrition. En Kim, S.-K. (Ed.). Handbook of Marine Microalgae. Academic Press, Cambridge, MA, USA.

Chiu, S.-Y., C.-Y. Kao, T.-Y. Chen, Y.-B. Chang, C.-M. Kuo and C.-S. Lin. 2015. Cultivation of microalgal Chlorella for biomass and lipid production using wastewater as nutrient resource. Bioresour. Technol. 184:179-189.

Cisneros, R. 2012. Crecimiento poblacional del rotífero nativo Brachionus sp. "cayman" al evaluar diferentes microalgas como alimento. Rev. Cub. Investig. Pesq. 2012. 29(1):18-23.

Collantes, G. y Oliva, D. 2013. Métodos de cultivo de microalgas. Editorial Universidad de Valparaíso, Valparaíso, Chile.

Converti, A., A. A. Casazza, E. Y. Ortiz, P. Perego and M. Del Borghi. 2009. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of Nannochloropsis oculata and Chlorella vulgaris for biodiesel production. Chem. Eng. Process.: Process Intensif. 48:1146‑1151.

Darachai, J., Piyatiratitivorakul, S., Kittakoop, P., Nitithamyong, C. y Menasveta, P. 1998. Effects of astaxanthin on larval growth and survival of the giant tiger prawn, Penaeus monodon. En Flegel T. W. (Ed). Advances in shrimp biotechnology, Bangkok, Thailand.

De la Vega-Naranjo, M. 2014. Aislamiento, caracterización y manipulación genética de microalgas marinas para la producción de compuestos de alto valor añadido. Tesis doctorado en Departamento de Química y Ciencias de los materiales. Universidad de Huelva. Huelva, España.

Di Lena, G. I. Casini, M. Lucarini, and G. Lombardi-Boccia. 2019. Carotenoid Profiling of Five Microalgae Species from Large-Scale Production. Food Res. Int. 120: 810–818.

Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers and F. Smith. 1956. Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 18: 350–356.

Duy, N. D. Q., D. S. Francis and P. C. Southgate. 2017. The nutritional value of live and concentrated micro-algae for early juveniles of sandfish, Holothuria scabra. Aquac. 473:97–104.

Enzing, C, Ploeg, M, Barbosa, M. and Sijtsma, L. 2014. Microalgae-based products for the food and feed sector: an outlook for Europe. Joint Research Centre Scientific and Policy Reports, European Commission. Publications Office of the European Union, Luxembourg, p 82. doi:10.2791/3339.

Escobar-Gil, A. R. y Cano-Manríque, J. L. 2015. Efecto de la concentración del extracto acuoso de Salicornia fruticosa en el crecimiento poblacional y contenido de lípidos totales de la microalga Tetraselmis suecica cultivada en condiciones de laboratorio. Tesis de licenciatura. Escuela Académico Profesional de Biología en Acuicultura, Universidad Nacional del Santa. Áncash, Peru.

Fabregas, J., C. Herrero, B. Cabezas and J. Abalde. 1985. Mass culture and biochemical variability of the marine microalga Tetraselmis suecica Kylin (Butch) with high nutrient concentrations. Aquac. 49(3-4):231–244. doi:10.1016/0044-8486(85)90082-1

Fabregas, J., L. Toribio, J. Abalde, B. Cabezas and C. Herrero. 1987. Approach to biomass production of the marine microalga Tetraselmis suecica (kylin) butch using common garden fertilizer and soil extract as cheap nutrient supply in batch cultures. Aquac. Eng. 6(2):141–150. doi:10.1016/0144-8609(87)90011-2

Fan, J., Y. Cui, M. Wan, W. Wang and Y. Li. 2014. Lipid accumulation and biosynthesis genes response of the oleaginous Chlorella pyrenoidosa under three nutrition stressors. Biotechnol. Biofuels. 7:17.

Franchino, M., E. Comino, F. Bona and V. A. Riggio. 2013. Growth of three microalgae strains and nutrient removal from an agro-zootechnical digestate. Chemosphere. 92(6):738-744.

Franz, A. D., M. A. Danielewiez, D. M. Wong, L. A. Anderson and J. R. Boothe. 2013. Phenotypic screening with oleaginous microalgae reveals modulators of lipid productivity. ACS Chem. Biol. 8:1053-1062.

Frost, B. W. 1972. Effects of size and concentration of food particles on the feeding behavior of the marine planktonic copepod Calanus pacificus. Limnol. Oceanogr. 17:805-815.

Gallego-Galiano, P. 2011. Efecto del fototropismo en larvas y juveniles de Artemia (Artemia franciscana, Kellogg, 1906). An. Univ. Etol. 5:14-20.

Gao, G., Q. Shi, Z. Xu, J. Xu, D. A. Campbell and H. Wu. 2018. Global warming interacts with ocean acidification to alter PSII function and protection in the diatom Thalassiosira weissflogii. Environ. Exp. Bot. 147:95‑103.

Garcés-Llantín, J. H. 2009. Efecto de la alimentación y exposición a la luz ultravioleta en la sobrevivencia de Artemia franciscana. Tesis de licenciatura. Universidad Interamericana de Puerto Rico. San Germán, Puerto Rico.

García, N., J. A. López-Elías, A. Miranda, M. Martínez-Porchas, N. Huerta and A. García. 2012. Effect of salinity on growth and chemical composition of the diatom Thalassiosira weissflogii at three culture phases. Lat. Am. J. Aquat. Res. 40(2): 435-440.

García-Romeral, J., M. Pavía-Gómez, T. García-Sanz, J. Chirivella-Martorell, and Á. Serrano-Aroca. 2017. Principios de Biotecnología y Bioingeniería en el cultivo de microalgas: importancia, problemas tecnológicos, tipos y sistemas de cultivos, crecimiento, factores limitantes, selección, aislamiento, escalado y caracterización bioquímica. NEREIS. 9:115-129.

Ghosh, A., S. Khanra, M. Mondal, G. Halder, O. N. Tiwari, S. Saini, T. K. Bhowmick and K. Gayen. 2016. Progress toward isolation of strains and genetically engineered strains of microalgae for production of biofuel and other value added chemicals: A review. Energy Conv. Manag. 113:104-118.

Giraud-Billoud, M., G. A. Rivera-Ingraham, D. C. Moreira, T. Burmester, A. Castro-Vazquez, J. M. Carvajalino-Fernández, A. Dafre, C. Niu, N. Tremblay, B. Paital, R. Rosa, J. M. Storey, I. A. Vega, W. Zhang, G. Yepiz-Plascencia, T. Zenteno-Savin, K. B. Storey, and M. Hermes-Lima. 2019. Twenty years of the 'preparation for oxidative stress' (POS) theory: Ecophysiological advantages and molecular strategies. Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol. 234:36–49. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.04.004.

Godínez, D., M. Gallo, R. Gelabert, A. Díaz, J. Gamboa, V. Landa and E. Godínez. 2004. Crecimiento larvario de Artemia franciscana (Kellog, 1906) alimentada con dos especies de microalgas vivas. Zootec. Trop. 22(3):265-275.

Goiris, K., K. Muylaert, I. Fraeye, I. Foubert, J. De Brabanter and L. De Cooman. 2012. Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. J. Appl. Phycol. 24:1477–1486. DOI 10.1007/s10811-012-9804-6.

Gómez, A. L., J. A. López, A. Rodríguez, J. Fortiz, L. R. Martínez, A. Apolinar and L. F. Enríquez. 2016. Producción de compuestos fenólicos por cuatro especies de microalgas marinas sometidas a diferentes condiciones de iluminación. Lat. Am. J. Aquat. Res. 44(1):137-143.

Guedes, A. C., Sousa-Pinto, I. and Malcata, F.X. 2015. Application of Microalgae Protein to Aquafeed. En Handbook of Marine Microalgae. Elsevier, Netherlands.

Guevara-Acosta, M. A. 2011. Optimización de las condiciones de cultivo y mejoramiento genético como estrategias para incrementar el valor nutricional de Rhodomonas salina (Wislouch) Hill y Wetherbee (1989) (Cryptophyta) como alimento para la acuicultura. Tesis de doctorado.

Guevara, M., L. Bastardo, R. Cortez, B. Arredondo-Vega, L. Romero and P. Gómez. 2011. Rhodomonas salina (Cryptophyta) pastes as feed for Brachionus plicatilis (Rotifera). Rev. Biol. Trop. 59:1503- 1515.

Guevara, M. and C. Lodeiros. 2003. Composición bioquímica de nauplios y metanauplios de Artemia sp. (Crustacea, Anostraca) proveniente de la salina

artificial de Araya, nororiente de Venezuela. Cienc. Mar. 29:655-663. doi: 10.7773/cm.v29i42.186

Guillard, R. R. L. and J. H. Ryther. 1962. Studies of marine planktonic diatoms, I. Cyclotella nana Hustedt and Detonula confervacea (Cleve). Can. J. Microbiol. 8: 229-325.

Gunerken, E, E. D'Hondt, M. H. M. Eppink, L. Garcia-Gonzalez, K. Elst and R. H. Wijffels. 2015. Cell disruption for microalgae biorefineries. Biotechnol. Adv. 33:243–260.

Gutierrez-Salmean, G., L. Fabila-Castillo and G. Chamorro-Cevallos. 2015. Nutritional and Toxicological Aspects of Spirulina (Arthrospira). Nutr. Hosp. 32:34-40.

Hamed, I. 2016. The Evolution and Versatility of Microalgal Biotechnology: A Review. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 15:1104-1123.

Hemerick, G. 1973. Mass culture. En Stein, J. R. (Ed.) Handbook of physiological methods. Cambridge University Press, UK.

Henrikson, R. 2009. Earth food spirulina. Sixth Printing, Ronore Enterprises, Inc., Hana, Maui, Hawaii.

Hernández, A. y J. Labbé. 2014. Microalgas, cultivos y beneficios. Rev. Biol. Mar. Oceanogr. 49(2):157-173.

Hira, K., R. M. Tariq, V. Sultana, J. Ara and S. Ehtesham ul-Haque. 2017. Effect of seaweeds occurring at Karachi coast on mosquito larvae and liver function in rats. Pak. J. Pharm. Sci. 30(2):387-391.

Hu, Q. 2013. The microalgae cell with reference to mass cultures: Environmental effects on cell composition. En Richmond A, and Hu, Q, (Eds). Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology. Wiley Blackwell.

Isenmann, P. 1975. Observations sur la mouette pygmée (Larus minutus) en Camargue de 1971 à 1974. Terre et Vie. 29(1):77-88.

Jeffrey SW, Wright SW. 2005. Photosynthetic pigments in marine microalgae: insights from cultures and the sea. En Subba Rao, D. V. (Ed.). Algal Cultures Analogues of Blooms and Applications. Science Publishers, New Hampshire, UK.

Joy, J. M., J. Aneykutty and R. Anandan. 2021. The role of carotenoids in enhancing the health of aquatic organisms. Intl J. Fish. & Aquat. Stud. 9(2):250-254.

Ju, Z. Y., D. F. Deng and W. A. Dominy. 2012. A defatted microalgae (Haematococcus pluvialis) meal as a protein ingredient to partially replace fishmeal in diets of Pacific white shrimp (Litopenaeus vannamei, Boone, 1931). Aquac. 354-355: 50-55.

Junior, A. M. M., E. B. Neto, M. L. Koening and E. E Leça. 2006. Composição química de microalgas em cultivo semi-intensivo: Chaetoceros gracilis Schutt, Isochrysis galbana Parke e Thalassiosira weissflogii (Grunow) G. Fryxell & Hasle, Rev. Cienc. Agron. 37:142-148.

Katavic, I., M. Tudor, J. Komljenovic and N. Ruzic. 1985. Changes in the biochemical composition of Artemia salina (L.) in relation to different feeding conditions. Acta Adriat. 26:123-134.

Katayama, T., A. Murata and S. Taguchi. 2011. Responses of pigment composition of the marine diatom Thalassiosira weissflogii to silicate availability during dark survival and recovery. Plankton Benthos Res. 6(1):1–11.

Katiyar, R. and A. Arora. 2020. Health promoting functional lipids from microalgae pool: A review. Algal Res. 46. 101800. doi.org/10.1016/j.algal.2020.101800.

Kato, K., T. Shinoda, R. Nagao, S. Akimoto, T. Suzuki, N. Dohmae, M. Chen, S. I. Allakhverdiev, J-R. Shen, F. Akita, N. Miyazaki and T. Tomo. (2020). Structural basis for the adaptation and function of chlorophyll f in photosystem I. Nat. Commun. 11(1):1-10. doi:10.1038/s41467-019-13898-5

Kiron, V., M. Phromkunthong, M. Huntley, I. Archibald and G. De Scheemaker. 2012. Marine microalgae from biorefinery as a potential feed protein source for Atlantic salmon, common carp and whiteleg shrimp. Aquac. Nutr. 18:521-531.

Koller, M., A. Muhr and G. Braunegg. 2014. “Microalgae as versatile celular factories for valued products”. Algal Res. 6:52-63.

Lakshmana-Senthil, S., T. T. Ajith-Kumar, T. Maruthu-Pandi, K. Nandhini-Devi and T. Balasubramanian. 2011. Comparison of A1 DHA and Microalgae on biochemical signatures of enriched Artemia salina. Anal. Biol. Res. 2(4):110–121.

La Roche, J., A. W. D. Larkum, B. R. Green, G. W. M. Van der Staay, F. Partensky, A. Ducret, R. Aebersold, R. Li, S. S. Golden, R. G. Hiller and P. M. Wrench. 1996. Independent evolution of the prochlorophyte and green plant chlorophyll a/b light-harvesting proteins. PNAS. 93(26):15244–15248. doi:10.1073/ pnas.93.26.15244.

Leger, P., D. A. Bengston, K. L. Simpson, and P. Sorgeloos. 1986. The use and nutritional value of Artemia as a food source. Oceanog. Mar. Biol. Ann. Rev. 24: 521-523.

Leonardos, N. and R. J. Geider. 2004. Responses of elemental and biochemical composition of Chaetoceros muelleri to growth under varying light and nitrate: phosphate supply ratios and their influence on critical N: P. Limnol. Oceanogr. 49(6):2105-2114

Lim, K.C., F. M. Yuso, M. Shari and M. S. Kamarudin. 2018. Astaxanthin as feed supplement in aquatic animals. Rev. Aquac. 10:738–773.

Lin, Q., W.-H. Zhuo, X.-W. Wang, C.-P. Chen, Y.-H. Gao, and J.-R Liang. 2018. Effects of fundamental nutrient stresses on the lipid accumulation profiles in two diatom species Thalassiosira weissflogii and Chaetoceros muelleri. Bioprocess Biosyst. Eng. 41(8):1213–1224.

Linan-Cabello, M.A., J. Paniagua-Michel and T. Zenteno-Savin. 2003. Carotenoids and retinal levels in captive and wild shrimp, Litopenaeus vannamei. Aquac. Nutr. 9:383–389.

Liu, Y., W. N. Wang, A. L. Wang, J. M. Wang and R. Y. Sun. 2007. Effects of dietary vitamin E supplementation on antioxidant enzyme activities in Litopenaeus

vannamei (Boone, 1931) exposed to acute salinity changes. Aquac. 265:351–358.

Liu, X.H., B. J. Wang, Y. F. Li, L. Wang and J. G. Liu. 2018. Effects of dietary botanical and synthetic astaxanthin on E/Z and R/S isomer composition, growth performance, and antioxidant capacity of white shrimp, Litopenaeus vannamei, in the nursery phase. Invertebrate Surviv. J. 15(1):131-140.

López-Elías, J. A., M. C. Báez-Dueñas and N. Huerta-Aldaz. 1995. Manual de técnicas analíticas aplicadas al cultivo de microalgas. Publicaciones Académicas. Sonora, México.

López-Elías, J. A., N. García-Lagunas, L. R. Jiménez-Gutiérrez and N. Huerta-Aldaz. 2009. Crecimiento de la diatomea Thalassiosira pseudonana en cultivos estáticos con iluminación continua y fotoperiodo a diferentes salinidades. Biotecnia. 11(1):10-18.

Lora-Vilchis, M. C. 2004. Evaluación de la calidad dietética de microalgas mediante el uso del balance energético de Artemia franciscana. Tesis de doctorado. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. La Paz, Baja California Sur, México.

Lora-Vilchis, M.C., B. Cordero-Esquivel and D. Voltolina. 2004. Growth of Artemia franciscana fed Isochrysis sp. and Chaetoceros muelleri during its early life stages. Aquac. Res. 35:1086-1091. doi: 10.1111/j.1365-2109.2004.01123.x

Lores-Subirats, H. 2015. Estudio a escala piloto del efecto de diferentes condiciones de operación sobre la eliminación de nutrientes en un cultivo de microalgas. Tesis de maestría. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España.

Lovio-Fragoso, J. P., C. Hayano-Kanashiro and J. A. López-Elías. 2019. Effect of different phosphorus concentrations on growth and biochemical composition of Chaetoceros muelleri. Lat. Am. J. Aquat. Res. 47(2):361-366. DOI: 10.3856/vol47-issue2-fulltext-17

Lowry, O. H., J. Rosebrough, A. L. Farr and R. L. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem.193: 265–275.

Luna-Figueroa, J.; T. Vargas and J. Figueroa. 2010. Alimento vivo en la dieta de larvas y juveniles de Pterophyllum scalare (Lichtenstein, 1823). AIA. 14: 63-72.

Lushchak, V.I. 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. Aquat. Toxicol. 101:13–30.

Malibari, R., F. Sayegh, A. M. Elazzazy, M. N. Baeshen, M. Dourou and G. Aggelis. 2018. Reuse of shrimp farm wastewater as growth medium for marine microalgae isolated from Red Sea – Jeddah. J. Clean. Prod. 198:160–169. doi: 10.1016/j.jclepro.2018.07.037

Maoka, T. 2011. Carotenoids in marine animals. Mar. Drugs. 9:278-293.

Madkour K. K., M. A. O. Dawood and H. Sewilam. 2022. The use of Artemia for aquaculture industry: An updated overview. Ann. Anim. Sci. 23(1):1-18. https://doi.org/10.2478/aoas 2022 0041

Martin, J. F., E. Gudina and J. L. Barredo. 2008. Conversion of beta-carotene into astaxanthin: Two separate enzymes or a bifunctional hydroxylase-ketolase protein? Microb. Cell. Fact. 7(3):1-10.

Martínez-Brown, J. M. 2001. Cultivo de Nannochloropsis sp. con tres productos de naturaleza zeolítica, para la alimentación del rotífero Brachionus plicatilis Miller. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Sinaloa, Facultad de Ciencias del Mar. Mazatlán, Sinaloa, México.

Martínez-Córdova, L. R., M. Martínez-Porchas, J. A. López-Elías and L. F. Enríquez-Ocaña. 2014. Uso de microorganismos en el cultivo de crustáceos. Biotecnia. 16(3):50-55.

Matos, A. P., R. Feller, E. H. S. Moecke, J. V. Oliveira, A. F. Junior, R. B. Derner and E. S. Sant'Anna. 2016. Chemical characterization of six microalgae with potential utility for food application. J. Am. Oil. Chem. Soc. 93: 963-972.

Matos, A. P., R. Feller, E. H. S. Moecke and E. S. Sant'Anna, 2015. Biomass, lipid productivity and fatty acids composition of marine Nannochloropsis gaditana cultured in desalination concentrate. Bioresour. Technol. 197:48–55

Matsuno, T. 2001. Aquatic animal carotenoids. Fish Sci. 67:771–789.

McGraw, K. J., A. A. Cohen, D. Constantini and P. H˜orak. 2010. The ecological significance of antioxidants and oxidative stress: a marriage between mechanistic and functional perspectives. Funct. Ecol. 24(5):947–949. https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2010.01772.x.

McMahon, J. W. and F. H. Rigler. 1963. Mechanisms regulating the feeding behavior of Daphnia magna Straus. Can. J. Zool. 41:603-611.

Meyers, S. P. 2000. Papel del carotenoide astaxantina en nutrición de especies acuáticas. En Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. UANL. La Paz, B.C.S., México. p 586.

Mohebbi, F., A. M. Azari, R. Ahmadi, M. Seidgar, B. Mostafazadeh and S. Ganji. 2015. The effects of Dunaliella tertiolecta, Tetraselmis suecica and Nannochloropsis oculata as food on the growth, survival and reproductive characteristics of Artemia urmiana. Environ. Resour. Res. 3(2):111-120.

