

**EFECTO COMBINADO DE LA TEMPERATURA Y SALINIDAD SOBRE LA
ECLOSIÓN DE HUEVOS ALMACENADOS DE *Acartia tonsa***

JOHN ELVIS ACOSTA PORTILLO

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
DEPARTAMENTO DE RECURSOS HIDROBIOLÓGICOS
INGENIERÍA EN PRODUCCIÓN ACUÍCOLA
SAN JUAN DE PASTO, COLOMBIA
2021**

**EFFECTO COMBINADO DE LA TEMPERATURA Y SALINIDAD SOBRE LA
ECLOSIÓN DE HUEVOS ALMACENADOS DE *Acartia tonsa***

JOHN ELVIS ACOSTA PORTILLO

**Trabajo de grado modalidad tesis de investigación, presentado como
requisito para optar al título de Ingeniero en Producción Acuícola**

Director:
GUSTAVO ADOLFO TORRES VALENCIA
Profesional en Acuicultura.
Dr (c)

Co-Director:
MARCO ANTONIO IMUES FIGUEROA
Zootecnista
Esp, MSc

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
DEPARTAMENTO DE RECURSOS HIDROBIOLÓGICOS
INGENIERÍA EN PRODUCCIÓN ACUÍCOLA
SAN JUAN DE PASTO, COLOMBIA
2021**

NOTA DE RESPONSABILIDAD

“Las ideas y conclusiones aportadas en el siguiente trabajo son responsabilidad exclusiva del autor”

Artículo 1ro del Acuerdo No. 324 de octubre 11 de 1966 emanado del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de Aceptación

GUSTAVO ADOLFO TORRES VALENCIA
Director

MARCO ANTONIO IMUÉS FIGUEROA
Co-Director

YEMALL ALEXANDER MAIGUAL ENRÍQUEZ
Jurado delegado

CAMILO LENIN GUERRERO ROMERO
Jurado

San Juan de Pasto, enero del 2021

AGRADECIMIENTOS

Gustavo Adolfo Torres Valencia	Profesor programa Ingeniería en Producción Acuícola.
Marco Antonio Imués Figueroa	Director Departamento Recursos Hidrobiológicos.
Jesús Hernando Gamboa Dcroz	Director Estación Acuícola Marina Bahía Málaga.
Jaglin Evelio López Arboleda	Coordinador Estación Acuícola Marina Bahía Málaga.
Yemall Alexander Maigual Enríquez	Ph.D, MSc, Ingeniero en Producción Acuícola, Jurado delegado.
Camilo Lenin Guerrero Romero	Ingeniero en Producción Acuícola, Jurado.
Luis Alfonso Solarte	Secretario Académico Facultad de Ciencias Pecuarias, Universidad de Nariño
Piedad Mejía Santacruz	Secretaria Departamento de Recursos Hidrobiológicos, Universidad de Nariño
Mario David Delgado	MSc, Ingeniero en Producción Acuícola
Óscar Mejía Santacruz	Economista, Bibliotecario
Janeth del Carmen Chaña	Funcionaria Departamento de Recursos Hidrobiológicos

A la Universidad de Nariño, Departamento de Recursos Hidrobiológicos en especial al programa de Ingeniería en Producción Acuícola, el cual me recibió, acogió y formó como profesional y persona. Hoy en día es motivo de orgullo para mí y mi familia poder decir que estudié en la Universidad de Nariño.

Al personal de la Estación Acuícola Marina Bahía Málaga, gracias por su tiempo, dedicación y paciencia. Esto, también es por ustedes.

A mis amigos más cercanos Maya, Rivera, Alexis, John Jairo, Wilmer, Nikita, René, Mafeins, Sandra, Naspi, Vane Vane, Yeison, Stip, Trejo y aquellos que encontré en el camino, gracias por ser personas únicas y ejemplos a seguir.

A mis mentores, mis padres, Miyer y Gustavo, son grandes ejemplos para mí y un regalo del cielo.

DEDICADO ESPECIALMENTE

En memoria de mis familiares difuntos, quienes disfrutarían tanto cada éxito en mi vida, especialmente a Caliche, quien me impulsó con su curiosidad y con cada palabra tocó mi corazón.

Por cada esfuerzo en el cual el nombre de mi familia, especialmente el de mis padres, ha estado impulsándome a terminar los objetivos que he iniciado y me he trazado en el camino, por esta vez, uno llamado universidad, y del cual pude probar la templanza, valores y sentido de pertenencia que han inculcado en mí.

A mis hermanas Lauris y Alexa, por ser un motor y siempre un punto de partida, siempre que pensé en rendirme, volví la vista para atrás y me di cuenta que ellas ven un ejemplo en mí, no hay razón para rendirse si mis mujeres maravillosas están a mi lado.

A mi Dalis, por quien cada esfuerzo ha valido la pena para conseguir los objetivos trazados, y a pesar de todo ha estado siempre impulsándome a seguir adelante en cada paso.

John Elvis Acosta Portillo

“No existe una manera fácil. No importa cuán talentoso seas, tu talento fallará si no lo desarrollas correctamente, si no estudias, si no trabajas duro, si no te dedicas a ser mejor cada día.”

Will Smith.

“Uno erra todo aquello mismo que uno no intenta.”

Michael Jordan

RESUMEN

Dentro del grupo de los copépodos, la especie de calanoide *Acartia tonsa* es una de las más estudiadas por su característica cosmopolita y la capacidad de producir huevos que entran en estado de quiescencia, los cuales pueden ser almacenados y utilizados como stock de nauplios en forma similar a los quistes de *Artemia* spp. Las poblaciones tropicales poseen baja eclosión después de largo tiempo de almacenamiento, por ende, son necesarias el estudio de las condiciones ambientales de cultivo para mejorar la calidad de huevos producidos. En ese sentido, en la presente investigación se cultivó adultos del copépodo *A. tonsa* bajo combinaciones de temperatura (20 y 26 °C) y salinidad (18 y 28 UPS), con el fin de determinar el efecto de estas variables sobre la eclosión de huevos almacenados por diferentes periodos de tiempo (0 - 30 días). Adultos fueron dispuestos en recipientes de 3 L a una densidad de 3 adultos mL⁻¹, con las respectivas combinaciones tratamiento de temperatura y salinidad, cada unidad experimental fue manejada con aireación suave, fotoperíodo de 12:12 horas Luz:Oscuridad y alimentados con la microalga *Rhodomonas salina* (UTEX) a razón diaria de 1.500 µg de carbono L⁻¹. Después de un lapso de 24 h se cosechó los huevos a partir de cada unidad experimental, luego fueron distribuidos en tubos de ensayo a una densidad de 50.000 huevos mL⁻¹ y almacenados a 3 °C. Para determinar el porcentaje de eclosión, muestras de huevos (50 a 80) fueron dispuestas en cámaras multicelda en agua marina estéril. Se realizó la eclosión (25 °C y 24 UPS) de huevos a los 0 días (huevos frescos no almacenados), 15 y 30 días de almacenamiento. Después del tiempo de incubación (48 h) se agregó lugol al 1 % y se procedió a contar los nauplios y huevos no eclosionados bajo microscopio. Los datos colectados fueron analizados a través de un arreglo factorial 2³ donde la temperatura, salinidad y tiempo de almacenamiento, fueron los factores con dos niveles de significancia para cada uno.

Para huevos frescos (0 días de almacenamiento), las combinaciones de temperatura y salinidad generaron diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq ,05$). La eclosión fue favorecida por una baja temperatura y alta salinidad (97 %), no obstante, en todos los tratamientos la eclosión superó el 84 %. En huevos almacenados el tiempo de almacenamiento afectó negativamente la eclosión, encontrándose diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq ,05$). La combinación de baja temperatura y alta salinidad permitió obtener la mayor eclosión después de 15 y 30 días de almacenamiento (77 ± 3 y 20 ± 2 %, respectivamente). De forma contraria, alta temperatura y baja salinidad afecta negativamente la eclosión de los huevos almacenados (< 3 %). Estos resultados permiten mejorar las condiciones de cultivo de esta especie y contribuyen al desarrollo de la tecnología de producción de huevos de copépodos como fuente de alimento vivo (nauplios) para la acuicultura marina.

Palabras clave: copépodos, alimento vivo, acuicultura marina, huevos, eclosión, quiescencia, cultivo, nauplios.

ABSTRACT

Within the group of copepods, the calanoid species *Acartia tonsa* is one of the most studied for its cosmopolitan characteristic and the ability to produce eggs that enter a state of quiescence, which can be stored and used as a stock of nauplium similar to cysts of *Artemia* spp. Tropical populations have low hatching after long storage time, therefore, it is necessary to study the environmental conditions of cultivation in order to improve the quality of eggs produced. In this regard, adults of copepod *A. tonsa* were cultivated under temperature combinations (20 and 26 °C) and salinity (18 and 28 UPS) in order to determine the effect of these variables on hatching eggs stored for different periods of time (0 - 30 days). Adults were arranged in containers of 3 L at a density of 3 adults.mL⁻¹, with the respective combinations of temperature and salinity treatment, each experimental unit was handled with mild aeration, photoperiod of 12:12 hours Light:Darkness and fed with the microalgae *Rhodomonas salina* (UTEX) at a daily rate of 1.500 µg of carbon.L⁻¹. After 24 hours the eggs were harvested from each experimental unit, then distributed in test tubes at a density of 50.000 eggs.mL⁻¹ and stored at 3 °C. To determine the percentage hatching, egg samples (50 to 80) were arranged in multicellde chambers in sterile marine water. Hatching (25 °C and 24 UPS) of eggs was carried out at 0 days (fresh eggs not stored), 15 and 30 days storage. After incubation time (48 h) 1 % lugol was added and unhatching naupli and eggs were counted under a microscope. The data collected were analysed through a factorial arrangement 2³ where the temperature, salinity and storage time were the factors with two levels of significance for each.

For fresh eggs (0 days of storage), temperature and salinity combinations generated significant differences between treatments ($p \leq ,05$). Hatching was favoured by low temperature and high salinity (97 %), however, in all treatments hatching exceeded 84 %. In eggs stored the storage time negatively affected hatching, with significant differences between treatments ($p \leq ,05$). The combination of low temperature and high salinity allowed the highest hatching after 15 and 30 days of storage (77 ± 3 and 20 ± 2 % respectively). To the contrary, high temperature and low salinity adversely affect the hatching of stored eggs (< 3 %). These results improve the growing conditions of this species and contribute to the development of technology for the production of copepod eggs as a source of live food (naupli) for marine aquaculture.

Key words: copepods, live feed, marine aquaculture, eggs, hatching, quiescence, culture, nauplii.

CONTENIDO

	Pg.
RESUMEN	8
CONTENIDO	10
1. INTRODUCCIÓN.....	18
2. OBJETIVOS.....	20
2.1 OBJETIVO GENERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3. MARCO REFERENCIAL	21
3.1 IMPORTANCIA DEL ALIMENTO VIVO EN ACUICULTURA	21
3.2 BIOLOGÍA DE LOS COPÉPODOS	21
3.3 GENERALIDADES DE <i>A. tonsa</i>	23
3.4 IMPORTANCIA DE <i>A. tonsa</i> EN ACUICULTURA	26
3.5 CULTIVO DE COPÉPODOS.....	26
3.6 ASPECTOS CRÍTICOS DEL CULTIVO	27
4. METODOLOGÍA	30
4.1 LOCALIZACIÓN	30
4.2 PERIODO DE ESTUDIO	31
4.3 INSTALACIONES, EQUIPOS, MATERIALES E INSUMOS.....	31

4.3.1 Instalaciones.....	31
4.3.2 Equipos.....	31
4.3.3 Materiales.....	32
4.3.4 Insumos.....	32
4.4 PLAN DE MANEJO	32
4.4.1 Obtención de la cepa.....	32
4.4.2 Alimentación de los copépodos	34
4.4.3 Obtención de reproductores.	34
4.4.4 Experimentos de salinidad y temperatura.....	35
4.4.5 Cosecha de huevos.	35
4.4.6 Desinfección y almacenamiento de huevos.....	35
4.4.7 Determinación de la eclosión de huevos.	37
4.4.8 Diseño experimental y análisis estadístico.	37
4.4.9 Variables a evaluar.	39
5. RESULTADOS	41
5.1 ECLOSIÓN HUEVOS FRESCOS	41
5.2 ECLOSIÓN HUEVOS ALMACENADOS	41
6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	44
7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	48

7.1 CONCLUSIONES.....	48
7.2 RECOMENDACIONES	48
BIBLIOGRAFÍA.....	49
ANEXOS.....	57

LISTA DE TABLAS

	Pg.
Tabla 1. Tratamiento huevos frescos y mortalidad	38
Tabla 2. Tratamientos e interacciones.....	38

LISTA DE FIGURAS

	Pg.
Figura 1. Ubicación de la Estación Acuícola Marina Bahía Málaga	30
Figura 2. Montaje unidades experimentales	31
Figura 3. Instalaciones para experimento de salinidad y temperatura.	33
Figura 4. Distribución experimento.	36
Figura 5. Porcentajes eclosión grupo huevos frescos.....	42
Figura 6. Porcentajes eclosión Grupo 15 y 30 días de almacenamiento	43

LISTA DE ANEXOS

	Pg.
Anexo A. Prueba de Brand Esnedecor	57
Anexo B. Comparación de proporciones para adultos.....	57
Anexo C. Número de huevos por tratamientos, réplica y grupo.....	58
Anexo D. Promedio y desviación estándar grupo huevos frescos	59
Anexo E. Verificación de supuestos estadísticos grupo huevos frescos.....	59
Anexo F. Análisis de varianza para grupo huevos frescos	60
Anexo G. Prueba de Tukey HSD para grupo huevos frescos	60
Anexo H. Tabla de promedios grupo 15 y 30 días de almacenamiento.....	61
Anexo I. Verificación supuestos estadísticos para 15 y 30 días almacenamiento	61
Anexo J. Análisis de varianza Grupo 15 y 30 días de almacenamiento.....	62
Anexo K. Prueba de Tukey HSD para Grupo 15 y 30 días de almacenamiento ...	63

GLOSARIO

ALIMENTO VIVO: aquellos animales que estando aún con vida, se usan como alimento para otros animales carnívoros y omnívoros.

COPÉPODO: subclase de crustáceos diminutos, con un solo ojo no compuesto, sin caparazón ni extremidades abdominales, que nadan con el primer par de antenas, que son de gran tamaño.

COPEPODITO: estado de desarrollo de copépodos posterior a la etapa naupliar

EURITERMO: dícese de organismos que pueden desarrollarse en temperaturas muy -variables.

EURIHALINO: aquellos seres acuáticos que son capaces de vivir en aguas que poseen un amplio rango de concentración de salinidad

ESTENOTÍPICO: que tiene una gama estrecha de tolerancia a un factor determinado, tal como la temperatura; es decir estenotermo.

FITOPLANCTON: conjunto de organismos exclusivamente vegetales que forman parte del plancton.

HUEVOS DIAPAUSA: se conocen también como aquellos huevos que entran en un estado de resistencia extremo o letargo, tras haber pasado un periodo preestablecido denominado fase refractaria. Puede ser originado por condiciones ambientales adversas, físicos o químicos del agua, causando una fuerte disminución o paro total en la actividad metabólica.

HUEVOS SUBITÁNEOS: son aquellos huevos que eclosionan de forma espontánea o inesperada.

HUEVOS EN ESTADO DE QUIESCENCIA: se conocen también como aquellos huevos que pueden entrar en un estado de resistencia en el cual su actividad metabólica se arresta o retarda bajo determinadas condiciones. Son similares a los huevos subitáneos con la diferencia de que estos pueden ser inducidos a partir de las condiciones ambientales adversas, físicas o químicas en el agua, causados especialmente por la temperatura, hipoxia y fotoperiodo.

LARVICULTURA: cultivo de animales que tienen pocas horas de eclosión, generalmente en laboratorios.

MICROALGAS: son microorganismos fotoautótrofos, capaces de transformar la luz solar en energía química mediante la fotosíntesis oxigénica y además capaces de asimilar carbono en forma de dióxido de carbono.

NAUPLIO: primera larva característica de los crustáceos.

PLANCTON: conjunto de organismos pelágicos que se encuentran en suspensión en el agua del mar o en las aguas dulce

POLÍFAGO: conjunto de organismos que poseen una alimentación variada. Estos organismos se pueden nutrir, a la vez, de especies vegetales y de especies animales.

QUIESCENCIA: estado donde se arresta el metabolismo, el cual puede ser retomado cuando las condiciones ambientales son adecuadas.

TAMIZ: aparato que contiene una red muy fina utilizado para la filtración, generalmente menor a 1000 μm .

UPS: unidades prácticas de salinidad o g.L^{-1} .

ZOOPLANCTON: conjunto de organismos del reino animal que forman parte del plancton.

