

DESARROLLO DE LAS TÉCNICAS DE
CULTIVO Y ESTUDIO DEL METABOLISMO
RESPIRATORIO DE MISIDÁCEOS

Alicia Herrera Ulibarri

Índice general

1. Introducción	2
1.1. Características generales	2
1.2. Reproducción y desarrollo embrionario	5
1.3. Importancia ecológica	8
1.4. Utilización en acuicultura	9
1.5. Cultivo de misidáceos	10
1.6. Calidad nutricional	13
1.7. Metabolismo respiratorio	14
1.8. Objetivos	19
2. Material y Métodos	20
2.1. Identificación de especies	20
2.2. Sistemas de cultivo	22
2.3. Supervivencia y producción	24
2.4. Relación entre biomasa y longitud en <i>Leptomysis lingvura</i>	25
2.5. Crecimiento y ciclo de vida de <i>L.lingvura</i>	26
2.6. Calidad nutricional	27
2.7. Metabolismo respiratorio de <i>L.lingvura</i>	28
3. Resultados y Discusión	30
3.1. Identificación de especies	30
3.2. Sistemas de cultivo	33
3.3. Supervivencia y producción	35
3.4. Relación entre biomasa y longitud en <i>Leptomysis lingvura</i>	41
3.5. Crecimiento y ciclo de vida de <i>L.lingvura</i>	45
3.6. Calidad nutricional	50
3.7. Metabolismo respiratorio en <i>L.lingvura</i>	55
4. Conclusiones	64
Bibliografía	68

Capítulo 1

Introducción

1.1. Características generales

El orden Mysidacea se encuentra dentro del filum Arthropoda, subphylum Crustacea, clase Malacostraca, superorden Peracárida (Bowman & Abele, 1982).

Se conocen 780 especies de misidáceos distribuidos entre alrededor de 120 géneros, cada una de las cuales son identificadas a través de las diferencias en su morfología externa, especialmente el rostro, la estructura de apéndices tales como pleópodos, escama antenal, urópodos y el telson (Mauchline, 1980; Murano, 1999)(figura 1.1).

Los adultos presentan casi todos los somitas torácicos y cefálicos cubiertos por el caparazón, que está fusionado dorsalmente con la región cefálica pero está libre luego de los cuatro segmentos torácicos anteriores.

La región cefálica presenta cinco pares de apéndices: anténula, antena, mandíbula, maxilula y maxila. Los pereiópodos son los apéndices torácicos, son ocho y constan de endopodito y exopodito.

En el abdomen se encuentran cinco pares de pleópodos, formados por endópodo y exópodo; y el último segmento, llamado telson, posee un par de urópodos, también constituidos por exópodo y endópodo (Murano, 1999).

Los misidáceos son similares en su aspecto general a los eufausiáceos, en la actualidad se reúnen dentro del orden *Schizopoda*; las principales diferencias entre ambos grupos se muestran en la tabla 1.1 (Murano, 1999).

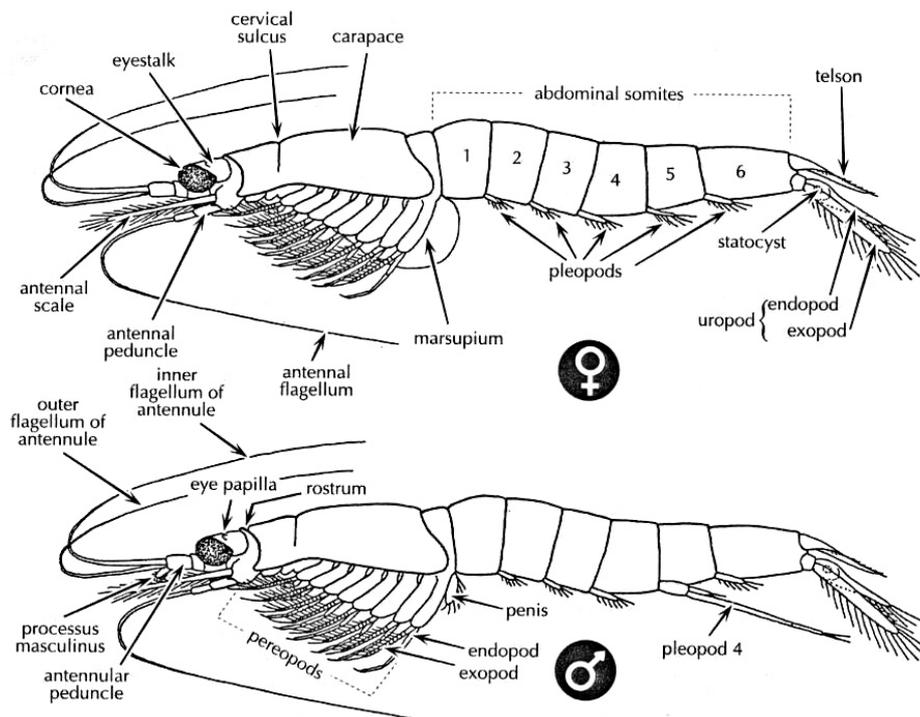


Figura 1.1: Morfología externa de un misidáceo típico en vista lateral. De Murano (1999).

Tabla 1.1: Diferencias entre misidáceos y eufausiáceos, en Murano (1999)

	Misidáceos	Eufausiáceos
Caparazón	no fusionado del cuarto al octavo segmento torácico	fusionado con todos los segmentos torácicos
Endópodos del primer y segundo pereiópodo	modificado en gnatópodos	no modificado
Branquias	ausentes o cubiertas por el caparazón	desarrolladas en las bases de las extremidades torácicas
Estatocisto	generalmente presente en endópodos de los urópodos	no presenta en los endópodos de los urópodos
Pleópodos de la hembra	generalmente reducidos a un único lóbulo inarticulado	desarrollado en órgano natatorio bilobulado
Órgano copulatorio del macho	generalmente en el tercer o cuarto pleópodo o en ambos	desarrollado en la parte interna de los lóbulos del primer y segundo pleópodo
Fases larvarias	no presenta	numerosas

1.2. Reproducción y desarrollo embrionario

Todas las especies del orden Mysidacea llevan sus crías en el marsupio, donde tiene lugar el desarrollo larvario (Wittmann, 1978; Mauchline, 1980) (figura 1.2a). Los huevos emergen en el seno del marsupio desde la abertura genital externa de los oviductos que se encuentran cerca de la base del sexto par de pereiópodos.

Los machos implantan la masa espermática en el marsupio inmediatamente después que los huevos son expulsados, la cópula tiene lugar durante la noche y dura unos pocos segundos (Mauchline, 1980).

El término huevo es utilizado con frecuencia para denominar a la etapa temprana del embrión, los huevos en el sentido estricto de la palabra no se encuentran en el marsupio, ya que son inmediatamente fecundados.

La salida de las larvas del marsupio tiene lugar durante la noche en un período corto de tiempo, desde unos pocos minutos a una hora.

Luego de las puestas, la hembra comienza nuevamente el ciclo de muda, cópula y puesta (Murano, 1999).

Para denominar las etapas embrionarias Mauchline (1980) utiliza la siguiente terminología:

Etapas I: embriones tempranos, esféricos o semiesféricos. En esta etapa aparecen rudimentos de antenas y se desarrolla el abdomen.

El número de embriones tempranos contenidos en el marsupio depende del tamaño del cuerpo de la hembra, del tamaño de los huevos, la temperatura, latitud, y estación del año.

Etapas II: Antenas y apéndices torácicos son desarrollados en esta etapa y los ojos pigmentados. Esta etapa termina con una muda.

Etapas III: La larva tiene ahora ojos pedunculados, esta etapa termina con una muda que se lleva a cabo en el marsupio poco después que las larvas son liberadas. Según la terminología propuesta por Wittmann (1981) para describir el desarrollo marsupial en *Leptomysis* (figura 1.3), los embriones pasan por tres etapas principales:

Estadio Embrionario: Dura 4-5 días y termina con la eclosión de la membrana del huevo.

Estadio Nauploide: el nauploide tiene las características más importantes de la etapa clásica de nauplio. Se forman todos los apéndices y segmentos del adulto. Abarca desde el día 4-5 hasta el 11-12, y termina con la primera muda del embrión (figura 1.2 b).

Estadio Postnauploide: Desde el día 11-12 hasta el día 14-15. En esta etapa ya están presentes y bien desarrollados todos los apéndices del adulto, pero todavía

están poco especializados. Se consume el vitelo y aparece el estómago. Termina con la liberación del juvenil y la consecuente muda.

Las larvas no son capaces de alimentarse hasta después de la muda. Luego de la muda el juvenil tiene todo el aspecto de un adulto en miniatura, pero no tiene bien desarrollado el estatocisto, ya que los estatolitos no están presentes. Luego de 10 horas los estatolitos ya están bien formados.

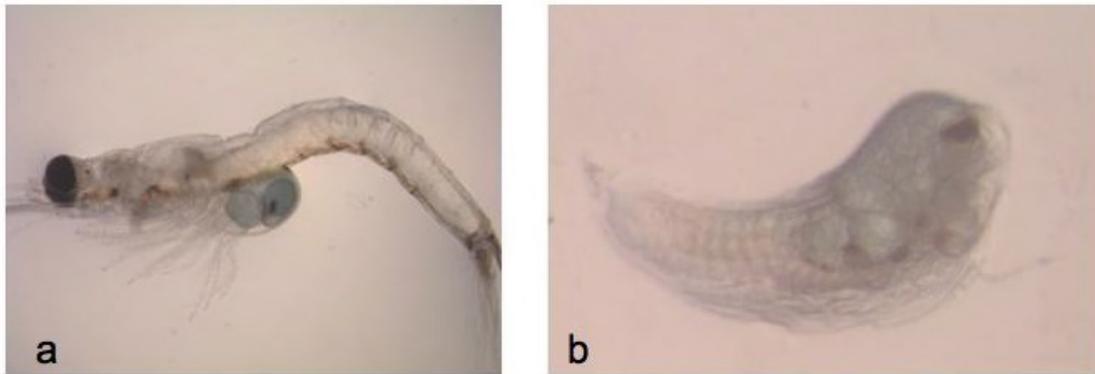


Figura 1.2: a. Hembra con embriones en el marsupio. b. Naupliode de *Leptomysis lingvura* removido del marsupio. Fotos: A.Herrera.

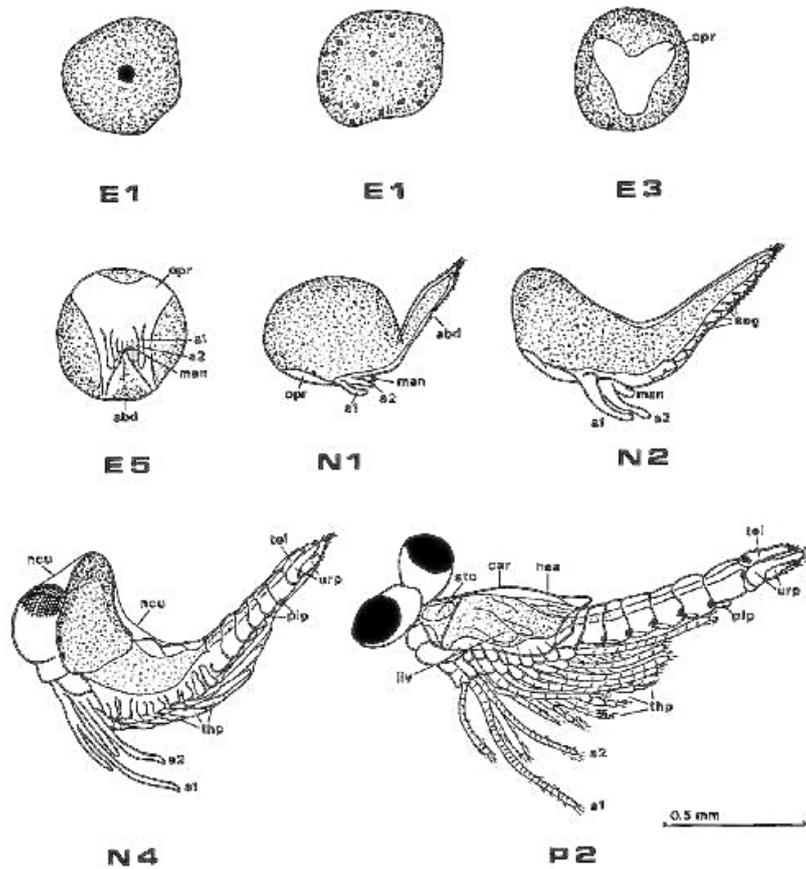


Figura 1.3: Desarrollo marsupial en *Leptomysis lingvura*. E. estadios embrionarios. N. estadios nauplioides. P. estadios postnauplioides. De Wittmann (1981).

1.3. Importancia ecológica

Los misidáceos pueden habitar en distintos tipos de ambientes, en la columna de agua, sobre o dentro de los sustratos del fondo, en cuevas o como comensales de otros animales. La mayoría de los misidáceos costeros realiza una migración vertical, ascendiendo y dispersándose en la columna de agua durante la noche, y descendiendo durante el día (Mauchline, 1980; Murano, 1999).

Las especies estudiadas son costeras y se encuentran en nubes densas cercanas a las rocas, entre 5 y 15 metros de profundidad.

Los misidáceos son omnívoros, en los contenidos estomacales de individuos colectados cerca de la costa, se encontraron detritos, cuerpos y apéndices de pequeños crustáceos y pequeñas cantidades de conchas de diatomeas (Murano, 1999).

Estudios sobre la relación entre misidáceos y peces, indican que los misidáceos son uno de los alimentos más importantes para los peces, especialmente en ambientes costeros, donde se encuentran en abundancia (Murano, 1999).

Son importantes como alimento de estadios juveniles de peces y moluscos; varios autores indican que son uno de los alimentos más importantes en zonas de cría y también como alimento de adultos de distintas especies (Castro, 1995; Mauchline, 1980; Murano, 1999).

En Gran Canaria no se conocen estudios de taxonomía o ecología a excepción de un primer inventario de las especies de misidáceos de la costa de Canarias y Madeira (Wittmann and Wirtz, 1998), y el trabajo de Castro (1995) que identifica varias especies en base a los restos encontrados en el contenido estomacal de la caballa *Scomber japonicus* (Houttuyn, 1782) capturados entre marzo de 1988 y mayo de 1989.

Scomber japonicus representa el 52% del pescado de tamaño medio de las Islas Canarias, su contenido estomacal proporciona buena información sobre la abundancia de eufáusidos y misidáceos (Castro, 1995). En base a los datos obtenidos sobre el porcentaje de misidáceos y eufausiáceos en el contenido estomacal y a la estimación acústica de abundancia de *Scomber japonicus* en la región; y dado que dicha especie consume diariamente un 8% de su peso corporal en crustáceos y un 2,5% en peces (anchoa), Castro (1995) estima la biomasa que consume anualmente esta especie en 242.000 toneladas de misidáceos y 29.000 toneladas de eufáusidos. En el citado trabajo el autor postula que los misidáceos, especialmente los que poseen patrones de migración pronunciados juegan un importante papel en las Islas Canarias y atribuye el que no se refleje su abundancia en los muestreos a los métodos utilizados, ya que estas especies tienen patrones de comportamiento muy específicos, y muchas de ellas viven asociadas al fondo.

En ecología de los organismos marinos es frecuente utilizar relaciones alométricas entre peso (W) y longitud (L), en la mayoría de los casos, la ecuación:

$$W = aL^b \quad (1.1)$$

la transformada logarítmicamente:

$$\ln W = \ln(a) + b * \ln(L)^b \quad (1.2)$$

es la que mejor correlación presenta.

Las relaciones alométricas permiten obtener estimaciones de la biomasa (en mg de proteínas) a partir de la longitud estándar de los organismos.

En misidáceos la longitud puede ser determinada como longitud total (TL), desde la base de los pedúnculos oculares o el inicio del rostro, hasta el final del telson y los urópodos, sin incluir las espinas. Otra medida frecuentemente utilizada es la longitud estándar (SL), desde el inicio del rostro hasta el final del último segmento abdominal.

Estas relaciones han sido utilizadas por varios autores (Mauchline, 1980) para obtener datos de biomasa a partir de medidas de longitud, más fáciles de obtener en la práctica.

1.4. Utilización en acuicultura

Los misidáceos han demostrado ser un alimento de muy buena calidad para las fases juveniles de sepia *Sepia officinalis* (Domínguez *et al.*, 2001a), y para adultos de caballito de mar *Hippocampus hippocampus* e *Hippocampus abdominalis* (Molina *et al.*, 2007; Otero *et al.*, 2007; Woods and Valentino, 2003).

La obtención de un cultivo de misidáceos puede ser un primer paso para su cultivo a gran escala que pueda sustituir o complementar a los cultivos que se utilizan actualmente en acuicultura, ya que presentan un tamaño adecuado como presa y una buena calidad nutricional (Domínguez *et al.*, 2000, 2001a; Guevara *et al.*, 2005). *Artemia* y rotíferos que son los alimentos vivos mas utilizados presentan varios inconvenientes; ninguno es presa natural en el medio marino, por lo que, en muchos casos son alimentos inadecuados sobre todo en los primeros estadios de vida, como ocurre en el cultivo de cefalópodos (Domínguez *et al.*, 2000); y la fluctuación en el precio de los cistes de *Artemia* eleva los costes de producción.

1.5. Cultivo de misidáceos

El cultivo de misidáceos ha sido estudiado por varios autores y llevado a cabo con éxito para estudios de laboratorio y exámenes de toxicidad del agua (Reitsema, 1980; Ward, 1984; Lussier *et al.*, 1996; Norton *et al.*, 1999; Domínguez *et al.*, 1999a,b, 2001b; Verslycke *et al.*, 2004).

