

# **MASTER INTERUNIVERSITARIO EN ACUICULTURA**

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA**

**UNIVERSITAT DE VALÈNCIA**

**INTITUTO DE ACUICULTURA TORRE LA SAL (CSIC)**



## **Estudio de viabilidad de la producción de biomasa adulta de *Artemia (A. franciscana)* como alimento vivo o congelado para acuariofilia**

TRABAJO FIN DE MÁSTER

### **AUTOR:**

Joan Jordi Fornés Dieke

### **TUTORES:**

*Dr. Juan Carlos Navarro Tárrega*, Investigador Científico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Instituto de Acuicultura Torre la Sal.

*Dra. Inmaculada Varó Vaello*, Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Instituto de Acuicultura Torre la Sal.

Valencia, septiembre 2018

# MASTER INTERUNIVERSITARIO EN ACUICULTURA



## Estudio de viabilidad de la producción de biomasa adulta de *Artemia (A. franciscana)* como alimento vivo o congelado para acuariofilia

Alumno:

JOAN JORDI FORNÉS DIEKE

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Joan Jordi Fornés Dieke'.

Tutores:

DR. JUAN CARLOS NAVARRO TÁRREGA

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Juan Carlos Navarro Tárrega'.

DRA. INMACULADA VARÓ VAELLO

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Inmaculada Varó Vaello'.

## **Agradecimientos**

En primer lugar, quisiera agradecer a mis tutores Inmaculada Varó Vaello y Juan Carlos Navarro Tárrega todos esos consejos, correcciones y, en definitiva, tiempo invertido durante el transcurso del presente TFM.

Por otro lado, agradezco a mis compañeros de piso en la estancia en el IATS por su constante apoyo, ya que con ellos compartí frustraciones y situaciones de estrés, pero también alegrías y muy buenos momentos.

Me gustaría agradecer también a todo el personal técnico del Instituto de Acuicultura Torre la Sal, su paciencia y dedicación invertidas en enseñarme el funcionamiento básico de la nave de fitoplancton durante todo el transcurso del trabajo.

Por último, no puedo olvidar a mis padres y hermano quienes me han brindado un apoyo moral muy intenso en momentos tanto de frustración como de alegrías.

Gracias a todos, de verdad.



Índice de tablas	7
Índice de figuras	8-9
Resumen – Abstract	10-11
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>12-15</b>
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>16-27</b>
2.1. Prospección de mercado	16
2.1.1. Diseño de la encuesta	
2.1.2. Distribución de la encuesta	
2.2. Organismo de estudio: <i>Artemia</i>	17-26
2.2.1. Manejo de quistes de <i>Artemia</i>	17-18
• Hidratación	
• Parámetros físico-químicos	
2.2.2. Eclosión de quistes de <i>Artemia</i>	19-21
• Sin descapsular	
• Descapsulados	
2.2.3. Calidad de eclosión de quistes descapsulados vs. no descapsulados	21-22
2.2.4. Cultivo de <i>Artemia</i>	22-23
2.2.5. Dietas utilizadas en el cultivo de <i>Artemia</i>	23-24
2.2.6. Crecimiento y supervivencia	24
2.2.7. Análisis estadístico	24
2.2.8. Recolección de biomasa	25-26
2.3. Estudio económico	26-27
<b>3. RESULTADOS</b>	<b>27-40</b>
3.1. Prospección de mercado	27-28
3.2. Estudios de producción de biomasa adulta de <i>Artemia</i>	29-38
• Comparaciones del rendimiento de las dietas en volúmenes de cultivo de 3 y 20L	
• Comparaciones del rendimiento de las dietas en volúmenes de cultivo de 40L	
• Comparación del rendimiento de <i>T. suecica</i> en volúmenes de cultivo de 40, 60 y 80L	
• Comparación del rendimiento de <i>T. suecica</i> en 3 ensayos con un volumen de cultivo de 80L	
• Supervivencia	
• Porcentajes, tasa y eficiencia de eclosión	
• Almacenaje de <i>Artemia</i>	
3.3. Estudio económico	39-40
• Costes de producción	
<b>4. DISCUSIÓN</b>	<b>40-45</b>
4.1. Prospección de mercado	40-41
4.2. Producción de biomasa	41-45
• Eclosión	
• Alimentación	
• Producción de biomasa	
4.3. Estudio económico	45

<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>46</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>47-53</b>
<b>7. ANEXOS</b>	<b>54-57</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 2.1.** Compuestos y volúmenes utilizados para la descapsulación de 200g de quistes secos.

**Tabla 2.2.** Fórmulas utilizadas para calcular y preparar la solución descapsuladora.

**Tabla 3.1.** Estado de madurez de las poblaciones de *A. franciscana* cultivadas en volúmenes a 40,60 y 80L.

**Tabla 3.2.** Estado de madurez de la población de *A. franciscana* cultivadas en diferentes ensayos en un volumen de 80L.

**Tabla 3.3.** Supervivencia de las poblaciones de *A. franciscana* alimentadas con diferentes dietas y cultivadas a 3 y 20L.

**Tabla 3.4.** Supervivencia de las poblaciones de *A. franciscana* cultivadas en volúmenes de 40, 60 y 80L, y de los tres ensayos en un volumen de 80L.

**Tabla 3.5.** Supuestos llevados a cabo en el estudio económico.

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 2.1.** Diagrama del efecto de la temperatura en el proceso de eclosión de los quistes de *A. franciscana* para los valores comprendidos entre -20°C y 40°C. (FAO)

**Figura 2.2.** Detalle del montaje utilizado para la eclosión de los quistes de *A. franciscana*.

**Figura 2.3.** Cilindros de cultivo de *A. franciscana* alimentados con: de izquierda a derecha, liofilizado de *Chlorella sp.*, pasta concentrada de *Nannochloropsis sp.*, *Tetraselmis suecica* viva y congelada.

**Figura 2.4.** Frascos de cultivo con 50mL de agua verde (*T. suecica* a 300.000 cel./mL) y con 50 y 100 individuos adultos de *A. franciscana*.

**Figura 2.5.** Pruebas de congelación a -20°C: A) Biomasa de *Artemia* en cubitera, B) Placa de 60g de biomasa de *Artemia*, C) Concentración de biomasa de *Artemia*, D) Tubo tipo Falcón con 15g de biomasa de *Artemia*, E) Biomasa de *Artemia* en cubitera concentrada con el método de malla y F) Biomasa de *Artemia* en placa multipocillo.

**Figura 3.1.** Efecto de la temperatura (24°C y 28°C) sobre la talla (mm) de los ejemplares *A. franciscana* alimentados con diferentes dietas y cultivados en 3L.

**Figura 3.2.** Talla (mm) de los ejemplares de *A. franciscana* para cada alimento (1 = Liofilizado de *Chlorella sp.*, 2 = Pasta concentrada de *Nannochloropsis sp.*, 3 = *Tetraselmis suecica*) y periodo de muestreo (3 días, 6 días y 10 días).

**Figura 3.3.** Talla (mm) de los individuos de *A. franciscana* para cada alimento (1 = Liofilizado de *Chlorella sp.*, 2 = Pasta concentrada de *Nannochloropsis sp.*, 3 = *Tetraselmis suecica*, 4 = *Isochrysis galbana*) y periodo de muestreo (1, 3, 6, 9 y 10 días) a 28°C.

**Figura 3.4.** Talla (mm) de los individuos de *A. franciscana* para cada periodo de muestreo (3, 7, 10, 13 y 17 días) y para cada alimento (1 = Liofilizado de *Chlorella sp.*, 2 = Pasta concentrada de *Nannochloropsis sp.*, 3 = *Tetraselmis suecica* y 4 = Concentrado de *Tetraselmis sp.* congelada) a un volumen final de 20L y temperatura ambiente de entre 24°C y 28°C.

**Figura 3.5.** Talla (mm) de los ejemplares de *A. franciscana* para cada alimento cultivados en 20L con y sin desdoble.

**Figura 3.6.** Talla (mm) para cada edad (3, 6, 10, 13 y 17 días) y para cada alimento (*T. suecica* e *I. galbana*) cultivados en 40L.

**Figura 3.7.** Talla (mm) para cada edad (3, 6, 10, 13 y 17 días) y para cada volumen de cultivo (40, 60 y 80L), alimentados con *T. suecica*.

**Figura 3.8.** Talla (mm) para cada edad (3 y 6 días) de las 3 réplicas cultivadas en 80L.

**Figura 3.9.** Talla (mm) para cada edad (3, 6, 10, 13 y 17 días) pertenecientes a las réplicas 1A y 3A.

**Figura 3.10.** Porcentaje de eclosión de los quistes de *A. franciscana* descapsulados y sin descapsular durante un periodo de 16 a 24 horas desde el inicio de la eclosión.

**Figura 3.11.** Porcentaje de eclosión de quistes de *A. franciscana* descapsulados y sin descapsular durante un periodo de 26 a 48 horas después del inicio de la eclosión.

**Figura 3.12.** Estado de la biomasa de *A. franciscana* congelada producida en el Instituto de Acuicultura Torre la Sal (IATS-CSIC).

**Figura 3.13.** Estado de la biomasa de *Artemia* congelada comercializada por “Oceans Nutriton”.

# Estudio de viabilidad de la producción de biomasa adulta de *Artemia* (*A. franciscana*) como alimento vivo o congelado para acuariofilia

J. Jordi Fornés Dieke

## Resumen

Se plantea la realización de un estudio económico y de mercado para determinar las posibilidades de producción, distribución y venta al público de biomasa de *Artemia* como alimento vivo para peces de acuariofilia. Para ello, se pretende establecer el método de producción más económico en función de las biomasas de *Artemia* requeridas, la cantidad de alimento utilizado para producirlas, las infraestructuras y energías utilizadas, así como evaluar si existe un mercado potencial para este tipo de alimento. La especie del género *Artemia* elegida para este estudio es *A. franciscana* por ser la más utilizada durante la historia de la acuariofilia para mejorar la calidad del alimento de los organismos acuáticos en sus diferentes fases de desarrollo en instalaciones de todo tipo, así como para el mantenimiento y reproducción de animales salvajes por motivos de conservación con vista a posibles reintroducciones. Durante el estudio se compararon las eficiencias en el crecimiento y supervivencia de diferentes dietas basadas en el uso de microalgas vivas (*T. suecica*, *I. galbana* y pasta concentrada de *Nannochloropsis sp.*) y de dietas inertes (liofilizado de *Chlorella sp.* y concentrado de *Tetraselmis sp.* congelado), y las eficiencias que estas dietas tendrían a diferentes volúmenes. También se quiso determinar los costes de inversión y producción que podría tener una empresa dedicada a la producción de biomasa de *Artemia* viva adulta y si sería factible este tipo de negocio. Se obtuvo como resultado que las mejores dietas en cuanto a crecimiento y supervivencia de las poblaciones de *Artemia* para una producción de biomasa eran aquellas basadas en el uso de las dos microalgas vivas (*T. suecica* e *I. galbana*) obteniéndose unas tallas de 6'746 y 7'237mm a los 17 días. También se pudo observar que a un mayor volumen de cultivo encontrábamos poblaciones de mayor tamaño y con un estado de maduración más avanzado, para un mismo tiempo de cultivo. Por otro lado, los costes de la apertura de una instalación con una producción de 1000Kg/año podría rondar los 70.000-150.000€ anuales dependiendo de si habría que crear una instalación desde cero (150.000€) o si únicamente habría que cubrir los gastos de producción, lo que permitiría alcanzar valores de precio unitario de 85-100€/Kg de biomasa viva de *Artemia* adulta.

**Palabras clave:** *Artemia franciscana*, producción de biomasa, valor económico, estudio de mercado, viabilidad.

## Abstract

The proposed research is an economic and market study to determine the possibilities of production, distribution and possible sale to the public of live food for aquarium fish. It tries to establish a feasible, economical production method depending on the required *Artemia* biomass, food used, enrichment, energy... as well as prospecting any potential market for this type of food. The species of the genus *Artemia* chosen for this study is *A. franciscana* because it is the most widely used throughout the history of aquatics to improve the quality of food for aquatic organisms in their different stages of development in facilities of all types, as well as for the maintenance and reproduction of wild animals for conservation reasons with a view to possible reintroductions. During the study, the efficiencies in the growth and survival of different diets based on the use of live microalgae (*T. suecica*, *I. galbana* and concentrated paste of *Nannochloropsis sp.*) and in the use of inert diets (lyophilized *Chlorella sp* and frozen *Tetraselmis sp.* concentrate) were compared, and the efficiencies that these diets would have at different volumes. It was also sought to determine the investment and production costs that could be incurred by a company dedicated to the production of biomass from adult living *Artemia* and whether this type of business would be feasible. As a result, the best diets in terms of growth and survival of the *Artemia* populations for biomass production were those based on the use of two live microalgae (*T. suecica* and *I. galbana*), obtaining sizes of 6'746 and 7'237mm at 17 days. It was also possible to observe that a larger crop volume causes a larger population in size and a more advanced maturation stage for the same growing time. On the other hand, the costs of opening an installation with a production of 1000Kg/year could be around 70.000-150.000€ per year, depending on whether it would be necessary to create an installation from scratch (150.000€) or whether it would only be necessary to cover the production costs, which would allow us to reach unite price values of 85-100€/Kg of living adult *Artemia* biomass.

**Keywords:** *Artemia franciscana*, production, biomass, economic value, market, feasibility.

# 1. Introducción

Para el cultivo de especies de interés comercial de peces y crustáceos marinos, tanto a nivel gastronómico como de acuariofilia, ha de recurrirse obligatoriamente a la obtención de sus formas larvianas (proceso conocido como larvicultura). La captura de las larvas del medio natural es una práctica insostenible que supone grandes inconvenientes, como son, los elevados costos económicos causados por la localización, extracción y clasificación de las larvas provenientes del zooplancton marino, o la sobreexplotación de futuros recursos pesqueros, ya que podría dar lugar al agotamiento de las reservas larvianas del medio natural. A partir de esto se deduce la necesidad, de las industrias de la acuicultura y acuariofilia, del mantenimiento en cautividad de stocks de adultos reproductores de las especies de interés comercial, los cuales, con el control de todas sus necesidades permitirán la obtención de sus puestas de donde obtendremos las larvas correspondientes. Una vez obtenidas, comenzará la fase de cultivo de las mismas en la que hay que cubrir correctamente sus necesidades nutricionales para permitir el correcto crecimiento y desarrollo de los individuos, lo que aumentará su supervivencia y reforzará su sistema inmune frente a patologías.

Las redes tróficas que se establecen en los hábitats marinos y dulceacuícolas son muy complejas y diversas, en las que el alimento natural de las larvas de especies de interés comercial son el fitoplancton y el zooplancton. El intento de captura de estos organismos del medio natural acarrea los mismos problemas económicos y logísticos que los nombrados anteriormente para las larvas, por lo que el desarrollo de la acuicultura y acuariofilia se ha basado en el uso de una red trófica artificial que imite la natural. Inicialmente, la imitación de esta red trófica venía dada por el cultivo en mesocosmos de varias especies de fitoplancton y de zooplancton en diferentes estadios (larvas, juveniles y adultos). A diferencia de lo anterior, en la actualidad la imitación de estas redes pasa por la producción de monocultivos de fitoplancton y zooplancton como pueden ser los cultivos de rotíferos, copépodos, cladóceros, etc..., pero el género de zooplancton que más destaca con diferencia a nivel de producción y utilización masiva en la industria, es el crustáceo *Artemia*, conocido también como camarón salado o "brine shrimp" (branquiópodo anostráceo) en todas sus estadios de desarrollo.

El primer eslabón de estas cadenas tróficas viene dado por el cultivo a gran escala de algunas especies de microalgas. Estas sirven de alimento para el cultivo masivo de las especies de zooplancton utilizadas en la alimentación larvaria, como serían los casos de los rotíferos y de la *Artemia*. Además, *Artemia* también se emplea en la alimentación de especies de interés comercial, tales como algunos peces con larvas fitófagas o algunos crustáceos, los cuales requieren de alimentación viva con tamaños comprendidos entre 5 y 20 $\mu$ m. Las especies de fitoplancton cultivadas hoy en día son muy diversas y presentan orígenes diferentes (dulceacuícolas, marinos o hipersalinos), lo que permite elegir la más adecuada dependiendo de la especie a alimentar. En cuanto al segundo eslabón de esta cadena trófica artificial, se utilizan los rotíferos y *Artemia*. Los rotíferos son pequeños metazoos de entre 80 y 250 $\mu$ m de longitud, presentan la talla idónea para la alimentación de las primeras fases larvianas de la mayoría de especies comerciales de peces y crustáceos (Barnabé & René, 1972). Estos organismos presentan un fácil manejo y una tasa reproductiva muy elevada que permite alcanzar densidades de 300 individuos/mL. La especie de rotífero más conocida y cultivada en la acuicultura marina es *Brachionus plicatilis* (Müller, 1786) (Theilacker & McMaster, 1971; Barnabé & René, 1973). En el caso de *Artemia*, sus primeras fases larvianas, también conocidas como nauplios, son las más utilizadas en larvicultura; sin embargo, en acuariofilia también se emplean los ejemplares adultos. El hábitat natural de las especies pertenecientes a este género son los ecosistemas hipersalinos (entre 80 y 150ppm encuentran la salinidad idónea), tanto costeros como continentales, para los que está expresamente adaptado y en los que no encuentra prácticamente depredadores. Además, las poblaciones de *Artemia* se pueden

encontrar en este tipo de ecosistemas alrededor de todo el mundo (Vanhaecke *et al.*, 1987; Triantaphyllidis *et al.*, 1998).

*Artemia* tiene dos modalidades reproductivas, la primera, conocida como bisexual (anfígónica), donde encontramos a machos y hembras, y la segunda, como partenogenética (telítoca), donde únicamente se encuentran hembras. Indistintamente de cuál de estas dos modalidades presenten, también tienen dos estrategias reproductivas, una ovovivípara, en la que el embrión se desarrolla hasta la primera fase larvaria (INSTAR I) dentro del ovisaco de las hembras, y otra ovípara, donde se produce la interrupción del desarrollo normal del embrión (fase de blástula avanzada) y se genera una envoltura externa de resistencia llamada corion capaz de soportar bruscas variaciones ambientales, dando lugar a los quistes de resistencia (huevos císticos). Los quistes, después de un periodo de deshidratación severa, entran en estado de letargia en la que pueden permanecer mucho tiempo, manteniendo la capacidad de, en condiciones adecuadas, rehidratarse y eclosionar para generar nauplios en un breve lapso de tiempo. Los quistes son fáciles de recolectar, ya que suelen quedar acumulados en las orillas de lagos salados y salinas a causa de las corrientes de viento, y presentan una sencilla conservación y almacenaje para su uso en cualquier momento de necesidad. Las condiciones idóneas para el mantenimiento de la viabilidad de los quistes pasan por mantenerlos a baja temperatura, en oscuridad, en condiciones de anoxia. Además, la obtención de los nauplios por medio de la eclosión de los quistes es una tarea sencilla (apartado 2.2.2). Estas características han hecho que *Artemia* se convierta en el alimento vivo más utilizado en el cultivo larvario, así como en el mantenimiento de especies muy exigentes en acuarios recreacionales (Sorgeloos *et al.*, 2001).

Además, hay otros factores que hacen que *Artemia* sea un alimento adecuado para la alimentación en vivo de la larvicultura y la acuariofilia. Entre ellos podemos encontrar en primer lugar, el tamaño medio que presentan los nauplios recién nacidos (400 - 600µm) es perfecto para la alimentación de larvas de pequeño tamaño de peces y crustáceos; en segundo lugar, presentan una cutícula extremadamente delgada que permite su digestibilidad; en tercer lugar, la presencia de movimiento constante y la ausencia de una respuesta de huida ante posibles depredadores hace que sean muy fáciles de capturar por parte de las larvas; y por último, también presenta un color llamativo (naranja) y una muy buena palatabilidad. Actualmente, hay otras alternativas al uso de *Artemia* disponibles en el mercado como los microencapsulados, que normalmente se combinan con biomasa de *Artemia* adulta congelada, liofilizada (Serflig *et al.*, 1974; Carlberg & VanOist, 1975; Beck, 1979; Schauer *et al.*, 1979) o viva. Pero, aun así, es necesario el uso de nauplios vivos como alimento en larvicultura y en el mantenimiento de ciertas especies de acuariofilia (Rottman *et al.*, 1991; Person Le Ruyet *et al.*, 1993; Sorgeloos *et al.*, 2001; Monroig *et al.*, 2003, 2006).