1. INTRODUCCIÓN

En larvicultura de muchas especies de peces marinas de interés acuícola, los nutrientes necesarios para larvas son suplidos por el alimento vivo, tales como rotíferos, copépodos y nauplios de *Artemia* spp. Los copépodos por su adecuado contenido nutricional¹ se han propuesto ampliamente en acuicultura², además, en la naturaleza constituyen el mayor recurso como presa viva para larvas de peces marinos³. Actualmente se han desarrollado estudios que viabilizan su cultivo a diferentes escalas⁴, así como evaluaciones de dietas adecuadas que permitan un incremento en la producción de huevos y nauplios⁵, métodos de cosecha y almacenamiento de huevos para posteriores usos con fines acuícolas⁶ y condiciones ambientales que permitan mejoras en su cultivo⁷.

El copépodo calanoide marino *Acartia tonsa* es de gran interés para la acuicultura⁸ y estudios de su cultivo son necesarios para viabilizar su uso como alimento vivo⁹. En este sentido, se ha demostrado que cambios ambientales pueden afectar variables como crecimiento, producción de huevos y eclosión¹⁰. La eclosión de huevos es de particular interés, puesto que los huevos subitáneos de *A. tonsa* pueden entrar en estado de quiescencia, lo cual viabiliza el uso de sus embriones tras periodos de almacenamiento de forma análoga a los quistes de *Artemia* spp.¹¹.

¹ STOTTRUP, Josianne G. Production and Nutritional Value of Copepods. Dans : STOTTRUP, Josianne G et MCEVOY, Lessley (dir.), Live Feeds in Marine Aquaculture [En línea]. Blackwell Publishing. 2007. p. 146. DOI 10.1002/9780470995143.ch5.

² DRILLET, Guillaume, FROUËL, Stéphane, SICHLAU, Mie H., et al. Status and recommendations on marine copepod cultivation for use as live feed. En: Aquaculture [En línea]. Elsevier. 2011. Vol. 315., p. 156. DOI 10.1016/J.AQUACULTURE.2011.02.027.

³ FRANCO, Sofia C., AUGUSTIN, Christina B., GEFFEN, Audrey J., et al. Growth, egg production and hatching success of *Acartia tonsa* cultured at high densities. Aquaculture [En línea]. 2017. Vol. 468. p. 570. DOI 10.1016/j.aquaculture.2016.10.044.

⁴ STOTTRUP, Josianne G., Op. cit. p., 147. DOI 10.1002/9780470995143.ch5.

⁵ ZHANG, Jianshe, IANORA, Adrianna, WU, Changwen, et al. How to increase productivity of the copepod *Acartia tonsa* (Dana): Effects of population density and food concentration. Aquaculture Research [En línea]. 2015. Vol. 46, n° 12. p. 2983. DOI 10.1111/are.12456.

⁶ JØRGENSEN, Tue Sparholt, JEPSEN, Per Meyer, PETERSEN, H. Cecilie B., et al. Eggs of the copepod *Acartia tonsa* Dana require hypoxic conditions to tolerate prolonged embryonic development arrest. BMC Ecology [En línea]. BMC. 2019. Vol. 19, n° 1. p. 2. DOI 10.1186/s12898-018-0217-5.

⁷ SARKISIAN, Brie L., LEMUS, Jason T., APEITOS, Angelos, et al. An intensive, large-scale batch culture system to produce the calanoid copepod, *Acartia tonsa*. Aquaculture [En línea]. Elsevier B.V. 2018., Vol. 501. p. 274. DOI 10.1016/j.aquaculture.2018.11.042.

⁸ DRILLET, Guillaume FROUËL, Stéphane, SICHLAU, Mie H., et al. Op. cit., p. 157. DOI 10.1016/J.AQUACULTURE.2011.02.027..

⁹ JØRGENSEN, Tue Sparholt, JEPSEN, Per Meyer, PETERSEN, H. Cecilie B., et al. Op. cit., p. 3. DOI 10.1186/s12898-018-0217-5

¹⁰ HOLSTE, Linda et PECK, Myron A. The effects of temperature and salinity on egg production and hatching success of Baltic *Acartia tonsa* (Copepoda: Calanoida): A laboratory investigation. Marine Biology [En línea]. 2006. Vol. 148. p. 1063. ISBN 0025-3162. DOI 10.1007/s00227-005-0132-0.

¹¹ TROTTET, Aurore, RICHIER DE FORGES, Mathilde, MAGUET, Rémi, et al. Optimising productivity of copepod cultures as live feed. AQUA Culture Asia Pacific Magazine [En línea]. 2017. Vol. 13. p. 45. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/319931167>.

El copépodo *A. tonsa* es considerado una especie cosmopolita, que posee una alta plasticidad, no obstante, autores como Drillet et al¹² y Sarkisian et al¹³ mencionan que las condiciones de cultivo de *A. tonsa* deben adaptarse a los niveles reportados para cada población utilizada, puesto que las poblaciones sufren procesos de adaptación. Lo anterior es de gran interés, debido a que existen fuertes variaciones en el almacenamiento de huevos utilizando poblaciones aisladas desde diferentes latitudes, donde las cepas procedentes de temperaturas tropicales muestran los más bajos porcentajes de eclosión¹⁴.

Se ha reportado que factores como temperatura y salinidad durante el desove de *A. tonsa* pueden afectar el proceso de reclutamiento en términos de cambios en su dinámica poblacional y ciclo de vida¹⁵, pero aún se desconoce el efecto de la interacción entre estos factores sobre la eclosión de huevos almacenados desde poblaciones tropicales.

En este trabajo se determinó el efecto combinado de dos salinidades y dos temperaturas durante el desove sobre la eclosión de huevos frescos y almacenados del copépodo *A. tonsa*.

¹² DRILLET, Guillaume, GOETZE, Erica, JEPSEN, Per M., et al. Op. cit. p. Strain-specific vital rates in four *Acartia tonsa* cultures, I: Strain origin, genetic differentiation and egg survivorship. En: Aquaculture [En línea]. 2008. Vol. 280. p. 111. DOI 10.1016/j.aquaculture.2008.04.005.

¹³ SARKISIAN, Brie L. et al., Op. cit., p. 274

¹⁴ Ibíd. p. 275

¹⁵ PECK, Nadine, PETERS, Janna, DIEKMANN, Rabea, et al. Interactive effects of temperature and salinity on population dynamics of the calanoid copepod *Acartia tonsa*. Journal of Plankton Research [En línea]. 2014. p. 3. DOI 10.1093/plankt/fbu093

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Establecer el efecto de la temperatura y la salinidad sobre la eclosión de huevos del copépodo calanoide *A. tonsa* almacenados en diferentes períodos de tiempo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer la supervivencia de los copépodos *A. tonsa* cultivados bajo dos temperaturas (20 y 26 °C) y dos salinidades (18 y 28 UPS).
- Determinar los porcentajes de eclosión de huevos frescos no almacenados del copépodo *A. tonsa* desovados bajo dos salinidades y dos temperaturas en condiciones de laboratorio.
- Determinar los porcentajes de eclosión de huevos del copépodo *A. tonsa* almacenados por 15 y 30 días, desovados bajo dos salinidades y dos temperaturas.

3. MARCO REFERENCIAL

3.1 IMPORTANCIA DEL ALIMENTO VIVO EN ACUICULTURA

En acuicultura, el alimento vivo forma parte indispensable como primera alimentación para numerosas especies durante la larvicultura. Conceição et al¹⁶, menciona que esta etapa es considerada un cuello de botella para la acuicultura, caracterizada por ser de alta mortalidad la cual requiere alto control y monitoreo de la alimentación.

El alimento vivo en acuicultura está compuesto por el fitoplancton y el zooplancton, indispensables como primera alimentación y eslabón en la cadena trófica, el cual, enmarca miles de especies distintas que en conjunto forman una gran biodiversidad. Dussart¹⁷, menciona que el plancton se encuentra distribuido en los cuerpos de agua, no presentan resistencia ante las fuerzas ejercidas por las corrientes, olas y mareas. Lavens y Sorgeloos¹⁸, lo consideran como un recurso que se puede encontrar desde las superficies hasta metros por debajo del agua, en cuerpos de agua dulce y salada. Kwok et al¹⁹ y Holste et al²⁰, mencionan la capacidad euriterma y eurihalina de algunos organismos planctónicos, pero también se encuentran algunos que son sensibles a los cambios que se presenten en el cuerpo de agua.

3.2 BIOLOGÍA DE LOS COPÉPODOS

De acuerdo a Marcus²¹, los copépodos son animales acuáticos conocidos como artrópodos pertenecientes a ambientes oceánicos, continentales y estuarinos. Støttrup²², describe que el nombre copépodo se deriva de del griego *kope* que significa “remar”, y *podos* que significa “pies”, órganos indispensables en funciones como alimentación, natación y desplazamiento. Componen una gran cantidad del zooplancton presente en el cuerpo de agua²³, puesto que son los organismos más con mayor presencia en el medio acuático²⁴.

¹⁶ CONCEIÇÃO, Luís. YÚFERA, Manuel. MAKRIDIS, Pavlos, et al. Live feeds for early stages of fish rearing. En: Aquaculture Research [En línea]. 2010. Vol. 41. p. 613. DOI 10.1111/j.1365-2109.2009.02242.x

¹⁷ DUSSART, B. M. Les différentes catégories de plankton. Hydrobiologia. 1965. Vol. 26, n° 1887. p. 72.

¹⁸ LAVENS, Patrick et SORGELOOS, Patrick. Manual on the production and use of live food for aquaculture. Vol. 361. 1996. p. 4. ISBN 9788578110796. DOI 10.1017/CBO9781107415324.004.

¹⁹ KWOK, Kevin W.H., SOUISSI, Sami, DUR, Gael, et al. Copepods as Reference Species in Estuarine and Marine Waters. Dans : Aquatic Ecotoxicology: Advancing Tools for Dealing with Emerging Risks [En línea]. Elsevier Inc., 2015. p. 282. DOI 10.1016/B978-0-12-800949-9.00012-7.

²⁰ HOLSTE, Linda, PECK, Myron A y JOHN, Michael A St. The influence of temperature, salinity and feeding history on population characteristics of Baltic *Acartia tonsa*: Egg production, hatching success and cohort development. 2004.

²¹ MARCUS, Nancy H. Calanoid Copepods, Resting Eggs, and Aquaculture. Dans: Copepods in Aquaculture [En línea]. En: Blackwell Publishing Professional. 2007. p. 3. ISBN 0813800668. DOI 10.1002/9780470277522.ch1.

²² STØTTRUP, Josianne G. Op. cit., p. 145. DOI 10.1002/9780470995143.ch5.

²³ Ibíd. p. 145

²⁴ KWOK, Kevin W.H., SOUISSI, Sami, DUR, Gael, et al, Op. cit. p. 282. DOI 10.1016/B978-0-12-800949-9.00012-7.

Autores como Støttrup²⁵, Torreblanca et al²⁶ y Fierro et al²⁷, mencionan que estos organismos miden usualmente 1-2 mm, son muy diversos y considerados los metazoarios más numerosos de la comunidad acuática, donde pueden constituir el 91.7 % del holoplancton y cerca del 50 % del zooplancton. Constituyen una importante conexión entre el fitoplancton el cual forma parte del consumo del zooplancton, siendo la presa más apetecida, con mayor abundancia en el medio acuático²⁸ y el primer alimento de larvas y peces juveniles²⁹.

Sus aparatos reproductivos se encuentran a la altura del Prosoma. Tanto en hembras como machos se distingue simplemente una gónada. Fernández, lo describe de la siguiente manera:

Tanto el macho como la hembra tienen una sola gónada situada en la parte central del cuerpo por debajo del pericardio. Mientras el macho tiene un solo conducto, la hembra tiene dos que corren paralelos hasta alcanzar la parte anterior del cuerpo y desembocar por separado en la única abertura genital situada en la parte ventral del primer segmento abdominal. El aparato genital del macho posee el conducto genital con diferentes partes: testículo, vaso deferente, vesícula seminal, saco espermático, espermatóforo y el conducto eyaculador³⁰.

Tras lo anterior y mediante estudios realizados por Støttrup³¹, y Fernández³², se sabe que su reproducción es sexual, los machos pueden producir espermatóforos que adhieren al segmento genital de las hembras, permitiendo que estas puedan desovar varios lotes de huevos antes de requerir otro espermatóforo.

Santosh et al³³, reportan unas 24.000 especies alrededor del mundo. Støttrup³⁴, menciona que los órdenes de mayor importancia para la acuicultura son Harpacticoida, Calanoida, y Cyclopoida. Muchos Harpacticoides tienden a permanecer gran parte de su vida en el fondo de la columna de agua también

²⁵ STOTTRUP, Josianne G. Op. cit., p. 158. DOI 10.1002/9780470995143.ch5.

²⁶ TORREBLANCA, M. Loreto et al. Seasonal dynamics of zooplankton in a northern Chile bay exposed to upwelling conditions. Revista de Biología Marina y Oceanografía [En línea]. 2016, Vol. 51, n° 2. p. 273.

²⁷ FIERRO, P, PINO, P et HIDALGO, P. DISTRIBUCIÓN LATITUDINAL DE COPÉPODOS PLANCTÓNICOS EN PRIMAVERA FRENTE A LAS COSTAS CHILENAS (23°- 36°S). Dans : XXXIV Congreso de Ciencias del Mar. 2014. p. 170.

²⁸ DRILLET, Guillaume, FROUËL, Stéphane, SICHLAU, Mie H., et al. Op. cit., p. 156. DOI 10.1016/J.AQUACULTURE.2011.02.027.

²⁹ HANSEN, Benni Winding. Advances using Copepods in Aquaculture. Journal of Plankton Research [En línea]. 2017. Vol. 00. n° 0. p. 1. DOI 10.1093/plankt/fbx057.

³⁰ FERNANDEZ DE PUELLES, Luz. Orden Calanoida. Ibero Diversidad Entomológica IDE@-SEA [En línea]. 2015. Vol. 89. p. 7. Disponible en: www.sea-entomologia.org/IDE@.

³¹ STOTTRUP, Josianne G. Op. cit., p. 155. DOI 10.1002/9780470995143.ch5.

³² FERNANDEZ DE PUELLES, Luz, Op. cit., p. 8

³³ SANTHOSH, B, ANIL, M. K, ANZEER, F Muhammed, et al. Culture Techniques of Marine Copepods [En línea]. Kerala : ICAR-Central Marine Fisheries Research. 2018. p. 9. ISBN 978-93-82263-23-4. Disponible en: <http://eprints.cmfri.org.in/13376/1/Culture%20Techniques%20of%20Marine%20Copepods%20CMFRI.pdf#page=59>.

³⁴ STOTTRUP, Josianne G., op. cit., p. 145 - 146. DOI 10.1002/9780470995143.ch5

conocido como bentos³⁵, por lo que en la naturaleza son menos disponibles para larvas que se alimentan a lo largo y ancho de la columna de agua³⁶. Los Harpacticoida y Cyclopoida, pueden crecer a altas densidades, pero dependiendo del tipo de producción, su cultivo puede ser realizado en laboratorios de producción de peces

Por otro lado, los Calanoides poseen estadios de vida planctónicos y muchos desovan sus huevos libremente en la columna de agua. Sus huevos no poseen un corion rígido cuando son desovados, de hecho, autores como Blades-Eckelbarger³⁷, menciona que solo los rodea una membrana frágil, la cual desencadena el endurecimiento de la misma formando el corion el cual se forma producto de dos procesos secuenciales de reacción cortical que construyen un espacio perivitelínico con fibras cada vez más gruesas lo cual recubre el citoplasma y posteriormente el huevo³⁸.

Dentro del grupo de los Calanoides se destaca la especie *A. tonsa* como una de las más estudiadas para acuicultura, puesto que presenta características de producción donde pueden soportar altos rangos de salinidad y temperatura³⁹.

Este copépodo es altamente productivo, además, sus huevos pueden entrar en estado de resistencia o quiescencia⁴⁰, por ende, tienen viabilidad en el almacenamiento en condiciones de bajas temperaturas⁴¹, por estos motivos ha sido ampliamente estudiado y favorece su uso como alimento vivo.