En general los sistemas presentados por distintos autores (Reitsema, 1980; Lussier *et al.*, 1988) consisten en tanques plásticos o acuarios de vidrio con sifones que separan los juveniles de los adultos (figura 1.4), ya que en misidáceos se han observado casos de canibalismo (Lussier *et al.*, 1988).

La mayor parte de la literatura disponible sobre cultivo hace referencia a las especies del género *Mysidopsis* (Reitsema, 1980; Ward, 1984; Lussier *et al.*, 1988; Kuhn *et al.*, 1991; Domínguez *et al.*, 1999b, 2001b), frecuentemente utilizadas en ecotoxicología, aunque también algunas de las especies presentes en Gran Canaria han sido cultivadas con éxito; *Leptomysis lingvura* (Wittmann, 1981) y *Siriella armata* (Cuzin-Roudy and Tchernigovtzeff, 1985).

Muchas especies del género *Mysidopsis* toleran distintos rangos de salinidad ya que son especies que viven en estuarios, por lo tanto, las condiciones de cultivo serán diferentes a las de las especies encontradas en Gran Canaria, sin embargo muchos de las recomendaciones respecto a las condiciones de cultivo son aplicables también a estas especies.

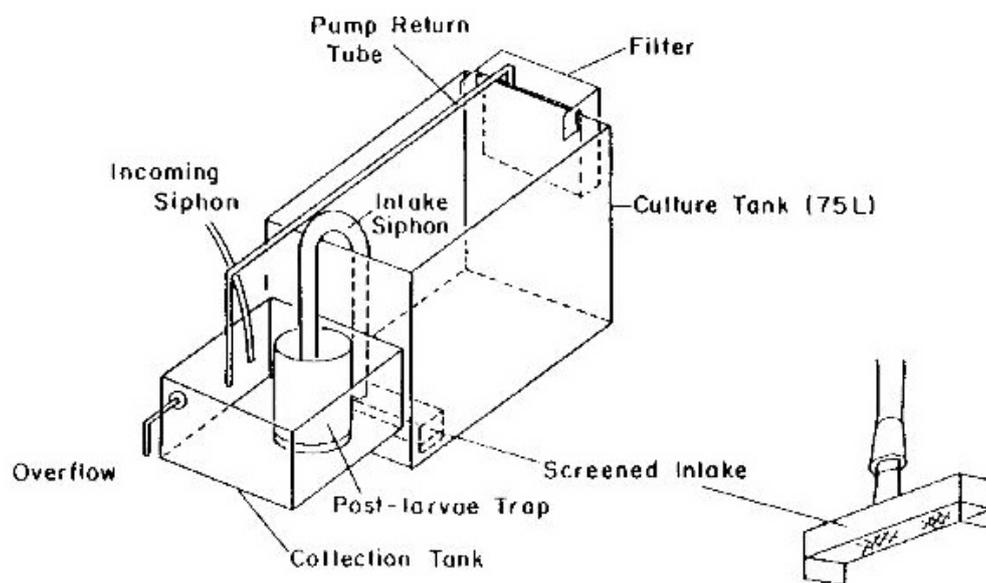


Fig. 1. A mysid generator.

Figura 1.4: Sistema de cultivo de misidáceos. De Lussier et al.,1988

Según Lussier *et al.* (1988) algunos de los aspectos más importantes a tener en cuenta a la hora de cultivar misidáceos son:

-Una buena aireación que mantenga el oxígeno disuelto por encima de 2,8 a 3 mg/L (concentración óptima de 7,0 mg/L), que además ayude a mantener el alimento en suspensión.

-El pH debe mantenerse por encima de 7,8.

-Densidad de 10-50 misidáceos por litro, con una relación hembras:machos 2:1.

-Control diario de temperatura, pH, salinidad, oxígeno, amonio, nitrito y nitrato.

-En sistemas de recirculación es recomendable un filtro biológico que contenga *Spirulina subsalsa*, y un recambio de 10-100 % semanal.

-Para la alimentación, se recomienda el alimento vivo, ya que estimula la respuesta táctil del organismo, las presas deben ser de tamaño adecuado. Los nauplios de 48 horas de *Artemia* son un alimento adecuado, y otros suplementos pueden ser las diatomeas *Skeletonema sp.* y *Nitzschia sp.*, el alga verdeazulada *Spirulina subsalsa* y el rotífero *Brachionus plicatilis*.

-El alimento debe ser suministrado en abundancia (150 nauplios de *Artemia* por misidáceo), por lo menos dos veces al día para prevenir el canibalismo de sus propias crías o entre los adultos.

1.6. Calidad nutricional

El estudio del contenido de ácidos grasos es de gran importancia en acuicultura ya que los peces como otros vertebrados requieren tres ácidos grasos polinsaturados de cadena larga (PUFA) para su normal crecimiento y desarrollo: ácido docosahexaenoico (DHA), ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido araquidónico (AA) (Sargent *et al.*, 1997, 1999). Estos ácidos grasos cumplen con dos funciones fundamentales:

- 1- cumplen un rol en el mantenimiento de la estructura y función de las membranas celulares.

- 2- son precursores de un grupo de hormonas altamente activas conocidas como eicosanoides.

En términos generales los eicosanoides se producen como respuesta al estrés. Se forman mayoritariamente a partir de AA, y también a partir de EPA aunque estos eicosanoides son biológicamente menos activos que los los formados a partir de AA. El EPA inhibe competitivamente la formación de eicosanoides a partir de AA, y además los eicosanoides formados a partir de EPA interfieren competitivamente con las acciones de los eicosanoides formados a partir de AA (Sargent *et al.*, 1997, 1999).

La función de los eicosanoides está determinada entonces por la relación DHA:EPA:AA. Determinar cual es la relación óptima entre estos tres ácidos grasos es difícil en la práctica, ya que la producción de eicosanoides es probable que difiera entre cada especie. Sargent *et al.* (1999) sugieren analizar las presas de cada especie en su medio natural, ya que ambas especies, depredador y presa, están bien adaptadas al mismo entorno en términos de lograr un óptimo comportamiento por un óptimo desarrollo neuronal y respondiendo de forma eficaz al estrés ambiental por una producción óptima de eicosanoides.

Como se ha mencionado anteriormente los misidáceos son la presa natural de muchas especies de peces pelágicos costeros y oceánicos, como la caballa *Scomber japonicus* (Castro, 1995), sería de gran interés para la pesquería y la acuicultura de la región conocer la composición de ácidos grasos y la relación DHA:EPA:AA de los misidáceos presentes, tanto salvajes como cultivados, ya que ayudaría a entender los requerimientos nutricionales de estos peces.

1.7. Metabolismo respiratorio

En los últimos tiempos el estudio de la respiración en el océano ha tomado mucho impulso, ya que la concentración de dióxido de carbono (CO_2) en la atmósfera está alcanzado una cifras récord a nivel mundial, 383 partes por millón (ppm) en el 2007, según las mediciones realizadas desde el Observatorio Mauna Loa, en Hawai (www.esrl.noaa.gov).

El aumento desproporcionado de los niveles de CO_2 puede traer consigo un aumento global de la temperatura a causa de lo que se conoce como efecto invernadero, por el cual determinados gases presentes en la atmósfera retienen parte de la energía que el suelo emite al ser calentado por la radiación solar.

Se consideró el CO_2 antropogénico como el principal responsable del cambio climático. El informe presentado por el Panel Intergubernamental para el Cambio Climático (IPCC) (Filho *et al.*, 1996) mostraba que la cantidad de CO_2 acumulado en la atmósfera era menor a la esperada, considerando el volumen de emisiones de dicho gas producido hasta esa fecha.

En principio, el papel de sumidero de CO_2 fue atribuído fundamentalmente a la biota terrestre, sin embargo, se consideró mas tarde que el océano podría estar jugando un rol fundamental en el mecanismo de reducción del CO_2 atmosférico.

Por actividad antropogénica se liberan a la atmósfera unas $7 \pm 1.2 \text{ Gt.C. año}^{-1}$, de las cuales, aproximadamente, $2 \text{ Gt. C. año}^{-1}$ son absorbidas por los océanos (Falkowski and Wilson, 1992).

Surge así la hipótesis de la bomba biológica, y con ella fue tomando trascendencia el estudio de los mecanismos que regulan los flujos de carbono en el océano. En las últimas décadas, el papel que juega el zooplancton en los intercambios de carbono ha sido objeto de un amplio estudio (Del Giorgio and Williams, 2005).

Dado que la respiración es un claro índice de la actividad fisiológica de una población, es importante conocer la tasa de consumo de O_2 para estudiar los procesos implicados en la producción secundaria y en la transferencia de energía debido al zooplancton en los ecosistemas marinos (Gómez *et al.*, 1996).

La estimación directa de las tasa de respiración se realiza midiendo los cambios en la concentracin de O_2 de organismos incubados en ambientes controlados, pero este método presenta la desventaja de tener que reproducir las condiciones naturales en el laboratorio, y como resultado, tal vez ocurran cambios en el estado fisiológico de los organismos, por ejemplo al estrés debido la manipulación.

Estas variables son muy difíciles de cuantificar y tener en cuenta a la hora de medir la respiración in situ en el zooplancton, el método del sistema de transporte de electrones (ETS) (Packard, 1971) no presenta estos inconvenientes, ya que es una técnica bioquímica basada en las enzimas que controlan la respiración celular a

través del sistema de transporte de electrones y se utiliza para obtener un índice de la potencialidad respiratoria de los organismos.

Sabemos que la respiración es limitada por la alimentación, también sabemos que el ETS controla el 90 % e incluso más de la medida fisiológica del consumo de O_2 . En condiciones de alimentación por debajo de niveles óptimos la actividad ETS no disminuye. Se plantea el estudio de la respiración con el fin de cuantificar como la actividad ETS es modulada por los niveles fisiológicos de las tasas respiratorias, es decir, poder determinar la relación Respiración-ETS (R/ETS) en diferentes condiciones fisiológicas.

Los organismos vivos obtienen energía de la oxidación de materia orgánica, la energía debe encontrarse en una forma que permita la realización de todas las reacciones químicas que sostienen la vida; la energía contenida en el enlace del trifosfato de adenosina (ATP) sirve para estas funciones (Starr and Taggart, 2004).

Las principales vías de liberación de energía se inician todas con las mismas reacciones en el citoplasma. En una etapa inicial las enzimas escinden y reordenan una molécula de glucosa para dar dos moléculas de piruvato, un compuesto de tres carbonos.

Luego de la glucólisis las vías de liberación de energía divergen; y solo la respiración aeróbica continúa en la mitocondria (Starr and Taggart, 2004).

Cada paso en el metabolismo respiratorio es catalizado por una enzima y los intermediarios que se forman sirven de sustrato para la siguiente reacción.

Para comprender mejor la respiración aerobia, se puede dividir en 3 etapas: glucólisis, ciclo de Krebs y fosforilación oxidativa.

1-Glucólisis: En esta etapa, que ocurre en el citoplasma, la molécula de glucosa es descompuesta parcialmente a piruvato, con un rendimiento neto de 2 moléculas de piruvato, 2 moléculas de ATP y 2 de NADH.

2-Ciclo de Krebs y reacciones previas: Las dos moléculas de piruvato previamente formadas salen del citoplasma y entran a la mitocondria. Antes de que se inicie el ciclo de Krebs una enzima retira 1 átomo de carbono de cada piruvato, la coenzima A (CoA) un ayudante de la enzima se transforma en acetil coenzima A, y este fragmento se transfiere al oxalacetato, que es el compuesto inicial del ciclo de Krebs. En este proceso se liberan 6 moléculas de CO_2 ; 2 ATP y 8 NADH y 2 FADH₂ que pasarán a la cadena de transporte de electrones.

3-Fosforilación oxidativa (figura 1.5): en la tercera etapa de la vía aeróbica es donde se produce la mayor parte del ATP, ya que en esta etapa se utilizan la cadena de transporte de electrones y ATP sintetasas, ubicadas en la membrana interna

mitocondrial. En el proceso de transporte de electrones la energía libre de la transferencia de electrones desde el NADH y FADH₂ al O₂ por medio de los centros redox unidos a las proteínas, está acoplada a la síntesis de ATP por las ATP sintetasas.

Cuando los electrones entran a la cadena de transferencia se libera hidrógeno y se ioniza (H⁺). A medida que los electrones atraviesan la cadena, los iones hidrógeno que están dentro del compartimiento interno son enviados al compartimiento externo. La energía que se genera al pasar los electrones desde un aceptor a otro se emplea para bombear H⁺ hacia el compartimiento externo, esto hace que se forme un gradiente de concentración de protones y eléctrico a través de la membrana, y la única forma de que los iones H⁺ puedan fluir a favor del gradiente es a través de las ATP sintasa. Su flujo a través de estas proteínas da lugar a la formación de ATP a partir de ADP y P (Solomon *et al.*, 1998; Curtis, 2000)(figura 1.5).

La cadena de transporte de electrones consta de una serie de cuatro complejos proteicos (figura 1.5) a través de los cuales pasan los electrones desde los potenciales de reducción estándar más bajos hacia los más altos:

COMPLEJO I: formado por NADH oxidasa, flavin mononucleótico (FMN) y proteínas de hierro y azufre. Transfiere los electrones desde el NADH hasta la ubiquinona.

COMPLEJO II: Succinato deshidrogenasa (SDH), flavina-adenin dinucleótido(FAD) y proteínas de hierro y azufre. Transfiere los electrones desde el succinato a la ubiquinona.

COMPLEJO III: Integrado por citocromos b y c, y proteínas de hierro y azufre, transfiere los electrones desde la ubiquinona al citocromo c.

COMPLEJO IV: Citocromo c oxidasa, que transfiere los electrones desde el citocromo c al O₂ (Lehninger *et al.*, 1995).

En los complejos I, III y IV la energía liberada es suficiente para la síntesis de 1 molécula de ATP, mientras que la reacción que ocurre en el complejo II no alcanza para impulsar la síntesis de ATP, su función es inyectar los electrones dentro de la cadena transportadora. Por ello la oxidación de una molécula de NADH genera 3 ATP y la de FADH₂ genera 2 ATP (Lehninger *et al.*, 1995).

El oxígeno es el aceptor de electrones al final de la cadena de transporte.

El método ETS (Packard, 1971) consiste en saturar el ETS mitocondrial con NADH y succinato, y el ETS microsomal con NADPH y utiliza Tetrazolium salt 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium chloride (INT) como aceptor final de electrones, en este proceso 1 mol de O₂ consumido, es equivalente a 2

moles de INT reducido (figura 1.5), y es medido espectrofotométricamente a 490 nm y 750 nm; de esta manera se mide la capacidad de mitocondrias y microsomas de transferir electrones desde sustratos fisiológicos (NADH, NADPH y succinato) a un aceptor final de electrones, reduciendo así los problemas asociados con la incubación de zooplancton en un ambiente controlado (Gómez, 1991).

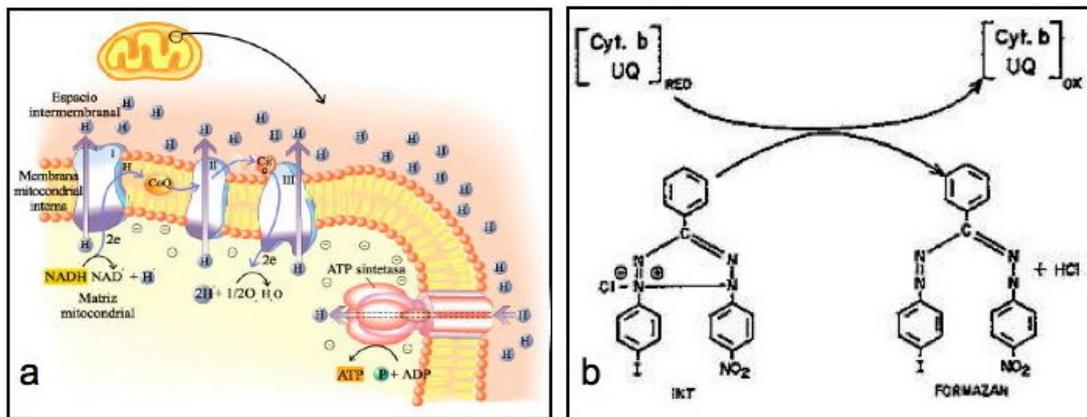


Figura 1.5: a. Cadena transportadora de electrones. Tomado de Curtis (2000).
 b. Reacción de oxido-reducción entre INT y el complejo ubiquinona-citocromo b. Tomado de Packard (1971).

1.8. Objetivos

La identificación de las especies presentes y la viabilidad de cultivo se presentan como dos estudios imprescindibles antes de comenzar cualquier trabajo referente a la calidad como alimento o como especie apta para estudios de respiración.

La tarea de identificación de las especies es muy amplia y excede los objetivos de este trabajo, por lo cual, lo que se plantea es estudiar las especies que aparecen con mayor frecuencia en una zona de fácil acceso para los muestreos (Risco Verde), lo que nos permitirá contar con organismos durante todo el año para realizar experimentos de cultivo y lograr finalmente un cultivo monoespecífico para su estudio.

Por lo expuesto anteriormente sobre la importancia de los misidáceos como alimento en el medio natural, se propone el análisis del contenido en proteínas, lípidos totales y ácidos grasos de *L.lingvura* y *P.nouveli* salvajes y cultivados; pudiendo comparar estos resultados con los citados en la bibliografía de las presas vivas usadas más frecuentemente en acuicultura: *Artemia* y rotíferos, lo que nos permitiría determinar su potencial como alimento.