El primer uso registrado de *Artemia* como alimento vivo para peces, se llevó a cabo por Seale (1933) y Rollesfen (1939) durante los años 30, los cuales se dieron cuenta del potencial que tenía la *Artemia* como alimento vivo para la cría de peces o para la reducción del estrés de peces de acuariofilia. A partir de los años 50 fue cuando empezaron a surgir las primeras empresas de explotación de quistes, las cuales se ubicaron principalmente de la zona de San Francisco Bay (SFB, California, USA) y del Great Salt Lake (GSL, Utah, USA) y comercializaban los quistes a un precio bastante reducido de 10 US\$ el kilogramo (Bengtson *et al.*, 1991). Durante los siguientes años, la demanda de quistes se disparó generando pequeñas crisis debido a la irregularidad en las cosechas y a la falta de optimización de las explotaciones poniendo en cuestión si la falta de *Artemia* como presa viva para el mantenimiento de peces carnívoros sería un factor limitante en el desarrollo del sector acuícola (Sorgeloos, 1979). Fue en este periodo en que hubo un movimiento a escala internacional para empezar a prospectar nuevos lugares para la producción de *Artemia*, y optimizar los procesos industriales de recolecta y procesado de los quistes. Durante los años 80, surgieron y se adoptaron nuevos métodos para manipular el proceso de eclosión de los quistes y evaluar la composición nutricional de los nauplios. Alrededor del mismo

periodo se realizó un importante cambio en las tecnologías de recolección en el Great Salt Lake, pasándose a recolectar los quistes de la superficie del lago en vez de la recolección en las orillas del mismo. Además, se combinó con la observación aérea, lo que resultó en un incremento de la comercialización en un factor de 10 (>200 T/año de producto procesado) y una mejora en la calidad de eclosión. En consecuencia, desde mediados de los 80 en adelante, los quistes provenientes del GSL dominaban el mercado, cubriendo el 90% de la demanda mundial. El 10% restante de la demanda mundial fueron provistos por ciertas salinas y lagos salados localizados en el Norte y Centro de China, Sur de Siberia, San Francisco Bay, Sur de Vietnam, Colombia y Noreste de Brasil, las cuales presentaban una producción limitada o limitaciones en las capacidades de recolección y procesado. Este hecho no significó mucho a un nivel de mercado internacional, pero si cubrió las necesidades y permitiendo un mayor desarrollo a nivel local. En la década de los 90, el consumo de quistes seguía incrementando exponencialmente, llegándose a finales de la década a cubrir demandas de más de 2.000 toneladas anuales. Aproximadamente el 85% del total de ventas en esta época eran adquiridas por “hatcheries” de camarones y otros crustáceos, y el excedente era adquirido por las “hatcheries” de peces y el mercado de la acuariología. Pero, en 1994 y 1995 hubo otro periodo de producción escasa en el GSL, lo que se reflejó en una temporal pero severa escasez de quistes (Sorgeloos & Stappen, 1995), lo que incrementó el precio, llegándose hasta los 100 US\$ por quilogramo de quistes. Esto provocó un estado de alerta en la industria de la acuicultura que dio lugar a que a finales de los años 90 se empezaran a buscar nuevamente, y en algunos casos inocular, nuevos lugares para la obtención de quistes, principalmente en localidades del Centro de Asia (Lago Urmia en Irán, Lago Aibi en China, Bolshoye Yarovoye en Siberia, ciertos lagos de Kazakstán y Kaza Bogaz Gol en Turkmenistán) y de lagos salados en Argentina (Lavens & Sorgeloos, 2000).

Basar la alimentación viva de los cultivos larvarios y acuarios ornamentales en el uso de *Artemia* ha provocado diversas crisis en el sector a lo largo del tiempo. A principios de la década de los 70 se empezó a observar una elevada mortalidad en los cultivos larvarios tanto de crustáceos como de peces alimentados con nauplios de *Artemia* procedente de diversos orígenes geográficos (Shelbourne, 1968; Reeve, 1969; Bookhout & Costlow, 1970; Wickins, 1972; Matsuoka, 1975). A partir de ese momento se iniciaron investigaciones muy exhaustivas para analizar la calidad nutricional que presentaban los nauplios de *Artemia* obtenidos de quistes de diferentes localidades. Pero no fue hasta el final de la década de los 70 que empezó a esclarecerse el problema, ya que los trabajos de varios grupos de investigación señalaban la necesidad de añadir microalgas en los cultivos de producción de *Artemia*, y en los cultivos larvarios y en acuarios recreacionales para mejorar la supervivencia de estos (Wickins, 1972; Fujita *et al.*, 1980; Watanabe *et al.*, 1980). Así es como empezó a relacionarse la malnutrición de las larvas de peces y crustáceos con las elevadas mortalidades registradas; y ésta con la ausencia o escasez de ciertos ácidos grasos poliinsaturados esenciales en los nauplios de *Artemia* para el correcto desarrollo de animales marinos (Schauer *et al.*, 1980; Watanabe *et al.*, 1980, 1988; Fujita *et al.*, 1980; Lèger *et al.*, 1986). A partir de estos estudios se estableció una diferenciación entre dos grandes tipos de *Artemia* según su composición lipídica: los de “tipo dulceacuícola”, caracterizados por ser poblaciones que presentaban altos niveles de LNA (ácido linolénico, 18:3n-3) y escasez o completa ausencia de EPA (ácido eicosapentaenoico, 20:5n-3), y los de “tipo marino”, los cuales presentaban una cantidad de LNA escaso y una abundancia en EPA. Los animales marinos requieren de ciertos ácidos grasos esenciales poliinsaturados de cadena larga como son el LA (ácido linoleico, 18:2n-6), LNA (ácido linolénico, 18:3n-6), EPA (ácido eicosapentaenoico, 20:5n-3) y DHA (ácido docosahexaenoico, 22:6n-3), para su correcto desarrollo como adultos (Yone, 1975; Kanazawa *et al.*, 1979; Watanabe, 1982). Hoy en día sabemos que los nauplios de *Artemia* no contienen en su perfil lipídico DHA, y presentan un escaso o nulo contenido de EPA (Lèger *et al.*, 1986; Navarro, 1990; Navarro *et al.*, 1991). Es por esto que se han desarrollado ciertos procedimientos para el enriquecimiento de *Artemia* y otros organismos del zooplancton para solucionar estas deficiencias nutricionales a la hora de alimentar peces de acuariofilia o durante los cultivos larvarios. El enriquecimiento no es más que vehicular ciertas sustancias de interés nutricional

para las larvas mediante el uso de alimento vivo, como son los nauplios de *Artemia*, y que sigue en proceso de optimización (Kashiwakura et al., 1994; Cook et al., 2003; Tlulsty et al., 2005; Monroig et al., 2003, 2006).

A lo largo de los últimos años, tanto la acuariología como la acuicultura han experimentado avances vertiginosos debido al desarrollo de nuevas tecnologías y a la optimización de las metodologías de trabajo, pero sigue habiendo la misma dependencia de quistes y biomas de *Artemia* viva del medio natural que en el pasado, a pesar de haber conseguido el funcionamiento de ciertas dietas inertes o la optimización de otros tipos de cultivos de presas vivas.

Hoy en día el recurso de quistes de *Artemia* sigue siendo escaso para la demanda de la acuicultura y la acuariofilia. Las consecuencias principales de esta situación son el excesivo crecimiento de los precios, la baja calidad del producto, la incertidumbre sobre la diversidad y origen de los quistes, además de problemas en los métodos de procesado y envasado de los mismos. Todo esto provoca que exista una falta de garantía sobre la calidad de los quistes, en términos de viabilidad tras un tiempo prolongado de almacenaje, de uniformidad del tamaño naupliar y de estándares de composición lipídica (HUFA), que son claves para una correcta alimentación de las larvas de especies marinas principalmente. Actualmente sigue existiendo la necesidad de prospectar de una manera adecuada los biotopos hipersalinos en todo el planeta para poder encontrar poblaciones de *Artemia* que se puedan explotar de forma sostenible como fuente de quistes o biomasa, y que asegure su idoneidad en términos de calidad para la industria acuícola (Lavens & Sorgeloos, 2000; Cohen et al., 1999a; Van Stappen, 2005).

## Objetivos

Los objetivos planteados y llevados a cabo durante el transcurso de este trabajo fueron:

- Determinar las posibilidades de producción, distribución y venta de biomasa de *Artemia* viva adulta para el mantenimiento de peces de acuariofilia.
- Evaluar la posible existencia de un mercado potencial para este tipo de alimento.
- Establecer el método de producción de biomasa de *Artemia* viva adulta más económico en función de la biomasa requerida.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1. Prospección de mercado

Para determinar el grado de interés y/o aceptación en la compra de biomasa de *Artemia* viva o congelada en el sector de la acuariofilia, se procedió a diseñar y distribuir una encuesta especialmente planeada para cubrir estas incógnitas.

La encuesta se diseñó con ayuda de la plataforma especializada [www.onlineencuestas.com](http://www.onlineencuestas.com), ya que cuenta con una gran variedad de encuestas prediseñadas que pueden ser preseleccionadas y modificadas según las necesidades del producto analizado. Sin embargo, en este estudio fue necesario diseñar una encuesta específica para analizar todas las necesidades de este sector.

Además de la encuesta se realizaron reuniones informativas con los representantes de distintas asociaciones/empresas a los que se les suministraron muestras gratuitas de *Artemia* viva para su uso en tienda y/o para la distribución entre sus clientes.

#### 2.1.1. Diseño de la encuesta

Las 16 preguntas presentes en la encuesta fueron pensadas para intentar poder dar respuesta a la mayoría de las cuestiones que iban surgiendo a lo largo del desarrollo del estudio; tales como: las necesidades de alimento vivo/congelado para sus acuarios, conocimientos sobre los alimentos utilizados, cantidades requeridas y opiniones sobre los posibles métodos de contacto entre proveedor y clientes. La mayoría de preguntas eran de contestación obligatoria, con respuesta única o múltiple, en cambio las preguntas relacionadas con la estimación de cantidades de alimento requeridas fueron opcionales debido a la subjetividad a la que estaban sujetas las respuestas, al no encontrar ningún tipo de medida de cantidad de alimento estandarizado, sino que cada alimento se cuantificaba de maneras muy dispares dependiendo del tipo utilizado y del productor que la comercialice.

#### 2.1.2. Distribución de la encuesta

Una vez finalizado el diseño de la encuesta, el programa generaba un enlace (<https://www.onlineencuesta.com/s/f21b233>) el cual facilitaba la difusión online de la misma. La encuesta se publicó en un total de 22 grupos de Facebook y 2 foros web: CG Club Guppy.Com, Club Guppy España, Intercambio de Corales España, Mercadillo Pequeños Océanos Acuariofilia Marina (España), Reef Marino España, Acuarios Marinos en España, Grupo Discus Llevant, Peces Disco España Sin Límites, Gala Discus, Pez Disco España, Sociedad Acuariofilia Valenciana, Acuarios y Gambarios España, Amigos España Marino&Reef, Reef Life Spain Acuarios Marinos-Ventas-Cambios-Ayuda, Adicto a los Acuarios (Oficial), Amigos de los Discos y Peces Ángel España, Pez Disco Vlc, Grupo de Acuariofilia Marinos, Asociación de Acuariofilia Marina Comunidad Valenciana, MisPeces y TodoMarino.

Para obtener el permiso de publicación por parte de los administradores en los grupos de Facebook y foros se redactó un breve texto de presentación explicando los objetivos de la encuesta y se solicitó la participación de todo aquel que pudiese estar interesado, destacando que la participación y el tratamiento de los resultados obtenidos iban a ser completamente anónimos.

## 2.2. Organismo de estudio: *Artemia*

### 2.2.1. Manejo de quistes de *Artemia*

Los procesos de eclosión de los quistes de *Artemia* han sido estudiados a lo largo de los años por muchos investigadores que han permitido estandarizar una metodología sencilla para la reactivación del metabolismo en diapausa de los quistes y la producción de nauplios mediante la incubación de estos en agua marina. Sin embargo, cuando se intenta trabajar a gran escala para la producción de biomasa a partir de la eclosión de altas cantidades de quistes, existen parámetros fisicoquímicos críticos que deben ser controlados para poder alcanzar la máxima eficiencia de eclosión, aunque puedan haber ligeras diferencias según sea el origen de los quistes.

#### *Hidratación*

Es el primer paso para la correcta eclosión de los quistes, es decir, este proceso es el que provoca que éstos tomen una forma esférica y reactiven su metabolismo desactivando la diapausa, producida durante la deshidratación. La hidratación completa de los quistes se logra al cabo de haberlos incubado durante 2 horas en agua dulce o de baja salinidad y a una temperatura de 25°C-28°C.

#### *Parámetros físico-químicos*

Durante la eclosión de los quistes es importante controlar ciertos parámetros físico-químicos en el medio como la temperatura, la salinidad, el pH, el oxígeno y la luz, así como la densidad de quistes en el medio.

La temperatura, como en todo proceso bioquímico, determina la velocidad a la que estos se llevan a cabo. Por tanto, un aumento moderado de la temperatura acelera el proceso de eclosión de los quistes, considerándose los 25°C-30°C como una temperatura óptima para este proceso. Una temperatura inferior a 25°C provoca una eclosión muy ralentizada, y un aumento excesivo de la misma (>30°C) causa la inactivación de estos debido a la interrupción del metabolismo de los embriones, siendo esto reversible si el aumento no es demasiado prolongado, de lo contrario el quiste se volverá inviable. Así, mantener una temperatura constante alrededor de 28°C en el medio de eclosión favorece una máxima producción de nauplios en fase INSTAR I.

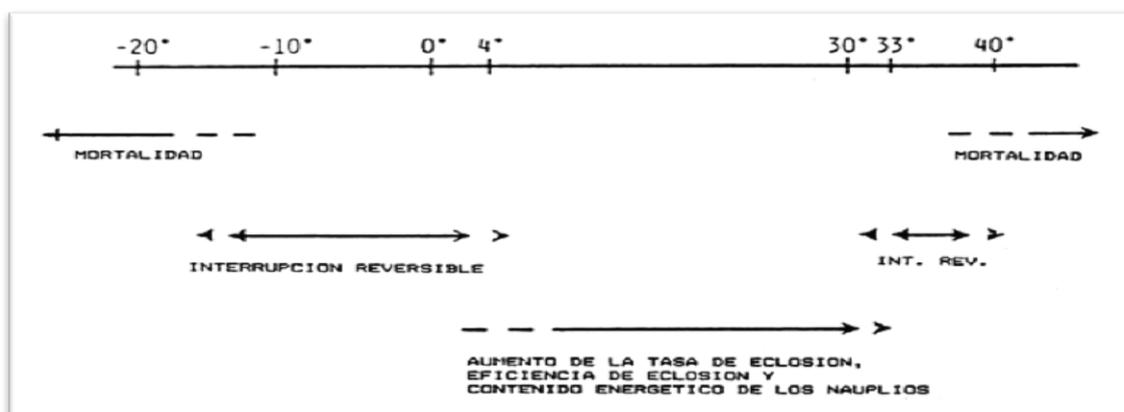


Figura 2.1. Diagrama del efecto de la temperatura en el proceso de eclosión de los quistes de *A. franciscana* para los valores comprendidos entre -20° y 40°C. (FAO)

Es esencial tener una iluminación constante de unos 2000 lux en la fase de hidratación y/o durante la incubación de los quistes para maximizar la eficiencia de eclosión (Sorgeloos, 1973).

En general, para la eclosión de los quistes de *Artemia* se utiliza agua de mar natural o artificial, con una salinidad comprendida entre 33 y 38‰. Sin embargo, se ha demostrado que a salinidades inferiores, alrededor de 25-30‰ incrementa la eficiencia de eclosión dependiendo de la procedencia de los quistes con los que se trabaja. Esto se debe a que, al haber un menor cambio de salinidad entre el interior del quiste y el medio en el que se encuentra, hay una menor presión osmótica a la cual se expone el quiste, con lo que el embrión no tendrá que sintetizar tanta glicerina para romper el corion y nacer, traduciéndose en un menor gasto energético y por tanto una mejor calidad nutricional del nauplio recién nacido (Clegg, 1964).

El pH idóneo para la eclosión de los quistes se encuentra entre 8-9, lo cual coincide con el rango de pH normal que presenta el agua de mar (alrededor de 8). Mantener el pH es importante debido a que existen pruebas de que los complejos enzimáticos encargados de facilitar la eclosión presentan su pico de actividad en este rango de pH de 8-9 (Sato, 1967). Pero se debe tener en cuenta que intentar eclosionar cargas muy elevadas de quistes (g/L) o diluir el agua para reducir la salinidad del medio de incubación puede provocar una acidificación del mismo, siendo necesario añadir carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) para mantener el medio tamponado a pH 8 (50mg/L).

En cuanto al oxígeno, la concentración recomendable para una correcta eclosión debe estar cerca de la saturación. Esto se consigue mediante una aireación intensa del medio dentro del tubo de eclosión, para la oxigenación del mismo y, además, la agitación de los quistes para evitar que precipiten y se acumulen en el fondo.

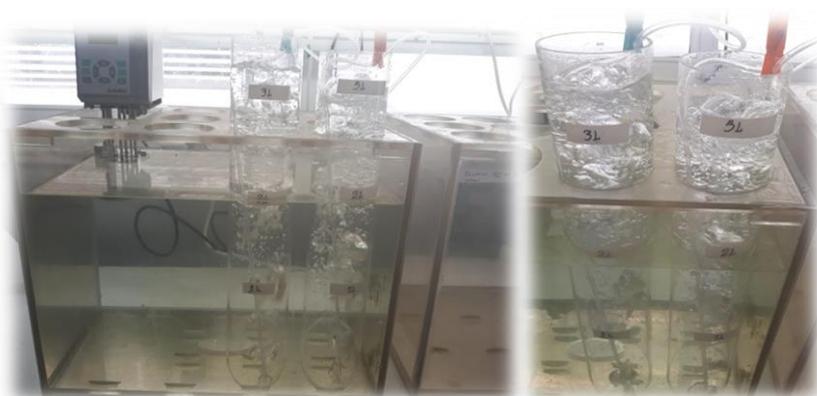


Figura 2.2. Detalle del montaje utilizado para la eclosión de los quistes de *A. franciscana*.

Otro parámetro a tener en cuenta es la densidad de siembra de los quistes, ya que puede influir en la eficiencia de eclosión. Es la cantidad de quistes por litro (g/L) que se añaden al de eclosión (3L), ya que un exceso en la cantidad de los mismos provoca una disminución del oxígeno en el agua y, por ende, una menor eficiencia en la eclosión. Es recomendable no superar los 5g/L de quistes, e ir aumentando la densidad de este conforme aumente el volumen de eclosión.

### 2.2.2. Eclosión de quistes de *Artemia*

En este estudio se utilizaron quistes comerciales (referencia EG-GLS) de la especie *A. franciscana*, suministrados por INVE Aquaculture (Bélgica) y comercializados en España por Acuazul (Cádiz).

#### *Sin descapsular*

Una cantidad conocida de quistes deshidratados de la cepa bisexual *A. franciscana* se eclosionan en agua de mar en tubos transparentes de metacrilato de 3L de capacidad. Estos tubos, dotados de un sistema de agitación constante por burbujeo de aire, se dispusieron en dos tanques de 60L de capacidad, llenos de agua descalcificada para evitar incrustaciones y poder tener una visión clara del contenido de los tubos durante la eclosión. Cada tanque se dotó de un calentador termostatzado y dispuesto bajo un tubo de luz fluorescente de 2000lux para mantener la temperatura (28°C) y la iluminación constantes durante todo el periodo de eclosión. En general, en cada tubo de eclosión se colocaron 1g/L de quistes hidratados en agua de mar filtrada al 50% y a una temperatura contante de 28°C. Transcurridas 24-48h, se procedió a la recolección y limpieza de los nauplios. Esto es importante debido a que en las cáscaras vacías y quistes sin eclosionar pueden quedar restos de microorganismos que contaminan los cultivos de los nauplios. Para llevar a cabo esta operación, se detuvo la aireación de los tubos de eclosión entre 5-10min, con el fin de separar las cáscaras que flotan de los nauplios y quistes sin eclosionar que se decantan en la parte inferior del tubo. A continuación, los nauplios se recogieron en una maya de 125µm mediante sifonado, se lavaron con agua dulce y se transfirieron a una probeta de 2L con agua dulce para eliminar restos y la mayor cantidad de quistes sin eclosionar. Una vez limpios los nauplios se re-suspendieron y concentraron en una probeta con un volumen conocido de agua de mar y para estimar la densidad naupliar (nauplios/mL) antes de iniciar los cultivos (ver apartado 2.2.4)

#### *Descapsulados*

El proceso de descapsulación fue desarrollado y descrito por primera vez en Sorgeloos *et al.*, (1977) debido a que separar a los nauplios recién eclosionados de los restos de cascaras ha sido desde siempre una tarea tediosa y poco precisa en la que era prácticamente imposible conseguir una limpieza perfecta de la muestra. Además de esto, el mismo autor describió que los restos de quistes no eclosionados y cascaras podían ser ingeridos junto con los nauplios por los organismos a los que se les suministra cómo alimento provocando obturaciones en el sistema digestivo debido a que los restos, son de quitina y no son digeribles. Por otra parte, estos restos de la eclosión pueden estar cargados de bacterias, lo que podría provocar infecciones en los cultivos de larvas de peces y/o crustáceos al ser alimentados con nauplios y restos de cáscaras (Wheeler *et al.*, 1979).

Las ventajas más destacables que se pueden obtener a través de este proceso son evidentes, siendo la primera de todas, la eliminación de la cápsula que envuelve a los embriones. La eliminación de esta parte indigerible del quiste permite obtener eclosiones más limpias y de mejor calidad nutricional, ya que los nauplios no tienen que realizar un gasto energético durante el proceso de la ruptura del corion para nacer; y que además, los embriones sin eclosionar pueden servir de alimento de igual manera que los nauplios debido a que no tienen la envoltura indigerible que los protege (Léger *et al.*, 1986). Además, otra ventaja sería la desinfección total de los quistes, evitando así posibles infecciones en de cultivos larvarios alimentados con nauplios.

El proceso de descapsulación conlleva una serie de pasos muy sencillos:

En primer lugar, como ya se ha descrito con anterioridad (apartado 2.2.1), la hidratación de los quistes provoca que estos retomen una forma esférica, entre otras cosas, lo que es indispensable para una correcta descapsulación, porque permite que haya la mayor superficie de contacto posible entre la solución descapsuladora y el quiste.