3.3 GENERALIDADES DE *A. tonsa*

De acuerdo con Dana⁴², el Copépodo *A. tonsa* tiene la siguiente clasificación taxonómica:

³⁵ FLEEGER, John W. The Potential to Mass-Culture Harpacticoid Copepods for Use as Food for Larval Fish. Dans : LEE, Cheng-Sheng, O'BRYEN, Patricia J. et MARCUS, Nancy H. (dir.), Copepods in Aquaculture [En línea]. p. 11. DOI 10.1002/9780470277522.ch2

³⁶ DRILLET, Guillaume, FROUËL, Stéphane, SICHLAU, Mie H., et al. Op. cit., p 157. DOI 10.1016/J.AQUACULTURE.2011.02.027

³⁷ BLADES-ECKELBARGER, Pamela I. et MARCUS, Nancy H. The Origin of Cortical Vesicles and Their Role in Egg Envelope Formation in the « Spiny » Eggs of a Calanoid Copepod, *Centropages velificatus*. En: Biological Bulletin [En línea]. 1992. Vol. 182. n° 1. p. 41. DOI 10.2307/1542179

³⁸ CUOC, Corinne. BRUNET, Michel. ARNAUD, Jean. MAZZA, Jacques. Formation of egg envelopes in the freshwater calanoid copepod, *Hemidiaptomus ingens*. En: Invertebrate Reproduction and Development [En línea]. 1994. Vol. 26. n° 1. p. 64. DOI 10.1080/07924259.1994.9672401

³⁹ HOLSTE, Linda et PECK, Myron A. Op. cit., p. 1061 ISBN 0025-3162. DOI 10.1007/s00227-005-0132-0

⁴⁰ JØRGENSEN, Tue Sparholt, JEPSEN, Per Meyer, PETERSEN, H. Cecilie B., et al. Op. cit., p. 2. DOI 10.1186/s12898-018-0217-5

⁴¹ DRILLET, Guillaume, LINDLEY, Laban C., MICHELS, Alan, et al. Improving cold storage of subitaneous eggs of the copepod *Acartia tonsa* Dana from the Gulf of Mexico (Florida - USA). En: Aquaculture Research [En línea]. 2007. Vol. 38. p. 457. DOI 10.1111/j.1365-2109.2007.01673.x

⁴² DANA, J D. Conspectus crustaceorum, quae in orbis terrarum circumnavigatione, Carolo Wilkes, e classe Reipublicae foederatae duce, lexit et descripsit Jacobus D. Dana. En: The American journal of science and arts [En línea]. 1849. Vol. 8. n° 2. p. 276. Disponible en: <https://www.biodiversitylibrary.org/page/27760646#page/296/mode/1up>

Reino:	Animalia
Phylum:	Arthropoda
Clase:	Hexanauplia
Subclase:	Copepoda
Super orden:	Gymnoplea
Orden:	Calanoida
Familia:	Acartiidae
Género:	<i>Acartia</i>
Especie:	<i>A. tonsa</i>

Marshall⁴³, menciona que este copépodo no posee branquias, pues su respiración es vía integumento e intestino medio, además, la excreción de productos finales del catabolismo es vía glándula maxilar. Abate et al⁴⁴, afirma que los huevos de *A. tonsa* miden entre 70 - 80 µm de diámetro y el tiempo de eclosión varía con la temperatura pudiendo ser de 1 a 3 días. De acuerdo con Vu et al⁴⁵, es un organismo que posee una alta fecundidad (7 - 50 huevos) y pequeño tamaño (< 1,5 mm), por otra parte, autores como Drillet et al⁴⁶, mencionan que la especie posee un corto tiempo de desarrollo a estadios reproductivos en alta temperatura (8 - 14 días) y relativamente largo a bajas temperaturas (15 - 30 días).

Esta especie desova libremente en la columna de agua, sus huevos pueden eclosionar directamente (huevos subitáneos) o pueden entrar en un estado de resistencia (quiescencia) bajo cambios de temperatura⁴⁷, concentraciones de oxígeno disuelto, luminosidad o salinidad⁴⁸. Estas condiciones usualmente ocurren en el medio natural cuando los huevos descienden y se entierran en el fondo, pero retornan a la columna de agua cuando el lecho acuático es afectado por las corrientes, donde eclosionan bajo condiciones ambientales favorables⁴⁹.

⁴³ MARSHALL, Sheina M. Respiration and feeding in copepods. Advances in Marine Biology [En línea]. 1973. Vol. 11. p. 67, 68. DOI 10.1016/S0065-2881(08)60268-0

⁴⁴ ABATE, Tenaw G., NIELSEN, Rasmus, NIELSEN, Max, et al. Economic feasibility of copepod production for commercial use: Result from a prototype production facility. En: Aquaculture [En línea]. Elsevier. 2015. Vol. 436. p. 73. DOI 10.1016/j.aquaculture.2014.10.012

⁴⁵ VU, M, HANSEN, B W et KIØRBOE, T. The constrains of high density production of the calanoid copepod *Acartia tonsa* Dana. Journal of Plankton Research [En línea]. 2017. Vol. submitted. p. 10. DOI 10.1093/plankt/fbx056

⁴⁶ DRILLET, Guillaume, GOETZE, Erica, JEPSEN, Per M., et al. Op. cit., p. 110. DOI 10.1016/j.aquaculture.2008.04.005

⁴⁷ DRILLET, Guillaume, RAIS, Mouloud, NOVAC, Aliona, et al. Total egg harvest by the calanoid copepod *Acartia tonsa* (Dana) in intensive culture - effects of high stocking densities on daily egg harvest and egg quality. En: Aquaculture Research [En línea]. 2015. Vol. 46. n° 12. p. 3030. DOI 10.1111/are.12459

⁴⁸ JØRGENSEN, Tue Sparholt, JEPSEN, Per Meyer, PETERSEN, H. Cecilie B., et al. Op. cit., p. 3. DOI 10.1186/s12898-018-0217-5

⁴⁹ NILSSON, Birgitte & HANSEN, Benni Winding. Timing of embryonic quiescence determines viability of embryos from the calanoid copepod, *Acartia tonsa* (Dana). PLoS ONE [En línea]. 2018. Vol. 13. n° 3. p. 4. DOI 10.1371/journal.pone.0193727

A. tonsa es una de las más estudiadas en este aspecto, puesto que sus huevos cuando entran en resistencia pueden sobrevivir hasta nueve meses almacenados entre 2 - 4 °C⁵⁰, esto es de particular interés, dado que abre nuevas posibilidades de aplicación y comercialización de huevos para larvicultura marina⁵¹. Se alimenta principalmente de microalgas, pero puede consumir rotíferos, protozoos y hasta sus propios huevos⁵², especialmente cuando hay baja concentración de alimento⁵³. Esta especie tiene seis estadios naupliares y seis de copepodito. Su crecimiento al igual que en otros crustáceos es a través de mudas sucesivas⁵⁴.

La especie *A. tonsa* ha sido reportada en Colombia para el mar Caribe⁵⁵ y el océano Pacífico⁵⁶. En el mar Caribe, habita en salinidades entre 24 y 36 UPS y temperaturas entre 26,8 y 31,5 °C⁵⁷. En el Pacífico, ha sido reportada en salinidades de 25 y 27 UPS y temperaturas de 22 y 28°C. Lo anterior es relevante puesto que esta especie presenta fuertes variaciones entre ecotipos (poblaciones cripticas) en términos de diferencias en el requerimiento de condiciones ambientales que afecten el ámbito productivo⁵⁸, de igual forma, se reportan diferencias en la capacidad de almacenamiento de huevos o embriones⁵⁹.

Las temperaturas óptimas para la producción de huevos, usualmente están cercanas a las presentes en el medio natural de las poblaciones específicas⁶⁰. La temperatura también tiene fuertes efectos sobre el requerimiento de oxígeno disuelto, en términos de presión parcial crítica (necesaria para un metabolismo normal), esto quiere decir que la saturación de oxígeno ambiental afecta el metabolismo de manera distinta cuando los animales son mantenidos a diferentes

⁵⁰ JØRGENSEN, Tue Sparholt. JEPSEN, Per Meyer. PETERSEN, H. Cecilie B. FRIIS, Dennis Steven. HANSEN, Benni Winding., Op. cit., p. 3. DOI 10.1186/s12898-018-0217-5

⁵¹ DRILLET, Guillaume. LINDLEY, Laban C. MICHELS, Alan. WILCOX, Jeffrey. MARCUS, Nancy H. Op cit. p. 458. DOI 10.1111/j.1365-2109.2007.01673.x

⁵² DRILLET, Guillaume et LOMBARD, Fabien. A first step towards improving copepod cultivation using modelling: The effects of density, crowding, cannibalism, tank design and strain selection on copepod egg production yields. En: Aquaculture Research [En línea]. 2015. Vol. 46, n° 7. p. 1-10. DOI 10.1111/are.12317

⁵³ Ibíd. p. 3

⁵⁴ DRILLET, Guillaume. JEPSEN, Per M. HØJGAARD, Jonas K. JØRGENSEN, Niels O.G. HANSEN, Benni W. Op cit., p. 48. DOI 10.1016/J.AQUACULTURE.2008.04.010.ica. JEPSEN

⁵⁵ MEDELLÍN-MORA, Johanna et NAVAS, Gabriel. Listado taxonómico de copépodos (Arthropoda: Crustacea) del mar Caribe colombiano. Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras. Santa Marta, Colombia : Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras José Benito Vives de Andrés - Invemar., 2010, Vol. 39, n° 2, p. 265-306. ISBN 0122-9761

⁵⁶ JEREZ-GUERRERO, Mauricio, CRIALES-HERNÁNDEZ, María I & GIRALDO, Alan. Copépodos epipelágicos en Bahía Cupica , Pacífico colombiano : composición de especies , distribución y variación temporal. Biología tropical. 2017, Vol. 65, n° 3, p. 1046-1061. ISBN 0034-7744

⁵⁷ CAÑON, L, QUINTANA, D, PÁEZ, Cañón, et al. Caracterización fisicoquímica del Golfo de Morrosquillo y Tanques de Lastre de buques de tráfico internacional. En: Boletín Científico CIOH. 2010, Vol. 28, p. 84-126

⁵⁸ DRILLET, Guillaume, JEPSEN, Per M., HØJGAARD, Jonas K., et al. Op. cit., p. 48. DOI 10.1016/J.AQUACULTURE.2008.04.010.

⁵⁹ HANSEN, Benni Winding, BUTTINO, Isabella, CUNHA, Maria Emilia, et al. Embryonic cold storage capability from seven strains of *Acartia* spp. isolated in different geographical areas. Aquaculture [En línea]. Elsevier B.V., 2016, Vol. 457, p. 131-139. DOI 10.1016/j.aquaculture.2016.02.024

⁶⁰ HOLSTE, Linda & PECK, Myron A. Op. cit., p. 1063. ISBN 0025-3162. DOI 10.1007/s00227-005-0132-0.

temperaturas⁶¹, pudiendo desencadenar un estado de producción de huevos quiescentes.

3.4 IMPORTANCIA DE *A. tonsa* EN ACUICULTURA

A. tonsa es uno de los crustáceos más estudiados en la actualidad, especialmente como presa viva debido a su importante función en el ámbito ecológico⁶² siendo parte fundamental en la primera alimentación de larvas de peces de origen marino con boca pequeña⁶³. En comparación a presas vivas utilizadas actualmente tales como *Artemia* spp. y rotíferos, los copépodos se consideran como la fuente de alimento más completo por su elevado valor nutritivo, variación de tallas y aspectos de motilidad, en ese sentido, es altamente preferido en la naturaleza por las larvas^{64,65}.

Para *A. tonsa*, la capacidad de producir huevos que pueden entrar en estado de quiescencia⁶⁶, ha brindado desde hace algunas décadas la posibilidad de almacenar los huevos por un cierto periodo de tiempo bajo ciertas condiciones que prolongan la vida útil de estos⁶⁷.

Por sus características de fácil aclimatación, factibilidad biológica y almacenamiento de huevos, *A. tonsa* se considera con un alto valor potencial para la implementación en cultivos, tal como lo afirman Støttrup⁶⁸, Kalidas et al⁶⁹ y Sarkisian⁷⁰, quienes mencionan la existencia de cultivos de esta especie en sistemas intensivos y con recirculación de agua.

3.5 CULTIVO DE COPÉPODOS

Desde hace décadas los copépodos se suministraron como alimento vivo para larvas de peces a través de colectas del medio natural. Posteriormente se utilizó el

⁶¹ ELLIOTT, David T., PIERSON, James J. et ROMAN, Michael R. Predicting the Effects of Coastal Hypoxia on Vital Rates of the Planktonic Copepod *Acartia tonsa* Dana. En: PLoS ONE [En línea]. 2013. Vol. 8, nº 5. ISBN 1932-6203. DOI 10.1371/journal.pone.0063987

⁶² DRILLET, Guillaume, HANSEN, Benni W. & KIØRBOE, Thomas. Resting egg production induced by food limitation in the calanoid copepod *Acartia tonsa*. En: Limnology and Oceanography [En línea]. 2011. Vol. 56, n 6. p. 2065. DOI 10.4319/lo.2011.56.6.2064

⁶³ ABATE, Tenaw G., NIELSEN, Rasmus, NIELSEN, Max, et al. Op. cit., p. 75. DOI 10.1016/j.aquaculture.2014.10.012

⁶⁴ DRILLET, Guillaume, FROUËL, Stéphane, SICHLAU, Mie H., et al. Op. cit., p. 158. DOI 10.1016/J.AQUACULTURE.2011.02.027.

⁶⁵ Trottet, Aurore, RICHIER DE FORGES, Mathilde, MAGUET, Rémi, et al. Op. cit., p. 45.

⁶⁶ JØRGENSEN, Tue Sparholt, JEPSEN, Per Meyer, PETERSEN, H. Cecilie B., et al. Op. cit., p. 4. DOI 10.1186/s12898-018-0217-5

⁶⁷ TAKAYAMA, Yoshiki & TODA, Tatsuki. Switch from production of subitaneous to delayed-hatching and diapause eggs in *Acartia japonica* Mori, 1940 (Copepoda: Calanoida) from Sagami Bay, Japan. En: Regional Studies in Marine Science [En línea]. Elsevier B.V. 2019. Vol. 29. p. 2. DOI 10.1016/j.rsma.2019.100673

⁶⁸ STOTTRUP, Josianne G. Op. cit., p. 155. DOI 10.1002/9780470995143.ch5

⁶⁹ SANTHOSH, B, RANJAN, R, RAJU, SS, et al. Cost estimate and financial analysis of a medium scale copepod culture unit. Dans : eprints.cmfri.org.in [En línea]. 2018. p. 123. Disponible en: [http://eprints.cmfri.org.in/13376/1/Culture Techniques of Marine Copepods CMFRI.pdf#page=122](http://eprints.cmfri.org.in/13376/1/Culture%20Techniques%20of%20Marine%20Copepods%20CMFRI.pdf#page=122)

⁷⁰ SARKISIAN, Brie L. et al. Op. cit., p. 275. DOI 10.1016/j.aquaculture.2018.11.042

sistema de cultivo de múltiples presas conocido con el nombre de “mesocosmos”, en donde se filtraban muestras del medio para proceder a cultivar los individuos y cultivarlos de manera extensiva en estanques de gran tamaño⁷¹.

Hoy en día y debido a su gran potencial como presa viva, se ha optado por realizar cultivos en escala intensiva, tanto en estanques excavados de grandes áreas, como en tanques de diversos materiales y volúmenes donde se pueda manejar y controlar tanto el cultivo como los parámetros de calidad de agua. De acuerdo con Støttrup⁷² y Drillet et al⁷³, se puede alcanzar cultivos intensivos con densidades que varían de 0,5 a 5 individuos mL⁻¹, siempre que exista un control estricto de calidad de agua en parámetros claves tales como: luminosidad, temperatura, salinidad y oxígeno disuelto, además una alimentación constante con microalgas.

Sarkisian, Lemus y Lee⁷⁴, Trottet et al⁷⁵ y Sarkisian et al⁷⁶, mencionan algunas fases o etapas a nivel de producción para el cultivo del copépodo *A. tonsa*, las cuales se describen a continuación.

- Cosecha de huevos: se recolecta los huevos por medio de sifoneo o por decantación de los mismos.
- Eclosión de huevos: inmediatamente en condiciones controladas, o post estado de quiescencia, cuando estos se almacenan entre 1 - 4 °C, posteriormente se colocan a eclosionar en agua de mar a 30 UPS y temperaturas entre 15 - 30 °C
- Levante de individuos: desde nauplios hasta alcanzar una etapa de adultos, alimentados con microalga.

