

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

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

Martha I Millán-Almaraz¹, Diana J López-Peraza^{2*}, Mario Nieves-Soto², Mario M Peraza-Yee¹

¹ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Sinaloa, 80260, Culiacán Rosales, Sinaloa, Mexico.

² Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Autónoma de Sinaloa, 82000 Mazatlán, Sinaloa, Mexico.

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

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

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

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

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



INTRODUCTION

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

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

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

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

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

INTRODUCCIÓN

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

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

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

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

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

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

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

MATERIALS AND METHODS

Microalgal cultures

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

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

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

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

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos de microalgas

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

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

Culture of juvenile *Artemia franciscana*

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

Nutrient bioencapsulation experiment in juvenile *Artemia franciscana*

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

It is important to mention that before the experiment, the intestines were confirmed to be empty by direct observation

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

Cultivo de juveniles de *Artemia franciscana*

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

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

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

Table 1. Lipid concentration in $\text{pg}\cdot\text{cell}^{-1}$ and equivalence in $\text{cell}\cdot\text{mL}^{-1}$ of the microalgae *Thalassiosira weissflogii* (TH-W-1), *Chaetoceros muelleri* (CH-M-1), *Tetraselmis suecica* (TE-S-1), and *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1).

Tabla 1. Concentración de lípidos en $\text{pg}\cdot\text{cel}^{-1}$ y equivalencia en $\text{cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ de las microalgas *Thalassiosira weissflogii* (TH-W-1), *Chaetoceros muelleri* (CH-M-1), *Tetraselmis suecica* (TE-S-1) y *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1).

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

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

Proximal analysis

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

Proteins

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

tanto, considerando el contenido de lípidos de la microalga *Chaetoceros muelleri* (12.84 pg de lípidos $\cdot\text{cel}^{-1}$) y la densidad celular reportada, la dieta isolípídica consistió en $11,556,000 \text{ pg}$ de lípidos $\cdot\text{mL}^{-1}$. Por lo tanto, necesitábamos $77,541 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ de *Thalassiosira weissflogii*, $457,482 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ de *Tetraselmis suecica* y $4,736,065 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ de *Nannochloropsis* sp. para alcanzar esta concentración (Tabla 1).

Es importante mencionar que antes del experimento, se confirmó que los intestinos estaban vacíos mediante observación directa utilizando un microscopio Olympus CH30. El experimento constó de 4 tratamientos, cada uno con una especie de microalga y 4 réplicas, dando como resultado 16 contenedores con microalga + *Artemia*. El control no incluyó microalgas. En total, hubo 20 unidades experimentales, cada una con una densidad de $0.5 \text{ Artemia}\cdot\text{mL}^{-1}$. Las unidades experimentales estuvieron compuestas por recipientes plásticos de paredes transparentes, cada uno con un volumen útil de 14 L. Durante el experimento, la salinidad (35 ups), temperatura (25°C), aireación y oscuridad (recipientes protegidos de la luz con cortinas negras) se mantuvieron constantes. Al inicio (0 h) y al final (6 h) del experimento, se tomaron muestras de juveniles de *A. franciscana* para determinar la composición proximal de proteínas, carbohidratos y lípidos, así como la concentración de clorofila *a* y *b* y contenido total de carotenoides.

Análisis proximal

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

Proteínas

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

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

Carbohydrates

The filters containing the samples were placed in centrifuge tubes, and 2 mL of 1 M H_2SO_4 was added to each tube. Afterward, the filters were macerated, and 2 mL of 1 M H_2SO_4 was added. The tubes were covered with aluminum foil and placed in a water bath at 100 °C for 60 min. Subsequently, the samples were mixed and centrifuged at $3,220 \times g$ for 15 min.

After centrifugation, 1 mL of the supernatant from each tube was taken and placed in a test tube, and 1 mL of 5% phenol solution was added. After resting for 40 min, 5 mL of concentrated sulfuric acid was added slowly and mixed until the samples turned yellow. Finally, a 1-cm quartz cell was used to read the samples in the Hach DR5000 spectrophotometer at a wavelength of 485 nm.

