



TRABAJO FIN DE GRADO

**GRADO EN
CIENCIAS DEL MAR**

Mejora del cultivo y del enriquecimiento
de metanauplios de *Artemia franciscana*
para su aplicación en larvicultura marina

Susana Ainsa Zazurca

Tutores:

Inmaculada Varó Vaello. Instituto de Acuicultura de Torre la Sal, Castellón.

Jerónimo Chirivella Martorell. Universidad Católica de Valencia "San Vicente Mártir".

Curso académico 2017/18



Agradecimientos

A mis padres,
a mi tutora Inma Varó
y a todos los que me han acompañado
en esta etapa de mi vida.
Gracias.

“Lo que no sobra nunca siempre es el tiempo”

D.M.C. y J.M.M.C.

ÍNDICE

1. RESUMEN	5
2. INTRODUCCIÓN	6
3. OBJETIVOS	10
3.1. OBJETIVOS GENERALES	10
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
4. CULTIVO DE <i>ARTEMIA FRANCISCANA</i>: DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DE MICROALGAS	11
4.1. INTRODUCCIÓN	11
4.2. MATERIAL Y MÉTODOS	12
4.2.1. Organismo experimental	12
4.2.2. Preparación del medio de microalgas	12
4.2.3. Biometría	13
4.2.4. Tasas de filtración (F) e ingestión (I)	15
4.2.5. Supervivencia	17
4.2.6. Análisis estadístico	17
4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
4.3.1. Biometría	18
4.3.2. Tasas de filtración (F) e ingestión (I)	20
4.3.3. Supervivencia	22
5. ENSAYOS PARA LA MEJORA DEL ENRIQUECIMIENTO DE METANAUPLIOS DE <i>ARTEMIA FRANCISCANA</i> CON ANTIOXIDANTE	24
5.1. INTRODUCCIÓN	24
5.2. MATERIAL Y MÉTODOS	26
5.2.1. Condiciones experimentales	26
5.2.2. Enriquecimiento de metanauplios de <i>Artemia</i>	26
5.2.3. Toma de muestras	28
5.2.4. Determinación de parámetros de estrés oxidativo	28
5.2.4.1. Proteína total	28
5.2.4.2. Catalasa	29
5.2.4.3. Peroxidación lipídica	29
5.2.5. Análisis estadístico	30
5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
5.3.1. Determinación de parámetros de estrés oxidativo	31

5.3.1.1. Proteína total	31
5.3.1.2. Catalasa	32
5.3.1.3. Peroxidación lipídica	33
6. CONCLUSIONES	35
7. FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN	36
8. BIBLIOGRAFÍA	37

1. RESUMEN

Actualmente, la larvicultura marina depende del uso de presas vivas enriquecidas como *Artemia* para cubrir totalmente los requerimientos nutricionales de las primeras fases de desarrollo de las especies marinas acuícolas. El enriquecimiento, que consiste en poner en contacto a los individuos con un compuesto rico en ácidos grasos esenciales altamente insaturados (HUFAs), presenta una eficiencia limitada debido a la autooxidación de éstos por parte de *Artemia*.

En este estudio, en primer lugar, se compararon *Tetraselmis suecica* e *Isochrysis galbana* para determinar la concentración óptima de microalgas como alimento durante el cultivo de *A. franciscana* (AF) hasta los 6 días de edad, mediante el crecimiento, supervivencia y comportamiento alimenticio, evaluado con la tasa de filtración e ingestión, en función de la concentración de microalgas en el medio. En segundo lugar, se analizó el efecto beneficioso o protector del uso de un antioxidante rico en polifenoles durante el enriquecimiento de metanauplios de AF de 3 días de edad, mediante la evaluación de la actividad CAT y la peroxidación lipídica como biomarcadores de estrés oxidativo.

Los resultados demostraron que los metanauplios de AF crecen más cuando se utiliza *T. suecica* como alimento, y la talla a los 3 y 6 días de edad aumenta con la concentración de microalgas. Por otra parte, los resultados de los metanauplios enriquecidos con LC60 junto con un antioxidante presentaron menor actividad CAT, lo que sugiere que este uso combinado tiene un efecto protector frente al estrés oxidativo ocasionado durante el enriquecimiento con sustancias prooxidantes ricas en HUFAs.

Palabras clave: *Artemia franciscana*, metanauplios, *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica*, tasa de filtración, tasa de ingestión, enriquecimiento, biomarcadores, estrés oxidativo.

2. INTRODUCCIÓN

La insostenibilidad de las pesquerías se debe principalmente a la sobreexplotación de las poblaciones marinas de interés comercial. En los últimos años, el desarrollo científico tecnológico está provocando un rápido aumento de la producción acuícola mundial. Según un informe de 2017 emitido por la Organización de Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), en 2006 dicha producción acuícola mundial en aguas continentales y marítimas fue de 61,6 millones de toneladas de organismos acuáticos. Sin embargo, en 2015 alcanzó los 106 millones de toneladas.

Generalmente, el pescado es una fuente de ácidos grasos altamente insaturados (HUFAs, Highly Unsaturated Fatty Acids) como el ácido docosahexaenoico (DHA), el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido araquidónico (ARA), que aportan importantes beneficios para la salud humana en la protección frente a cardiopatías coronarias y contribuye al desarrollo neurológico y cerebral del feto (Tocher, 2015). Probablemente sea el valor nutricional una de las causas del incremento del consumo de alimentos de origen marino, tal y como afirma la FAO (2016):

El consumo aparente de pescado per capita a nivel mundial registró un aumento de un promedio de 99, kg en la década de 1960 a 14,4 kg en la década de 1990 y 19,7 kg en 2013, con estimaciones preliminares que apuntan a un aumento todavía mayor, superior a 20 kg en 2015.

Por tanto, satisfacer la fuerte demanda mundial de pescado sin agotar los recursos naturales es todo un reto para la acuicultura. En el medio natural, las larvas de peces y crustáceos se alimentan de fitoplancton y zooplancton, concretamente de copépodos, conformando una red trófica diversa y compleja. Los copépodos son crustáceos que presentan un alto contenido de ácidos grasos esenciales y antioxidantes (Van der Meeren *et al.*, 2008, citado por Puello, González y García, 2008). Lo que ocurre es que capturar estos individuos del medio natural como alimento vivo en larvicultura, da lugar a los mismos problemas ecológicos y económicos que la captura de las propias larvas (Viciano, 2015). Desde principios del siglo XX, Fabre-Domergue y Bietrix (1905) ya sugerían que la captura de plancton natural para alimentar larvas de cultivo es una práctica casi impensable debido a su baja rentabilidad económica. Es por esto que desde el comienzo de la acuicultura se ha intentado reproducir la cadena trófica natural desde la simplificación, reemplazando el conjunto de las especies planctónicas del ecosistema, que representan los primeros eslabones de la cadena, por unas pocas especies fácilmente cultivables y manipulables, en lo que se denomina cadena trófica artificial. Es decir, utilizar unas especies determinadas como presas vivas, estos son los llamados cultivos auxiliares, de

modo que cubran los requerimientos nutricionales de las fases tempranas de desarrollo de las especies acuícolas comerciales (Ruiz, 2008).

Nutricionalmente, las microalgas (fitoplancton, primer eslabón de la cadena trófica) son una fuente de micronutrientes, vitaminas, aceites y elementos traza para las comunidades acuáticas. Entre las especies de microalgas más utilizadas en acuicultura se incluyen las clorófitas *Nannochloropsis oculata* (2-4 μm), *Dunaliella tertiolecta* (7-12 μm) y *Tetraselmis suecica* (10-14 μm), y las crisófitas *Isochrysis galbana* (4-6 μm) y *Chaetoceros gracilis* (7-10 μm) (Volkman *et al.*, 1989). Generalmente, la composición nutricional de una microalga varía según la especie, los nutrientes y otros factores tanto abióticos (ej. la luz) como fisicoquímicos. A modo de ejemplo, las cantidades de EPA y DHA, expresadas sobre el peso seco de las microalgas, que contiene *I. galbana* es de 0,8 mg g⁻¹ de EPA y 15,8 mg g⁻¹ de DHA. Sin embargo, *T. suecica* tiene 4,8 mg g⁻¹ de EPA y 0,2 mg g⁻¹ de DHA (Patil *et al.*, 2007). Las cantidades de EPA y DHA están expresadas sobre el peso seco de las microalgas. En la actualidad, es muy frecuente suministrar determinadas especies de fitoplancton en los tanques de cultivo larvario, incluso cuando no se trata de moluscos filtradores que se alimentan de forma directa de estas microalgas. Esta técnica se conoce como “cultivo en aguas verdes”, y se ha demostrado una mejora en la supervivencia y crecimiento de más de 40 especies comparado con el “cultivo en aguas claras” (Muller-Feuga *et al.*, 2003).

En cuanto al segundo eslabón de la cadena, se emplea zooplancton como rotíferos, especialmente del género *Brachionus*, y el crustáceo *Artemia* en sus diferentes estadios de desarrollo (Medina, 2012). Por ejemplo, actualmente se estudia el uso de metanauplios de *Artemia* como alimento vivo de paralarvas de pulpo. Además, se ha comprobado la preferencia de las paralarvas, desde sus primeros días de vida, por individuos de *Artemia* de mayor tamaño, entre 0,8 – 1,4 mm (Iglesias *et al.*, 2006, citado por Fernandes, 2009).

A pesar de los avances llevados a cabo en acuicultura, en particular en piscicultura, para completar los ciclos de vida de las especies marinas de relevancia económica, la larvicultura marina sigue dependiendo del uso de presas vivas enriquecidas con el fin de cubrir totalmente los requerimientos nutricionales de las primeras fases de desarrollo. Las larvas de organismos marinos necesitan para su desarrollo y crecimiento los ácidos grasos esenciales DHA, EPA y ARA (Tocher, 2010), puesto que son incapaces de sintetizarlos de forma endógena y por lo tanto se deben introducir a través de la dieta (Watanabe *et al.*, 1982; Lavens, Léger y Sorgeloos, 1989; Tocher, 2003). Hay estudios que demuestran que la falta de estos HUFAs en la dieta de peces marinos provoca un descenso del desarrollo visual y neural de las larvas teniendo consecuencias a nivel fisiológico y comportamental (Bell *et al.*, 2003). También, la composición bioquímica del alimento vivo de los stocks de reproductores es determinante para

generar puestas de calidad, ya que de esto dependerá la supervivencia y el desarrollo óptimo de las larvas (Viciano, 2015).

Las especies marinas no se alimentan de *Artemia* en condiciones naturales porque no existen en los mares y océanos; sin embargo, estos crustáceos son muy importantes como presa viva para alimentar las larvas de las especies marinas de acuicultura, ya que parece que reúnen las características idóneas para ser depredados (Amat, 1985a). *Artemia* habita los ecosistemas hipersalinos de todo el mundo, a excepción del continente antártico. Son organismos eurihalinos ya que son capaces de soportar salinidades desde 20 a 330 g L⁻¹. El género *Artemia* comprende seis especies bisexuales y una gran cantidad de poblaciones partenogenéticas (Bowen *et al.*, 1980, citado por Amat, 1985b). Sin embargo, *Artemia franciscana* es la especie bisexual más abundante y sus quistes están comercialmente disponibles principalmente para la acuicultura.

Artemia es un crustáceo branquiópodo anostráceo (Fig. 1), lo que significa que posee apéndices torácicos en forma de hoja, denominados filópodos o toracópodos, cada uno dotado de una branquia, sin caparazón rígido. Los toracópodos tienen funciones importantes en lo que respecta a la locomoción, respiración y filtración (Redón, 2015).



Fig. 1. Individuo de *A. franciscana* de 8 días de edad visto bajo el microscopio estereoscópico.

El cuerpo de este crustáceo es delgado y claramente segmentado, pero su longitud, aspecto, frecuencia de las mudas y rapidez de desarrollo varían según el tipo de raza: partenogenética o bisexual, diploides o polidiploides, y de las características fisicoquímicas y ambientales, como la concentración de oxígeno disuelto, la densidad poblacional, el pH, la salinidad, la temperatura y/o el tipo de alimento (Ruiz, 2008).

En lo que se refiere a su reproducción, puede ser bisexual, con presencia de machos y hembras, o partenogenética, donde la presencia de machos es testimonial. Ambos tipos pueden dar lugar a dos tipos de huevos: mediante un proceso ovovivíparo, finalizan el desarrollo embrionario en el útero resultando en un nauplio (primera fase de desarrollo); o mediante el proceso ovíparo, detienen su desarrollo en estado de blástula avanzada recubriéndose de un corion, quedando en forma de quiste subitáneo o huevo de resistencia (Dutrieu, 1960, citado por Ruiz, 2008). Este tipo de reproducción que da lugar a quistes se debe a condiciones adversas del medio como la falta de alimento. Los quistes se encuentran en estado de latencia (diapausa) y pueden permanecer así durante mucho tiempo hasta que se restablezcan las condiciones idóneas para su eclosión. El mayor banco de quistes naturales se encuentra en el Gran Lago Salado de Utah (EE. UU.), donde se han desarrollado técnicas de recolección, procesado y envasado para posteriormente ser distribuidos comercialmente para su uso en acuicultura principalmente (Amat, 1985a).