3.6 ASPECTOS CRÍTICOS DEL CULTIVO

De acuerdo al estudio de Ajiboye⁷⁷, la factibilidad tecnológica para cultivar copépodos está restringida en algunos aspectos, es preciso definir aquellos de la biología de los copépodos bajo condiciones de cultivo. Según Vu et al⁷⁸ y Jørgensen

⁷¹ STOTTRUP, Josianne G. Op cit., p. 168. DOI 10.1002/9780470995143.ch5

⁷² Ibid. p. 175. DOI 10.1002/9780470995143.ch5

⁷³ DRILLET, Guillaume, FROUËL, Stéphane, SICHLAU, Mie H., et al. Op. cit., p. 162 DOI 10.1016/J.AQUACULTURE.2011.02.027

⁷⁴ SARKISIAN, B., LEMUS, J. & LEE, P. Large-Scale Production System for Copepods. 2013. p. 2. Ver en: <https://www.aquaculturealliance.org/advocate/large-scale-production-system-for-copepods/>

⁷⁵ TROTET, Aurore, RICHIER DE FORGES, Mathilde, MAGUET, Rémi, et al. Op. cit., p. 44

⁷⁶ SARKISIAN, Brie L. et al. Op cit. p. 275. DOI 10.1016/j.aquaculture.2018.11.042

⁷⁷ AJIBOYE, O., YAKUBU, A. F., ADAMS, T. E., et al. A review of the use of copepods in marine fish larviculture. En: Reviews in Fish Biology and Fisheries [En línea]. 2011. Vol. 21, nº 2. p. 226. ISBN 0960-3166. DOI 10.1007/s11160-010-9169-3

⁷⁸ VU, Minh T.T., HANSEN, Benni W. & KIØRBOE, Thomas. The constraints of high density production of the calanoid copepod *Acartia tonsa* Dana. En: Journal of Plankton Research [En línea]. 2017. Vol. 39, nº 6. p. 1030. DOI 10.1093/plankt/fbx056

et al⁷⁹, características productivas y variables de bioingeniería deben ser abordados por la ingeniería aplicada a la acuicultura, luego de esa forma, concretar producciones a altas densidades y escala comercial con menores recursos.

Como restricción tecnológica se ha identificado la necesidad de definir el ambiente de cultivo que se requiere para promover una alta densidad (mayor o igual 5 adultos mL⁻¹)⁸⁰ bajo ciertas condiciones ideales las cuales fomentan un ambiente propicio para el cultivo⁸¹. Dentro de las variables ambientales más reconocidas se encuentran la temperatura, concentración de oxígeno disuelto, salinidad y luminosidad. De manera convencional no se ha valorado en gran medida la salinidad, puesto que esta variable es adaptada principalmente a las condiciones naturales de las especies y poblaciones seleccionadas⁸².

No obstante, existen varios estudios que muestran la importancia de este parámetro para el éxito en la eclosión de huevos de *A. tonsa* producidos bajo condiciones de salinidad de desove naturales, tales como el estudio de Holste y Peck⁸³, quienes demostraron que la salinidad del medio natural de una población específica de *A. tonsa*, es indiferente al éxito de eclosión de los huevos obtenidos en condiciones de laboratorio, y que puede afectar el patrón de éxito de eclosión bajo diferentes salinidades de desove, lo cual demuestra un alto grado de plasticidad entre poblaciones de la especie.

Aspectos similares encontraron Holmstrup et al⁸⁴, Peck y Holste⁸⁵, Peck et al⁸⁶, quienes demostraron que la salinidad afecta la eclosión de huevos de *A. tonsa* aun después de un tiempo de almacenamiento. Johnson⁸⁷, menciona que la salinidad no tiene influencia en la inducción a la quiescencia, pero si tiene un efecto en la eclosión de los huevos.

⁷⁹ JØRGENSEN, Tue Sparholt, JEPSEN, Per Meyer, PETERSEN, H. Cecilie B., et al. Op. cit., p. 5. DOI 10.1186/s12898-018-0217-5

⁸⁰ ABATE, Tenaw G., NIELSEN, Rasmus, NIELSEN, Max, et al. Op. cit., p. 76. DOI 10.1016/j.aquaculture.2014.10.012

⁸¹ FRANCO, Sofia C., AUGUSTIN, Christina B., GEFFEN, Audrey J., et al. Op. cit., p. 570. DOI 10.1016/j.aquaculture.2016.10.044

⁸² DRILLET, Guillaume, FROUËL, Stéphane, SICHLAU, Mie H., et al. Op. cit., p. 162. DOI 10.1016/J.AQUACULTURE.2011.02.027

⁸³ PECK, Myron A. & HOLSTE, Linda. Effects of salinity, photoperiod and adult stocking density on egg production and egg hatching success in *Acartia tonsa* (Calanoida: Copepoda): Optimizing intensive cultures. En: Aquaculture [En línea]. Elsevier. 2006. Vol. 255, nº 1-4. p. 342. DOI 10.1016/J.AQUACULTURE.2005.11.055

⁸⁴ HOLMSTRUP, Martin, OVERGAARD, Johannes, SORENSEN, Thomas F., et al. Influence of storage conditions on viability of quiescent copepod eggs (*Acartia tonsa* Dana): effects of temperature, salinity and anoxia. En: Aquaculture Research [En línea]. 2006. Vol. 37, nº 6. p. 627. DOI 10.1111/j.1365-2109.2006.01472.x

⁸⁵ PECK, Myron A. & HOLSTE, Linda. Op. cit., p. 341. DOI 10.1016/J.AQUACULTURE.2005.11.055

⁸⁶ PECK, Nadine, PETERS, Janna, DIEKMANN, Rabea, et al. Op. cit., p. 12. DOI 10.1093/plankt/fbu093

⁸⁷ JOHNSON, J.K. Effects of temperature and salinity on production and hatching of dormant eggs of *Acartia californiensis* (copepoda) in an Oregon Estuary. Fishery Bulletin. 1980. Vol. 77, nº 3. p. 567-584.

Por otra parte, algunos autores han demostrado la influencia de la temperatura y su efecto sobre la inducción a la quiescencia de huevos en copépodos, de igual forma éxito de eclosión y porcentaje del misma en donde mencionan que depende de la temperatura y salinidad de incubación de los huevos⁸⁸.

⁸⁸ CHINNERY, Fay E. & WILLIAMS, John A. Photoperiod and temperature regulation of diapause egg production in *Acartia bifilosa* from Southampton Water. En: *Marine Ecology Progress Series* [En línea]. 2003. Vol. 263. p. 150. DOI 10.3354/meps263149

4. METODOLOGÍA

4.1 LOCALIZACIÓN

El presente trabajo fue desarrollado en las instalaciones de la Estación Acuícola Marina Bahía Málaga (EABM) perteneciente a la Autoridad Nacional de Acuicultura y Pesca de Colombia (AUNAP), ubicada entre la ciudad de Málaga y el corregimiento de Juanchaco, jurisdicción de Buenaventura, departamento del Valle del Cauca, Pacífico colombiano⁸⁹ (Figura 1).

La estación cuenta con la siguiente ubicación geográfica 3°56'24" N, 77°20'44" W. De acuerdo con el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA)⁹⁰, es una de las zonas más lluviosas del mundo, con precipitaciones promedio anuales superiores a 6.000 mm, siendo 8.000 mm el pico máximo alcanzado, clima cálido tropical húmedo con una temperatura de aire entre los 24 y 26 °C y sensación térmica de 29 °C, humedad entre el 88 y 91 %, temperatura del agua de 26 a 29 °C, salinidad del agua entre 25 a 33 UPS.

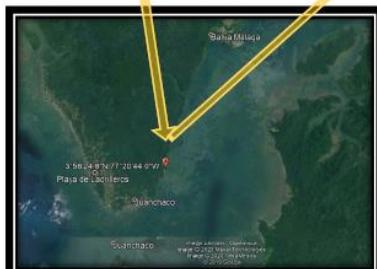
Figura 1. Ubicación de la Estación Acuícola Marina Bahía Málaga



Fuente: Google Earth Pro



Fuente: Jaglin López Arboleda



Fuente: Google Earth Pro



Fuente: Jaglin López Arboleda

⁸⁹ HERNANDO-GAMBOA, Jesús. FRESNEDA, Adriana. ESPINEL, Victor. Avances en la reproducción y cultivo en cautiverio del pargo lunarejo *Lutjanus guttatus*, (Steindachner, 1869) en la Costa Pacífica Colombiana. En: Revista Electronica de Ingeniería en Producción Acuícola. 2007. Vol. 2. p. 62

⁹⁰ INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO. Estación de acuicultura marina de Bahía Málaga [En línea]. [Consultado el 5 de febrero de 2020]. Disponible en: <https://www.ica.gov.co/getdoc/3afe60d1-e0ee-4b3a-97bf-8f13287c4691/estacion-de-acuicultura-marina-de-bahia-malaga.aspx>

4.2 PERIODO DE ESTUDIO

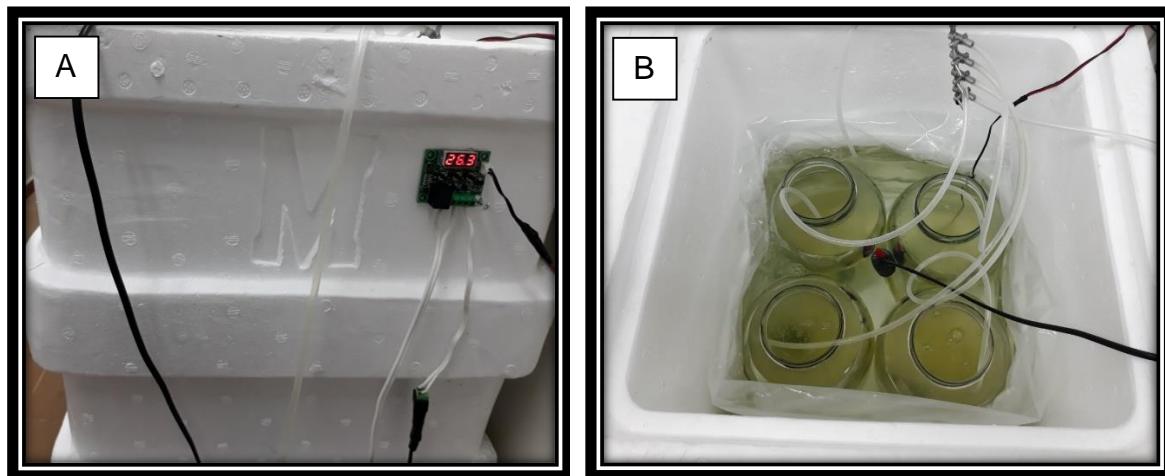
La investigación y desarrollo experimental, se efectuó entre los meses de febrero a mayo del año 2020. En los cuales se realizó la aclimatación de los reproductores, desoves, almacenamiento y puesta en marcha de la eclosión de huevos tanto frescos como almacenados.

4.3 INSTALACIONES, EQUIPOS, MATERIALES E INSUMOS

4.3.1 Instalaciones. La estación cuenta con múltiples áreas. De acuerdo al ICA⁹¹, el área total de la estación corresponde a 2.850 m², los cuales se dividen de la siguiente manera:

Un área para laboratorios, oficinas y habitaciones de 326 m², 54 m² para sala de cultivo de microalgas, 224 m² para sala de maduración de reproductores y obtención de desoves, 63 m² para larvicultura, 120 m² para mesocosmos, 42 m² para levante de alevinos, 18 m² para preparación de alimento, 70 m² para bodega y taller, 16 m² para caseta de la planta eléctrica.

Figura 2. Montaje unidades experimentales



4.3.2 Equipos. Entre los equipos para el manejo de los organismos y huevos, se encuentra: microscopio de disección binocular Nikon™ modelo Iphaphet-2 YS2, termostato digital modelo XH-W1209, refrigerador Alpicool™ modelo C20 21 Quart, refractómetro ATAGO™ Master-Honey/Bx, balanza gramera AND EK-1200 g precisión de 0.1 g. Bomba Auncebante de 5 HP IHM®.

⁹¹ Ibíd

4.3.3 Materiales. Entre los materiales para realizar el mantenimiento de los organismos y llevar a cabo el experimento de eclosión, se encuentra: tubos de ensayo con rosca, cámara Improved Neubauer Boeco™ Bright-line, cámara de conteo Sedgwick-Rafter Graticules Optics™ S50, placas multipozos (plastic multiwell slide plates (Pentair 6 well # MW16), erlenmeyers de 0.2, 0.5 y 1 L, beakers de 0,25 0,5 y 1 L, baldes plásticos de 3, 5 y 10 L, goteros de 3 mL; tamices de 60, 100 y 200 µm, tambores de renovación de 100 µm, piedras difusoras, portaobjetos, cubreobjetos, manguera de 1/8 ”.

4.3.4 Insumos. Tiosulfato de sodio 99 % de pureza, cloro grado industrial al 14,5 %, formaldehido en concentración de 37 %.

4.4 PLAN DE MANEJO

4.4.1 Bombeo y preparación de agua. El agua se bombeó directamente del mar y posteriormente se condujo a un reservorio de 100 m³. Previo a su uso el agua se depositó en tanques de 6 m³ previamente microfiltrada (10 y 5 µm). Luego se realizó la desinfección añadiendo cloro a una concentración de 10 ppm por un periodo de mínimo 24 horas. Previo a su uso, se agregó tiosulfato de sodio en igual concentración para neutralizar el cloro, esto de acuerdo a los protocolos establecidos por la estación.

4.4.2 Adecuación de instalaciones. El área de preparación de alimento se adecuó a una temperatura ambiental de 18 °C con aire acondicionado para el cultivo de la especie *A. tonsa* (Figura 3), en la cual se llevó a cabo el experimento. Para el mantenimiento de las unidades experimentales se utilizó neveras de poliestireno (80 L) en las cuales se distribuyó las unidades experimentales. Con el fin de mantener la temperatura en las unidades experimentales, se utilizó termostatos digitales con relé automático (Figura 2 A), el cual encendía el termostato análogo para aumentar la temperatura. Se utilizó una línea de aire en el centro de la unidad para distribuir homogéneamente el calor al agua (Figura 2 B). La aireación se obtuvo por medio de una derivación de ½” que sale desde la conducción principal (tubería de 1”), para recibir líneas de manguera de 1/8” las cuales tenían un juego de cuatro válvulas de aire que salían directamente a las unidades experimentales. La aireación se suministró a través de un blower Sweetwater® (S63-C) de 3 HP, el cual abastecía de aire a la estación y se encuentra encendido las 24 h del día, siete días a la semana.

4.4.3 Obtención de reproductores. La cepa del copépodo *A. tonsa* se obtuvo a través del laboratorio de alimento vivo de la Universidad de Córdoba, el cual aisló la cepa a través de muestreos de zooplancton en el litoral de la bahía de Cispatá, golfo de Morrosquillo, Colombia.

El laboratorio produjo los huevos necesarios y se encargó del respectivo envío hacia la ciudad de Buenaventura, Valle del Cauca. La cepa se mantuvo en tubos de ensayo a una densidad de 100.000 huevos.mL⁻¹ y fue despachada en contenedores térmicos a una temperatura entre 2 - 4 °C.

Figura 3. Instalaciones para experimento salinidad y temperatura.



Fuente: Jaglin López Arboleda

Los huevos recibidos fueron desinfectados en un recipiente de un litro, utilizó formalina a 150 ppm por 2 minutos con fuerte aireación. Luego, los huevos fueron dispuestos en un tamiz de 60 µm y enjuagados con agua de mar estéril (26 °C, 24 UPS y microfiltrada a 1 µm).

Tras la desinfección, los huevos fueron incubados por 48 horas en recipientes de 3 L. Se utilizó fuerte aireación, fotoperiodo natural, 26 °C y 24 UPS. La densidad de incubación fue 80 huevos.mL⁻¹. Transcurrido el tiempo de incubación, los nauplios fueron cosechados en un tamiz de 40 µm, enjuagados con agua de mar estéril y sembrados en tanques de fibra de vidrio de 1 m³, bajo las mismas condiciones de incubación (temperatura y salinidad ambiente). En esta fase se llevó los nauplios hasta adultos reproductores.

4.4.4 Selección de reproductores. Los adultos necesarios para el experimento, se obtuvieron mediante un cultivo en sistema tipo Batch. Para lo anterior se utilizó tanques de fibra de vidrio de 1 m³, donde los nauplios eclosionados fueron alimentados hasta alcanzar la etapa de adultos maduros, la cual fue confirmada al verificar la madurez de los individuos y presencia de huevos dentro del prosoma bajo microscopio.

4.4.5 Alimentación de los copépodos. Se alimentó a una concentración de 200, 1.000 y 1.500 µg de Carbono.L⁻¹ dia⁻¹ para nauplios, copepoditos y adultos, respectivamente. Los organismos se alimentaron con la microalga *Rhodomonas salina* (UTEX LB 2763). Los organismos se mantuvieron desde nauplios hasta copepoditos y se alimentaron a 2.300 células.mL⁻¹ y 11.300 células.mL⁻¹, de acuerdo a los niveles de saturación en µg de Carbono.L⁻¹.dia⁻¹. Los copépodos reproductores se alimentaron a una concentración de 16.900 cel.mL⁻¹. Lo anterior, de acuerdo a lo reportado en sus estudios para *A. tonsa* por Zhang et al⁹². La fórmula propuesta por Strathmann⁹³ para establecer los µg de Carbono necesarios, se describe a continuación:

$$\text{Log } [C] = -0.46 + 0.866 * (\text{Log}[V])$$

Donde:

C es la concentración de carbono celular (pg de carbono célula⁻¹).

V es el volumen celular (µm³).