Lipids

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

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

Chlorophyll and total carotenoid analysis

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

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

Carbohidratos

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

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

Lípidos

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

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

$$\text{Chla} = 11.75 A_{662} - 2.350 A_{645}, \quad (1)$$

$$\text{Chlb} = 18.61 A_{645} - 3.960 A_{662}, \quad (2)$$

$$\text{TC} = 1,000 A_{470} - 2.270 \text{Chla} - 81.4 \text{Chlb}/227, \quad (3)$$

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

Statistical analysis

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

RESULTS

Proximal analysis of microalgae

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

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

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

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

Análisis de clorofilas y carotenoides totales

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

$$\text{Cla} = 11.75 A_{662} - 2.350 A_{645}, \quad (1)$$

$$\text{Clb} = 18.61 A_{645} - 3.960 A_{662}, \quad (2)$$

$$\text{CT} = 1,000 A_{470} - 2.270 \text{Cla} - 81.4 \text{Clb}/227, \quad (3)$$

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

Análisis estadístico

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

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

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

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

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

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

RESULTADOS

Análisis proximal de microalgas

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

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

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

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

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

Table 2. Proteins, carbohydrates, and lipids in mg·g⁻¹ of dry weight of the microalgae *Thalassiosira weissflogii* (TH-W-1), *Chaetoceros muelleri* (CH-M-1), *Tetraselmis suecica* (TE-S-1), and *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1) during their exponential phase. Results are mean values ± standard error ($n = 4$).

Tabla 2. Proteínas, carbohidratos y lípidos en mg·g⁻¹ de peso seco de las microalgas *Thalassiosira weissflogii* (TH-W-1), *Chaetoceros muelleri* (CH-M-1), *Tetraselmis suecica* (TE-S-1) y *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1) durante su fase exponencial. Los resultados son valores promedio ± error estándar ($n = 4$).

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

Equal letters indicate that there are no significant differences between species ($P > 0.05$).

Table 3. Chlorophyll *a* (Chla), chlorophyll *b* (Chlb), and total carotenoids (TC) shown as $\text{pg}\cdot\text{ng}^{-1}$ of dry weight (DW) of the microalgae *Thalassiosira weissflogii* (TH-W-1), *Chaetoceros muelleri* (CH-M-1), *Tetraselmis suecica* (TE-S-1), and *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1) cultured during their exponential phase. Results are mean values \pm standard error ($n = 4$).

Tabla 3. Clorofila *a* (Chla), clorofila *b* (Chlb) y carotenoides totales (TC) presentados como $\text{pg}\cdot\text{ng}^{-1}$ de peso seco (DW) de las microalgas *Thalassiosira weissflogii* (TH-W-1), *Chaetoceros muelleri* (CH-M-1), *Tetraselmis suecica* (TE-S-1) y *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1) cultivadas durante su fase exponencial. Los resultados son valores promedio \pm error estándar ($n = 4$).

Unit	TH-W-1	CH-M-1	TE-S-1	NN-X-1
Chlorophyll <i>a</i>				
pg Chla·ng ⁻¹ DW	8.93 \pm 0.41 ^a	7.50 \pm 0.54 ^a	12.59 \pm 1.42 ^b	7.60 \pm 0.72 ^a
Chlorophyll <i>b</i>				
*pg Chlb·ng ⁻¹ DW	1.02 \pm 0.08 ^b	0.76 \pm 0.05 ^a	3.64 \pm 0.46 ^c	2.45 \pm 0.26 ^c
Total carotenoids				
pg TC·ng ⁻¹ DW	1.96 \pm 0.12 ^a	2.98 \pm 0.18 ^b	3.72 \pm 0.40 ^b	1.61 \pm 0.14 ^a

Equal letters indicate that there are no significant differences between the species per unit of measure ($P > 0.05$).

* Non-parametric test.

DISCUSSION

Microalgae proximal composition, concentration of chlorophyll *a* and *b*, and total carotenoid content

As expected, diatoms present lower concentrations of organic matter than green microalgae because they possess frustules with higher percentages of inorganic matter. However, no trend has been observed in which proteins, carbohydrates, and lipids exhibited lower values in diatoms than in other species, as observed by Renaud et al. (1999). In this study, only the protein content was higher in green microalgae than in diatoms.

The protein content of TH-W-1 (244.70 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) was similar to the value of 289 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ reported by García et al. (2012). Regarding the protein content of CH-M-1, our value was lower than that reported by Carbajal-López (2008) for *Chaetoceros calcitrans*, while our values for TE-S-1 and NN-X-1 were higher than those reported by the same author (274.57 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ for TE-S-1 and 169.34 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ for *Nannochloropsis oculata*). These differences could be due to the different microalgae species, media (e.g., Carbajal-López [2008] used f/2 medium), or methodologies employed between studies.

Similarly, these reasons may also explain the differences observed in carbohydrate and lipid content. The carbohydrate content obtained in this study for TH-W-1 (185.57 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) was similar to the value of 207.00 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ reported by García et al. (2012) for the same species. On the other hand, Carbajal-López (2008) reported carbohydrate content of 42.55 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ for *C. calcitrans*, 22.25 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ for

(11.90 $\mu\text{g}\cdot\text{org}^{-1}$) y carbohidratos (8.70 $\mu\text{g}\cdot\text{org}^{-1}$), los cuales fueron significativamente mayores ($P < 0.05$) que los de los otros tratamientos. Por otro lado, los tratamientos TH-W-1 y TE-S-1 mostraron mayores porcentajes de proteínas (53.36% y 54.11%) y carbohidratos (11.32% y 11.45%), mientras que TE-S-1 exhibió un mayor porcentaje de lípidos (15.66%; $P < 0.05$).