Montoya-Vallejo, C. and A. Acosta-Cárdenas. 2016. Producción de biomasa microalgal de Tetraselmis sp. en fotobiorreactor tipo columna de burbujeo. En Congreso Internacional de Flujos Reactivos. Medellin, Colombia. p 2.

Moore, C. M., M. M. Mills, K. R. Arrigo, I. Bermanfrank, L. Bopp, P. W. Boyd, E. D. Galbraith, R. J. Geider, C. Guieu and S. L. Jaccard. 2013. Processes and patterns of oceanic nutrient limitation. Nat. Geosci. 6:701-710.

Mulders, K. J. M., P. P. Lamers, D. E. Martens and R. H. Wijffels. 2014. Phototrophic pigment production with microalgae: biological constraints and opportunities. J. Phycol. 50:229–242

Muthuraj, M., V. Kumar, B. Palabhanvi, and D. Das. 2014. Evaluation of indigenous microalgal isolate Chlorella sp. FC2 IITG as a cell factory for biodiesel production and scale up in outdoor conditions. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 41:499–511. https:// doi.org/10.1007/s10295-013-1397-9.

Nakano, T., T. Kanmuri, M. Sato and M. Takeuchi. 1999. Effect of astaxanthin rich red yeast (Phaffia rhodozyma) on oxidative stress in rainbow trout. Biochim. Biophys. Acta. 1426:119–125.

Nakano, T., M. Kameda, Y. Shoji, S. Hayashi, T. Yamaguchi and M. Sato. 2014. Effect of severe environmental thermal stress on redox state in salmon. Redox Biol. 2:772–776.

Nakano, T., S. Hayashi and N. Nagamine. 2018. Effect of excessive doses of oxytetracycline on stress-related biomarker expression in coho salmon. Environ. Sci. Pollut. Res. 25:7121–7128.

Nakano, T. and G. Wiegertjes. 2020. Properties of Carotenoids in Fish Fitness: A Review. Marine Drugs, 18(11):568. doi:10.3390/md18110568

Nieves, M., D. López, M. Medina, P. Piña, S. Leal and J. López-Elías. 2009. Producción y calidad de Chaetoceros muelleri a diferentes concentraciones de nutrientes y densidades de inóculos. Rev. Invest. Mar. 30(2):123-133.

Niu J., L. Tian, H. Y. Lin and Y. Liu. 2011. Carotenoids in aquaculture, an overview. J. Anim. Sci. Biotechnol. 2:44–58.

Niu J., H. Wen, C. H. Li, Y. J. Liu, L. X. Tian, X. Chen, Z. Huang and H. Z. Lin 2014. Comparison effect of dietary astaxanthin and b-carotene in the presence and absence of cholesterol supplementation on growth performance, antioxidant capacity and gene expression of Penaeus monodon under normoxia and hypoxia condition. Aquac. 422–423:8–17.

Ocampo, L. E., M. Botero and L. Restrepo. 2010. Growth culture evaluation of Daphnia magna feed with Saccharomyces cereviseae enrichment with oat soy. Rev. Colomb. Cienc. Pec. 23:78-85.

Ochoa-García, L. 2016. Efecto de dos fertilizantes agrícolas comerciales sobre las microalgas Tetraselmis suecica (Kylin) Butcher y Chlorella vulgaris Beijerinck. Tesis de licenciatura. Universidad de Coruña. LA Coruña, España.

Olmstead, I. L. D., D. R. A. Hill, D. A. Dias, N. S. Jayasinghe, D. L. Callahan, S. E. Kentish, P. J. Scales and G. J. O. Martin. 2013. A quantitative analysis of microalgal lipids for optimization of biodiesel and omega-3 production. Biotechnol. Bioeng. 110(8):2096–2104. doi:10.1002/bit.24844

Palacios-Bohórquez, D. 2016. Efecto de los espectros de luz azul, roja y verde en la multiplicación celular y síntesis bioquímica de Rhodomonas sp. y Tetraselmis sp. en condiciones in vitro. Tesis de licenciatura. Universidad de Guayaquil. Guayaquil, Ecuador.

Pande, S. V., R. P. Khan and T. A. Venkitasubramanian. 1963. Microdetermination of lipids and serum total fatty acid. Anal. Biochem. 6:415–423.

Pangestuti, R. and S.-K. Kim. 2011. Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae. J. Funct. Foods. 3(4):255–266. https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.07.001

Paniagua-Michel, J., Olmos-Soto, J. and Ruiz, M. A. 2012. Pathways of Carotenoid Biosynthesis in Bacteria and Microalgae. En: Barredo, J. L. (Ed.). Microbial carotenoids from bacteria and microalgae. Humana Press, New York, USA.

Panis, G. and J. R. Carreon. 2016. Commercial astaxanthin production derived by green alga Haematococcus pluvialis: a microalgae process model and a techno-economic assessment all through production line. Algal Res. 18:175-190.

Park, J., R. Craggs and A. Shilton. 2011. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. Bioresour. Technol. 102: 35-42.

Pástor, G. V. and C. Pozo. 2013. Evaluación del rol de la iluminancia, el pH y la cantidad de nutrientes en el crecimiento de la microalga Scenedesmus sp. en condiciones de laboratorio. Tesis de licenciatura. Universidad Politécnica Salesiana. Quito, Ecuador.

Piña, P., M. Medina, M. Nieves, S. Leal, J. López-Elías and M. Guerrero. 2007. Cultivo de cuatro especies de microalgas con diferentes fertilizantes utilizados en acuicultura. Rev. Invest. Mar. 28(3): 225-236.

Prusiñska, M., O. Khudyi, R. Kolman, L. Khuda, A. Duda, G. Wiszniewski, M. Marchenko and O. Kushniryk. 2018. Impact of a polyunsaturated fatty acid supplement on enriching the nutritional value of brine shrimp nauplii, Artemia sp. Fish. Aquat. Life. 26:173 – 184. DOI 10.2478/aopf-2018-0019.

Ra, C.H., P. Sirisuk, J. H. Jung, G. T. Jeong and S. K. Kim. 2017. Effects of light-emitting diode (LED) with a mixture of wavelengths on the growth and lipid content of microalgae. Bioproc. Biosyst. Eng. 41:457-465. https://doi.org/10.1007/s00449-017-1880-1

Rahmadi, A., Y. Mulyani, and M. W. Lewaru. 2020. Effect of salinity difference on lipid content from Chaetoceros muelleri on continuous reactors. Adv. J. Grad. Res. 7(1): 3–10. doi:10.21467/ajgr.7.1.3–10.

Ramos-Jiliberto, R. 1995. Alometría y producción de zooplancton herbívoros. Rev. Chil. Hist. Nat. 68: 477-488.

Rivera-Reyes, N. 2013. Comparación de seis dietas diferentes de microalgas locales para el crecimiento de Artemia. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur. B. C. S., México.

Rodolfi L, G. C. Zittelli, N. Bassi, G. Padovani, N. Biondi, G. Bonini and M. R. Tredici. 2009. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. Biotechnol. Bioeng. 102:100–12. https://doi. org/10.1002/bit.22033.

Rodrigues, D. B., C. R. Menezes, A. Z. Mercadante, E. Jacob-Lopes and L. Q. Zepka. 2015. Bioactive pigments from microalgae Phormidium autumnale. Food Res. Int. 77(2):273-279. http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.04.027

Rojo-Cebreros, A. H., Román-Reyes, J. C., Rodríguez-Montes de Oca, G. A., Nieves-Soto, M., Piña-Valdez, P. y Medina-Jasso, M. A. 2012. Balance energético del rotífero Brachionus rotundiformis tschugunoff 1921, alimentado con cuatro especies de microalgas. Ecosis. Recur. Agropec. 28(3):231-244.

Rosales-Loaiza, N., H. Zambrano, M. Guevara, C. Lodeiros and E. Morales. 2012. Productividad de las microalgas marinas Chaetoceros sp. LAEP-35 y Chroomonas sp. MOF-03 en cultivos semicontinuos de interés en acuicultura. Cienc. 20(2):90-97.

Ruiz-Pérez, O. 2008. Caracterización de diversas poblaciones de Artemia desde el punto de vista de su composición en ácidos grasos y de sus patrones moleculares. Tesis de doctorado. Universitat de Valencia. Valencia, España.

Ruiz-Soto, A. 2017. Implementación de una metodología por cromatografía líquida de alta resolución para la determinación del carotenoide all-trans-β-caroteno en la microalga Arthrospira platensis. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional de Ingeniería. Lima, Perú.

Ryckeboscha E., C. Bruneela, R. Termote-Verhallea, K. Goirisb and K. Muylaert. 2014. Nutritional evaluation of microalgae oils rich in omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids as an alternative for fish oil. Food Chem. 160: 393-400.

Sadeq, E. 2012. Production of natural beta carotene from Dunaliella living in the Dead Sea. JJEES. 4(2):23-27.

Sadovskaya I, A. Souissi, S. Souissi, T. Grard, P. Lencel, C. M. Greene, S. Duin, P. S. Dmitrenok, A. O. Chizhov, A. S. Shashkov and A. I. Usov. 2014. Chemical structure and biological activity of a highly branched (1 → 3,1 → 6)-β-d-glucan from Isochrysis galbana. Carbohyd. Polym. 111:139–148.

Safi, C., A. V. Ursu, C. Laroche, B. Zebib, O. Merah, P. Y. Pontalier and C. Vaca-García. 2014. Aqueous extraction of proteins from microalgae: effect of different cell disruption methods. Algal Res. 3:61-65.

Sambusiti, C., M. Bellucci, A. Zabaniotou, L. Beneduce and F. Monlau. 2015. Algae as promising feedstocks for fermentative biohydrogen production according to a biorefinery approach: A comprehensive review. Renew. Sustain. Energy Rev. 44:20-36.

Sánchez-Estudillo, L. 2011. Alimento nutritivo, colorido y en movimiento: Los cultivos de apoyo en acuicultura. Cienc. Mar. 15(43):55-60.

Sánchez-Saavedra, M.P. and C. Paniagua-Chávez. 2017. Potential of refrigerated marine cyanobacterium Synechococcus elongatus used as food for Artemia franciscana. Lat. Am. J. Aquat. Res. 45:937-947. doi: 10.3856/vol45-issue5-fulltext-9

Sansone, C., C. Galasso, I. Orefice, G. Nuzzo, E. Luongo, A. Cutignano, G. Romano, C. Brunet, A. Fontana, F. Esposito and A. Ianora. 2017. The green microalga Tetraselmis suecica reduces oxidative stress and induces repairing mechanisms in human cells. Sci. Rep. 7:41215–41215.

Saranya, C., A. Hemalatha, C. Parthiban and P. Anantharaman. 2014. Evaluation of Antioxidant Properties, Total Phenolic and Carotenoid Content of Chaetoceros calcitrans, Chlorella salina and Isochrysis galbana. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. 3(8):365-377

Schulze, P. S. C., C. J. Hulatt, D. Morales-Sánchez, R. H. Wijffels and V. Kiron. 2019. Fatty acids and proteins from marine cold adapted microalgae for biotechnology. Algae Res. 42:101604. doi:10.1016/j.algae.2019.101604.

Segade, A., L. Robaina, F. Otero-Ferrer, J. García-Romero and L. Molina-Domínguez. 2014. Effects of the diet on seahorse (Hippocampus hippocampus) growth, body colour and biochemical composition. Aquac. Nutr. 21(6):807-813. doi: 10.1111/anu.12202.

Shanmugam, S., T. Mathimani, S. Anto, M. P. Sudhakar, S. S. Kumar and A. Pugazhendhi. 2020. Cell density, lipidomic profile, and fatty acid characterization as selection criteria in bioprospecting of microalgae and cyanobacterium for biodiesel production. Bioresour. Technol. 304:123061. https://doi.org/10.1016/j.biotech.2020.123061.

Sies, H., C. Berndt and D. P. Jones. 2017. Oxidative Stress. Annu. Rev. Biochem. 86: 715–748.

Singh H., J. L. Varanasi, S. Banerjee and D. Das. 2019. Production of carbohydrate enrich microalgal biomass as a bioenergy feedstock. Energy. 188:116039. https:// doi.org/10.1016/j.energy.2019.116039.

Sorgeloos, P., P. Lavens, P. Leger, W. Tackaert and D. Versichele. 1986. Manual for the culture and use of brine shrimp Artemia in aquaculture. FAO. 319 p.

Sorokin, C. 1973. Dry weight, packed ce11 volume and optical density. En Stein J. R. (Ed.). Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements. Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK.

Soto-León, S., I. E. Zazueta-Patrón, P. Piña-Valdez, M. Nieves-Soto, C. Reyes-Moreno and I. Contreras-Andrade. 2014. Rev. Mex. Ing. Quim. 13(3):723-737.

Takaichi S. 2011. Carotenoids in algae: distributions, biosyntheses and functions. Mar. Drugs 9:1101–1118

Tasic M. B., L. F. R. Pinto, B. C. Klein, V. B. Velikovic and R. M. Filho. 2016. Botryococcus braunii for biodiesel production. Renew. Sustain. Energ. Rev. 64:260–270

Tomo, T., S. I. Allakhverdiev and M. Mimuro. 2011. Constitution and energetics of photosystem I and photosystem II in the chlorophyll d-dominated cyanobacterium Acaryochloris marina. J. Photochem. Photobiol. B. 104:333–340. doi:10.1016/j.jphotobiol.2011.02.017

Turu I. C., C. T. Kayhan, A. Kazan E. Y. Ozturk, S. Akgol and O. Y. Celiktas. 2016. Synthesis and characterization of cryogel structures for isolation of EPS from Botryococcus braunii. Carbohyd. Polym. 150:378–384.

Varela J. C., H. Pereira, M. Vila and R. León. 2015. Production of carotenoids by microalgae: achievements and challenges. Photosynth. Res. 125:423–436. https ://doi.org/10.1007/s11120-015-0149-2

Vásquez-Suárez, A., M. Guevara, M. González, R. Cortez and B. Arredondo-Vega. 2013. Crecimiento y composición bioquímica de Thalassiosira pseudonana (Thalassiosirales: Thalassiosiraceae) bajo cultivo semi-continuo en diferentes

medios y niveles de irradiancias. Rev. Biol. Trop. (Int. J. Trop. Biol. ISSN-0034-7744). 61(3):1003-1013.

Velasco, L. A., S. Carrera and J. Barros. 2016. Isolation, culture and evaluation of Chaetoceros muelleri from the Caribbean as food for the native scallops, Argopecten nucleus and Nodipecten nodosus. Lat. Am. J. Aquat. Res. 44(3): 557-568.

Viciano-Delibano, E. 2015. Optimización del enriquecimiento de nauplios de Artemia mediante el uso de emulsiones lipídicas formuladas a partir de aceites sintéticos ricos en DHA. Tesis de doctorado. Universidad de Valencia. Valencia, España.

Villa, A., D. Herazo and A. C. Torregroza. 2014. Efecto del fotoperiodo sobre el crecimiento de la diatomea Chaetoceros calcitrans (CLON C-CAL) en cultivos estáticos. Rev. Intropica. 9:111-117.

Virág, L., R. I. Jaén, Z. Regdon, L. Boscá and P. Prieto. 2019. Self-defense of macrophages against oxidative injury: Fighting for their own survival. Redox Biol. 26: 101261.

Voltolina, D., L. F. Bückle-Ramírez and E. L. Morales-Guerrero. 1989. Manual de metodologías y alternativas para el cultivo de microalgas. Segunda edición. México.

Von Lintig, J., J. Moon, J. Lee and S. Ramkumar. 2020. Carotenoid metabolism at the intestinal barrier. Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Biol. Lipids. 1865.

Wade, N. M., J. Gabaudan and B. D. Glencross. 2015. A review of carotenoid utilisation and function in crustacean aquaculture. Rev. Aquac. 9(2):141-156. doi:10.1111/raq.12109

Wang, X., J. Liang, C. Luo, C. Chen and Y. Gao. 2014. Biomass, total lipid production, and fatty acid composition of the marine diatom Chaetoceros muelleri in response to different CO2 levels. Bioresour. Technol. 161:124–130. doi: 10.1016/j.biortech.2014.03.012.

Wang, L., Y. Li, M. Sommerfeld and Q. Hu. 2013. A flexible culture process for production of the green microalga Scenedesmus dimorphus rich in protein, carbohydrate or lipid. Bioresour. Technol. 129:289‑295.

Wang, T., H. W. Shan, Z. X. Geng, P. Yu and S. Ma. 2020. Dietary supplementation with freeze-dried Ampithoe sp. enhances the ammonia-N tolerance of Litopenaeus vannamei by reducing oxidative stress and endoplasmic reticulum stress and regulating lipid metabolism. Aquac. Rep. 16:100264.

Whyte, J. 1987. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. Aquac. 60:231-241.

Wouters, R., P. Lavens, J. Nieto and P. Sorgeloos. 2001. Penaeid shrimp broodstock nutrition: an updated review on research and development. Aquac. 202:1–21.

Wu, H., Y. Fujii, T. Nakano, T. Arimoto, M. Murata, H. Matsumoto, Y. Yoshiura, H. Ohnuki and H. Endo. 2019. Development of a novel enhanced biosensor system for real-time monitoring of fish stress using a self-assembled monolayer. Biosensors. 19:1585.

Xin, L, H. Hong-ying, G. Ke and S. Ying-xue. 2010. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga Scenedesmus sp. Bioresour. Technol. 101:5494–500. doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.016.

Yang, X., X. Wang, B. Zhao and Y. Li. 2014. Simulation model of pyrolysis biofuel yield based on algal components and pyrolysis kinetics. BioEnergy Res. 7:1293-1304.

Yen, H.-W., I.-C. Hu, C.-Y. Chen, S.-H. Ho, D.-J. Lee and J.-S. Chang. 2013. Microalgae-based biorefinery‑from biofuels to natural products. Bioresour. Technol. 135:166‑174.

You, K., C. Ma, H. Gao, F. Li, M. Zhang, Y. Qiu and B. Wang. 2008. Food intake rate and delivery strategy in aquaculture. Chinese J. Oceanol. Limnol. 26:263-267. doi.org/10.1007/s00343-008-0263-5

Young, J. N. and F. M. M. Morel. 2015. Biological oceanography: The CO2 switch in diatoms. Nature Clim. Change. 5:722-723.

Zapata, M., J. L. Garrido and S. W. Jeffrey. 2006. Chlorophyll c pigments: current status. En Grimm B. (Ed.). Chlorophylls and bacteriochlorophylls: biochemistry, biophysics, functions and applications. Springer, Netherlands.

Zar, J. H. 2010. Biostatistical analysis. Prentice Hall. New Jersey, USA.

Zazueta-Patrón, I. E. 2016. Crecimiento, Biomasa y Composición Proximal de Microalgas Cultivadas en Medios Limitantes de Nitrógeno. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Sinaloa. Sinaloa, México.

Zhang, R., O. Parniakov, N. Grimi, N. Lebovka, L. Marchal and E. Vorobiev. 2018. Emerging techniques for cell disruption and extraction of valuable bio-molecules of microalgae Nannochloropsis sp. Bioprocess Biosyst. Eng. doi.org/10.1007/s00449-018-2038-5.

Zhu, L. 2015. Biorefinery as a promising approach to promote microalgae industry: An innovative framework. Renew. Sustain. Energy Rev. 41:1376-1384.

Zhu L., E. Hiltunen, E. Antila, J. Zhong, Z. Yuan and Z. Wang. 2014. Microalgal biofuels: flexible bioenergies for sustainable development. Renew. Sust. Energ. Rev. 30:1035‑1046.