La concentración de la microalga se reajustó diariamente realizando conteos de cada unidad experimental en cámara de Neubauer bajo microscopio para determinar el volumen necesario de microalgas.

⁹² ZHANG, Jianshe, IANORA, Adrianna, WU, Changwen, et al. Op. cit., p. 2986. DOI 10.1111/are.12456

⁹³ STRATHMANN, R. ESTIMATING THE ORGANIC CARBON CONTENT OF PHYTOPLANKTON FROM CELL VOLUME OR PLASMA VOLUME. En: Limnol. Oceanography [En línea]. 1967. Vol. 12, nº 3. p. 414. ISBN 0024-3590. DOI 10.4319/lo.1967.12.3.0411

4.4.6 Experimentos de salinidad y temperatura. La biomasa de copépodos adultos se obtuvo previamente en tanques de 1 m³. Los adultos fueron concentrados en un recipiente de 5 L y determinada la densidad por medio de conteo en cámara Sedgwick-Rafter bajo microscopio. Posteriormente se distribuyeron por volumetría en 12 unidades experimentales (3 L C/U) a la salinidad y temperatura correspondiente al tratamiento, aclimatando los animales un grado Celsius por hora. Para esto la temperatura del agua fue monitoreada con un termostato digital (XH-W1209) y los cambios de salinidad fueron realizados a través de aumentos o disminuciones de 1,5 UPS por día. Cada unidad experimental fue inoculada con 9.000 individuos aproximadamente (3 adultos mL⁻¹), para generar cuatro combinaciones de dos temperaturas, 20 y 26 °C (↓ y ↑ temperatura) y dos salinidades, 18 y 28 UPS (↓ y ↑ salinidad) formando cuatro tratamientos con sus respectivas réplicas (Figura 4).

Cuando los individuos alcanzaron las condiciones ambientales experimentales, se suministró aireación suave, fotoperiodo natural 12:12 horas Luz:Oscuridad; respectivamente, y alimentados de acuerdo a descrito en la sección “Alimentación de copépodos”.

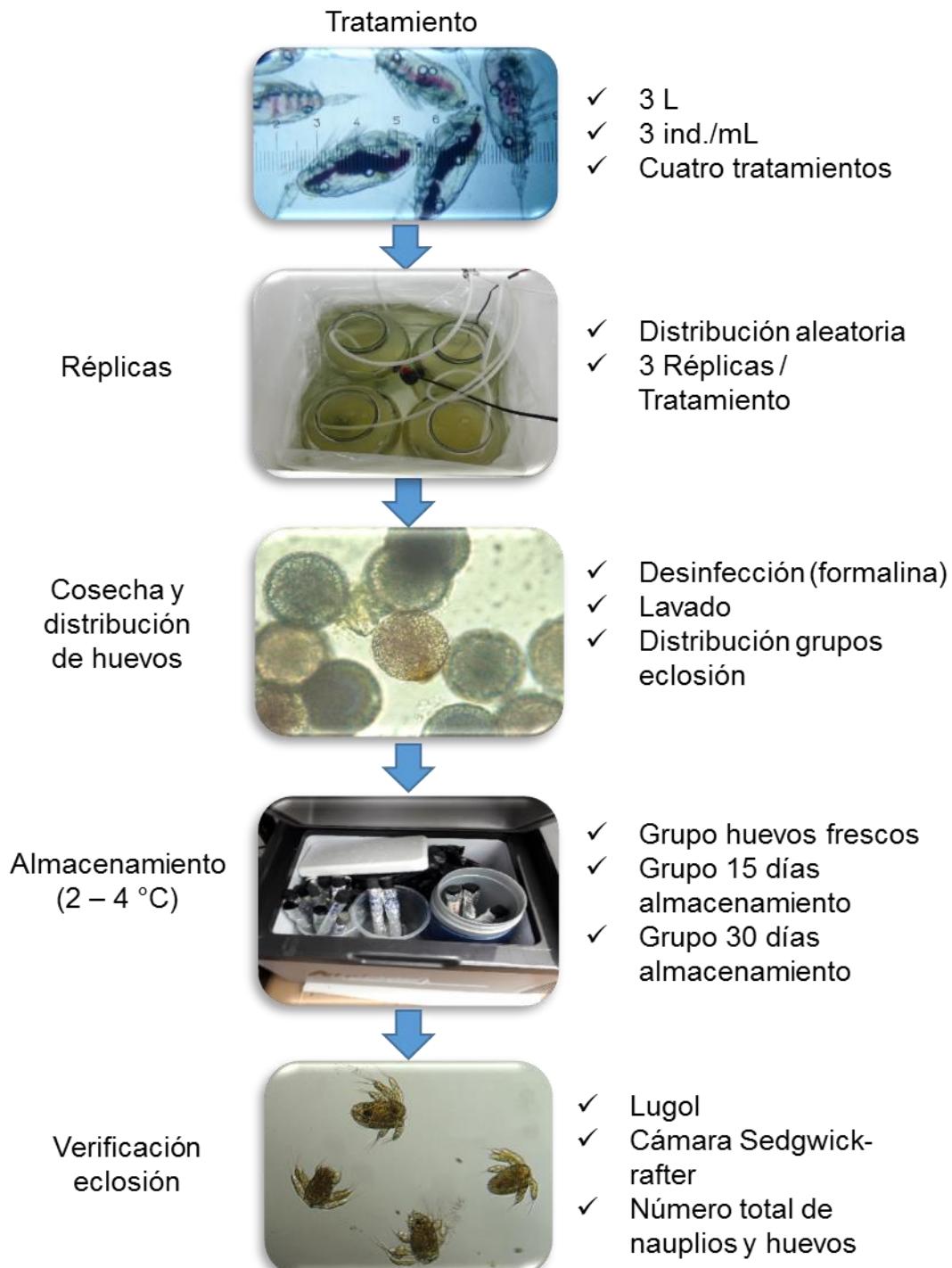
La mortalidad y la cantidad de huevos fue determinada al finalizar el desove (24 h).

4.4.7 Cosecha de huevos. Para realizar la cosecha, se procedió a succionar el fondo de cada unidad experimental por medio de una manguera 1/8 ". El material colectado (adultos y huevos) fue separado utilizando un tamiz con malla de 100 µm y 60 µm para adultos y huevos, respectivamente. Los adultos retenidos en el tamiz de 100 µm fueron devueltos a las respectivas unidades experimentales.

4.4.8 Desinfección y almacenamiento de huevos. Los huevos cosechados de cada unidad experimental se desinfectaron con formalina a 150 ppm. Posteriormente, se procedió a distribuir los huevos de cada unidad experimental en tres grupos: huevos frescos, 15 y 30 días de almacenamiento. Los huevos frescos fueron dispuestos a eclosionar inmediatamente después de la desinfección. Los grupos 15 y 30 días fueron almacenados en un tubo de ensayo por grupo, lo cual generó 24 tubos para las 12 unidades experimentales.

A cada tubo de ensayo (10 mL) se suministró una densidad aproximada de 2.000 huevos mL⁻¹, agua de mar esterilizada en autoclave y microfiltrada (5 µm), oscuridad total y refrigeración entre 2 y 4 °C (nevera Alpicool ™, C20 21 Quart). Los tubos fueron marcados con fecha y tratamiento correspondiente para su posterior identificación.

Figura 4. Descripción experimento.



4.4.9 Determinación de la eclosión de huevos. La eclosión de huevos se realizó con distribución aleatoria en cámaras multipozo (multiwell slide plates, Pentair 6 well # MW6), con agua de mar filtrada a 25 UPS, temperatura ambiente (26 °C), fotoperiodo natural y 48 horas de incubación. Se dispuso los grupos formados con anterioridad (frescos, 15 y 30 días de almacenamiento). En las cámaras se depositó entre 80 y 100 huevos por cada pozo, y se utilizó un total de 3 pozos por cada tubo de ensayo. Lo anterior arrojó un total de 9 conteos por cada grupo y unidad experimental.

Al término del tiempo de eclosión, se agregó dos gotas de solución de lugol al 2% a cada pozo, para evitar la continuidad del desarrollo embrionario y eclosión de huevos.

4.4.10 Diseño experimental y análisis estadístico. Para verificar la mortalidad de adultos se realizó una prueba de Brand Esnedecor basada en el estadístico de chi cuadrado y una comparación de proporciones para establecer diferencias significativas entre tratamientos. Lo anterior basado en las siguientes fórmulas.

$$\chi^2 = \frac{\sum n_i (pi - p)^2}{pq}$$

Donde:

χ^2 : valor de chi cuadrado

n_i : número animales en el i-ésimo tratamiento

p_i : proporción de sobrevivencia en el i-ésimo tratamiento

p : proporción de sobrevivencia en todos los tratamientos

q : Proporción de mortalidad de todos los tratamientos

Decisión:

$$\text{Si } \chi^2 c > \chi^2 t_{(1-\alpha)}$$

Existen diferencias significativas

Los tratamientos para corroborar la mortalidad, se detallan en la tabla 1.

Para verificar la eclosión, se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2^3 (descrito en la tabla 1) y 2^3 , con dos niveles de interacción para cada uno. Los factores se describen a continuación.

- Factor 1: salinidad, con niveles: 0 (18 UPS) y 1 (28 UPS).
- Factor 2: temperatura, con niveles: 0 (20 °C) y 1 (26 °C).
- Factor 3: almacenamiento, con niveles: 0 (15 días) y 1 (30 días).

Tabla 1. Tratamiento huevos frescos y mortalidad

Factor 2: Temperatura	Factor 1: Salinidad	
	0: (18 UPS)	1: (28 UPS)
0: (20 °C)	T1 0 0	T2 0 1
1: (26 °C)	T3 1 0	T4 1 1

Tabla 2. Tratamientos e interacciones.

Factor 3: tiempo	Factor 1: salinidad			
	0: (18 UPS)		1: (28 UPS)	
	Factor 2: temperatura			
	0: (20 °C)	1: (26 °C)	0: (20 °C)	1: (26 °C)
0: (15 días)	T1 0 0 0	T2 0 1 0	T3 1 0 0	T4 1 1 0
1: (30 días)	T5 0 0 1	T6 0 1 1	T7 1 0 1	T8 1 1 1

De acuerdo a lo anterior, los tratamientos son los siguientes:

- T1 (000): salinidad 18 UPS, temperatura 20 °C, tiempo 15 días.
- T2 (010): salinidad 18 UPS, temperatura 26 °C, tiempo 15 días.
- T3 (100): salinidad 28 UPS, temperatura 20 °C, tiempo 15 días.
- T4 (110): salinidad 28 UPS, temperatura 26 °C, tiempo 15 días.
- T5 (001): salinidad 18 UPS, temperatura 20 °C, tiempo 30 días.
- T6 (011): salinidad 18 UPS, temperatura 26 °C, tiempo 30 días.

- T7 (101): salinidad 28 UPS, temperatura 20 °C, tiempo 30 días.
- T8 (111): salinidad 28 UPS, temperatura 26 °C, tiempo 30 días.

Los datos colectados en este estudio se analizaron con el software StatGraphics Centurion XVI. Los resultados de los tratamientos se presentaron como promedio ± el error estándar (EE). Para comparar las variables a evaluar, se aplicó pruebas no paramétricas de Brand-Snedecor (Chi cuadrado) para determinar diferencias significativas entre tratamientos, y una comparación de proporciones con el fin de establecer diferencias entre las proporciones de supervivencia de reproductores y eclosión de huevos. Se utilizó un análisis estadístico además de la transformación de los porcentajes como lo exponen Ohs et al⁹⁴, Hagemann⁹⁵, Pham et al⁹⁶, Peck y Holste⁹⁷, Nogueira et al⁹⁸, Franco et al⁹⁹, a través de la fórmula arcoseno de la raíz cuadrada.

4.4.11 Variables a evaluar. Supervivencia, la cual será determinada a partir de la siguiente fórmula.

$$\% \text{ supervivencia} = \frac{Nf \text{ individuos}}{No \text{ individuos}} * 100$$

Donde:

Nf individuos: número de adultos encontrados al final del experimento.
No individuos: número de adultos sembrados al inicio del experimento.

Eclosión, la cual será determinada a partir de la siguiente fórmula.

$$\% \text{ Eclosión} = \frac{Nf}{No} * 100$$

Donde:

⁹⁴ OHS, Cortney L., RHYNE, Andrew L. et STENN, Erik. Viability of subitaneous eggs of the copepod, *Acartia tonsa* (Dana), following exposure to various cryoprotectants and hypersaline water. En: Aquaculture [En línea]. Elsevier B.V., 2009, Vol. 287, nº 1-2, p. 114-119. DOI 10.1016/j.aquaculture.2008.10.004

⁹⁵ HAGEMANN, Andreas. Cold storage of eggs of *Acartia tonsa* Dana: effects of light, salinity and short-term temperature elevation on 48-h egg hatching success. Tesis de maestría. En: Norwegian University of Science and Technology. 2011.

⁹⁶ PHAM, Thanh Day. Particle characterization and influence on the nauplii and egg production of calanoid copepod (*Acartia tonsa* Dana) in water treatment systems with and without membrane filtration. Tesis de maestría. En: Norwegian University of Science and Technology. 2014.

⁹⁷ PECK, Myron A. & HOLSTE, Linda. Op. cit., p. 344. DOI 10.1016/J.AQUACULTURE.2005.11.055

⁹⁸ NOGUEIRA, Natacha, SUMARES, Bernardo, ANDRADE, Carlos, et al. The effects of temperature and photoperiod on egg hatching success, egg production and population growth of the calanoid copepod, *Acartia grani* (Calanoida: Acartiidae). En: Aquaculture Research [En línea]. 2017. p. 3. DOI 10.1111/are.13437.

⁹⁹ FRANCO, Sofia C., AUGUSTIN, Christina B., GEFFEN, Audrey J., et al. Op. cit., p. 571. DOI 10.1016/j.aquaculture.2016.10.044

Nf: número de nauplios encontrados al final del conteo.

No: número total de huevos y nauplios encontrados al final del conteo.

5. RESULTADOS

5.1 SUPERVIVENCIA

La supervivencia de adultos en todos los tratamientos fue de 98 %, sin presentar diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($p > ,05$). (Anexo A, B)

Teniendo en cuenta la formación de los tres grupos (huevos frescos, 15 y 30 días de almacenamiento), se realizó dos análisis estadísticos.

5.2 ECLOSIÓN HUEVOS FRESCOS

La verificación de los supuestos estadísticos para este grupo (Varianza, normalidad e independencia) sugiere que los datos obtenidos en el experimento cumplen los supuestos con un 95 % de confiabilidad ($p \leq ,05$) (Anexo E). De forma similar, un R^2 con un valor de 96,1 %.

Se obtuvo altos porcentajes de eclosión ($84,5 \pm 2,3$ %) sin importar las distintas salinidades y temperaturas aplicadas. La más alta eclosión alcanzada fue de $97,3 \pm 0,7$ % para el tratamiento T1 (\downarrow temperatura \downarrow salinidad) y el más bajo para los tratamientos T4 (\uparrow temperatura \uparrow salinidad) y T3 (\uparrow temperatura, \downarrow salinidad) con 84,5 % en ambos. El efecto entre tratamientos en la eclosión de huevos frescos, presentó diferencias estadísticamente significativas para las eclosiones obtenidas ($p \leq ,05$) (Figura 5), esto corroborado por medio de un análisis de varianza con un 95 % de confiabilidad (Anexo D).

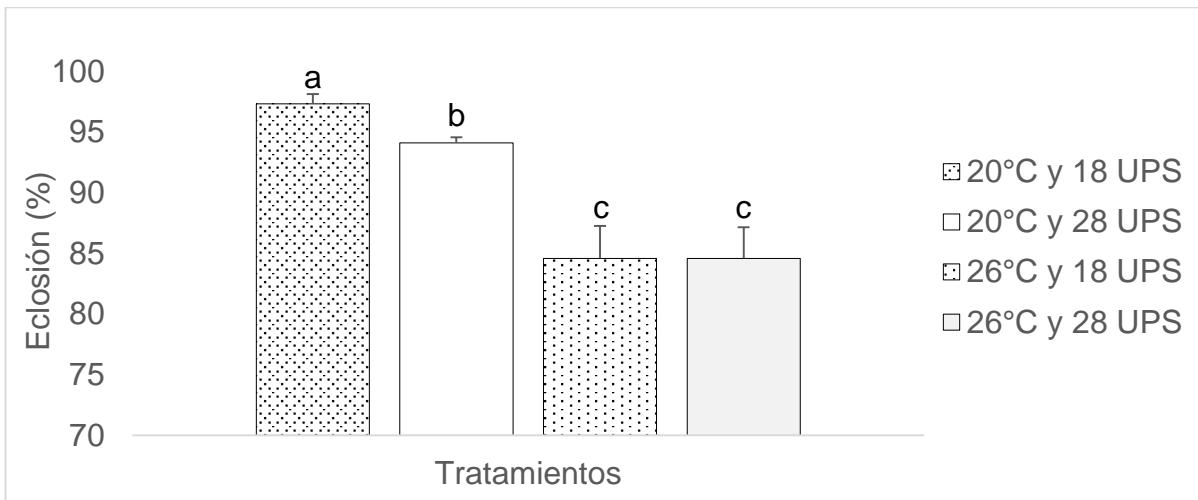
En cuanto al efecto de los factores y sus combinaciones, el análisis de varianza multifactorial arrojó que tanto el factor 1 (salinidad) como el factor 2 (temperatura) presentan diferencias estadísticamente significativas sobre la eclosión de huevos frescos ($p \leq ,05$). De forma similar, el análisis mostró que dichos factores presentan interacción entre ellos con un 95 % de confiabilidad (Anexo F).