Son bastantes las ventajas del uso de *Artemia* como alimento vivo. Por ejemplo, el almacenamiento en forma de quistes de pequeño tamaño y su fácil manejo, sobretodo porque tras aproximadamente 24 h de hidratación es posible obtener un gran número de nauplios listos para su uso como alimento. Los nauplios recién eclosionados miden alrededor de 400 μm , aunque puede variar su tamaño dependiendo de la especie y/o cepa. Tras la eclosión, el nauplio, que se encuentra en su primer estadio larvario, presenta una coloración anaranjada debido a las reservas de vitelo y carotenos. A medida que transcurren las horas se va desarrollando morfológicamente y tras la primera muda, que origina el segundo estadio larvario, se denomina metanauplio (Amat, 1985b). Además, no se necesitan instalaciones sofisticadas para su cultivo, presentan movilidad constante y se adaptan fácilmente a amplios rangos de temperatura (6 – 35 °C) y salinidad, como se ha nombrado anteriormente. Es por esto que *Artemia* representa un recurso indispensable y uno de los más utilizados para la cría larvaria a nivel mundial.

Por contraposición, generalmente *Artemia* posee un escaso valor nutricional en cuanto a su contenido en HUFAs, que son un elemento esencial para la viabilidad de las larvas marinas. La calidad nutricional de los nauplios varía ligeramente según la especie y/o cepa, así como del lote (Moraiti-Ioannidou *et al.*, 2009). Incluso puede variar en una misma población recolectada en diferentes épocas del año (Léger *et al.*, 1986). Debido a que los individuos de *Artemia* carecen de DHA y tienen bajos niveles de EPA, deben enriquecerse con productos ricos en estos compuestos, con el fin de satisfacer las necesidades nutricionales de las larvas de especies marinas garantizando así un desarrollo normal (Sargent, McEvoy y Bell, 1999; Hamre *et al.*, 2013).

Artemia se alimenta de forma continua porque es un organismo filtrador no selectivo, que retiene cualquier tipo de partícula que se encuentre en suspensión en el medio ya sea de origen orgánico o inorgánico (Amat, 1985b), en un rango entre 10 - 50 micras (Makridis y Vadstein, 1999), aunque el rango de preferencia está entre 6,8 y 27,5 μm , con el óptimo alrededor de 16 μm (Gelabert, 2001). Por tanto, el enriquecimiento consiste en poner en contacto a los individuos de *Artemia* con la emulsión rica en HUFAs para que los incorporen en su sistema digestivo y/o se adhiera a su superficie, de forma que este organismo actúa a modo de vehículo de la misma. Este proceso se puede llevar a cabo de forma indirecta mediante la incorporación de otros organismos como microalgas o levaduras (Watanabe *et al.*, 1982; Aragão *et al.*, 2004), o de forma directa, utilizando, entre otros, emulsiones lipídicas (Léger *et al.*, 1986; Evjemo *et al.*, 1997; Han, Geurden y Sorgeloos, 2000), siendo este procedimiento uno de los métodos más extendidos actualmente.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVOS GENERALES

En el presente trabajo se llevaron a cabo diferentes estudios para la mejora del enriquecimiento de metanauplios de *A. franciscana* (AF) como presa viva con vistas a su aplicación en larvicultura marina.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para alcanzar el objetivo principal se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar la concentración óptima de microalgas del medio para el cultivo de AF, desde nauplios recién eclosionados hasta obtener metanauplios de 6 días de edad.
2. Evaluar el efecto del uso de antioxidantes durante el enriquecimiento sobre el sistema de defensas antioxidantes en metanauplios de 3 días de edad.

4. CULTIVO DE *Artemia franciscana*: DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DE MICROALGAS

4.1. INTRODUCCIÓN

Como se ha mencionado anteriormente, el fitoplancton constituye el primer eslabón de la cadena trófica artificial utilizada en larvicultura marina. *T. suecica* e *I. galbana* son dos de las especies de microalgas más comúnmente utilizadas para el enriquecimiento/cultivo de *Artemia* (Hamazaki *et al.*, 1991; Iglesias *et al.*, 2002; Moxica *et al.*, 2002). Se trata de microalgas unicelulares cuya composición bioquímica es apta para alimentar *Artemia*, aumentando su contenido en HUFAs, con el fin de atenuar el problema sobre su escaso valor nutricional como presa viva para el cultivo larvario (Iglesias *et al.*, 2007). En el caso de *T. suecica*, es una microalga que se ha utilizado en diversos estudios como alimento óptimo de organismos filtradores como copépodos (Lee *et al.*, 2006; Puello *et al.*, 2008) o *Artemia* (Fernandes, 2009; Viciano, 2015). Por otra parte, *I. galbana* se utiliza con frecuencia para cultivar y enriquecer individuos de *Artemia*, que posteriormente serán utilizados para alimentar las fases larvarias de peces y cefalópodos. En el caso de paralarvas de pulpo (*Octopus vulgaris*), el cultivo de *Artemia* con *I. galbana* ha dado muy buenos resultados en cuanto a la composición bioquímica de éstas, concretamente aumentado su contenido en HUFAs (Fernandes, 2009; Garrido *et al.*, 2017).

La optimización de las condiciones de cultivo de *Artemia* con vistas a su uso como presa viva se puede realizar mediante el estudio del crecimiento, supervivencia y comportamiento alimenticio. Según Brito, Milani y Pereira (2006), “la estimación de la cantidad de material en suspensión que ingiere una especie dada por unidad de tiempo (tasa de ingestión), es una variable de gran interés ecológico”. Es decir, la tasa de ingestión (I) se define como el número de células (cél) consumidas por un individuo (ind) con capacidad filtradora por unidad de tiempo, en horas (h), (cél/ind/h). Sin embargo, la tasa de filtración (F) es el volumen (μL) de medio filtrado por un individuo y por unidad de tiempo ($\mu\text{L}/\text{ind}/\text{h}$) (Gauld, 1951).

Por tanto, en el presente estudio se compararon dos microalgas, *T. suecica* e *I. galbana*, para determinar: 1) la concentración óptima de microalgas como alimento durante el cultivo de *Artemia franciscana* hasta los 6 días de edad. Esta comparación se lleva a cabo mediante el uso de las tasas de filtración e ingestión para valorar la cantidad de alimento ingerido por organismos acuáticos filtradores como *Artemia*. 2) El crecimiento en función de la concentración de microalgas en el medio y, 3) la supervivencia, para evaluar la viabilidad de los cultivos.

4.2. MATERIAL Y MÉTODOS

4.2.1. Organismo experimental

El trabajo se desarrolló mediante el empleo de individuos de la especie bisexual americana *Artemia franciscana* (AF), que se obtuvieron a partir de la eclosión de quistes deshidratados, suministrados por la empresa Inve (Bélgica), tal y como describe Amat (1985a).

La eclosión de los quistes se realizó en tubos de cristal cilíndricos, con capacidad máxima de 1 L, colocados dentro de un baño termostático a 28 °C, en condiciones de iluminación (1000 lux) constante y aireación continua individual por burbujeo de aire comprimido desde el fondo. Se pesaron los quistes en una balanza analítica y a continuación, se añadieron en el interior del tubo de eclosión con 1 L de agua de mar (37 ‰) previamente aclimatado a 28 °C. La densidad máxima de quistes fue de 2,5 g L⁻¹, y no superior a 4 g L⁻¹ como aconseja Van Stappen (1996).

Tras un periodo de 22 a 24 h, se detuvo la aireación para facilitar la separación entre los nauplios, que decantaron, y las cáscaras y quistes sin eclosionar. A continuación, los nauplios se sifonaron y se recogieron en una malla de plancton de 100 µm. Una vez retenidos en la malla, se enjuagaron con agua dulce y se resuspendieron en una probeta de 1 L para realizar otro lavado, eliminando así el mayor número posible de quistes no eclosionados y cáscaras (Monroig, 2006). Seguidamente, los nauplios se resuspendieron en un volumen conocido de agua de mar filtrada. Para calcular la densidad naupliar, se puso aireación para tener una dispersión homogénea en todo el recipiente, y se realizó el conteo mediante la toma de 6 alícuotas de 100 µL cada una. De esta forma, se determinó el volumen a transferir a cada recipiente de cultivo para que la densidad final fuera de 10 ind mL⁻¹. Los individuos se mantuvieron en recipientes cilíndricos de 6 L de capacidad máxima con aireación moderada, en una cámara termostática a 24 °C y fotoperiodo 12 h luz :12 h oscuridad durante 6 días, realizándose una renovación del medio de microalgas a los 3 días.

4.2.2. Preparación del medio de microalgas

T. suecica e *I. galbana* fueron suministradas por el banco de microalgas del Instituto de Acuicultura de Torre la Sal (IATS) en su forma viva. La preparación del medio de microalgas se realizó mediante el cálculo de la concentración inicial del cultivo madre o *stock* utilizando una cámara de recuento Neubauer. Continuamente, sabiendo el volumen final del cultivo y su concentración (cél mL⁻¹) deseada, se determinó el volumen que debía cogerse del *stock*.

Se prepararon medios de cultivo en volúmenes entre 2 y 5 L y a diferentes concentraciones según la especie de microalga:

- Para *T. suecica*, la concentraciones de los ensayos fueron 100.000, 200.000 y 300.000 cél mL⁻¹ (Fig. 2)
- Para *I. galbana* fueron 300.000, 500.000 y 1.000.000 cél mL⁻¹ debido a que su tamaño celular es menor (Fig. 3)

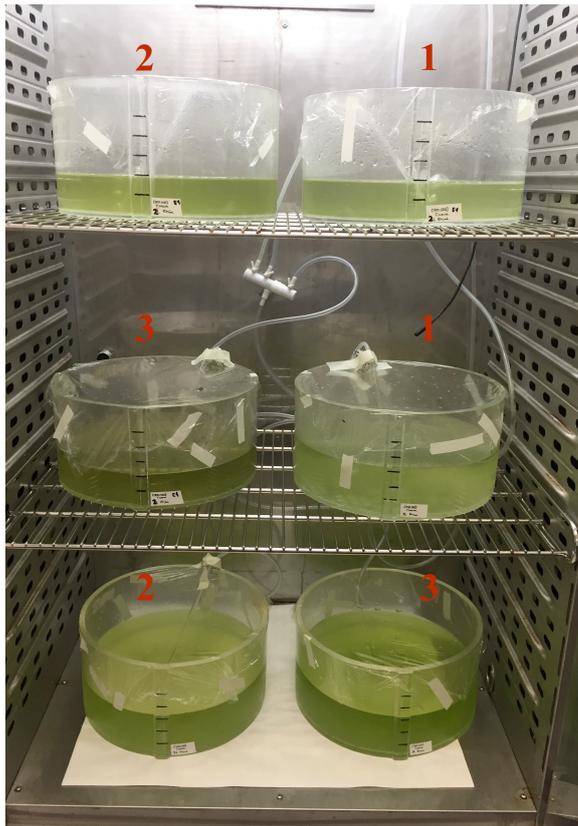


Fig. 2. Cultivos de AF con *T. suecica*: 1 = 100.000 cél mL⁻¹, 2 = 200.000 cél mL⁻¹ y 3 = 300.000 cél mL⁻¹.

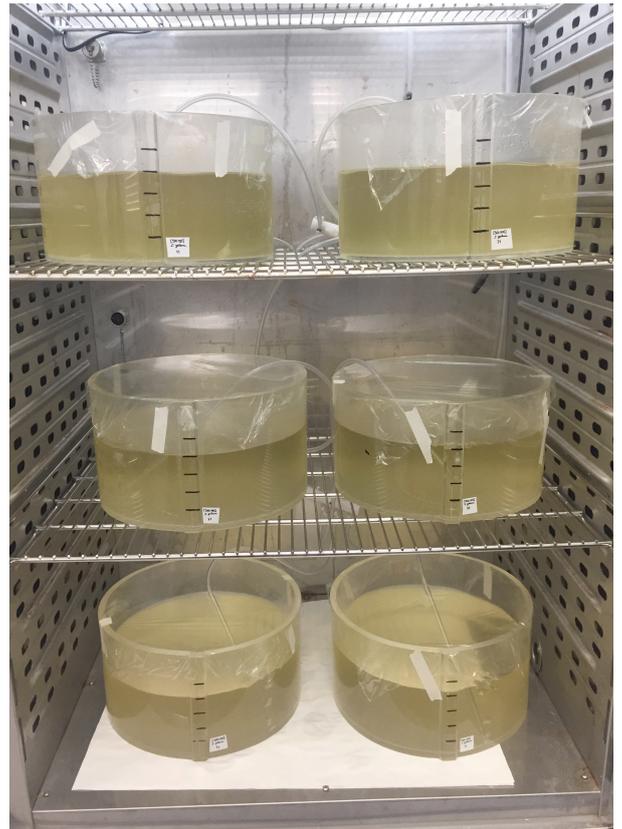


Fig. 3. Cultivos de AF con *I. galbana* a una concentración de 500.000 cél mL⁻¹.