Clorofila *a* y *b* y carotenoides totales en juveniles de *Artemia franciscana*

Después de 6 h de alimentación, todos los organismos tuvieron concentraciones de pigmentos más altas que el control (Tabla 5), pero los juveniles alimentados con TH-W-1 mostraron concentraciones más altas de clorofila *a* (0.482 $\text{ng Cl}\cdot\mu\text{g}^{-1}$ PS) y carotenoides totales (0.345 $\text{ng CT}\cdot\mu\text{g}^{-1}$ PS; $P < 0.05$). Los alimentados con TE-S-1 exhibieron el valor más alto de clorofila *b* (0.131 $\text{ng Clb}\cdot\mu\text{g}^{-1}$ PS).

DISCUSIÓN

Composición proximal de microalgas, concentración de clorofila *a* y *b* y contenido total de carotenoides

Como es de esperar, las diatomeas presentan menores concentraciones de materia orgánica que las microalgas verdes debido a que poseen frústulas con mayores porcentajes de materia inorgánica. Sin embargo, no se ha observado una tendencia en la que las proteínas, carbohidratos y lípidos exhiban valores más bajos en las diatomeas que en otras especies, como observaron Renaud et al. (1999). En

Table 4. Proteins, lipids, and carbohydrates ($\mu\text{g}\cdot\text{org}^{-1}$ and percentages) based on the dry weight of *Artemia franciscana* juveniles at the beginning (0 h) and after (6 h) feeding them with *Thalassiosira weissflogii* (TH-W-1), *Chaetoceros muelleri* (CH-M-1), *Tetraselmis suecica* (TE-S-1), and *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1). Results are mean values \pm standard error ($n = 4$).

Tabla 4. Proteínas, lípidos y carbohidratos ($\mu\text{g}\cdot\text{org}^{-1}$ y porcentajes) con base al peso seco de los juveniles de *Artemia franciscana* al inicio (0 h) y después (6 h) de alimentarlos con *Thalassiosira weissflogii* (TH-W-1), *Chaetoceros muelleri* (CH-M-1), *Tetraselmis suecica* (TE-S-1) y *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1). Los resultados son valores promedio \pm error estándar ($n = 4$).

Determination	Initial	Control	TH-W-1	CH-M-1	TE-S-1	NN-X-1
Concentrations in $\mu\text{g}\cdot\text{org}^{-1}$						
Proteins	30.01 \pm 0.22	27.89 \pm 0.19 ^a	37.89 \pm 0.25 ^c	39.79 \pm 0.34 ^d	41.12 \pm 0.31 ^c	34.33 \pm 0.25 ^b
*Lipids	5.55 \pm 0.04	5.11 \pm 0.03 ^a	9.76 \pm 0.06 ^c	11.15 \pm 0.14 ^d	11.90 \pm 0.07 ^c	7.58 \pm 0.06 ^b
Carbohydrates	5.40 \pm 0.02	4.92 \pm 0.02 ^a	8.04 \pm 0.05 ^d	7.46 \pm 0.03 ^c	8.70 \pm 0.03 ^c	6.68 \pm 0.05 ^b
Percentages						
Proteins	44.54 \pm 0.25	43.56 \pm 0.17 ^a	53.36 \pm 0.68 ^d	47.02 \pm 0.52 ^b	54.11 \pm 0.73 ^d	49.30 \pm 0.47 ^c
*Lipids	8.24 \pm 0.04	7.98 \pm 0.04 ^a	13.74 \pm 0.24 ^c	13.18 \pm 0.23 ^c	15.66 \pm 0.19 ^d	10.88 \pm 0.11 ^b
Carbohydrates	8.01 \pm 0.02	7.68 \pm 0.03 ^a	11.32 \pm 0.17 ^d	8.81 \pm 0.06 ^b	11.45 \pm 0.15 ^d	9.59 \pm 0.09 ^c

Different letters indicate significant differences between treatments ($P < 0.05$). *Non-parametric test.

Table 5. Chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, and total carotenoids in $\text{ng}\cdot\mu\text{g}^{-1}$ dry weight (DW) of the juveniles of *Artemia franciscana* at the beginning (0 h) and after (6 h) feeding them with the microalgae *Thalassiosira weissflogii* (TH-W-1), *Chaetoceros muelleri* (CH-M-1), *Tetraselmis suecica* (TE-S-1), and *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1). Results are mean values \pm standard error ($n = 4$).