El tratamiento T1 (\downarrow temperatura \downarrow salinidad) mostró el mayor porcentaje de eclosión ($97,3 \pm 0,7$ %) significativamente más alto que todos ($p \leq ,05$) (Anexo G), seguido por T2 (\downarrow temperatura \uparrow salinidad) ($94,1 \pm 0,41$ %). En cuanto a los tratamientos T3 y T4 no presentaron diferencias entre sí, con valores de $84,5 \pm 2,3$ y $84,5 \pm 2,2$ %; respectivamente (Figura 5).

5.3 ECLOSIÓN HUEVOS ALMACENADOS

La verificación de los supuestos estadísticos para el grupo huevos almacenados (15 y 30 días de almacenamiento), arrojó que se cumplió el supuesto de normalidad (Valor Z para Asimetría), varianza e independencia ($p \geq ,05$) (Anexo I) y con un R^2 de 98,5 %.

Figura 5. Porcentajes eclosión grupo huevos frescos



*Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas.

Para el grupo 15 días de almacenamiento (Figura 6) el tratamiento T3 (\uparrow Salinidad \downarrow Temperatura) presentó significativamente mayor eclosión ($77,7 \pm 3,5\%$) con respecto a los otros tratamientos ($p \leq ,05$). El valor más bajo obtenido ($14,5 \pm 2,6\%$) correspondió al tratamiento T2 (\downarrow Salinidad \uparrow Temperatura) (Anexo H).

Para el grupo 30 días de almacenamiento (Figura 6) el tratamiento T7 (\downarrow Salinidad \downarrow Temperatura) presentó significativamente mayor eclosión ($20,2 \pm 2,9\%$) con respecto al T5 (\uparrow Salinidad \downarrow Temperatura) ($18,4 \pm 0,5$) sin presentar diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Los tratamientos T6 y T8 (\downarrow Salinidad \uparrow Temperatura, \uparrow Salinidad \uparrow Temperatura) presentaron bajos porcentajes de eclosión ($3,00 \pm 0,12$, $3,9 \pm 0,9$; respectivamente), sin presentar diferencias estadísticas entre sí ($p \geq ,05$) (Anexo H).

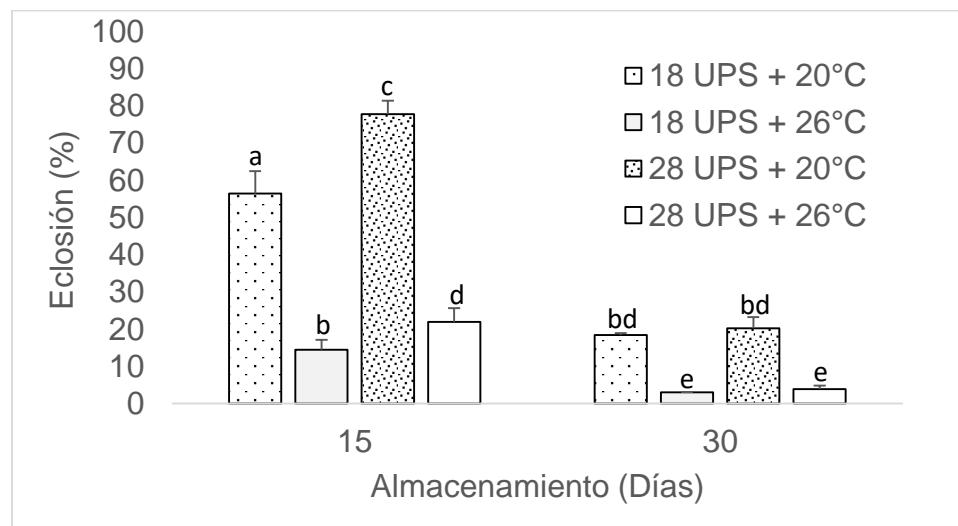
El efecto entre tratamientos en la eclosión de huevos almacenados, no presentó diferencias estadísticamente significativas con el tratamiento T5 (\downarrow Salinidad \downarrow Temperatura) para las eclosiones obtenidas ($p \geq ,05$), esto corroborado al realizar un análisis de varianza con un 95 % de confiabilidad. Se observó que todos los factores (Salinidad, Temperatura y Tiempo) presentan diferencias estadísticamente significativas sobre la eclosión de huevos frescos ($p \leq ,05$) (Anexo J).

La interacción de los factores temperatura y salinidad no afectaron significativamente ($p \geq ,05$) la eclosión de los huevos almacenados. Por otro lado, la interacción del tiempo con los factores salinidad y temperatura si afectaron significativamente ($p \leq ,05$) la eclosión de huevos almacenados (Anexo J).

En la prueba paramétrica de Tukey HSD, se obtuvo que los tratamientos T6 y T8 no presentan diferencias significativas entre ellos, pero son diferentes a los demás, de

forma similar el T1 y T3. (Anexo K). Se demostró, además, que el tratamiento con mayor eclosión correspondió a T3 (baja temperatura, alta salinidad, 15 días de almacenamiento) seguido del T1 (baja temperatura, baja salinidad, 15 días de almacenamiento) con valores de $77,8 \pm 3,2\%$ y $56,4 \pm 5,3\%$; respectivamente, en comparación con los demás tratamientos y combinaciones (Figura 6).

Figura 6. Porcentajes eclosión Grupo 15 y 30 días de almacenamiento



* Letras diferentes indican diferencias estadísticas

6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente estudio la mortalidad en adultos de *A. tonsa* no se vió afectada por las condiciones de cultivo otorgadas a los animales. Anteriormente ha sido demostrado en estudios como los de Oppert¹⁰⁰, quien no encontró mortalidad de los individuos sometidos a condiciones ambientales adversas como alteraciones en el fotoperiodo, temperatura, salinidad y niveles de oxígeno inferiores a 4 mg.L⁻¹. Sin embargo, menciona que estos pueden verse afectados por la edad, presencia de parásitos o infecciones bacterianas, donde puede reducir el número de individuos por mililitro en el cultivo. Cabe resaltar que la mortalidad de los copépodos reproductores también puede verse influenciada por las densidades de cultivo¹⁰¹, sin embargo en los estudios propuestos para revisión de este trabajo la densidad más alta encontrada corresponde a 5 ind.mL⁻¹, la cual es mayor con respecto a la registrada en este trabajo, en el cual la mortalidad no presentó diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos propuestos.

El presente estudio demostró que la eclosión de los huevos del copépodo *A. tonsa* (población tropical) es afectada por la temperatura, salinidad y tiempo de almacenamiento. Lo anterior es de gran importancia para la acuicultura, puesto que una adecuada selección de las mejores condiciones para el desove, eclosión y almacenamiento de huevos contribuye en el desarrollo tecnológico de esta especie como alimento vivo para acuicultura.

Entre los factores ambientales estudiados, la temperatura afectó considerablemente la fecundidad de los adultos de *A. tonsa* (Anexo C). Esto ya ha sido documentado por autores como Castro¹⁰² y Chinnery & Williams¹⁰³, quienes establecen que esta especie puede tolerar amplios rangos de temperatura, pero con fuertes cambios en la producción de huevos. También, estudios realizados por Milione & Zeng¹⁰⁴ afirman que altas temperaturas incrementan la fecundidad de los reproductores de cepas de aguas costeras del sur de California y el Golfo de México, en efecto, producen mayor cantidad de huevos que pueden ser incubados de forma inmediata obteniendo altos porcentajes de eclosión. Nogueira et al¹⁰⁵ en su estudio para la especie *A. grani*, demostraron que a alta temperatura existe una mayor producción

¹⁰⁰ OPPERT, Cris J. Effect of Diet and Low Dissolved Oxygen on Some Life History Parameters of *Acartia tonsa* (Copepoda: Calanoida). Tesis doctoral. 2006. pg 17-19.

¹⁰¹ Ibid pg. 21

¹⁰² CASTRO-LONGORIA, Ernestina. Egg production and hatching success of four *Acartia* species under different temperature and salinity regimes. En: Journal of Crustacean Biology [En línea]. 2003. Vol. 23, n° 2. p. 289-299. DOI 10.1163/20021975-99990339

¹⁰³ CHINNERY, F. E. & WILLIAMS, J. A. The influence of temperature and salinity on *Acartia* (Copepoda: Calanoida) nauplii survival. En: Marine Biology [En línea]. 2004. Vol. 145, n° 4. p. 736. DOI 10.1007/s00227-004-1354-2

¹⁰⁴ MILIONE, Michael & ZENG, Chaoshu. The effects of temperature and salinity on population growth and egg hatching success of the tropical calanoid copepod, *Acartia sinjiensis*. En: Aquaculture [En línea]. 2008. Vol. 275, n° 1-4. p. 118. DOI 10.1016/j.aquaculture.2007.12.010

¹⁰⁵ NOGUEIRA, Natacha, SUMARES, Bernardo, ANDRADE, Carlos, et al. Op. cit., p. 9. DOI 10.1111/are.13437

de huevos, de igual forma, observaron que estos se ven afectados por el fotoperiodo ofrecido a los reproductores, donde hay una mayor producción de huevos en oscuridad total, lo anterior también ha sido corroborado para *A. tonsa* por autores como Hagemann et al¹⁰⁶ y Jepsen et al¹⁰⁷.

Autores como Holste & Peck¹⁰⁸ y Peck et al¹⁰⁹ mencionan que a diferentes temperaturas ocurren diferencias entre la producción y eclosión de huevos, esto dependiendo del ambiente o condiciones en que los reproductores sean cultivados. No obstante, este estudio es el primero en evaluar el efecto combinado de factores tiempo de almacenamiento de huevos, salinidad y temperatura de cultivo de adultos sobre el desove y la eclosión de los huevos producidos.

Dependiendo de las condiciones de temperatura y salinidad la cepa de *A. tonsa* aislada desde la Bahía de Cispatá generó diferentes respuestas de eclosión de huevos, tanto para frescos como almacenados. Lo anterior es de gran importancia teniendo en cuenta las fuertes variaciones que existen entre las poblaciones de esta especie, tal y como lo demuestran Drillet et al¹¹⁰, quienes evaluaron cepas aisladas desde cuatro puntos terrestres distintos: Océano Báltico, Oresund (Dinamarca) y Kiel Bight (Alemania), Golfo de México: Alabama y Florida (EEUU); los autores encontraron que las cepas presentaron altas diferencias en la producción y eclosión de huevos, sugiriendo que la característica cosmopolita y alta plasticidad de las cepas, demuestra diferencias genotípicas y afecta la producción y eclosión de los mismos. No obstante, estos estudios fueron realizados bajo una misma condición ambiental, lo que no deja ver el requerimiento específico de cada población.

A pesar de los mejores resultados obtenidos a baja temperatura y alta salinidad, la eclosión de huevos almacenados sigue siendo baja comparada con cepas tales como DIFRES Oresund (Dinamarca), la cual presenta una mayor producción de huevos cosechados en 17 y 25 °C con eclosiones superiores al 40 % hasta períodos de un mes de almacenamiento, valor que es superior a otra cepa subtropical (Golfo de México)¹¹¹ y la obtenida en este estudio. De ahí que el linaje de poblaciones cripticas difiere en los patrones genéticos, por ende, se requieren condiciones diferentes de cultivo dependiendo del lugar donde sea captada la cepa.

¹⁰⁶ HAGEMANN, Andreas, ØIE, Gunvor, EVJEMO, Jan Ove, et al. Effects of light and short-term temperature elevation on the 48-h hatching success of cold-stored *Acartia tonsa* Dana eggs. En: Aquaculture International [En línea]. 2016. Vol. 24, n° 1. p. 65. DOI 10.1007/s10499-015-9908-5

¹⁰⁷ JEPSEN, Per M., BJØRBÆK, Niels S., RAYNER, Thomas A., et al. Recommended feeding regime and light climate in live feed cultures of the calanoid copepod *Acartia tonsa* Dana. En: Aquaculture International [En línea]. Springer International Publishing, 2017, Vol. 25, n° 2, p. 635-654. DOI 10.1007/s10499-016-0063-4

¹⁰⁸ HOLSTE, Linda et PECK, Myron A. Op. cit., p. 1064. DOI 10.1007/s00227-005-0132-0

¹⁰⁹ PECK, Nadine, PETERS, Janna, DIEKMANN, Rabea, et al. Op. cit., p. 13 DOI 10.1093/plankt/fbu093

¹¹⁰ DRILLET, Guillaume, GOETZE, Erica, JEPSEN, Per M., et al. Op. cit., p. 113. DOI 10.1016/j.aquaculture.2008.04.005

¹¹¹ Ibid. p. 114

Se evidenció que la cepa utilizada de *A. tonsa* se aclimató a las condiciones experimentales, y que la temperatura de cultivo juega un papel fundamental en la producción de huevos quiescentes, especialmente para almacenamiento. Varias explicaciones han sido propuestas, una de ellas está ligada al efecto que tiene la temperatura sobre la velocidad de desarrollo embrionario en estos organismos poiquilotermos, donde Nilsson y Hansen creen que en el estadio de gástrula existe un “despertar”; esto significa que, durante el almacenamiento, los huevos colectados después de gástrula continuarán el desarrollo embrionario hasta embriogénesis, con un consecuente mayor gasto energético. Lo anterior sugiere que los huevos deben ser colectados y almacenados en una etapa temprana del desarrollo¹¹². Otra explicación a nuestros resultados es el mayor tamaño del huevo $3 \times 10^{-4} \text{ mm}^3$ (biovolumen) a baja temperatura de cultivo, dado que el tamaño de los huevos es inversamente proporcional a la temperatura¹¹³.

Las diferentes salinidades aplicadas al experimento mostraron variaciones en la eclosión de los huevos. Una combinación de alta salinidad y baja temperatura beneficia la eclosión de huevos almacenados. Sin embargo, varios estudios sugieren que valores de salinidad usados (18 y 30 UPS) no muestran efectos sobre la eclosión de huevos frescos¹¹⁴. Peck et al, establecen que *A. tonsa* desde origen marino presenta alta eclosión de huevos frescos a 23 °C y baja salinidad (18 PSU), y se ha sugerido que la producción de huevos es beneficiada con el uso de salinidades estuarinas¹¹⁵. También, utilizando una alta temperatura de cultivo (26 °C) Shayegan et al. no encontró un efecto significante de la salinidad de cultivo sobre la eclosión de huevos frescos, pero sugieren al igual que el presente estudio una alta salinidad de cultivo¹¹⁶. No obstante, para huevos almacenados una baja salinidad de cultivo afectó considerablemente la eclosión de los huevos. En esta especie considerada osmoconformadora, la disponibilidad de energía para la reproducción podría disminuir después de exceder un umbral específico de mayor o menor salinidad¹¹⁷. Por lo tanto, el efecto de la salinidad del desove no es notable en huevos frescos; sin embargo, aún podrían generarse cambios importantes no determinados, por ejemplo, se conoce que una baja salinidad de cultivo genera una disminución en la densidad del huevo de *A. tonsa*¹¹⁸.