Por otra parte, la obtención de un cultivo de misidáceos nos permitiría contar con organismos mesozooplancctónicos para el estudio de su metabolismo respiratorio, de esta manera no sería necesario realizar muestreos para cada estudio, lo que implica una inversión económica y de tiempo que no siempre es posible solventar. Como estudio preliminar del metabolismo de los misidáceos, el presente trabajo tiene como objetivo establecer correlaciones entre longitud, biomasa y respiración potencial.

En resumen, los objetivos planteados en el presente trabajo son:

- 1- Identificación de las especies presentes en la costa este de Gran Canaria.
- 2- Estudio de la viabilidad de cultivo de las especies presentes.
- 3- Análisis de la calidad nutricional para determinar el potencial como alimento vivo en acuicultura.
- 4- Estudio del metabolismo respiratorio de las especies aptas para cultivo.

Capítulo 2

Material y Métodos

2.1. Identificación de especies

En la costa este de Gran Canaria (figura 2.1), se realizaron muestreos semanales desde agosto a octubre de 2008. La captura se realizó a profundidades entre 5 y 15 metros con equipo SCUBA y red de mano de 500 μm de abertura de malla (figura 2.2). La identificación hasta el nivel de especie se llevó a cabo con lupa binocular y microscopio, siguiendo los trabajos de Tattersall and Tattersall (1951), Labat (1953), Wittmann (1986) y Barberá-Cebrián *et al.* (2001).

Para el estudio de estructuras como telson, rostro y escama antenal se utilizó cámara reflex digital Canon EOS 1000D y las medidas de longitud se determinaron con el programa ImageJ 1.40g (National Institutes of Health, USA). Se determinó la longitud estándar (desde el rostro entre los pedúnculos oculares hasta el fin del último segmento abdominal) de 40 individuos adultos de cada especie para obtener la longitud estándar media.

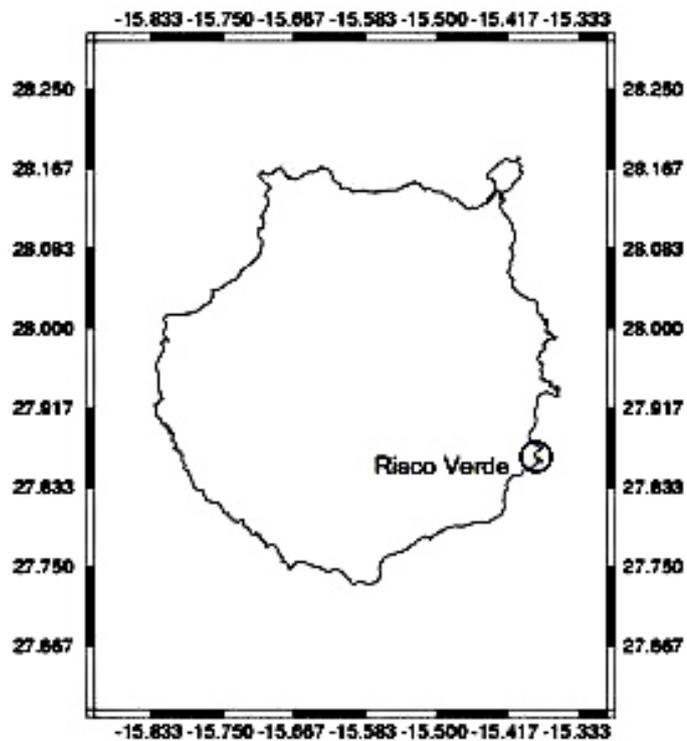


Figura 2.1: Mapa de Gran Canaria indicando la zona de muestreo (Risco Verde, Arinaga).



Figura 2.2: Colecta de misidáceos con red de mano en Risco Verde, Arinaga. Fotos: F.Balader.

2.2. Sistemas de cultivo

Para llevar a cabo el cultivo de misidáceos se probaron dos sistemas. El primero fue instalado en el Instituto Canario de Ciencias Marinas (ICCM)(figura 2.3) que cuenta con flujo continuo de agua de mar, allí se llevaron a cabo los cultivos para estudios de supervivencia y producción, y de calidad nutricional. El segundo se instaló en la Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad de las Palmas de Gran Canaria (ULPGC) (figura 2.4), ya que era necesario mantener allí las cohortes para el estudio del metabolismo respiratorio, en éste caso fue necesario crear un sistema de recirculación de agua.

El sistema de cultivo con flujo continuo de agua de mar esta formado por 3 tanques rectangulares con un volumen de 14 l de agua de mar natural filtrada. El agua fue filtrado mediante cartuchos de hilo hasta 5 micras (Meter signo) y luego esterilizada mediante lámparas UV (Sera, 25W, Alemania), finalmente pasa un filtro biológico formado por roca viva (figura 2.3).

La iluminación fue suministrada por un tubo fluorescente de 36 W y el fotoperíodo fue de 10:14 h de luz y oscuridad.

El caudal de agua de mar fue de 1,2 L por hora.

Para el sistema de cultivo de recirculación se instalaron 3 tanques rectangulares de plástico de 35 litros, se utilizó agua natural de mar filtrada y la recirculación de agua fue de 6 L/h.

El agua circula desde los tanques hasta un filtro mecánico y biológico y luego a un depósito de 70 litros con roca viva que funciona como filtro biológico para la transformación de amonio en nitritos y de nitritos en nitratos, luego pasa por otro filtro mecánico, por una lámpara esterilizadora UV y es bombeada nuevamente hacia los tanques. A su vez cada tanque cuenta con un minifiltro mecánico para evitar la acumulación de restos de alimento (figura 2.4b).

La luz fue proporcionada por tubos de luz de 36 W y el ciclo de luz-oscuridad fue 10:14 h.

Para mantener constante la temperatura del agua se utilizó un termostato que mantuvo la temperatura del agua de las bandejas entre 24,1 y 24,5°C.

El recambio de agua fue del 30% semanal.



Figura 2.3: *Sistema con flujo continuo* : (a) vista general, (b) bandeja de cultivo, (c) misidáceo alimentándose. Fotos: A.Herrera.



Figura 2.4: *Sistema de cultivo con recirculación de agua* : (a) vista general, (b) bandeja de cultivo con parideras, (c) detalle de paridera con misidáceos. Fotos: A.Herrera.

2.3. Supervivencia y producción

Se capturaron en la zona de Risco Verde, (figura 2.1) en octubre de 2008, ejemplares de *Leptomysis lingvura* y *Paramysis nouveli* a profundidades entre 5 y 15 m. con red de mano de 500 μm de abertura de malla. Tras un período de adaptación de dos días, se separaron 30 machos y 30 hembras adultos de cada especie. Se colocaron triplicados de 10 machos y 10 hembras de cada especie en parideras de 1 litro, y las parideras se colocaron en bandejas de cultivo de 14 litros.

El cultivo se realizó en el ICCM en un sistema de flujo continuo con las condiciones anteriormente descritas para ese sistema.

Los misidáceos fueron alimentados con 2 tomas diarias de 100 nauplios de 48 horas de *Artemia* enriquecida con Easy-DHA Selco® (INVE, Belgium), por individuo (figura 2.3c).

Se realizó diariamente el conteo de los individuos adultos machos y hembras. La supervivencia se expresó en porcentaje según la ecuación:

$$\text{Supervivencia} = ((\text{No. inicial} - \text{No. final}) \div \text{No. inicial}) * 100 \quad (2.1)$$

Diariamente se realizó el conteo de las crías. Se seleccionaron al azar 30 crías de cada especie y se determinó la longitud estándar (desde el rostro entre los pedúnculos oculares hasta el fin del último segmento abdominal) utilizando ImageJ 1.40g (National Institutes of Health, USA), se compararon los resultados para cada especie, aplicando test de t Student.

La producción relativa se estimó dividiendo el número de crías diarias por el número de hembras vivas, para obtener el número de crías.hembra⁻¹.

Para comparar la supervivencia y producción en los triplicados se aplicó test no paramétrico de Kruskal-Wallis significancia $P < 0,05$ y para la comparación estadística entre ambas especies se aplicó test no paramétrico de Mann-Whitney con significancia $P < 0,05$.

Se aplicó test χ -cuadrado para evaluar la asociación entre la supervivencia y el sexo en cada una de las especies (figura 3.6).

Los resultados fueron procesados usando SPSS Statistical Software System versión 14.0 (SPSS Chicago, Illinois, 1999).

2.4. Relación entre biomasa y longitud en *Leptomysis lingvura*

En el presente estudio se colectaron 60 individuos de *Leptomysis lingvura* en el área de estudio durante el mes de octubre de 2009. El rango de tallas fue de 1,23 a 6,42 mm.

En este estudio no se tuvo en cuenta el sexo de los organismos, ya que el rango de tallas abarca desde juveniles (en los que no se ha podido determinar sexo) hasta adultos.

Para determinar la longitud estándar los individuos fueron fotografiados con una cámara réflex Canon EOS 1000D de 10 megapíxeles y medidos con el programa ImageJ 1.40g (National Institutes of Health, USA).

Las proteínas se determinaron según el método descrito por Lowry, modificado por Rutter (Lowry *et al.*, 1951; Rutter, 1967).

Los resultados fueron procesados usando SPSS Statistical Software System versión 14.0 (SPSS Chicago, Illinois, 1999).

2.5. Crecimiento y ciclo de vida de *L.lingvura*

Se capturaron muestras de *L. lingvura* en septiembre de 2009 para el estudio del crecimiento de las cohortes nacidas en cautividad y del ciclo de vida. Se trabajó solo con esta especie, ya que fue la que presentó mayor supervivencia y producción en las condiciones dadas en nuestras instalaciones.

El cultivo se realizó en un sistema de recirculación de agua, los adultos y las crías fueron alimentados con 2 tomas diarias de 100 nauplios de 48 horas de *Artemia* enriquecida con Easy-DHA Selco®(INVE, Belgium), por individuo

Luego de dos días de aclimatación se separaron las hembras adultas con embriones en el marsupio (figura 1.2), que son fácilmente reconocibles por el color verde del vitelo y la pigmentación negra de las larvas (Wittmann, 1981), y se colocaron en parideras de 1 L. Diariamente se recolectaron las crías nacidas durante la noche.

Para el estudio del crecimiento individuos de la misma cohorte fueron separados, fotografiados con una cámara digital réflex Canon EOS 1000D y medidos con el programa Image J, hasta que alcanzaron la madurez sexual.

Para estimar la biomasa se utilizó la relación alométrica establecida (ver capítulo 3.4):

$$\ln W = 2,6391 \ln SL - 5,6766 \quad (2.2)$$

El ciclo de vida se estudió separando 18 parejas en recipientes de 0,1 L y observando diariamente las puestas y la frecuencia de las mismas, durante un período de 21 días.

2.6. Calidad nutricional

Los muestreos se realizaron entre marzo y abril de 2009. El estudio de ambas especies en estado salvaje se llevó a cabo congelando las muestras inmediatamente después de ser capturadas.

Para estudiar la calidad nutricional de misidáceos en cautividad, los individuos capturados de cada especie, luego de un período de aclimatación de 2 días fueron distribuidos en tres tanques. Las condiciones de cultivo fueron las presentadas para el sistema de flujo continuo instalado en el ICCM. Al día 21 los misidáceos fueron congelados a -80°C para llevar a cabo los análisis.

Se llevaron a cabo los análisis por triplicado de Humedad, proteínas, lípidos y ácidos grasos en las instalaciones del Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria (IUSA), perteneciente a la Facultad de Veterinaria de la ULPGC.

Las proteínas se calcularon a partir de la composición en nitrógeno total de las muestras determinada mediante la técnica de Kjeldhal (AOAC, 1995). El método consiste en la digestión de las muestras con ácido sulfúrico concentrado a 400°C en presencia de un catalizador de cobre, seguido de una destilación.

La humedad se determinó por desecación en estufa a 110°C y las cenizas por incineración de la muestra en un horno de mufla a una temperatura de 600°C hasta peso constante (AOAC, 1995).

Para la extracción de lípidos se utilizó el método descrito por Folch *et al.* (1957). La determinación de ácidos grasos se hizo por metilación según metodología de Christie (1982). Los FAMES se diluyen en hexano y su separación, identificación y cuantificación se realiza mediante cromatografía de gases bajo las condiciones descritas por Izquierdo *et al.* (1990). Las proteínas, lípidos y cenizas se expresaron en % del peso seco y los ácidos grasos se expresaron en porcentaje del total de los mismos.

Para determinar si existen diferencias significativas entre diferentes especies y en diferentes condiciones (salvajes y en cultivo) se aplicó ANOVA de un factor, con significancia $P < 0,05$. Los resultados fueron procesados usando SPSS Statistical Software System versión 14.0 (SPSS Chicago, Illinois, 1999).

2.7. Metabolismo respiratorio de *L.lingvura*

A partir de las hembras colectadas en Risco Verde en el mes de septiembre de 2009 se obtuvo una cohorte de 90 individuos en un sistema de cultivo de flujo continuo. Se determinó la longitud estándar (SL) todos los días durante los primeros siete días de la cohorte y luego para los días 10, 14, 21 y 30.

A partir de estos datos se estimó la biomasa de acuerdo a la correlación establecida previamente entre la biomasa (W) y la longitud (SL):

$$\ln W = 2,6391 \ln SL - 5,6766 \quad (2.3)$$

Inmediatamente después de realizadas las medidas de longitud los individuos fueron congelados a -195°C en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C . Se estimó la respiración potencial de acuerdo al método ETS según Packard (1971) con modificaciones (Owens and King, 1975; Kenner and Ahmed, 1975; Gómez *et al.*, 1996). Se descongelaron las muestras y homogeneizaron en teflón cristal a 1500rpm con 1ml de tampón de homogeneizado (75uM MgSO_4 , 0,2 % (v/v) de Tritón X-100, 0,15 % (p/v) de PVP (Ployvinyl pyrrolidone), 50mM de tampón fosfato sódico pH 8.0 y 2mM de NaCN en agua bidestilada Milli-Q).

Se centrifugaron las muestras durante 10 minutos a 4000 rpm a temperatura de 0°C .

A una alícuota de 0,5 ml del sobrenadante se le agrega 1,5 ml de la una solución que contiene los sustratos (0,2 % (v/v) de Tritón X-100, 50mM de tampón fosfato sódico pH 8.0, 0,133M de succinato disódico, 0,835mM de NADH y 0,24mM de NADPH) y 0,5 ml de INT 4mM.

Se incubó a $24,3^{\circ}\text{C}$ (lo más cercano a la temperatura de cultivo de los organismos) durante 20 minutos, tras lo cual se detuvo la reacción con una solución Quench formada por una parte de ácido fosfórico 0,1M y otra de formaldehído al 36 %. Se realizó un ensayo blanco para cada muestra.

Luego de la reacción se realizó la lectura de la absorbancia a 490nm y 750nm como línea base para corregir la turbidez en un espectrofotómetro (Beckman DU 650, U.S.A.).

El cálculo de la actividad ETS se realizó según la expresión:

$$ETS = 60 * H * AS * COD / (INT * T * L * F) \quad (2.4)$$

H, volumen de homogeneizado en ml; AS volumen de la reacción; INT, factor de

estandarización del INT=1,42; T, tiempo de incubación en minutos; L, ancho de la cubeta del espectrofotómetro (1 cm); F, volumen del homogeneizado que reacciona; COD es una expresión que relaciona las absorbancias obtenidas para los blancos y las muestras con sus volúmenes de reacción (Packard and Williams, 1981).

$$COD = [(AOD * AS) - (BOD * BS) - (FOD * FS)]/AS \quad (2.5)$$

AOD, diferencia de los valores de absorbancia a 490 y 750nm para la muestra; BOD diferencia de los valores de absorbancia a 490 y 750nm para cada blanco; FOD, diferencia de absorbancia a 490 y 750nm para el blanco de tampón de homogeneizado; BS volumen de reacción del blanco de muestra; FS volumen de reacción del blanco de tampón de homogeneizado.

Para la corrección de la temperatura se aplicó la ecuación de Arrhenius (Packard *et al.*, 1971):

$$ETS * exp((Ea * ((1/(273 + Tincub) - (1/273 + Tsitu))))/1,9872) \quad (2.6)$$

ETS, valor de ETS estimado para la temperatura de incubación; Ea, energía de activación=1500 cal. mol⁻¹; R, cte. de los gases =1,987 cal. mol⁻¹; Tincub, temperatura de incubación en °C ; Tsitu en °C .

Para procesar estadísticamente los datos obtenidos se utilizó el programa SPSS Statistical Software System versión 14.0 (SPSS Chicago, Illinois,1999), aplicándose el coeficiente de Spearman para determinar la correlación entre ETS-tiempo de vida, ETS-longitud y, por lo tanto, ETS-biomasa; y test de Kruskal-Wallis para determinar si existen diferencias significativas entre la tasa respiratoria para los triplicados de cada día.

Capítulo 3

Resultados y Discusión

3.1. Identificación de especies

Se identificaron 3 especies: *Siriella armata* (H. M. Edwards, 1837), *Leptomysis lingvura* (G. O. Sars, 1866) y *Paramysis nouveli* (Labat, 1953).

Siriella armata (figura 3.1) es la especie de mayor tamaño de las tres identificadas, la longitud estándar media fue $9,8 \pm 1,1$ mm.

Posee un caparazón pequeño, con rostro largo, que sobrepasa la parte distal del segundo segmento del pedúnculo antenal. Los pedúnculos oculares son muy largos. La escama antenal es larga y estrecha, y el extremo presenta en su margen interno una concavidad y en el externo una convexidad que termina en un fino diente. El telson es largo, estrecho y entero. El margen proximal posee espinas desiguales y el distal espinas prominentes y entre ellas series de cinco a diez espinas muy cortas e iguales. El ápice posee dos espinas largas y robustas y entre ellas tres a cinco espinas cortas e iguales.