Latin American Journal of Aquatic Research, 49(5): 717 -724, 2021
Effect of light and feed density on *Artemia franciscana*
DOI: 10.3856/vol49-issue5-fulltext-2695

Research Article

Effect of light and feed density on ingestion rate, protein and lipid content of *Artemia franciscana* juveniles

Martha I. Millán-Almaraz[1], Mario Nieves-Soto[2]
Diana J. López-Peraza[2] & Mario M. Peraza-Yee[1]
[1]Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Sinaloa
Culiacán Rosales, Sinaloa, México
[2]Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Autónoma de Sinaloa, Mazatlán, Sinaloa, México
Corresponding author: Diana J. López-Peraza (dianalopez@uas.edu.mx)

ABSTRACT. *Artemia franciscana* is one of the most used organisms as live food to larvae of different marine species, so it is important to determine the appropriate food ration to improve its biochemical composition and maintain the nutritional stability of the *Artemia*. Furthermore, even though light is important in newly hatched nauplii, its effect in the late stages of *Artemia* have been poorly studied. This study aimed to evaluate the effect of food density (*Chaetoceros muelleri* microalgae) on the ingestion rate, protein, and lipid content of *A. franciscana* juveniles exposed and unexposed to light during 6 h. The experiment evaluated six treatments, resulting from combining three densities of *C. muelleri* as a food: 600,000, 900,000, and 1,200,000 cell mL^{-1} and two illumination conditions: exposed and unexposed to the light. The ingestion rate was evaluated at 3 and 6 h, while protein and lipid content at the end of the experiment. The highest ingestion rates were observed in the treatment of 900,000 cell mL^{-1} exposed to light at 3 h (253,118 cell ind^{-1} h^{-1}) and unexposed to light at 6 h (164,712 cell ind^{-1} h^{-1}). At the same time, the highest content of lipid (13.52 µg ind^{-1}) and proteins (38.28 µg ind^{-1}) per organism was obtained with the treatment of 900,000 cell mL^{-1} unexposed to light. There was an interaction between cell density and light since both factors influenced the results of the ingestion rate and lipid content of the juveniles of *A. franciscana*.

Keywords: *Artemia franciscana*; *Chaetoceros muelleri*; ingestion rate; lipid; protein; aquaculture

INTRODUCTION

The use of live food in aquaculture remains essential, especially during the larval and juvenile stages of many species of fish and crustaceans. It is frequently observed that commercial balanced foods do not satisfy the species nutritional requirements due to essential nutrients commonly having low availability and assimilation (Sales & Janssens 2003). Live food has several advantages over balanced food. Besides its high nutritional value, it can be nutritionally improved using compounds or ingredients (e.g. fatty acids, vitamins, minerals, antioxidants, probiotics, among others), which is incorporated by the prey and later consumed by the cultivated organisms, resulting in high assimilation rates, greater tolerance to diseases, and higher growth and survival rates (Ocampo et al. 2010, Sánchez-Estudillo 2011). Among the species of zooplankton, rotifers and *Artemia* are the most used organisms as live prey in aquaculture (Martínez-Córdova et al. 2014).

Artemia is widely used as live food for more than 85% of marine species, from nauplii to the adult stage (Lakshmana-Senthil et al. 2011). Its importance as food is because it tolerates various culture conditions is easily digested and also can be used as a carrier of interest compounds for the species in culture. Another attribute of *Artemia* is that its eggs can encyst and hatch whenever be necessary, and as a result, obtain large biomass in any season of the year (Viciano-Delibano 2015).

According to previous studies, the hatching of *Artemia* cysts is affected by lighting conditions (Lavens et al. 1986, Lavens & Sorgeloos 1987), such as light

Corresponding editor: Patricio Dantagnan

intensity, illumination periods, and wavelength of light (Browne & Wanigasekera 2000). Therefore, it is recommended to maintain a constant illumination of around 2000 lux during the hydration phase or the incubation of the cysts to maximize the efficiency of hatching (Sorgeloos 1973, Sharahi & Zarei 2016).

The effect of light throughout the life cycle of *Artemia* has been poorly studied, especially in late stages, so it is not clear how light affects the proximal composition or the ingestion rate of juveniles of *Artemia*. However, it has been observed that newly hatched organisms are attracted to the light during the first days, while from the fifth day, they move away from the light and concentrate in the non-illuminated area (Gallego-Galiano 2011).

On the other hand, the nutritional quality of *Artemia* can vary considerably due to geographic origin, differences between batches of cysts, and the analysis methods used (Leger et al. 1986). In addition, the food ration has been shown to affect the reproductive rate of *Artemia* and its protein, lipid, and carbohydrate content (Ronsón-Paulín 2010). Regarding the proximal composition of the juveniles of *Artemia*, in general, it has been observed that various strains fed with diets based on *Chaetoceros* sp. have a higher content of proteins (50%), lipids (15%), and carbohydrates (5%) compared to other microalgae (Lora-Vilchis et al. 2004, Shanmugam & Rajendran 2018). Also, higher than 90% survival percentages were obtained when *Artemia* was feeding with this microalgae genera (Arriaga & Re 1997, Lora-Vilchis 2004).

For all the above, the objective of this study was to evaluate the effect of food density of *Chaetoceros muelleri* microalgae on the ingestion rate and protein and lipid content in juveniles of *Artemia franciscana* exposed and unexposed to light.

MATERIALS AND METHODS

Culture of the juveniles of *Artemia franciscana*

The standard procedure of hydration-decapsulation-incubation of the cysts was followed to obtain the nauplii (Great Salt Lake *Artemia*, INVE Aquaculture, lot 7116496181), applying some of the recommendations proposed by Sorgeloos et al. (1986). In a transparent plastic container of 3 L for 1 h in fresh water and constant aeration were weighed and hydrated 1.5 g of cysts. Afterward, cysts were harvested with a 105 µm mesh and transferred to a 1 L container for decapsulation. Five percent commercial sodium hypochlorite at a rate of 125 mL of chlorine for every 10 g of cysts was used as a decapsulation solution.

Once the sodium hypochlorite was added, intense stirring was maintained for approximately 3.5 min, until the color of the cysts turned orange, thus indicating the degradation of the chorion. Immediately afterward, the cysts were flushed with fresh water to remove residual chlorine and avoid any damage. The decapsulated cysts were incubated for 24 h in a conical transparent plastic container, with a capacity of 1.5 L of seawater at 35 of salinity, constant aeration, and lighting (2000 lux) at 28°C. Then, the newly hatched *A. franciscana* was harvested and moved to a 14 L circular container at a density of 2 ind mL^{-1}.

According to the feeding rate obtained from previous studies, the *A. franciscana* was fed with *Chaetoceros muelleri* microalgae for eight days for its growth (Table 1). Likewise, a 30% daily exchange was carried out with seawater to eliminate the organic matter residues in the container. In addition, samples of the *A. franciscana* were taken at zero and nine days to determine the initial and final length of the individuals.

Ingestion rate (IR) of *Artemia franciscana* juveniles

Juveniles of *A. franciscana* were transferred to 18 experimental 1 L units of seawater at a rate of 0.5 ind mL^{-1} to carry out the IR experiment. The experiment evaluated six treatments, resulting from combining three densities of *C. muelleri* as a food: 600,000, 900,000, and 1,200,000 cell mL^{-1} and two illumination conditions: exposed (EL) and unexposed (UL) to the light. For the EL treatments, the lighting was continuous and supplied by two white light fluorescent lamps of 2000 lux of intensity. The containers did not have any lighting in the UL treatments and were protected from light using a black curtain. In addition, there were six control treatments, which consisted of the combination of the mentioned factors without the juveniles of *A. franciscana*, to evaluate the repro-duction of the microalgae in the experimental units and thus be able to correct the IR readings of *A. franciscana* juveniles.

Table 1. Feeding for *Artemia franciscana* fed with the microalgae *Chaetoceros muelleri* (CH-M-1).

Day	CH-M-1(cell mL^{-1})
0	100,000
1	150,000
2	200,000
3	250,000
4	300,000
5	400,000
6	550,000
7	650,000
8	750,000

The treatments were carried out in triplicate. Therefore, there were 36 units: 18 units (9 EL and 9 UL) corresponding to the treatments with *A. franciscana* and 18 (9 EL and 9 UL) control units. It is important to mention that, before starting the experiment, it was verified that the intestine of the organisms was empty.

The experiment lasted 6 h; water samples were taken at 3 and 6 h from the treatments to perform microalgae counts to determine the ingestion rate. Furthermore, at the end of the experiment, samples were taken to determine the protein and lipid concentration of the juveniles of *A. franciscana*.

The ingestion rate was determined using the formula proposed by Paffenhofer (1971):

$$IR = \frac{V\,(Co - Ct)}{nt}$$

where IR: ingestion rate (cell ind^{-1} h^{-1}), V: volume per experimental unit (mL), Co: cell density of the control treatment (cell mL^{-1}), Ct: cell density of the sample (cell mL^{-1}), n: number of individuals per experimental unit, t: time (h).

Proximal composition analysis

The protein content was determined with the method of Lowry et al. (1951) using 1 N sodium hydroxide for 30 min to the extraction, and the extraction of total lipids was carried out according to the methodology proposed by Bligh & Dyer (1959) and its quantification was made with the method of Pande et al. (1963).

Statistical analysis

To the data obtained from the ingestion rate and the proximal composition (proteins and lipids), the Lilliefors normality test and Bartlett's homoscedasticity test (Zar 2010) were applied to define the application of parametric statistical analysis methods or non-parametric. As the data met the statistical assumptions, two-factor analysis of variance was applied to deter-mine statistical differences between the treatments. When the analysis revealed significant differences, the Student-Newman-Keuls (SNK) multiple comparison test was applied to determine these differences. The effect per factor (density of food and light) is presented as the averages of the data. All statistical analyzes were made in the SigmaStat 3.5 program, with a significance level of 5%.

RESULTS

The newly hatched nauplii of *Artemia franciscana* registered an average length of 0.23 ± 0.01 mm, while, at the end of the culture, the juveniles reached an average length of 3.53 ± 0.12 mm with 90% survival on day 9.

Ingestion rate (IR)

The IR was influenced by the food density as well as the light exposition since the interaction between the two factors (cell density and light) was observed in both samplings: at 3 h (P = 0.013) and 6 h (P = 0.029).

The highest IR of the *A. franciscana* juveniles at 3 h was recorded on the 900,000 cell mL^{-1} treatment exposed to the light (EL), reaching an ingestion rate of 253,118 ± 12,123 cell ind^{-1} h^{-1}, which showed significant differences with the other treatments (Table 2). In contrast, the lowest ingestion rates were recorded in the 600,000 cell mL^{-1} of both treatments EL and UL, and the 1,200,000 cell mL^{-1} unexposed to light treatment, whose values were significantly lower than those registered by the other treatments.

When the effect of light was evaluated, it was found that the highest ingestion rates were obtained on treatments EL, which were significantly higher than those obtained on treatments UL. On the other hand, the effect of cell density revealed that the highest IR was obtained when the juveniles of *A. franciscana* were fed with 900,000 cell mL^{1}, with significant differences (P < 0.001) concerning the other cell densities.

Regarding 6 h, the highest ingestion rate for juveniles of *A. franciscana* was obtained with the treatment of 900,000 cell mL^{-1} and UL, achieving a consumption of 164,712 ± 3,593 cell ind^{-1} h^{-1}, which was significantly higher than the other treatments (Table 2).

On the contrary, the lowest ingestion rate was in the 1,200,000 cell mL^{-1} and EL treatments. This value was significantly lower (P < 0.001) than those registered by the other treatments. When the effect of lighting was evaluated, it was observed that the highest IR was obtained on treatments UL, being significantly higher than those obtained on EL. In addition, the density of 900,000 cell mL^{-1} registered the highest values of IR in the juveniles, showing significant differences compared to the other cell densities.

Lipid and protein content of the juveniles of *A. franciscana*

Both cell density and illumination influenced the results obtained from lipid content since an interaction (P = 0.038) was found between the two factors. The highest content of lipids per organism was obtained with the treatment of 900,000 cell mL^{-1} and UL, reaching a concentration of 13.52 ± 0.10 µg ind^{-1}, which showed significant differences with the other treatments (Table 3). In contrast, the lowest lipid content was registered

Table 2. Ingestion rate (cell ind^{-1} h^{-1}) of juveniles of *Artemia franciscana*, fed with three cell densities of *Chaetoceros muelleri* and exposed (EL) and unexposed (UL) to light, after 3 and 6 h. Results are expressed as the mean ± standard error (n = 3). Different superscript letters between the two factors (cell density and light) indicate significant differences (P < 0.05). Two-way ANOVA and SNK tests.

Time		Cell density (cell mL^{-1})			Average
		600,000	900,000	1,200,000	
3 h	EL	129,833± 10,191^{a}	253,118± 12,123^{c}	221,799± 17,150^{b}	201,583 ± 19,688^{b}
	UL	124,993± 1,993^{a}	194,181± 2,482^{b}	148,910± 7,419^{a}	156,028 ± 10,408^{a}
	Average	127,413± 4,768^{a}	223,649± 14,294^{c}	185,354± 18,316^{b}	
P-value					
cell mL^{-1} effect		<0.001			
Light effect		<0.001			
cell mL^{-1} *vs*. light		0.013			
6 h	EL	66,767± 6,052^{b}	134,389± 10,239^{c}	45,413± 2,433^{a}	82,190 ± 13,859^{a}
	UL	121,292± 2,502^{c}	164,712± 3,593^{d}	65,201± 5,482^{b}	117,068 ± 14,544^{b}
	Average	94,030± 12,539^{b}	149,550± 8,338^{c}	55,307± 5,174^{a}	
P-value					
cell mL^{-1} effect		<0.001			
Light effect		<0.001			
cell mL^{-1} *vs*. light		0.029			

Table 3. Lipid and protein content (µg ind^{-1}) of juvenile *Artemia franciscana* fed with three cell densities of *Chaetoceros muelleri* exposed (EL) and unexposed (UL) to light, after 6 h. Equal letters indicate that there are no significant differences. Results are expressed as the mean ± standard error (n = 3). Different letters between the two factors (cell density and light) indicate significant differences (P < 0.05). Two-way ANOVA and SNK tests.

		Cell density (cell mL^{-1})			Average
		600,000	900,000	1,200,000	
Lipid	EL	9.57± 0.15^{b}	12.10 ± 0.08^{d}	8.73 ± 0.11^{a}	10.13 ± 0.51^{a}
	UL	11.30± 0.13^{c}	13.52 ± 0.10^{e}	9.72 ± 0.17^{b}	11.52 ± 0.55^{b}
	Average	10.43± 0.40^{b}	12.81 ± 0.32^{c}	9.23 ± 0.24^{a}	
P-value					
cell mL^{-1} effect		<0.001			
Light effect		<0.001			
cell mL^{-1} *vs*. light		0.038			
Protein	EL	33.55± 0.36^{a}	36.41 ± 0.50^{a}	31.37 ± 0.37^{a}	33.78 ± 0.76^{a}
	UL	35.89± 0.32^{a}	38.28 ± 0.36^{a}	33.19 ± 0.36^{a}	35.79 ± 0.76^{b}
	Average	34.72± 0.57^{b}	37.34 ± 0.50^{c}	32.28 ± 0.47^{a}	
P-value					
cell mL^{-1} effect		<0.001			
Light effect		<0.001			
cell mL^{-1} *vs*. light		0.761			

in the treatment of 1,200,000 cell mL^{-1} and EL, whose value was significantly lower than those registered by the other treatments. An effect per factor was also observed; the lipid content was significantly higher on treatments UL. Likewise, it was registered that the highest lipid content was obtained when the juveniles were fed with the density of 900,000 cell mL^{-1}. In the case of proteins, there was no interaction (P = 0.761) between cell density and illumination (Table 3).

However, the main protein content was observed on the treatment of 900,000 cell mL^{-1}, in both condition EL and UL, compared with the low and highest density of the food. On the other hand, an effect per factor was recorded; the protein content on the 900,000 cell mL^{-1} treatment was significantly higher than the other treatments, and when the illumination factor was evaluated, it was observed that the highest protein content was obtained on the treatments UL.

DISCUSSION

The results of survival (90%) and growth of *Artemia franciscana* (3.53 ± 0.12 mm) fed with *Chaetoceros muelleri* in this study were superior to those found by Rivera-Reyes (2013). They obtained a survival of 78.9% and an average length of 2.80 mm at day 11 of culture with the same species but fed with a cell density of 120,000 cell mL^{-1} of *C. muelleri*, which could affect the growth and the length of the *Artemia*. Likewise, in this work, the length recorded at day 9 was greater than that reported by Lora-Vilchis (2004) for *A. franciscana* fed with 900,000 cell mL^{-1} of *C. muelleri* the day 7, who obtained a growth of 2.81 mm of total length; as well as a survival superior to 89%, which was similar in both studies.

It was observed, in both illumination conditions, that the IR of *A. franciscana* juveniles was higher at the first sampling (3 h), and as time passed, it tended to decrease, obtaining lower IR values during the second sampling (6 h). At 6 h, the IR on EL treatments decreased around 51% in the density of 600,000 cell mL^{-1}, 53% at 900,000 cell mL^{-1}, and 80% for 1,200,000 cell mL^{-1} compared to the IR at 3 h. Nevertheless, on the UL treatments, the IR at 6 h decreased 3, 15, and 56% for the cell densities of 600,000, 900,000, and 1,200,000 cell mL^{-1}, respectively, compared to the value at 3 h. The consumption decreased according to the time could be because the organisms consumed more food initially because they had an empty intestine and required food intake to reach their needs, which was not the case in the second sampling.

On the other hand, at 3 h, the IR was higher on the EL treatments, while at 6 h, the UL treatments registered the highest IR. However, during both samplings (3 and 6 h), the highest ingestion rate was obtained with the treatment of 900,000 cell mL^{-1}, so this cell density could be optimal to feed juveniles of *A. franciscana* regardless of the light condition. In this sense, determining the ingestion rate is very useful since it is an index that contributes to developing a good eating strategy. If the IR increases, this means that the amount of feed supplied must also increase. Contrarily, if the IR decreases, the amount of feed supplied should be reduced. An increment in IR may be a reflection of an improvement in the food supply (You et al. 2008).

At the highest cell density (1,200,000 cell mL^{-1}), the consumption was lower than the other densities, probably because concentration exceeded the consumption limit of the juveniles of *A. franciscana*. From the point of view of the consumer's functional response, the ingestion rate is directly proportional to the food concentration, up to the incipient limiting concentration, from which the ingestion rate becomes independent of the food concentration (Ramos-Jiliberto 1995).

The results of this study do not agree with the recorded by Lora-Vilchis (2004), who observed the ingestion rates of *A. franciscana* varied directly proportionally with the supplied ration, although the said author did not reach the consumption limit for *Artemia*. On the other hand, this behavior occurs only until reaching a critical concentration, above which ingestion remains constant or low, as observed in *Daphnia magna* (McMahon & Rigler 1963) and the copepod *Calanus pacificus* (Frost 1972).

It is worth mentioning that *A. franciscana* tended to be attracted to light during the first four days of cultivation, which changed from the fifth day as the organisms moved away. Although studies on the light effect on *Artemia* behavior are scarce, the results of this research are similar to those found by Gallego-Galiano (2011). He maintained a culture of *A. franciscana* for 15 days. He observed that these organisms presented a variable behavior against light throughout their development until they reached the adult stage, initially showing positive phototropism, followed by a negative phototropism phase, and finally positive phototropism. The observed behavior of *Artemia* according to age may be linked to the needs of the first larval stages, which look for surface waters with a greater presence of light and favorable temperatures to facilitate their development and allow them to feed on primary production (Cebrián & Valiela 1999). In addition to this, the development of *Artemia* requires the performance of several molts that allow the shedding of the chitinous exoskeleton and the increase of muscle mass and the development of secondary sexual characteristics until reaching the adult stage (Castrejón et al. 1993). During these molting phases, the organisms are particularly vulnerable, so the juveniles may show a negative phototropism in response to the search for deeper waters or refuge, which reduces such vulnerability against possible predators. Once the *Artemia* has reached adult size, it would show positive phototropic behavior, searching for the most illuminated layer where the phytoplankton that serves as food is concentrated (Isenmann 1975).

Regarding the proximal composition of *Artemia* sp. and *A. franciscana* starving, Guevara & Lodeiros (2003) analyzed the protein and lipid content of nauplii (24 h after hatched) and metanauplii (72 h after hatched) from cysts obtained from two different sites: Araya saltworks and San Francisco Bay. The authors found a higher protein proportion than lipids for both populations, which agrees with the results obtained in this study since proteins were more abundant than lipids. However, they also recorded a higher protein

concentration in metanauplii, while lipids were more abundant in nauplii. Studies support the hypothesis of the accumulation of proteins for structural and energetic effects in advanced stages, rather than lipids, which are used in the earliest phases such as naupliar. Nauplii present higher lipid content than metanauplii since they represent the form of energy available for the first hours of life since the digestive system is not functional (Katavic et al. 1985, Leger et al. 1986).