4.2.3. Biometría

Para determinar la talla se hicieron fotografías de los individuos mediante un microscopio estereoscópico Leica MZ6 con cámara digital incorporada Leica MC170HD. Seguidamente, se procesaron dichas imágenes con el programa informático ImageJ (Schneider, Rasband y Eliceiri, 2012).

A lo largo de cada bioensayo, para medir la talla se tomaron muestras de 20 individuos, a diferentes tiempos, que se anestesiaron con una solución de agua saturada de cloroformo antes de tomar la imagen. Por tanto, se controló la talla en nauplios recién eclosionados (Fig. 4) y metanauplios de 3 (Figs. 5 y 6) y 6 días (Figs. 7 y 8) a cada una de las concentraciones de *T. suecica* e *I. galbana* ensayadas. Los individuos que fueron anestesiados para ser medidos fueron eliminados del experimento.

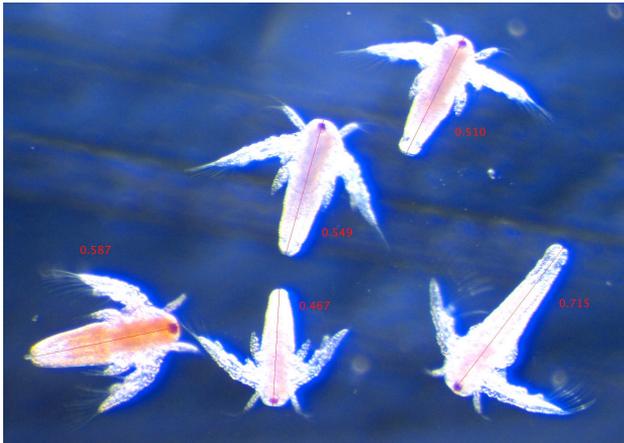


Fig. 4. Talla (mm) de nauplios vistos bajo el microscopio estereoscópico (4x).

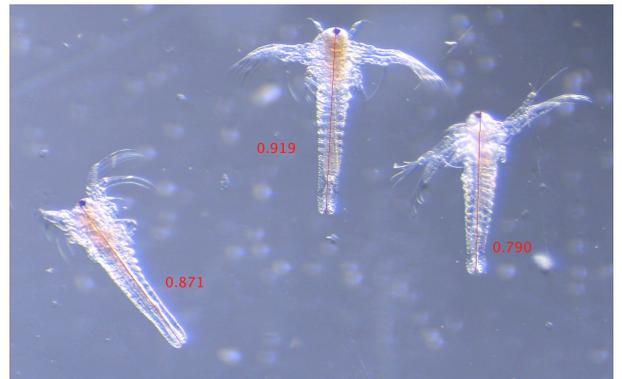


Fig. 5. Talla (mm) de metanauplios de 3 días de edad cultivados con *I. galbana* a una concentración de 500.000 cél mL⁻¹, vistos bajo el microscopio estereoscópico (2,5x).

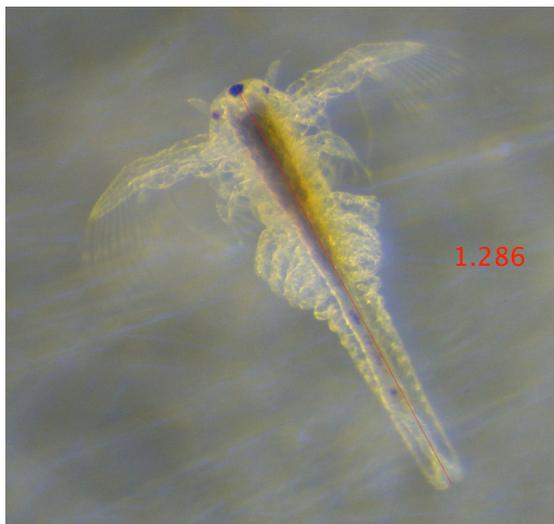


Fig. 6. Talla (mm) de metanauplio de 3 días de edad cultivado con *T. suecica* a una concentración de 200.000 cél mL⁻¹, visto bajo el microscopio estereoscópico (4x).



Fig. 7. Talla (mm) de metanauplios de 6 días de edad cultivados con *T. suecica* a una concentración de 300.000 cél mL⁻¹, vistos bajo el microscopio estereoscópico (3,2x).

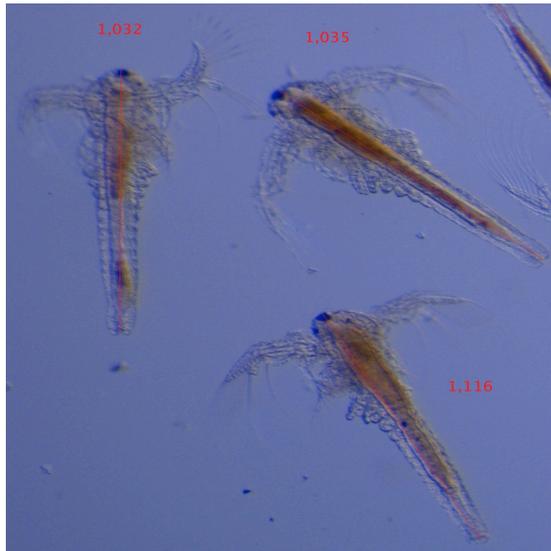


Fig. 8. Talla (mm) de metanauplios de 6 días cultivados con *I. galbana* a una concentración de 500.000 cél mL⁻¹, vistos bajo el microscopio estereoscópico (3,2x).

4.2.4. Tasas de filtración (F) e ingestión (I)

La tasa de filtración (F) y la tasa de ingestión (I) fueron determinadas a los 3 y 6 días de edad. Se tomó una muestra de 200 mL de cada recipiente de cultivo, se filtró y se resuspendieron los individuos en agua de mar filtrada durante 2 h. Durante este tiempo se mantuvieron en las mismas condiciones (aireación, temperatura y fotoperiodo) que en el cultivo, pero en ayuno para favorecer el vaciado del tracto digestivo. Pasadas las 2 h, se procedió a exponer a los metanauplios durante 3 h a un medio con las siguientes concentraciones:

- *T. suecica*: 100.000, 200.000 y 300.000 cél mL⁻¹.
- *I. galbana*: 300.000, 500.000 y 1.000.000 cél mL⁻¹.

Para *T. suecica* se realizaron 2 ensayos independientes y para *I. galbana* sólo un ensayo. Cada ensayo consistió en exponer en tubos tipo Corning 300 individuos en 30 mL de medio para cada concentración y por triplicado, además de un control que únicamente contenía medio con las microalgas a cada una de las concentraciones fijadas (Fig. 9).

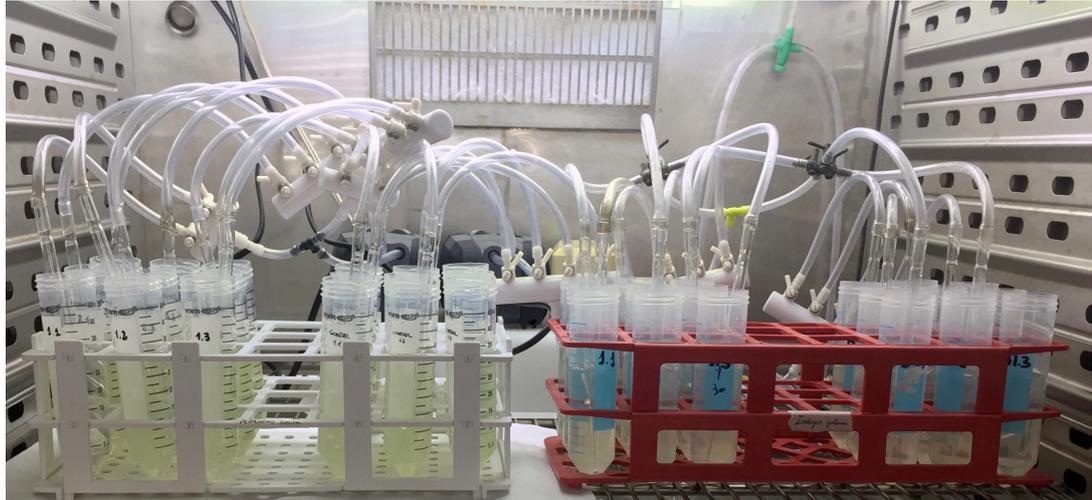


Fig. 9. Detalle del sistema empleado para determinar la tasa de filtración (F) e ingestión (I). A la izquierda, *T. suecica* y a la derecha, *I. galbana*. Condiciones experimentales: 24 °C, aireación moderada, luz constante, 10 ind mL⁻¹ y n = 3.

Trascurridas las 3 h, se tomaron muestras de cada tubo Corning y mediante una cámara de recuento Neubauer, se calculó el número de células de microalgas presentes en las muestras y se aplicaron las siguientes fórmulas para determinar F e I (Gauld, 1951):

$$F = \left(\frac{V}{n}\right) * \frac{\ln C_o - \ln C_t}{t} - A \quad A = \frac{\ln C_o - \ln C_{t,t}}{t} \quad I = F * \sqrt{C_o * C_t}$$

C_o y C_t: concentraciones inicial y final (cél μL⁻¹).

“t”: es el tiempo (h) de duración del experimento.

“n”: es el número de individuos.

V: es el volumen (μL) del medio que pasa a través de los individuos.

A: es el factor de corrección que se refiere a los cambios que tienen lugar en la concentración inicial de alga C_o después de transcurrido un tiempo “t”, en ausencia de individuos. La concentración final de alga se expresa como C_{t,t} para diferenciarla de C_t (en presencia de individuos).

4.2.5. Supervivencia

Para evaluar la supervivencia se muestrearon los cultivos de AF de cada una de las concentraciones de microalgas a los 3 y 6 días de edad. La supervivencia se estimó tomando 4 réplicas de 1 mL de cada cultivo apuntándose el número de metanauplios vivos presentes en cada réplica sobre los totales.

4.2.6. Análisis estadístico

A partir del test Shapiro-Wilk y de Levene se comprobó la normalidad y homogeneidad de las varianzas, respectivamente. Para comparar la talla y la tasa de filtración e ingestión de los metanauplios dependiendo de la concentración de microalgas en el medio, se realizó el análisis de la varianza de una vía (ANOVA de una vía), en caso de varianzas heterogéneas se utilizó la corrección Brown-Forsythe; seguido del test HDS de Tukey *post hoc* para varianzas homogéneas, o el test *post hoc* de Games-Howell para varianzas heterogéneas.

Los resultados se presentan como media \pm desviación estándar. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el software IBM SPSS Statistics, con un nivel de significación del 95% ($p \leq 0,05$).

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1. Biometría

En la figura 10 se observan los resultados de las tallas (mm) de nauplios recién eclosionados, o de 0 horas, y metanauplios de 3 y 6 días de AF, según las concentraciones (cél mL⁻¹) ensayadas de *T. suecica*. A los 3 días, la talla de los metanauplios cultivados con la concentración de 100.000 cél mL⁻¹ es significativamente ($p \leq 0,05$) más baja que la de los individuos alimentados con 200.000 y 300.000 cél mL⁻¹, aunque no existen diferencias significativas entre estos últimos. Por otra parte, las tallas de los metanauplios de 6 días cultivados con cada una de las concentraciones de estudio son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). Además, la talla del grupo cultivado a la concentración más alta, que difiere significativamente de los individuos alimentados con 100.000 y 200.000 cél mL⁻¹, presenta el valor más alto ($1,34 \pm 0,17$ mm).