Durante los muestreos no fue muy abundante, encontrándose cerca de los fondos arenosos entre 5 y 10 m de profundidad.

Leptomysis lingvura (figura 3.2) se caracteriza por presentar caparazón corto, con rostro triangular muy corto y en punta. La escama antenal es larga y está segmentada en dos. El segmento terminal posee entre nueve y doce setas que definen a esta especie.

El telson es corto y ancho, con forma de lengua y en el ápice posee dos espinas largas y robustas que intercalan dos a cuatro más pequeñas.

En los muestreos fueron abundantes en zonas cercanas a las rocas, sobre el sustra-

to. Las muestras presentaron una longitud estándar media de $5,8 \pm 1,1$ mm.

Paramysis nouveli presenta caparazón corto, con el rostro redondeado. La escama antenal es casi tan larga como ancha y posee un margen externo liso que termina en un diente, el ápice redondeado, setoso, con una pequeña sutura distal.

El telson presenta una hendidura profunda, los márgenes laterales poseen entre doce y veinte espinas y en los extremos, a ambos lados de la sutura posee dos espinas más largas. Esta especie presentó una longitud estándar media de $5,9 \pm 0,9$ mm.

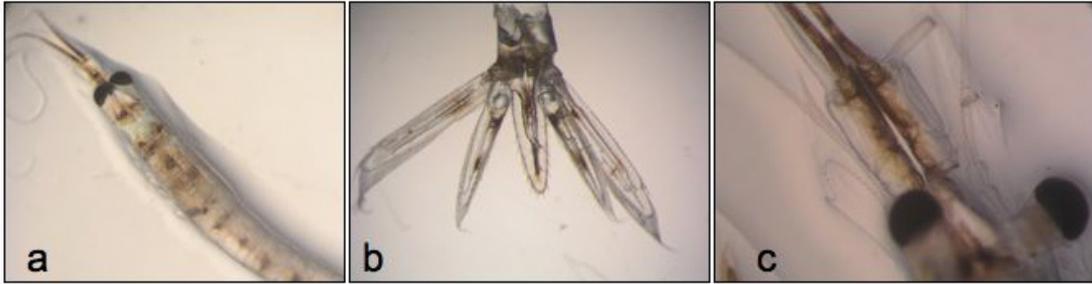


Figura 3.1: *Siriella armata* (H. M. Edwards, 1837): (a) detalle del rostro, (b) detalle del telson, (c) detalle de la escama antenal. Fotos: A.Herrera.

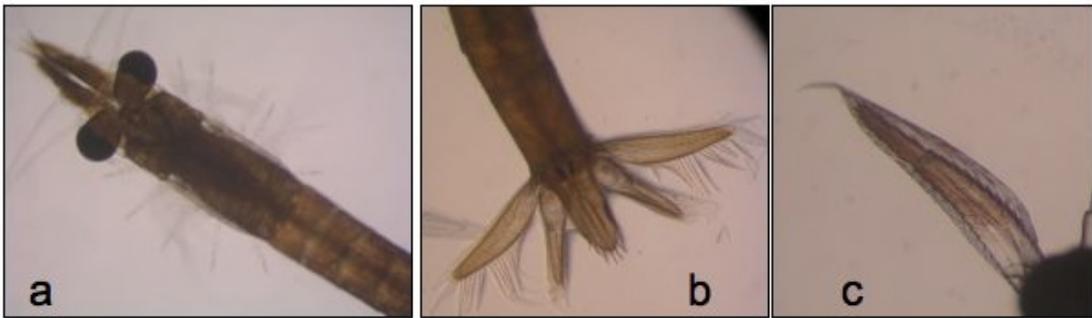


Figura 3.2: *Leptomysis lingvura* (G.O. Sars, 1868): (a) detalle del rostro, (b) detalle del telson, (c) detalle de la escama antenal. Fotos: A.Herrera.



Figura 3.3: *Paramysis nouveli* (Labat, 1953): (a) vista general, (b) detalle del rostro, (c) detalle del telson. Fotos: A.Herrera.

3.2. Sistemas de cultivo

En el sistema de flujo continuo instalado en el ICCM se midieron los parámetros diariamente y se obtuvieron los valores que se presentan en la figura 3.1:

Tabla 3.1: Parámetros medidos en sistema de flujo continuo y en el de recirculación de agua.

	FLUJO CONTÍNUO	RECIRCULACIÓN
pH	8,2±0,1	8,1±0,2
SALINIDAD	37‰	37‰
TEMPERATURA	18,2±0,4°C	24,3±0,2°C
AMONIO	0-0,2 mg.L ⁻¹	0-0,2 mg.L ⁻¹
NITRITO	0-0,02 mg.L ⁻¹	0-0,05 mg.L ⁻¹
NITRATO	0-1 mg.L ⁻¹	0-10 mg.L ⁻¹
OXÍGENO	7,1±0,1 mg.L ⁻¹	7,1±0,1 mg.L ⁻¹

Debido al recambio completo cada 12 horas del agua, este sistema no presenta inconvenientes para mantener los niveles de amonio, nitrito y nitrato en valores aceptables. Esto representa una gran ventaja, ya que la acumulación de amonio y nitrito debido a las excreciones y a la descomposición de los residuos, es uno de los mayores problemas para el mantenimiento de los cultivos.

El control de la temperatura es más complejo en este tipo de sistema ya que el agua que ingresa al sistema puede tener cambios bruscos de temperatura, sobre todo durante la noche, es por ello que se utilizaron calentadores de agua con termostato, que mantuvieron la temperatura en 18,2±0,4°C, que era la temperatura a la cual llegaba el agua durante el día.

El principal inconveniente a la hora de instalar este tipo de sistema, es que no siempre los laboratorios cuentan con un sistema de circulación de agua de mar, por lo cual muchas veces es necesario utilizar sistemas que hagan recircular el agua, con un gasto mínimo de la misma.

En el sistema de cultivo de recirculación uno de los aspectos más importantes a tener en cuenta es la nitrificación, oxidación biológica de amonio a nitrato por acción de bacterias autótrofas nitrificantes. El amonio es altamente tóxico, y se presenta bajo dos formas: no ionizada (NH₃) e ionizada (NH₄⁺), siendo la primera considerada la más tóxica para los organismos.

Los métodos analíticos tradicionales no permiten medir por separado a las dos especies, por lo cual el porcentaje total de NH₃ debe ser calculado a partir del

equilibrio amonio-agua eq 3.1 y eq 3.2:



$$K_a = (NH_3)(H^+) / (NH_4^+) \quad (3.2)$$

(Millero,1996)

En rangos de pH entre 6,5 y 9 el equilibrio favorece la forma de amonio ionizada. Por ejemplo para agua de mar a pH 8,1 y temperatura 25°C, el pKa es 9,5 y el porcentaje de amonio ionizado es del 95 % mientras que la forma no ionizada es del 5 % (Millero, 1996).

La constante de disociación del amonio (NH_4^+) puede ser determinada según la ecuación:

$$\begin{aligned} \ln K_{NH_4} = & -6285,33/T + 0,0001635 T - 0,25444 \\ & +(0,46532 - 123,7184/T) S + (-0,01992 + 3,17556/T) S \end{aligned} \quad (3.3)$$

(Millero,1996)

Los compuestos nitrogenados totales (TAN), constituidos por (NH_3) y (NH_4^+) son transformados por procesos oxidativos a nitrito (NO_2) por las bacterias *Nitrosomonas*, y luego a nitrato (NO_3^-) por las bacterias *Nitrobacter*, en un proceso llamado nitrificación.

La denitrificación es un proceso heterotrófico por el cual los microorganismos frente a la deficiencia de oxígeno pueden utilizar el NO_3^- como aceptor de electrones en la respiración, transformándolo a NO_2 y éste a óxido nitroso para finalmente llegar a nitrógeno gaseoso (N_2).

Lussier *et al.* (1988), sugiere límites máximos de 0,1 mg total NH_4^+-N/L , 0,05 mg NO_2-N/L y 20 mg $NO_3^- -N/L$ en sistemas de recirculación.

Para el control de amonio, nitrito y nitrato se utilizaron kits para determinación colorimétrica Visocolor®Eco (MACHEREY-NAGEL, Alemania).

El recambio de agua debió ser de un 30 % semanal y se realizó diariamente la limpieza del fondo de los tanques, evitando la acumulación de restos de comida, ya que esto causa el aumento de los niveles de amonio y nitrito por encima de valores óptimos provocando una alta mortalidad en los cultivos.

Finalmente se logró mantener estables estos parámetros y se obtuvieron los datos presentados en la tabla 3.1.

3.3. Supervivencia y producción

Siriella armata, una de las especies identificadas, es poco abundante y no aparece de forma constante en los muestreos realizados en la zona, por lo tanto, los estudios planteados para determinar las especies aptas para cultivo solo se realizaron para *Leptomysis linguvura* y *Paramysis nouveli*.

La supervivencia no mostró diferencias significativas ($P < 0,05$) hasta el día 9 del experimento, a partir de este día hubo mayor supervivencia de *Leptomysis linguvura* ($P < 0,05$) como puede apreciarse en las figuras 3.4 y 3.5.

Al final del experimento la supervivencia media de *L. linguvura* fue de $65 \pm 8,7\%$ y para *P. nouveli* $16,7 \pm 5,8\%$ (figura 3.4). Se descartó la hipótesis de que los resultados pudieran verse influenciados por la mayor mortalidad de alguno de los sexos, ya que no se observó una relación entre la supervivencia y el sexo en ninguna de las especies (figura 3.6).

El total de crías medio por paridera al día 21 fue de 166 ± 2 para *Leptomysis linguvura* y de 45 ± 7 para *Paramysis nouveli*, y la longitud estándar media de las crías fue $2,03 \pm 0,23$ mm. y $1,86 \pm 0,17$ mm. respectivamente mostrando diferencias significativas ($P < 0,05$) entre ambas especies.

La producción relativa fue significativamente mayor ($P < 0,05$) en *Leptomysis linguvura* que en *Paramysis nouveli*, a partir del día 9 (figura 3.7). A partir del día 12 del experimento no se registraron crías de la especie *Paramysis nouveli* (figura 3.7).

De acuerdo a los resultados obtenidos determinamos que *Leptomysis linguvura* es la especie mas apta para cultivo en las condiciones dadas en nuestras instalaciones, aunque sería necesario también realizar experiencias de supervivencia y crecimiento de las crías. Esta especie ha sido cultivada anteriormente con éxito en laboratorio (Wittmann, 1981). Es claro que modificando las condiciones de cultivo podrían variar los resultados de supervivencia y producción, sobre todo en lo referente al tratamiento de alimentación, ya que ambas especies podrían no estar recibiendo la alimentación adecuada. Sería necesario realizar experiencias para determinar las tasas de ingestión con distintas presas que en el caso de los misidáceos, que son omnívoros, podrán ser copépodos, rotíferos, diatomeas o detritos orgánicos (Mauclhine, 1980; Murano, 1999; Domínguez *et al.*, 2000, 1999b).

La completa sustitución de nauplios de *Artemia* por rotíferos provoca menor producción y supervivencia de juveniles y adultos de *Leptomysis* sp., sin embargo, el reemplazo parcial ($1/3$ nauplios de *Artemia* + $1/3$ rotíferos) tiene como resultado una buena producción, crecimiento y supervivencia, tanto de juveniles como de adultos, aunque no significativamente diferentes de los que produce la alimenta-

ción con nauplios de *Artemia* únicamente (Domínguez *et al.*, 2000).

También deberían realizarse experiencias variando otros parámetros, entre ellos la temperatura, densidad de población y salinidad, ya que afectan directamente tanto la supervivencia como el crecimiento y la producción (Mauchline, 1980; Domínguez *et al.*, 1999a; Murano, 1999; Fockedey *et al.*, 2005).

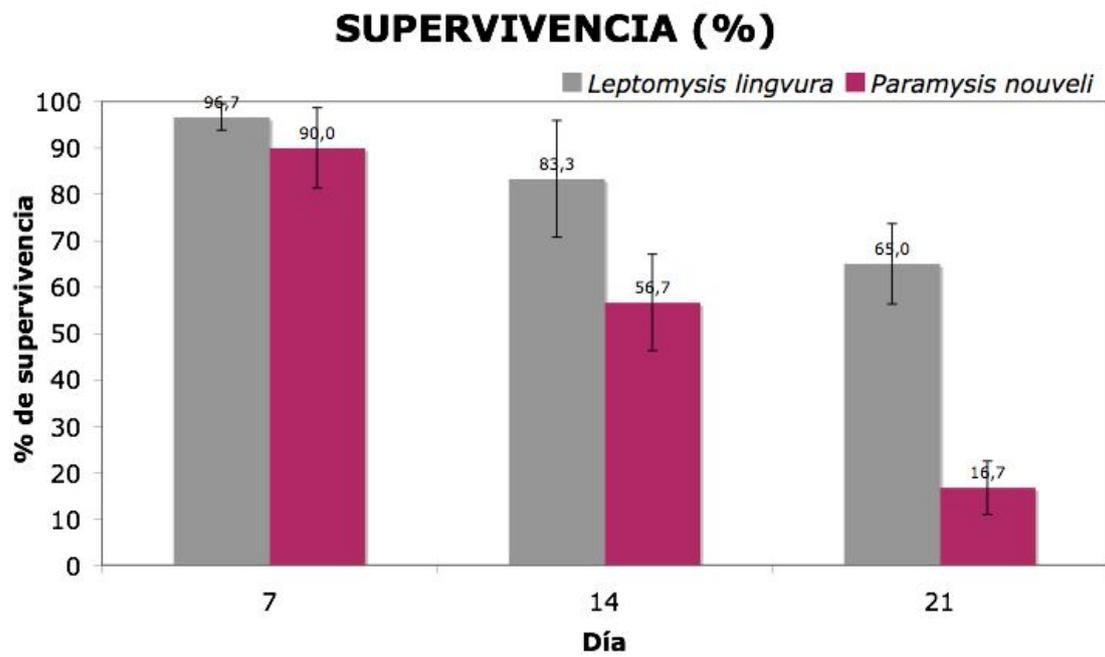


Figura 3.4: Supervivencia en porcentaje de *Paramysis nouveli* y *Leptomysis lingvura*

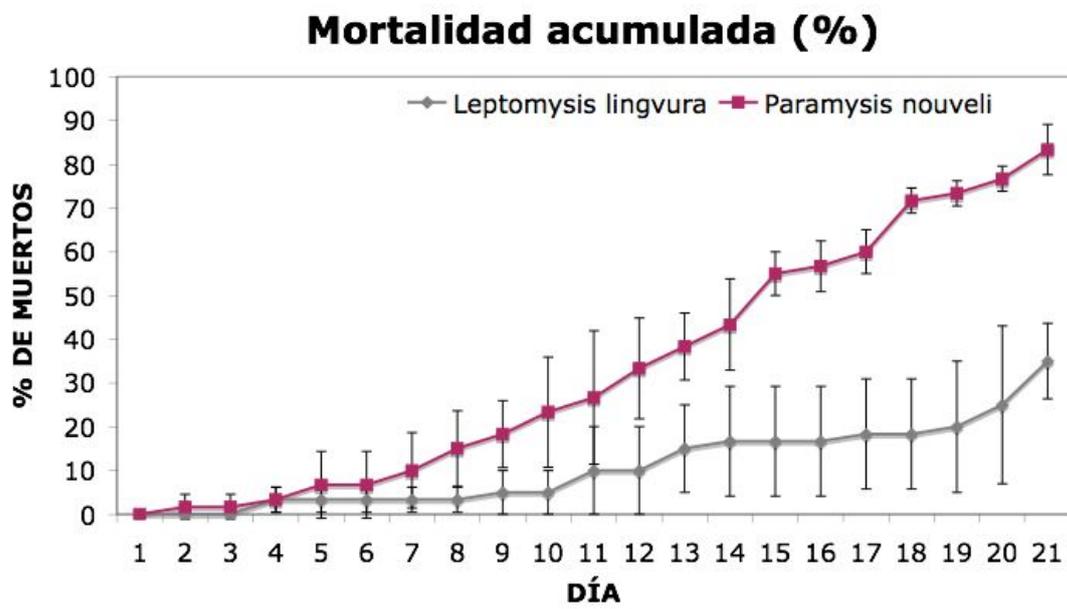


Figura 3.5: Mortalidad acumulada en porcentaje a lo largo de 21 días para *Paramysis nouveli* y *Leptomysis lingvura*