Tabla 5. Clorofila *a*, clorofila *b* y carotenoides totales en $\text{ng}\cdot\mu\text{g}^{-1}$ peso seco (DW) de los juveniles de *Artemia franciscana* al inicio (0 h) y después (6 h) de alimentarlos con las microalgas *Thalassiosira weissflogii* (TH-W-1), *Chaetoceros muelleri* (CH-M-1), *Tetraselmis suecica* (TE-S-1) y *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1). Los resultados son valores promedio \pm error estándar ($n = 4$).

Determination	Initial	Control	TH-W-1	CH-M-1	TE-S-1	NN-X-1
Concentrations in $\text{ng}\cdot\mu\text{g}^{-1}$ DW						
*Chlorophyll <i>a</i>	0.010 \pm 0.000	0.010 \pm 0.001 ^a	0.482 \pm 0.009 ^c	0.437 \pm 0.002 ^d	0.248 \pm 0.006 ^c	0.193 \pm 0.002 ^b
Chlorophyll <i>b</i>	0.005 \pm 0.000	0.004 \pm 0.000 ^a	0.102 \pm 0.004 ^c	0.081 \pm 0.002 ^b	0.131 \pm 0.004 ^c	0.121 \pm 0.003 ^d
*Total carotenoids	0.050 \pm 0.001	0.043 \pm 0.001 ^a	0.345 \pm 0.002 ^d	0.328 \pm 0.001 ^c	0.229 \pm 0.006 ^b	0.228 \pm 0.004 ^b

Different letters indicate significant differences between treatments ($P < 0.05$). * Non-parametric test.

TE-S-1, and 18.96 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ for *N. oculata*, which are lower than those reported in this study. The lipid content of TH-W-1 (117.99 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) in our study was lower than that reported by García et al. (2012), which may also be due to the differences in culture conditions between studies (e.g., different media, temperatures, and salinities). However, the lipid concentrations of CH-M-1 and TE-S-1 in this study were higher than those of Carbajal-López (2008) for *C. calcitrans* (103.27 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) and TE-S-1 (86.63 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$). Lastly, the lipid content of NN-X-1 in this study was similar to that reported by Carbajal-López (2008) for *N. oculata*.

este estudio, sólo el contenido de proteínas fue mayor en las microalgas verdes que en las diatomeas.

El contenido de proteína de TH-W-1 (244.70 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) fue similar al valor de 289 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ reportado por García et al. (2012). En cuanto al contenido de proteína de CH-M-1, nuestro valor fue inferior al reportado por Carbajal-López (2008) para *Chaetoceros calcitrans*, mientras que nuestros valores para TE-S-1 y NN-X-1 fueron superiores a los reportados por el mismo autor (274.57 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ para TE-S-1 y 169.34 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ para *Nannochloropsis oculata*). Estas diferencias podrían deberse a las diferentes especies de microalgas,

In this study, chlorophyll *a* was the most abundant compound in all species of microalgae, while chlorophyll *b* was the second most abundant compound in green microalgae. These results agree with those of Jeffrey and Wright (2005). Although it was not evaluated in this study, chlorophyll *c*, in addition to the 2 chlorophyll types mentioned above, is found in many groups of marine algae, including diatoms, brown algae, and dinoflagellates (Zapata et al. 2006). In this study, the concentration of chlorophyll *a* in TH-W-1 (8.93 pg Chl*a*·ng⁻¹ DW) was higher than those reported by Saxena et al. (2022), who recorded concentrations ranging from 2.79 to 6.01 pg Chl*a*·ng⁻¹ DW for this species. Similarly, Saxena et al. (2022) reported chlorophyll *a* values that ranged from 2.60 to 4.16 pg Chl*a*·ng⁻¹ DW for *Chaetoceros gracilis*. These concentrations were lower than those recorded in this study (7.50 pg Chl*a*·ng⁻¹ DW for CH-M-1). The concentration of total carotenoids for TH-W-1 (1.96 pg TC·ng⁻¹ DW) in this study was similar to that reported by Bhattacharjya et al. (2020) for *Thalassiosira* sp. (1.50 pg TC·ng⁻¹ DW). The concentration of total carotenoids for CH-M-1 (2.98 pg TC·ng⁻¹ DW) in this study was higher than that found by Goiris et al. (2012), who reported a value of 2.33 pg TC·ng⁻¹ DW for samples of lyophilized biomass of *C. calcitrans*.

Few studies have reported chlorophyll *b* content in diatoms. However, Ju et al. (2009), who worked with *Thalassiosira weissflogii*, and Wang et al. (2019), who analyzed *Phaeodactylum tricornutu*, reported concentrations lower than those obtained in this study. In the case of Ju et al. (2009), these differences may be due to the different procedures used to obtain and analyze the samples. With regard to Wang et al. (2019), these differences may be due to the different species, culture media, and temperatures employed, as well as the different light/dark cycles or exposure to 5 p-chloroaniline concentrations.