En cuanto al compuesto utilizado tradicionalmente como solución descapsuladora, el hipoclorito, se puede encontrar en la lejía (NaOCl). Normalmente, la actividad o concentración real de la lejía se puede determinar fácilmente mediante la medida del índice de refracción de esta con la ayuda de un refractómetro. De este modo se puede determinar la calidad de la lejía, sabiendo si la solución es reciente y si esta se ha conservado adecuadamente. Para preparar la solución descapsuladora es necesario conocer el índice activo de la lejía (cantidad de producto activo necesario para la descapsulación de una cierta cantidad de quistes), el cual se determina respetando la proporción ideal de 0'5g lejía/1g quistes. Normalmente la actividad o concentración real de la lejía y el índice activo de la misma no son iguales, por lo que, con estos dos datos se debe determinar el volumen real de lejía necesario para la descapsulación. Por último, debe añadirse un producto de alcalinidad fuerte (NaOH) que lleve la reacción a un pH de 10 aproximadamente, ya que la reacción provoca una acidificación brusca del medio que debe ser neutralizada. La cantidad de sosa se determina sabiendo que debe añadirse 0'15g sosa/1g quistes. Hay que tener en cuenta que es necesaria una aireación constante e intensa para permitir una buena mezcla de la solución descapsuladora con los quistes y evitar que estos últimos precipiten hacia el fondo, lo que evitaría su correcta descapsulación. Además, cabe destacar que la reacción de descapsulación es exotérmica, lo que provoca que haya un aumento térmico brusco, es por esto que debe enfriarse la solución de descapsulación con hielo o agua fría para evitar que esta supere los 40°C, ya que a estas temperaturas los quistes no son viables y no eclosionarían. La descapsulación debe durar entre 5-10 minutos, sabiendo que los quistes pasarán de una coloración marrón (debido al corion) a una coloración naranja (debido al embrión). Si se excede el tiempo en reacción, los embriones pueden sufrir una pérdida de viabilidad importante disminuyendo la eficiencia de eclosión.

A continuación, se muestran dos tablas con las que se determinará las cantidades que se han de añadir de cada compuesto para obtener una buena reacción de descapsulación:

**Tabla 2.1. Compuestos y volúmenes utilizados para la descapsulación de 200g de quistes secos.**

<b>Índice de Refracción Lejía</b>	<b>Gramos de Quistes a descapsular</b>	
	<b>CÁLCULOS</b>	<b>200</b>
<b>1,359</b>		
Volumen Total	2,667	Litros
1 - Índice Activo Lejía	100	Gramos de Lejía (1)
2 - Concentración Real Lejía	148	Gramos de Lejía (2)
Volumen Lejía	0,676	Litros de Lejía
Volumen Agua de Mar	1,991	Litros Agua de Mar
Sosa	30	Gramos Sosa

Tabla 2.2. Fórmulas utilizadas para calcular y preparar la solución descapsuladora.

FORMULAS	
Volumen Total	Gramos Quistes / 75
1 - Índice Activo Lejia	Grs. Quistes / 2
2 - Concentración Real Lejia	$((\text{Índice Refrac. Lejia} * 3000) - 4003) * 2$
Volumen Lejia	Grs. Lejia (1) / Grs. Lejia (2)
Volumen Agua de Mar	Volumen Total - Volumen Lejia
Sosa	$(\text{Grs. Quistes} * 15) / 100$

En el momento en el que se deje de observar el cambio de color general de marrón a naranja y que ya no aumente la temperatura, podremos saber que la reacción está en su fase final y que probablemente el corion de los quistes esté completamente disuelto en la mayoría de ellos. Una vez llegados a este punto, se procede a realizar un copioso lavado con agua dulce. Será necesario lavar los embriones hasta que ya no se perciba ningún olor a cloro en el recipiente. Cabe destacar que existe un tratamiento de desactivación de los residuos del cloro activo que pueda haberse quedado sobre los quistes descapsulados y que no se puedan limpiar mediante el agua del lavado. Es por esto que se podrían bañar los quistes descapsulados durante menos de 1 minuto en ácido clorhídrico (0'1N), ácido acético (0'1N) o tiosulfato (0'1%). Posteriormente al baño de desactivación se lavaron con abundante agua dulce los quistes.

Una vez finalizado todo el proceso de descapsulación, los quistes hidratados y sin corion ya podrían ponerse a incubar bajo parámetros controlados (apartado 2.2.2 – sin descapsular), o si no fuese el caso, podrían almacenarse en un frigorífico entre 0°C - 4°C durante máximo una semana. Si se desea almacenar los quistes durante un periodo de tiempo mayor que una semana, habría que deshidratarlos. Esto se consigue mediante la inmersión de los quistes en una salmuera saturada de sal (150 - 200g/L), aunque hay autores que señalan cantidades de hasta 330g/L. Con esto se consigue reducir el agua celular del quiste hasta un 16 – 20%, lo que le conferirá unos meses de duración en cuanto a la eficiencia de eclosión, siempre que se almacene a una temperatura de entre 0°C – 4°C.

### 2.2.3. Calidad de eclosión de quistes descapsulados vs. no descapsulados

El cálculo de estos parámetros da una idea del estado de viabilidad de los quistes con los que se está trabajando. Entre estos encontramos el porcentaje de eclosión, el cual consiste en la determinación del número de nauplios que se pueden producir a partir de 100 quistes bajo condiciones de eclosión estándar, y la tasa de eclosión que nos indica el periodo de tiempo en el que se produce una eclosión total desde el inicio del proceso de eclosión hasta la liberación de los nauplios, en un número de intervalos de tiempo. Por otro lado, también se determinó la eficiencia de eclosión, la cual consiste en determinar el número de nauplios que se pueden obtener a partir de un gramo de quistes. Además, se discriminó entre quistes descapsulados y sin descapsular, para poder observar si existían cambios en los porcentajes y tasas de eclosión que se pudieran dar a causa del proceso de descapsulación.

Para determina la calidad de la eclosión de quistes descapsulados y no descapsulados de *A. franciscana* se separaron individualmente quistes de ambos tipos, hidratados previamente, en pocillos de una placa multipocillo de 96 pocillos con agua de mar, y se cubrieron con un parafilm perforado para evitar que la evaporación y permitir un mínimo intercambio de aire entre los pocillos y la atmosfera,

para que el oxígeno no fuera un factor limitante en el proceso de eclosión. La placa multipocillo se incubó en una cámara a 28°C durante 40h, observándose el proceso de eclosión a partir de las 14 horas de incubación cada dos horas, para determinar cuántos nauplios iban naciendo y así poder determinar cuál era el periodo óptimo de eclosión de los quistes. Cada vez que se observaba la placa se renovaba el parafilm.

#### **2.2.4. Cultivo de *Artemia***

Los cultivos de *Artemia* se realizaron en agua de mar en recipientes cilíndricos de diferente volumen dotados de aireación por burbujeo de aire para facilitar la distribución del medio y el aporte de oxígeno. La temperatura (24°C-29°C) y el fotoperiodo utilizados en los cultivos fueron ambientales propios de la época estival.

Los cultivos de *Artemia* se iniciaron con la siembra de una densidad conocida de nauplios, ya que ésta influye directamente en la supervivencia y desarrollo de los individuos. Ésta se estimó a partir de muestras de nauplios concentradas en una probeta de 1L y distribuidas uniformemente con ayuda de aireación. Para calcular la densidad (nº de nauplios/mL) se procedió a la toma de 4 sub-muestras de 250µL (evitando coger burbujas de aire), que se depositaron cada una en un pocillo de 3ml de una placa multipocillo. A continuación, se añadió un poco más de agua de mar para diluir la muestra de nauplios y unas gotas de cloroformo diluido para anestésarlos. Seguidamente, se procedió al conteo del número de nauplios en cada pocillo con la ayuda de una cuadrícula de plástico ubicada debajo de la placa para separar la base del pocillo en secciones y facilitando el trabajo. Una vez contados los nauplios, se procedió a calcular la media del nº nauplios/0'25mL (250µL), y con una regla de tres sencilla se determina el nº nauplios/mL. Para determinar el volumen necesario de siembra en los recipientes de cultivo, el cálculo se realizó mediante la fórmula:

$$\text{Concentración 1} \times \text{Volumen 1} = \text{Concentración 2} \times \text{Volumen 2}$$

Donde C1 se sustituiría por el valor de la densidad requerida en el cultivo (en nuestro caso 10 nauplios/mL), V1 se reemplazará por el volumen final de cultivo (p.ej. 40L) y C2 se sustituirá por la densidad de nauplios que haya en la probeta de inóculo de 1L del que se extrae la semilla para la siembra. Por tanto, el término a despejar es la V2, que corresponde al volumen que hay que coger de dicha probeta de 1L.

Dependiendo de la finalidad del cultivo de *Artemia* y de las instalaciones de las que se dispongan serán recomendables unas u otras densidades de siembra. Estudios previos realizados por diversos estudiantes con estancias en el IATS indican que para una producción de biomasa de *Artemia* en volúmenes de hasta 80L con una renovación del medio del 50% cada 3 días, se recomienda una densidad de siembra aproximada de unos 10 nauplios/mL. Además, como se ha observado durante el transcurso de los ensayos realizados, la densidad de cultivo debe disminuirse con el crecimiento de la población para evitar mortalidad y favorecer un mayor crecimiento. De forma general, los cultivos de *Artemia* se indicaron siempre con una densidad de 10 nauplios/mL, reduciendo la densidad a 5 nauplios/mL a los 3 días. Este procedimiento permitió llegar al final del proceso de engorde (15 días) hasta unas densidades de 0'2 individuos/mL.

Se probaron diferentes volúmenes de cultivo (3, 20, 40 y 80L) en los tubos cilíndricos de metacrilato para determinar si existía una influencia directa del volumen en el desarrollo de la población, y también quiso determinarse si existían diferencias en el crecimiento por usar dos tipos de tanques distintos, uno tubo cilíndrico de metacrilato transparente de 80L y un tanque troncocónico

de fibra de vidrio de 60L completamente opaco. Además, para el testeo inicial de los alimentos a utilizar convenía el uso de recipientes pequeños para no malgastar materiales.

### 2.2.5. Dietas utilizadas en el cultivo de *Artemia*

Para el cultivo de *Artemia* se utilizaron y compararon diferentes especies de microalgas vivas, congeladas o inertes disponibles comercialmente o producidas en las instalaciones del IATS, para ver el efecto sobre el crecimiento y la supervivencia de los animales. Las dietas utilizadas en los ensayos fueron *Tetraselmis suecica* (microalga viva y congelada), *Isochrysis galbana* (microalga viva), *Nannochloropsis sp.* (microalga viva) y *Chlorella sp.* liofilizada.

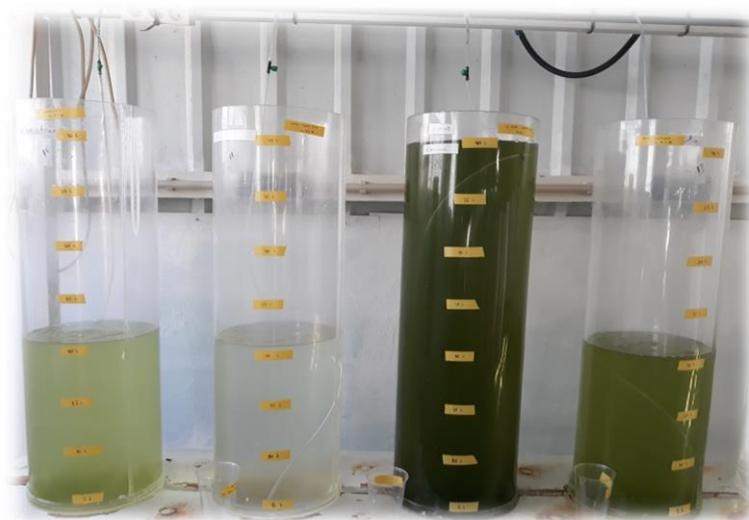


Figura 2.3. Cilindros de cultivo de *A. franciscana* alimentados con: de izquierda a derecha, liofilizado de *Chlorella sp.*, pasta concentrada de *Nannochloropsis sp.*, *Tetraselmis suecica* viva y congelada.

Para la determinación de la densidad celular de *T. suecica* e *I. galbana* viva se prepararon dos diluciones (1:2 y/o 1:10) del cultivo de microalgas con agua de mar según la concentración del mismo, y a las cuales se les añadían dos gotas de lugol para fijar las células. A continuación, y mediante el uso de una cámara Neubauer, se determinó el número de células con el fin de calcular el volumen de microalgas necesario para alimentar los cultivos de *Artemia*. Para *T. suecica* la densidad final se ajustó entre 200.000-300.000 cel./mL, mientras que para *I. galbana* fue de 1.000.000 cel./mL debido a su menor tamaño.

La fórmula utilizada para determinar la concentración de cel./mL fue:

$$[\text{cel./mL}] = (N^{\circ}\text{cel.} \times 10000 \times \text{Fact. Diluc.})/4$$

En el caso de *Tetraselmis sp.* congelada (Mc Algae Ice Tetraselmis – KF IBER FROST), se determinó la concentración de microalga por mL a partir de las especificaciones del producto ( $2 \cdot 10^9$  cel./g), es decir, que diluir 4g/40mL resultó en una concentración de  $2 \cdot 10^8$  cel./mL. A partir de este valor se determinó que eran necesarios 30mL de esta disolución para obtener una cantidad de 300.000 cel./mL en el volumen final de 20L.

En cuanto al liofilizado de *Chlorella sp.* (w3 Algae – BERNAQUA), la concentración del producto para el cultivo de *Artemia* se estimó de dos maneras. En el primer caso, se diluyeron 0'604g en 2, 4, 5 y 6L hasta obtener una turbidez en medio de cultivo similar a la obtenida *T. suecica* a 300.000 cel./mL. La turbidez que más se acercaba fue la dilución de 0'6g/6L (0'1g/L). En el segundo caso, se determinó la concentración del producto liofilizado a partir de 0'6-1g por cada millón de rotíferos, según la recomendación del fabricante, y a partir de este valor y considerando una densidad de cultivo fija de 10 nauplios/mL en un volumen de 100L se estimó la cantidad de 1g/día; a continuación, se calculó la cantidad de liofilizado necesaria para alimentar los cultivo de *Artemia* en 0'01g/L y día para un volumen de 20L, valor que se multiplicó por 3 para asegurar la cantidad de alimento necesaria para mantener a los animales durante 3 días, coincidiendo con la renovación del medio.

La densidad de *Nannochloropsis sp.* viva (Mc Algae Phyto-Green Paste *Nannochloropsis* – KF IBER FROST) utilizada en los cultivos de *Artemia* se estimó a partir de las especificaciones de peso del producto ( $1'2 \cdot 10^{11}$  cel./g), calculándose los gramos de producto necesario para tener una densidad de entre 250.000-300.000 cel./mL en el medio.

### 2.2.6. Crecimiento y Supervivencia

Para controlar el estado de crecimiento de la población en los tubos de cultivo se deben realizar controles de talla y supervivencia periódicos cada 3 – 4 días. Dependiendo del momento en que muestreemos, habrá que tener en cuenta la densidad a la que se encuentra el cultivo para extraer un volumen determinado con una cantidad representativa de individuos, a los 3 (T3) y 6 (T6) días de cultivo. Los primeros periodos T3 y T6, se cogió un volumen total de 25mL para el control de supervivencia y de talla, y en los periodos posteriores (T10, T13, T16, etc...), se tomaron muestras de 250mL para los recuentos. Estos volúmenes se dividían en alícuotas más pequeños repartidas en una placa multipocillo para facilitar los recuento de los animales una vez anestesiados con una solución de agua con cloroformo. Con esto fue posible determina la densidad de cultivo (nº individuos/mL) y estimar la supervivencia del mismo.

Para el control de crecimiento, se midieron entre 20-30 individuos elegidos al azar. La talla se determinó a partir de las imágenes tomadas con ayuda de una lupa binocular Leica Biosystems modelo MZ6 con una cámara incorporada, y posteriormente éstas se procesaron con el programa "Imaje J" para obtener las medidas en milímetros de cada uno de los individuos.

### 2.2.7. Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico, se procesaron los datos de manera que se pudiese comparar la influencia que cada uno de los factores analizados (temperatura, volumen y alimento) sobre el crecimiento de *Artemia*. Para ello se realizaron análisis de la varianza mediante un ANOVA de un factor para todas aquellas pruebas con más de dos grupos experimentales, tras comprobar la homogeneidad de las varianzas con el test de Levene, seguido de un análisis *post hoc* de HSD Tukey. En el caso de varianzas heterogéneas se utilizó la corrección de Brown-Forsythe en el ANOVA y el test *post hoc* de Games-Howell. Para los conjuntos de análisis de dos únicos grupos se realizó el análisis del Test T de student. El nivel de significación se estableció en  $p < 0'05$ .

### 2.2.8. Recolección de Biomasa

Una vez finalizado el periodo de cultivo estipulado de dos semanas, se recolectaron los ejemplares de *Artemia* de cada uno de los ensayos realizados con diferentes volúmenes de manera independiente con ayuda de una malla de 600 $\mu$ m de luz. Una vez concentradas las muestras de *Artemia* en la malla, se lavaron con la manguera para intentar retirar al máximo los detritos que pudiese haber y se resuspendieron en cubetas de plástico en agua de mar filtrada a las que se les añadía un aireador para garantizar una mínima circulación del agua.

Posteriormente, con una malla previamente tarada en la balanza, se volvieron a concentrar las muestras de biomasa y se lavaron con agua destilada para eliminar restos de sal. A continuación, se eliminó el exceso de agua de éstas con ayuda de papel secante antes de pesarlas.

Por último, para determinar el desarrollo de la población se tomó una muestra al azar de unos 200 individuos de los cuales se clasificaron 100 según su fase de desarrollo, distinguiendo entre: metanauplios, si conservaban las dos setas naupliares; juveniles, si presentaban una morfología de adulto pero sin desarrollo gonadal; y adultos cuando ya empezaban a presentar las típicas características sexuales de los adultos (desarrollo del ovisaco y oviductos en hembras e hipertrofia del primer par de apéndices de los machos).

Una vez finalizados las fases de crecimiento y determinada la biomasa producida, se procedió a probar diferentes métodos de conservación y almacenaje dependiendo de si la presentación del producto final era en vivo o congelado.

Para el envasado en vivo, se comprobó si los individuos adultos eran capaces de sobrevivir varios días en uno frascos para cultivos celulares parcialmente cerrados. Para ello se utilizaron 4 frascos a los que se les añadió 50mL de agua verde (*T. suecica* a una concentración de 300.000 cel./mL) y 50 y 100 individuos por frasco. Éstos se mantuvieron a temperatura ambiente (26°C - 28°C) y en oscuridad o con fotoperiodo natural.



Figura 2.4. Frascos de cultivo con 50mL de agua verde (*T. suecica* a 300.000 cel./mL) y con 50 y 100 individuos adultos de *A. franciscana*.

Para la presentación de biomasa congelada también se probaron diferentes formatos de congelación, y se compararon con los que actualmente se comercializan en forma de daditos de unos 2'5g de biomasa adulta a modo de "tableta de chocolate" con un peso neto de 100g, o como tabletas de 500g. Se probó la congelación a -20°C y a -80°C y diversos recipientes.

En el congelador de -20°C se probó una primera prueba en una cubitera con 4 daditos de biomasa de *Artemia* de aproximadamente 2'3g cada uno (Imagen A). Estas se recogieron con una

cucharilla metálica de una malla donde se concentraron previamente y se depositaron en un trozo de papel de aluminio ubicado en el dadito de la cubitera. En las siguientes pruebas se utilizó para congelar: eppendorfs (aprox. 1'5g de biomasa cada uno), cubitera (aprox. 3g de biomasa cada uno, Imagen E), caja cuadrada (aprox. 60g de biomasa, Imagen B), placa multipocillo (aprox. 1'5g de biomasa cada uno, Imagen F) y tubo tipo Falcón (aprox. 15g de biomasa, Imagen D). Para concentrar, lavar con agua destilada y recoger la biomasa de *Artemia* se utilizó una pequeña maya (Imagen C).

Al haber poca disponibilidad de espacio en el congelador de -80°C, solo se pudo realizar la prueba de congelación de biomasa en eppendorf (aprox. 1'5g de biomasa cada uno), utilizando la misma metodología para concentrar, lavar y recoger la biomasa de *Artemia* descrita anteriormente.

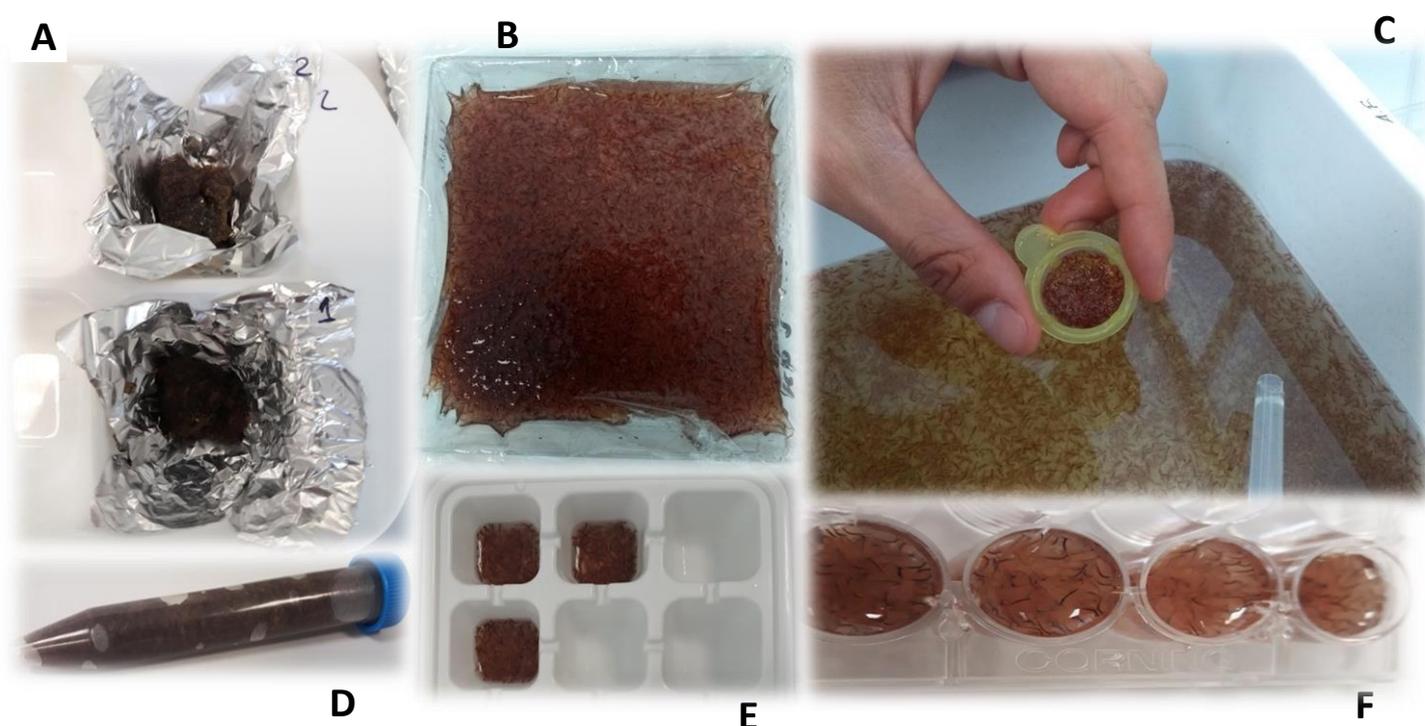


Figura 2.5. Pruebas de congelación a -20°C: A) Biomasa de *Artemia* en cubitera , B) Placa de 60g de biomasa de *Artemia*, C) Concentración de biomasa de *Artemia*, D) tubo tipo Falcón con 15g de biomasa de *Artemia*, E) Biomasa de *Artemia* en cubitera concentrada con el método de malla y F) Biomasa de *Artemia* en placa multipocillo.