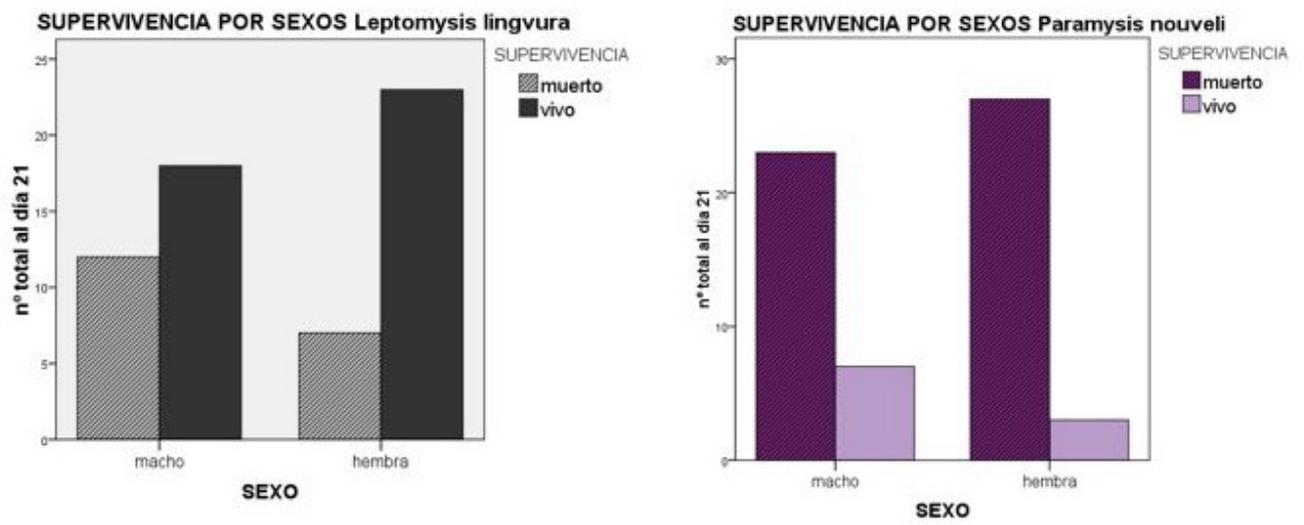


Figura 3.6: Supervivencia por sexos para *Paramysis nouveli* y *Leptomysis lingvura*

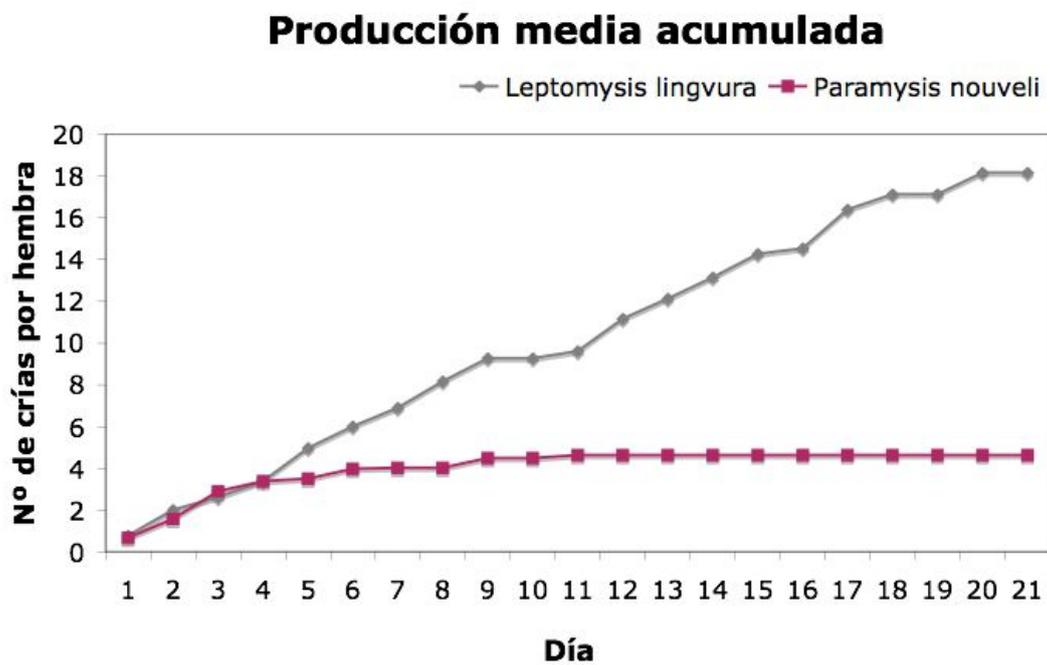


Figura 3.7: Producción acumulada en porcentaje (crías.hembra⁻¹) a lo largo de 21 días para *Paramysis nouveli* y *Leptomysis lingvura*

3.4. Relación entre biomasa y longitud en *Leptomysis lingvura*

Se estableció la relación alométrica entre SL y biomasa en mg de proteína (W) para 60 misidáceos de ambos sexos en un rango de longitud de 1,23 a 6,42 mm (figura 3.8).

A partir de los resultados (figura 3.9) se obtuvo la siguiente ecuación de regresión:

$$\ln W = b * \ln (L) + (a) \quad (3.4)$$

siendo $a=-5,6766$, y la pendiente $b=2,6391$ ($n=59$, $r^2=0,93$)

Los valores de biomasa para misidáceos con tallas menores a 1,3 mm ($n=1$), no se tuvieron en cuenta para la relación, ya que con el método utilizado (Lowry *et al.*, 1951), se obtienen valores negativos, debido a la sensibilidad del método que es de hasta 0,005 mg. Determinamos que este método es adecuado para estimar biomasa en *L. lingvura* ya que los misidáceos de menor tamaño (día 1) presentaron en el estudio de crecimiento del presente trabajo una talla media de 1,58 mm (SD=0,16; $n=30$).

La figura 3.8 muestra el histograma de frecuencia de tallas de los organismos.

Mauchline (1980) presenta los resultados de relaciones entre longitud y biomasa obtenidos por distintos autores para otras especies de misidáceos. La tabla 3.2 muestra estos resultados y los obtenidos en el presente trabajo para *Leptomysis lingvura*, como puede observarse, la pendiente obtenida se encuentra dentro del rango de valores que figuran en la literatura sobre misidáceos.

Se ha obtenido una buena correlación entre la longitud y la biomasa, con un coeficiente de correlación de Pearson de 0,94 ($n=60$); esta correlación nos permite estimar la biomasa a partir de fotografías o medidas en las que no sea necesario matar al organismo, ya que en muchos estudios, por ejemplo de respiración, es necesario mantener al organismo con vida, al mismo tiempo que determinar su biomasa con un mínimo de manipulación evitando el estrés.

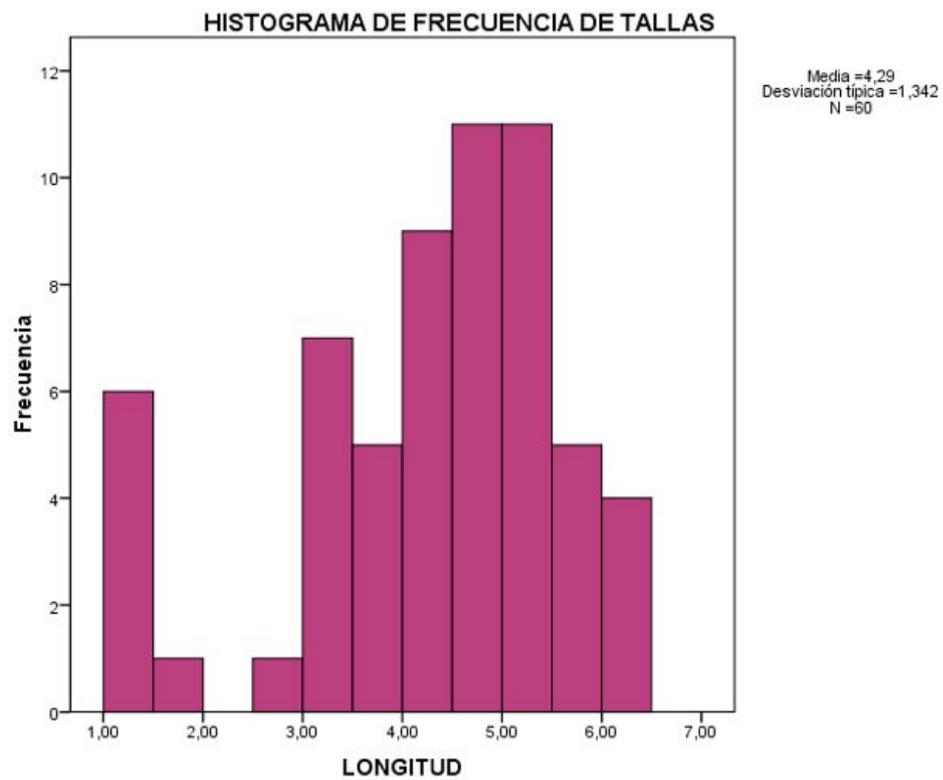


Figura 3.8: Histograma de frecuencia de tallas para los organismos colectados para el presente estudio.

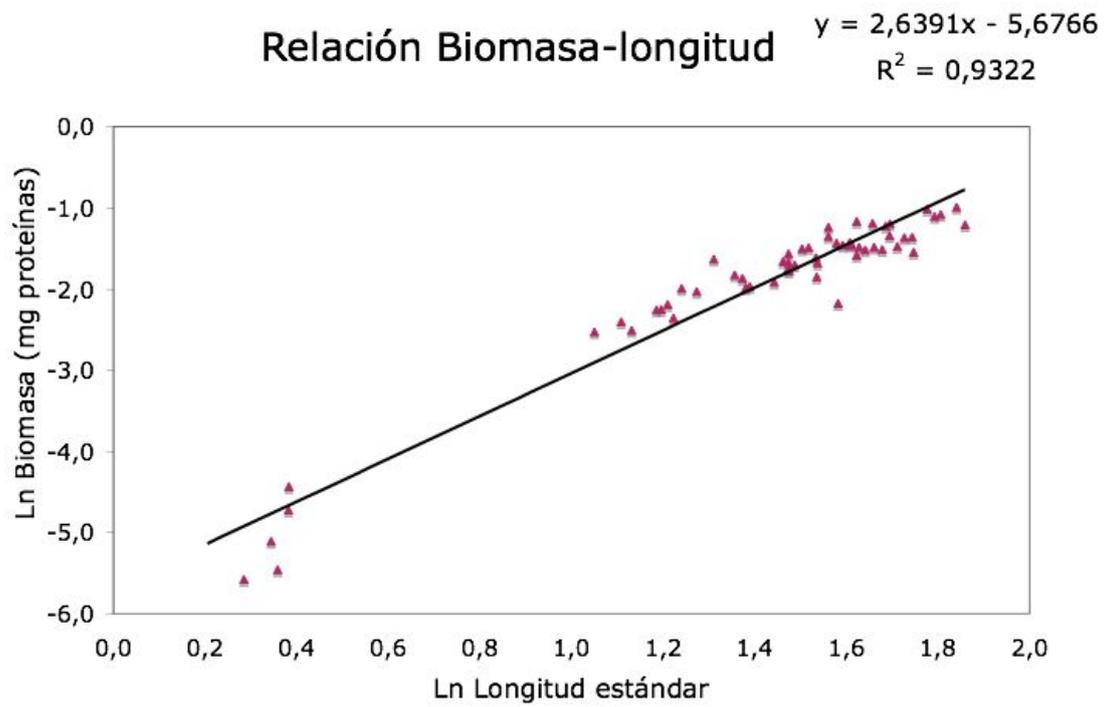


Figura 3.9: Relación longitud estándar (mm) y biomasa en mg de proteína para *Leptomysis lingvura*.

Tabla 3.2: Constantes de regresión ($\log y = b \log x + a$) entre biomasa en peso seco (DW) y longitud total (TL) en misidáceos obtenidas por distintos autores (Mauchline, 1980) y constante de regresión ($\ln y = b \ln x + a$) entre biomasa en mg de proteína y longitud estándar (SL) para *Leptomysis lingvura*

ESPECIE	a	b	REFERENCIA
<i>Leptomysis lingvura</i>	-5,6766	2,6391	presente trabajo
<i>Metamysidopsis elongata</i>	-5,436	2,77	Clutter and Theilacker (1972)
<i>Mysis relicta</i>	-4,5654	2,00	Lasenby and Langford (1972)
<i>Neomysis mirabilis</i>	-4,569	2,691	Shushina et al. (1972)
<i>Paramysis baeri</i>	0,018	2,3	Nekrasova and Rakitina (1968)
<i>Paramysis intermedia</i>	0,02	3,4	Nekrasova and Rakitina (1968)
<i>Paramysis Kowalewski</i>	0,002	3,0	Nekrasova and Rakitina (1968)
<i>Mesopodopsis slabberi</i>	0,012	2,5	Nekrasova and Rakitina (1968)
<i>Acanthomysis strauschi</i>	0,020	2,5	Nekrasova and Rakitina (1968)

3.5. Crecimiento y ciclo de vida de *L. lingvura*

De las 18 parejas separadas para el estudio del ciclo de vida, solo en 12 de ellas sobrevivieron ambos reproductores hasta el final del experimento, por lo cual solo se tuvieron en cuenta estos datos. Las observaciones realizadas en estas parejas muestran una frecuencia de puesta de 7,3 días (SD=0,65; n=12).

La cantidad de crías nacidas por hembra varió entre 1 y 9 (4,8 promedio, SD=2,2; n=25).

El tamaño medio de las crías fue de 1,58 mm (SD=0,16; n=30), este valor es menor que el presentado por las crías nacidas en cautividad en el experimento de supervivencia y producción llevado a cabo en el ICCM en un sistema de flujo continuo de agua de mar (2,03 promedio; SD=0,23 mm; n=30).

Entre las variables que pueden afectar el tamaño de las crías se encuentran la temperatura del agua, la talla de las hembras, la estación del año y la alimentación (Mauchline, 1980). En este caso el experimento fue llevado a cabo durante el mes de septiembre de 2009 con hembras colectadas del medio y aclimatadas en un sistema de recirculación a una temperatura de $24,3 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$; mientras que en el ICCM la temperatura del agua fue de $18,2 \pm 0,4^{\circ}\text{C}$ y las muestras se tomaron en octubre de 2008.

La variable que presenta mayor diferencia entre ambos experimentos es la temperatura, observándose que las crías nacidas a mayor temperatura son de menor tamaño, sin embargo, el tamaño de las hembras no se midió en ninguno de los dos experimentos, ya que al tratarse de experiencias de reproducción se intentó realizar la menor manipulación posible de las hembras evitando el estrés, por lo cual, esta variable también podría estar afectando los resultados.

El tiempo de desarrollo en el marsupio es menor a mayores temperaturas (ver tabla 3.3), este hecho también podría explicar que la talla alcanzada por las crías sea menor, ya que se acelera el proceso de desarrollo.

Las cohortes alcanzaron la madurez sexual en 30 días y la longitud estándar media alcanzada al día 30 fue de 4,8 mm.

El tamaño alcanzado no se corresponde con el tamaño medio de los adultos colectados en Risco Verde ($5,8 \pm 1,1$ mm), es probable que la cohorte al ser incubada a mayor temperatura haya alcanzado antes la madurez sexual con menores tallas que los organismos que se encuentran en el medio natural a una temperatura de aproximadamente 18°C .

De acuerdo con Kimmerer y McKinnon (1987), se determinó que el crecimen-

to en *L.lingvura* se ajusta a una función exponencial (figura 3.10) de tipo:

$$W_t = W_0 \cdot e^{ut} \quad (3.5)$$

W_t , biomasa en el tiempo t ; W_0 , biomasa en el tiempo cero; t , tiempo transcurrido en días, y μ es la tasa instantánea de crecimiento (d^{-1}). Si normalizamos la ecuación se obtiene:

$$\text{Ln}W_t = \text{Ln}W_0 + ut \quad (3.6)$$

El Ln de la biomasa sigue un incremento lineal con el tiempo, siendo la pendiente de la recta (μ) la tasa instantánea de crecimiento (Kimmerer and McKinnon, 1987).

$$u = ((\text{Ln}W_1 - \text{Ln}W_2) / \Delta T) \quad (3.7)$$

A partir del gráfico Ln biomasa en función del tiempo se obtuvo la pendiente que corresponde a la tasa de crecimiento en *L.lingvura* $\mu=0,1064 d^{-1}$ (figura 3.11).