The chlorophyll *a* content of TE-S-1 (12.59 pg Chl*a*·ng⁻¹ DW) was similar to the concentrations obtained by Abiusi et al. (2013), who cultivated the same species for 9 days using LEDs of different colors and reported values of 7.00 to 16.00 pg Chl*a*·ng⁻¹ DW. Nevertheless, the content of chlorophyll *b* (3.64 pg Chl*b*·ng⁻¹ DW) and total carotenoids (3.72 pg TC·ng⁻¹ DW) obtained in the present study were lower than those recorded by the authors mentioned above, who reported values ranging from 6.00 to 13.00 pg·ng⁻¹ DW for chlorophyll *b* and 6.00 pg·ng⁻¹ DW for total carotenoids.

Regarding the pigment concentrations, the chlorophyll *a* content (7.60 pg Chl*a*·ng⁻¹ DW) for NN-X-1 obtained in this study was higher than that reported by Ra et al. (2018), who reported values of 4.00 to 6.00 pg Chl*a*·ng⁻¹ DW for *Nannochloropsis oceanica*, although the value in this study was similar to that obtained for *N. salina* (6.00 to 10.00 pg Chl*a*·ng⁻¹ DW). Ra et al. (2018) evaluated the effects of mixed wavelengths of white and green light from LEDs on microalgae. However, the concentration of chlorophyll *b*

medios (e.g., Carbajal-López [2008] usó medio f/2) o metodologías empleadas entre los estudios.

De manera similar, estas razones también pueden explicar las diferencias observadas en el contenido de carbohidratos y lípidos. El contenido de carbohidratos obtenido en este estudio para TH-W-1 (185.57 mg·g⁻¹) fue similar al valor de 207.00 mg·g⁻¹ reportado por García et al. (2012) para la misma especie. Por otro lado, Carbajal-López (2008) reportó un contenido de carbohidratos de 42.55 mg·g⁻¹ para *C. calcitrans*, 22.25 mg·g⁻¹ para TE-S-1 y 18.96 mg·g⁻¹ para *N. oculata*, que son inferiores a los reportados en este estudio. El contenido lipídico de TH-W-1 (117.99 mg·g⁻¹) en nuestro estudio fue inferior al reportado por García et al. (2012), lo que también puede deberse a las diferencias en las condiciones de cultivo entre los estudios (e.g., diferentes medios, temperaturas y salinidades). Sin embargo, las concentraciones de lípidos de CH-M-1 y TE-S-1 en este estudio fueron superiores a las de Carbajal-López (2008) para *C. calcitrans* (103.27 mg·g⁻¹) y TE-S-1 (86.63 mg·g⁻¹). Por último, el contenido de lípidos de NN-X-1 en este estudio fue similar al reportado por Carbajal-López (2008) para *N. oculata*.

En este estudio, la clorofila *a* fue el compuesto más abundante en todas las especies de microalgas, mientras que la clorofila *b* fue el segundo compuesto más abundante en las microalgas verdes. Estos resultados concuerdan con los de Jeffrey y Wright (2005). Aunque no fue evaluada en este estudio, la clorofila *c*, además de los 2 tipos de clorofila mencionados anteriormente, se encuentra en muchos grupos de algas marinas, incluidas las diatomeas, las algas pardas y los dinoflagelados (Zapata et al. 2006). En este estudio, la concentración de clorofila *a* en TH-W-1 (8.93 pg Chl*a*·ng⁻¹ PS) fue superior a las reportadas por Saxena et al. (2022), quienes registraron concentraciones que oscilaron entre 2.79 y 6.01 pg Chl*a*·ng⁻¹ PS para esta especie. De manera similar, Saxena et al. (2022) reportaron valores de clorofila *a* que oscilaron entre 2.60 y 4.16 pg Chl*a*·ng⁻¹ PS para *Chaetoceros gracilis*. Estas concentraciones fueron inferiores a las registradas en este estudio (7.50 pg Chl*a*·ng⁻¹ PS para CH-M-1). La concentración de carotenoides totales para TH-W-1 (1.96 pg CT·ng⁻¹ PS) en este estudio fue similar a la reportada por Bhattacharjya et al. (2020) para *Thalassiosira* sp. (1.50 pg CT·ng⁻¹ PS). La concentración de carotenoides totales para CH-M-1 (2.98 pg CT·ng⁻¹ PS) en este estudio fue superior a la encontrada por Goiris et al. (2012), quienes reportaron un valor de 2.33 pg CT·ng⁻¹ PS para muestras de biomasa liofilizada de *C. calcitrans*.