### 2.3. Estudio económico

Para la elaboración del estudio económico se llevó a cabo el diseño de una hoja de cálculo en la que se hizo figurar la mayoría de gastos que cabría esperar en el caso de la apertura de una empresa especializada en la producción biomasa de *Artemia* viva como alimento para la acuariofilia.

En primer lugar, se hizo un supuesto en el que se valoraba la adquisición de un terreno en el que se construiría la nave industrial para llevar a cabo todo el proceso de producción. Esta parte de obra civil engloba la adquisición de la parcela, la construcción de la nave y el cerramiento del terreno, la instalación de las tomas de agua y depósitos de agua, la urbanización del recinto (camino, canales de salida...), la instalación de toda la infraestructura necesaria de tuberías, filtros, bombas, etc... Al final del listado de gastos de la obra civil, figura la inversión total de la obra y la amortización a 25 años vista

correspondiente. Además, se muestra el precio de alquiler de una nave ya equipada para la producción, ya que se realiza el estudio con el supuesto de alquilar las instalaciones del instituto de Acuicultura Torre la Sal (IATS) del CSIC en la que se han realizado todos los experimentos de este trabajo.

A continuación, se muestra un listado con todos los materiales y equipos necesario para la producción de biomasa de *Artemia* viva adulta, dividido en sub-apartados en los que figuran: materiales de uso general, material volumétrico, materiales para el manejo de líquidos, filtros de separación y concentración, elementos de montaje e instrumental, materiales de microbiología y patología, microscopios y estereomicroscopios, frascos y recipientes para muestras, centrifugación y tubos de ensayo, balanzas, termostatos, instrumentos de medida y técnicas instrumentales, materiales de seguridad e higiene, mobiliario, reactivos y productos químicos, equipos eléctricos y tanques. Todos estos materiales y equipos figuran con sus correspondientes cantidades y precios; pero continuando con el supuesto antes nombrado de alquilar las instalaciones del IATS y su equipamiento, solo habría que realizar gastos en los apartados de reactivos y productos químicos, y los pocos consumibles que puedan encontrarse en los diversos apartados. Todos los precios se obtuvieron del catálogo LabBox 2018 y otros catálogos y páginas en línea en internet.

En caso de no contar con la infraestructura (instalaciones y equipamiento) del IATS sería necesario invertir para crear la empresa de cero (obra civil + equipos), o para equipar una nave ya construida, para alquilar una nave ya equipada sin laboratorio y para alquilar una nave equipada y con laboratorio, yendo estos precios acompañados de sus correspondientes amortizaciones. En el caso de tener que realizar la obra civil, se incluyen los costes de contratación del arquitecto, gastos en tasa, licencias, permisos, gastos de dirección de la obra...

Por último, se calcularon los costes de producción aproximados para el cultivo de biomasa de *Artemia* adulta. Para ello, en primer lugar se calculó el gasto que conlleva el personal técnico, tanto el coste en bruto como en neto, considerando la necesidad de 2 técnicos, un jefe de producción y un jefe de ventas. También se tuvieron en cuenta los costes de las materias primas necesarias como pueden ser los quistes, los fertilizantes para el cultivo de fitoplancton, uso de agua o los productos químicos. Además, en estos costes de producción se incluyen las amortizaciones calculadas en los presupuestos y, aparte de esto, se calculan los gastos eléctricos y de seguros.

De esta manera se obtienen unos costes de producción anual, que permite la determinación del coste que tiene la producción de 1Kg de biomasa de *Artemia* adulta, y por ende el precio aproximado que este podría tener en el mercado para poder obtener beneficios.

## **3. Resultados**

### **3.1. Prospección de mercado**

La encuesta realizada durante el transcurso de un mes y medio con un total de 122 participantes en su mayoría relacionado con el sector de la acuariofilia de todo el territorio español.

El 90'9% de los encuestados poseen acuarios recreativos y un 5'7% son también encargados de acuarios de exposición, además un 26'2% de estos también dedican su tiempo a la cría de diferentes especies tanto marinas como dulceacuícolas, y un 7'4% del total se dedican a la venta a nivel particular o de grandes superficies. En cuanto a la alimentación que estos usuarios requieren para el mantenimiento de sus acuarios, se puede observar una clara tendencia hacia los piensos extrusionados

(granulados) y hacia los organismos “vivos” congelados, acumulando estos un 62’3% y un 63’1% de los encuestados respectivamente. Además, un 38’5% de los encuestados necesitan alimento vivo “*sensu stricto*”. También se ha visto que un 32’8% acopla alguno de estos alimentos con el pienso laminado, y que en otros casos, además se ofrece a los peces productos liofilizados (14’8%) y huevas o quistes de organismos vivos (12’3%). Por último, también hay encuestados que producen sus propias papillas caseras (7’32%) con materias primas vegetales, mejillones, etc... A la hora de adquirir todos estos alimentos, el 86’1% tiene una mayor tendencia a fijarse en la calidad del producto que están comprando o a una relación calidad/precio que les convenga dependiendo del contenido del mismo. Por último, el 27’9% y el 27% de los encuestados se fijan en el precio y el contenido respectivamente y un 11’4% se fijan en la marca que están adquiriendo.

También se preguntó a los encuestados la cantidad de alimento en vivo o congelado que utilizaban semanalmente, y la cantidad de alimento vivo que creen que consumirían semanalmente si hubiese un suministro constante de *Artemia* viva o congelada, resultando en que entre el total de estos se hace un consumo aproximado de 15Kg de alimento congelado y vivo, sin tener en cuenta los piensos, y que estarían dispuestos a consumir un total de unos 7Kg semanalmente de *Artemia* viva para el mantenimiento de sus acuarios. También se quiso saber de manera orientativa el gasto semanal, coincidiendo el 74’6% en que el coste de la adquisición de sus productos fuera menor a 10€ semanales, luego un 17’2% gastan entre 10 y 25€, un 2’5% entre 25 y 50€, y por último hubo dos respuestas (1’6%) con un coste superior a 100€ semanales, con lo que podemos deducir que estas dos respuestas pertenecen a dos grandes acuarios o tiendas de animales. Con esto se quiso determinar si los potenciales clientes estaban satisfechos con el tipo de alimento que utilizan, con lo que se pudo observar que el 41’8% de los encuestados estaban muy satisfechos con los productos utilizados, y que un 57’4% estaban satisfechos, pero creían que podría haber mejores productos para sus peces. Es por este motivo que también se les preguntó si estarían dispuestos a desembolsar un precio ligeramente superior al que ya “pagan”, por un producto de mayor calidad. Se obtuvo que un 82% de los encuestados sí estaban dispuestos, mientras que el 18% restantes no lo estaban.

Por otro lado, el 63’1% de los participantes adquirirían el alimento para sus acuarios directamente en tiendas de animales, pero un 13’9% y un 10’7% lo hacían en internet en páginas web especializadas y en empresas dedicadas a la venta de este tipo de producto para peces, respectivamente. Además, un 3’3% de los encuestados lo obtenían de la compra a particulares con instalaciones caseras propias. Sabiendo esto, se les preguntó si estarían dispuestos a participar en una red de distribución de la *Artemia* viva, y en caso afirmativo, qué plataforma creían que sería la mejor para ponerla en funcionamiento. Se obtuvo que un 49’2% de los participantes estarían dispuestos a participar como compradores finales, un 23% también como intermediarios para la venta al público, y el 27% restante no vieron factible unirse a una red de distribución. Por otro lado, hubo más discrepancias en las respuestas de la plataforma a utilizar, obteniéndose que un 31’4% de los encuestados pensaba que la mejor manera es creando una página web especializada, pero también hubo un 24’8% que pensó que en tiendas de animales sería la mejor manera, y un 20’7% que un grupo de alguna aplicación de mensajería instantánea (whatsapp, telegram...) sería la mejor opción. También hubo un 10’7% que pensaron que el grupo de Facebook sería una buena opción, y un 5’8% y un 3’3% sugirieron que una app especializada o un correo vía email podrían ser buenas opciones respectivamente. Por último, un 3’3% sugirió el uso de todas las opciones para maximizar y facilitarle al comprador el trabajo.

Por último, se quiso saber el estado de conocimiento general que podía haber alrededor del alimento vivo y *Artemia* viva enriquecida, con lo que se preguntó el grado de conocimiento sobre la posibilidad del uso de alimento vivo (*Artemia*, copépodos, rotíferos...) para los peces y si pensaban que este era beneficioso para ellos, obteniéndose un 97’5% de respuestas positivas. También se preguntó si tenían noticia de la posibilidad de adquirir *Artemia* viva enriquecida como fuente de alimento y que, si

estaban dispuestos a adquirirla comercialmente en vez de producirla con instalaciones caseras, con lo que se obtuvo un 83'6% de respuestas positivas.

## 3.2. Estudios de producción de biomasa adulta de *Artemia*

Durante el transcurso de los ensayos se determinaron las tallas de varios individuos de *Artemia* a diferentes edades (20-30 por cultivo y edad) para poder determinar cuál sería la mejor dieta y volumen para optimizar al máximo el cultivo intensivo de biomasa de *Artemia*. Para ello se realizaron una serie de comparaciones de las diferentes tallas obtenidas en cada tipo de cultivo, además de controlarse las supervivencias de cada cultivo y las eficiencias de eclosión de los quistes utilizados. Todas estas comparaciones y controles de supervivencia y eficiencia de eclosión se muestran a continuación:

### Comparaciones del rendimiento de las dietas en volúmenes de cultivo de 3 y 20 L

En las figuras 3.1, 3.2 y 3.3 se presentan las tallas de *A. franciscana* en función de la temperatura y la dieta utilizada para un volumen de cultivo de 3L. El crecimiento fue significativamente ( $p < 0'05$ ) mayor en la población cultivada a 28°C, independientemente de la dieta suministrada (Fig. 3.1).

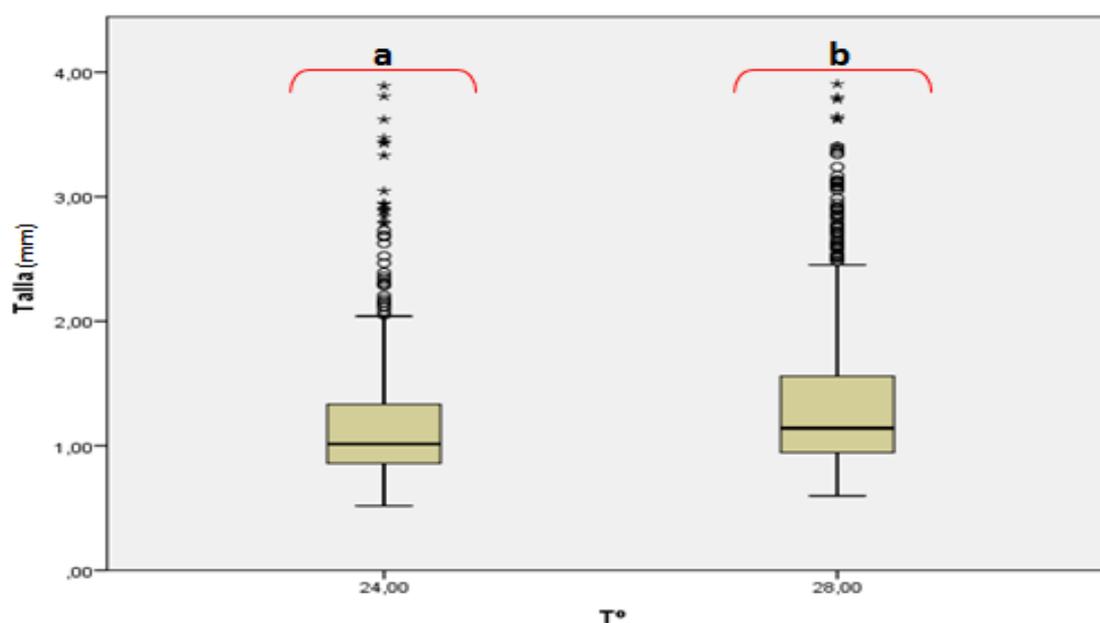


Figura 3.1. Efecto de la temperatura (24°C y 28°C) sobre la talla (mm) de los ejemplares *A. franciscana* alimentados con diferentes dietas y cultivados en 3L.

Para cada temperatura ensayada, el crecimiento de la población presentó diferencias significativas ( $p < 0'05$ ) dependiendo de la dieta tras 10 días de cultivo (Fig. 3.2 y 3.3), siendo mayor la talla en los cultivos alimentados con *T. suecica* viva en comparación con los alimentados con microalga liofilizada de *Chlorella sp.* y la pasta concentrada de *Nannochloropsis sp.*, encontrándose la talla más pequeña en el cultivo alimentado con la pasta concentrada de *Nannochloropsis sp.*. En cuanto a la supervivencia, el porcentaje más elevado se obtuvo con el cultivo alimentado con *T. suecica* con un

61'72%, mientras que los cultivos alimentados con microalga liofilizada de *Chlorella sp.* y la pasta concentrada de *Nannochloropsis sp.* la mortalidad fue del 100% tras 10 días (ver tabla 3.3)

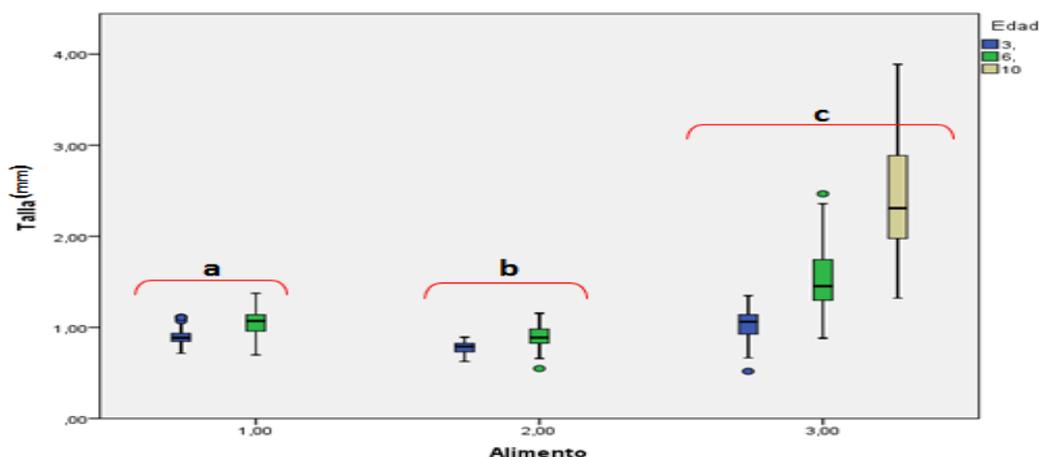


Figura 3.2. Talla (mm) de los ejemplares de *A. franciscana* para cada alimento (1 = Liofilizado de *Chlorella sp.*, 2 = Pasta concentrada de *Nannochloropsis sp.*, 3 = *Tetraselmis suecica*) y periodo de muestreo (3 días, 6 días y 10 días) a 24°C.

La talla de los individuos cultivados a 24°C (Fig. 3.2) presentaron diferencias significativas ( $p < 0'05$ ) con respecto a la dieta. El crecimiento fue mayor en los cultivos alimentados con el microalga viva *T. suecica*, mostrando una talla media de 2'493mm a los 10 días. En cuanto a las supervivencias de los cultivos, aquellos que fueron alimentados con la microalga liofilizada de *Chlorella sp.* y la pasta concentrada de *Nannochloropsis sp.* a los tres días mostraban un 60% y un 58'66% respectivamente, pero entre los 6 y los 10 días de cultivo experimentaron un aumento de la mortalidad hasta llegar cerca del 100%. En cambio, la supervivencia observada en los cultivos de *T. suecica* fueron de un 61'72%.

Por otro lado, la talla de los individuos cultivados a 28°C (Fig. 3.3) presentaron diferencias significativas ( $p < 0'05$ ) en función de la dieta. El crecimiento fue mayor en los cultivos alimentados con las microalgas vivas de *T. suecica* e *I. galbana*, mostrando una talla mayor la población alimentada con *T. suecica* con un valor medio de 2'814mm. En cuanto a las supervivencias de los cultivos, estas fueron muy dispares. Los cultivos alimentados con microalga liofilizada de *Chlorella sp.* y la pasta concentrada de *Nannochloropsis sp.* a los 3 días apenas alcanzaban el 21'8% y 1'6% respectivamente, y las algas vivas *T. suecica* e *I. galbana* presentaban supervivencias de 22'5% y 56'24% a los 9 y 10 días respectivamente.

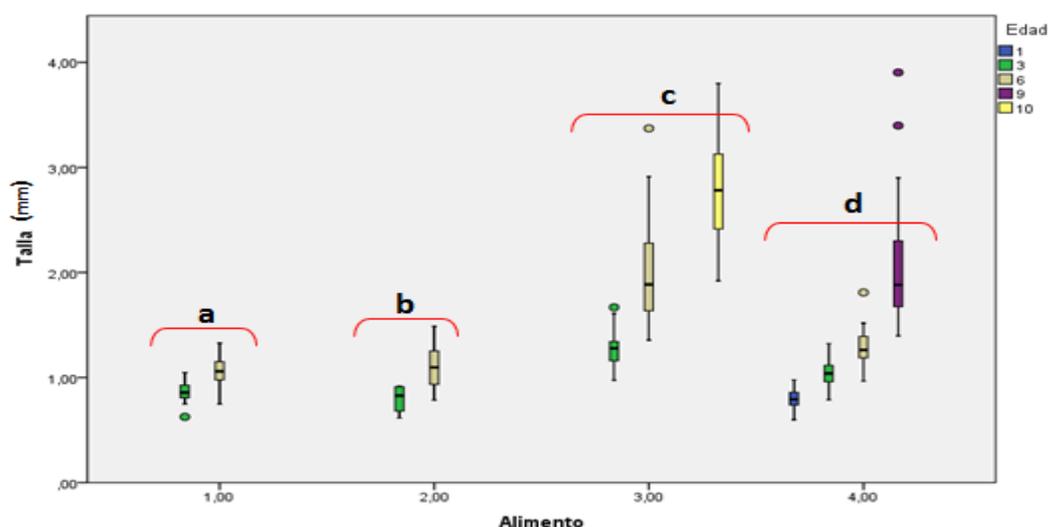


Figura 3.3. Talla (mm) de los individuos de *A. franciscana* para cada alimento (1 = Liofilizado de *Chlorella sp.*, 2 = Pasta concentrada de *Nannochloropsis sp.*, 3 = *Tetraselmis suecica*, 4 = *Isochrysis galbana*) y periodo de muestreo (1, 3, 6, 9 y 10 días) a 28°C.

En la figura 3.4 se presentan las tallas de *A. franciscana* en función de las dietas suministradas a los cultivos con un volumen final de 20L y a temperatura ambiente (24°C-28°C). El crecimiento fue significativamente ( $p < 0.05$ ) mayor en las poblaciones alimentadas con el microalga viva *T. suecica* y el concentrado de *Tetraselmis sp.* congelado, las cuales presentaban unas tallas de 4'263 y 4'264mm a los 17 días. Los cultivos que fueron alimentados con liofilizado de *Chlorella sp.* y la pasta concentrada de *Nannochloropsis sp.* alcanzaron unas tallas de 1'052 y 0'933mm al cabo de 7 días. En cuanto a las supervivencias observadas, estos dos últimos cultivos presentaron, a los 7 días, unas supervivencias de 14'96% y 16% respectivamente y alcanzaron una mortalidad del 100% a los 10 días. Los cultivos alimentados con *T. suecica* finalizaron con una supervivencia del 2'62% a los 17 días, mientras que los alimentados con el concentrado de *Tetraselmis sp.* congelado presentaron unas supervivencias de 2'32% a los 14 días y 0'64% a los 17.