As mentioned above, in this study, the major components found in the *A. franciscana* juveniles were proteins and, to a lesser extent, lipids, which is in agreement with some authors (Lora-Vilchis et al. 2004, Sánchez-Saavedra & Paniagua-Chávez 2017), who found a similar proportion for these compounds. On the other hand, it was observed that both proteins and lipids, concentrations, coincided with the data of the ingestion rate since the organisms that presented the highest IR also presented the highest concentration of these compounds. The organic constitution is shown to be similar among microalgae, with proteins being the predominant components (Parsons et al. 1984, Lavens & Sorgeloos 1996). Such is the case of the microalgae *C. muelleri*, which has been characterized by having a higher concentration of proteins than lipids, registering values >20 and >10 pg cell^{-1} for these compounds (Lemus et al. 2006, Piña et al. 2007), which agrees with the results obtained in this study for *A. franciscana* juveniles fed with this microalgae. Furthermore, *C. muelleri* is considered one of the most appropriate live diets for the culture of *A. franciscana* due to its optimal development and high survival rates when feeding it with this microalga (De Micco & Hubbard 2001). In turn, the *Artemia* fed with *C. muelleri* can improve its nutritional quality (Palma et al. 2011) and that of the organisms fed with this *Artemia*, resulting in good growth and a high survival rate (Widiastuti et al. 2012, Herawati et al. 2014).

ACKNOWLEDGMENTS

To Pablo Piña Valdez and María A. Medina Jasso for the advices given during the development to this project. The first author was supported by a scholarship (#424079) from CONACYT.

REFERENCES

Arriaga, H.V. & Re, A.A. 1997. Uso de microalgas vivas e inertes como alimento para *Artemia franciscana* (Anostraca: Artemiidae). Revista de Biología Tropi-cal, 45: 803-811.

Bligh, E.G. & Dyer, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 37: 911-917.

Browne, R. & Wanigasekera, G. 2000. Combined effects of salinity and temperature on survival and reproduction of five species of *Artemia*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 244: 29-44. doi: 10.1016/s0022-0981(99)00125-2

Castrejón, L., Soriano, M. & Soto, E. 1993. Biología y aprovechamiento del camarón duende *Streptocephalus* (Crustacea, Branchiopoda). Universidad del Mar, Oaxaca.

Cebrián, J. & Valiela, I. 1999. Seasonal patterns in phytoplankton biomass in coastal ecosystems. Journal of Plankton Research, 21: 429-444. doi: 10.1093/plankt/21.3.429

De Micco, E. & Hubbard, R. 2001. Plankton alternatives to *Artemia* for growth of marine shrimp *Litopenaeus vannamei* larvae. World Aquaculture Society, Baton Rouge.

Frost, B.W. 1972. Effects of size and concentration of food particles on the feeding behavior of the marine planktonic copepod *Calanus pacificus*. Limnology and Oceanography, 17: 805-815. doi: 10.4319/lo.1972.17. 6.0805

Gallego-Galiano, P. 2011. Efecto del fototropismo en larvas y juveniles de *Artemia* (*Artemia franciscana* Kellogg, 1906). Anales Universitarios de Etología, 5: 14-20.

Guevara, M. & Lodeiros, C. 2003. Composición bioquímica de nauplios y metanauplios de *Artemia* sp. (Crustacea, Anostraca) proveniente de la salina artificial de Araya, nororiente de Venezuela. Ciencias Marinas, 29: 655-663. doi: 10.7773/cm.v29i42.186

Herawati, V.E., Hutabarat, J. & Radjasa, O.K. 2014. Nutritional content of *Artemia* sp. fed with *Chaetoceros* calcitrans and *Skeletonema costatum*. Hayati, 21: 166-172.

Isenmann, P. 1975. Observations sur la mouette pygmée (*Larus minutus*) en Camargue de 1971 à 1974. La Terre et la Vie, 29: 77-88.

Katavic, I., Tudor, M., Komljenovic, J. & Ruzic, N. 1985. Changes in the biochemical composition of *Artemia salina* (L.) in relation to different feeding conditions. Acta Adriatica, 26: 123-134.

Lakshmana-Senthil, S., Ajith-Kumar, T., Maruthu-Pandi, T., Nandhini-Devi, K. & Balasubramanian, T. 2011. Comparison of A1 DHA and microalgae on biochemical signatures of enriched *Artemia salina*. Analysis of Biological Research, 2: 110-121.

Lavens, P. & Sorgeloos, P. 1987. The cryptobiotic state of *Artemia* cysts, its diapause deactivation and hatching: a review. In: Sorgeloos, P., Bengtson, D.A., Decleir,

W. & Jaspers, E. (Eds.). *Artemia* research and its applications. Ecology, culturing, use in aquaculture. Universa Press, Wetteren.

Lavens, P. & Sorgeloos, P. 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO, Rome.

Lavens, P., Tackaert, W. & Sorgeloos, P. 1986. International study on *Artemia*. XLI. Influence of culture conditions and specific diapause deactivation methods on the hatchability of *Artemia* cysts produced in a standard culture system. Marine Ecology Progress Series, 31: 197-203. doi: 10.3354/meps031197

Leger, P., Bengston, D.A., Simpson, K.L. & Sorgeloos, P. 1986. The use and nutritional value of *Artemia* as a food source. Oceanography and Marine Biology - An Annual Review, 24: 521-523.

Lemus, N., Urbano, T., Arredondo-Vega, B., Guevara, M., Vásquez, A., Carreón-Palau, L. & Vallejo, N. 2006. Crecimiento y perfil bioquímico de *Chaetoceros muelleri* cultivada en sistemas discontinuos y semi-continuos. Ciencias Marinas, 32: 597-603. doi: 10.7773/cm.v32i3.1119

Lora-Vilchis, M.C. 2004. Evaluación de la calidad dietética de microalgas mediante el uso del balance energético de Artemia *franciscana*. Tesis de Doctorado, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., La Paz.

Lora-Vilchis, M.C., Cordero-Esquivel, B. & Voltolina, D. 2004. Growth of *Artemia franciscana* fed *Isochrysis* sp. and Chaetoceros *muelleri* during its early life stages. Aquaculture Research, 35: 1086-1091. doi: 10.1111/j.1365-2109.2004.01123.x

Lowry, O.H., Rosebrough, J., Farr, A.L. & Randall, R.L. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, 193: 265-275.

Martínez-Córdova, L.R., Martínez-Porchas, M., López-Elías, J.A. & Enríquez-Ocaña, L.F. 2014. Uso de microorganismos en el cultivo de crustáceos. Biotecnia, 16: 50-55. doi: 10.18633/bt.v16i3.141

McMahon, J.W. & Rigler, F.H. 1963. Mechanisms regulating the feeding behavior of *Daphnia magna* Straus. Canadian Journal Zoology, 41: 603-611. doi: 10.1139/z63-027

Ocampo, L.E., Botero, M. & Restrepo, L. 2010. Growth culture evaluation of *Daphnia* magna feed with *Saccharomyces cerevisiae* enrichment with oat soy. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, 23: 78-85.

Paffenhofer, G.A. 1971. Grazing and ingestion rates of nauplii copepods and adults of the marine planktonic copepods Calanus *helgolandiculs*. Marine Biology, 11: 286-298. doi: 10.1007/bf00401275

Palma, J., Bureau, D.P. & Andrade, J.P. 2011. Effect of different *Artemia* enrichments and feeding protocol for rearing juvenile long snout seahorse, *Hippocampus guttulatus*. Aquaculture, 318: 439-443.

Pande, S.V., Khan, R.P. & Venkitasubramanian, T.A. 1963. Micro determination of lipids and serum total fatty acid. Analytical Biochemistry, 6: 415-423. doi: 10.1016/0003-2697(63)90094-0

Parsons, T.R., Takahashi, M. & Hargrave, B. 1984. Biological oceanographic processes. Pergamon Press, Oxford.

Piña, P., Medina, M., Nieves, M., Leal, S., López-Elías, J. Guerrero, M. 2007. Cultivo de cuatro especies de microalgas con diferentes fertilizantes utilizados en acuicultura. Revista de Investigaciones Marinas, 28: 225-236.

Ramos-Jiliberto, R. 1995. Alometría y producción de zooplancton herbívoros. Revista Chilena de Historia Natural, 68: 477-488.

Rivera-Reyes, N. 2013. Comparación de seis dietas diferentes de microalgas locales para el crecimiento de *Artemia.* Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma de Baja California Sur, Baja California.

Ronsón-Paulín, J.A. 2010. Modificación de la transferencia de nutrientes en la cadena nutritiva microalga-rotífero y microalga-*Artemia* mediante cambios en la formulación de los nutrientes en el cultivo microalgal. Tesis de Doctorado, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela.

Sales, J. & Janssens, G.P.J. 2003. Nutrient requirements of ornamental fish. Aquatic Living Resources, 16: 533-540. doi: 10.1016/j.aquliv.2003.06.001

Sánchez-Estudillo, L. 2011. Alimento nutritivo, colorido y en movimiento: los cultivos de apoyo en acuicultura. Ciencia y Mar, 15: 55-60.

Sánchez-Saavedra, M.P. & Paniagua-Chávez, C. 2017. Potential of refrigerated marine cyanobacterium *Synechococcus elongatus* used as food for *Artemia franciscana.* Latin American Journal of Aquatic Research, 45: 937-947. doi: 10.3856/vol45-issue5-fulltext-9

Shanmugam, S. & Rajendran, R. 2018. Influence of different diets on the growth, survival, fecundity and proximate composition of brine shrimp *Artemia franciscana* (Kellog, 1906). Aquaculture Research, 50: 1-14. doi: 10.1111/are.13882

Sharahi, A.R. & Zarei, S. 2016. Mutual effect of light and turbidity on hatching of *Artemia franciscana* cysts. International Journal of Fauna and Biological Studies, 3: 3-6.

Sorgeloos, P. 1973. First report on the triggering effect of light on the hatching mechanism of *Artemia salina* dry cysts. Marine Biology, 22: 75-76. doi: 10.1007/bf00388912

Sorgeloos, P., Lavens, P., Leger, P., Tackaert, W. & Versichele, D. 1986. Manual for the culture and use of

brine shrimp *Artemia* in aquaculture. FAO - State University of Ghent, Ghent.

Viciano-Delibano, E. 2015. Optimización del enrique-cimiento de nauplios de *Artemia* mediante el uso de emulsiones lipídicas formuladas a partir de aceites sintéticos ricos en DHA. Tesis de Doctorado, Universidad de Valencia, Valencia.

Widiastuti, R., Hutabarat, J. & Herawati, V.E. 2012. Effect of different natural feeding (*Skeletonema costatum* and Chaetoceros *gracilis*) on absolute biomass growth and nutritional content of local *Artemia* sp. Journal of Additive Manufacturing Technologies, 1: 236-248.

You, K., Ma, C., Gao, H., Li, F., Zhang, M., Qiu, Y. & Wang, B. 2008. Food intake rate and delivery strategy in aquaculture. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 26: 263-267. doi: 10.1007/s00343-008-0263-5

Zar, J.H. 2010. Biostatistical analysis. Prentice-Hall, New Jersey.

Received: December 30, 2020; Accepted: July 1, 2021

Ciencias Marinas (2023), 49:e3381
https://doi.org/10.7773/cm.y2023.3381

Research Article/*Artículo de Investigación*

Online ISSN: 2395-9053

Effect of 4 microalgal diets on the proximal composition, chlorophyll concentration, and total carotenoid content in *Artemia franciscana*

Efecto de 4 dietas de microalgas sobre la composición proximal, concentración de clorofila y contenido total de carotenoides en *Artemia franciscana*

Martha I Millán-Almaraz[1], Diana J López-Peraza[2]*, Mario Nieves-Soto[2], Mario M Peraza-Yee[1]

[1] Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Sinaloa, 80260, Culiacán Rosales, Sinaloa, Mexico.
[2] Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Autónoma de Sinaloa, 82000 Mazatlán, Sinaloa, Mexico.

* Corresponding author. E-mail: dianalopez@uas.edu.mx

ABSTRACT. Microalgae are the primary source of food for *Artemia franciscana*. In turn, *Artemia* serve as live food for various species in culture. The chemical composition of *Artemia* is of great importance because it affects the nutritional quality of the organisms produced in aquaculture systems. For this reason, the present study aimed to characterize the nutritional value, proximal composition, concentration of chlorophyll *a* and *b*, and total carotenoid content in the microalgae *Thalassiosira weissflogii*, *Chaetoceros muelleri*, *Tetraselmis suecica*, and *Nannochloropsis* sp., which were used to feed juvenile *A. franciscana* for 6 h. *Artemia* juveniles fed with these microalgae species exhibited higher concentrations of proteins, carbohydrates, lipids, chlorophyll *a* and *b*, and total carotenoids than those in the control. The organisms fed with *Tetraselmis suecica* presented the highest content of chlorophyll *b*, while those fed with *Thalassiosira weissflogii* and *Chaetoceros muelleri* showed the highest values of total carotenoids and chlorophyll *a*.

Key words: *Artemia*, microalgae, proximal composition, chlorophylls, carotenoids.

RESUMEN. Las microalgas son la principal fuente de alimento de *Artemia franciscana*. A su vez, *Artemia* sirve como alimento vivo para diversas especies en cultivo. La composición química de *Artemia* es de gran importancia porque afecta la calidad nutricional de los organismos producidos en los sistemas acuícolas. Por esta razón, el presente estudio tuvo como objetivo caracterizar el valor nutricional, composición proximal, concentración de clorofila *a* y *b* y contenido total de carotenoides en las microalgas *Thalassiosira weissflogii*, *Chaetoceros muelleri*, *Tetraselmis suecica* y *Nannochloropsis* sp., que fueron utilizadas para alimentar a juveniles de *A. franciscana* durante 6 h. Los juveniles de *Artemia* alimentados con estas especies de microalgas exhibieron concentraciones más altas de proteínas, carbohidratos, lípidos, clorofila *a* y *b* y carotenoides totales que los del control. Los organismos alimentados con *Tetraselmis suecica* presentaron el mayor contenido de clorofila *b*, mientras que los alimentados con *Thalassiosira weissflogii* y *Chaetoceros muelleri* mostraron los valores más altos de carotenoides totales y clorofila *a*.

Palabras clave: *Artemia*, microalgas, composición proximal, clorofilas, carotenoides.

Received 02 October 2022, accepted 22 May 2023, published 05 December 2023

Screened via Similarity Check powered by iThenticate

Open Access

©Martha I Millán-Almaraz, Diana J López-Peraza, Mario Nieves-Soto, Mario M Peraza-Yee.
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0), which allows you to share and adapt the work, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. Figures, tables, and other elements in the article are included in the article's CC BY 4.0 license, unless otherwise indicated. You must seek permission from the copyright holder for use of material not covered by this license. The journal title is protected by copyrights owned by Universidad Autónoma de Baja California, and the journal title and logo are not subject to this license.

INTRODUCTION

Microalgae contain high-value nutrients such as carotenoids, vitamins, and essential fatty acids (Hamed 2016). Consequently, they are a primary food source for many marine organisms during their early life stages, including bivalves, fish, and shrimp, as well as zooplankton such as *Artemia*, cladocerans, and copepods (Martínez-Córdova et al. 2014).

Carotenoids, which are vitamin A precursors, can scavenge reactive oxygen species, protecting cells from aggressive free radical damage and improving the immune system (De la Vega-Naranjo 2014, Ruiz-Soto 2017). Similarly, chlorophylls function as antioxidants by interrupting the peroxidation chain reaction (Rigane et al. 2013). Polyunsaturated fatty acids (PUFAs), such as eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5 n-3), docosahexaenoic acid (DHA, 22:6 n-3), and arachidonic acid (AA, 20:4 n-6; Ramírez-Mérida et al. 2015), are essential for organisms. These compounds play important functions as precursors of eicosanoids and hormones and improve the immune system (Vizcaíno-Ochoa et al. 2010).

The diatoms *Thalassiosira weissflogii* and *Chaetoceros muelleri* mainly produce the carotenoids fucoxanthin, diadinoxanthin, diatoxanthin, and β-carotene (Marella and Tiwari 2020). However, they can produce other carotenoids, including violaxanthin, zeaxanthin, and phaeophytin *a*, in minor quantities depending on light, nutrient, and temperature conditions (Long et al. 2018). *Tetraselmis suecica* is characterized by having trans-violaxanthin, antheraxanthin, astaxanthin, lutein, α-carotene, and β-carotene (Ahmed et al. 2014), whereas *Nannochloropsis* sp. mainly contains violaxanthin and vaucheriaxanthin, in addition to zeaxanthin, canthaxanthin, α-carotene, and β-carotene (Paliwal et al. 2016). The main fatty acids in *Thalassiosira weissflogii* are 16:1n, 16:0, 14:0, and EPA, while those in *Chaetoceros muelleri* are 16:1n, 16:0, 14:0, EPA, and AA (Aranda-Burgos et al. 2014, Marella and Tiwari 2020). The green microalgae *Tetraselmis suecica* mainly contains 16:0, 16:2, 16:3, and α-linolenic acid (18:3), whereas *Nannochloropsis* sp. mainly contains EPA and AA (Chaisutyakorn et al. 2018, Pugkaew et al. 2019).

Artemia is one of the most used live foods in aquaculture, although *Artemia* nauplii and juveniles are deficient in PUFAs and carotenoids. These deficiencies can be solved by enrichment or bioencapsulation techniques, which can deliver several compounds of nutritional interest to organ- isms cultured with live food, including *Artemia* (Tlusty et al. 2005). Employing *Artemia* juveniles or adults has certain advantages over using nauplii, as their nutritional value is higher than that of recently hatched or early-stage nauplii (Léger et al. 1986).

In late developmental stages, *Artemia* is used as live food for larger organisms, including the lobster *Homarus americanus*, shrimp *Macrobrachium americanum*, and

INTRODUCCIÓN

Las microalgas contienen nutrientes de alto valor, como carotenoides, vitaminas y ácidos grasos esenciales (Hamed 2016). En consecuencia, son una fuente primaria de alimento para muchos organismos marinos durante sus primeras etapas de vida, incluidos bivalvos, peces y camarones, así como zooplancton como *Artemia*, cladóceros y copépodos (Martínez-Córdova et al. 2014).

Los carotenoides, que son precursores de la vitamina A, pueden secuestrar las especies reactivas de oxígeno, protegiendo las células del daño agresivo de los radicales libres y mejorando el sistema inmunológico (De la Vega-Naranjo 2014, Ruiz-Soto 2017). De manera similar, las clorofilas funcionan como antioxidantes al interrumpir la reacción en cadena de peroxidación (Rigane et al. 2013). Ácidos grasos poliinsaturados (AGPIs), como el ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5 n-3), ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6 n-3) y ácido araquidónico (AA, 20:4 n-6; Ramírez-Mérida et al. 2015), son esenciales para los organismos. Estos compuestos desempeñan funciones importantes como precursores de eicosanoides y hormonas y mejoran el sistema inmunológico (Vizcaíno-Ochoa et al. 2010).

Las diatomeas *Thalassiosira weissflogii* y *Chaetoceros muelleri* producen principalmente los carotenoides fucoxantina, diadinoxantina, diatoxantina y β-caroteno (Marella y Tiwari 2020). Sin embargo, pueden producir otros carotenoides, como violaxantina, zeaxantina y feofitina *a*, en cantidades menores dependiendo de las condiciones de luz, nutrientes y temperatura (Long et al. 2018). *Tetraselmis suecica* se caracteriza por tener transviolaxantina, anteraxantina, astaxantina, luteína, α-caroteno y β-caroteno (Ahmed et al. 2014), mientras que *Nannochloropsis* sp. contiene principalmente violaxantina y vaucheriaxantina, además de zeaxantina, cantaxantina, α-caroteno y β-caroteno (Paliwal et al. 2016). Los principales ácidos grasos de *Thalassiosira weissflogii* son 16:1n, 16:0, 14:0 y EPA, mientras que los de *Chaetoceros muelleri* son 16:1n, 16:0, 14:0, EPA y AA (Aranda-Burgos et al. 2014, Marella y Tiwari 2020). La microalga verde *Tetraselmis suecica* contiene principalmente ácido 16:0, 16:2, 16:3 y ácido α-linolénico (18:3), mientras que *Nannochloropsis* sp. contiene principalmente EPA y AA (Chaisutyakorn et al. 2018, Pugkaew et al. 2019).