Pocos estudios han informado del contenido de clorofila *b* en las diatomeas. Sin embargo, Ju et al. (2009), quienes trabajaron con *Thalassiosira weissflogii*, y Wang et al. (2019), quienes analizaron *Phaeodactylum tricornutu*, reportaron concentraciones inferiores a las obtenidas en este estudio. En el caso de Ju et al. (2009), estas diferencias pueden deberse a diferentes procedimientos utilizados para obtener y analizar las muestras. Respecto a Wang et al. (2019), estas diferencias pueden deberse a las diferentes especies, medios de cultivo

(2.45 pg Chl b ·ng $^{-1}$ DW) in this study was higher than that obtained by those authors, who reported chlorophyll b concentrations lower than 2.00 Chl b ·ng $^{-1}$ DW in both species. Moreover, the concentration of total carotenoids (1.61 pg TC·ng $^{-1}$ DW) in this study was similar to that reported by Goiris et al. (2012), who reported a total carotenoid concentration of 1.65 pg TC·ng $^{-1}$ DW in *N. oculata*.

Temperature and light intensity are key factors affecting the productivity of microalgae (Hindersin et al. 2014). In addition, nitrogen and phosphorus supplementation influences the synthesis of biochemical components of cultured algae (Rasdi and Qin 2015). For example, nitrogen and phosphorus limitation in algal culture media promotes lipid accumulation (Franz et al. 2013), whereas excess temperature or light induces carotenoid synthesis (Panis and Carreon 2016). Diatoms in the exponential and stationary phases of harvest contain more fatty acids than green microalgae or blue-green microalgae (Wongrat 1995). In the case of carotenoids, some microalgae strains accumulate the highest cellular concentrations of carotenoids in the mid-late exponential phase of growth (Gómez-Loredo et al. 2016).

Proximal composition, chlorophylls, and total carotenoid content in juvenile *Artemia franciscana*

Juvenile *A. franciscana* fed with the isolipidic diets of TH-W-1, CH-M-1, TE-S-1, and NN-X-1 presented higher protein, carbohydrate, and lipid concentrations and percentages than those in the control. However, juveniles fed with TE-S-1 exhibited higher concentrations and percentages of proteins, carbohydrates, and lipids than those fed with the other microalgal species, which agrees with the proximal composition of TE-S-1. In contrast, juvenile *A. franciscana* fed with NN-X-1 presented the lowest concentrations of proteins, carbohydrates, and lipids per organism when compared to the juveniles fed with the other microalgae, which may be because *Artemia* nauplii cannot digest *Nannochloropsis* species because of their rigid cell walls (Gerken et al. 2013).

The protein percentage of the juveniles fed the TE-S-1 diet (54.11%) in this study was similar to that found by Maldonado-Montiel and Rodríguez-Canché (2005), who reported a percentage of 53.1% for adult *Artemia* sp. fed with the same microalgae. In another study, Shanmugam and Rajendran (2018) obtained 55.55% protein in adult *A. franciscana* fed *Chaetoceros* sp., which is higher than that found in this study with the microalgae *Chaetoceros muelleri* (47.02%). The lipid percentage reported by Shanmugam and Rajendran (2018) of 19.38% for adult *A. franciscana* fed *Chaetoceros* sp. was higher than that found in this study for juvenile *Artemia* fed with *Chaetoceros muelleri* (13.18%). However, these authors reported a lipid percentage (16.06%) in organisms fed with *Tetraselmis* sp., which was similar to that obtained in this study in juveniles fed *Tetraselmis suecica* (15.66%). Sánchez-Saavedra and Paniagua-Chávez (2017)

y temperaturas empleadas, así como a los diferentes ciclos de luz/oscuridad o a la exposición a 5 concentraciones de *p*-cloroanilina.

El contenido de clorofila a de TE-S-1 (12.59 pg Cl a ·ng $^{-1}$ PS) fue similar a las concentraciones obtenidas por Abiusi et al. (2013), quienes cultivaron la misma especie durante 9 días utilizando LED de diferentes colores y reportaron valores de 7.00 a 16.00 pg Cl a ·ng $^{-1}$ PS. Sin embargo, el contenido de clorofila b (3.64 pg Cl b ·ng $^{-1}$ PS) y carotenoides totales (3.72 pg CT·ng $^{-1}$ PS) obtenidos en el presente estudio fueron inferiores a los registrados por los autores mencionados anteriormente, quienes reportaron valores que oscilaron entre 6.00 y 13.00 pg·ng $^{-1}$ PS para clorofila b y 6.00 pg·ng $^{-1}$ PS para carotenoides totales.