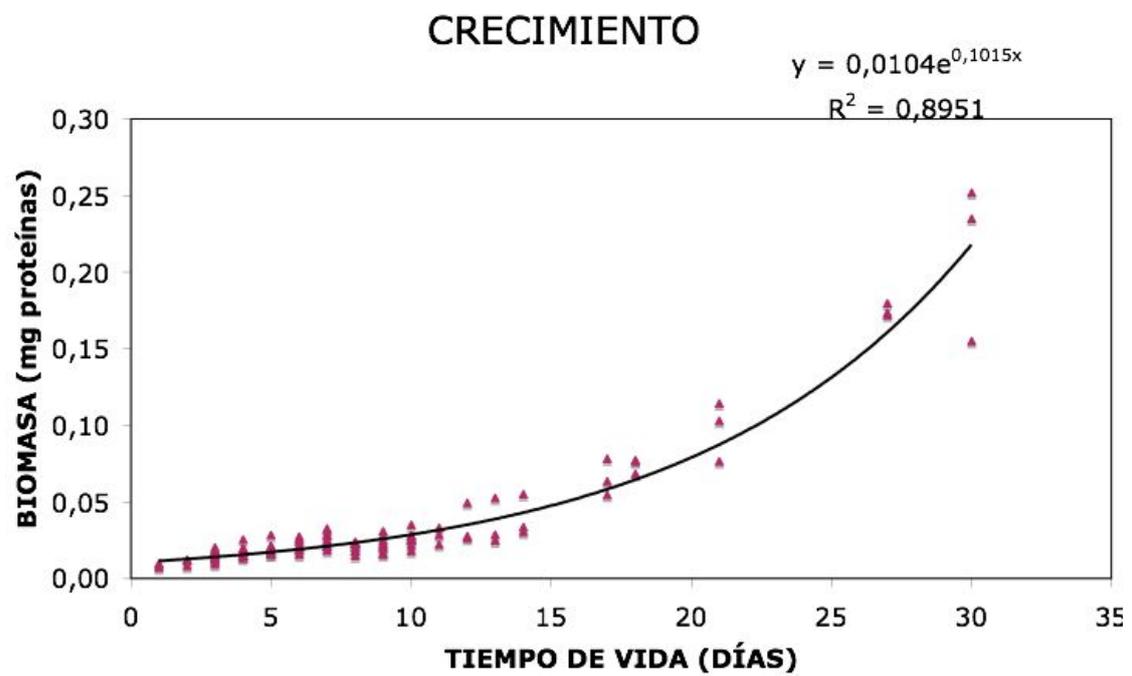
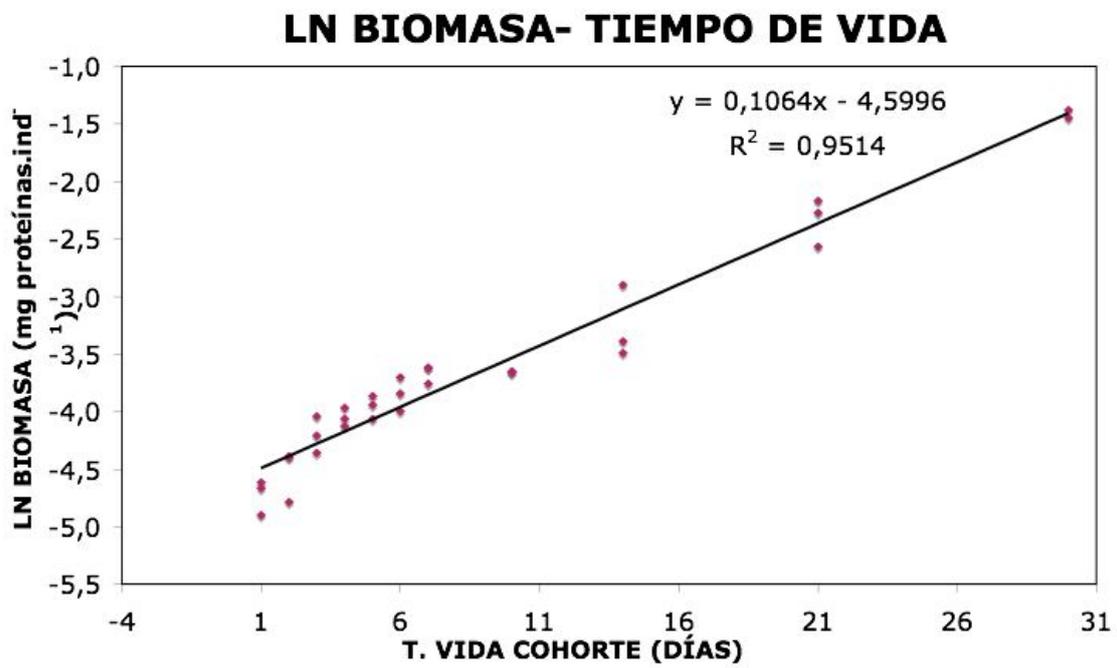


Figura 3.10: Crecimiento de la cohorte.



En las condiciones de cultivo de nuestro laboratorio a una temperatura media de $24,3 \pm 0,2^\circ\text{C}$ el tiempo de desarrollo dentro del marsupio fue de media 7,3 días y las hembras tuvieron una producción de 1-9 crías por puesta. Estos valores difieren de los observados por Wittmann (1981) en la misma especie, en abril a 16°C , siendo la duración del desarrollo marsupial 14,6 días promedio y la producción de las hembras de 7-34 huevos, y para las hembras colectadas en el Adriático Norte el tiempo de incubación fue estimado en 12-15 días a temperaturas entre 19 y $21,5^\circ\text{C}$ y el número de crías para las hembras colectadas en marzo $16,9 \pm 3,9$ y mayo $14,4 \pm 4,2$ (Wittmann, 1978) (tabla 3.3).

La cantidad de embriones tempranos dentro del marsupio depende del tamaño de la hembra, del tamaño de los huevos y de la estación del año (Mauchline, 1980; Wittmann, 1981), por lo cual, los datos obtenidos podrían variar en muestras tomadas en otros meses, o al aclimatar los individuos a las condiciones de cultivo o variar las mismas.

Para obtener resultados óptimos en la producción de los cultivos y en la tasa de crecimiento sería necesario realizar experiencias a diferentes temperaturas, con diferentes tratamientos de alimentación y con hembras nacidas en cautividad en las mismas condiciones, a fin de comparar los resultados obtenidos.

Tabla 3.3: Tiempo de desarrollo en el marsupio (en días) y número de crías por puesta para hembras de *L. lingvura* colectadas en diferentes regiones y estaciones e incubadas a diferentes temperaturas ($^\circ\text{C}$).

Región/mes (autor)	Temp. cultivo	Tiempo de desarrollo en el marsupio	Número de crías
Gran Canaria, octubre (presente trabajo)	24,3	7,3	1-9
Golfo de Nápoles, abril (Wittmann, 1981)	16	14,9	7-34
Adriático Norte, marzo (Wittmann, 1978)	19-21,5	12-15	$16,9 \pm 3,9$
Adriático Norte, mayo (Wittmann, 1978)	19-21,5	12-15	$14,4 \pm 4,2$

3.6. Calidad nutricional

Los resultados obtenidos en cautividad para *Paramysis noveli* de proteínas y lípidos (en % del peso seco) fueron $73,38 \pm 1,77$ % y $15,01 \pm 1,12$ %; y para *Leptomysis lingvura* $74,19 \pm 5,22$ % y $14,79 \pm 2,66$ %; mientras que en el medio natural para *Paramysis noveli* fueron $17,82 \pm 0,13$ y $74,23 \pm 1,29$, y para *Leptomysis lingvura* los lípidos representaron un 12,74 % , y las proteínas 73,63 % (figura 3.12 y Tabla 3.4). Estos resultados no mostraron diferencias significativas ($P > 0,05$).

Para ambas especies en cautividad los ácidos grasos más abundantes fueron 16:00, 18:1n9, 20:5n3(EPA), 22:6n3(DHA), 18:3n3 y 18:2n6 (figura 3.13, tabla 3.5).

Los ácidos grasos polyinsaturados (PUFA) n-3 y n-6 totales para *Paramysis noveli* y *Leptomysis lingvura* representaron un 39,44 % y 8,42 %; y 42,4 % y 8,4 % del total respectivamente (figura 3.13, tabla 3.5). Esto representa un porcentaje muy alto de los mismos.

Si se compara la composición de ácidos grasos de las especies salvajes con las alimentadas en cautividad con nauplios de *Artemia* se observan contenidos más altos de DHA y EPA ($P < 0,05$) en ambas especies en estado salvaje, mientras que los contenidos de ácido linolénico y linoléico son menores ($P < 0,05$) (figura 3.13), esto podría deberse a las diferentes condiciones de alimentación presentadas en el medio natural y en cultivos alimentados con *Artemia* enriquecida con ácidos grasos (Easy DHA Selco®(INVE,Belgium)).

Ambas especies presentan un alto contenido en DHA. Sin embargo, la evidencia actual sugiere que no solamente el contenido de DHA o n-3 HUFA son importantes para el crecimiento y desarrollo normal de las larvas, sino también la relación DHA:EPA (Izquierdo, 1996).

La relación DHA:EPA:AA tanto para organismos colectados del medio, como para cultivos se muestra en la tabla 3.6. No se observaron diferencias significativas en la relación DHA:EPA entre ambas especies ($P > 0,05$), sin embargo sí hay diferencias en la relación EPA:AA y DHA:AA ($P < 0,05$). Los valores que presentan los organismos salvajes podrían ser un buen indicador de la relación óptima para el alimento en muchas especies de interés comercial, ya que como se ha mencionado antes, los misidáceos son su presa natural en el medio marino. Algunos autores (Sargent *et al.*, 1999) sugieren analizar las presas de cada especie en su medio natural para poder determinar los valores óptimos de esta relación, ya que parecen ser diferentes para cada especie, lo que hace difícil su determinación.

El estudio de la composición bioquímica revela que ambas especies tienen un alto potencial como alimento vivo en acuicultura, ya que los niveles de lípidos, proteínas y ácidos grasos satisfacen los requerimientos alimentarios para el cultivo de peces y crustáceos según las recomendaciones de la FAO (Tacon, 1989), y la composición en DHA, EPA y AA es superior a la reportada por Roo et al. (2009) para rotíferos y *Artemia* enriquecidos con Selco®(INVE,Belgium) (Tabla 3.5), por lo que los misidáceos se presentan como un alimento de buena calidad que podría ser utilizado en el cultivo de larvas de peces y cefalópodos.

Tabla 3.4: Porcentaje de humedad (% peso total) y cenizas, proteínas y lípidos (en % del peso seco) para *Paramysis nouveli* y *Leptomyis lingvura* salvajes y en cultivos alimentados con *Artemia* enriquecida con Easy DHA Selco®(INVE,Belgium). (*) No hay muestra suficiente para realizar triplicados.

TRATAMIENTO	HUMEDAD	CENIZAS	PROTEÍNAS	LÍPIDOS
<i>L. lingvura</i> salvaje*	74,14	15,24	73,63	12,74
<i>P. nouveli</i> salvaje	76,83±0,11	11,61±0,86	74,23±1,29	17,82±0,13
<i>L. lingvura</i> cultivo	74,76±0,63	14,36±0,51	74,19 ±5,22	14,79±2,66
<i>P. nouveli</i> cultivo	78,73±0,27	14,04±0,49	73,38 ±1,77	15,01±1,12

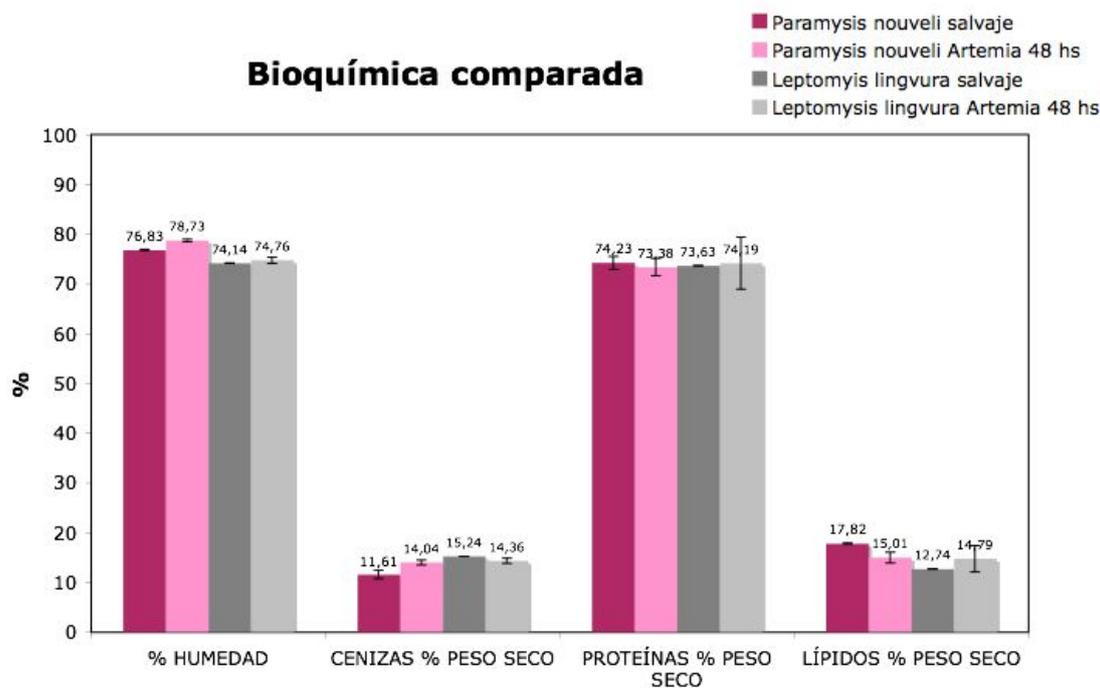


Figura 3.12: Composición en humedad; lípidos, proteínas y cenizas (en % del peso seco) de *Paramysis nouveli* y *Leptomyis lingvura* salvajes y alimentados con *Artemia* enriquecida con Easy DHA Selco®(INVE,Belgium).

Tabla 3.5: Proteínas y lípidos (en % del peso seco) y ácidos grasos (en % del total de ácidos grasos) para *Paramysis nouveli* y *Leptomysis lingvura* en cultivo; y para rotíferos y *Artemia* enriquecidos con Selco®(INVE,Belgium) datos tomados de Roo et al. (2009).

		<i>P.nouveli</i>	<i>L.lingvura</i>	Rotíferos	<i>Artemia</i>
Lípidos		15,01±1,12	14,79±2,66	22,05±3,84	26,04±0,41
Proteínas		73,38±1,77	74,19±5,22	54,28±4,57	56,39±4,84
16:00	Palmítico	16,94±0,62	15,48±0,23	13,00±2,48	15,22±3,8
18:00	Esteárico	4,01±0,1	3,64±0,04	4,73±1,21	4,42±0,37
18:1n9	Oleico	19,11±0,39	17,9±0,23	20,1±1,72	20,36±7,38
18:2n6	Linolénico	4,79±0,24	4,76±0,02	8,14±1,31	3,78±2,61
18:3n3	α Linolénico	8,22±0,19	14,18±0,26	1,62±0,11	10,81±4,23
20:5n3	EPA	14,78±0,2	12,45±0,15	6,51±0,62	11,10±4,27
22:6n3	DHA	12,63±0,37	11,10±0,2	9,68±0,93	4,47±1,43
20:4n6	AA	2,02±0,06	2,34±0,09	1,46±0,73	1,49±0,37
\sum PUFA n-3		39,44±0,94	42,40±0,8	21,12±0,48	31,14±11,43
\sum PUFA n-6		8,43±0,42	8,40±0,15	10,77±2,11	7,03±3,73
DHA/EPA		0,85±0,01	0,89±0,01	1,49±0,01	0,4±0,34
EPA/AA		7,32±0,26	5,32±0,20	5,45±2,99	7,43±11,53
DHA/AA		6,25±0,26	4,74±0,14	8,10±4,45	2,99±3,87

Tabla 3.6: Relación DHA:EPA:AA en *Paramysis nouveli* y *Leptomysis lingvura* salvajes y en cultivos alimentados con *Artemia* enriquecida con Easy DHA Selco®(INVE,Belgium). (*) No hay muestra suficiente para realizar los análisis de ácidos grasos por triplicado).

	<i>P.nouveli</i> salvajes*	<i>P.nouveli</i> cultivo	<i>L.lingvura</i> salvajes*	<i>L.lingvura</i> cultivo
DHA:EPA	0,81	0,85±0,01	0,90	0,89±0,01
EPA:AA	6,78	7,32±0,26	4,52	5,32±0,20
DHA:AA	5,50	6,25±0,26	4,05	4,74±0,14

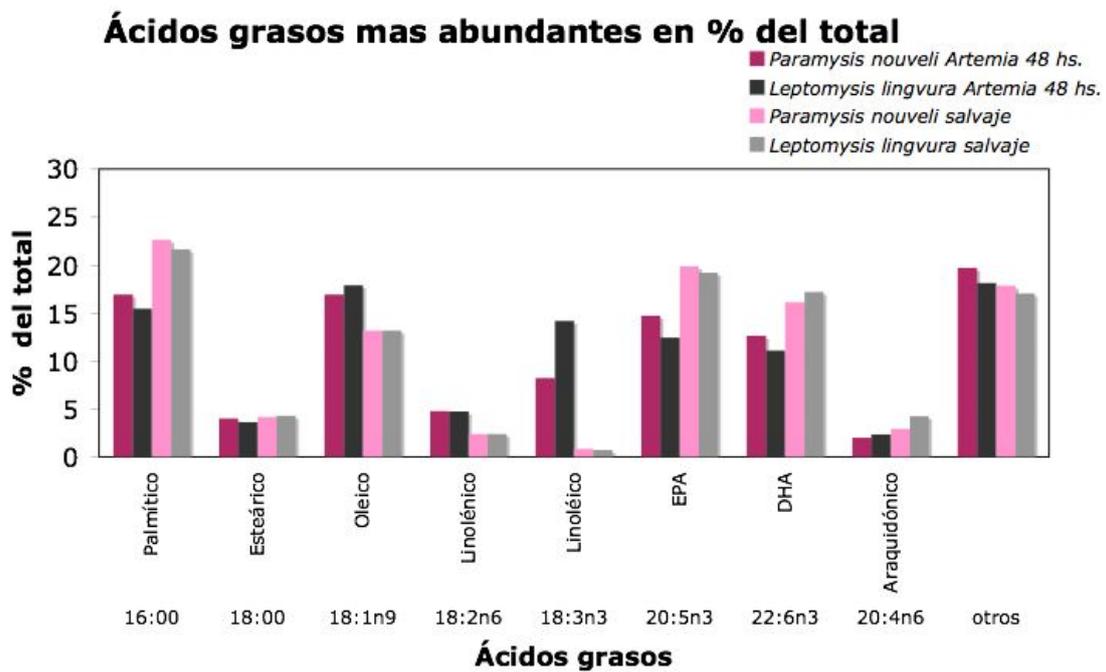


Figura 3.13: Ácidos grasos más abundantes (en % del total de ácidos grasos) para *Paramysis nouveli* y *Leptomysis lingvura* salvajes y alimentados con *Artemia* enriquecida con Easy DHA Selco®(INVE,Belgium).

3.7. Metabolismo respiratorio en *L.lingvura*

La evolución de la actividad ETS de la cohorte a lo largo del ciclo de vida muestra una tendencia exponencial a aumentar, con un coeficiente de correlación $R^2=0,92$ (n=32).

Al relacionar la longitud de los organismos de la cohorte con la actividad ETS encontrada, observamos una relación ETS-longitud (figura 3.15) presenta un $R^2=0,96$ y esta representada por la ecuación:

$$\ln ETS = b \ln SL + a \quad (3.8)$$

siendo $a=1,0887$ y la pendiente $b=2,4357$ (n=32, $R^2=0,96$); SL, longitud estándar; ETS=tasa respiratoria potencial.