Artemia es uno de los alimentos vivos más utilizados en la acuicultura, aunque los nauplios y juveniles de *Artemia* son deficientes en AGPIs y carotenoides. Estas deficiencias pueden resolverse mediante técnicas de enriquecimiento o bioencapsulación, que pueden proporcionar varios compuestos de interés nutricional a organismos cultivados con alimentos vivos, incluida *Artemia* (Tlusty et al. 2005). El empleo de juveniles o adultos de *Artemia* tiene ciertas ventajas sobre el uso de nauplios, ya que su valor nutricional es mayor que el de los nauplios recién eclosionados o en etapa temprana (Léger et al. 1986).

octopus *Octopus vulgaris* (Méndez-Martínez et al. 2018). In addition, *Artemia* is used widely in the culturing protocols of ornamental fishes. For example, Azimirad et al. (2016) evaluated the effect of feeding angelfish (*Pterophyllum scalare*) adult *Artemia* without enrichment (control), adult *Artemia* enriched with lyophilised probiotic, adult *Artemia* enriched with a prebiotic, and adult *Artemia* enriched with a synbiotic and found better results in terms of the final weight, weight gain, and specific growth rate of juvenile angelfish fed with the symbiotic-enriched *Artemia*.

Among *Artemia* species, *A. franciscana* is the most widely used live food in marine hatcheries despite being deficient in carotenoids and PUFAs. Nonetheless, as microalgae constitute the primary food source for *Artemia*, the biochemical composition of hatchery diets can be modified by adjusting the diet of *Artemia* (Fábregas et al. 2001). For example, several studies have shown that PUFAs can be transferred from microalgae to *Artemia* nauplii through feeding, that is, from prey to predator (Bhuvaneshwari et al. 2018). Indeed, a short enrichment period of 6–8 h was observed to improve the nutritional quality of *Artemia*, increasing PUFA content to 56.50% when enriched with *Nannochloropsis salina* (Chakraborty et al. 2007). Additionally, mortality rates of *Artemia* decreased when fed a diet enriched with this microalga (Chakraborty et al. 2007).

Many studies have evaluated the enrichment of *Artemia* nauplii with microalgae. However, very few have focused on *Artemia* in late developmental stages (i.e., juveniles and adults). Therefore, this study aimed to characterize the proximal composition, concentration of chlorophyll *a* and *b*, and total carotenoid content of the most widely used microalgae in aquaculture, namely *Thalassiosira weissflogii*, *Chaetoceros muelleri*, *Tetraselmis suecica*, and *Nannochloropsis* sp., to evaluate the effects of these microalgae diets on the biochemical composition of *A. franciscana juveniles*.

MATERIALS AND METHODS

Microalgae cultures

Microalgae were cultivated in f culture media prepared with seawater at 35 psu (practical salinity units), filtered and disinfected with commercial sodium hypochlorite at 5% (Guillard and Ryther 1962). Air was supplied continuously by a 2.5-HP blower, and the cultures were illuminated with 6 white light fluorescent lamps (6,000–6,500 lux). Temperature was maintained at 25 ± 1 °C. Microalgae culturing was carried out following the successive transfer technique of Zazueta-Patrón (2016) using the strains *Thalassiosira weissflogii* (TH-W-1), *Chaetoceros muelleri* (CH-M-1), *Tetraselmis suecica* (TE-S-1), and *Nannochloropsis* sp. (NN- X-1). The initial density of each culture was 10,000 cell·mL^{-1} (TH-W-1), 200,000 cell·mL^{-1} (CH-M-1), 25,000 cell·mL^{-1} (TE-S-1), and 300,000 cell·mL^{-1} (NN-X-1). Cultures were maintained until the exponential phase. Cell density was

En etapas tardías de desarrollo, *Artemia* se utiliza como alimento vivo para organismos más grandes, incluida la langosta *Homarus americanus*, el camarón *Macrobrachium americanum* y el pulpo *Octopus vulgaris* (Méndez-Martínez et al. 2018). Además, *Artemia* se utiliza ampliamente en los protocolos de cultivo de peces ornamentales. Por ejemplo, Azimirad et al. (2016) evaluaron el efecto de alimentar al pez ángel (*Pterophyllum scalare*) con *Artemia* adulta no enriquecida (control), *Artemia* adulta enriquecida con probiótico liofilizado, *Artemia* adulta enriquecida con prebiótico y *Artemia* adulta enriquecida con simbiótico y encontraron mejores resultados en términos de peso final, ganancia de peso y tasa de crecimiento específica en los juveniles de peces ángel alimentados con *Artemia* enriquecida con simbiótico.

Entre las especies de *Artemia*, *A. franciscana* es el alimento vivo más utilizado en los criaderos marinos a pesar de ser deficiente en carotenoides y AGPIs. No obstante, como las microalgas constituyen la principal fuente de alimento de *Artemia*, la composición bioquímica de la dieta del criadero puede modificarse ajustando la dieta de *Artemia* (Fábregas et al. 2001). Por ejemplo, varios estudios han demostrado que los AGPIs pueden transferirse de las microalgas a los nauplios de *Artemia* a través de la alimentación, es decir, de la presa al depredador (Bhuvaneshwari et al. 2018). De hecho, se observó que un corto período de enriquecimiento de 6 a 8 h mejoraba la calidad nutricional de *Artemia*, aumentando el contenido de AGPIs al 56.50% cuando se enriquecía con *Nannochloropsis salina* (Chakraborty et al. 2007). Además, las tasas de mortalidad de *Artemia* disminuyeron cuando se les alimentó con una dieta enriquecida con esta microalga (Chakraborty et al. 2007).

Muchos estudios han evaluado el enriquecimiento de los nauplios de *Artemia* con microalgas. Sin embargo, muy pocos se han centrado en *Artemia* en etapas tardías de su desarrollo (i.e., juveniles y adultos). Por lo tanto, este estudio tuvo como objetivo caracterizar la composición proximal, la concentración de clorofila *a* y *b* y el contenido de carotenoides totales de las microalgas más utilizadas en acuicultura, a saber, *Thalassiosira weissflogii*, *Chaetoceros muelleri*, *Tetraselmis suecica* y *Nannochloropsis* sp., para evaluar los efectos de estas dietas de microalgas en la composición bioquímica de los juveniles de *A. franciscana*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos de microalgas

Las microalgas se cultivaron en medio de cultivo f preparado con agua de mar a 35 ups (unidades prácticas de salinidad) filtrada y desinfectada con hipoclorito de sodio comercial al 5% (Guillard y Ryther 1962). Se suministró aire continuamente mediante un soplador de 2.5 HP y los cultivos se iluminaron con 6 lámparas fluorescentes de luz blanca (6,000-6,500 lux). La temperatura se mantuvo a 25 ± 1 °C. Los cultivos de microalgas se realizaron siguiendo la técnica de

determined by direct counts using a compound microscope and Neubauer chamber. Representative samples of each microalga were taken to analyze the proximal composition of proteins, carbohydrates, and lipids, as well as the concentration of chlorophyll *a* and *b*, and total carotenoid content. All samples were kept at –60 °C until analyzed.

Culture of juvenile *Artemia franciscana*

To obtain *A. franciscana* nauplii (Great Salt Lake *Artemia*, INVE Aquaculture, lot 7116496181), we followed the standard cyst hydration-decapsulation-incubation procedure described by Sorgeloos et al. (1986). Based on mitogenomic analyses, Sainz-Escudero et al. (2021) pro- posed the name *Artemia monica* Verrill, 1869 as the valid name of *A. franciscana* Kellogg, 1906 for the New World Lineage. Hydration was conducted in freshwater with constant aeration. For decapsulation, 5% commercial sodium hypochlorite was used, and the cysts were incubated for 24 h in seawater (35 psu and 28 °C) with aeration and constant lighting (2,000 lux). After hatching, *A. franciscana* organisms were transferred to a 14-L container with 2 *Artemia*·mL^{-1} and cultured for 9 days. During this period,
A. franciscana was fed daily with *Chaetoceros muelleri* according to the feeding rate reported by Millán-Almaraz et al. (2021). The seawater was exchanged (30%) each day. The bioencapsulation experiment commenced on day 9 of the culture. *Artemia franciscana* was cultured for 9 days, as this time is required for organisms to reach the juvenile stage (minimum length of 2.7 mm; Sorgeloos et al. 1986).

Nutrient bioencapsulation experiment in juvenile *Artemia franciscana*

The microalgae and *A. franciscana* cultures were syn- chronized so that *A. franciscana* juveniles were available by the time the microalgae reached the exponential phase. Thus, we were able to feed isolipidic diets to the juveniles. The isolipidic equivalence of the microalgae has been determined in previous unpublished studies (Table 1). For this purpose, the microalgae *Chaetoceros muelleri* was used as a reference, and the experimental conditions were based on the results of Millán-Almaraz et al. (2021), who observed that the highest ingestion rate of *A. franciscana* juveniles occurred when they were fed with a density of 900,000 cell·mL^{-1} in the dark. Therefore, considering the lipid content of the microalgae *Chaetoceros muelleri* (12.84 pg of lipid·cell^{-1}) and the reported cell density, the isolipidic diet consisted of 11,556,000 pg of lipid·mL^{-1}. Thus, we needed 77,541 cell·mL^{-1} of *Thalassiosira weissflogii*, 457,482 cell·mL^{-1} of *Tetraselmis suecica*, and 4,736,065 cell·mL^{-1} of *Nannochloropsis* sp. to reach this concentration (Table 1).
It is important to mention that before the experiment, the intestines were confirmed to be empty by direct observation

transferencias sucesivas de Zazueta- Patrón (2016) utilizando las cepas *Thalassiosira weissflogii* (TH-W-1), *Chaetoceros muelleri* (CH-M-1), *Tetraselmis suecica* (TE-S-1) y *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1). La densidad inicial de cada cultivo fue de 10,000 cel·mL^{-1} (TH-W-1), 200,000 cel·mL^{-1} (CH-M-1), 25,000 cel·mL^{-1} (TE-S-1) y 300,000 cel·mL^{-1} (NN-X-1). Los cultivos se mantuvieron hasta la fase expo- nencial. La densidad celular se determinó mediante conteos directos utilizando un microscopio compuesto y una cámara de Neubauer. Se tomaron muestras representativas de cada microalga para analizar la composición proximal de proteínas, carbohidratos y lípidos, así como la concentración de clorofila *a* y *b*, y el contenido total de carotenoides. Todas las muestras se mantuvieron a –60 °C hasta su análisis.

Cultivo de juveniles de *Artemia franciscana*

Para obtener nauplios de *A. franciscana* (Great Salt Lake *Artemia*, INVE Aquaculture, lote 7116496181), seguimos el procedimiento estándar de hidratación-decapsulación-incubación de quistes descrito por Sorgeloos et al. (1986). Basado en análisis mitogenómicos, Sainz-Escudero et al. (2021) propusieron el nombre *Artemia monica* Verrill, 1869 como nombre válido de *A. franciscana* Kellogg, 1906 para el Linaje del Nuevo Mundo. La hidratación se realizó en agua dulce con aireación constante. Para la decapsulación se utilizó hipoclorito de sodio comercial al 5% y los quistes se incubaron durante 24 h en agua de mar (35 ups y 28 °C) con aireación e iluminación constante (2,000 lux). Después de la eclosión, los organismos de *A. franciscana* se transfirieron a un recipiente de 14 L con 2 *Artemia*·mL^{-1} y se cultivaron durante 9 días. Durante este período, *A. franciscana* fue alimentada diariamente con *Chaetoceros muelleri* según la tasa de alimentación reportada por Millán-Almaraz et al. (2021). El agua de mar se cambió (30%) cada día. El experimento de bioencapsulación comenzó el día 9 del cultivo. *Artemia franciscana* se cultivó durante 9 días, ya que este tiempo es necesario para que los organismos alcancen la etapa juvenil (longitud mínima de 2.7 mm; Sorgeloos et al. 1986).

Experimento de bioencapsulación de nutrientes en juveniles de *Artemia franciscana*

Los cultivos de microalgas y *A. franciscana* se sincronizaron para que los juveniles de *A. franciscana* estuvieran disponibles cuando las microalgas alcanzaran la fase exponencial. Por lo tanto, pudimos alimentar a los juveniles con dietas isolipídicas. La equivalencia isolipídica de las microalgas se ha determinado en estudios previos no publicados (Tabla 1). Para ello, se tomó como referencia la microalga *Chaetoceros muelleri* y las condiciones experimentales se basaron en los resultados de Millán-Almaraz et al. (2021), quienes observaron que la mayor tasa de ingestión de juveniles de *A. franciscana* se produjo cuando fueron alimentados con una densidad de 900,000 cel·mL^{-1} en la oscuridad. Por lo

Table 1. Lipid concentration in pg·cell^{-1} and equivalence in cell·mL^{-1} of the microalgae *Thalassiosira weissflogii* (TH-W-1), *Chaetoceros muelleri* (CH-M-1), *Tetraselmis suecica* (TE-S-1), and *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1).
Tabla 1. Concentración de lípidos en pg·cel^{-1} y equivalencia en cel·mL^{-1} de las microalgas *Thalassiosira weissflogii* (TH-W-1), *Chaetoceros muelleri* (CH-M-1), *Tetraselmis suecica* (TE-S-1) y *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1).

	CH-M-1	TH-W-1	TE-S-1	NN-X-1
Lipids in pg·cell^{-1}	12.84	149.03	25.26	2.44
Equivalence in cell·mL^{-1}	900,000	77,541	457,482	4,736,065

using an CH30 microscope. The experiment consisted of 4 treatments, each with one species of microalgae and 4 replicas, resulting in 16 containers with microalgae + *Artemia*. The control did not include microalgae. In total, there were 20 experimental units, each with a density of 0.5 *Artemia*·mL^{-1}. The experimental units consisted of plastic containers with transparent walls, each with a useful volume of 14 L. During the experiment, salinity (35 psu), temperature (25 °C), aeration, and darkness (containers protected from light with black curtains) were maintained constant. At the beginning (0 h) and end (6 h) of the experiment, samples of *A. franciscana* juveniles were taken to determine the proximal composition of proteins, carbohydrates, and lipids, as well as the concentration of chlorophyll *a* and *b*, and total carotenoid content.

Proximal analysis

The proximal composition of the microalgae and *A. franciscana juveniles* was determined based on the dry weight of proteins (Lowry et al. 1951), carbohydrates (extraction, Whyte 1987; quantification, Dubois et al. 1956) and lipids (extraction, Bligh and Dyer 1959; quantification, Pande et al. 1963). To obtain the samples, a known volume of *A. franciscana* culture was filtered through GF/C 25 mm filters Whatman. Then, the samples were placed in an oven at 45 °C to dry and stored at –60 °C until analyzed.

Proteins

The filters containing the samples were placed in centrifuge tubes, and 2 mL of 1 N NaOH was added to each. After- ward, the filters were macerated, and 3 mL of 1 N NaOH was added. Then, the tubes were covered with aluminum foil and placed in a water bath at 100 °C for 10 min. Subsequently, the samples were mixed and centrifuged at 3,220 × g for 15 min, and the supernatant was transferred to the test tubes. A double extraction was performed. Afterward, 1 mL of each sample was collected and placed in each test tube, and 5 mL of solution C was added. Solution C was a mixture of the following solutions: solution A (2% anhydrous sodium carbonate in 0.1 N NaOH), solution B1 (0.5% copper

tanto, considerando el contenido de lípidos de la microalga *Chaetoceros muelleri* (12.84 pg de lípidos·cel-1) y la densidad celular reportada, la dieta isolipídica consistió en 11,556,000 pg de lípidos·mL^{-1}. Por lo tanto, necesitábamos 77,541 cel·mL^{-1} de *Thalassiosira weissflogii*, 457,482 cel·mL^{-1} de *Tetraselmis suecica* y 4,736,065 cel·mL^{-1} de *Nannochloropsis* sp. para alcanzar esta concentración (Tabla 1).
Es importante mencionar que antes del experimento, se confirmó que los intestinos estaban vacíos mediante observación directa utilizando un microscopio Olympus CH30. El experimento constó de 4 tratamientos, cada uno con una especie de microalga y 4 réplicas, dando como resultado 16 contenedores con microalga + *Artemia*. El control no incluyó microalgas. En total, hubo 20 unidades experimentales, cada una con una densidad de 0.5 *Artemia*·mL^{-1}. Las unidades experimentales estuvieron compuestas por recipientes plásticos de paredes transparentes, cada uno con un volumen útil de 14 L. Durante el experimento, la salinidad (35 ups), temperatura (25 °C), aireación y oscuridad (recipientes protegidos de la luz con cortinas negras) se mantuvieron constantes. Al inicio (0 h) y al final (6 h) del experimento, se tomaron muestras de juveniles de *A. franciscana* para determinar la composición proximal de proteínas, carbohidratos y lípidos, así como la concentración de clorofila *a* y *b* y contenido total de carotenoides.

Análisis proximal

La composición proximal de las microalgas y los juveniles de *A. franciscana* se determinó con base en el peso seco de proteínas (Lowry et al. 1951), carbohidratos (extracción, Whyte 1987; cuantificación, Dubois et al. 1956) y lípidos (extracción, Bligh y Dyer 1959; cuantificación, Pande et al. 1963). Para obtener las muestras, se filtró un volumen conocido de cultivo de *A. franciscana* a través de filtros GF/C de 25 mm Whatman. Luego, las muestras se colocaron en una estufa a 45 °C para secar y se almacenaron a –60 °C hasta su análisis.

Proteínas

Los filtros que contenían las muestras se colocaron en tubos de centrífuga y a cada uno se le agregaron 2 mL de

sulfate in distilled water), and solution B2 (1% sodium potassium tartrate in distilled water). After adding solution C, the test tubes were allowed to settle for 10 min. Then, 0.5 mL of solution D (mixture of Folin Ciocalteu and distilled water) was added to each tube and shaken vigorously until the mixture turned blue. After which, the test tubes were left to stand for 90 min in the dark. A 1 cm quartz cell was used to read the samples in a Hach DR5000 spectrophotometer at a wave- length of 750 nm.

Carbohydrates

The filters containing the samples were placed in centrifuge tubes, and 2 mL of 1 M H_2SO_4 was added to each tube. Afterward, the filters were macerated, and 2 mL of 1 M H_2SO_4 was added. The tubes were covered with aluminum foil and placed in a water bath at 100 °C for 60 min. Subsequently, the samples were mixed and centrifuged at 3,220 × g for 15 min. After centrifugation, 1 mL of the supernatant from each tube was taken and placed in a test tube, and 1 mL of 5% phenol solution was added. After resting for 40 min, 5 mL of concentrated sulfuric acid was added slowly and mixed until the samples turned yellow. Finally, a 1 cm quartz cell was used to read the samples in the Hach DR5000 spectrophotometer at a wavelength of 485 nm.

Lipids

The filters containing the samples were placed in test tubes and positioned in an ice bath. Then, 0.5 mL of distilled water and 2 mL of methanol were added to each tube, and the con- tents were macerated. Subsequently, 2 mL of chloroform and 2 mL of methanol were added to each tube and centrifuged at 3,220 × g for 15 min. Then, a double extraction was conducted using 1 mL of methanol and 2 mL of chloroform. A total of 2 mL of distilled water was added to the supernatant obtained from the 2 extractions, and the tubes were shaken vigorously for biphase formation. The tubes with the supernatant were covered with aluminum foil and refrigerated for at least 24 h. After which, the upper layer was discarded, and the rest was left to dry in an oven at 45 °C.

A total of 3 mL of the 2% acid solution of potassium dichromate was added to the remaining concentrate, which was then covered with aluminum foil and placed in a water bath at 100 °C for 15 min. Subsequently, 4.5 mL of distilled water was added to each tube, mixed vigorously, and cooled to room temperature. Finally, a 1 cm quartz cell was used to read the samples in the Hach DR5000 spectrophotometer at a wavelength of 590 nm.