En cuanto a las concentraciones de pigmentos, el contenido de clorofila a (7.60 pg Cl a ·ng $^{-1}$ PS) para NN-X-1 obtenido en este estudio fue superior al reportado por Ra et al. (2018), quienes reportaron valores de 4.00 a 6.00 pg Cl a ·ng $^{-1}$ PS para *Nannochloropsis oceanica*, aunque el valor en este estudio fue similar al obtenido para *N. salina* (6.00 a 10.00 pg Cl a ·ng $^{-1}$ PS). Ra et al. (2018) evaluaron los efectos de longitudes de onda mixtas de luz LED blanca y verde en microalgas. Sin embargo, la concentración de clorofila b (2.45 pg Cl b ·ng $^{-1}$ PS) en este estudio fue superior a la obtenida por esos autores, quienes reportaron concentraciones de clorofila b inferiores a 2.00 Cl b ·ng $^{-1}$ PS en ambas especies. Además, la concentración de carotenoides totales (1.61 pg CT·ng $^{-1}$ PS) en este estudio fue similar a la reportada por Goiris et al. (2012), quienes reportaron una concentración total de carotenoides de 1.65 pg CT·ng $^{-1}$ PS en *N. oculata*.

La temperatura y la intensidad de la luz son factores clave que afectan la productividad de las microalgas (Hindersin et al. 2014). Además, la suplementación con nitrógeno y fósforo influye en la síntesis de componentes bioquímicos de las algas cultivadas (Rasdi y Qin 2015). Por ejemplo, la limitación de nitrógeno y fósforo en los medios de cultivo de algas promueve la acumulación de lípidos (Franz et al. 2013), mientras que el exceso de temperatura o luz induce la síntesis de carotenoides (Panis y Carreon 2016). Las diatomeas en las fases exponencial y estacionaria de cosecha contienen más ácidos grasos que las microalgas verdes o las microalgas verde azules (Wongrat 1995). En el caso de los carotenoides, algunas cepas de microalgas acumulan las mayores concentraciones celulares de carotenoides en la fase exponencial media-tardía de crecimiento (Gómez-Loredo et al. 2016).

Composición proximal, clorofilas y contenido total de carotenoides en juveniles de *Artemia franciscana*

Los juveniles de *A. franciscana* alimentados con las dietas isolipídicas de TH-W-1, CH-M-1, TE-S-1 y NN-X-1 presentaron concentraciones y porcentajes de proteínas, carbohidratos y lípidos mayores que los del control. Sin embargo, los juveniles alimentados con TE-S-1 exhibieron concentraciones y porcentajes más altos de proteínas, carbohidratos

reported a carbohydrate percentage of 18.83% for adult *A. franciscana* fed with *Chaetoceros muelleri*, which is higher than that obtained in this study for juveniles fed with the same species (8.81%). Nevertheless, Shanmugam and Rajendran (2018) reported a carbohydrate percentage of 15.11% (based on dry weight) for organisms fed *Tetraselmis* sp., which is similar to the value reported in this study (11.45%) in juvenile *A. franciscana* fed *Tetraselmis suecica*.

The total carotenoid content in *A. franciscana* juveniles in this study was higher than those reported by Cheban et al. (2020), who obtained values of 0.06 to 0.18 ng TC· μg^{-1} DW in *Artemia salina* nauplii enriched with the microalgae *Desmodesmus armatus*, *Chlorella vulgaris*, and *Dunaliella viridis* for 24 h. In contrast, the concentrations in this study were lower than those obtained by Abdollahi et al. (2019), who reported a value of 0.88 ng TC· μg^{-1} DW for adult *A. franciscana* enriched for 4 h with β -carotene from *Dunaliella salina*. No references were found reporting the chlorophyll concentration in crustaceans or possible functions. However, antioxidant activity that prevents oxidative DNA damage and lipid peroxidation is a beneficial effect of chlorophyll (Pangestuti and Kim 2011).

High-quality meals, such as *Artemia* enriched with microalgae, are crucial for the success of fish larvae cultures, as these diets provide the nutritional elements needed to support the lifespans, ideal growth, and immune systems of fish (Madkour et al. 2022). In this sense, *Artemia* juveniles enriched with carotenoids from microalgae, such as those evaluated in the present study, can also serve as food for ornamental fish, such as *Xiphophorus maculatus*, given that supplementing their diets with carotenoids improves coloration and mucosal immune responses (Abdollahi et al. 2019). In addition, Pérez-Rodríguez et al. (2018) studied the effects of feeding *M. americanum* larvae a diet of *Artemia* enriched with *C. calcitrans* microalgae, reporting that the overall growth, growth rate, and survival improved.