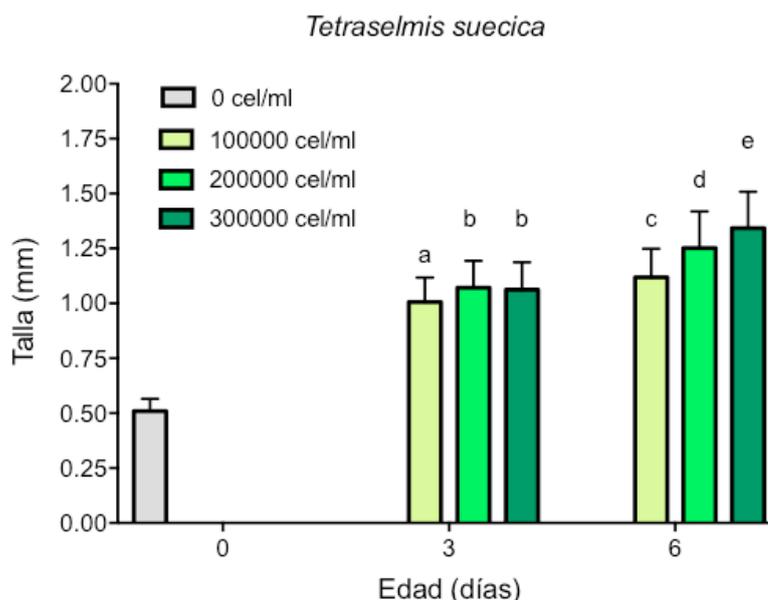


Fig. 10. Variación de la talla de individuos de AF cultivados con diferentes concentraciones de *T. suecica*. Distintas letras indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$, ANOVA, *post hoc* Tukey). Los resultados se presentan como media \pm desviación estándar.

En un estudio sobre el crecimiento larvario de AF con una concentración de 250.000 cél mL⁻¹ de *T. suecica*, Godínez *et al.* (2004) obtuvieron datos de talla de los metanauplios de 3 días y 6 días mayores que los encontrados en este estudio. Quizás esta diferencia pueda deberse al efecto de la densidad de individuos en el crecimiento, ya que el cultivo se realizó con 3 ind mL⁻¹, frente a los 10 ind mL⁻¹ utilizados en el presente trabajo.

Respecto a los resultados de las tallas de los individuos de AF sometidos a diferentes concentraciones de *I. galbana* se muestran en la figura 11. A los 3 días de edad, la talla de los metanauplios cultivados a una concentración de 1.000.000 cél mL⁻¹ es significativamente mayor (1,04 ± 0,11 mm), respecto a los cultivados con las concentraciones de 300.000 y 500.000 cél mL⁻¹. En cambio, a los 6 días de ensayo se observa un valor de talla ligeramente menor de los metanauplios cultivados a una concentración de 500.000 cél mL⁻¹, en comparación con los otros grupos, aunque esta diferencia no es significativa ($p \geq 0,05$). Sin embargo, no hay diferencias en las tallas de los metanauplios de 6 días cultivados en función de la concentración de microalgas.

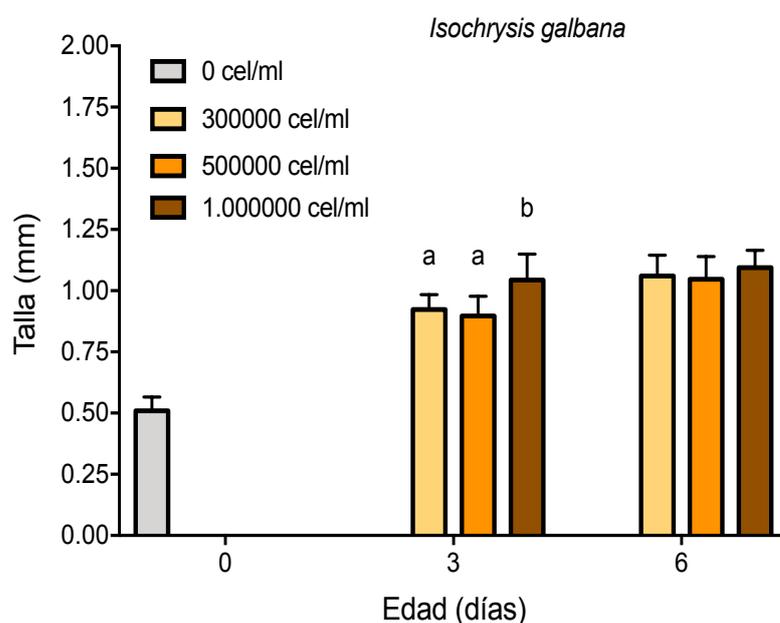


Fig. 11. Variación de la talla de individuos de AF cultivados con diferentes concentraciones de *I. galbana*. Las distintas letras denotan diferencias significativas ($p \leq 0,05$, ANOVA, *post hoc* Tukey). Los datos corresponden a las medias \pm desviación estándar.

El estudio realizado por Fábregas *et al.* (1996) hace hincapié en la importancia de la fase en la que se encuentra el cultivo de microalgas para con el crecimiento de *Artemia*, ya que la composición nutricional es mayor en la fase exponencial del cultivo microalgal. De hecho, obtuvieron que el crecimiento de *Artemia* dependía más de la calidad nutricional de la microalga que de otros factores como la concentración. Esto difiere ligeramente de los resultados del presente puesto que, parece que AF crece más cuando se alimenta con *T. suecica*, a pesar de que tenga menor valor nutricional que *I. galbana* en relación con el contenido de DHA y EPA. Por el contrario, Seixas *et al.* (2008) observaron, al igual que en este estudio, una mayor talla en los juveniles de *Artemia* enriquecidos durante 26 h con *T. suecica* que con *I. galbana*.

4.3.2. Tasas de filtración (F) e ingestión (I)

Los resultados de las tasas de filtración de AF en función de la especie de microalga y su concentración en el medio se presenta en la figura 12. Para *T. suecica*, como puede observarse, no se encontraron diferencias significativas ($p \geq 0,05$, ANOVA de una vía) en la tasa de filtración de los metanauplios de 3 y 6 días según la concentración de microalgas en el medio.

Respecto a la tasa de filtración con *I. galbana*, tan solo pudieron analizarse estadísticamente los resultados obtenidos con metanauplios de 3 días de edad, ya que no se obtuvieron suficientes individuos de 6 días de edad para realizar los ensayos. Se observan diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en la tasa de filtración de metanauplios de 3 días entre las concentraciones de *I. galbana* de acuerdo con los resultados de ANOVA de una vía (corrección Brown-Forsythe para varianzas heterogéneas) y el test *post hoc* de Games-Howell ($p \leq 0,05$). El valor más alto de tasa de filtración se encuentra a la concentración más baja ensayada de $300.000 \text{ céL mL}^{-1}$, con un valor de $37,6 \pm 0,6 \mu\text{L/ind/h}$.

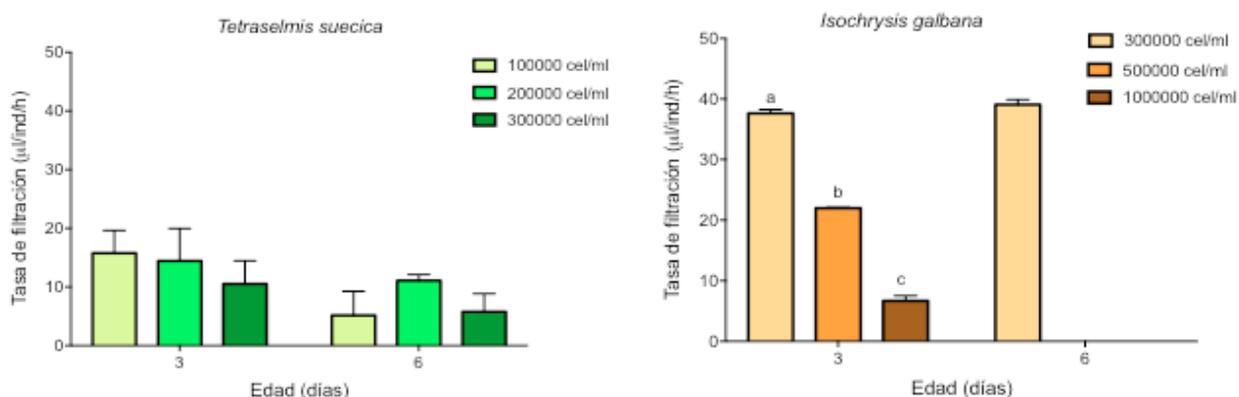


Fig. 12. Tasa de filtración de individuos de AF a diferentes edades cultivados con distintas concentraciones de *T. suecica* (dcha.) e *I. galbana* (izqda.). Los resultados se presentan como media \pm desviación estándar.

El factor edad, relacionado con el aumento del tamaño, es muy importante en la capacidad de los metanauplios de *Artemia* para filtrar del medio las partículas en suspensión. La actividad filtradora de los individuos de *Artemia* es más efectiva en la etapa adulta, que se alcanza tras unas 25 etapas descritas por Olesen (2014) y que denomina pre-adultas. En los individuos adultos, los toracópodos están totalmente desarrollados y son más funcionales (Sorgeloos *et al.*, 1986; Makridis y Vadstein, 1999). Reeve (1963) estudió la tasa de filtración de la especie bisexual *A. salina* variando la concentración de microalgas del medio entre 100.000 y $2.000.000 \text{ céL mL}^{-1}$; y observó que a medida que se incrementaba la concentración, la tasa de filtración permanecía constante mientras que la tasa de ingestión aumentaba. A partir de una concentración determinada, la tasa de ingestión alcanzaba un máximo constante y la tasa de

filtración disminuía, lo cual interpretó como saciedad de los individuos, siendo éstos capaces de regular su alimentación.

Como se observa en la figura 13, hay diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en la tasa de ingestión de metanauplios de 3 días en función de la concentración de *T. suecica*, de acuerdo con el resultado de ANOVA de una vía y el test *post hoc* de Tukey. Los valores mayores de tasa de ingestión se dan en las concentraciones de 200.000 y 300.000 cél mL⁻¹. Sin embargo, a los 6 días de edad, tan solo se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en la tasa de ingestión de los metanauplios cultivados con 100.000 y 200.000 cél mL⁻¹ de *T. suecica*.

En cuanto a la tasa de ingestión con la microalga *I. galbana*, no se encuentran diferencias significativas ($p \geq 0,05$) en los metanauplios de 3 días en función de las concentraciones de *I. galbana*, de acuerdo con el resultado de ANOVA de una vía (corrección Brown-Forsythe para varianzas heterogéneas).

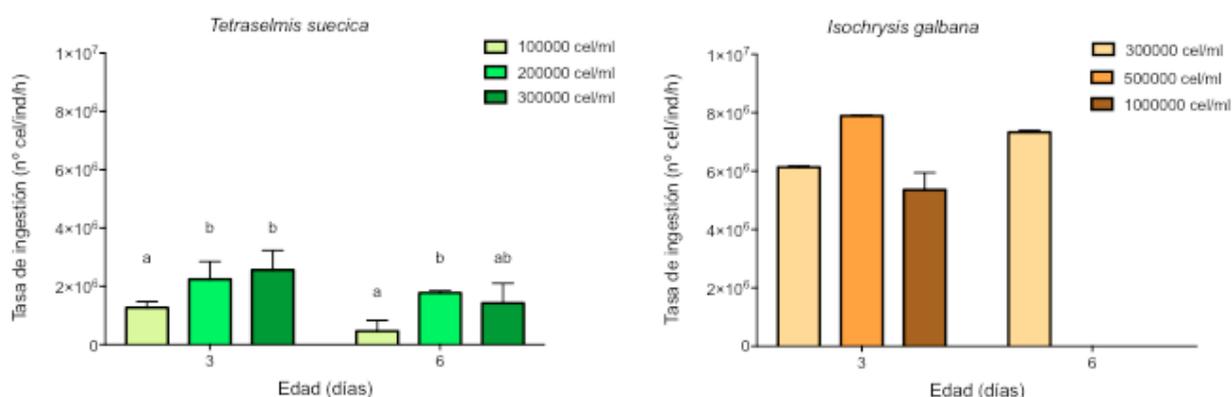


Fig. 13. Tasa de ingestión de individuos de AF a diferentes edades cultivados con distintas concentraciones de *T. suecica* (dcha.) e *I. galbana* (izqda.). Los resultados se presentan como media \pm desviación estándar.

Los resultados obtenidos indican una tendencia inversa en lo que respecta a la tasa de filtración e ingestión. A medida que se aumenta la concentración de células en el medio, la tasa de filtración disminuye y la de ingestión aumenta. Los individuos de AF ingieren un número mayor de células de *I. galbana* que de *T. suecica* posiblemente debido al distinto tamaño celular de ambas microalgas. De hecho, Díaz *et al.* (2006) demostraron el efecto del tamaño de las microalgas sobre la tasa de ingestión de AF. Concretamente compararon *T. suecica* y *Chaetoceros muelleri*, cuyas células son 3 o 4 veces más pequeñas, y observaron que, durante su desarrollo larvario, AF ingiere con mayor facilidad *C. muelleri*, atenuándose esta condición a medida que avanza su desarrollo a adulto.