A partir de los datos de la correlación observada entre longitud y biomasa para *L. lingvura* (ver ecuación 3.4) se estimó la biomasa de la cohorte a partir de la longitud y se determinó la relación ETS-biomasa (figura 3.15) con un coeficiente de correlación de Spearman= 0,956 (n=32 $P<0,01$), que está dada por la ecuación:

$$\ln ETS = b \ln W + a \quad (3.9)$$

siendo $a=4,153$ y la pendiente $b=0,9229$ (n=32, $R^2=0,96$); W=mg proteína; ETS=tasa respiratoria potencial.

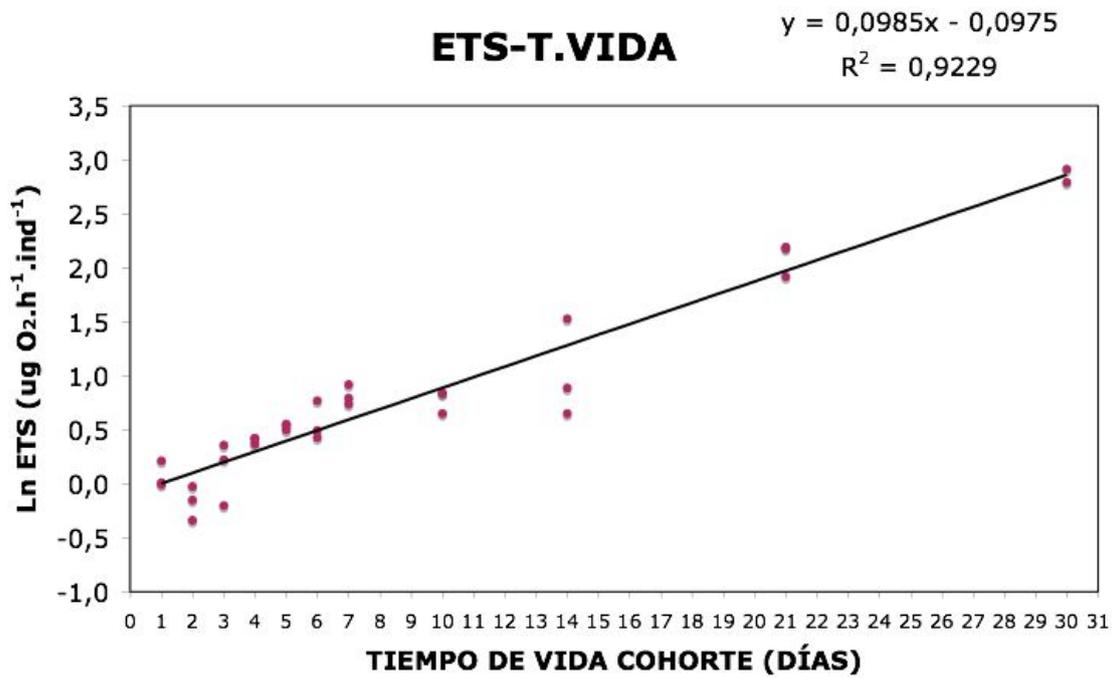


Figura 3.14: Tasa de respiración potencial de la cohorte en relación al tiempo de vida

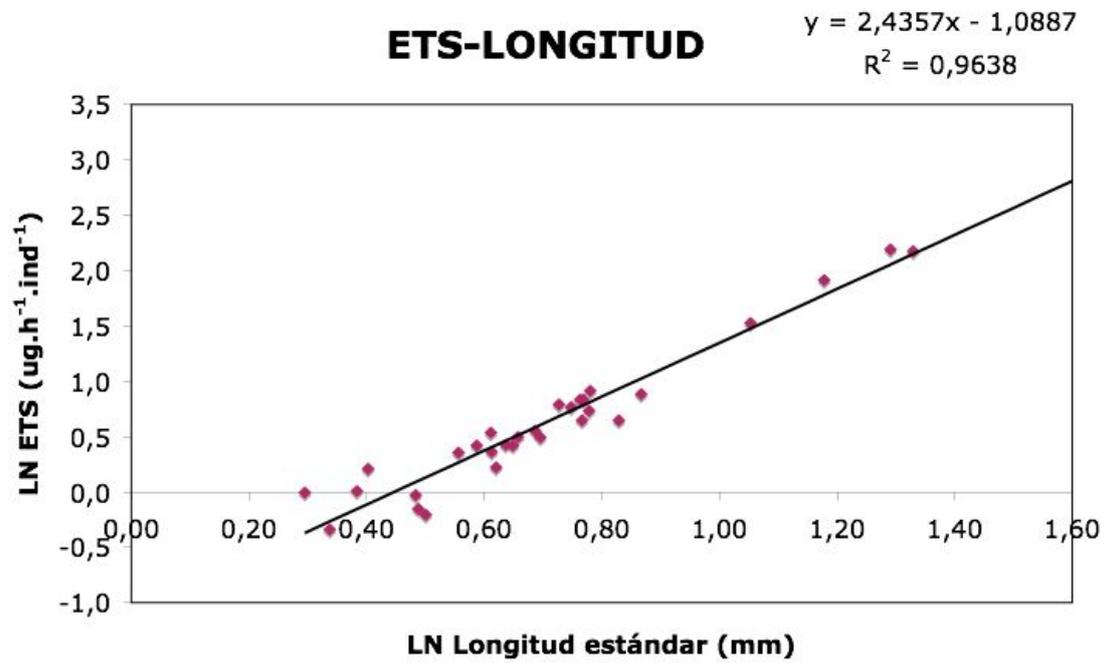


Figura 3.15: Tasa de respiración potencial en relación al tamaño corporal (mg proteína).

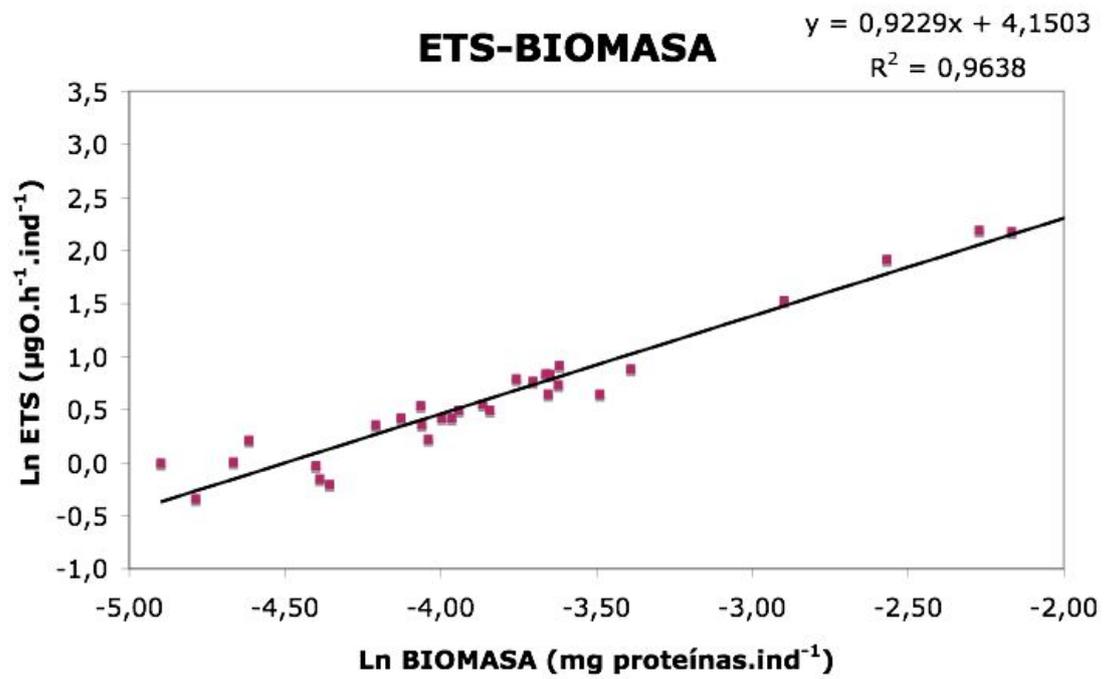


Figura 3.16: Tasa respiratoria potencial en relación a la biomasa (en mg de proteínas).

Las relaciones entre tasa metabólica y biomasa son expresadas generalmente como regresiones logarítmicas, y el coeficiente de regresión para la relación entre tasa respiratoria y tamaño corporal se aproxima a 0,75 como establece la ley de Keiber (Kleiber, 1961; Brown *et al.*, 2007).

La ley de Keiber (1961) postula que en la mayoría de los organismos la tasa metabólica es proporcional a la biomasa, según la ecuación:

$$Y = W^{3/4} \quad (3.10)$$

En zooplancton, otros autores han estudiado la relación ETS-biomasa a nivel ecológico (Gómez *et al.*, 2008) en muestras analizadas de diferentes regiones oceanográficas, a diferentes profundidades, y por lo tanto en diversas condiciones de alimentación. Los resultados obtenidos se muestran junto a los del presente trabajo en la tabla 3.7.

Como puede observarse en la tabla 3.7 en los transectos en los que la disponibilidad de alimento es buena (afloramientos y remolinos ciclónicos), la pendiente de la ecuación que relaciona log ETS-log biomasa es cercana a 1, al igual que en el presente trabajo (0.92) y en lo observado por otros autores en cultivos bacterianos (Packard *et al.*, 1983). Dado que este exponente es cercano a 1, la relación es lineal y no requiere transformación logarítmica (figura 3.17).

En muestras colectadas en estaciones costeras (Gómez *et al.*, 2008) y en muestras de zooplancton colectadas del medio e incubadas el mismo día (Packard and Gómez, 2008) la pendiente si se ajusta al valor de 0,75 establecido por Kleiber, en este sentido algunos autores postulan que estos organismo se encuentran en condiciones naturales de alimentación; mientras que en muestras oceánicas en condiciones de poca disponibilidad de alimento, la pendiente es menor a 0,75 (Gómez *et al.*, 2008), lo mismo se observa en cultivos de *Artemia salina* (Martínez, 2007) en los que los autores postulan que la alimentación que están recibiendo se encuentra por debajo de los niveles adecuados.

A partir de nuestros resultados y los obtenidos por otros autores (Packard *et al.*, 1983; Gómez *et al.*, 2008) encontramos que, en condiciones óptimas de alimentación la relación entre el coeficiente de regresión para la ecuación que relaciona log ETS-log-biomasa es cercano a 1, por lo cual la relación ETS-biomasa es directamente lineal y no necesita transformación logarítmica.

Tabla 3.7: Constantes de regresión ($\log \text{ETS} = b \log W + a$) para la relación ETS y biomasa obtenidas por distintos autores y para el presente trabajo. W, biomasa en mg de proteínas; ETS tasa respiratoria potencial.

Organismos estudiados	Ecuación de regresión	Referencia
cultivos de <i>Leptomysis lingvura</i>	$\text{Ln ETS} = 0,9229\text{LnW} + 4,153;$ $R^2=0,9638$	presente trabajo
zooplancton colectado en regiones de afloramiento	$\text{Log ETS} = 0,8862\log W + 0,1432;$ $R^2=0,5254$	Gómez et al.(2008)
zooplancton colectado en regiones con presencia de remolinos ciclónicos	- $\text{Log ETS} = 0,9787\log W - 0,1254;$ $R^2=0,4771$	Gómez et al.(2008)
zooplancton colectado en regiones costeras	$\text{Log ETS} = 0,7925\log W + 0,083;$ $R^2=0,6425$	Gómez et al.(2008)
zooplancton colectado en regiones oceánicas	$\text{Log ETS} = 0,6441\log W - 0,0297;$ $R^2=0,3784$	Gómez et al.(2008)
cultivos de <i>Artemia salina</i> alimentados con <i>Nanoclorosis sp.</i> (5000cel. ind ⁻¹)	$\text{Ln ETS} = 0,5938\ln W - 0,0496;$ $R^2=0,6044$	Martínez (2007)
cultivos de <i>Artemia salina</i> alimentados con <i>Dunaliella sp.</i> (1000 cel. ind ⁻¹)	$\text{Ln ETS} = 0,6377\ln W - 3,7651;$ $R^2=0,9214$	Martínez (2007)
zooplancton incubado 1 día	$\log \text{ETS} = 0,7913\log W + 0,5155;$ $R^2=0,9458$	Packard y Gómez (2008)

La relación actividad ETS-biomasa presenta un muy buen ajuste ($R^2 = 0.98$). Ante este resultado, cabría preguntarnos el porqué de esta relación tan buena, cuando el ETS es un reflejo de la potencialidad máxima de la respiración. En este sentido debemos recordar que la actividad ETS está determinada por la concentración del complejo enzimático-lipoproteico de NADH deshidrogenasa en la membrana interna de la mitocondria. Este complejo enzimático es constitutivo y por lo tanto forma parte de la maquinaria fija de las mitocondrias, no cambia rápidamente con las condiciones ambientales o la cantidad de sustrato metabolizable. En efecto, constituye una parte permanente de la célula y como tal varía conjuntamente con las variaciones de carbono, nitrógeno, proteínas y la biomasa total de la célula. Debido a que las enzimas están entre los principales componentes de la biomasa celular, se descomponen tan pronto ocurre la muerte celular, por lo que la actividad ETS desaparece rápidamente una vez que la célula muere. Por lo tanto podríamos decir pues que la actividad ETS es un claro índice de la biomasa viva de los organismos, es decir la biomasa que posee actividad enzimática. Esto confirma una vez más los resultados encontrados por otros autores (Packard *et al.*, 1983; Packard and Gómez, 2008; Martínez, 2007; Gómez *et al.*, 2008).

La tasa de respiración potencial por unidad de biomasa (ETS/W) se determinó para todas las tallas (figura 3.18), y puede observarse que los individuos más pequeños muestran una tendencia a respirar más por unidad de biomasa que los más grandes.

Establecer una relación entre la biomasa y la tasa respiratoria es un primer paso en el estudio del metabolismo respiratorio en misidáceos. Es fundamental para completar este estudio realizar experimentos de respiración *in situ*, para poder establecer empíricamente la relación R/ETS para este grupo en diferentes condiciones fisiológicas, y la relación con su biomasa.

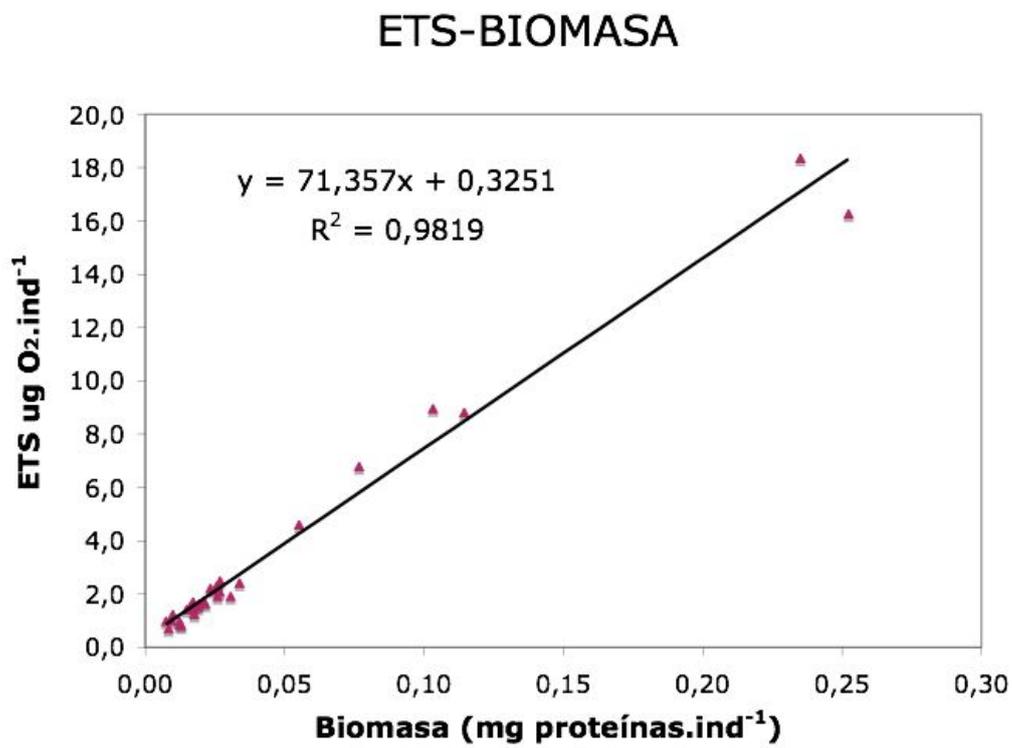


Figura 3.17: Relación lineal entre ETS y biomasa.