Chlorophyll and total carotenoid analysis

Microalgae and *Artemia* samples were ground in 100% acetone in an ice bath in the dark and left to stand for 24 h in a refrigerator at 4 °C. The supernatant was recovered by

NaOH 1 N. Posteriormente se maceraron los filtros y se agregaron 3 mL de NaOH 1 N. Luego, los tubos se cubrieron con papel de aluminio y se colocaron en un baño de agua a 100 °C durante 10 min. Posteriormente, las muestras se mezclaron y centrifugaron a 3220 x g durante 15 min y el sobrenadante se transfirió a los tubos de ensayo. Se realizó una doble extracción. Posteriormente se recogió 1 mL de cada muestra y se colocó en cada tubo de ensayo y se agregaron 5 mL de solución C. La solución C era una mezcla de las siguientes soluciones: solución A (carbonato de sodio anhidro al 2% en NaOH 0.1 N), solución B1 (sulfato de cobre al 0.5% en agua destilada) y solución B2 (tartrato de sodio y potasio al 1% en agua destilada). Después de agregar la solución C, los tubos de ensayo se dejaron reposar durante 10 min. Luego, se agregaron a cada tubo 0.5 ml de solución D (mezcla de Folin Ciocalteu y agua destilada) y se agitó vigorosamente hasta que la mezcla se volvió azul. Después de lo cual, los tubos de ensayo se dejaron reposar durante 90 min en la oscuridad. Se utilizó una celda de cuarzo de 1 cm para leer las muestras en un espectrofotómetro Hach DR5000 a una longitud de onda de 750 nm.

Carbohidratos

Los filtros que contenían las muestras se colocaron en tubos de centrífuga y se agregaron 2 mL de H_2SO_4 1 M a cada tubo. Posteriormente se maceraron los filtros y se agregaron 2 mL de H_2SO_4 1 M. Los tubos se cubrieron con papel de aluminio y se colocaron en un baño de agua a 100 °C durante 60 min. Posteriormente, las muestras se mezclaron y se centrifugaron a 3,220 × g durante 15 min.

Después de la centrifugación, se tomó 1 mL del sobrenadante de cada tubo y se colocó en un tubo de ensayo y se añadió 1 ml de solución de fenol al 5%. Después de reposar durante 40 min, se agregaron lentamente 5 mL de ácido sulfúrico concentrado y se mezclaron hasta que las muestras se volvieron amarillas. Finalmente, se utilizó una celda de cuarzo de 1 cm para leer las muestras en el espectrofotómetro Hach DR5000 a una longitud de onda de 485 nm.

Lípidos

Los filtros que contenían las muestras se pusieron en tubos de ensayo y se colocaron en un baño de hielo. Luego se añadieron a cada tubo 0.5 mL de agua destilada y 2 mL de metanol y se maceró el contenido. Posteriormente, a cada tubo se le agregaron 2 mL de cloroformo y 2 mL de metanol y se centrifugaron a 3,220 × g durante 15 min. Luego, se realizó una doble extracción utilizando 1 mL de metanol y 2 mL de cloroformo. Al sobrenadante obtenido de las 2 extracciones se le añadió un total de 2 mL de agua destilada y los tubos se agitaron vigorosamente para la formación de bifase. Los tubos con el sobrenadante se cubrieron con papel de aluminio y se refrigeraron durante al menos 24 h. Posteriormente se descartó la capa superior y el resto se dejó secar en estufa a 45 °C.

centrifugation at 3,220 × g for 15 min at 4 °C. A double extraction was then performed on the precipitate, and the resulting supernatants were mixed. Then, a 1 cm quartz cell was used to read the samples in the Hach DR5000 spectrophotometer at 662 nm (chlorophyll *a*), 645 nm (chlorophyll *b*), and 470 nm (total carotenoids). The concentrations of these pigments are presented in $\mu g \cdot mL^{-1}$ and were calculated according to the equations proposed by Lichtenthaler and Wellburn (1983):

$$Chl\mathit{a} = 11.75\ A_{662} - 2.350\ A_{645}, \quad (1)$$

$$Chl\mathit{b} = 18.61\ A_{645} - 3.960\ A_{662}, \quad (2)$$

$$TC = 1{,}000\ A_{470} - 2.270\ Chl\mathit{a} - 81.4\ Chl\mathit{b}/227\ , \quad (3)$$

where Chl*a* is chlorophyll *a* in $\mu g \cdot mL^{-1}$, Chl*b* is chlorophyll *b* in $\mu g \cdot mL^{-1}$, TC is total carotenoids in $\mu g \cdot mL^{-1}$, and A is absorbance.

Statistical analysis

Data of the proximal composition, concentration of chlorophyll *a* and *b*, and total carotenoid content of the microalgae and juvenile *A. franciscana* were evaluated by Lilliefors normality and Bartlett homoscedasticity tests (Zar 2010) to determine if parametric or non-parametric statistical tests were necessary. When the data met the assumptions of these tests, a one-way analysis of variance (ANOVA) was performed. Conversely, when the data did not meet these assumptions, a non-parametric Kruskal–Wallis test was con- ducted. When significant differences were found, a Student– Newman–Keuls (SNK) multiple comparison test was conducted for both parametric and non-parametric data. Data analyzed with non-parametric tests are marked in the tables with an asterisk (*). All statistical analyses were performed in SigmaStat v. 3.5 with a significance level of 5%.

RESULTS

Proximal analysis of microalgae

The proximal analysis based on dry weight (DW) revealed that the protein content of TE-S-1 (426.28 $mg \cdot g^{-1}$) was higher than that of TH-W-1 and CH-M-1 ($P < 0.05$; Table 2). The carbohydrate content of TE-S-1 (231.70 $mg \cdot g^{-1}$) was higher than those of CH-M-1 and NN-X-1 ($P < 0.05$; Table 2). On the other hand, TE-S-1 showed the highest lipid content (154.43 $mg \cdot g^{-1}$), which was only significantly higher than that of NN-X-1 ($P < 0.05$; Table 2).

Chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, and total carotenoids in microalgae

The chlorophyll *a* content of TE-S-1 was 12.59 pg Chl*a*$\cdot ng^{-1}$ DW, the highest value for all microalgae ($P < 0.05$;

Al concentrado restante se le añadió un total de 3 mL de la solución ácida de dicromato de potasio al 2%, que luego se cubrió con papel de aluminio y se colocó en un baño de agua a 100 °C durante 15 min. Posteriormente, se agregaron 4.5 mL de agua destilada a cada tubo, se mezclaron vigorosamente y se enfriaron a temperatura ambiente. Finalmente, se utilizó una celda de cuarzo de 1 cm para leer las muestras en el espectrofotómetro DR5000 (Hach) a una longitud de onda de 590 nm.

Análisis de clorofilas y carotenoides totales

Se trituraron muestras de microalgas y *Artemia* en acetona al 100% en un baño de hielo en la oscuridad y se dejaron reposar durante 24 h en refrigeración a 4 °C. El sobrenadante se recuperó por centrifugación a 3,220 × g durante 15 min a 4 °C. Posteriormente, se realizó una doble extracción del precipitado y se mezclaron los sobrenadantes resultantes. Luego, se utilizó una celda de cuarzo de 1 cm para leer las muestras en el espectrofotómetro Hach DR5000 a 662 nm (clorofila *a*), 645 nm (clorofila *b*) y 470 nm (carotenoides totales). Las concentraciones de estos pigmentos se presentan en $\mu g \cdot mL^{-1}$ y se calcularon según las ecuaciones propuestas por Lichtenthaler y Wellburn (1983):

$$Cl\mathit{a} = 11.75\ A_{662} - 2.350\ A_{645}\ , \quad (1)$$

$$Cl\mathit{b} = 18.61\ A_{645} - 3.960\ A_{662}\ , \quad (2)$$

$$CT = 1{,}000\ A_{470} - 2.270\ Cl\mathit{a} - 81.4\ Cl\mathit{b}/227\ , \quad (3)$$

donde Cl*a* es clorofila *a* en $\mu g \cdot mL^{-1}$, Cl*b* es clorofila *b* en $\mu g \cdot mL^{-1}$, CT son carotenoides totales en $\mu g \cdot mL^{-1}$ y A es absorbancia.

Análisis estadístico

Los datos de la composición proximal, concentración de clorofila *a* y *b*, y contenido total de carotenoides de las microalgas y juveniles de *A. franciscana* fueron evaluados mediante las pruebas de normalidad de Lilliefors y homocedasticidad de Bartlett (Zar 2010) para determinar si eran necesarias pruebas estadísticas paramétricas o no paramétricas. Cuando los datos cumplieron con los supuestos de estas pruebas, se realizó un análisis de varianza de una vía (ANDEVA). Por el contrario, cuando los datos no cumplieron con estos supuestos, se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Cuando se encontraron diferencias significativas, se realizó una prueba de comparaciones múltiples de Student-Newman-Keuls (SNK) para datos tanto paramétricos como no paramétricos. Los datos analizados con pruebas no paramétricas están marcados en las tablas con un asterisco (*). Todos los análisis estadísticos se realizaron en SigmaStat v.3.5 con un nivel de significancia del 5%.

Table 3). The chlorophyll *b* content of TE-S-1 was 3.64 pg Chl*b*·ng^{-1} DW and was not significantly different from that of NN-X-1 (2.45 pg Chl*b*·ng^{-1} DW; $P > 0.05$; Table 3). The total carotenoid content of CH-M-1 (2.98 pg TC·ng^{-1} DW) and TE-S-1 (3.72 pg TC·ng^{-1} DW) reflected the highest concentrations of total carotenoids and were not significantly different ($P < 0.05$; Table 3).

Proteins, lipids, and carbohydrate content in juvenile *Artemia franciscana*

After 6 h, all juveniles fed with different microalgae species exhibited higher concentrations and percentages of proteins, lipids, and carbohydrates compared to those of the initial and control values (Table 4). Organisms fed with TE-S-1 showed the highest content of proteins (41.12 µg·org^{-1}), lipids (11.90 µg·org^{-1}), and carbohydrates (8.70 µg·org^{-1}), which were significantly higher ($P < 0.05$) than those of the other treatments. On the other hand, the TH-W-1 and TE-S-1 treatments showed higher percentages of proteins (53.36% and 54.11%) and carbohydrates (11.32% and 11.45%), while TE-S-1 exhibited a higher percentage of lipids (15.66%; $P < 0.05$).

Chlorophyll *a* and *b* and total carotenoids in juvenile *Artemia franciscana*

After 6 h of feeding, all organisms had higher pigment concentrations than the control (Table 5), but juveniles fed with TH-W-1 showed higher concentrations of chlorophyll *a* (0.482 ng Chl*a*·µg^{-1} DW) and total carotenoids (0.345 ng TC·µg^{-1} DW; $P < 0.05$). Those fed with TE-S-1 exhibited the highest value of chlorophyll *b* (0.131 ng Chl*b*·µg^{-1} DW).

RESULTADOS

Análisis proximal de microalgas

El análisis proximal basado en peso seco (PS) reveló que el contenido de proteína de TE-S-1 (426.28 mg·g^{-1}) fue mayor que el de TH-W-1 y CH-M-1 ($P < 0.05$; Tabla 2). El contenido de carbohidratos de TE-S-1 (231.70 mg·g^{-1}) fue mayor que el de CH-M-1 y NN-X-1 ($P < 0.05$; Tabla 2). Por otro lado, TE-S-1 mostró el mayor contenido de lípidos (154.43 mg·g^{-1}), que solo fue significativamente mayor que el de NN-X-1 ($P < 0.05$; Tabla 2).

Clorofila *a*, clorofila *b* y carotenoides totales en microalgas

El contenido de clorofila *a* de TE-S-1 fue de 12.59 pg Cl*a*·ng^{-1} PS, el valor más alto para todas las microalgas ($P < 0.05$; Tabla 3). El contenido de clorofila *b* de TE-S-1 fue de 3.64 pg Cl*b*·ng^{-1} PS y no fue significativamente diferente del de NN-X-1 (2.45 pg Cl*b*·ng^{-1} PS; $P > 0.05$; Tabla 3). El contenido total de carotenoides de CH-M-1 (2.98 pg CT·ng^{-1} PS) y TE-S-1 (3.72 pg CT·ng^{-1} PS) reflejaron las concentraciones más altas de carotenoides totales y no fueron significativamente diferentes ($P < 0.05$; Tabla 3).

Contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos en juveniles de *Artemia franciscana*

Después de 6 h, todos los juveniles alimentados con diferentes especies de microalgas exhibieron concentraciones y porcentajes más altos de proteínas, lípidos y carbohidratos en comparación con los valores iniciales y el control (Tabla 4). Los organismos alimentados con TE-S-1 mostraron el mayor contenido de proteínas (41.12 µg·org^{-1}), lípidos

Table 2. Proteins, carbohydrates, and lipids in mg·g^{-1} of dry weight of the microalgae *Thalassiosira weissflogii* (TH-W-1), *Chaetoceros muelleri* (CH-M-1), *Tetraselmis suecica* (TE-S-1), and *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1) during their exponential phase. Results are mean values ± standard error ($n = 4$).
Tabla 2. Proteínas, carbohidratos y lípidos en mg·g^{-1} de peso seco de las microalgas *Thalassiosira weissflogii* (TH-W-1), *Chaetoceros muelleri* (CH-M-1), *Tetraselmis suecica* (TE-S-1) y *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1) durante su fase exponencial. Los resultados son valores promedio ± error estándar ($n = 4$).

Determination	Concentrations in mg·g^{-1}			
	TH-W-1	CH-M-1	TE-S-1	NN-X-1
Proteins	244.70 ± 22.17^{a}	286.05 ± 19.19^{ab}	426.28 ± 57.26^{c}	389.75 ± 24.13^{bc}
Carbohydrates	185.57 ± 10.89^{b}	77.42 ± 7.37^{a}	231.70 ± 30.00^{b}	116.50 ± 8.32^{a}
Lipids	117.99 ± 2.89^{ab}	123.96 ± 5.67^{ab}	154.43 ± 19.64^{b}	105.89 ± 6.25^{a}

Equal letters indicate that there are no significant differences between species ($P > 0.05$).

Table 3. Chlorophyll *a* (Chl*a*), chlorophyll *b* (Chl*b*), and total carotenoids (TC) shown as pg·ng^{-1} of dry weight (DW) of the microalgae *Thalassiosira weissflogii* (TH-W-1), *Chaetoceros muelleri* (CH-M-1), *Tetraselmis suecica* (TE-S-1), and *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1) cultured during their exponential phase. Results are mean values ± standard error (n = 4).
Tabla 3. Clorofila *a* (Chl*a*), clorofila *b* (Chl*b*) y carotenoides totales (TC) presentados como pg·ng^{-1} de peso seco (DW) de las microalgas *Thalassiosira weissflogii* (TH-W-1), *Chaetoceros muelleri* (CH-M-1), *Tetraselmis suecica* (TE-S-1) y *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1) cultivadas durante su fase exponencial. Los resultados son valores promedio ± error estándar (n = 4).

Unit	TH-W-1	CH-M-1	TE-S-1	NN-X-1
		Chlorophyll *a*		
pg Chl*a*·ng^{-1} DW	8.93 ± 0.41^{a}	7.50 ± 0.54^{a}	12.59 ± 1.42^{b}	7.60 ± 0.72^{a}
		Chlorophyll *b*		
*pg Chl*b*·ng^{-1} DW	1.02 ± 0.08^{b}	0.76 ± 0.05^{a}	3.64 ± 0.46^{c}	2.45 ± 0.26^{c}
		Total carotenoids		
pg TC·ng^{-1} DW	1.96 ± 0.12^{a}	2.98 ± 0.18^{b}	3.72 ± 0.40^{b}	1.61 ± 0.14^{a}

Equal letters indicate that there are no significant differences between the species per unit of measure (P > 0.05).
* Non-parametric test.

DISCUSSION

Microalgae proximal composition, concentration of chlorophyll *a* and *b*, and total carotenoid content

As expected, diatoms present lower concentrations of organic matter than green microalgae because they possess frustules with higher percentages of inorganic matter. However, no trend has been observed in which proteins, carbohydrates, and lipids exhibited lower values in diatoms than in other species, as observed by Renaud et al. (1999). In this study, only the protein content was higher in green microalgae than in diatoms. The protein content of TH-W-1 (244.70 mg·g^{-1}) was similar to the value of 289 mg·g^{-1} reported by García et al. (2012). Regarding the protein content of CH-M-1, our value was lower than that reported by Carbajal-López (2008) for *Chaetoceros calcitrans*, while our values for TE-S-1 and NN-X-1 were higher than those reported by the same author (274.57 mg·g^{-1} for TE-S-1 and 169.34 mg·g^{-1} for *Nannochloropsis oculata*). These differences could be due to the different microalgae species, media (e.g., Carbajal-López [2008] used f/2 medium), or methodologies employed between studies.
Similarly, these reasons may also explain the differences observed in carbohydrate and lipid content. The carbohydrate content obtained in this study for TH-W-1 (185.57 mg·g^{-1}) was similar to the value of 207.00 mg·g^{-1} reported by García et al. (2012) for the same species. On the other hand, Carbajal-López (2008) reported carbohydrate content of 42.55 mg·g^{-1} for *C. calcitrans*, 22.25 mg·g^{-1} for (11.90 µg·org^{-1}) y carbohidratos (8.70 µg·org^{-1}), los cuales fueron significativamente mayores (P < 0.05) que los de los otros tratamientos. Por otro lado, los tratamientos TH-W-1 y TE-S-1 mostraron mayores porcentajes de proteínas (53.36% y 54.11%) y carbohidratos (11.32% y 11.45%), mientras que TE-S-1 exhibió un mayor porcentaje de lípidos (15.66%; P < 0.05).

Clorofila *a* y *b* y carotenoides totales en juveniles de *Artemia franciscana*

Después de 6 h de alimentación, todos los organismos tuvieron concentraciones de pigmentos más altas que el control (Tabla 5), pero los juveniles alimentados con TH-W-1 mostraron concentraciones más altas de clorofila *a* (0.482 ng Cl*a*·µg^{-1} PS) y carotenoides totales (0.345 ng CT·µg^{-1} PS; P < 0.05). Los alimentados con TE-S-1 exhibieron el valor más alto de clorofila *b* (0.131 ng Cl*b*·µg^{-1} PS).

DISCUSIÓN

Composición proximal de microalgas, concentración de clorofila *a* y *b* y contenido total de carotenoides

Como es de esperar, las diatomeas presentan menores concentraciones de materia orgánica que las microalgas verdes debido a que poseen frústulas con mayores porcentajes de materia inorgánica. Sin embargo, no se ha observado una tendencia en la que las proteínas, carbohidratos y lípidos exhiban valores más bajos en las diatomeas que en otras especies, como observaron Renaud et al. (1999). En

Table 4. Proteins, lipids, and carbohydrates (µg·org^{-1} and percentages) based on the dry weight of *Artemia franciscana* juveniles at the beginning (0 h) and after (6 h) feeding them with *Thalassiosira weissflogii* (TH-W-1), *Chaetoceros muelleri* (CH-M-1), *Tetraselmis suecica* (TE-S-1), and *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1). Results are mean values ± standard error (n = 4).
Tabla 4. Proteínas, lípidos y carbohidratos (µg·org^{-1} y porcentajes) con base al peso seco de los juveniles de *Artemia franciscana* al inicio (0 h) y después (6 h) de alimentarlos con *Thalassiosira weissflogii* (TH-W-1), *Chaetoceros muelleri* (CH-M-1), *Tetraselmis suecica* (TE-S-1) y *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1). Los resultados son valores promedio ± error estándar (n = 4).

Determination	Initial	Control	TH-W-1	CH-M-1	TE-S-1	NN-X-1
			Concentrations in µg·org^{-1}			
Proteins	30.01 ± 0.22	27.89 ± 0.19^{a}	37.89 ± 0.25^{c}	39.79 ± 0.34^{d}	41.12 ± 0.31^{e}	34.33 ± 0.25^{b}
*Lipids	5.55 ± 0.04	5.11 ± 0.03^{a}	9.76 ± 0.06^{c}	11.15 ± 0.14^{d}	11.90 ± 0.07^{e}	7.58 ± 0.06^{b}
Carbohydrates	5.40 ± 0.02	4.92 ± 0.02^{a}	8.04 ± 0.05^{d}	7.46 ± 0.03^{c}	8.70 ± 0.03^{e}	6.68 ± 0.05^{b}
			Percentages			
Proteins	44.54 ± 0.25	43.56 ± 0.17^{a}	53.36 ± 0.68^{d}	47.02 ± 0.52^{b}	54.11 ± 0.73^{d}	49.30 ± 0.47^{c}
*Lipids	8.24 ± 0.04	7.98 ± 0.04^{a}	13.74 ± 0.24^{c}	13.18 ± 0.23^{c}	15.66 ± 0.19^{d}	10.88 ± 0.11^{b}
Carbohydrates	8.01 ± 0.02	7.68 ± 0.03^{a}	11.32 ± 0.17^{d}	8.81 ± 0.06^{b}	11.45 ± 0.15^{d}	9.59 ± 0.09^{c}

Different letters indicate significant differences between treatments (P < 0.05). *Non-parametric test.