¹¹² NILSSON, Birgitte & HANSEN, Benni Winding. Op. cit., p. 10. DOI 10.1371/journal.pone.0193727

¹¹³ HANSEN, Benni Winding, BUTTINO, Isabella, CUNHA, Maria Emilia, et al. Op. cit., p. 137. DOI 10.1016/j.aquaculture.2016.02.024

¹¹⁴ DRILLET, Guillaume. GOETZE, Erica. JEPSEN, Per M. HØJGAARD, Jonas K. HANSEN, Benni W. Op. cit., p. 112. DOI 10.1016/j.aquaculture.2008.04.005

¹¹⁵ PECK, Nadine. PETERS, Janna. DIEKMANN, Rabea. LAAKMANN, Silke. RENZ, Jasmin. Op. cit., p. 10. DOI 10.1093/plankt/fbu093

¹¹⁶ MAJID, Shayegan, FEREIDOUNI ABOLGHASEM, Esmaeili, NASER, Agh, et al. Effects of salinity on egg and fecal pellet production, development and survival, adult sex ratio and total life span in the calanoid copepod, *Acartia tonsa*: a laboratory study. En: Chinese Journal of Oceanology and Limnology [En línea]. 2016. Vol. 34, n° 4. p. 715. DOI 10.1007/s00343-016-5030-4

¹¹⁷ PECK, Nadine. PETERS, Janna. DIEKMANN, Rabea. LAAKMANN, Silke. RENZ, Jasmin. Op. cit., p. 11. DOI 10.1093/plankt/fbu093

¹¹⁸ MILLER, Denise D. et MARCUS, Nancy H. The effects of salinity and temperature on the density and sinking velocity of eggs of the calanoid copepod *Acartia tonsa* Dana. En: Journal of Experimental Marine Biology and Ecology [En línea]. 1994. Vol. 179, n° 2. p. 250. DOI 10.1016/0022-0981(94)90117-1

En esta experiencia, no se observó problemas para crecer los nauplios hasta adultos utilizando una baja salinidad y alta temperatura. Pero cuando el propósito de cultivar esta especie es almacenar los huevos por un determinado tiempo, es necesario tener en cuenta estos factores ambientales durante el desove. Otros aspectos podrían ser evaluados para mejorar los resultados obtenidos en el presente estudio, tales como el tratamiento de huevos con antibióticos¹¹⁹ y el uso de nitrógeno gaseoso para almacenar los huevos en condiciones de anoxia¹²⁰, aspecto que ya han sido descritos en otros estudios y podrían tener beneficios importantes.

La interacción de la temperatura y salinidad del cultivo ha sido poco estudiada en esta especie de copépodo. Peck et al., reportan que la interacción de estas variables ambientales afecta la dinámica poblacional y el ciclo de vida de *A. tonsa*¹²¹. En dicho estudio los autores establecen beneficios de condiciones estuarinas para la reproducción. De igual forma este estudio mostró una interacción de estas variables sobre la eclosión de huevos almacenados; sin embargo, el enfoque acuícola de almacenar huevos como fuente de alimento vivo favorece el uso de salinidades más altas y temperaturas bajas, aun teniendo en cuenta la procedencia tropical y estuarina de la cepa utilizada (Bahía de Cispatá)¹²².

¹¹⁹ DRILLET, Guillaume, LINDLEY, Laban C., MICHELS, Alan, et al. Op. cit., p. 461. DOI 10.1111/j.1365-2109.2007.01673.x

¹²⁰ JØRGENSEN, Tue Sparholt, JEPSEN, Per Meyer, PETERSEN, H. Cecilie B., et al. Op. cit., p. 6. DOI 10.1186/s12898-018-0217-5

¹²¹ PECK, Nadine. PETERS, Janna. DIEKMANN, Rabea. LAAKMANN, Silke. RENZ. Op. cit., p.12. DOI 10.1093/plankt/fbu093

¹²² CAÑON, L, QUINTANA, D, PÁEZ, Cañón, et al. Op. cit., p 86

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1 CONCLUSIONES

Los extremos de temperatura y salinidad (alto y bajo), no mostraron diferencias significativas con respecto a la mortalidad de los individuos ($p \leq ,05$) y supervivencias del 98 % para todos los tratamientos. En ese sentido, las opciones de combinaciones (temperatura y salinidad) para realizar desoves dependerán de factores logísticos de la estación y otros lugares que decidan replicar el trabajo.

Basado en los resultados de este estudio se pueden obtener altos porcentajes de eclosión ($> 84\%$) en huevos frescos sin importar las combinaciones de temperatura y salinidad utilizadas.

Cuando los huevos son almacenados es necesario disminuir la temperatura e incrementar la salinidad de cultivo para obtener porcentajes de eclosión superiores al 50 % para huevos almacenados hasta 15 días.

En este trabajo tanto los huevos frescos como almacenados tuvieron un buen comportamiento respecto a la eclosión, sin embargo, la elección de la combinación de cultivo adecuada (temperatura, salinidad y tiempo) depende en gran medida de las condiciones y capacidad de producción requeridas por la estación o institución donde se deseé aplicar los procedimientos establecidos en este trabajo.

7.2 RECOMENDACIONES

Si el interés de cultivar el copépodo *A. tonsa* es dirigido hacia la producción de huevos frescos como fuente de nauplios para larvicultura de peces marinos, una alta temperatura es más adecuada, puesto que permite aprovechar la fecundidad de las hembras en el cultivo sin efectos considerables sobre la eclosión de los huevos.

Si el interés de cultivar el copépodo *A. tonsa* es dirigido hacia la producción de huevos de quiescencia como fuente de nauplios, un periodo no mayor a 15 días de almacenamiento es adecuado, puesto que se obtienen altos porcentajes de eclosión ($> 50\%$) con una combinación de baja temperatura sin importar las salinidades propuestas.

Es importante continuar con el estudio de otras variables que afectan la eclosión de huevos almacenados, así como incluir otros aspectos que ya han demostrado mejoras en la eclosión de otras poblaciones, tales como almacenamiento de huevos en condiciones de hipoxia y total oscuridad, para mejorar los prospectos de eclosión y así contribuir en la viabilidad de esta cepa tropical.

BIBLIOGRAFÍA

- ABATE, Tenaw G. NIELSEN, Rasmus. NIELSEN, Max. DRILLET, Guillaume. JEPSEN, Per M. HANSEN, Benni W.I. Economic feasibility of copepod production for commercial use: Result from a prototype production facility. En: Aquaculture [En línea]. Elsevier. 2015. Vol. 436. p. 72-79. DOI 10.1016/j.aquaculture.2014.10.012
- AJIBOYE, O. YAKUBU, A. F. ADAMS, T. E. OLADI, E. D. NWOGU, N. A. A review of the use of copepods in marine fish larviculture. En: Reviews in Fish Biology and Fisheries [En línea]. 2011. Vol. 21, n° 2. p. 225-246. ISBN 0960-3166. DOI 10.1007/s11160-010-9169-3
- BLADES-ECKELBARGER, Pamela I. & MARCUS, Nancy H. The Origin of Cortical Vesicles and Their Role in Egg Envelope Formation in the «Spiny» Eggs of a Calanoid Copepod, *Centropages velificatus*. En: Biological Bulletin [En línea]. 1992. Vol. 182, n° 1. p. 41-53. DOI 10.2307/1542179
- CAÑON, L. QUINTANA, D. PÁEZ, Cañón. LOPEZ, R. TOUS, G. LLAMAS, H. Caracterización fisicoquímica del Golfo de Morrosquillo y Tanques de Lastre de buques de tráfico internacional. En: Boletín Científico CIOH. 2010. Vol. 28. 84-126 p.
- CASTRO-LONGORIA, Ernestina. Egg production and hatching success of four *Acartia* species under different temperature and salinity regimes. En: Journal of Crustacean Biology [En línea]. 2003. Vol. 23, n° 2. p. 289-299. DOI 10.1163/20021975-99990339
- CHINNERY, F. E. & WILLIAMS, J. A. The influence of temperature and salinity on *Acartia* (Copepoda: Calanoida) nauplii survival. En: Marine Biology [En línea]. 2004. Vol. 145, n° 4. p. 733-738. DOI 10.1007/s00227-004-1354-2
- CHINNERY, Fay E. & WILLIAMS, John A. Photoperiod and temperature regulation of diapause egg production in *Acartia bifilosa* from Southampton Water. En: Marine Ecology Progress Series [En línea]. 2003. Vol. 263. p. 149-157. DOI 10.3354/meps263149
- CONCEIÇÃO, Luís. YÚFERA, Manuel. MAKRIDIS, Pavlos. MORAIS, Sofia. DINIS, Maria Teresa. Live feeds for early stages of fish rearing. En: Aquaculture Research [En línea]. 2010. Vol. 41. p. 613-640. DOI 10.1111/j.1365-2109.2009.02242.x
- CUOC, Corinne. BRUNET, Michel. ARNAUD, Jean. MAZZA, Jacques. Formation of egg envelopes in the freshwater calanoid copepod, *Hemidiaptomus ingens*. En: Invertebrate Reproduction and Development [En línea]. 1994. Vol. 26, n° 1. p. 63-78. DOI 10.1080/07924259.1994.9672401

DANA, J D. Conspectus crustaceorum, quae in orbis terrarum circumnavigatione, Carolo Wilkes, e classe Reipublicae foederatae duce, lexit et descriptis Jacobus D. Dana. En: The American journal of science and arts [En línea]. 1849. Vol. 8, n° 2. p. 276-285. Disponible en : <https://www.biodiversitylibrary.org/page/27760646#page/296/mode/1up>

DRILLET, Guillaume, HANSEN, Benni W. & KIØRBOE, Thomas. Resting egg production induced by food limitation in the calanoid copepod *Acartia tonsa*. En: Limnology and Oceanography [En línea]. 2011. Vol. 56, n° 6. p. 2064-2070. DOI 10.4319/lo.2011.56.6.2064.

DRILLET, Guillaume. LINDLEY, Laban C. MICHELS, Alan. WILCOX, Jeffrey. MARCUS, Nancy. Improving cold storage of subitaneous eggs of the copepod *Acartia tonsa* Dana from the Gulf of Mexico (Florida - USA). En: Aquaculture Research [En línea]. 2007. Vol. 38. p. 457-466. DOI 10.1111/j.1365-2109.2007.01673.x

DRILLET, Guillaume. FROUËL, Stéphane. SICHLAU, Mie H. JEPSEN, Per M. HØJGAARD, Jonas K. JOARDER, Almagir K. HANSEN, Benni W. Status and recommendations on marine copepod cultivation for use as live feed. En: Aquaculture [En línea]. Elsevier. 2011. Vol. 315. p. 155-166. DOI 10.1016/J.AQUACULTURE.2011.02.027

DRILLET, Guillaume. GOETZE, Erica. JEPSEN, Per M. HØJGAARD, Jonas K. HANSEN, Benni W. Strain-specific vital rates in four *Acartia tonsa* cultures, I: Strain origin, genetic differentiation and egg survivorship. En: Aquaculture [En línea]. 2008. Vol. 280. p. 109-116. DOI 10.1016/j.aquaculture.2008.04.005

DRILLET, Guillaume. JEPSEN, Per M. HØJGAARD, Jonas K. JØRGENSEN, Niels O.G. HANSEN, Benni W. Strain-specific vital rates in four *Acartia tonsa* cultures II: Life history traits and biochemical contents of eggs and adults. En: Aquaculture [En línea]. Elsevier. 2008. Vol. 279, n° 1-4. p. 47-54. DOI 10.1016/J.AQUACULTURE.2008.04.010

DRILLET, Guillaume. RAIS, Mouloud. NOVAC, Aliona. JEPSEN, Per M. MAHJOUB, Mohamed Sofiane. HANSEN, Benni W. Total egg harvest by the calanoid copepod *Acartia tonsa* (Dana) in intensive culture - effects of high stocking densities on daily egg harvest and egg quality. En: Aquaculture Research [En línea]. 2015. Vol. 46, n 12. p. 3028-3039. DOI 10.1111/are.12459

DRILLET, Guillaume & LOMBARD, Fabien. A first step towards improving copepod cultivation using modelling: The effects of density, crowding, cannibalism, tank

design and strain selection on copepod egg production yields. En: Aquaculture Research [En línea]. 2015. Vol. 46, n 7. p. 1-10. DOI 10.1111/are.12317

DUSSART, B. M. Les différentes catégories de plankton. Hydrobiologia. 1965, Vol. 26, n° 1887. p. 72-74.

ELLIOTT, David T., PIERSON, James J. & ROMAN, Michael R. Predicting the Effects of Coastal Hypoxia on Vital Rates of the Planktonic Copepod *Acartia tonsa* Dana. En: PLoS ONE [En línea]. 2013, Vol. 8, n° 5. ISBN 1932-6203. DOI 10.1371/journal.pone.0063987.

FERNANDEZ DE PUELLES, Luz. Orden Calanoida. Ibero Diversidad Entomológica IDE@-SEA [En línea]. 2015, Vol. 89, p. 1-27. Disponible en: www.sea-entomologia.org/IDE@

XXXIV Congreso de Ciencias del Mar. DISTRIBUCIÓN LATITUDINAL DE COPÉPODOS PLANCTÓNICOS EN PRIMAVERA FRENTE A LAS COSTAS CHILENAS (23°- 36°S). 2014, p. 170.

FLEGER, John W. The Potential to Mass-Culture Harpacticoid Copepods for Use as Food for Larval Fish. En: Copepods in Aquaculture. LEE, Cheng-Sheng, O'BRYEN, Patricia J. et MARCUS, Nancy H. (Eds.). [En línea]. Blackwell Publishing Professional. 2005. p. 11-24. DOI 10.1002/9780470277522.ch2

FRANCO, Sofia C. AUGUSTIN, Christina B. GEFFEN, Audrey J. DINIS, Maria Teresa. Growth, egg production and hatching success of *Acartia tonsa* cultured at high densities. En: Aquaculture [En línea]. 2017. Vol. 468. p. 569-578. DOI 10.1016/j.aquaculture.2016.10.044

HAGEMANN, Andreas. Cold storage of eggs of *Acartia tonsa* Dana : effects of light, salinity and short-term temperature elevation on 48-h egg hatching success. Master's Thesis. Trondheim, Noruega. Norwegian University of Science and Technology. 2011. 58 p.

HAGEMANN, Andreas. ØIE, Gunvor. EVJEMO, Jan Ove. OLSEN, Yngvar. Effects of light and short-term temperature elevation on the 48-h hatching success of cold-stored *Acartia tonsa* Dana eggs. En: Aquaculture International [En línea]. 2016. Vol. 24, n° 1. p. 57-68. DOI 10.1007/s10499-015-9908-5

HANSEN, Benni Winding. Advances using Copepods in Aquaculture. En: Journal of Plankton Research [En línea]. 2017. Vol. 00, n° 0. p. 1-3. DOI 10.1093/plankt/fbx057

HANSEN, Benni Winding. BUTTINO, Isabella. CUNHA, Maria Emilia. DRILLET, Guillaume. Embryonic cold storage capability from seven strains of *Acartia* spp.

isolated in different geographical areas. En: Aquaculture [En línea]. Elsevier B.V., 2016. Vol. 457. p. 131-139. DOI 10.1016/j.aquaculture.2016.02.024

GAMBOA, Jesús Hernando. FRESNEDA, Adriana. ESPINEL, Victor. Avances en la reproducción y cultivo en cautiverio del pargo lunarejo *Lutjanus guttatus*, (Steindachner, 1869) en la Costa Pacífica Colombiana. En: Revista Electronica de Ingeniería en Producción Acuícola. 2007. Vol. 2. p. 61-64.

HOLMSTRUP, Martin. OVERGAARD, Johannes. SORENSEN, Thomas F. DRILLET, Guillaume. HANSEN, Benni W. RAMLOV, Hans. ENGELL-SORENSEN, Kirsten. Influence of storage conditions on viability of quiescent copepod eggs (*Acartia tonsa* Dana): effects of temperature, salinity and anoxia. En: Aquaculture Research [En línea]. 2006. Vol. 37, n° 6. p. 625-631. DOI 10.1111/j.1365-2109.2006.01472.x

HOLSTE, Linda & PECK, Myron A. The effects of temperature and salinity on egg production and hatching success of Baltic *Acartia tonsa* (Copepoda: Calanoida): A laboratory investigation. En: Marine Biology [En línea]. 2006. Vol. 148. p. 1061-1070. ISBN 0025-3162. DOI 10.1007/s00227-005-0132-0

HOLSTE, Linda, PECK, Myron A & JOHN, Michael A St. The influence of temperature, salinity and feeding history on population characteristics of Baltic *Acartia tonsa*: Egg production, hatching success and cohort development. 2004.

INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO. Estación de acuicultura marina de Bahía Málaga [En línea]. [Consultado el 5 de febrero de 2020]. Disponible en: <https://www.ica.gov.co/getdoc/3afe60d1-e0ee-4b3a-97bf-8f13287c4691/estacion-de-acuicultura-marina-de-bahia-malaga.aspx>

JEPSEN, Per M. BJØRBÆK, Niels S. RAYNER, Thomas A. VU, Minh T.T. HANSEN, Benni W. Recommended feeding regime and light climate in live feed cultures of the calanoid copepod *Acartia tonsa* Dana. En: Aquaculture International [En línea]. Springer International Publishing. 2017. Vol. 25, n° 2. p. 635-654. DOI 10.1007/s10499-016-0063-4

JEREZ-GUERRERO, Mauricio, CRIALES-HERNÁNDEZ, María I & GIRALDO, Alan. Copépodos epipelágicos en Bahía Cupica, Pacífico colombiano: composición de especies, distribución y variación temporal. En: Biología tropical. 2017. Vol. 65, n° 3. p. 1046-1061. ISBN 0034-7744

JOHNSON, J.K. Effects of temperature and salinity on production and hatching of dormant eggs of *Acartia californiensis* (copepoda) in an Oregon Estuary. En: Fishery Bulletin. 1980. Vol. 77, n° 3. p. 567-584.