4.3.3. Supervivencia

La supervivencia en los ensayos de metanauplios de AF de 3 días fue del 100 % para todas las concentraciones ensayadas de *T. suecica* e *I. galbana*. Durante el transcurso de los ensayos se observó mayor movilidad en los metanauplios cultivados con *T. suecica*.

En la tabla 1 se muestran los resultados de la supervivencia (%) obtenida en los cultivos de metanauplios de 6 días. Los resultados indican que se obtienen mayores supervivencias cuando los metanauplios se alimentan con *T. suecica*, y en concreto con una concentración de 300.000 cél mL⁻¹. Por el contrario, a una concentración de *I. galbana* de 1.000.000 cél mL⁻¹ la supervivencia se reduce notablemente, siendo del 50,4 %.

Tabla 1. Supervivencia de metanauplios de 6 días de AF cultivados con dos especies de microalgas a distintas concentraciones. Individuos vivos en 1 mL sobre el total.

	<i>T. suecica</i>			<i>I. galbana</i>		
	100.000 cél mL ⁻¹	200.000 cél mL ⁻¹	300.000 cél mL ⁻¹	300.000 cél mL ⁻¹	500.000 cél mL ⁻¹	1.000.000 cél mL ⁻¹
R1	23 / 26 = 88,46 %	15 / 15 = 100 %	17 / 17 = 100 %	8 / 9 = 88,9 %	9 / 11 = 81,82 %	6 / 12 = 50 %
R2	7 / 8 = 87,5 %	12 / 12 = 100 %	11 / 11 = 100 %	11 / 12 = 91,67 %	13 / 16 = 81,25 %	9 / 15 = 60 %
R3	14 / 16 = 87,5 %	22 / 25 = 88 %	17 / 20 = 85 %	7 / 9 = 77,78 %	7 / 8 = 87,5 %	5 / 10 = 50 %
R4	9 / 12 = 75 %	12 / 12 = 100 %	10 / 11 = 90,9 %	8 / 9 = 88,9 %	11 / 13 = 84,62 %	5 / 12 = 41,67 %
Medias						
	84,6 %	97 %	93,97 %	86,8 %	83,8 %	50,4 %

Estudios previos realizados por Mechaly, Cervellini y Bambill (2004) con la misma especie de *Artemia* obtuvieron los mejores valores de supervivencia de metanauplios de 7 días de edad con *Nannochloropsis oculata* y a una concentración superior a 2.000.000 cél mL⁻¹, con una densidad de individuos inferior a la utilizada en este estudio, de 10 ind mL⁻¹, y 28 °C. Estas

diferencias en supervivencia podrían estar relacionadas con el tamaño celular ya que *N. oculata* mide entre 2 y 4 μm y es mucho mas pequeña que *T. suecica* (10-14 μm) e *I. galbana* (4-6 μm). Sin descartar las diferencias que puedan estar relacionadas con el valor nutritivo propio de cada especie de microalga y con la temperatura.

Por tanto, según los resultados obtenidos, los mayores valores de supervivencia se observaron en el cultivo de AF con *T. suecica*, en concreto con una concentración intermedia entre 200.000 y 300.000 cél mL^{-1} .

5. ENSAYOS PARA LA MEJORA DEL ENRIQUECIMIENTO DE METANAUPLIOS DE *Artemia franciscana* CON ANTIOXIDANTE

5.1. INTRODUCCIÓN

Los bajos niveles de ácidos grasos altamente insaturados (HUFAs) de *Artemia* hacen necesario someter a estos crustáceos a un proceso de enriquecimiento previo a su uso como presa viva. El enriquecimiento consiste en poner en contacto a los individuos de *Artemia* con un compuesto rico en DHA (ácido docosahexaenoico) y EPA (ácido eicosapentaenoico), con el fin de que se produzca su incorporación en el tracto digestivo de estos organismos, aprovechando su condición de filtradores no selectivos. A través de *Artemia* es posible vehicular compuestos como microalgas, levaduras, nutrientes esenciales como vitaminas o fosfolípidos, profilácticos, pigmentos o antibióticos (Tonheim, Koven y Rønnestad, 2000; Sorgeloos, Dhert y Candreva, 2001; Monroig *et al.*, 2007).

Uno de los métodos más utilizados para enriquecer *Artemia* son las emulsiones lipídicas, capaces de dispersarse en el agua de mar quedando disponibles para ser capturadas por el aparato filtrador de estos organismos, dentro de un rango de tamaños determinado. Los individuos, que incorporan estas emulsiones dispersas en el medio, actúan como vehículo vivo de compuestos ricos en HUFAs. Actualmente, se está estudiando el enriquecimiento de metanauplios de *Artemia* debido a la necesidad de individuos de tamaño más grande que sirvan como presa viva de paralarvas de *Octopus vulgaris*. De hecho, los tamaños de *Artemia* inferiores a 1,5 mm se suministran en los primeros días de vida, incrementándose el tamaño gradualmente a medida que las paralarvas se hacen más grandes (Navarro y Villanueva, 2000; Okumura *et al.*, 2005). Las emulsiones lipídicas se formulan a partir de aceites de pescado, ésteres etílicos de DHA, emulgentes, vitaminas,... Sin embargo, este procedimiento presenta ciertos inconvenientes como: elevado coste, autooxidación de los HUFAs (Sargent *et al.*, 1997, citado por Viciano, 2017), mortalidad alta de los individuos de *Artemia* (Figueiredo, 2009) y baja eficiencia, ya que no se han logrado alcanzar valores nutricionales similares a los del plancton marino. Además, el metabolismo de *Artemia* realiza una retroconversión de DHA en EPA, lo cual limita la eficiencia del enriquecimiento (Han, Geurden y Sorgeloos, 2001).

Los HUFAs son susceptibles a la oxidación o lo que es lo mismo, reacciones con oxígeno sin generación de energía. Por tanto, se utilizan sustancias antioxidantes para contrarrestar los posibles prooxidantes, que son los radicales libres y otras especies reactivas de oxígeno (ROS) (Betteridge, 2000). Las ROS se producen de forma natural durante diferentes procesos celulares propios del metabolismo aerobio, incluyendo la fosforilación oxidativa o la actividad de

las enzimas oxidorreductasas (Halliwell y Gutteridge, 2007, citado por Regoli y Giuliani, 2014). En el caso de la peroxidación lipídica, se origina cuando una especie suficientemente reactiva sustrae un átomo de hidrógeno a un grupo metileno de un HUFA (Soledad, 2011). La reacción de lipoperoxidación está compuesta por: a) formación de radicales libres, de forma que se inicia el proceso de oxidación; b) formación de hidroperóxidos como productos primarios de reacción; y c) formación de determinados productos secundarios y terciarios de oxidación (Kamal-Eldin y Pokorny, 2005).

En el cultivo de paralarvas de *O. vulgaris* y de larvas de peces como *Brachymystax lenok* (Zhang *et al.*, 2009) o *Solea senegalensis* (Cañavate, Zerolo y Fernández, 2006), el uso de dietas ricas en HUFAs puede inducir estrés oxidativo a través de la peroxidación lipídica, lo cual causa daño tisular debido a la formación de sustancias tóxicas como el ácido malondialdehídico (MAD). Además, se han analizado las defensas antioxidantes, así como la peroxidación lipídica, para evaluar el estado nutricional en el cultivo de paralarvas de pulpo (Varó *et al.*, 2013, citado por Garrido *et al.*, 2017).

El sistema de defensas antioxidantes de los organismos aeróbicos se encarga de neutralizar las ROS, y se pueden distinguir entre antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Un antioxidante es aquella sustancia que presenta bajas concentraciones respecto a la de un sustrato oxidable (biomolécula), retardando o previniendo su oxidación (Gil, 2010). Los antioxidantes enzimáticos o endógenos son sustancias naturales, es decir, las propias enzimas de un organismo como por ejemplo la catalasa (CAT), que convierte el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en hidrógeno y agua, la superóxido dismutasa (SOD) y otras enzimas dependientes de glutatión (glutatión peroxidasa, GPX y glutatión reductasa, GR) (Frontera, 2008). Los antioxidantes no enzimáticos o exógenos incluyen antioxidantes de bajo peso molecular, como la glutatión y la vitamina C (Zielinski y Pörtner, 2000). Es por esto que, estas moléculas pueden utilizarse como biomarcadores de estrés oxidativo ya que son capaces de producir un cambio biológico a nivel molecular, bioquímico o fisiológico que puede ser medido en un tejido, fluido biológico u organismo proporcionando evidencias de exposición a, y/o efectos de uno o más compuestos (Depledge, 1994).

Con el fin de evitar la oxidación de los HUFAs incorporados durante el enriquecimiento de *Artemia* con compuestos ricos en fosfolípidos, en el presente estudio se pretende determinar el efecto beneficioso o protector del uso de un antioxidante rico en polifenoles durante este proceso en metanauplios de AF de 3 días de edad. Para evaluar el efecto antioxidante en los metanauplios se han determinado la actividad catalasa y la peroxidación lipídica como biomarcadores de estrés oxidativo.

5.2. MATERIAL Y MÉTODOS

5.2.1. Condiciones experimentales

La eclosión de los quistes y el cultivo de *Artemia* se realizó siguiendo el procedimiento descrito en los apartados 3.2.1 y 3.2.2. Los ensayos de enriquecimiento se hicieron con metanauplios de 3 días de edad de AF, cultivados a 24 °C, con una concentración de la microalga *I. galbana* de 500.000 cél mL⁻¹, fotoperiodo 12 h luz :12 h oscuridad, aireación moderada y a una densidad de 10 ind mL⁻¹.

5.2.2. Enriquecimiento de metanauplios de *Artemia*

Los ensayos de enriquecimiento consistieron en incubar metanauplios de 3 días de edad de AF con el producto enriquecedor comercial lecitina marina LC60® (PhosphoTech Laboratoires, Saint Herblain, France), en combinación con un producto rico en polifenoles como antioxidante procedente de un extracto de olivo. Los tratamientos analizados se muestran en la figura 14 y el sistema utilizado para llevarlos a cabo en la figura 15. Las condiciones de enriquecimiento fueron aireación vigorosa, 28 °C, luz constante y densidad de 60 ind mL⁻¹ durante 6 horas, tal y como describe Garrido *et al.* (2017).

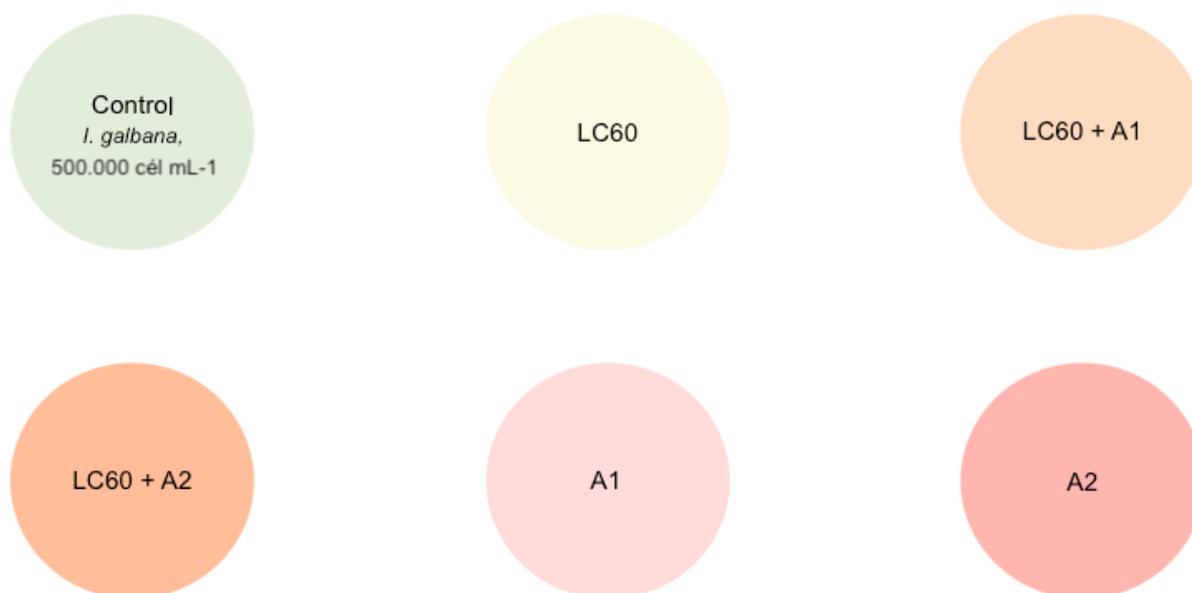


Fig. 14. Esquema de los distintos tratamientos a los que se han expuesto los metanauplios de 3 días de edad de AF. Control (*I. galbana*, 500.000 cél mL⁻¹), LC60 (lecitina marina, 0,6 g L⁻¹), LC60+A1 (0,6 g L⁻¹ de LC60 + 15 mg L⁻¹ de antioxidante), LC60+A2 (0,6 g L⁻¹ de LC60 + 30 mg L⁻¹ de antioxidante), A1 (15 mg L⁻¹ de antioxidante) y A2 (30 mg L⁻¹ de antioxidante).