Table 5. Chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, and total carotenoids in ng·µg^{-1} dry weight (DW) of the juveniles of *Artemia franciscana* at the beginning (0 h) and after (6 h) feeding them with the microalgae *Thalassiosira weissflogii* (TH-W-1), *Chaetoceros muelleri* (CH-M-1), *Tetraselmis suecica* (TE-S-1), and *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1). Results are mean values ± standard error (n = 4).
Tabla 5. Clorofila *a*, clorofila *b* y carotenoides totales en ng·µg^{-1} peso seco (DW) de los juveniles de *Artemia franciscana* al inicio (0 h) y después (6 h) de alimentarlos con las microalgas *Thalassiosira weissflogii* (TH-W-1), *Chaetoceros muelleri* (CH-M-1), *Tetraselmis suecica* (TE-S-1) y *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1). Los resultados son valores promedio ± error estándar (n = 4).

Determination	Initial	Control	TH-W-1	CH-M-1	TE-S-1	NN-X-1
			Concentrations in ng·µg^{-1} DW			
*Chlorophyll *a*	0.010 ± 0.000	0.010 ± 0.001^{a}	0.482 ± 0.009^{e}	0.437 ± 0.002^{d}	0.248 ± 0.006^{c}	0.193 ± 0.002^{b}
Chlorophyll *b*	0.005 ± 0.000	0.004 ± 0.000^{a}	0.102 ± 0.004^{c}	0.081 ± 0.002^{b}	0.131 ± 0.004^{e}	0.121 ± 0.003^{d}
*Total carotenoids	0.050 ± 0.001	0.043 ± 0.001^{a}	0.345 ± 0.002^{d}	0.328 ± 0.001^{c}	0.229 ± 0.006^{b}	0.228 ± 0.004^{b}

Different letters indicate significant differences between treatments (P < 0.05). * Non-parametric test.

TE-S-1, and 18.96 mg·g^{-1} for *N. oculata*, which are lower than those reported in this study. The lipid content of TH-W-1 (117.99 mg·g^{-1}) in our study was lower than that reported by García et al. (2012), which may also be due to the differences in culture conditions between studies (e.g., different media, temperatures, and salinities). However, the lipid concentrations of CH-M-1 and TE-S-1 in this study were higher than those of Carbajal-López (2008) for *C. calcitrans* (103.27 mg·g^{-1}) and TE-S-1 (86.63 mg·g^{-1}). Lastly, the lipid content of NN-X-1 in this study was similar to that reported by Carbajal-López (2008) for *N. oculata*.

este estudio, sólo el contenido de proteínas fue mayor en las microalgas verdes que en las diatomeas.
El contenido de proteína de TH-W-1 (244.70 mg·g^{-1}) fue similar al valor de 289 mg·g^{-1} reportado por García et al. (2012). En cuanto al contenido de proteína de CH-M-1, nuestro valor fue inferior al reportado por Carbajal-López (2008) para *Chaetoceros calcitrans*, mientras que nuestros valores para TE-S-1 y NN-X-1 fueron superiores a los reportados por el mismo autor (274.57 mg·g^{-1} para TE-S-1 y 169.34 mg·g^{-1} para *Nannochloropsis oculata*). Estas diferencias podrían deberse a las diferentes especies de microalgas,

In this study, chlorophyll *a* was the most abundant compound in all species of microalgae, while chlorophyll *b* was the second most abundant compound in green microalgae. These results agree with those of Jeffrey and Wright (2005). Although it was not evaluated in this study, chlorophyll *c*, in addition to the 2 chlorophyll types mentioned above, is found in many groups of marine algae, including diatoms, brown algae, and dinoflagellates (Zapata et al. 2006). In this study, the concentration of chlorophyll *a* in TH-W-1 (8.93 pg Chl*a*·ng^{-1} DW) was higher than those reported by Saxena et al. (2022), who recorded concentrations ranging from 2.79 to 6.01 pg Chl*a*·ng^{-1} DW for this species. Similarly, Saxena et al. (2022) reported chlorophyll *a* values that ranged from 2.60 to 4.16 pg Chl*a*·ng^{-1} DW for *Chaetoceros gracilis*. These concentrations were lower than those recorded in this study (7.50 pg Chl*a*·ng^{-1} DW for CH-M-1). The concentration of total carotenoids for TH-W-1 (1.96 pg TC·ng^{-1} DW) in this study was sim- ilar to that reported by Bhattacharjya et al. (2020) for *Thalassiosira* sp. (1.50 pg TC·ng^{-1} DW). The concentration of total carotenoids for CH-M-1 (2.98 pg TC·ng^{-1} DW) in this study was higher than that found by Goiris et al. (2012), who reported a value of 2.33 pg TC·ng^{-1} DW for samples of lyophilized biomass of *C. calcitrans*.

Few studies have reported chlorophyll *b* content in diatoms. However, Ju et al. (2009), who worked with *Thalassiosira weissflogii*, and Wang et al. (2019), who analyzed *Phaeodactylum tricornutu*, reported concentrations lower than those obtained in this study. In the case of Ju et al. (2009), these differences may be due to the different procedures used to obtain and analyze the samples. With regard to Wang et al. (2019), these differences may be due to the different species, culture media, and temperatures employed, as well as the different light/dark cycles or exposure to 5 p-chloroaniline concentrations.

The chlorophyll *a* content of TE-S-1 (12.59 pg Chl*a*·ng^{-1} DW) was similar to the concentrations obtained by Abiusi et al. (2013), who cultivated the same species for 9 days using LEDs of different colors and reported values of 7.00 to 16.00 pg Chl*a*·ng^{-1} DW. Nevertheless, the con- tent of chlorophyll *b* (3.64 pg Chl*b*·ng^{-1} DW) and total carotenoids (3.72 pg TC·ng^{-1} DW) obtained in the present study were lower than those recorded by the authors mentioned above, who reported values ranging from 6.00 to 13.00 pg·ng^{-1} DW for chlorophyll *b* and 6.00 pg·ng^{-1} DW for total carotenoids.

Regarding the pigment concentrations, the chlorophyll *a* content (7.60 pg Chl*a*·ng^{-1} DW) for NN-X-1 obtained in this study was higher than that reported by Ra et al. (2018), who reported values of 4.00 to 6.00 pg Chl*a*·ng^{-1} DW for *Nannochloropsis oceanica*, although the value in this study was similar to that obtained for *N. salina* (6.00 to 10.00 pg Chl*a*·ng^{-1} DW). Ra et al. (2018) evaluated the effects of mixed wavelengths of white and green light from LEDs on microalgae. However, the concentration of chlorophyll *b*

medios (e.g., Carbajal-López [2008] usó medio f/2) o metodologías empleadas entre los estudios.

De manera similar, estas razones también pueden explicar las diferencias observadas en el contenido de carbohidratos y lípidos. El contenido de carbohidratos obtenido en este estudio para TH-W-1 (185.57 mg·g^{-1}) fue similar al valor de 207.00 mg·g^{-1} reportado por García et al. (2012) para la misma especie. Por otro lado, Carbajal-López (2008) reportó un contenido de carbohidratos de 42.55 mg·g^{-1} para *C. calcitrans*, 22.25 mg·g^{-1} para TE-S-1 y 18.96 mg·g^{-1} para *N. oculata*, que son inferiores a los reportados en este estudio. El contenido lipídico de TH-W-1 (117.99 mg·g^{-1}) en nuestro estudio fue inferior al reportado por García et al. (2012), lo que también puede deberse a las diferencias en las condiciones de cultivo entre los estudios (e.g., diferentes medios, temperaturas y salinidades). Sin embargo, las concentraciones de lípidos de CH-M-1 y TE-S-1 en este estudio fueron superiores a las de Carbajal-López (2008) para *C. calcitrans* (103.27 mg·g^{-1}) y TE-S-1 (86.63 mg·g^{-1}). Por último, el contenido de lípidos de NN-X-1 en este estudio fue similar al reportado por Carbajal-López (2008) para *N. oculata*.

En este estudio, la clorofila *a* fue el compuesto más abundante en todas las especies de microalgas, mientras que la clorofila *b* fue el segundo compuesto más abundante en las microalgas verdes. Estos resultados concuerdan con los de Jeffrey y Wright (2005). Aunque no fue evaluada en este estudio, la clorofila *c*, además de los 2 tipos de clorofila mencionados anteriormente, se encuentra en muchos grupos de algas marinas, incluidas las diatomeas, las algas pardas y los dinoflagelados (Zapata et al. 2006). En este estudio, la concentración de clorofila *a* en TH-W-1 (8.93 pg Cl*a*·ng^{-1} PS) fue superior a las reportadas por Saxena et al. (2022), quienes registraron concentraciones que oscilaron entre 2.79 y 6.01 pg Cl*a*·ng^{-1} PS para esta especie. De manera similar, Saxena et al. (2022) reportaron valores de clorofila *a* que oscilaron entre 2.60 y 4.16 pg Cl*a*·ng^{-1} PS para *Chaetoceros gracilis*. Estas concentraciones fueron inferiores a las registradas en este estudio (7.50 pg Cl*a*·ng^{-1} PS para CH-M-1). La concentración de carotenoides totales para TH-W-1 (1.96 pg CT·ng^{-1} PS) en este estudio fue similar a la reportada por Bhattacharjya et al. (2020) para *Thalassiosira* sp. (1.50 pg CT·ng^{-1}). La concentración de carotenoides totales para CH-M-1 (2.98 pg CT·ng^{-1} PS) en este estudio fue superior a la encontrada por Goiris et al. (2012), quienes reportaron un valor de 2.33 pg CT·ng^{-1} PS para muestras de biomasa liofilizada de *C. calcitrans*.

Pocos estudios han informado del contenido de clorofila *b* en las diatomeas. Sin embargo, Ju et al. (2009), quienes trabajaron con *Thalassiosira weissflogii*, y Wang et al. (2019), quienes analizaron *Phaeodactylum tricornutu*, reportaron concentraciones inferiores a las obtenidas en este estudio. En el caso de Ju et al. (2009), estas diferencias pueden deberse a diferentes procedimientos utilizados para obtener y analizar las muestras. Respecto a Wang et al. (2019), estas diferencias pueden deberse a las diferentes especies, medios de cultivo

(2.45 pg Chl*b*·ng^{-1} DW) in this study was higher than that obtained by those authors, who reported chlorophyll *b* concentrations lower than 2.00 Chl*b*·ng^{-1} DW in both species. Moreover, the concentration of total carotenoids (1.61 pg TC·ng^{-1} DW) in this study was similar to that reported by Goiris et al. (2012), who reported a total carotenoid concentration of 1.65 pg TC·ng^{-1} DW in *N. oculata*.

Temperature and light intensity are key factors affecting the productivity of microalgae (Hindersin et al. 2014). In addition, nitrogen and phosphorus supplementation influences the synthesis of biochemical components of cultured algae (Rasdi and Qin 2015). For example, nitrogen and phosphorus limitation in algal culture media promotes lipid accumulation (Franz et al. 2013), whereas excess temperature or light induces carotenoid synthesis (Panis and Carreon 2016). Diatoms in the exponential and stationary phases of harvest contain more fatty acids than green microalgae or blue-green microalgae (Wongrat 1995). In the case of carotenoids, some microalgae strains accumulate the highest cellular concentrations of carotenoids in the mid-late exponential phase of growth (Gómez-Loredo et al. 2016).

Proximal composition, chlorophylls, and total carotenoid content in juvenile *Artemia franciscana*

Juvenile *A. franciscana* fed with the isolipidic diets of TH-W-1, CH-M-1, TE-S-1, and NN-X-1 presented higher protein, carbohydrate, and lipid concentrations and percentages than those in the control. However, juveniles fed with TE-S-1 exhibited higher concentrations and percentages of proteins, carbohydrates, and lipids than those fed with the other microalgal species, which agrees with the proximal composition of TE-S-1. In contrast, juvenile *A. franciscana* fed with NN-X-1 presented the lowest concentrations of proteins, carbohydrates, and lipids per organism when compared to the juveniles fed with the other microalgae, which may be because *Artemia* nauplii cannot digest *Nannochloropsis* species because of their rigid cell walls (Gerken et al. 2013). The protein percentage of the juveniles fed the TE-S-1 diet (54.11%) in this study was similar to that found by Maldonado-Montiel and Rodríguez-Canché (2005), who reported a percentage of 53.1% for adult *Artemia* sp. fed with the same microalgae. In another study, Shanmugam and Rajendran (2018) obtained 55.55% protein in adult *A. franciscana* fed *Chaetoceros* sp., which is higher than that found in this study with the microalgae *Chaetoceros muelleri* (47.02%). The lipid percentage reported by Shanmugam and Rajendran (2018) of 19.38% for adult *A. franciscana* fed *Chaetoceros* sp. was higher than that found in this study for juvenile *Artemia* fed with *Chaetoceros muelleri* (13.18%). However, these authors reported a lipid percentage (16.06%) in organisms fed with *Tetraselmis* sp., which was similar to that obtained in this study in juveniles fed *Tetraselmis suecica* (15.66%). Sánchez-Saavedra and Paniagua-Chávez (2017)

y temperaturas empleadas, así como a los diferentes ciclos de luz/oscuridad o a la exposición a 5 concentraciones de p-cloroanilina.

El contenido de clorofila *a* de TE-S-1 (12.59 pg Cl*a*·ng^{-1} PS) fue similar a las concentraciones obtenidas por Abiusi et al. (2013), quienes cultivaron la misma especie durante 9 días utilizando LED de diferentes colores y reportaron valores de 7.00 a 16.00 pg Cl*a*·ng^{-1} PS. Sin embargo, el contenido de clorofila *b* (3.64 pg Cl*b*·ng^{-1} PS) y carotenoides totales (3.72 pg CT·ng^{-1} PS) obtenidos en el presente estudio fueron inferiores a los registrados por los autores mencionados anteriormente, quienes reportaron valores que oscilaron entre 6.00 y 13.00 pg·ng^{-1} PS para clorofila *b* y 6.00 pg·ng^{-1} PS para carotenoides totales.

En cuanto a las concentraciones de pigmentos, el contenido de clorofila *a* (7.60 pg Cl*a*·ng^{-1} PS) para NN-X-1 obtenido en este estudio fue superior al reportado por Ra et al. (2018), quienes reportaron valores de 4.00 a 6.00 pg Cl*a*·ng^{-1} PS para *Nannochloropsis oceanica*, aunque el valor en este estudio fue similar al obtenido para *N. salina* (6.00 a 10.00 pg Cl*a*·ng^{-1} PS). Ra et al. (2018) evaluaron los efectos de longi- tudes de onda mixtas de luz LED blanca y verde en micro- algas. Sin embargo, la concentración de clorofila *b* (2.45 pg Cl*b*·ng^{-1} PS) en este estudio fue superior a la obtenida por esos autores, quienes reportaron concentraciones de clorofila *b* inferiores a 2.00 Cl*b*·ng^{-1} PS en ambas especies. Además, la concentración de carotenoides totales (1.61 pg CT·ng^{-1} PS) en este estudio fue similar a la reportada por Goiris et al. (2012), quienes reportaron una concentración total de carotenoides de 1.65 pg CT·ng^{-1} PS en *N. oculata*.

La temperatura y la intensidad de la luz son factores clave que afectan la productividad de las microalgas (Hindersin et al. 2014). Además, la suplementación con nitrógeno y fósforo influye en la síntesis de componentes bioquímicos de las algas cultivadas (Rasdi y Qin 2015). Por ejemplo, la limitación de nitrógeno y fósforo en los medios de cultivo de algas promueve la acumulación de lípidos (Franz et al. 2013), mientras que el exceso de temperatura o luz induce la síntesis de carotenoides (Panis y Carreon 2016). Las diatomeas en las fases exponencial y estacionaria de cosecha contienen más ácidos grasos que las microalgas verdes o las microalgas verde azules (Wongrat 1995). En el caso de los carotenoides, algunas cepas de microalgas acumulan las mayores concentraciones celulares de carotenoides en la fase exponencial media-tardía de crecimiento (Gómez-Loredo et al. 2016).

Composición proximal, clorofilas y contenido total de carotenoides en juveniles de *Artemia franciscana*

Los juveniles de *A. franciscana* alimentados con las dietas isolipídicas de TH-W-1, CH-M-1, TE-S-1 y NN-X-1 presentaron concentraciones y porcentajes de proteínas, carbohidratos y lípidos mayores que los del control. Sin embargo, los juveniles alimentados con TE-S-1 exhibieron concentraciones y porcentajes más altos de proteínas, carbohidratos

reported a carbohydrate percentage of 18.83% for adult *A. franciscana* fed with *Chaetoceros muelleri*, which is higher than that obtained in this study for juveniles fed with the same species (8.81%). Nevertheless, Shanmugam and Rajendran (2018) reported a carbohydrate percentage of 15.11% (based on dry weight) for organisms fed *Tetraselmis* sp., which is similar to the value reported in this study (11.45%) in juvenile *A. franciscana* fed *Tetraselmis suecica*.

The total carotenoid content in *A. franciscana juveniles* in this study was higher than those reported by Cheban et al. (2020), who obtained values of 0.06 to 0.18 ng TC·μg^{-1} DW in *Artemia salina* nauplii enriched with the microalgae *Desmodesmus armatus*, *Chlorella vulgaris*, and *Dunaliella viridis* for 24 h. In contrast, the concentrations in this study were lower than those obtained by Abdollahi et al. (2019), who reported a value of 0.88 ng TC·μg^{-1} DW for adult *A. franciscana* enriched for 4 h with β-carotene from *Dunaliella salina*. No references were found reporting the chlorophyll concentration in crustaceans or possible functions. However, antioxidant activity that prevents oxidative DNA damage and lipid peroxidation is a beneficial effect of chlorophyll (Pangestuti and Kim 2011).

High-quality meals, such as *Artemia* enriched with microalgae, are crucial for the success of fish larvae cultures, as these diets provide the nutritional elements needed to support the lifespans, ideal growth, and immune systems of fish (Madkour et al. 2022). In this sense, *Artemia* juveniles enriched with carotenoids from microalgae, such as those evaluated in the present study, can also serve as food for ornamental fish, such as *Xiphophorus maculatus*, given that supplementing their diets with carotenoids improves coloration and mucosal immune responses (Abdollahi et al. 2019). In addition, Pérez-Rodríguez et al. (2018) studied the effects of feeding *M. americanum* larvae a diet of *Artemia* enriched with *C. calcitrans* microalgae, reporting that the overall growth, growth rate, and survival improved.

In conclusion, positive effects were observed in the proximal composition, concentration of chlorophyll *a* and *b*, and total carotenoid content of juvenile *A. franciscana* fed different microalgae species after 6 h. Organisms fed with *Tetraselmis suecica* exhibited the best results in terms of proximal composition and chlorophyll *b* content, while those fed diets of *Thalassiosira weissflogii* and *Chaetoceros muelleri* presented the best results in terms of total carotenoid and chlorophyll *a* content.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank CONACYT for a scholarship (#424079) and the project PRO_A7_041 of the Program for the Promotion and Support of Research Projects (PROFAPI) 2022.

All coauthors agree with its publication and made significant contributions; there is no conflict of interest.

Copyediting by MacTavish Scientific Editing.

y lípidos que aquellos alimentados con otras especies de microalgas, lo que concuerda con la composición proximal de TE-S-1. En contraste, los juveniles de *A. franciscana* alimentados con NN-X-1 presentaron las concentraciones más bajas de proteínas, carbohidratos y lípidos por organismo en comparación con los juveniles alimentados con las otras microalgas, lo que puede deberse a que los nauplios de *Artemia* no pueden digerir las especies de *Nannochloropsis* debido a sus rígidas paredes celulares (Gerken et al. 2013).