JØRGENSEN, Tue Sparholt. JEPSEN, Per Meyer. PETERSEN, H. Cecilie B. FRIIS, Dennis Steven. HANSEN, Benni Winding. Eggs of the copepod *Acartia tonsa* Dana require hypoxic conditions to tolerate prolonged embryonic development arrest. En: BMC Ecology [En línea]. BMC. 2019. Vol. 19, n° 1. p. 1-9. DOI 10.1186/s12898-018-0217-5

KWOK, Kevin W.H. SOUSSI, Sami. DUR, Gael. WON, Eun Ji. LEE, Jae Seong. Copepods as References Species in Estuarine and Marine Waters. En: Aquatic Ecotoxicology: Advancing Tools for Dealing with Emerging Risks [En línea]. Elsevier Inc. 2015. p. 281-308. DOI 10.1016/B978-0-12-800949-9.00012-7

LAVENS, Patrick et SORGELOOS, Patrick. Manual on the production and use of live food for aquaculture. Fao Fisheries Technical Paper. 1996. Vol. 361. 295 p. ISBN 9788578110796. DOI 10.1017/CBO9781107415324.004

MAJID, Shayegan. FEREIDOUNI ABOLGHASEM, Esmaeili. Naser, Agh. KHALILI KHOSROW, Jani. Effects of salinity on egg and fecal pellet production, development and survival, adult sex ratio and total life span in the calanoid copepod, *Acartia tonsa*: a laboratory study*. En: Chinese Journal of Oceanology and Limnology [En línea]. 2016. Vol. 34, n° 4. p. 709-718. DOI 10.1007/s00343-016-5030-4

MARCUS, Nancy H. Calanoid Copepods, Resting Eggs, and Aquaculture. Dans: Copepods in Aquaculture [En línea]. En: Blackwell Publishing Professional. 2007. p. 3-10. ISBN 0813800668. DOI 10.1002/9780470277522.ch1

MARSHALL, Sheina M. Respiration and feeding in copepods. En: Advances in Marine Biology [En línea]. 1973. Vol. 11. p. 57-120. DOI 10.1016/S0065-2881(08)60268-0

MEDELLÍN-MORA, Johanna & NAVAS, Gabriel. Listado taxonómico de copépodos (Arthropoda: Crustacea) del mar Caribe colombiano. En: Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras. Santa Marta, Colombia: Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras José Benito Vives de Andréis - Invemar. 2010. Vol. 39, n° 2. p. 265-306. ISBN 0122-9761

MILIONE, Michael & ZENG, Chaoshu. The effects of temperature and salinity on population growth and egg hatching success of the tropical calanoid copepod, *Acartia sinjiensis*. En: Aquaculture [En línea]. 2008. Vol. 275, n° 1-4. p. 116-123. DOI 10.1016/j.aquaculture.2007.12.010

MILLER, Denise D. & MARCUS, Nancy H. The effects of salinity and temperature on the density and sinking velocity of eggs of the calanoid copepod *Acartia tonsa* Dana. En: Journal of Experimental Marine Biology and Ecology [En línea]. 1994. Vol. 179, n° 2. p. 235-252. DOI 10.1016/0022-0981(94)90117-1

NILSSON, Birgitte & HANSEN, Benni Winding. Timing of embryonic quiescence determines viability of embryos from the calanoid copepod, *Acartia tonsa* (Dana). En: PLoS ONE [En línea]. 2018. Vol. 13, n° 3. p. 1-16. DOI 10.1371/journal.pone.0193727

NOGUEIRA, Natacha. SUMARES, Bernardo. ANDRADE, Carlos. AFONSO, António. The effects of temperature and photoperiod on egg hatching success, egg production and population growth of the calanoid copepod, *Acartia grani* (Calanoida: Acartiidae). En: Aquaculture Research [En línea]. 2017. p. 1-11. DOI 10.1111/are.13437

OPPERT, Cris J. Effect of Diet and Low Dissolved Oxygen on Some Life History Parameters of *Acartia tonsa* (Copepoda: Calanoida). Tesis doctoral. 2006.

OHS, Cortney L., RHYNE, Andrew L. & STENN, Erik. Viability of subitaneous eggs of the copepod, *Acartia tonsa* (Dana), following exposure to various cryoprotectants and hypersaline water. En: Aquaculture [En línea]. Elsevier B.V. 2009. Vol. 287, n° 1-2. p. 114-119. DOI 10.1016/j.aquaculture.2008.10.004

PECK, Myron A. & HOLSTE, Linda. Effects of salinity, photoperiod and adult stocking density on egg production and egg hatching success in *Acartia tonsa* (Calanoida: Copepoda): Optimizing intensive cultures. En: Aquaculture [En línea]. Elsevier. 2006. Vol. 255, n° 1-4. p. 341-350. DOI 10.1016/j.aquaculture.2005.11.055

PECK, Nadine. PETERS, Janna. DIEKMANN, Rabea. LAAKMANN, Silke. RENZ, Jasmin. Interactive effects of temperature and salinity on population dynamics of the calanoid copepod *Acartia tonsa*. En: Journal of Plankton Research [En línea]. 2014. p. 1-14. DOI 10.1093/plankt/fbu093

PHAM, Thanh Day. Particle characterization and influence on the nauplii and egg production of calanoid copepod (*Acartia tonsa* Dana) in water treatment systems with and without membrane filtration. Norwegian University of Science and Technology, 2014.

SANTHOSH, B. RANJAN, R. RAJU, SS. Cost estimate and financial analysis of a medium scale copepod culture unit. En: eprints.cmfri.org.in [En línea]. 2018. p. 123. Disponible en: [http://eprints.cmfri.org.in/13376/1/Culture Techniques of Marine Copepods CMFRI.pdf#page=122](http://eprints.cmfri.org.in/13376/1/Culture%20Techniques%20of%20Marine%20Copepods%20CMFRI.pdf#page=122)

SANTHOSH, B. ANIL, M. K. ANZEER, F Muhammed. ANEESH, K. MIJO, Abraham. GOPAKUMAR, G. GEORGE, Rani Mary. GOPALAKRISHNAN, A. UNNIKRISHNAN, C. Culture Techniques of Marine Copepods [En línea]. En: Kerala: ICAR-Central Marine Fisheries Research. 2018. Disponible en:

[http://eprints.cmfri.org.in/13376/1/Culture Techniques of Mariine Copepods CMFRI.pdf#page=59](http://eprints.cmfri.org.in/13376/1/Culture%20Techniques%20of%20Mariine%20Copepods%20CMFRI.pdf#page=59)

SARKISIAN, B. LEMUS, J. & LEE, P. Large-Scale Production System for Copepods [En línea]. 2013. Disponible en: <https://www.aquaculturealliance.org/advocate/large-scale-production-system-for-copepods/>

SARKISIAN, Brie L. LEMUS, Jason T. APEITOS, Angelos. BLAYLOCK, Reginald B. Saillant, Eric A. An intensive, large-scale batch culture system to produce the calanoid copepod, *Acartia tonsa*. En: Aquaculture [En línea]. Elsevier B.V. 2018. Vol. 501. p. 272-278. DOI 10.1016/j.aquaculture.2018.11.042

STØTTRUP, Josianne G. Production and Nutritional Value of Copepods. En: Live Feeds in Marine Aquaculture [En línea]. STØTTRUP, Josianne G & MCEVOY. Lesley (Eds). Blackwell Publishing. 2007. p. 145-205. DOI 10.1002/9780470995143.ch5

STRATHMANN, R. Estimating the organic carbon content of phytoplankton from cell volume or plasma volume. En: Limnol. Oceanogr [En línea]. 1967. Vol. 12, n° 3. p. 411-418. ISBN 0024-3590. DOI 10.4319/lo.1967.12.3.0411

TAKAYAMA, Yoshiki & TODA, Tatsuki. Switch from production of subitaneous to delayed-hatching and diapause eggs in *Acartia japonica* Mori, 1940 (Copepoda: Calanoida) from Sagami Bay, Japan. En: Regional Studies in Marine Science [En línea]. Elsevier B.V. 2019. Vol. 29. p. 1-10. DOI 10.1016/j.rsma.2019.100673

TORREBLANCA, M. Loreto. PÉREZ-SANTOS, Iván. San MARTÍN, Bruno. VARAS, Eduardo. ZILLERUELO, Rodrigo. RIQUELME-BUGUEÑO, Ramiro. PALMA, Álvaro T. Seasonal dynamics of zooplankton in a northern Chile bay exposed to upwelling conditions. En: Revista de Biología Marina y Oceanografía [En línea]. 2016. Vol. 51, n° 2. p. 273-291. DOI 10.4067/S0718-19572016000200006

TROTTET, Aurore. RICHIER DE FORGES, Mathilde. MAGUET, Rémi. DRILLET, Guillaume. Optimising productivity of copepod cultures as live feed. En: AQUA Culture Asia Pacific Magazine [En línea]. 2017. Vol. 13. p. 44-46. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/319931167>

VU, M, HANSEN, B W & KIØRBOE, T. The constrains of high density production of the calanoid copepod *Acartia tonsa* Dana. En: Journal of Plankton Research [En línea]. 2017. p. 1-12. DOI 10.1093/plankt/fbx056

VU, Minh T.T., HANSEN, Benni W. & KIØRBOE, Thomas. The constraints of high density production of the calanoid copepod *Acartia tonsa* Dana. En: Journal of

Plankton Research [En línea]. 2017. Vol. 39, n° 6. p. 1028-1039. DOI 10.1093/plankt/fbx056

ZHANG, Jianshe. IANORA, Adrianna. WU, Changwen. PELLEGRINI, David. ESPOSITO, Francesco. BUTTINO, Isabella. How to increase productivity of the copepod *Acartia tonsa* (Dana): Effects of population density and food concentration. En: Aquaculture Research [En línea]. 2015. Vol. 46. n° 12. p. 2982-2990. DOI 10.1111/are.12456

ANEXOS

Anexo A. Prueba de Brand Esnedecor

n	4
n – 1	3
α	0.05
1 – α	0.95
p	0.993
q = (1 - p)	0.007

$\chi^2 c$	0.244
$\chi^2 t_{(1-\alpha)}$	7.81

Anexo B. Comparación de proporciones para adultos

Tratamiento	Promedio (%)	Diferencias estadísticas
T4	98.74	X
T1	98.24	X
T3	98.41	X
T2	98.64	X

Anexo C. Número de huevos por tratamientos, réplica y grupo.

Tratamiento	Réplica	Grupo de huevos	# huevos	Promedio	Error
1	1	Frescos	14,000	14,500	2,040
		15	16,500		
		30	13,000		
1	2	Frescos	15,200	14,733	570
		15	14,800		
		30	14,200		
1	3	Frescos	16,200	15,400	816
		15	14,800		
		30	15,200		
2	1	Frescos	14,600	14,167	1,369
		15	15,100		
		30	12,800		
2	2	Frescos	18,300	16,500	1,934
		15	16,300		
		30	14,900		
2	3	Frescos	16,400	15,800	630
		15	15,300		
		30	15,700		
3	1	Frescos	12,800	11,633	1,178
		15	11,300		
		30	10,800		
3	2	Frescos	13,200	13,100	1,983
		15	14,800		
		30	11,300		
3	3	Frescos	10,300	10,333	962
		15	9,500		
		30	11,200		
4	1	Frescos	13,400	12,267	1,133
		15	11,900		
		30	11,500		
4	2	Frescos	10,900	11,600	1,006
		15	12,600		
		30	11,300		
4	3	Frescos	11,500	11,833	1,618
		15	13,400		
		30	10,600		

Anexo D. Promedio y desviación estándar grupo huevos frescos

Grupo huevos frescos (Huevos frescos)				
Tratamientos	Promedio (%)		Desviación Estándar	Error
		(DE)		
20°C y 18 UPS	T1	97.32	0.70	0.7868
20°C y 28 UPS	T2	94.09	0.41	0.4586
26°C y 18 UPS	T3	84.59	2.36	2.6751
26°C y 28 UPS	T4	84.59	2.27	2.5641

Anexo E. Verificación de supuestos estadísticos grupo huevos frescos

Supuestos estadísticos	Prueba realizada	Valor-P	Decisión
Prueba de varianza	Levene's	0.793296	Cumple el supuesto
Prueba de normalidad	Chi-Cuadrado	0.124726	Cumple el supuesto
	Estadístico W de Shapiro-Wilk	0.111136	Cumple el supuesto
	Valor-Z para asimetría	0.836597	Cumple el supuesto
	Prueba de Grubbs'	1.0000	Cumple el supuesto
	Durbin Watson	0.9668	Cumple el supuesto

Anexo F. Análisis de varianza para grupo huevos frescos

ANOVA multifactorial						
Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón -F	Valor-P	Decisión
EFECTOS PRINCIPALES						
A = Factor 1: Salinidad	0.11791	1	0.117917	182.66	0.0000	Existen diferencias significativas
B = Factor 2: Temperatura	0.00505	1	0.005052	7.83	0.0233	Existen diferencias significativas
INTERACCIONES						
AB	0.00505	1	0.0050577	7.83	0.0232	Existen diferencias significativas
Entre grupos (Tratamientos)	0.12802	3	0.0426754	66.11	0.0000	Existen diferencias significativas
RESIDUOS	0.00516	8	0.0006455			
TOTAL (CORREGIDO)	0.13319	11				

Anexo G. Prueba de Tukey HSD para grupo huevos frescos

Prueba de Tukey HSD					
Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos		
3	3	1.168	X		
4	3	1.168	X		
2	3	1.325		X	
1	3	1.407			X

Anexo H. Tabla de promedios grupo 15 y 30 días de almacenamiento

Tratamientos		Promedio (%)	Desviación Estándar (DE)	Error	Diferencias estadísticas
18 UPS + 20°C + 15 Días	T1	56.44	5.34	6.0404	a
18 UPS + 26°C + 15 Días	T2	14.50	2.32	2.6224	b
28 UPS + 20°C + 15 Días	T3	77.78	3.13	3.5467	c
28 UPS + 26°C + 15 Días	T4	21.96	3.23	3.6514	d
18 UPS + 20°C + 30 Días	T5	18.45	0.45	0.5061	bd
18 UPS + 26°C + 30 Días	T6	3.00	0.11	0.1201	e
28 UPS + 20°C + 30 Días	T7	20.26	2.64	2.9820	bd
28 UPS + 26°C + 30 Días	T8	3.91	0.80	0.9036	e

*Letras diferentes muestran diferencias estadísticas significativas

Anexo I. Verificación de supuestos estadísticos para 15 y 30 días de almacenamiento

Supuestos estadísticos	Prueba realizada	Valor-P	Decisión
Prueba de varianza	Levene's	0.8175	Cumple el supuesto
Prueba de normalidad	Chi-Cuadrado	0.0001	No cumple el supuesto
	Estadístico W de Shapiro-Wilk	0.0032	No cumple el supuesto
	Valor-Z para asimetría	0.2098	Cumple el supuesto
	Prueba de Grubbs'	0.9321	Cumple el supuesto
Prueba de independencia	Durbin Watson	0.1204	Cumple el supuesto

Anexo J. Análisis de varianza Grupo 15 y 30 días de almacenamiento

ANOVA multifactorial						
Fuente	Suma de Cuadrados	G I	Cuadrad o Medio	Razón -F	Valor- P	Decisión
EFFECTOS PRINCIPALES						
A:Factor 1	0.04072	1	0.04072	38.3	0.00000	Existen diferencias significativas
B:Factor 2	0.94991	1	0.94991	893.41	0.00000	Existen diferencias significativas
C:Factor 3	0.87172	1	0.87172	819.87	0.00000	Existen diferencias significativas
INTERACCIONES						
AB	0.00281	1	0.00281	2.64	0.12350	No existen diferencias significativas
AC	0.03974	1	0.03974	37.38	0.00000	Existen diferencias significativas
BC	0.09990	1	0.09990	93.97	0.00000	Existen diferencias significativas
ABC	0.01212	1	0.01212	11.4	0.00380	Existen diferencias significativas
Entre grupos (Tratamientos)	2.01694	7	0.28813	271	0.00000	Existen diferencias significativas
RESIDUOS	0.01701	16	0.00106			
TOTAL (CORREGIDO)	2.03395	23				

Anexo K. Prueba de Tukey HSD para Grupo 15 y 30 días de almacenamiento

Tratamiento	Casos	Media	Prueba de Tukey HSD					
			Grupos Homogéneos					
T6	3	0.174137	X					
T8	3	0.19845	X					
T2	3	0.389833		X				
T5	3	0.443988		X	X			
T7	3	0.466304		X	X			
T4	3	0.487004			X			
T1	3	0.850167				X		
T3	3	1.08053						X