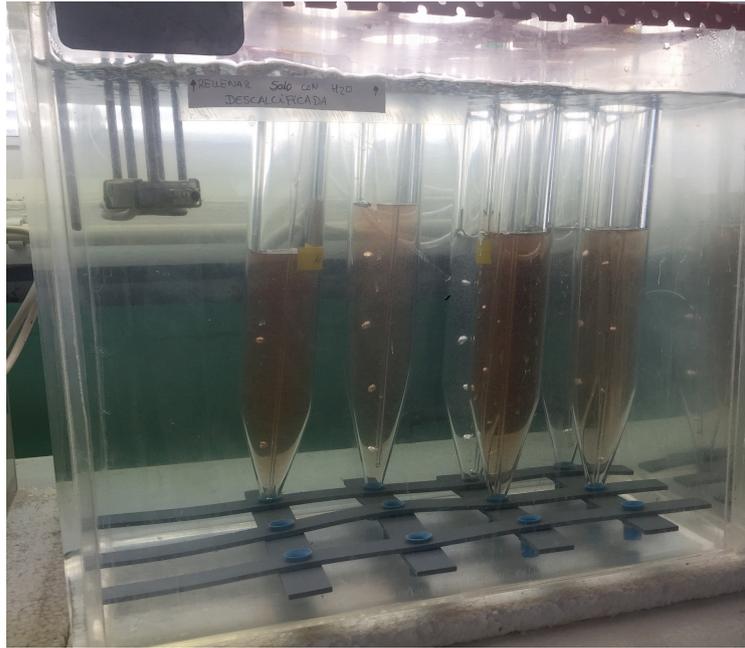


Fig. 15. Sistema utilizado para realizar los distintos tratamientos de enriquecimiento de metanauplios de 3 días de edad.

La dosis final del producto enriquecedor en el medio fue de $0,6 \text{ g L}^{-1}$, según recomienda el fabricante. La elaboración de los medios con enriquecedor LC60 se llevó a cabo disolviendo, con ayuda de un agitador, $0,6 \text{ g L}^{-1}$ del producto en agua de mar filtrada. Una vez preparado, se disolvían 15 mg mL^{-1} y 30 mg mL^{-1} de antioxidante para el tratamiento A1 y A2 respectivamente. Para los tratamientos que únicamente contenían la concentración A1 y A2 de antioxidante, se realizaron disolviendo directamente el antioxidante en agua de mar filtrada. Además, se utilizó como control un tratamiento que sólo contenía la microalga *I. galbana* a una concentración de $500.000 \text{ cél mL}^{-1}$. Pese a que se obtuvieron mejores valores de talla y supervivencia de AF en los cultivos de *T. suecica*, se escogió *I. galbana* para los ensayos de enriquecimiento porque tiene mayor valor nutricional en cuanto al contenido en HUFAs.

Una vez preparados los diferentes tratamientos, se procedía a filtrar un volumen conocido del cultivo de metanauplios con ayuda de una malla de tamaño de poro de $100 \mu\text{m}$, quedando retenidos los individuos sobre ella. Seguidamente, los metanauplios se resuspendían en tubos cilíndricos con ayuda del medio preparado para los diferentes tratamientos hasta un volumen máximo de 1 L , para que la densidad fuera $60 \text{ metanauplios mL}^{-1}$.

5.2.3. Toma de muestras

Tras las 6 h de enriquecimiento, se detuvo la aireación y se filtró el contenido de los diferentes tubos con los tratamientos a través de una malla de 100 μm . Los metanauplios se lavaron con abundante agua destilada para eliminar posibles restos de sal y del producto enriquecedor. Tras eliminar el exceso de agua de la biomasa recogida, ésta se repartió en tubos y se pesaron en una balanza analítica (peso húmedo), obteniendo muestras de 100 a 200 mg, que se guardaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis.

5.2.4. Determinación de parámetros de estrés oxidativo

Para evaluar el efecto antioxidante en los metanauplios de los diferentes tratamientos, durante los ensayos de enriquecimiento, se ha determinado el contenido en proteína total, la actividad catalasa y la peroxidación lipídica.

Tras descongelar en frío las muestras guardadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, se añadió a cada una 250 μL de tampón fosfato ($\text{pH} = 7,4$; KCl 180 mM + 1 mM EDTA + 0,1 % Triton) y se homogeneizó con un homogeneizador electrónico (ULTRA-TURRAX, IKA). Seguidamente, las muestras se centrifugaron durante 20 min, a 10.000 g y $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pasado este tiempo, se hicieron 5 alícuotas de 50 μL con el sobrenadante y se guardaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis bioquímico.

5.2.4.1. Proteína total

Se determinó la concentración de proteína total presente en las muestras, expresada en mg mL^{-1} , mediante el método Bradford (Bradford, 1976). De esta forma, es posible cuantificar la proteína de una muestra gracias a un cambio de color en función de su contenido total. Para ello se preparó una curva de calibrado con 7 concentraciones crecientes de albúmina sérica bovina o BSA, en un rango entre 0 a $0,5\text{ mg mL}^{-1}$.

El ensayo se realizó en una microplaca de 96 pocillos y consistió en pipetear por triplicado 10 μL de la muestra diluida (1:20) o de cada concentración de patrón de BSA. A continuación, se añadieron 200 μL de solución Bio-Rad diluido (1:5, v/v) a cada pocillo y se incubó en oscuridad a temperatura ambiente durante 15 min. Por último, se midió la absorbancia a 595 nm en un lector de microplaca TECAN (Ultra Evolution). La concentración de proteína total de las muestras se calculó a partir de los valores obtenidos de la recta patrón.

5.2.4.2. Catalasa

La actividad catalasa (CAT) se evaluó mediante el método basado en Aebi (1974). El ensayo se desarrolló siguiendo espectrofotométricamente la disminución de la absorbancia a 230 nm durante 1 min (6 ciclos) a 25 °C. El descenso de la absorbancia se debe a la transformación, catalizada por CAT, del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno.

En primer lugar, se preparó la solución de reacción (SR) a base de peróxido de hidrógeno (30 %, w/w) y tampón fosfato (100 mM, pH = 6,5). Seguidamente, se pipetearon 50 µL de muestra previamente diluida (1:10) y de SR (100 mM, pH = 6,5) para el blanco, por triplicado. El ensayo se realizó en una microplaca UV y consistió en añadir 200 µL de SR. Debido a la rapidez de la reacción cada muestra se analizó individualmente en un lector de microplaca TECAN (Ultra Evolution).

El cálculo de la actividad CAT (µmoles/min/mg proteína) se hizo según la fórmula:

$$\frac{\text{Pendiente} \left(\frac{\Delta Abs}{\text{min}} \right) * \text{Volumen total} (\mu L) * 1000 * \text{Factor de dilución}}{\epsilon (M^{-1} * cm^{-1}) * \text{Volumen muestra} (\mu L) * \text{Proteína} \left(\frac{mg}{mL} \right) * \text{Corrección paso luz}}$$

Los cálculos se basan en la ley de Lambert-Beer, siendo para este caso: $\epsilon = 40 M^{-1} \cdot cm^{-1}$ y la corrección de trayectoria de la luz para el volumen de ensayo (250 µL) 0,85 cm.

5.2.4.3. Peroxidación lipídica

El grado de peroxidación lipídica se determinó mediante la cuantificación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) utilizando 1,1,3,3-tetraethoxypropano (TEP) como estándar. Los lípidos oxidados se rompen para dar una serie de pequeñas moléculas, que incluyen entre ellas el malondialdehído (MAD). MAD reacciona con el TBARS dando lugar a un color “rosa brillante” que puede medirse en el espectrofotómetro a 532 nm, o por fluorescencia a 530 nm excitación/550nm emisión. La cuantificación de TBARS se hace tras la incubación a temperatura alta (95 °C) de las muestras con ácido acético (pH ácido 3.5) y ácido tiobarbitúrico (Ohkawa, Ohishi y Yagi, 1979).

Para el ensayo se utilizaron tubos de polipropileno de 3 mL con tapón de rosca a los que se añadieron 50 µL de patrón TEP o muestra, y a continuación, 8,1 % (p/v) de dodecil sulfato de sodio (SDS) con BHT al 0,05 %, ácido acético (pH = 3,5) al 20 % (v/v) y ácido tiobarbitúrico al 0,8 % (p/v). Seguidamente, se cerraron los tubos herméticamente y se incubaron en baño

maría a 95 °C durante 60 min. Para detener la reacción en las muestras, se pusieron en hielo durante 10 min.

En campana, se añadieron a cada muestra agua bidestilada y n-butanol-pyridine (15:1) y se agitó con ayuda de un vórtex. Para separar la fracción orgánica (color rosa) se centrifugaron las muestras a 10.000 g durante 5 min. A continuación, se procedió a pipetear muestra y patrón TEP por triplicado en una microplaca negra. Se midió la fluorescencia a 535 nm excitación y 550 nm emisión en un lector de microplaca TECAN (Ultra Evolution).

Los valores de peroxidación lipídica en cada muestra se determinaron a partir de la recta y se expresaron como nmols TBARS g⁻¹ de tejido (peso húmedo).

5.2.5. Análisis estadístico

A partir del test Shapiro-Wilk y de Levene se comprobó la normalidad y homogeneidad de las varianzas, respectivamente. Para comparar el contenido en proteína total, la actividad catalasa y la peroxidación lipídica de los metanauplios dependiendo del tratamiento aplicado, se realizó el análisis de la varianza de una vía (ANOVA de una vía), en caso de varianzas heterogéneas se utilizó la corrección Brown-Forsythe; seguido del test *post hoc* HDS de Tukey para varianzas homogéneas, o del test *post hoc* de Games-Howell para varianzas heterogéneas.

Los resultados se presentan como media ± desviación estándar. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el software IBM SPSS Statistics, con un nivel de significación del 95% ($p \leq 0,05$).

5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.1. Determinación de parámetros de estrés oxidativo

5.3.1.1. Proteína total

En cuanto al contenido en proteína total (Fig. 16), no se encuentran diferencias significativas ($p \geq 0,05$) entre los grupos expuestos a los distintos tratamientos. Estos resultados eran esperables puesto que los ensayos de enriquecimiento se realizaron durante 6 h con metanauplios de 3 días de edad cultivados bajo las mismas condiciones.

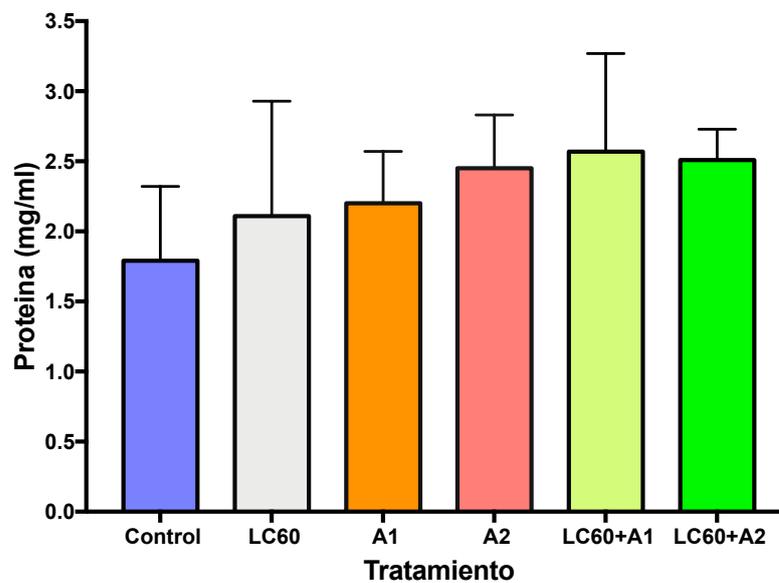


Fig. 16. Proteína total en metanauplios de AF de 3 días de edad tras el enriquecimiento según el tratamiento: Control (*I. galbana*, 500.000 cél mL⁻¹), LC60 (lecitina marina, 0,6 g L⁻¹), A1 (15 mg L⁻¹ de antioxidante), A2 (30 mg L⁻¹ de antioxidante), LC60+A1 (0,6 g L⁻¹ de LC60 + 15 mg L⁻¹ de antioxidante) y LC60+A2 (0,6 g L⁻¹ de LC60 + 30 mg L⁻¹ de antioxidante). Los resultados se presentan como media \pm desviación estándar.