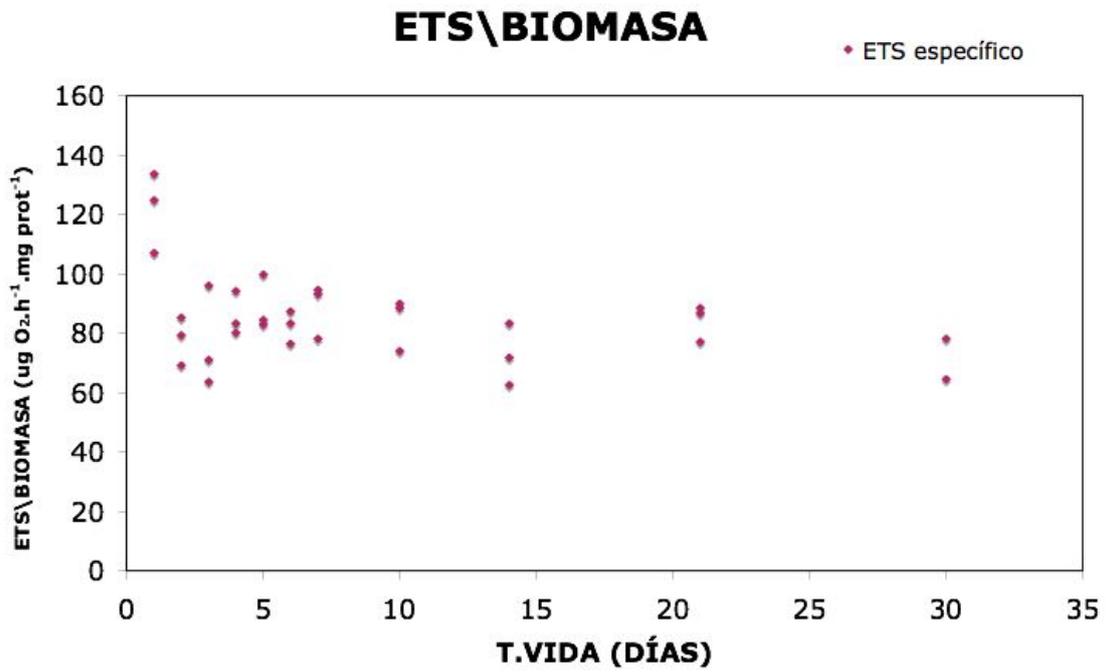


Figura 3.18: Tasa de respiración potencial por unidad de biomasa (mg de proteínas).

Capítulo 4

Conclusiones

- 1- Se identificaron 3 especies: *Siriella armata* (H. M. Edwards, 1837), *Leptomysis lingvura* (G. O. Sars, 1866) y *Paramysis nouveli* (Labat, 1953) en la zona de estudio.
- 2- Los dos sistemas de cultivo diseñados han funcionado correctamente para el mantenimiento en cautividad de *L.lingvura*.
- 3- *L.lingvura* presentó mayor supervivencia y producción que *P.nouveli* en las condiciones dadas para el sistema de cultivo de flujo continuo.
- 4- Se han desarrollado técnicas de cultivo que han permitido que las cohortes nacidas en cautividad de *L.lingvura* alcancen la madurez sexual.
- 5- Se obtuvo una relación significativa entre la longitud y la biomasa: $(\ln W = 2,6391 \ln SL - 5,6766, R^2 = 0,93)$ en *L.lingvura*.
- 6- Los misidáceos presentan un porcentaje de proteínas y de DHA, EPA y AA (sobre el total de lípidos) superior al que presentan *Artemia* y rotíferos, las presas utilizadas más frecuentemente en acuicultura, por lo cual podrían ser un alimento de muy buena calidad.
- 7- La relación DHA:EPA:AA de misidáceos salvajes puede ser un buen indicador de la relación óptima para el alimento utilizado en acuicultura, ya que los misidáceos son presa natural de peces y cefalópodos de interés comercial.

8- En condiciones de saturación de alimento la pendiente de la relación \ln ETS- \ln biomasa es cercana a 1, por lo cual esta relación no necesita transformación logarítmica, ya que ETS y biomasa poseen una relación lineal.

9- Respiración potencial y biomasa presentan una buena correlación: $(ETS = 71,357W + 0,3251, R^2 = 0,98)$, por lo que concluimos que el ETS podría ser un buen índice de la biomasa viva.

Anexo

**Artículo publicado a partir del
presente trabajo**

Agradecimientos

A Fabio y Laura por apoyarme en todo momento.

A Mati, Atá, Abú por estar presentes a pesar de la distancia.

A mis directoras de tesis May Gómez y Lucía Molina por su inestimable ayuda y a Fran Otero y Ted Packard por haberme brindado sus conocimientos.

A mis compañeros de laboratorio.

A Carmen Barberá por su ayuda en la clasificación taxonómica.

A la Universidad de las Palmas de Gran Canaria y el proyecto EXOME (CTM 2008-01616) por haberme permitido llevar a cabo este trabajo.

Bibliografía

AOAC (1995). *Official Methods of Analysis*. AOAC. USA..

BARBERÁ-CEBRIÁN, C.; RIBEIRO DA CUNHA, M.; SÁNCHEZ JEREZ, P. and RAMOS ESPLÁ, A. A. (2001). «Mysidacea associated with seagrass meadows off the southeast Iberian coast». *Boletín Instituto Español de Oceanografía*, **17**, pp. 97–106.

BROWN, J.H.; ALLEN, A.P. and GILLOOLY, J.F. (2007). *Body Size: The Structure and Function of Aquatic Ecosystems*. chapter The metabolic theory of ecology and the role of body size in marine and freshwater ecosystems. Cambridge University Press.

CASTRO, J. (1995). «Mysids and euphausiids in the diet of *Scomber japonicus* Houttuyn, 1782 off the Canary Islands.» *Boletín del Instituto Español de Oceanografía*, **II(1)**, pp. 77–86.

CHRISTIE, W.W. (1982). *Lipid Analyses*. Pergamon, Oxford, UK, 2th edition.

CURTIS, H. (2000). *Biología*. 6th edition.

CUZIN-ROUDY, J. and TCHERNIGOVITZEFF, C. (1985). «Chronology of the female molt cycle in *Siriella armata* M. Edw.(Crustacea: Mysidacea) based on marsupial development.» *Journal of Crustacean Biology*, pp. 1–14.

DEL GIORGIO, P. and WILLIAMS, P. (2005). *Respiration in aquatic Ecosystems*. Oxford University Press.

DOMÍNGUEZ, P.; FORES, R.; P.G., LEE TURK P.E. and ANDRADE, J. P. (2000). «Mysids culture: lowering costs with alternative diets.» *Aquaculture Research*, **31**, pp. 719–728.

DOMÍNGUEZ, P.; SYKES, A. and ANDRADE, J. (2001a). «The use of it *Artemia* sp. or mysids as food source for hatchlings of the cuttlefish (*Sepia officinalis*); effects

- on growth and survival throughout the life cycle.» *Aquaculture International*, **9**, pp. 319–331.
- DOMÍNGUEZ, P.; TURK, P.; ANDRADE, J. and LEE, P. (1999a). «Culture of the mysid, *Mysidopsis almyra* (Bowman), (Crustacea: Mysidacea) in a static water system: effects of density and temperature on production, survival and growth.» *Aquaculture Research*, **30**, pp. 135–143.
- DOMÍNGUEZ, P.; TURK, P.; ANDRADE, J. and LEE, P. (2001b). «Effects of enriched Artemia nauplii on production, survival and growth of the mysid shrimp *Mysidopsis almyra* Bowman 1964 (Crustacea: Mysidacea).» *Aquaculture Research*, **32**, pp. 599–603.
- DOMÍNGUEZ, P.; TURK, P. E.; ANDRADE, J. P. and LEE, P. G. (1999b). «Culture of the mysid, *Mysidopsis almyra* (Bowman), (Crustacea: Mysidacea) in a static water system: effects of density and temperature on production, survival and growth.» *Aquaculture Research*, **30**, pp. 135–143.
- FALKOWSKI, S.W. and WILSON, C. (1992). «Phytoplankton productivity in the North Pacific Ocean since 1900 and implications for absorption of anthropogenic CO₂.» *Nature*, **358**, pp. 741–743.
- FILHO, L.G. MEIRA; CALLANDAR, B.A.; HARRIS, N. and A.KATTENBERG, A. MASKELL (1996). «The science of climate change.» *Contribution of working group 1 to the second assessment report of IPCC.*, IPCC.
- FOCKEDEY, N.; MEES, J.; VANGHELUWE, M.; VERSLYCKE, T.; JANSSEN, C. R. and VINCX, M. (2005). «Temperatura and salinity effects on post-marsupial growth of *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea).» *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **326**, pp. 27–47.
- FOLCH, J.; LEES, M. and SLOANE-STANLEY, G. H. (1957). «A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissues.» *J. Biol. Chem.*, (**226**), pp. 497–509.
- GÓMEZ, M.; MARTÍNEZ, I.; HERNÁNDEZ-LEÓN, S. and PACKARD, T. (2008). «Does ETS activity follow Kleiber's law?» International Symposium on Eastern boundary upwelling ecosystems (2-6 Junio 2008). Las Palmas de Gran Canaria, Canary Islands, Spain.
- GÓMEZ, M.; TORRES, S. and HERNÁNDEZ-LEÓN, S. (1996). «Modification of the electron transport system (ETS) method for routine measurements of respiratory rates of zooplankton.» *S. Afr. J. mar. Sci.*, **16**, pp. 15–20.

- GÓMEZ, M.M. (1991). *Biomasa y actividad metabólica del zooplancton en relación con un efecto de masa de isla en aguas de Gran Canaria*. Ph.D. thesis, Universidad de las Palmas de Gran Canaria.
- GUEVARA, M.; LODEIROS, C.; DONATO, M.D.; GRACIANI, C. and FREITES, L. (2005). «Nutritional quality of *Metamysidopsis insularis* Brattegard (Crustacea: Mysidacea)». *Aquaculture Nutrition*, **11**, pp. 315–319.
- IZQUIERDO, M. (1996). «Essential fatty acid requirements of cultured marine fish larvae». *Aquaculture Nutrition*, **2**, pp. 183–191.
- IZQUIERDO, M.S.; WATANABE, T.; TAKEUCHI, T.; ARAKAWA, T. and KITAJIMA, C. (1990). *The Current Status of Fish Nutrition in Aquaculture*. chapter Optimum EFA levels in Artemia to meet the EFA requirements of red sea bream (*Pagrus major*)., pp. 221–232. Tokyo University of Fisheries, Tokyo.
- KENNER, R.A and AHMED, S.I. (1975). «Measurement of electron transport activities in marine phytoplankton.» *Mar.Biol.*, **33**, pp. 119–127.
- KIMMERER, W.J. and MCKINNON, A.D. (1987). «Growth, mortality, and secondary production of the Copepod *Acartia tranteri* in Westernport Bay, Australia.» *Limnology and Oceanography*, **32**, pp. 14–28.
- KLEIBER, M. (1961). *The fire of life: an introduction to animal energetic*. John Wiley and sons Inc., New York.
- KUHN, A.H.; BENGTSON, D.A. and SIMPSON, K.L. (1991). «Increased reproduction by mysids (*Mysidopsis bahia*) fed with enriched *Artemia* spp. nauplii.» *Mysids in fisheries: hard lessons from headlong introductions*, **9**, pp. 192–199.
- LABAT, R. (1953). «it *Paramysis nouveli* n. sp. et *Paramysis bacescoi*n sp. deux especes de Mysidacs confondues, jusqupresent, avec *Paramysis helleri* (G. O. Sars, 1877).» *Bulletin Institut Océanographique*, **1034**, pp. 1–24.
- LEHNINGER, A.; NELSON, D. and COX, M. (1995). *Principios de Bioquímica*. 2th edition.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. and RANDALL, R.J. (1951). «Protein measurements with a Folin phenol reagent.» *J.Biol.Chem.*, **193**, pp. 265–275.
- LUSSIER, S.; KUHN, A.; CHAMMAS, M. and SEWALL, J. (1988). «Techniques for the Laboratory Culture of *Mysidopsis* species (Crustacea: Mysidacea)». *Environmental Toxicology and Chemistry*, **7**, pp. 969–977.

- LUSSIER, S.M.; CHAMPLIN, D.; KUHN, A. and HELTSHE, J.F. (1996). «Mysid (*Mysidopsis bahia*) life-cycle test: Design comparisons and assessment.» *Environmental Toxicology and Risk Assessment: Biomarkers and Risk Assessment*, **5**.
- MARTÍNEZ, I. (2007). *Relaciones entre biomasa, tasa de crecimiento, respiración y respiración potencial en el crustáceo Artemia salina*. Master's thesis, Universidad de las Palmas de Gran Canaria.
- MAUCLINE, J. (1980). «The biology of Mysids and Euphausiids». *Advances in Marine Biology*, **18**, pp. 1–681.
- MILLERO, F.J. (1996). *Chemical Oceanography*. CRC Press, 2th edition.
- MOLINA, L.; SOCORRO, J.; HERRERA, R.; OTERO, F.; VILLARES, H. and IZQUIERDO, M. (2007). «Experiencias preliminares del cultivo de *Hippocampus hippocampus* (Linnaeus, 1758) en Gran Canaria.» XI Congreso Nacional de Acuicultura (24-28 de Septiembre). Vigo, España.
- MURANO, M. (1999). *South Atlantic Zooplankton*. volume 2, chapter Mysidacea, pp. 1099–1140. Backhuy Publishers, Leiden, Holanda..
- NORTON, B.L.; LEWIS, M.A. and MAYER, F.L. (1999). «Storage duration and temperature and the acute toxicities of estuarine sediments to *Mysidopsis bahia* and *Leptocheirus plumulosus*.» *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, **63(2)**, pp. 157–166.
- OTERO, F.; MOLINA, L.; SOCORRO, J.; HERRERA, R.; FERNÁNDEZ-PALACIOS, H. and IZQUIERDO, M. (2007). «Efecto de la primera alimentacin en la supervivencia y el crecimiento de cras de caballito de mar, *Hippocampus hippocampus* (Linnaeus, 1758).» XI Congreso Nacional de Acuicultura (24-28 de Septiembre). Vigo, España.
- OWENS, T.G. and KING, F.D. (1975). «The Measurement of respiratory electron transport system activity in marine zooplankton.» *Marine Biology*, **30**, pp. 27–36.
- PACKARD, T.T. (1971). «The Measurement of Respiratory Electron-transport Activity in Marine Phytoplankton.» *Journal of Marine Research*, **29(29)**, pp. 235–244.
- PACKARD, T.T; GARFIELD, P.C. and MARTINEZ, R. (1983). «Respiration and respiratory enzyme activity in aerobic and anaerobic cultures of the marine denitrifying bacterium *Pseudomonas perfectomarinus*». *Deep Sea Research*, **2**, pp. 227–243.

- PACKARD, T.T and GÓMEZ, M. (2008). «Exploring a first-principles-based model for zooplankton respiration». *ICES Journal of Marine Science*, **65**, pp. 371–378.
- PACKARD, T.T.; HEALY, M.L. and RICHARDS, F.A. (1971). «Vertical distribution of the activity of the respiratory electron transport system in marine plankton.» *Limnology and Oceanography*, **16**, pp. 60–70.
- PACKARD, T.T. and WILLIAMS, P.L.B. (1981). «Rates of respiratory oxygen consumption and electron transport in surface seawater from the northwest Atlantic Ocean.» *Oceanologica Acta*, **4**, pp. 351–358.
- REITSEMA, L.A. (1980). «A recirculating artificial seawater system for the laboratory culture of *Mysidopsis almyra* (Crustacea; Pericaridea).» *Estuaries and Coasts*, **3(4)**, pp. 321–323.
- RUTTER, W.J. (1967). *Methods in developmental biology*. chapter Protein determinations in embryos, pp. 671–684. Academic Press, London.
- SARGENT, J.; BELL, G.; MCEVOY, L.; TOCHER, D. and ESTEVEZ, A. (1999). «Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish.» *Aquaculture*, **177(1-4)**, pp. 191–199.
- SARGENT, J.R.; MCEVOY, L.A. and BELL, J.G. (1997). «Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds.» *Aquaculture*, **155(1-4)**, pp. 117–127.
- SOLOMON, E.P.; BERG, L.R.; MARTIN, D.W. and VILLE, C. (1998). *Biología de Ville*. 4th edition.
- STARR, C. and TAGGART, R. (2004). *Biología. La unidad y diversidad de la vida*. 10th edition.
- TACON, A.C.G. (1989). *Nutrición y alimentación de peces y camarones cultivados*. Manual de Capacitación.
- TATTERSALL, W. M. and TATTERSALL, O. (1951). *The British Mysidacea*. Ray Society, Londres.
- VERSLYCKE, T.A.; FOCKEDEY, N.; MCKENNEY JR, C.L.; ROAST, S.D.; JONES, M.B.; MEES, J. and JANSSEN, C.R. (2004). «Mysid crustaceans as potential test organisms for the evaluation of environmental endocrine disruption: a review.» *Environmental Toxicology and Chemistry*, **23(5)**, pp. 1219–1234.
- WARD, S.H. (1984). «A system for laboratory rearing of the mysid, *Mysidopsis bahia* Molenock.» *The Progressive Fish-Culturist*, **46(3)**, pp. 170–175.

- WITTMANN, K. J. (1978). «Adoption, replacement, and identification of young in marine Mysidacea (Crustacea)». *Journal of experimental marine biology and ecology*, **32(3)**, pp. 259–274.
- WITTMANN, K.J. (1981). «Comparative biology and morphology of marsupial development in *Leptomysis* and other Mediterranean Mysidacea (Crustacea).» *Journal of experimental marine biology and ecology*, **52**, pp. 243–270.
- WITTMANN, K.J. (1986). «Saisonale und morphogeographische differenzierung bei *Leptomysis lingvura* und zwei verwandten speziez (Crustacea, Mysidacea).» *Ann. Naturhist. Mus. Wien.*, **87**, pp. 265–294.
- WITTMANN, K.J. and WIRTZ, P. (1998). «A first inventory of the mysid fauna (Crustacea: Mysidacea) in coastal waters of the Madeira and Canary archipelagos.» *Bol. Mus. Mun. Funchal*, **5**, pp. 511–533.
- WOODS, C.M.C. and VALENTINO, F. (2003). «Frozen mysids as an alternative to live *Artemia* in culturing seahorses *Hippocampus abdominalis*.» *Aquaculture Research*, **34(9)**, pp. 757–763.