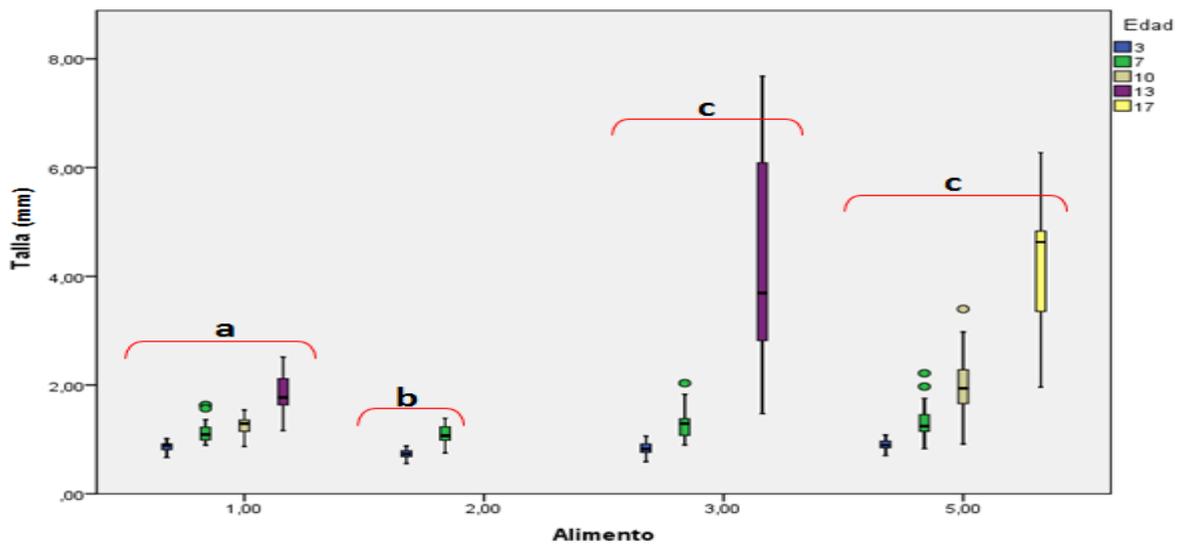


Figura 3.4. Talla (mm) de los individuos de *A. franciscana* para cada periodo de muestreo (3, 7, 10, 13 y 17 días) y para cada alimento (1 = Liofilizado de *Chlorella sp.*, 2 = Pasta concentrada de *Nannochloropsis sp.*, 3 = *Tetraselmis suecica* y 4 = Concentrado de *Tetraselmis sp.* congelada) a un volumen final de 20L y temperatura ambiente de entre 24°C y 28°C.

Por otro lado, se quiso probar si disminuir la densidad de las poblaciones durante el cultivo provocaba algún tipo de efecto sobre el crecimiento de *Artemia*, por lo que los cultivos se realizaron todos por duplicado. La mitad de los cultivos se iniciaron con 10L y se desdoblaron a 20L a los 3 días disminuyendo la densidad de la población de 10 a 5 nauplios/mL, mientras que la otra mitad empezó el cultivo directamente a 20L con una densidad de 5 nauplios/mL. No se pudieron observar diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los dos tipos de cultivo, la única diferencia observada fue un aumento en la dispersión de tallas en los cultivos con desdoble (Fig. 3.5).

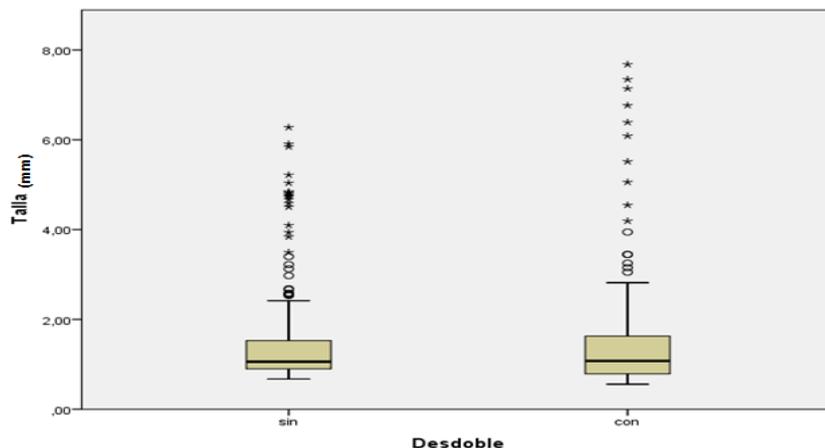


Figura 3.5. Talla (mm) de los ejemplares de *A. franciscana* para cada alimento cultivados en 20L con y sin desdoble.

### Comparación del rendimiento de las dietas en volúmenes de cultivo de 40L

Los ensayos previos nos permitieron eliminar del diseño experimental los alimentos con menor eficiencia para la producción de biomasa de *Artemia*, por lo que se decidió dejar de utilizar la microalga liofilizada de *Chlorella sp.*, la pasta concentrada de *Nannochloropsis sp.* y el concentrado de *Tetraselmis* congelado.

A continuación (Fig. 3.6) se observaron los rendimientos de las dos mejores dietas ensayadas (*T. suecica* e *I. galbana*) en cultivos de 40L de volumen y a temperatura ambiente (26°C-28°C). Se observaron claras diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en los crecimientos de las dos poblaciones. Para la población alimentada con *T. suecica* se obtuvo una talla media de 4.611mm y una supervivencia que se estabilizó en 2.62% a los 17 días. En cambio, el cultivo con *I. galbana* presentó una supervivencia de 16.4% a los 6 días, la cual cayó prácticamente a 0% durante los 3 días siguientes (0.03325% a los 10 días), debido a eso la talla media fue de 3.143mm a los 130 días y aumentó hasta 7.237mm a los 13 días, ya que los pocos individuos que quedaron no competían entre ellos.

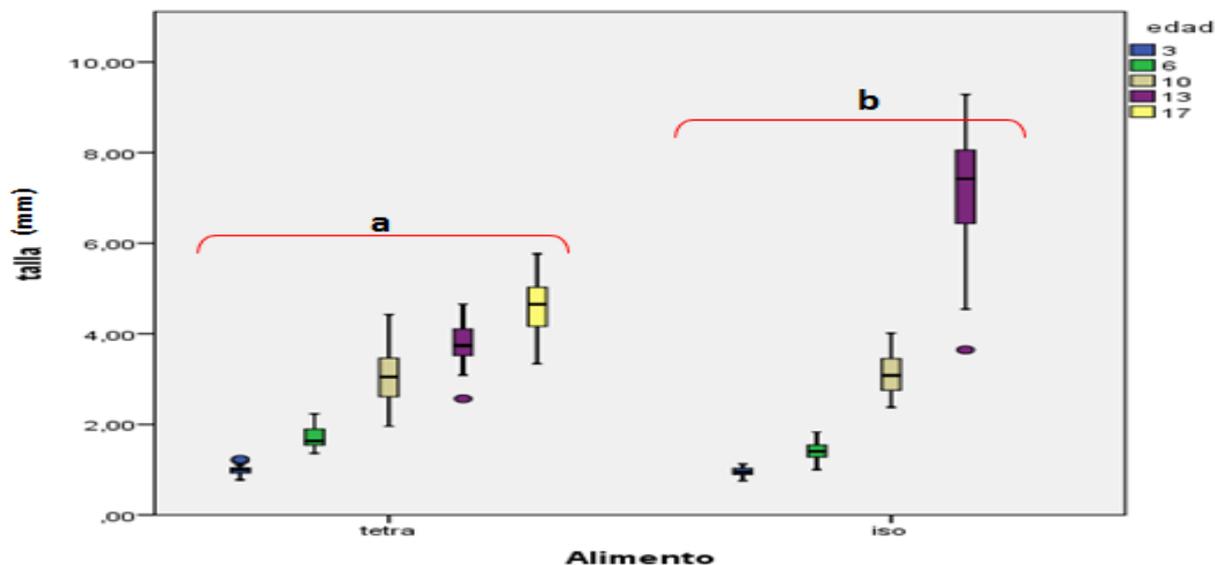


Figura 3.6. Talla (mm) de los individuos de *A. franciscana* para cada edad (3, 6, 10, 13 y 17 días) y para cada alimento (*T. suecica* e *I. galbana*) cultivados en 40L.

### Comparación del rendimiento de *T. suecica* en volúmenes de cultivo de 40, 60 y 80L

Con los resultados del ensayo anterior se decidió elegir la dieta a base de *T. suecica* como alimento para la producción intensiva de biomasa de *Artemia*. A continuación, se quiso ver si el aumento del volumen de cultivo provocaba un aumento acorde del crecimiento de los individuos de las poblaciones, para lo que se realizaron 3 cultivos con volúmenes crecientes de 40, 60 y 80L a temperatura ambiente (26°C-29°C) y al que se le renovaba el 50% del medio de cultivo cada 3 días.

Las tallas obtenidas en los cultivos realizados resultaron en no presentar diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre ellas, siendo estos valores de 4.611, 6.717 y 6.746mm para los volúmenes de 40, 60 y 80L respectivamente (Fig. 3.7). Además, se pudo observar claramente que a mayor volumen se encuentra una mayor dispersión de tallas a los 10 días, ya que es en esta fecha en la que los tres medios llegan a una supervivencia medianamente estable. Las supervivencias en el día 10 del cultivo para los volúmenes de 40, 60 y 80L eran de 3.76%, 9.16% y 3.44% respectivamente, las cuales

disminuyeron mínimamente a lo largo de los 7 días posteriores, alcanzando supervivencias finales de 2'62%, 2'7% y 2'2% a los 17 días.

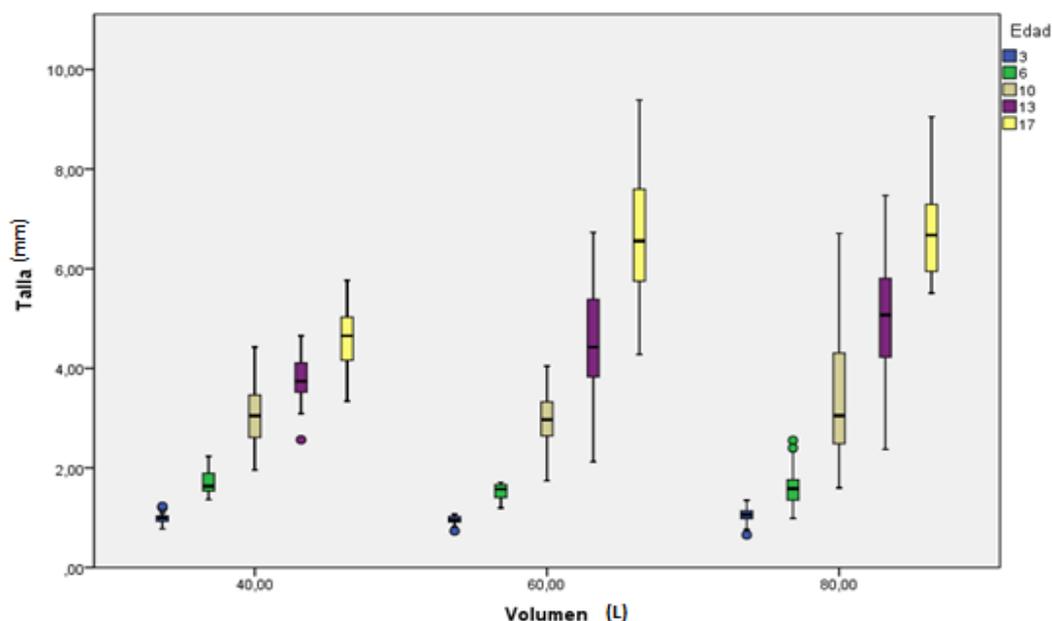


Figura 3.7. Talla (mm) de los individuos de *A. franciscana* para cada edad (3, 6, 10, 13 y 17 días) y para cada volumen de cultivo (40, 60 y 80L), alimentados con *T. suecica*.

También se quiso determinar la biomasa de *Artemia* producida durante los ensayos, resultando en 24'7, 37'1 y 52'1g de menor a mayor volumen de cultivo, y el estado de madurez que presentaban las poblaciones en cultivo (Tabla 3.1), lo que parece mostrar que un volumen creciente de cultivo provoca que las poblaciones maduren con una mayor velocidad para un mismo periodo de crecimiento de 17 días.

Tabla 3.1. Estado de madurez de las poblaciones de *A. franciscana* cultivadas en volúmenes a 40,60 y 80L.

Volumen	Estado de madurez de la población		
	Metanauplios	Juveniles	Adultos
40L	0	78	23
60L	0	58	44
80L	0	49	53

#### Comparación del rendimiento de *T. suecica* en 3 ensayos con un volumen de cultivo de 80L

Con los resultados obtenidos en el ensayo anterior se eligió el cilindro de 80L alimentado con *T. suecica* como la estrategia más eficiente para la producción de biomasa de *Artemia* con fines comerciales. Por esto se decidió realizar 2 réplicas del cultivo a 80L para poder determinar la repetitividad del proceso de producción y complementar los datos de crecimiento obtenidos en el ensayo anterior para este volumen.

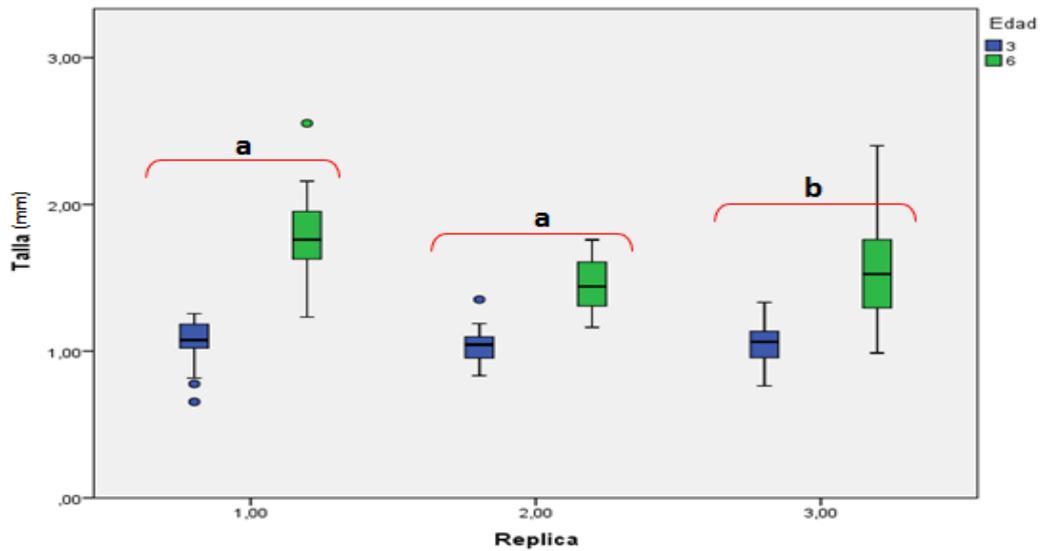


Figura 3.8. Talla (mm) de los individuos de *A. franciscana* para cada edad (3 y 6 días) de las 3 réplicas cultivadas en 80L.

En la figura 3.8 se pueden observar las tallas hasta los 6 días de las 3 réplicas (1A, 2A y 3A), siendo las dos primeras (1A y 2A) significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) con respecto a la tercera réplica (3A). Las tallas medias que se obtuvieron fueron de 1.817, 1.439 y 1.564mm respectivamente. En cuanto a la supervivencia, el cultivo de la réplica 2A sufrió una mortalidad del 100% a los 6 días de haber iniciado el cultivo, esto fue debido a un aumento brusco de la temperatura ambiental y es por lo que no figura en el próximo análisis. En cuanto a los cultivos de las réplicas 1A y 3A presentaron unas supervivencias de 6.4% y 28.5%.

Por otro lado, se quiso ver el grado de similitud entre las tallas obtenidas en la primera (1A) y la tercera (3A) réplica, con lo que se obtuvo que había diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las tallas medias de ambas réplicas. Las tallas medias observadas en las dos poblaciones fueron de 5.432 y 4.836mm a los 13 días. Estas diferencias podrían estar causadas por la mala calidad del fitoplancton *T. suecica* durante el cultivo de la tercera (3A) réplica, debido a que la temperatura ambiental durante el transcurso del último cultivo era elevada (27°C-30°C) con lo que era complicado mantener buenas poblaciones del microalga. En cuanto a las supervivencias observadas en cada uno de los cultivos, estas fueron bastante similares, siendo la de la primera réplica (1A) de 2.2% a los 17 días y la de la tercera (3A) de 2.25% a los 13 días.

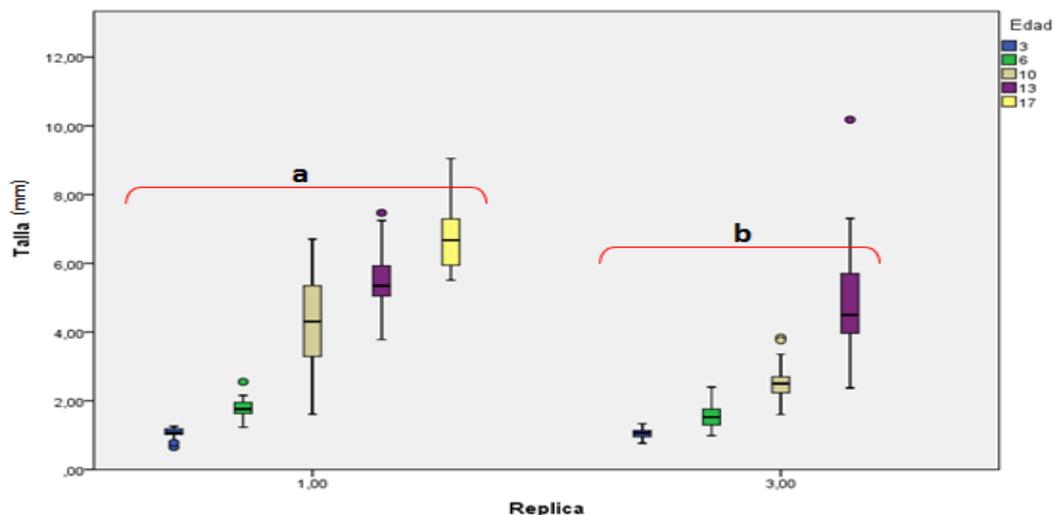


Figura 3.9. Talla (mm) de los individuos de *A. franciscana* para cada edad (3, 6, 10, 13 y 17 días) pertenecientes a las réplicas 1A y 3A.

Por último, se determinó el peso escurrido de la biomasa de *Artemia* producida durante el cultivo, lo que resulto en la primera réplica (1A) en 52'9g y en la tercera (3A) en 33'04g de biomasa. Esto pudo estar debido a las diferencias en la edad final de los cultivos, ya que la mala calidad del fitoplancton obligó a retirar la réplica 3A a los 13 días de cultivo. Además, se comprobó el estado de madurez de las dos poblaciones (Tabla 3.2) donde se observa que la réplica 3A presentaba una población más joven que la 1A.

Tabla 3.2. Estado de madurez de la población de *A. franciscana* cultivadas en diferentes ensayos en un volumen de 80L.

Réplica	Estado de madurez de la población		
	Metanauplios	Juveniles	Adultos
1A	0	49	53
3A	16	44	41

### Supervivencia

Como ya se ha ido comentando en los apartados anteriores, se tomaron muestras para la determinación de la supervivencia en diferentes edades de cultivo lo que implicó diferentes métodos de muestreo dependiendo del tamaño de los animales para obtener muestras relativamente significativas de la muestra. Estos resultados han sido plasmados en las Tablas 3.3 y 3.4 mostradas a continuación:

Tabla 3.3. Supervivencia de las poblaciones de *A. franciscana* alimentadas con diferentes dietas y cultivadas a 3 y 20L.

Volumen	Tº	Edad	Alimento				
			<i>Chlorella sp.</i>	<i>Nannochloropsis sp.</i>	<i>Tetraselmis suecica</i>	<i>Isochrysis galbana</i>	<i>Tetraselmis sp. Congelada</i>
3L	24º	3	60%	58'33%	100%	-	-
		6	-	-	-	-	-
		10	0%	0%	61'72%	-	-
	28º	3	21'3%	1'3%	33'8%	97'25%	-
		6	-	-	-	92'75%	-
		9	-	-	-	56'25%	-
		10	-	-	22'5%	-	-
20L	Tº ambiente	3	34%	20%	20'25%	49'5%	82%
		6	-	-	11'4%	16'4%	-
		7	14'96%	16%	-	0'0332%	39'12%
		10	1'4%	-	3'76%	-	2'33%
		13	-	-	3'66%	-	-
		14	0'0275%	-	-	-	2'32%
		17	-	-	2'62%	-	0'64%

Tabla 3.4. Supervivencia de las poblaciones de *A. franciscana* cultivadas en volúmenes de 40, 60 y 80L, y de los tres ensayos en un volumen de 80L.

Volumen	Periodo	Alimentos		
		<i>Tetraselmis suecica</i>		<i>Isochrysis galbana</i>
40L	3	20'25%		49'5%
	6	11'4%		16'4%
	10	3'76%		0'03325%
	13	3'66%		-
	17	2'62%		-
60L	3	36%		
	6	18'6%		
	10	9'16%		
	13	4'2%		
	17	2'7%		
80L	3	35'5%	85%	92%
	6	6'4%	53'2%	28'5%
	10	3'44%	-	3'2%
	13	3'36%	-	2'25%
	17	2'2%	-	-
		<b>1A</b>	<b>2A</b>	<b>3A</b>
		<b>Réplicas</b>		

De estas dos tablas se puede concluir que en los primeros 3-6 días de cultivo es cuando más mortalidad hay, cayendo las poblaciones entre un 50 y un 80%. Además, se observa que estos cambios de densidad poblacional suelen producirse durante la primera semana, llegando al día 10 de cultivo con una relativa estabilidad en la mortalidad, rondándose el 2-4% de supervivencia, la cual disminuye mínimamente a partir de esta edad.