5.3.1.2. Catalasa

Como se muestra en la figura 17, la actividad catalasa (CAT) en el grupo control y LC60 es significativamente mayor ($p \leq 0,05$) comparada con los resultados de los demás tratamientos, a excepción del grupo LC60, que no presentó diferencia con los grupos con antioxidante sólo (A1 y A2). En cambio, los metanauplios de grupos enriquecidos con LC60 y antioxidante (LC60+A1 y LC60+A2) presentaron niveles de actividad catalasa significativamente menores que los del grupo control y LC60, lo que corrobora el efecto beneficioso de la presencia del producto antioxidante en el medio al producir una disminución en la producción de ROS por parte de las células. Contrariamente a lo esperable, no se han encontrado diferencias significativas ($p \geq 0,05$) en la actividad CAT de los metanauplios expuestos al antioxidante (A1 y A2) y a LC60.

Es sabido que la actividad CAT juega un rol importante como enzima antioxidante en invertebrados marinos (Barata *et al.*, 2005). Según Jemec *et al.* (2008), un aumento de la actividad de la enzima CAT puede estar relacionado con el inicio de la producción de ROS.

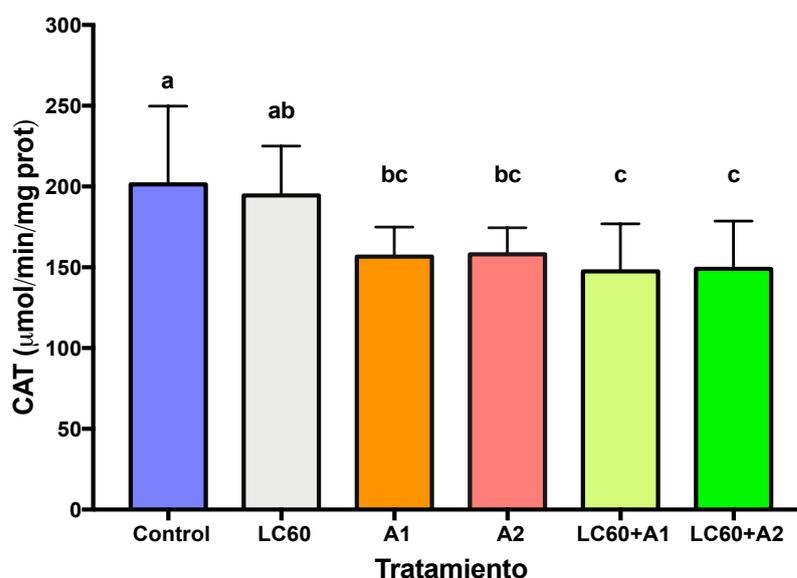


Fig. 17. Actividad catalasa en metanauplios de AF de 3 días de edad tras el enriquecimiento según el tratamiento: Control (*I. galbana*, 500.000 cél mL⁻¹), LC60 (lecitina marina, 0,6 g L⁻¹), A1 (15 mg L⁻¹ de antioxidante), A2 (30 mg L⁻¹ de antioxidante), LC60+A1 (0,6 g L⁻¹ de LC60 + 15 mg L⁻¹ de antioxidante) y LC60+A2 (0,6 g L⁻¹ de LC60 + 30 mg L⁻¹ de antioxidante). Distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo con el resultado del análisis de ANOVA de una vía ($p \leq 0,05$, ANOVA, *post hoc*, Tukey). Los resultados se presentan como media \pm desviación estándar.

Los resultados obtenidos en el presente estudio apoyan a los obtenidos previamente por Viciano *et al.* (2015). Estos autores encuentran una disminución significativa de la actividad CAT en nauplios de 24 h de AF cuando añaden un producto antioxidante (hidroxitirosol) en el medio durante el enriquecimiento, tras 21 h y a una densidad de 300 ind mL⁻¹.

5.3.1.3. Peroxidación lipídica

En la figura 18 se muestran los valores de peroxidación lipídica en metanauplios de 3 días de edad de AF tras el enriquecimiento con los distintos tratamientos. De acuerdo con el resultado del análisis de ANOVA de una vía, no hay diferencias significativas en los niveles de peroxidación lipídica en función del tratamiento ($p \geq 0,05$).

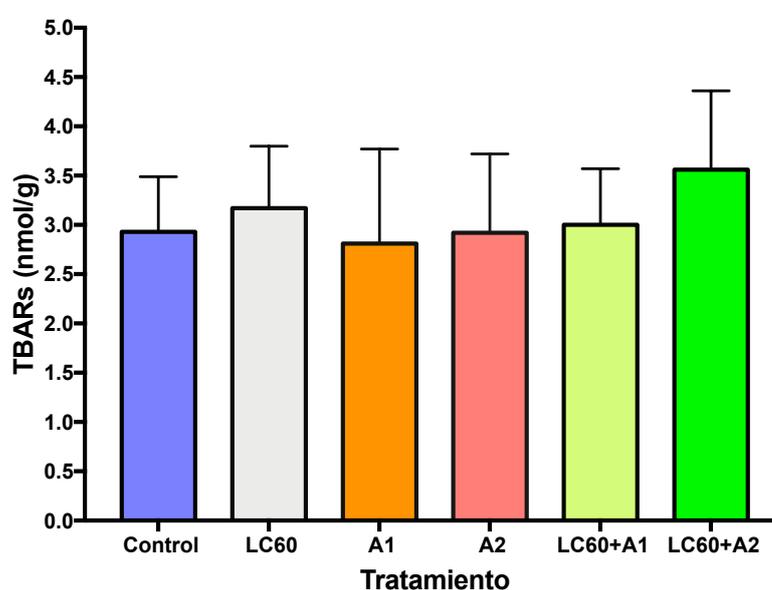


Fig. 18. Nivel de peroxidación lipídica (TBARS) en metanauplios de AF de 3 días de edad tras el enriquecimiento según el tratamiento: Control (*I. galbana*, 500.000 cél mL⁻¹), LC60 (lecitina marina, 0,6 g L⁻¹), A1 (15 mg L⁻¹ de antioxidante), A2 (30 mg L⁻¹ de antioxidante), LC60+A1 (0,6 g L⁻¹ de LC60 + 15 mg L⁻¹ de antioxidante) y LC60+A2 (0,6 g L⁻¹ de LC60 + 30 mg L⁻¹ de antioxidante). Los resultados se presentan como media \pm desviación estándar.

Según Viciano *et al.* (2015), en nauplios enriquecidos durante 21 h la peroxidación lipídica es mayor en los tratamientos con el producto enriquecedor en comparación con los grupos control y los suplementados con el antioxidante.

Contrariamente a los resultados obtenidos por Viciano *et al.* (2015), en el presente estudio realizado con metanauplios de 3 días, la adición de un antioxidante en el medio junto con el enriquecedor LC60 no disminuye la posible peroxidación lipídica que se pueda generar durante el proceso de enriquecimiento.

6. CONCLUSIONES

1. Los metanauplios de *A. franciscana* crecen más cuando se utiliza *T. suecica* como alimento, y la talla a los 3 y 6 días de edad aumenta con la concentración de microalgas.
2. La talla media de los metanauplios de *A. franciscana* cultivados con *I. galbana* sólo aumenta con la concentración de microalgas hasta los 3 días de edad.
3. Las tasas de filtración e ingestión de los metanauplios de *A. franciscana* son diferentes según la especie de microalgas usada como alimento.
4. La tasa de filtración de los metanauplios de *A. franciscana* es mayor cuando se usa *I. galbana*, y su valor más alto se obtiene a la concentración más baja ensayada de 300.000 cél mL⁻¹.
5. Independientemente del tamaño celular de las microalgas, parece haber una relación inversa entre las tasas de filtración e ingestión en los metanauplios de *A. franciscana*, encontrándose que al aumentar la concentración (cél mL⁻¹) de microalgas en el medio de cultivo, la tasa de filtración disminuye y la de ingestión aumenta.
6. Sólo los resultados de la actividad catalasa (CAT) sugieren que el uso combinado de un antioxidante rico en polifenoles junto con el LC60, tiene un efecto protector frente al estrés oxidativo ocasionado durante el proceso de enriquecimiento con sustancias prooxidantes ricas en HUFAs.
7. Por tanto, la combinación de antioxidantes con el producto enriquecedor, cuya finalidad es atenuar la autooxidación de los HUFAs de la emulsión, es una práctica interesante para neutralizar radicales libres y disminuir el estrés oxidativo de los metanauplios de *Artemia* durante del enriquecimiento.

7. FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

Como se ha mencionado a lo largo del trabajo, se requiere la optimización del enriquecimiento de metanauplios de *Artemia* debido a la necesidad de individuos de tamaño más grande que sirvan como presa viva de paralarvas de *O. vulgaris*. Para ello sería necesario estudiar la viabilidad de realizar cultivos masivos de AF aumentando la temperatura entre 26 – 28 °C, con el fin de obtener individuos de mayor tamaño (próximos a los 2 mm) en menos tiempo y abaratar costes en la producción de cultivos auxiliares.

Otro estudio interesante sería determinar los parámetros abióticos (Tª y salinidad) idóneos para cultivar *Artemia* de forma intensiva y controlada en el laboratorio, consiguiendo la reproducción ovovivípara de los individuos, de modo rentable también para abastecer la demanda del sector acuícola, principalmente acuariofílico.

Desde el punto de vista de la ingeniería genética, está la posibilidad de secuenciar el genoma de *Artemia* para modificarlo, de manera que su organismo sea capaz de sintetizar HUFAs, aunque esta práctica genera numerosas controversias sociales.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Aebi, H. (1974) *Methods of Enzymatic Analysis*. London: H.U. Bergmeyer.
- Amat, F. (1985a) *Utilización de Artemia en acuicultura*. Barcelona: Centro Nacional de Investigaciones Pesqueras.
- Amat, F. (1985b) *Biología de Artemia*. Barcelona: Centro Nacional de Investigaciones Pesqueras.
- Aragão, C., Conceição, L. E. C., Dinis, M. T. y Fyhn, H. (2004) Amino acid pools of rotifers and *Artemia* under different conditions: nutritional implications for fish larvae. *Aquaculture*, 234, pp. 429-445.
- Barata C., Varo, I., Navarro, J. C., Arun, S. y Porte, C. (2005) Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. *Comparative Biochemistry and physiology Part C: Toxicology & pharmacology*, 140, pp. 175-186.
- Bell, J. G., McEvoy, L. A., Estévez, A., Shields, R. J. y Sargent, J. R. (2003) Optimising lipid nutrition in first-feeding flatfish larvae. *Aquaculture*, 227, pp. 211-220.
- Betteridge D. (2000) What is oxidative stress? *Metabolism*, 49, pp. 3-8.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, pp. 248-254.
- Brito, D., Milani, N. y Pereira, G. (2006) Tasa de filtración e ingestión de *Simocephalus vetulus* (Müller, 1776) (Crustacea: Cladocera) alimentado con *Selenastrum capricornutum* (Printz, 1914) y *Chlorella vulgaris* (Beijerinck, 1890). *Interciencia*, 31 (10), pp. 753-757.
- Bowen, S. T., Davis, M. L., Fenster, S. R. y Lindwall, G. A. (1980) Sibling species of *Artemia*. EN: Persoone, G. et al. eds. *The Brine Shrimp Artemia*. Belgium: Universa Press.
- Cañavate, J. P., Zerolo, R. y Fernández, C. (2006) Feeding and development of Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae reared in different photoperiods. *Aquaculture*, 258, pp. 368-377.
- Depledge, M. H. y Fossi, M. C. (1994) The role of biomarkers in environmental assessment (2). Invertebrates. *Ecotoxicology*, 3 (3), pp. 161-172.