El porcentaje de proteína de los juveniles alimentados con la dieta TE-S-1 (54.11%) en este estudio fue similar al encontrado por Maldonado-Montiel y Rodríguez-Canché (2005), quienes reportaron un porcentaje de 53.1% para los adultos de *Artemia* sp. alimentados con la misma microalga. En otro estudio, Shanmugam y Rajendran (2018) obtuvieron un 55.55% de proteína en adultos de *A. franciscana* alimentados con *Chaetoceros* sp., valor superior al encontrado en este estudio con la microalga *Chaetoceros muelleri* (47.02%). El porcentaje de lípidos reportado por Shanmugam y Rajendran (2018) del 19.38% para adultos de *A. franciscana* alimentados con *Chaetoceros* sp. fue superior al encontrado en este estudio para juveniles de *Artemia* alimentados con *Chaetoceros muelleri* (13.18%). Sin embargo, estos autores reportaron un porcentaje de lípidos (16.06%) en organismos alimentados con *Tetraselmis* sp., similar al obtenido en este estudio en juveniles alimentados con *Tetraselmis suecica* (15.66%). Sánchez-Saavedra y Paniagua-Chávez (2017) reportaron un porcentaje de carbohidratos del 18.83% para adultos de *A. franciscana* alimentados con *Chaetoceros muelleri*, el cual es superior al obtenido en este estudio para juveniles alimentados con la misma especie (8.81%). Sin embargo, Shanmugam y Rajendran (2018) reportaron un porcentaje de carbohidratos del 15.11% (basado en peso seco) para organismos alimentados con *Tetraselmis* sp., que es similar al valor reportado en este estudio (11.45%) en juveniles de *A. franciscana* alimentados con *Tetraselmis suecica*. El contenido total de carotenoides en juveniles de *A. franciscana* de este estudio fue mayor que los reportados por Cheban et al. (2020), quienes obtuvieron valores de 0.06 a 0.18 ng CT·μg^{-1} PS en nauplios de *Artemia salina* enriquecidos con las microalgas *Desmodesmus armatus*, *Chlorella vulgaris* y *Dunaliella viridis* durante 24 h. Por el contrario, las concentraciones en este estudio fueron inferiores a las obtenidas por Abdollahi et al. (2019), quienes reportaron un valor de 0.88 ng CT·μg^{-1} PS para adultos de *A. franciscana* enriquecidos durante 4 h con β-caroteno de *Dunaliella salina*. No se encontraron referencias que reporten la concentración de clorofila en crustáceos ni sus posibles funciones. Sin embargo, la actividad antioxidante que previene el daño oxidativo del ADN y la peroxidación lipídica es un efecto beneficioso de la clorofila (Pangestuti y Kim 2011).

Los alimentos de alta calidad, como *Artemia* enriquecida con microalgas, son cruciales para el éxito de los cultivos de larvas de peces, ya que estas dietas proporcionan los elementos nutricionales necesarios para respaldar

la esperanza de vida, el crecimiento ideal y el sistema inmunológico de los peces (Madkour et al. 2022). En este sentido, los juveniles de *Artemia* enriquecidos con carotenoides provenientes de microalgas, como los evaluados en el presente estudio, también pueden servir como alimento para peces ornamentales, como *Xiphophorus maculatus*, dado que suplementar su dieta con carotenoides mejora la coloración y la respuesta inmune de las mucosas (Abdollahi et al. 2019). Además, Pérez-Rodríguez et al. (2018) estudiaron los efectos de alimentar a larvas de *M. americanum* con una dieta de *Artemia* enriquecida con la microalga *C. calcitrans*, reportando que el crecimiento general, la tasa de crecimiento y la supervivencia mejoraron.

En conclusión, se observaron efectos positivos en la composición proximal, la concentración de clorofila *a* y *b* y el contenido total de carotenoides de juveniles de *A. franciscana* alimentados con diferentes especies de microalgas después de 6 h. Los organismos alimentados con *Tetraselmis suecica* exhibieron los mejores resultados en términos de composición proximal y contenido de clorofila *b*, mientras que aquellos alimentados con dietas de *Thalassiosira weissflogii* y *Chaetoceros muelleri* presentaron los mejores resultados en términos de contenido total de carotenoides y clorofila *a*.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al CONACYT por la beca (#424079) y el proyecto PRO_A7_041 del Programa de Promoción y Apoyo a Proyectos de Investigación (PROFAPI) 2022.

Todos los coautores están de acuerdo con su publicación y realizaron aportes significativos; no hay conflicto de interés.

Traducido al español por MacTavish Scientific Editing.

REFERENCES

Abdollahi Y, Ahmadifard N, Agh N, Rahmanifarah K, Amin- Hejazi M. 2019. β-Carotene-enriched *Artemia* as a natural carotenoid improved skin pigmentation and enhanced the mucus immune responses of platyfish *Xiphophorus maculatus*. Aquac Int. 27(6):1847-1858. https://doi.org/10.1007/s10499-019-00437-8

Abiusi F, Sampietro G, Marturano G, Biondi N, Rodolfi L, D'Ottavio M, Tredici MR. 2013. Growth, photosynthetic efficiency, and biochemical composition of *Tetraselmis suecica* F&M-M33 grown with LEDs of different colors. Biotechnol Bioeng. 111(5):956-964. https://doi.org/10.1002/bit.25014

Ahmed F, Fanning K, Netzel M, Turner W, Li Y, Schenk PM. 2014. Profiling of carotenoids and antioxidant capacity of microalgae from subtropical coastal and brackish waters. Food Chem. 165:300-306. http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.107

Aranda-Burgos JA, da Costa F, Nóvoa S, Ojea J, Martínez-Patiño D. 2014. Effects of microalgal diet on growth, survival, biochemical and fatty acid composition of *Ruditapes decussatus* larvae. Aquaculture. 420–421:38-48. http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.10.032

Azimirad M, Meshkini S, Ahmadifard N, Hoseinifar SH. 2016. The effects of feeding with synbiotic (*Pediococcus acidilactici* and fructooligosaccharide) enriched adult *Artemia* on skin mucus immune responses, stress resistance, intestinal microbiota and performance of angelfish (*Pterophyllum scalare*). Fish Shellfish Immunol. 54:516-522. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.05.001

Bhattacharjya R, Marella TK, Tiwari A, Saxena A, Singh PK, Mishra B. 2020. Bioprospecting of marine diatoms *Thalassiosira*, *Skeletonema* and *Chaetoceros* for lipids and other value-added products. Bioresour Technol. 318:124073. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124073

Bhuvaneshwari M, Thiagarajan V, Nemade P, Chandrasekaran N, Mukherjee A. 2018. Toxicity and trophic transfer of P25 TiO2 NPs from *Dunaliella salina* to *Artemia salina*: effect of dietary and waterborne exposure. Environ Res. 160:39-46. https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.09.022

Bligh EG, Dyer WJ. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J Biochem Physiol. 37(8):911-917. https://doi.org/10.1139/o59-099

Carbajal-López A. 2008. Producción en masa del rotífero *Brachionus plicatilis* alimentado con 4 diferentes microalgas, para su uso como alimento vivo de larvas de peces marinos. [Mass production of *Brachionus plicatilis* rotifer fed with 4 different microalgae, for use as live food for marine fish larvae] [BSc thesis]. [Guadalajara (Jalisco, Mexico)]: Universidad de Guadalajara. 48 p.

Chaisutyakorn P, Praiboon J, Kaewsuralikhit C. 2018. The effect of temperature on growth and lipid and fatty acid composition on marine microalgae used for biodiesel production. J Appl Phycol. 30:37-45. https://doi.org/10.1007/s10811-017-1186-3

Chakraborty RD, Chakraborty K, Radhakrishnan EV. 2007. Variation in fatty acid composition of *Artemia salina* nauplii enriched with microalgae and baker's yeast for use in larviculture. J Agric Food Chem. 55(10):4043-4051. https://doi.org/10.1021/jf063654l

Cheban L, Khudyi O, Prusińska M, Duda A, Khuda L, Wiszniewski G, Kushniryk O, Kapusta A. 2020. Survival, proximate composition, and proteolytic activity of *Artemia salina* bioencapsulated with different algal monocultures. Fish Aquat Life. 28(4):205-215. https://doi.org/10.2478/aopf-2020-0025

De la Vega-Naranjo M. 2014. Aislamiento, caracterización y manipulación genética de microalgas marinas para la producción de compuestos de alto valor añadido [Isolation, characterization, and genetic manipulation of marine microalgae for the production of high added value compounds] [dissertation]. [Spain]: Universidad de Huelva. 204 p.

Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. 1956. Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. Anal Chem. 28(3):350-356. https://doi.org/10.1021/ac60111a017

Fábregas J, Otero A, Domínguez A, Patiño M. 2001. Growth rate of the microalga *Tetraselmis suecica* changes the biochemical composition of *Artemia* species. Mar Biotechnol. 3(3):256-263. https://doi.org/10.1007/s101260000074

Franz AK, Danielewicz MA, Wong DM, Anderson LA, Boothe JR. 2013. Phenotypic screening with oleaginous microalgae reveals modulators of lipid productivity. ACS Chem Biol. 8:1053-1062. https://doi.org/10.1021/cb300573r

García N, López-Elías JA, Miranda A, Martínez-Porchas M, Huerta N, García A. 2012. Effect of salinity on growth and chemical composition of the diatom *Thalassiosira weissflogii* at three

culture phases. Lat Am J Aquat Res. 40(2):435-440. http://doi.org/10.3856/vol40-issue2-fulltext-18

Gerken HG, Donohoe B, Knoshaug EP. 2013. Enzymatic cell wall degradation of *Chlorella vulgaris* and other microalgae for biofuels production. Planta: 237:239-253. https://doi.org/10.1007/s00425-012-1765-0

Goiris K, Muylaert K, Fraeye I, Foubert I, de Brabanter J, de Cooman L. 2012. Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. J Appl Phycol. 24:1477- 1486. https://doi.org/10.1007/s10811-012-9804-6

Gómez-Loredo A, Benavides J, Rito-Palomares M. 2016. Growth kinetics and fucoxanthin production of *Phaeodactylum tricornutu*m and *Isochrysis galbana* cultures at different light and agitation conditions. J Appl Phycol. 28:849-860. https://doi.org/10.1007/s10811-015-0635-0

Guillard RRL, Ryther JH. 1962. Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve). Rev Microbiol. 8:229-325. https://doi.org/10.1139/m62-029

Hamed I. 2016. The evolution and versatility of microalgal biotechnology: a review. Compr Rev Food Sci Food Saf. 15(6):1104-1123. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12227

Hindersin S, Leupold M, Kerner M, Hanelt D. 2014. Key parameters for outdoor biomass production of *Scenedesmus obliquus* in solar tracked photobioreactors. J Appl Phycol. 26:2315-2325. https://doi.org/10.1007/s10811-014-0261-2

Jeffrey SW, Wright SW. 2005. Photosynthetic pigments in marine microalgae: insights from cultures and the sea. In: Subba-Rao DV (ed.), Algal Cultures, Analogues of Blooms and Applications. New Hampshire (USA): Science Publishers. p. 33-90.

Ju ZY, Forster IP, Dominy WG. 2009. Effects of supplementing two species of marine algae or their fractions to a formulated diet on growth, survival and composition of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Aquaculture. 292:237-243. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.04.040

Léger P, Bengston DA, Simpson KL, Sorgeloos P. 1986. The use and nutritional value of *Artemia* as a food source. Oceanogr Mar Biol Annu Rev. 24:521-623.

Lichtenthaler HK, Wellburn AR. 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. Biochem Soc Trans. 11(5):591-592. https://doi.org/10.1042/bst0110591

Long M, Tallec K, Soudant P, Le Grand F, Donval A, Lambert C, Sarthou G, Jolley DF, Hégaret H. 2018. Allelochemicals from *Alexandrium minutum* induce rapid inhibition of metabolism and modify the membranes from *Chaetoceros muelleri*. Algal Res. 35:508-518. https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.09.023

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RL. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem. 193(1):265-275. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6

Madkour K, Dawood MAO, Sewilam H. 2022. The use of *Artemia* for aquaculture industry: An updated overview. Ann Anim Sci. 23(1):3-10. https://doi.org/10.2478/aoas-2022-0041

Maldonado-Montiel TDNJ, Rodríguez-Canché LG. 2005. Biomass production and nutritional value of *Artemia* sp. (Anostraca: Artemiidae) in Campeche, México. Rev Biol Trop. 53(3–4):447-454. https://doi.org/10.15517/rbt.v53i3-4.14613

Marella TK, Tiwari A. 2020. Marine diatom *Thalassiosira weissflogii* based biorefinery for co-production of eicosapentaenoic acid and fucoxanthin. Bioresour Technol. 307:123245. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123245

Martínez-Córdova LR, Martínez-Porchas M, López-Elías JA, Enríquez-Ocaña LF. 2014. Uso de microorganismos en el cultivo de crustáceos = Use of microorganisms in crustacean culture. Biotecnia. 16(3):50-55. https://doi.org/10.18633/bt.v16i3.141

Méndez-Martínez Y, García-Guerrero MU, Lora-Vilchis MC, Martínez-Córdova LR, Arcos-Ortega FG, Alpuche JJ, Cortés-Jacinto E. 2018. Nutritional effect of *Artemia* nauplii enriched with *Tetraselmis suecica* and *Chaetoceros calcitrans* microalgae on growth and survival on the river prawn *Macrobrachium americanum* larvae. Aquac Int. 26:1001-1015. https://doi.org/10.1007/s10499-018-0264-0

Millán-Almaraz MI, Nieves-Soto M, López-Peraza DJ, Peraza-Yee MM. 2021. Effect of light and feed density on ingestion rate, protein and lipid content of *Artemia franciscana* juveniles. Lat Am J Aquat. 49(5):717-724. https://doi.org/10.3856/vol49-issue5-fulltext-2695

Paliwal C, Ghosh T, George B, Pancha I, Maurya R, Chokshi K, Ghosh A, Mishra S. 2016. Microalgal carotenoids: Potential nutraceutical compounds with chemotaxonomic importance. Algal Res. 15:24-31. http://doi.org/10.1016/j.algal.2016.01.017

Pande SV, Khan RP, Venkitasubramanian TA. 1963. Microdetermination of lipids and serum total fatty acid. Anal Biochem. 6(5):415-423. https://doi.org/10.1016/0003-2697(63)90094-0

Pangestuti R, Kim, SK. 2011. Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae. J Funct Foods. 3(4):255-266. https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.07.001

Panis G, Carreon JR. 2016. Commercial astaxanthin production derived by green alga *Haematococcus pluvialis*: a microalgae process model and a techno-economic assessment all through production line. Algal Res. 18:175-190. https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.06.007

Pérez-Rodríguez JC, Yamasaki-Granados S, García-Guerrero MU, Martínez-Porchas M, Méndez-Martínez Y, Latournerié- Cervera JR, Cortés-Jacinto E. 2018. Growth and survival of juvenile cauque river prawn *Macrobrachium americanum* fed with diets containing different protein levels. Lat Am J Aquat Res. 46(3):534-542. http://doi.org/10.3856/vol46-issue3-fulltext-6

Pugkaew W, Meetam M, Yokthongwattana K, Leeratsuwan N, Pokethitiyook P. 2019. Effects of salinity changes on growth, photosynthetic activity, biochemical composition, and lipid productivity of marine microalga *Tetraselmis suecica*. J Appl Phycol. 31:969-979. https://doi.org/10.1007/s10811-018-1619-7

Ra CH, Sirisuk P, Jung JH, Jeong GT, Kim SK. 2018. Effects of light-emitting diode (LED) with a mixture of wavelengths on the growth and lipid content of microalgae. Bioprocess Biosyst Eng. 41:457-465. https://doi.org/10.1007/s00449-017-1880-1

Ramírez-Mérida LG, Ragagnin de Menezes C, Queiroz Zepka L, Jacob-Lopes E. 2015. Microalgas: potencial para la producción de compuestos bioactivos nanoencapsulados [Microalgae: potential for the production of nanoencapsulated bioactive compounds]. Ciencia e Natura. 37(5):7-17. https://doi.org/10.5902/2179-460X19690

Rasdi NW, Qin JG. 2015. Effect of N:P ratio on growth and chemical composition of *Nannochloropsis oculata* and *Tisochrysis lutea*. J Appl Phycol. 27:2221-2230. https://doi.org/10.1007/s10811-014-0495-z

Renaud SM, Thinh LV, Parry DL. 1999. The gross chemical composition and fatty acid composition of 18 species of tropical Australian microalgae for possible use in mariculture. Aquaculture 170(2):147-159. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00399-8

Rigane G, Bouaziz M, Sayadi S, Salem RB. 2013. Effect of storage on refined olive oil composition: stabilization by addition of chlorophyll pigments and squalene. J Oleo Sci. 62(12):981-987. https://doi.org/10.5650/jos.62.981

Ruiz-Soto A. 2017. Implementación de una metodología por cromatografía líquida de alta resolución para la determinación del carotenoide all-trans-β-caroteno en la microalga *Arthrospira platensis* [Implementation of a high performance liquid chromatography methodology for the all-trans-B-carotene carotenoid determination o in the microalgae *Arthrospira platensis*] [Bsc thesis]. [Lima (Peru)]: Universidad Nacional de Ingeniería. 125 p.

Sainz-Escudero L, López-Estrada EK, Rodríguez-Flores PC, García-París M. 2021. Settling taxonomic and nomenclatural problems in brine shrimps, *Artemia* (Crustacea: Branchiopoda: Anostraca), by integrating mitogenomics, marker discordances and nomenclature rules. PeerJ. 9:e10865. https://doi.org/10.7717/peerj.10865

Sánchez-Saavedra MP, Paniagua-Chávez C. 2017. Potential of refrigerated marine cyanobacterium *Synechococcus elongatus* used as food for *Artemia franciscana*. Lat Am J Aquat Res. 45(5):937-947. http://doi.org/10.3856/vol45-issue5-fulltext-9

Saxena A, Mishra B, Tiwari A. 2022. Cost-effective mass cultivation of marine diatoms with local salts and its impact on growth and productivity. Bioresour Technol. 352:127128. http://doi.org/10.2139/ssrn.4035281

Shanmugam S, Rajendran R. 2018. Influence of different diets on the growth, survival, fecundity and proximate composition of brine shrimp *Artemia franciscana* (Kellog, 1906). Aquac Res. 50(2):1-14. https://doi.org/10.1111/are.13882

Sorgeloos P, Lavens P, Leger P, Tackaert W, Versichele D. 1986. Manual for the culture and use of brine shrimp *Artemia* in aquaculture. Belgium: Belgian Development Agency; FAO. 319 p.

Tlusty MF, Goldstein JS, Fiore DR. 2005. Hatchery performance of early benthic juvenile American lobsters (*Homarus americanus*) fed enriched frozen adult *Artemia* diets. Aquac Nutr. 11(3):191-198. https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2005.00339.x

Vizcaíno-Ochoa V, Lazo JP, Barón-Sevilla B, Drawbridge MA. 2010. The effect of dietary docosahexaenoic acid (DHA) on growth, survival and pigmentation of California halibut *Paralichthys californicus* larvae (Ayres, 1810). Aquaculture. 302:228-234. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.02.022

Wang X, Miao J, Pan L, Li Y, Lin Y, Wu J. 2019. Toxicity effects of p-choroaniline on the growth, photosynthesis, respiration capacity and antioxidant enzyme activities of a diatom, *Phaeodactylum tricornutu*. Ecotoxicol Environ Saf. 169:654- 661. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.11.015

Whyte JNC. 1987. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. Aquaculture. 60(3–4):231-241. https://doi.org/10.1016/0044-8486(87)90290-0

Wongrat L. 1995. Phytoplankton. Bangkok (Thailand): Faculty of Fisheries, Kasetsart University.

Zapata M, Garrido JL, Jeffrey SW. 2006. Chlorophyll *c* pigments: current status. In: Grimm, B, Porra RJ, Rüdiger W, Scheer, H. (eds.), Chlorophylls and Bacteriochlorophylls: Biochemistry, Biophysics, Functions and Applications. Dordrecht (The Netherlands): Springer: p. 39–53. https://doi.org/10.1007/1-4020-4516-6_3

Zar JH. 2010. Biostatistical analysis. New Jersey (USA): Prentice Hall. 663 p.

Zazueta-Patrón IE. 2016. Crecimiento, biomasa y composición proximal de microalgas cultivadas en medios limitantes de nitrógeno [Growth, biomass, and proximal composition of microalgae cultured in limiting nitrogen media] [MSc thesis]. [Mazatlan (Sinaloa, Mexico)]: Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Autónoma de Sinaloa (FACIMAR-UAS). 55 p.