#### Porcentaje, Tasa y Eficiencia de eclosión

Se quiso ver el porcentaje de eclosión de los quistes utilizados a lo largo de los experimentos, y si el proceso de descapsulación afectaba a dicho porcentaje de eclosión. Para esto se ubicaron quistes sin corion y con corion individualmente en una placa multipocillo de 96 pocillos, y se observaba la situación de éstos cada ciertas horas, con lo que se pudo observar el porcentaje de eclosión y la velocidad a la que estos eclosionaban.

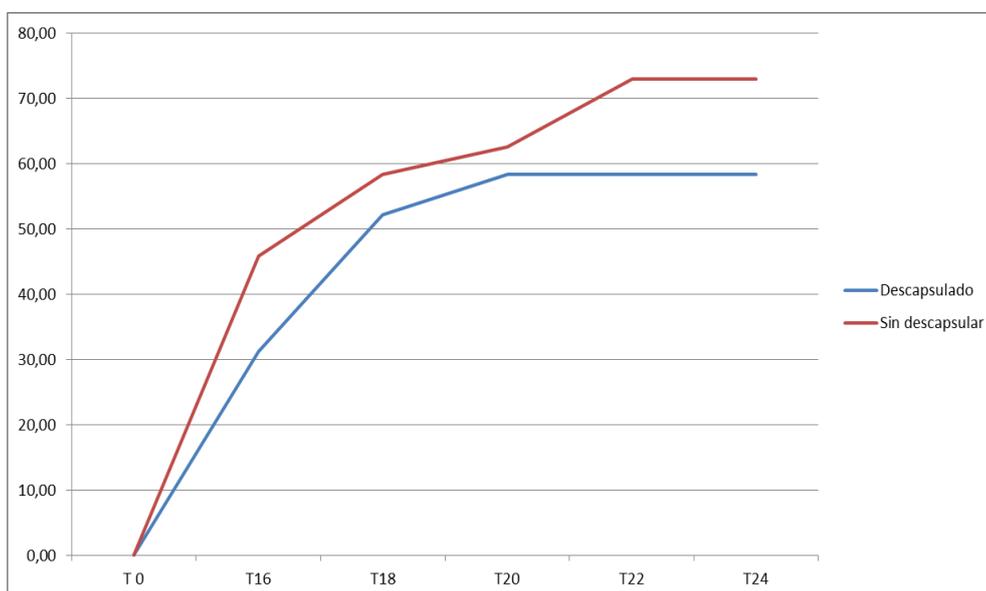


Figura 3.10. Porcentaje de eclosión de los quistes de *A. franciscana* descapsulados y sin descapsular durante un periodo de 16 a 24 horas desde el inicio de la eclosión.

En la Figura 3.10 se aprecia claramente que a partir de las 16 horas de incubación se obtiene, en el caso de quistes descapsulados, un 30% de quistes eclosionados, mientras que en el caso de los quistes sin descapsular, casi un 50% de eclosiones. Con estos datos y las observaciones realizadas podemos saber que las eclosiones se inician antes de las 16 horas, pudiendo empezar a tener eclosiones a partir de las 12 a 14 horas de haber iniciado la incubación.

En cambio, en la Figura 3.11 podemos observar los resultados obtenidos con respecto al porcentaje de eclosión de los quistes, tanto descapsulados como sin descapsular, durante un periodo de 26 a 48 hora de incubación. Se puede observar claramente la supremacía de los quistes sin descapsular sobre los descapsulados, pudiendo estar esto causado por los tiempos de reacción química en el proceso de descapsulación, llegando a un porcentaje máximo de eclosión de 89'58% y 66'67% respectivamente (Figura 3.11).

También se quiso calcular la tasa de eclosión para poder ver la sincronía con que los quistes eclosionan, dando como resultado T30, es decir, que los quistes de este stock comercial llegan al 50% de la eclosión al cabo de 30 horas de haber iniciado el proceso. Por último, se determinó la eficiencia de eclosión para compararla con la aportada por la ficha técnica de los quistes, obteniéndose un resultado de 214.857 quistes/g peso, lo que resulta ligeramente inferior que lo especificado en la ficha del producto (266.810 quistes/g peso).

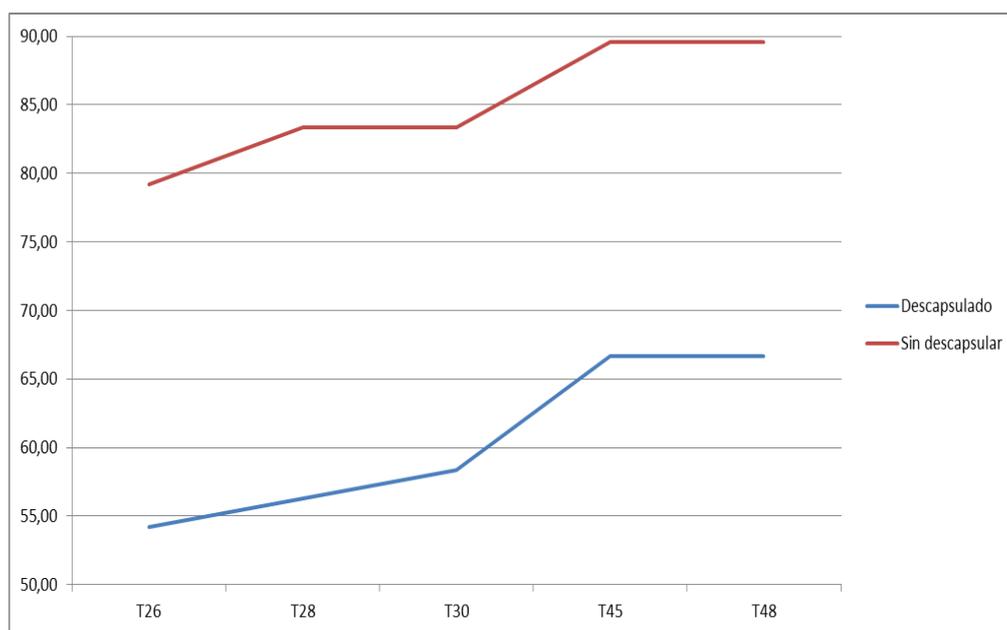


Figura 3.11. Porcentaje de eclosión de quistes de *A. franciscana* descapsulados y sin descapsular durante un periodo de 26 a 48 horas después del inicio de la eclosión.

### Almacenaje de Artemia

Como ya se ha mencionado con anterioridad, se realizaron distintas pruebas de almacenaje de la biomasa de *Artemia* adulta, tanto en vivo como en congelado. En el caso del almacenaje en vivo, se probaron uno frascos para cultivos celulares de 50mL con 1 y 2 individuos/mL en agua verde (250.000 cel./mL de *T. suecica*), resultando en una supervivencia del 100% a lo largo de los primeros 4 días en todos los casos. A partir del cuarto día comenzó a haber mortalidad, mayormente en los frascos presentes en fotoperiodo natural, los de oscuridad aguantaron 1 día más que el resto. Por otro lado, también se probó a almacenarlas en vivo en recipientes de plástico de 8L, llenada a la mitad con agua verde (250.000 cel./mL de *T. suecica*) y almacenada con el tapón agujereado para permitir un mínimo

intercambio de aire. En este caso, los animales aguantaron entre 4 y 6 días sin cambios bruscos en la densidad poblacional.

En cuanto a las muestras de biomasa almacenadas en congelador, se utilizaron dos métodos de concentración de la biomasa de *Artemia*. En primer lugar, se intentó recoger la *Artemia* concentrada en una malla mediante una cucharilla metálica, lo que resultó en un dañado sistemático del cuerpo de los animales, provocando que se partiesen y perdiesen su aspecto normal, lo que podría provocar cierto rechazo por parte del público al cual será ofertada. Posteriormente se decidió concentrarlas en tamices celulares y, mediante una pipeta, ubicar la masa correspondiente en el soporte utilizado para congelación, lo que mejoró mucho el aspecto físico de los individuos una vez se descongelaban.



Figura 3.12. Estado de la biomasa de *A. franciscana* congelada producida en el Instituto de Acuicultura Torre la Sal (IATS-CSIC).



Figura 3.13. Estado de la biomasa de *Artemia* congelada comercializada por "Oceans Nutriton".

Aparte de esto, se adquirió un producto comercial producido por "Oceans Nutrition" en forma de "tableta de chocolate", la cual presenta un total de 100g de biomasa de *Artemia* congelada. Se llegó a la conclusión de que la mejor manera de comercializarla en el formato congelado sería utilizando éstas láminas con daditos en la que se separa la *Artemia* en pequeñas dosis de 2-3g. Además, se realizó una comparación del estado externo de los individuos descongelados entre este producto ya comercializado y la *Artemia* congelada producida en el instituto, resultando en que la que era producida por el IATS tenía mejor aspecto que la adquirida en una tienda de animales (Kiwoko). El aspecto de la *Artemia* comprada se asemeja mucho al aspecto de la *Artemia* concentrada con la cucharilla metálica, pero presenta una dispersión de tallas prácticamente inexistente y casi el 100% de los animales se encuentran en estado adulto, en cambio, nuestra *Artemia* presenta cierta dispersión de talla y no todos los individuos son adultos.

### 3.3. Estudio económico

Se realizó un estudio económico de costes de producción y posibles inversiones teniendo en cuenta diversos supuestos y condiciones. Para presupuestar la posible instalación se propusieron 4 casos en los que habría diferentes montos de inversión para la apertura de la instalación:

Tabla 3.5. Supuestos llevados a cabo en el estudio económico.

Supuesto	Nave	Equipos	Lab.	Obra civil	Amortización (25 años)	Materiales y equipos	Amortización (10 años)
1	No	No	No	260.692'36	10.427'69	51.911'21	4.325'93
2	Si	No	No	65.404'36	2.616'17	33.088'13	3.308'81
3	Si	Si	No	2000	-	5.665'60	566'56
4	Si	Si	Si	2000	-	782'32	78'23

En primer lugar, se supuso (supuesto 1) la necesidad de la construcción desde cero de la instalación entera, incluyendo la compra y el vallado del terreno, construcción de la nave, caminos de acceso, canales de salida de agua, la toma de agua y el montaje de toda la instalación incluyendo tuberías, tanques de almacenaje y de producción, bombas, filtros... Todos los gastos nombrados logran alcanzar el valor de 260.692'36€, lo cual produce un gasto de amortización anual a 25 años vista de 10.427'69€. Además, a nivel de equipamiento de la instalación, se tuvo en cuenta la compra de todos los equipos, materiales, reactivos y amueblado necesario para poner en marcha la instalación, lo que ascendió el precio en 51.911'21€ con su gasto de amortización anual a 10 años vista de 4.325'93€.

En el segundo análisis económico (supuesto 2) se supuso el alquiler de una nave industrial en la cual había que realizar las obras pertinentes para adaptarla a una instalación de acuicultura y adquirir una equipación acorde. En este caso habría que realizar obras para instalar una entrada de agua, los canales de salida, la instalación para la circulación del agua... los que redujo el precio inicial hasta los 65.404'36€ con su amortización asociada de 2.616'17€. Además, como la nave no está equipada y el laboratorio tampoco habría que invertir en materiales y equipos, pero se decidió sustituir los tanques de metacrilato por bolsas de plástico sujetadas por mallazo de obra, con lo que el precio anterior descendería a 33.088'13€ con su amortización asociada de 3.308'81€.

A continuación, se supuso (supuesto 3) el alquiler de una instalación de acuicultura en la que no había que realizar ninguna obra para adaptarla ni había que adquirir equipos para la producción, la única adquisición serían los materiales de laboratorio y las materias primas para la producción, lo que reduciría el costo a 2.000€ de alquiler de la nave, más la inversión para la compra de los materiales de laboratorio que rondarían los 5.665'60€ con sus 566'56€ de amortización asociados. Esta es una de las opciones más económicas dentro de los supuestos realizados.

Por último, se supuso (supuesto 4) que únicamente era necesario el alquiler de la nave mensualmente produciendo un gasto de 2.000€, además esta nave se encuentra totalmente equipada para la producción de la biomasa de *Artemia* y de los cultivos de fitoplancton, que además presenta un laboratorio muy bien equipado en el que lo único que se necesita son los consumible y reactivos, lo que reduce el coste a 782'32€ con su amortización asociada de 78'23€. Esta es la opción más económica, ya que los gastos son mínimos.

## Costes de producción

Posteriormente a la selección del presupuesto que corresponde a la mínima inversión (el supuesto 3 en nuestro caso) se intentaron estimar los costes de producción para una biomasa final de 1000Kg de biomasa de *Artemia* adulta viva anuales. Se seleccionó esta cantidad conforme los cálculos realizados a partir de las respuestas obtenidas en la encuesta y otras fuentes. Este presupuesto equivaldría únicamente al alquiler de la nave de producción y a la adquisición de los materiales y reactivos necesarios a lo largo de todo el año, resultando en un gasto de 7.665'60€ con su amortización asociada a 5 años vista de 1.133'12€. Esto dio como resultado una inversión unitaria de 29'33€/Kg *Artemia* viva adulta.

Se tuvo en cuenta el sueldo de dos trabajadores los cuales cobran 1.236'73€ mensuales, lo que se multiplicó por 1'6 para obtener el precio neto real. Se tuvo en cuenta el precio del quilogramo de quistes (169'6€) contando que se necesitarían alrededor de 100kg de quistes anuales para realizar una producción de 1T, también se contó con el abono para el fitoplancton, la amortización de la inversión inicial (anteriormente comentada) y los costes de luz y agua, además de un porcentaje (8%) del precio final que se van en gastos fijos. Todo esto se acumula generando un gasto aproximados de unos 87.377'58€ anuales, lo que se traduce en un precio unitario de producto de 94'37€/Kg.

## 4. Discusión

### 4.1. Prospección de mercado

Existen diferentes alimentos para acuariofilia entre las que podemos distinguir 4 formatos de presentación: secos, liofilizados, congelados y en vivo. En la encuesta realizada se observa claramente que los formatos de alimentos más utilizados son los secos (62'3%) y congelados (63'1%), ya que la mayoría de los encuestados tienen acuarios ornamentales (89'3%) en los que el alimento seco suele ser suficiente, o en el caso de tener especies exigentes suelen utilizar el alimento congelado. Sin embargo, la demanda de alimento vivo (38'5%) en el mercado es cada vez mayor debido a que la afición por la acuariofilia marina es cada vez mayor. Ésta requiere del mantenimiento de especies tropicales bastante exigentes, o con stocks de reproductores (26'2%), que necesitan alimento vivo de calidad para reproducirse correctamente. En el caso de *Artemia*, la biomasa adulta viva se encuentra disponible con relativa abundancia únicamente ciertos meses al año (normalmente verano), ya que la mayoría de las empresas que ofertan este tipo de producto recolectan la biomasa del medio natural y la procesan en pequeñas dosis. Además, el precio y cantidad de biomasa de *Artemia* ofertada en estas fechas suele fluctuar mucho a causa de estar sujeta a la cantidad y calidad de la población obtenida en cada cosecha o temporada. Lo normal a la hora de realizar una compra de biomasa de *Artemia* viva adulta es obtener unos envases de entre 150-250 mL en las que se añaden individuos adultos de *Artemia* en baja densidad con un peso húmedo aproximado de unos 5-10g, y sin agua verde, por lo que los animales duran unos pocos días en el recipiente.

A partir de la encuesta realizada en este estudio se ha constatado que existe una demanda importante de biomasa de *Artemia* viva adulta, ya que únicamente entre los encuestados se requerían aproximadamente unos 15kg semanales de alimento. Además de las posibles demandas de grandes acuarios, tiendas de animales, importadores de peces ornamentales y más particulares. La compra de

*Artemia* viva adulta se suelen realizar mensualmente o trimestralmente y/o a demanda por parte de ciertas empresas y particulares, pero únicamente en los periodos en los que el proveedor tiene materia prima. Las principales razones por las que ofertan tan poca *Artemia* viva en las tiendas de animales y otros proveedores suelen ser los elevados precios de los aranceles a la hora de importar el producto, lo que deja poco margen de beneficio. Además, tener que importar un alimento en vivo que tardará cierto tiempo en llegar y que no puede almacenarse indefinidamente porque los animales no son capaces de sobrevivir, obliga a las tiendas a venderlo en un muy corto periodo de tiempo. Otro de los problemas es la falta de productores o proveedores nacionales, que puedan ofrecer el producto a precios razonables, ya que con frecuencia realizan importaciones internacionales. Si hubiese un proveedor nacional, muchas empresas estarían dispuestas a realizar compras quincenales o incluso semanales para asegurarse una disponibilidad de biomasa viva de *Artemia* adulta.

Las razones por las cuales los clientes potenciales adquirirían el producto, según los canales de distribución, son entre otras, la fiabilidad en cuanto a la calidad del producto, ya que actualmente mucha de la venta de alimento vivo está realizada por particulares los cuales venden el excedente por internet, lo que permite dudar de la calidad nutricional de los animales, y crea incertidumbre sobre la posibilidad de transmisión de patógenos provenientes del medio donde se haya cultivado la biomasa de *Artemia*. También, debido a la incomodidad de montar y mantener en buenas condiciones un equipo de eclosión de quistes y de cultivo de los nauplios hasta un estado adulto, lo que puede llevar varias semanas o incluso meses antes de obtener biomasa *Artemia* adulta.

Varias de las empresas con las que se contactó, mostraron interés en la adquisición de biomasa de *Artemia* viva como alimento, ya sea para uso propio en la alimentación de los peces en venta o stocks reproductores, o para la venta al público en empresas con un buen contacto con sus clientes y con una capacidad de venta rápida asegurada. Otras empresas, las cuales no tenían tanto contacto con este tipo de alimento, propusieron la instalación de unos tanques en los que se produciría y engordaría *Artemia* cara al público para poder hacer márketing del producto ante sus clientes y así aumentar la demanda del mismo.

## **4.2. Producción de biomasa de *Artemia***

### *Eclosión*

En cuanto al porcentaje de eclosión de los quistes, algunos autores señalan que se podría utilizar agua de mar diluida hasta 25ppm de salinidad para acelerar la velocidad de eclosión de algunas cepas de quistes (Versichele *et al.*, 1991). Sin embargo, en este estudio se usó agua marina normal a una concentración de 37ppm de salinidad debido a que la eclosión no cambia de forma significativa, y a la disponibilidad de esta en la instalación del IATS. En primera instancia, se obtuvieron buenos resultados tanto de quistes descapsulados como de quistes sin descapsular, los cuales se encontraban bajo las mismas condiciones abióticas que influyen directamente en la eclosión.

Cabe destacar que el porcentaje de eclosión de los quistes descapsulados es ligeramente inferior al porcentaje de los quistes con corion, siendo estos porcentajes de 60% y de 75% respectivamente al cabo de 24 horas desde el inicio de la eclosión. Este hecho puede ser debido al propio proceso de descapsulación que puede haber provocado la inviabilidad de muchos de los quistes (Ramakrishnan *et al.*, 2008), ya que tras una semana desde la realización del proceso de descapsulación se observó que éstos eclosionaban correctamente.

Una vez pasado un mes de la descapsulación se quiso observar si los quistes habían sufrido alguna pérdida de viabilidad, con lo que se obtuvo un porcentaje de eclosión de 67% para los quistes descapsulados y de un 90% para los quistes sin descapsular. Esto demuestra que los quistes que han sufrido el proceso de descapsulación pierden su viabilidad con el tiempo, pero otorgan la ventaja de no tener que limpiar las cáscaras de los restos de eclosión y, por tanto, podrían utilizarse como alimento para larvas pequeñas de crustáceos y peces (Vanhaecke *et al.*, 1990)

A pesar de obtener porcentajes de eclosión del 85-90% a las 30-35 horas de haber iniciado el proceso, estos resultados difieren de las especificaciones del producto facilitadas por INVE Aquaculture, las cuales indican un porcentaje de eclosión del 87'2% al cabo de 24 horas bajo unas condiciones concretas de temperatura (29°C), intensidad lumínica (>2000 lux), salinidad (25ppm), aireación intensa y densidad de quistes (2g/L). También facilitan la cantidad aproximada de quistes por gramos que tiene el producto, la cual es de 266.810 quistes/g, y la eficiencia de eclosión de 232.756 nauplios/g de quistes, la cual es ligeramente superior a la obtenida en los ensayos del estudio.

### Alimentación

Los cultivos de *A. franciscana* realizados en este estudio con diferentes dietas y volúmenes de cultivo demuestran que el uso de microalgas vivas dio los mejores resultados en términos de crecimiento y supervivencia, con excepción de la pasta viva concentrada de *Nannochloropsis sp.* que dio el peor resultado produciendo mortalidades próximas al 100% entre los 3 y 7 días de cultivo. Esto puede ser debido a que *Nannochloropsis sp.* son muy pequeñas, lo que puede haber provocado fallos en las estimaciones de densidad, pudiendo estar ésta demasiado elevada. Esto, sumado a que las microalgas presentan una pared celular relativamente gruesa puede ser la causa de que la *Artemia*, aunque filtre las células, éstas no pueden ser digeridas. Otra de las causas podría ser la aparición de un "bloom" fitoplanctónico de la microalga en el medio de cultivo, debido al problema en la determinación de la densidad (nº de células/mL), lo que provocaría que *Artemia* fuera incapaz de sobrevivir en el medio de cultivo con exceso de alimento (Mechaly *et al.*, 2004).

El liofilizado de *Chlorella sp.* fue otro de las dietas que tampoco dio un buen resultado lo largo del experimento. La supervivencia en los cultivos fue muy baja (0'0275%), hacia el final del periodo de 15 días. Además, el crecimiento de la población fue pequeño, ya que los ejemplares no superaban los 2mm tras 15 días. El pequeño tamaño del liofilizado y su elevada concentración en el medio podrían provocar una elevada tasa de filtración por parte de los individuos que puede no ir acompañada de una ingestión y digestión acorde por parte de *Artemia* (Reeve, 1963).