- Díaz, A., Ramírez, A., Godínez, D. y Gallo, C. (2006) Efecto del tamaño de las microalgas sobre la tasa de ingestión en larvas de *Artemia franciscana* (Kellog, 1906). *Zootecnia Trop.*, 24 (2), pp. 193-203.
- Dutrieu, J. (1960) Observations biochimiques et physiologiques sur le développement d'*Artemia salina* Leach. *Arch. Zool. Exp. Gen.*, 99, pp. 1-128.
- Evjemo, J. O., Coutteau, P., Olsen, Y. y Sorgeloos, P. (1997) The stability of docosahexaenoic acid in two *Artemia* species following enrichment and subsequent starvation. *Aquaculture*, 155, pp. 135-148.
- FAO (2016) *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos*. Roma: Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO.
- FAO (2017) *FAO Anuario: Estadísticas de pesca y acuicultura. 2015*. Roma: Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO.
- Fabre-Domergue, P. y Bietrix, E. (1905) *Développement de la sole (Solea vulgaris). Introduction à l'étude de la pisciculture marine. Travail du laboratoire de zoologie maritime de Concarneau*. Paris: Vuibert et Nony.
- Fábregas, J., Otero, A., Morales, E., Cordero, B. y Patiño, M. (1996) *Tetraselmis suecica* cultured in different nutrient concentrations varies in nutritional value to *Artemia*. *Aquaculture*, 143, pp. 197-204.
- Fernandes, P. (2009) *Composición bioquímica y crecimiento de paralarvas de pulpo (Octopus vulgaris Cuvier, 1797) alimentadas con juveniles de Artemia enriquecidos con microalgas y otros suplementos nutricionales*. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.
- Figueiredo, J., Van Woesik, R., Lin, J. y Narciso, L. (2009) *Artemia franciscana* enrichment model – How to keep them small, rich and alive? *Aquaculture*, 294, pp. 212-220.
- Frontera, W. (2008) *Medicina deportiva clínica*. Madrid: S.A. Elsevier España.
- Garrido, D., Varó, I., Morales, A. E., Hidalgo, M. C., Navarro, J. C., Hontoria, F., Monroig, O., Iglesias, J., Otero, J. J., Estévez, A., Pérez, J., Martín, M. V., Rodríguez, C., Almansa, E. y Cardenete, G. (2017) Assessment of stress and nutritional biomarkers in cultured *Octopus vulgaris* paralarvae: Effects of geographical origin and dietary regime. *Aquaculture*, 468, pp. 558-568.

- Gauld, D. T. (1951) The grazing rate of planktonic copepods. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. Cambridge University Press, 29 (3), pp. 695-706.
- Gelabert, R. (2001) *Artemia* bioencapsulation I. Effect of particle size on the filtering behavior of *Artemia franciscana*. *J. Crust. Biol.*, 21, pp. 435-442.
- Gil, Á. (2010) *Tratado de nutrición*. Madrid: Panamericana.
- Godínez, D., Gallo, M. C., Gelabert, R., Díaz, A., Gamboa, J., Landa, V. y Godínez, E. (2004) Crecimiento larvario de *Artemia franciscana* (Kellog, 1906) alimentada con dos especies de microalgas vivas. *Zootecnia Trop.*, 22 (3), pp. 265-276.
- Halliwell, B. y Gutteridge, J. M. C. (2007) *Free Radicals in Biology and Medicine*. New York: Oxford University Press.
- Hamazaki, H., Fukunaga, K., Yoshida, Y. y Maruyama, K. (1991) Effects of marine *Nannochloropsis* sp., on survival and growth on rearing pelagic paralarvae of *Octopus vulgaris*, and results of mass culture in the tank of 20 metric tons. *Saibai-Giken*, 19, pp. 75-84.
- Hamre, K., Yúfera, M., Rønnestad, I., Boglione, C., Concenição, L. E. C. e Izquierdo, M. (2013) Fish larval nutrition and feed formulation: knowledge gaps and bottlenecks for advances in larval rearing. *Reviews in Aquaculture*, 5, pp. S26-S58.
- Han, K., Geurden, I. y Sorgeloos, P. (2000) Enrichment strategies for *Artemia* using emulsions providing different levels of n-3 highly unsaturated fatty acids. *Aquaculture*, 183, pp. 335-347.
- Han, K., Geurden, I. y Sorgeloos, P. (2001) Fatty acid changes in enriched and subsequently starved *Artemia franciscana* nauplii enriched with different essential fatty acids. *Aquaculture*, 199, pp. 93-105.
- Hoff, F. y Snell, T. (1999) *Plankton Culture Manual*. 5ª ed. Florida: Florida Aqua Farms, Inc.
- Iglesias, J., Fuentes, L., Sánchez, J., Otero, J. J., Moxica, C. y Lago, M. J. (2006) First feeding of *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797 paralarvae using *Artemia*: Effect of prey size, prey density and feeding frequency. *Aquaculture*, 261, pp. 817-822.
- Iglesias, J., Otero, J., Moxica, C., Fuentes, L. y Sánchez, F. J. (2002) Paralarvae culture of octopus (*Octopus vulgaris*, Cuvier) using *Artemia* and crab zoeae and first data on juvenile growth up to eight months of age. *Aquaculture Europe*, 32, pp. 268-269.

- Iglesias, J., Sánchez, F. J., Bersano, J. G. F., Carrasco, J. F., Dhont, J., Fuentes, L., Linares, F., Muñoz, J. L., Okumura, S., Roo, J., van der Meeren, T., Vidal, E. A. G. y Villanueva, R. (2007) Rearing of *Octopus vulgaris* paralarvae: Present status, bottlenecks and trends. *Aquaculture*, 266, pp. 1-15.
- Kamal-Eldin, A. y Pokorny, J. (2005) *Analysis of lipid oxidation*. Nueva York: AOCS Publishing.
- Lavens, P., Léger, P. y Sorgeloos, P. (1989) Manipulation of the fatty acid profile in *Artemia* offspring produced in intensive culture systems. EN: De Pauw, N. *et al.* eds. *Aquaculture - a Biotechnology in Progress*, European Aquaculture Society, Bredene, Belgium, pp. 731-739.
- Lee, K., Park, H., Lee, S. y Kang, H. (2006) Effects of diets on the growth of the brackish water cyclopoid copepod *Paracyclops nana* Smirnov. *Aquaculture*, 256, pp. 346-353.
- Léger, P., Bengtson, D. A., Simpson, K. L. y Sorgeloos, P. (1986) The use and nutritional value of *Artemia* as a food source. *Oceanography and Marine Biology - Annual Review*, 24, pp. 521-623.
- Makridis, P. y Vadstein, O. (1999) Food size selectivity of *Artemia franciscana* at three development stages. *Journal of Plankton Research*, 21 (11), pp. 2191-2201.
- Mechaly, A. S., Cervellini, P. M. y Bambill, G. A. (2004) Experiencias preliminares con *Artemia persimilis* (Crustacea, Anostraca) como potencial alimento vivo en acuicultura. *Aquatic.*, 21, pp. 1-7.
- Medina, G.R. (2012) *El recurso de Artemia de Argentina: Biodiversidad y uso en acuicultura*. Tesis doctoral. Universidad de Valencia.
- Monroig, O. (2006) *Diseño y optimización de liposomas para su uso como sistema de suministro de nutrientes a larvas de peces marinos*. Tesis doctoral. Universidad de Valencia.
- Monroig, Ó, Navarro, J. C., Amat, F., González, P. y Hontoria, F. (2007) Oxidative stability and changes in the particle size of liposomes used in the *Artemia* enrichment. *Aquaculture*, 266, pp. 200-210.
- Moraiti-Ioannidou, M., Castritsi-Catharios, J., Miliou, H. y Sorgeloos, P. (2009) Biochemical composition and digestive enzyme activity during naupliar development of *Artemia* spp from three solar saltworks in Greece. *Aquaculture*, 286, pp. 259-265.

- Moxica, C., Linares, F., Otero, J. J., Iglesias, J. y Sánchez, F. J. (2002) Cultivo intensivo de paralarvas de pulpo, *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797, en tanques de 9 m³. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.*, 18, pp. 31-36.
- Müller-Feuga, A., Robert, R., Cahu, C., Robin, J. y Divanach, P. (2003) Uses of microalgae in aquaculture. EN: Støttrup, J.G. y McEvoy, L.A. eds. *Live Feeds in Marine Aquaculture*. Oxford: Blackwell Science Ltd.
- Navarro, J. y Villanueva, R. (2000) Lipid and fatty acid composition of early stages of cephalopods: an approach to their lipid requirements. *Aquaculture*, 183, pp. 161-177.
- Ohkawa, H., Ohishi, N. y Yagi, K. (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95, pp. 351-358.
- Okumura, S., Kurihara, A., Iwamoto, A. y Takeuchi, T. (2005) Improved survival and growth in *Octopus vulgaris* paralarvae by feeding large type *Artemia* and Pacific sandeel, *Ammodytes personatus*. Improved survival and growth of common octopus paralarvae. *Aquaculture*, 244, pp. 147-157.
- Olesen, J. (2014) Anostraca. EN: Martin, J. W. et al. eds. *Atlas of Crustacean Larvae*. Baltimore: Johns Hopkins University Press,
- Patil, V., Källqvist, T., Olsen, E., Vogt, G. y Gislerød, H. R. (2007) Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed. *Aquaculture International*, 15 (1), pp. 1-9.
- Puello, A., González, B. y García, A. (2008) *Investigación en producción y uso de copépodos en larvicultura marina*. IX Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, 24-27 de noviembre de 2008, Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
- Redón, S. (2015) *Parasitismo por cestodos en Artemia spp. y su implicación en la invasión biológica de Artemia franciscana en la región Mediterránea*. Tesis doctoral. Universidad de Valencia.
- Reeve, M. (1963) The filter-feeding of *Artemia*. I. In pure cultures of plant cells. *Journal of Experimental Biology*, 40, pp. 195-205.
- Regoli, F. y Giuliani, M. (2014) Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. *Marine Environmental Research*, 93, pp. 106-117
- Ruiz, 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 doctoral. Universidad de Valencia.

- Sargent, J. R., McEvoy, L. A. y Bell, J. G. (1997) Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feed. *Aquaculture*, 155, pp. 177-127.
- Sargent, J. R., McEvoy, L. A., Estévez, A., Bell, G., Bell, M., Henderson J. y Tocher, D. (1999) Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. *Aquaculture*, 179, pp. 217-229.
- Schneider, C., Rasband, W. y Eliceiri, K. (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, 9 (7), pp. 671-675.
- Seixas, P., Rey-Méndez, M., Valente, L. y Otero, A. (2008) Producing juvenile *Artemia* as prey for *Octopus vulgaris* paralarvae with different microalgal species of controlled biochemical composition. *Aquaculture*, 283, pp. 83-91.
- Soledad, N. (2011) *Peroxidación de diferentes especies lipídicas: Efecto de antioxidantes*. Tesis doctoral. Universidad Nacional de la Plata.
- Sorgeloos, P., Lavens, P., Léger, P. H., Tackaert, W. y Versichele, D. (1986) *Manual for the Culture and Use of Brine Shrimp Artemia in Aquaculture*. Belgium: Artemia Reference Center.
- Sorgeloos, P., Dhert, P. y Candreva, P. (2001) Use of the brine shrimp, *Artemia* spp., in marine fish larviculture. *Aquaculture*, 200, pp. 147-159.
- Tocher, D. R. (2003) Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in Fisheries Science*, 11, pp. 107-184.
- Tocher, D. (2010) Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. *Aquacult. Res.*, 41, pp. 717-732.
- Tocher, D. R. (2015) Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids and aquaculture in perspective. *Aquaculture*, 449, pp. 94-107.
- Tonheim, S. K., Koven, W. y Rønnestad, I. (2000) Enrichment of *Artemia* with free methionine. *Aquaculture*, 190, pp. 223-235.
- Van Stappen, G. (1996) Introduction, Biology and Ecology of *Artemia*. EN: Lavens P. y Sorgeloos P. eds. *Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture*, 361, pp. 101-121. Roma: FAO.
- Van der Meeren, T., Olsen, R. E., Hamre, K. y Fyhn, H. (2008) Biochemical composition of copepods for evaluation of feed quality in production of juvenile marine fish. *Aquaculture*, 274, pp. 375-397.

- Varó, I., Navarro, J. C., Iglesias, J., Otero, J. J., Sánchez, J., Almansa, E., Monroig, Ó., Hontoria, F., Morales, A. E. y Cardenete, G. (2013) Studies on the characterisation of biomarkers of nutritionally-derived stress in paralarval culture of the common octopus (*Octopus vulgaris*). *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.*, 78, pp. 473-475.
- Viciano, 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 doctoral. Universidad de Valencia.
- Viciano, E., Monroig, Ó., Barata, C., Peña, C. y Navarro, J. C. (2015) Antioxidant activity and lipid peroxidation in *Artemia* nauplii enriched with DHA-rich oil emulsion and the effect of adding an external antioxidant based on hydroxytyrosol. *Aquaculture research*.
- Volkman, J. K., Jeffrey, S. W., Rogers, G. I., Nicholas, P. D., Garland, V. (1989) Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 128, pp. 219-240.
- Watanabe, T., Ohta, M., Kitajima, C. y Fujita, S. (1982) Improvement of dietary value of brine shrimp *Artemia salina* for fish larvae by feeding them on w3 highly unsaturated fatty acids. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish*, 48, pp. 1775-1782.
- Zhang, H., Mu, Z., Xu, L. M., Xu, G., Liu, M. y Shan, A. (2009) Dietary lipid level induced antioxidant response in manchurian trout, *Brachymystax lenok* (Pallas) larvae. *Lipids*, 44, pp. 643-654.
- Zielinski, S. y Pörtner, H. O. (2000) Oxidative stress and antioxidative defense in cephalopods: a function of metabolic rate or age? *Comp. Biochem. Physiol. B.*, 125, pp. 147-160.