Las mejores dietas fueron *T. suecica* e *I. galbana*, vivas, y *Tetraselmis sp.* congelada, obteniéndose resultados de crecimiento y supervivencia muy similares entre las dos especies de microalgas vivas. *Tetraselmis sp.* congelada resultó ser un alimento parecido a la *T. suecica* viva, ya que en los cultivos se obtuvieron buenos valores de supervivencia, pero el crecimiento de los individuos fue menor, llegando a la talla media máxima de 4'263mm alcanzada con *T. suecica* viva (13 días), pero en 17 días.

En relación con las dietas de microalgas vivas utilizadas, a pesar de que éstas son consideradas como el alimento más adecuado para el cultivo y producción de biomasa de *Artemia*, debería valorarse el no utilizarlo como alimento único, al menos en los cultivos intensivos de producción de grandes biomásas, ya que puede ser más rentable económicamente el combinarlo con alimento inerte (Tizol, 1994). Se propone una combinación de dietas con microalgas vivas y liofilizadas, de manera que al principio del cultivo a los nauplios se les alimente con microalgas vivas como *T. suecica* o *I. galbana*,

para ir disminuyendo su concentración a medida que van creciendo, y sustituyéndola por concentraciones crecientes de alimento inerte. Además, debido al buen valor nutricional de *T. suecica* y de *I. galbana* en cuanto a sus ácidos grasos esenciales, en los últimos días de cultivo de *Artemia* se podría utilizar sólo microalgas vivas para aumentar su contenido en ácidos grasos esenciales como HUFA y PUFA para aportar un valor añadido a la biomasa de *Artemia* como alimento (Volkman *et al.*, 1989).

### *Producción de biomasa*

Los ensayos realizados para producir biomasa adulta de *Artemia* utilizando diferentes tanques y volúmenes con la misma dieta, se llevó a cabo para esclarecer si había diferencias en la densidad final de la población obtenida dependía de estos. Los resultados obtenidos indicaron que el volumen del tanque no influía en la producción de biomasa de *Artemia* si las condiciones experimentales eran las mismas. No obstante, algunas de las diferencias encontradas entre los distintos tanques de cultivos de 40, 60 y 80L fue debido a un error en el cálculo de la densidad de siembra del tanque troncocónico de 60L. Los resultados obtenidos indicaron que los factores bióticos que más influyen en el crecimiento y en la supervivencia del cultivo son la densidad inicial de siembra y la cantidad de alimento diario, junto con los factores abióticos de temperatura. A partir de estos resultados, se decidió realizar diferentes ensayos de cultivos de 80L para ver la repetitividad en el procedimiento en producción. Los resultados obtenidos no fueron concluyentes debido al incremento de la temperatura ambiente entre el primer ensayo (23°C-26°C, réplica 1A) y el último (27°C-30°C, réplica 3A), y que afectó tanto al cultivo de *Artemia* como al de fitoplancton. Con el aumento de la temperatura el cultivo sufrió un descenso brusco en la densidad de población a los 6 días. Aun así, los 3 ensayos no mostraron diferencias en crecimiento.

Los resultados de biomasa obtenidos son muy bajos comparados con los obtenidos en otras investigaciones, debido probablemente a la baja supervivencia que presentaban las poblaciones de *Artemia*. Los individuos presentaban unos tamaños y estados de madurez adecuados a su edad, pero su supervivencia, en el mejor de los casos no superaba el 5%, en comparación con otros estudios en los que la supervivencia final es del 40% (Ochoa, 2004). Por otro lado, en el trabajo realizado por Lavens *et al.* (2009) se describe un sistema de producción de biomasa en un volumen de 6000L de agua de mar en recirculación y tanques de cultivo de 300L tipo RAS (sistema de recirculación de aguas), en el que con tan sólo 50g de quistes deshidratados se obtienen 6kg de pre-adultos de *Artemia* (peso escurrido). Esto nos indica que existe la posibilidad de optimizar el proceso de producción de biomasa en gran medida, ya que teóricamente, si se obtuviese un 40% de supervivencia en los cultivos de 100L, pasarían de producirse entre 50-60g a producirse de 400 a 800g de pre-adultos y adultos de *Artemia* en 14 días. Como algunos autores indican, se podría sustituir los tanques de engorde de 80L por "raceways" de 5 a 15m<sup>3</sup> (15.000L) aumentando así enormemente la producción y supervivencia, lo que permitiría obtener 20Kg de pre-adultos y adultos de *Artemia* en 14 días a partir de la inoculación de 50g de quistes deshidratados (Lavens *et al.*, 2009).

Por otro lado, cabría tener en cuenta la posibilidad de vincular la producción de biomasa de *Artemia* con un oficio tradicional, como es la producción de sal tradicional en salinas costeras y continentales. Este oficio tuvo su gran importancia en su momento en España en el siglo pasado, y hoy en día sigue siendo el sustento de muchas familias en países con un menor potencial económico como pasa en muchas zonas de Asia, Oceanía y Sur América (Afolí, 2017). Estas familias dedicadas a la producción de sal mediante la radiación solar, han visto una oportunidad en la producción de biomasa y quistes de *Artemia* durante las estaciones secas, debido al elevado precio de venta que suele tener y a las buenas condiciones que presentan estos ambientes para su cultivo.

El método típico de la producción de sal consta de una serie de balsas consecutivas de extensión variable, en la primera de las cuales se acumula el agua marina a 37ppm, que posteriormente fluye por gravedad a la primera balsa de evaporación, donde se mantendrá hasta que el agua alcance salinidades de 80ppm. A continuación, el agua pasa a una segunda balsa de evaporación en la cual la salinidad varía de 80 a 150ppm, siendo esta salinidad idónea para el cultivo de biomasa de *Artemia*. Por último, la salmuera pasa a la balsa de cristalización en la que la salinidad pasa de unos 170ppm a los 250ppm, lo que provoca la posterior precipitación y cristalización de la sal. Mediante una inoculación semi-intensiva (> 20 nauplios/L) en la segunda balsa de evaporación de una explotación salinera sería posible conseguir grandes poblaciones de *Artemia* las cuales maduran al cabo de 2-3 semanas (Van Hoa & Sorgeloos, 2014). Algunos autores apuntan a que una producción de biomasa de *Artemia* que presente un crecimiento exponencial de la población durante la mayoría del periodo de producción debería ser capaz de soportar la extracción cada 3 días de la mitad de la biomasa en producción (Ngoc Anh *et al.*, 2010). Una buena densidad de producción en las amplias superficies que suelen tener las salinas, podría resultar en producciones de 150Kg (peso fresco) en unas 16ha (De los Santos *et al.*, 1979). Además, también sería factible la producción de quistes en estas vastas superficies, ya que, por ejemplo, en el Delta del Mekong (Vietnam) durante la estación seca se llevan a cabo producciones de quistes de hasta 40Kg/ha/mes, traducándose esto en valores que superan las 50 toneladas de quistes (peso húmedo) al final de la temporada. Aunque esto no signifique ni el 10% de la demanda anual de quistes del país, sigue siendo una labor de un valor socio-económico muy grande a nivel local en estos países (Van Hoa & Sorgeloos, 2014).

Adaptar una producción salinera de calidad con la producción de biomasa de *Artemia* para satisfacer la demanda del sector de la acuariofilia, permite mantener una tradición que en muchos países se está perdiendo debido al poco rendimiento económico que genera en la actualidad. En algunas zonas de España la recuperación de salinas abandonadas podría considerarse un patrimonio cultural, debido a la larga tradición salinera que ha mantenido tantas familias durante la historia y que ahora se están perdiendo debido a la industrialización de la producción de sal (Hueso & Carrasco, 2006). Además, muchas de las zonas de salina presentan un alto valor ecológico y de la conservación, ya que generan una biota particular donde se pueden encontrar especies halófilas y/o halotolerantes que son muy poco comunes, además de ser el lugar de paso y anidamiento de muchas especies de aves migratorias.

Por último, se definieron las características que iban a tener los productos una vez estuvieran disponibles para su comercialización. Se planteó una producción quincenal de cultivos para obtener biomasa de *Artemia* adulta, la cual se produciría a demanda, es decir, que para la obtención de cantidades considerables de biomasa de *Artemia* debería solicitarse por parte del comprador, por vía email o en las tiendas de animales que se asociarían a la empresa. Una vez obtenida la biomasa de *Artemia* adulta viva, se propusieron dos formatos de comercialización del producto, un primero, en el que se ofrecería un envase de plástico de 200 mL con un total de 3-5g de biomasa de *Artemia* adulta viva en agua verde (*T. suecica* a unas 300.000 cel./mL). En estos recipientes los ejemplares de *Artemia* sobrevivieron hasta 4 días. Probablemente la supervivencia podría aumentarse si el recipiente o envase es opaco, o se almacena en oscuridad a baja temperatura, ya que baja el metabolismo de los organismos (Léger *et al.*, 1983), y permite que éstos filtren mejor el alimento disponible al distribuirse uniformemente por la columna de agua debido a que no existen fototactismos (Royan, 1976). El segundo producto propuesto es básicamente el mismo, pero en mayor volumen. Se probaron diferentes recipientes, pero el mejor fue una simple botella de plástico de 8L en la cual se dispusieron 100g de *Artemia* adulta viva y agua verde (*T. suecica* a 300.000 cel./mL). Para permitir un intercambio gaseoso, se agujereó el tapón. En estas condiciones los ejemplares sobrevivieron entre 4-7 días. Otra posibilidad que podría ser factible sería poner a la venta biomasa de *Artemia* viva junto a una pequeña pastilla de concentrado de *T. suecica* congelada, ya que los resultados obtenidos indican que este alimento permite obtener una biomasa de *Artemia* comparable a la que se consigue cuando se utiliza *T. suecica* viva.

Por último, también propusimos congelar a  $-20^{\circ}\text{C}$  con una mínima cantidad de agua el excedente de la producción, o incluso producir la biomasa de *Artemia* adulta directamente para congelarla en grandes cantidades (500 y 1000g) en formato “tableta”, y/o en monodosis en un formato de “cubitera”. Otra opción podría ser la venta únicamente de los quistes descapsulados, lo que permitiría la venta a posibles clientes con cultivos larvarios que quieran obtener nauplios de manera limpia y rápida.

### 4.3. Estudio económico

Entre los gastos de puesta en funcionamiento de la empresa podemos encontrar cuatro principales desembolsos económicos: la inversión inicial, la materia prima, la mano de obra y los costes de producción.

La inversión inicial es uno de los factores clave que determina si la empresa es factible o no lo es, ya que, si la demanda por parte del potencial comprador de biomasa de *Artemia* no es muy elevada y el precio del Kg de *Artemia* adulta no es excesivamente elevado, los beneficios posibles son más limitados y no se podrían realizar inversiones del calibre de cientos de miles de euros. Es por tanto necesario una evaluación más detallada de los posibles gastos de inversión, tanto como del mercado potencial, en cada uno de los casos que se puedan plantear, ya que estos podrían ir desde una cantidad bastante aceptable y reducida de unos 3.000€ hasta una cantidad más sustanciosa de unos 350.000€, en el caso de que hubiese que construirse la instalación desde cero. Por otro lado, es posible que las estimaciones de precios de materiales y equipos, entre otros, estén un poco sobrevalorados ya que se presupuestó todo en exceso para poder realizar un presupuesto al alza.

Los gastos que acarrear la mano de obra y la adquisición de la materia prima se engloban en los costes de producción de la biomasa de *Artemia*, pero a diferencia del resto de gastos (energía, agua, amortización, etc...), estos dos pueden llegar a suponer el 70% y el 22% de los costes totales de producción respectivamente. Estos resultados son bastante prometedores ya que el precio de producción de 1000Kg de biomasa de *Artemia* va de los 70.000€ hasta los 150.000€ anuales, lo que deja mucho margen de gastos en el que se podría jugar con el precio para intentar obtener el máximo beneficio. Cabe destacar que estos precios de producción de biomasa de *Artemia* adulta están infravalorados debido a que los gastos de transporte no están incluidos en el precio unitario. El precio de producción unitaria suele rondar los 85-150€/Kg, lo que deja cierto margen de fluctuación de los costes con respecto al precio variable anualmente de los quistes, ya que su abundancia y disponibilidad cada año varía y es la que dictamina su precio.

## 5. Conclusiones

En el mundo de la acuariofilia existe una demanda creciente de alimento vivo para la alimentación de sus peces desde sus fases larvarias, tanto por particulares como por grandes acuarios e importadores de peces. La producción de biomasa de *Artemia* viva adulta de forma controlada se presenta como una buena alternativa para satisfacer las necesidades del sector.

En cuanto al proceso de producción de biomasa, se observó que a volúmenes de 80L se podría producir cierta biomasa de *Artemia* viva adulta (entre 80-100g). Sin embargo, a mayores volúmenes (mín. 300L) se podría favorecer un mayor crecimiento de la población y disminuir la mortalidad, permitiendo llegar a producir biomasas de entre 400-800g. También, un control de la temperatura del medio podría beneficiar a la producción. En cuanto a la alimentación utilizada, las dietas vivas basadas en las dos especies probadas *T. suecica* e *I. galbana* dieron buenos resultados en crecimiento y supervivencia.

Por último, el desembolso económico para la puesta en funcionamiento de una empresa de producción de biomasa de *Artemia* viva adulta depende de las condiciones particulares de cada situación. Dependiendo de si el gasto económico engloba únicamente los costes de producción o si lo hace tanto con los costes de producción como con los costes de construcción y puesta a punto de la nave, los precios pueden fluctuar entre 70.000 y 150.000€ anuales que, junto con los precios fluctuantes de los quistes necesarios para la producción, dejan unos márgenes aceptables de beneficio para el desarrollo de la empresa. Dependiendo de los objetivos de producción de la empresa, ya sea una producción a pequeña escala con demandas más bien locales, o una producción a gran escala con exportación de productos, los costes económicos presentarán enormes diferencias y los beneficios a obtener serán bastante dispares. Por tanto, en una posible empresa en la que únicamente haya que abonarse el precio de renta de la instalación, y en la que los gastos de producción de 1 tonelada de biomasa viva de *Artemia* adulta únicamente engloben salarios, adquisición de materias primas y gastos energéticos, podría hablarse de precios unitarios de entre 80-100€/Kg. Por tanto, este es un buen precio unitario debido a que el precio de producción de 10g de biomasa de *Artemia* es de 0'80€, y esta cantidad de biomasa tiene un precio en el mercado de 4-5€.

## 6. Bibliografía

- Abreu-Grobois, F. A., Briseño-Dueñas, R., Herrera, M. A., & Malagón, M. L. (1991). A model for growth of *Artemia franciscana* cultures based on food ration-dependent gross growth efficiencies. *Hydrobiologia*, 212(1), 27–37. <https://doi.org/10.1007/BF00025984>
- Alfolí, E. (2017). ¿Que son las salinas? *Boletín Semestral de IPAISAL*, (20).
- Amat, F. (1985). Biología de *Artemia*. *Informe Técnico Instituto de Investigaciones Pesqueras*, 126–127.
- Amat, F. (1985). *Artemia* en Acuicultura.pdf. *Informe Técnico Instituto de Investigaciones Pesqueras*, 128–129.
- Anh, N. T. N., Van Hoa, N., Van Stappen, G., & Sorgeloos, P. (2010). Effect of partial harvesting strategies on *Artemia* biomass production in Vietnamese salt works. *Aquaculture Research*, 41(9), 289–298. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02529.x>
- Anh, N. T. N., Van Hoa, N., Van Stappen, G., & Sorgeloos, P. (2008). Effect of different supplemental feeds on proximate composition and *Artemia* biomass production in salt ponds. *Aquaculture*, 286(3–4), 217–225. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.09.030>
- Bastidas, O. (2011). Conteo Celular con Hematocitómetro. *Technical Note-Neubauer Chamber Cell Counting*, 1–6.
- Barnabé, G., & René, F. (1972). Reproduction contrôlée du loup (*Dicentrarchus labrax*) (Linné) et production en masse d'alevins. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris* 275: 2741-2744.
- Barnabé, G., & René, F. (1973). Reproduction contrôlée et production chez la dorade *Sparus auratus* Linné 1778. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris* 276: 1621-1623.
- Beck, A.D. (1979). Laboratory culture and feeding of the Atlantic Silverside *Menidia menidia*. En: Styczynska-Jurewicz, E., Backiel, T., Jaspers, E. y Persoone, G. (eds.). Cultivation of fish fry and its live food. *European Mariculture Society*, Special Publication, Bredene. 534 pp.
- Bengtson, D.A., Lèger, P., & Sorgeloos, P. (1991). Use of *Artemia* as a food source for aquaculture. In: Browne, R.A., Sorgeloos, P., & Trotman, C.N. (eds.). *Artemia* Biology. CRC Press, Boca Raton, Florida: pp 255-285.
- Bookhout, C.G., & Costlow, J.D. (1970). Nutritional effects of *Artemia* from different locations on larval development of crabs. *Helgol Wiss Meeresunters* 20: 435-442.
- Brisset, P., Versichele, D., Bossuyt, E., Ruyck, L. De, & Sorgeloos, P. (1982). High density flow-through culturing of brine shrimp *Artemia* on inert feeds - Preliminary results with a modified culture system. *Aquacultural Engineering*, 1(2), 115–119. [https://doi.org/10.1016/0144-8609\(82\)90003-6](https://doi.org/10.1016/0144-8609(82)90003-6)
- Caballero, A. M. (2018). Optimización del cultivo y de métodos de enriquecimiento en nauplios de *Artemia franciscana* Kellogg, 1906, como alimento vivo en acuicultura.
- Carlberg, J.M., & Van Oist, J.C. (1975). Brine Shrimp (*Artemia salina*) consumption by the larval stages of the American lobster (*Homarus americanus*) in relation to food density and water temperature. En: Avault, J. V. (eds.), *Procedures of 6th Annual Meeting World Mariculture Society*. Louisiana State University, Baton Rouge, USA: 729pp.

- Calvillo, S. R. (2015). Parasitismo por cestodo en *Artemia spp.* y su implicación en la invasión biológica de *A. franciscana* en la región mediterránea. Tesis doctoral Universidad de Valencia.
- Cisneros Burga, R. E. (2002). Producción semi-intensiva de biomasa de *Artemia franciscana* kellogg 1906 (cepa Virrilá, Perú) utilizando diferentes dietas. Univ. Nacional Mayor de San Marcos (Perú). Retrieved from [http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibVirtualData/Tesis/Basic/Cisneros\\_B\\_R/t\\_completo.pdf](http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibVirtualData/Tesis/Basic/Cisneros_B_R/t_completo.pdf)
- Cisneros, R., & Vinatea, E. (2009). Producción de biomasa de *Artemia franciscana* Kellogg 1906 utilizando diferentes dietas, Biomass production of *Artemia franciscana* Kellogg 1906 using different diets. *Ecología Aplicada*, 8(1).
- Clegg, J. S. (1964). The Control of Emergence and Metabolism by External Osmotic Pressure and the Role of Free Glycerol in Developing Cysts of *Artemia Salina*. *The Journal of Experimental Biology*, 41, 879–892.
- Cohen, R.G., Amat, F., Hontoria, F., & Navarro, J. C. (1999<sup>a</sup>). Preliminary characterization of some Argentinean *Artemia* populations from La Pampa and Buenos Aires provinces. *International Journal of Salt Lake Research* 8: 329-340.
- Cook, M.A., Rust, M.B., Masee, K., Majack, T., & Peterson, M.E. (2003). Uptake of erythromycin by forst-feeding sokeye salmon, *Oncorhynchus nerka* (Walbaum), fed live or freeze-dried enriched adult *Artemia* or medicated pellets. *Journal of Fish Diseases* 26: 277-285.
- De Medeiros Rocha, R., Costa, D. F. S., Lucena-Filho, M. A., Bezerra, R. M., Medeiros, D. H. M., Azevedo-Silva, A. M., Xavier-Filho, L. (2012). Brazilian solar saltworks - ancient uses and future possibilities. *Aquatic Biosystems*, 8(1), 8. <https://doi.org/10.1186/2046-9063-8-8>
- De los Santos, J., Sorgeloos, P., Laviña, E., & Bernardino, A. (1979). Successful inoculation of *Artemia* and production of cysts in man-made salterns in the Philippines. *SEAFDEC Aquaculture Department Quarterly Research Report*, 3(1), 19–20. Retrieved from <http://hdl.handle.net/10862/2342>
- Duarte, D. N. R. (2016). Proceedings of the 2014 EuSalt Solar Salt Conference. *Eu Salt Solar Salt Conference*, (March).
- Eryalcin, K. M. (2016). Effects of Different Commercial Feeds and Enrichments on Biochemical Composition and Fatty Acid Profile of Rotifes (*Brachionus plicatilis*, Müller 1789) and *Artemia franciscana*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 18, 81–90. <https://doi.org/10.4194/1303-2712-v18>
- Fujita, S., Watanabe, T. y Kitajima, C., (1980). Nutritional quality of *Artemia salina* from different locations, as a living feed from the viewpoint of essential fatty acids for marine fish. En: Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O., & Jaspers, E. (eds.). *The Brine Shrimp Artemia*. Ecology, Culturing, Use in Aquaculture. Universa Press., Wetteren, Bélgica: pp 456.
- Gao, M., Wang, J., Ma, G., Van Stappen, G., & Sui, L. (2017). Carbon supplementation and microbial management to stimulate *Artemia* biomass production in hypersaline culture conditions. *Aquaculture Research*, 48(3), 1240–1250. <https://doi.org/10.1111/are.12965>
- García, J. M. (2009). Implicaciones de la dispersión actual e histórica para la biología evolutiva y conservación de *Artemia* y otros invertebrados acuáticos con estadio de diapausa. Tesis doctoral *Universidad de Sevilla*.

- Gouveia, L., Sousa, J., Marques, A., Tavares, C., & Giestas, M. (2009). Solar Pond devices: Free energy or bioreactors for *Artemia* biomass production? *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(8), 1035–1045. <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0585-0>
- Hernandez Piñeres, S. (2016). Evaluación del uso como alimento vivo de la *Artemia* de agua dulce, *Dendrocephalus Affinis* (ANOSTRACA: THAMNOCEPHALIDAE) para desarrollar cultivos masivos en la alimentación de peces de interés comercial. *AUNAP Autoridad Nacional de Acuicultura y Pesca*.
- Hueso K., K., & Carrasco, J. (2002). Interior En España. *The Articulation of Portuguese Salt with Worldwide Routes - Past and New Consumption Trends*, 321–328.
- Hueso Kortekass, K., & Carrasco Vayá, J. F. (2006). Las salinas de interior, un patrimonio desconocido y amenazado. *De Re Metallica (Madrid): Revista de La Sociedad Española Para La Defensa Del Patrimonio Geológico y Minero*, (6), 23–28. Retrieved from <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/4602082.pdf%5Cnhttps://dialnet.unirioja.es/servlet/extart?codigo=4602082>
- Kashiwakura, M., Seto, A., & Hasegawa, K. (1994). Heterotrophic microalgal production of docosahexaenoic acid and its use for aquaculture of marine juvenile fish. Procedure of. 3 *International Marine Biotechnology Conference*. Tromso, Noruega: pp 61.
- Lavens, P., Baert, P., de Meulemeester, A., Van Ballaer, E., & Sorgeloos, P. (1985). New developments in the high density flow-through culturing of brine shrimp *Artemia*. *Journal of the World Mariculture Society*, 16(1–4), 498–508. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1985.tb00228.x>
- Lavens, P., & Sorgeloos, P. (1991). Production of *Artemia* in culture tanks. *Artemia Biology*. Retrieved from: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Production+of+Artemia+in+culture+tanks#0>
- Lavens, P., & Sorgeloos, P. (2000). The history, present status and prospects of the availability of *Artemia* cysts for aquaculture. *Aquaculture*, 181(3–4), 397–403. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00233-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00233-1)
- Léger, P., Vanhaecke, P., & Sorgeloos, P. (1983). International study on *Artemia* XXIV. Cold storage of live *Artemia* nauplii from various geographical sources: Potentials and limits in aquaculture. *Aquacultural Engineering*, 2(1), 69–78. [https://doi.org/10.1016/0144-8609\(83\)90006-7](https://doi.org/10.1016/0144-8609(83)90006-7)
- Léger, P., Bieber, G. F., & Sorgeloos, P. (1985). International study on *Artemia* XXXIII. Promising results in larval rearing of *Penaeus stylirostris* using a prepared diet as algal substitute and for *Artemia* enrichment. *Journal of the World Mariculture Society*. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1985.tb00216.x>
- Leger, P., Bengtson, D. a, Simpson, K. L., & Sorgeloos, P. (1986). The use and nutritional value of *Artemia* as a food source. *Oceanogr.Mar.Biol.Ann.Rev.* <https://doi.org/10.1673/031.011.14601>
- Léger, P., Bengtson, D. a., Sorgeloos, P., Simpson, K. L., & Beck, A. D. (1987). The nutritional value of *Artemia*: a review. *Artemia Research and Its Applications*, 3(January), 357–372.
- López-Guzmán, C. V. (2014). Evaluación económica y financiera para la comercialización de quistes descapsulados. *Tesis doctoral, Facultad de ciencias económicas, Universidad de San Carlos de Guatemala*.

- Matsuoka, T. (1975). Culture of the giant prawn. *Yosohoku* 12: 48-52.
- Mechaly, A. S., Cervellini, P. M., & Bambill, G. A. (2004). Experiencias preliminares con *Artemia persimilis* (Crustacea, Anostraca) como potencial alimento vivo en acuicultura. *AquaTIC*, 000(21), 1–7. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=49402101>
- Medina-López, G. R. (2012). El recurso de *Artemia* de Argentina: Biodiversidad y uso en acuicultura. *Tesis Doctoral. Universidad de Valencia*.
- Monroig, O., Navarro, J.C., Amat, I., González, P., Amat, F., & Hontoria, F. (2003). Enrichment of *Artemia nauplii* in PUFA, phospholipids and water-soluble nutrients using liposomes. *Aquaculture International* 11: 151-161.
- Monroig, Ó., Navarro, J. C., Amat, F., González, P., Bermejo, A., & Hontoría, F. (2006). Enrichment of *Artemia nauplii* in essential fatty acids with different types of liposomes and their use in the rearing of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture*, 251(2–4), 491–508. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.06.026>
- Muñoz, J. (2010). Diversity and distribution of diapausing aquatic invertebrates in inland wetlands: An ecosystem conservation viewpoint. *Journal for Nature Conservation*, 18(1), 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.jnc.2009.02.006>
- Muñoz, J., & Pacios, F. (2010). Global biodiversity and geographical distribution of diapausing aquatic invertebrates: The case of the cosmopolitan brine shrimp, *Artemia* (Branchiopoda, Anostraca). *Crustaceana*, 83(4), 465–480. <https://doi.org/10.1163/001121610X489449>
- Naegel, L. C. A. (1999). Controlled production of *Artemia* biomass using an inert commercial diet, compared with the microalgae *Chaetoceros*. *Aquacultural Engineering*, 21(1), 49–59. [https://doi.org/10.1016/S0144-8609\(99\)00023-0](https://doi.org/10.1016/S0144-8609(99)00023-0)
- Navarro, J.C. (1990). Caracterización de las cepas españolas de *Artemia* desde el punto de vista de su valor nutritivo y de sus fenotipos electroforéticos. Implicaciones prácticas en Acuicultura. *Tesis Doctoral, Universidad de Valencia, España*, 350pp.
- Navarro, J.C., Amat, F., & Sargent, J.R. (1991). Fatty acid composition of coastal and inland *Artemia sp.* populations from Spain. *Aquaculture* 102: 219-230.
- Ochoa, C. A. V. (2004). Protocolo para la cría de biomasa de *Artemia* adulta en raceways. *Revista AquaTIC*, 21, 8–15. Retrieved from [http://www.revistaaquatic.com/aquatic/pdf/21\\_02.pdf](http://www.revistaaquatic.com/aquatic/pdf/21_02.pdf)
- Person Le Ruyet, J., Alexandre, J.C., Thebaud, L., & Mugnier, C. (1993). Marine fish larvae feeding: formulated diets or live prey?. *Journal of the World Aquaculture Society* 24: 211-224.
- Planas, M., Silva, C., Quintas, P., Chamorro, A., & Piñero, S. (2016). Ongrowing and enhancement of n-3 HUFA profile in adult *Artemia*: short- vs long-time enrichment. *Journal of Applied Phycology*, 29(3), 1409–1420. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-1016-z>
- Prescott, S. R. (1980). Economics of *Artemia Nauplii* use in Aquaculture. *Proc. World Maricul. Soc.*, 11: 175–180.
- Raj Kumar, G., & Babu, D. E. (2015). Effect of Light, Temperature and salinity on the growth of *Artemia*. *International Journal of Engineering Science Invention*, 4(12), 7–14. <https://doi.org/10.1007/s10811-006-9033-y>

- Ramakrishnan C.M., Haniffa M.A., Manoha M., Dhanaraj M., Arockiaraj A.J., A. S. V. (2008). The Open Access Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgheh Editor-in-Chief Copy Editor Effects of Probiotics and *Spirulina* on Survival and. *Isr J Aquacult*, 60(January), 128–133. Retrieved from <http://hdl.handle.net/10862/1958>
- Reeve, B. Y. M. R. (1963). The filter-feeding of *Artemia*. *Journal of Experimental Biology*, 40, 195–205.
- Reeve, M.R., (1969). The laboratory culture of the prawn *Palaemon serratus*. *Fishery Investigation* 26: 1-38.
- Rollefsen, G. (1939). Artificial rearing of fry of seawater fish. Preliminary communication. *Rapp. Proc.-Verb. Reun. Cons. Perm. Int. Explor. Mer*, 109-133.
- Rottmann, R.W., Shireman, J.V., & Lincoln, E.P. (1991). Comparison of three live foods and two dry diets for intensive culture of grass carp larvae. *Aquaculture* 96: 269-280.
- Royan, J. P. (1976). Effect of light on the hatching and growth of *Artemia salina*. *National Institute of Oceanography*, 9(1 & 2).
- Sato, N. L. (1967). Enzymatic contribution to the encystment of *Artemia salina*. *Science Reports of the Research Institutes Tohoku University*, 33, 319-327.
- Schauer, P.S., Richardson, L.M., & Simpson, K.L. (1979). Nutritional status of marine and juvenile *Menidia menidia* reared on *Artemia salina* and various artificial diets. *European Mariculture Society*. Special Publication 4: 159-176.
- Schauer, P.S., Johns, D.M., Olney, C.E., & Simpson, K.L. (1980). Lipid level, energy content and fatty acid composition of the cysts and newly hatched nauplii from five geographical strains of *Artemia*. En: Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O. y Jaspers, E. (eds.). *The Brine Shrimp Artemia*. Ecology, Culturing, Use in Aquaculture. Universa Press, Wetteren, Bélgica: pp 365-374.
- Seale, A. (1933). The brine shrimp (*Artemia*) as a satisfactory live food for fishes. *Transactions of the American Fisheries Society*, 63(1), 129-130.
- Serfling, S.A., Van Oist, J.C., & Ford, R.F. (1974). An automatic feeding device and the use of live and frozen *Artemia* for culturing larval stages of the American lobster, *Homarus americanus*. *Aquaculture* 3: 311-315.
- Shelbourne, J.E. (1968). The culture of marine fish larvae with special references to the plaice *Pleuronectes platessa* and the sole *Solea solea*. *Thesis. London University*: pp 143.
- Sorgeloos, P. (1973). First report on the triggering effect of light on the hatching mechanism of *Artemia salina* dry cysts. *Marine Biology*, 22(1), 75-76.
- Sorgeloos, P., Bossuyt, E., Laviña, E., Baeza-Mesa, M., & Persoone, G. (1977). Decapsulation of *Artemia* cysts: A simple technique for the improvement of the use of brine shrimp in aquaculture. *Aquaculture*.
- Sorgeloos, P. (1979). The brine shrimp *Artemia salina*: a bottle neck in mariculture?. En: Pillay, T.R.V. y Dill, W.A. (eds). *FAO Technical Conference on Aquaculture*, Kyoto. Fishing News Books, Farnham: pp 321-324.
- Sorgeloos, P. (1980). The use of the brine shrimp *Artemia* in aquaculture. *The Brine Shrimp Artemia*. Vol. 3. Ecology. Culturing. Use in Aquaculture. Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O., & Jaspers, E.. Universa Press, Wetteren, Belgium, 456 p.

- Sorgeloos, P., & Persoone, G. (1982). Perspectives in Maricultural Technologies. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London.*, 307(1499), 363–375.
- Sorgeloos, P., & Van Stappen, G. (1995). *Artemia* cyst shortage: the ARC's point of view. *Larviculture & Artemia Newsletter*, 35, 19.
- Sorgeloos, P., Dhert, P., & Candreva, P. (2001). Use of brine shrimp, *Artemia* spp., in marine fish larviculture. *Aquaculture* 200: 147-159.
- Tejedo, P. (2008). Reflexiones sobre el futuro de las salinas tradicionales. *Jornada Técnica El Patrimonio Cultural de Las Salinas*.
- Theilacker, G.H., & McMaster, M. F. (1971). Mass culture of the Rotifer *Brachionus plicatilis* and his evaluation as a food for larval anchovies. *Marine Biology* 10: 183-188.
- Tizol Correa, R. (1994). Uso de la levadura torula (*Torulopsis utilis*) en la obtención de biomasa de *Artemia*. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras-INVEMAR*, 23(1), 165-171.
- Tlusty, M.F., Goldstein, J.S., & Fiore, D.R. (2005). Hatchery performance of early benthic juvenile American lobsters (*Homarus americanus*) fed enriched frozen adult *Artemia* diets. *Aquaculture Nutrition*, 11: 191-198.
- Treece, G. D. (2000). *Artemia* Production for Marine Larval Fish Culture. *Southern Regional Aquaculture Center Publication*, (702), 1–8.
- Triantaphyllidis, G., Abatzopoulos, T., & Sorgeloos, P. (1998). Review of the biogeography of the genus *Artemia* (Crustacea, Anostraca). *Journal of Biogeography*, 25(2), 213–226. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2699.1998.252190.x>
- Vanhaecke, P., Plateaustraat, J., & Ghent, B.-. (1983). INTEBNATIONAL STUDY ON ARTEMIA' XXX . BIO-ECONOMIC EVALUATION OF THE NIJTRITICNAL VALUE FOB CARP (*CYPRINUS CARPIO L .*) LARVAE OF NINE ARTEMIA STRAINS. *Aquaculture*, 32, 285–293.
- Vanhaecke, P., Tackaert, W., & Sorgeloos, P. (1987). The biogeography of *Artemia*: an updated review. En: Sorgeloos, P., Bengtson D.A., Declair W., & Jaspers, E. (eds.). *Artemia Research and its Applications*. Universa Press, Wetteren, Bélgica: pp 129–155,
- Vanhaecke, P., Vrieze, L. De, Tackaert, W., & Sorgeloos, P. (1990). The Use of Decapsulated Cysts of the Brine Shrimp *Artemia* as Direct Food for Carp *Cyprinus carpio L.* Larvae. *Journal of the World Aquaculture Society*, 21(4), 257–262. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1990.tb00537.x>
- Van Stappen, G. (2005). *Artemia* zoogeography and taxonomy: an up-to-date overview. *Artemia Seminar*, September 2005, Gante, Bélgica.
- Versichele, D., Leger, P., Lavens, P., & Sorgeloos, P. (1991). El uso de *Artemia*. *Acuicultura*, Gilbert Bernabé. Ediciones Omega, S.A., Barcelona: 200-215.
- Volkman, J. K., Jeffrey, S. W., Nichols, P. D., Rogers, G. I., & Garland, C. D. (1989). Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 128(3), 219–240. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(89\)90029-4](https://doi.org/10.1016/0022-0981(89)90029-4)
- Watanabe, T., Oowa, F., Kitajima, C., & Fujita, S. (1980). Relationship between dietary value of Brine Shrimp *Artemia salina* and their content of w3 highly unsaturated fatty acids. *Bulletin of Japanese Society of Scientific Fisheries* 46: 35-41.

- Watanabe, T. (1982). Lipid nutrition in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology* 73: 3-15.
- Watanabe, T. (1988). Nutrition and growth. En: Shepherd C.J., & Bromage N.R. (eds.). *Intensive Fish Farming. BSP Professional Books*, Billing y Sons Ltd, Worcester, Inglaterra: pp 54-197.
- Wheeler, R., Yudin, A. I., & Clark, W. H. (1979). Hatching events in the cysts of *Artemia Salina*. *Aquaculture*, 18(1979), 59–67.
- Wickins, J.F. (1972). The food value of Brine Shrimp *Artemia salina* L., to larvae of the prawn, *Palaemon serratus* Pennant. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 10: 151-170.
- Wikfors, G. H. (2004). Live Feeds in Marine Aquaculture. *Journal of Phycology* (Vol. 40). <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2004.40504.x>
- Yone, Y. (1975). Studies on nutrition of red sea bream. XI. Effect of w3 fatty acid supplementation in a corn oil diet on growth rate and feed efficiency. *Bulletin of Japanese Society of Scientific Fisheries* 41: 73-77.
- Zazurca, S. A. (2018). Mejora del cultivo y del enriquecimiento de metanauplios de *Artemia franciscana* para su aplicación en larvicultura marina. *Trabajo de fin de grado, Universidad Católica de Valencia*.
- Zhang, X., Roman, M., Sanford, A., Adolf, H., Lascara, C., & Burgett, R. (2000). Can an optical plankton counter produce reasonable estimates of zooplankton abundance and biovolume in water with high detritus? *Journal of Plankton Research*, 22(1), 137–150. <https://doi.org/10.1093/plankt/22.1.137>

## 7. ANEXOS

### Encuesta

#### **Necesidades de artemia viva en acuariofilia.**

Mi nombre es J. Jordi Fornés, soy estudiante del Máster Interuniversitario de Acuicultura ofertado por la Universidad Politécnica de Valencia (UPV) y por la Universidad de Valencia (UV). A lo largo de los últimos meses del curso se realiza un trabajo de fin de máster (TFM/Tesina), siendo en el presente caso un trabajo vinculado al Instituto de Acuicultura de Torre la Sal, perteneciente al CSIC (Consejo Superior de Investigaciones Científicas).

La investigación planteada consiste en la realización de un estudio económico y de mercado para determinar las posibilidades de producción, distribución y posible venta al público de alimento vivo para peces de acuariofilia, es decir, intentar determinar cuál es el método de producción más económico dependiendo de las biomásas requeridas, alimento utilizado, enriquecimiento, energía utilizada... y si existe un mercado potencial para este tipo de alimento. El producto que se propone para el estudio es la artemia viva enriquecida, la cual ha sido muy utilizada durante la historia de la acuariofilia para mejorar en gran medida el aporte nutricional para organismos acuáticos en instalaciones de todo tipo (reproducción, larvario, crecimiento...), así como para el mantenimiento de animales salvajes por motivos de conservación, reproducción... en vista a posibles reintroducciones.

Es por esto que el siguiente estudio se realiza para intentar determinar la rentabilidad de una producción que pueda cubrir las necesidades de alimento vivo de una población local en la que la única fuente de este tipo de alimento es el cultivo particular de manera casera, al margen de poder acudir a alguna de las escasas páginas web en las que se ofertan este tipo de productos. Es importante resaltar que sí es posible encontrar, y además de manera abundante, productos de artemia congelada, liofilizada... pero no viva, presentando esta última un mejor aprovechamiento por parte de los organismos acuáticos, ya que estimula su instinto depredador debido a la necesidad natural de capturar el alimento y a que este se distribuye mejor en la columna de agua. Además un proceso más industrializado podría tanto optimizar los sistemas de producción como mejorar la calidad final del producto.

Por tanto, SE RUEGA LA COLABORACIÓN del presente lector, con el estudio, por medio de una encuesta, que intenta abordar y determinar las necesidades del producto que existen en la población tanto a nivel particular como en grandes superficies, además de dar una idea del nivel de conocimiento existente sobre este tipo de alimento y los beneficios que puede aportar.

Todas las encuestas y los datos obtenidos de las mismas serán tratados de manera totalmente anónima, y serán utilizados para tratar de resolver las cuestiones anteriormente planteadas.

Muchas gracias por su colaboración.

Saludos.

PD: Para resolver cualquier duda u obtener más información sobre el estudio, este es mi correo electrónico: [jordifd95@gmail.com](mailto:jordifd95@gmail.com)

**1. ¿Cuál es su relación con la acuariofilia?**

- Acuarios Recreacionales / Ornamentales
- Acuarios de Exposición
- Acuarios de Reproducción (reproductores y/o alevines)
- Venta de animales, equipos, alimentación...
- Otros...

**2. ¿Qué tipo de alimento es el que más se acopla a sus necesidades? (el que más utiliza)**

- Pienso Laminado
- Pienso Extrusionados (granulado)
- Organismos "vivos" congelados
- Organismos "vivos" liofilizados
- Huevos o quistes de organismos "vivos"
- Alimento vivo (sensu stricto)
- Otros...

**3. ¿En el momento de adquirir el alimento para los peces, que es lo primero que tiene en cuenta?**

- Marca
- Calidad
- Precio
- Contenido
- Otros...

**4. ¿Qué cantidad de alimento usa a la semana?**

**5. ¿Qué cantidad de dinero le cuesta el alimento que utiliza semanalmente?**

- Menos de 10€
- Entre 10 y 25€
- Entre 25 y 50€
- Entre 50 y 100€
- Más de 100€
- Otros...

**6. ¿Dónde adquiere el alimento?**

- Internet (páginas web especializadas)
- Particulares
- Tienda de animales
- Asociaciones
- Empresas especializadas
- Otros...

**7. ¿Está satisfecho con el tipo de alimentación que usa?**

- Sí, mucho
- Sí, pero podría ser mejor
- No

**8. ¿Tiene conocimiento sobre la posibilidad de utilizar alimento vivo (rotíferos, artemia, copépodos...) para la alimentación de sus peces?**

- Si
- No

**9. ¿Cree que el alimento vivo beneficiará a sus peces de alguna manera?**

- Sí
- No

**10. ¿Tiene conocimientos sobre la artemia viva enriquecida?**

- Si
- No

**11. ¿Estaría dispuesto a adquirir alimento vivo de alta calidad semanalmente y sin necesidad de una instalación casera?**

- Si
- No

**12. ¿Qué cantidad de alimento vivo cree que necesitaría semanalmente?**

**13. ¿Tendría interés por adquirir nauplios vivos de artemia o artemia adulta?**

- Nauplios de Artemia
- Artemia adulta
- Ambos
- Ninguno

**14. ¿Estaría dispuesto a pagar un precio ligeramente superior al precio que paga actualmente por un producto de mayor calidad para la alimentación de sus peces?**

- Si
- No

**15. ¿Estaría dispuesto a participar en una red de distribución?**

- Si
- No

**16. ¿Qué plataforma creen más accesible para generar dicha red?**

- Grupo de Facebook
- Grupo de WhatsApp (u otra aplicación de mensajería instantánea)
- E-mail
- Página web especializada
- App especializada
- Tiendas animales y/o asociaciones

**MUCHAS GRACIAS POR HABERNOS PRESTADO SU TIEMPO!!**