In conclusion, positive effects were observed in the proximal composition, concentration of chlorophyll *a* and *b*, and total carotenoid content of juvenile *A. franciscana* fed different microalgae species after 6 h. Organisms fed with *Tetraselmis suecica* exhibited the best results in terms of proximal composition and chlorophyll *b* content, while those fed diets of *Thalassiosira weissflogii* and *Chaetoceros muelleri* presented the best results in terms of total carotenoid and chlorophyll *a* content.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank CONACYT for a scholarship (#424079) and the project PRO_A7_041 of the Program for the Promotion and Support of Research Projects (PROFAPI) 2022.

All coauthors agree with its publication and made significant contributions; there is no conflict of interest.

Copyediting by MacTavish Scientific Editing.

y lípidos que aquellos alimentados con otras especies de microalgas, lo que concuerda con la composición proximal de TE-S-1. En contraste, los juveniles de *A. franciscana* alimentados con NN-X-1 presentaron las concentraciones más bajas de proteínas, carbohidratos y lípidos por organismo en comparación con los juveniles alimentados con las otras microalgas, lo que puede deberse a que los nauplios de *Artemia* no pueden digerir las especies de *Nannochloropsis* debido a sus rígidas paredes celulares (Gerken et al. 2013).

El porcentaje de proteína de los juveniles alimentados con la dieta TE-S-1 (54.11%) en este estudio fue similar al encontrado por Maldonado-Montiel y Rodríguez-Canché (2005), quienes reportaron un porcentaje de 53.1% para los adultos de *Artemia* sp. alimentados con la misma microalga. En otro estudio, Shanmugam y Rajendran (2018) obtuvieron un 55.55% de proteína en adultos de *A. franciscana* alimentados con *Chaetoceros* sp., valor superior al encontrado en este estudio con la microalga *Chaetoceros muelleri* (47.02%). El porcentaje de lípidos reportado por Shanmugam y Rajendran (2018) del 19.38% para adultos de *A. franciscana* alimentados con *Chaetoceros* sp. fue superior al encontrado en este estudio para juveniles de *Artemia* alimentados con *Chaetoceros muelleri* (13.18%). Sin embargo, estos autores reportaron un porcentaje de lípidos (16.06%) en organismos alimentados con *Tetraselmis* sp., similar al obtenido en este estudio en juveniles alimentados con *Tetraselmis suecica* (15.66%). Sánchez-Saavedra y Paniagua-Chávez (2017) reportaron un porcentaje de carbohidratos del 18.83% para adultos de *A. franciscana* alimentados con *Chaetoceros muelleri*, el cual es superior al obtenido en este estudio para juveniles alimentados con la misma especie (8.81%). Sin embargo, Shanmugam y Rajendran (2018) reportaron un porcentaje de carbohidratos del 15.11% (basado en peso seco) para organismos alimentados con *Tetraselmis* sp., que es similar al valor reportado en este estudio (11.45%) en juveniles de *A. franciscana* alimentados con *Tetraselmis suecica*.

El contenido total de carotenoides en juveniles de *A. franciscana* de este estudio fue mayor que los reportados por Cheban et al. (2020), quienes obtuvieron valores de 0.06 a 0.18 ng CT· μg^{-1} PS en nauplios de *Artemia salina* enriquecidos con las microalgas *Desmodesmus armatus*, *Chlorella vulgaris* y *Dunaliella viridis* durante 24 h. Por el contrario, las concentraciones en este estudio fueron inferiores a las obtenidas por Abdollahi et al. (2019), quienes reportaron un valor de 0.88 ng CT· μg^{-1} PS para adultos de *A. franciscana* enriquecidos durante 4 h con β -caroteno de *Dunaliella salina*. No se encontraron referencias que reporten la concentración de clorofila en crustáceos ni sus posibles funciones. Sin embargo, la actividad antioxidante que previene el daño oxidativo del ADN y la peroxidación lipídica es un efecto beneficioso de la clorofila (Pangestuti y Kim 2011).

Los alimentos de alta calidad, como *Artemia* enriquecida con microalgas, son cruciales para el éxito de los cultivos de larvas de peces, ya que estas dietas proporcionan los elementos nutricionales necesarios para respaldar

REFERENCES

- Abdollahi Y, Ahmadifard N, Agh N, Rahmanifarah K, Amin-Hejazi M. 2019. β -Carotene-enriched *Artemia* as a natural carotenoid improved skin pigmentation and enhanced the mucus immune responses of platyfish *Xiphophorus maculatus*. *Aquac Int.* 27(6):1847-1858. <https://doi.org/10.1007/s10499-019-00437-8>
- Abiusi F, Sampietro G, Marturano G, Biondi N, Rodolfi L, D'Ottavio M, Tredici MR. 2013. Growth, photosynthetic efficiency, and biochemical composition of *Tetraselmis suecica* F&M-M33 grown with LEDs of different colors. *Biotechnol Bioeng.* 111(5):956-964. <https://doi.org/10.1002/bit.25014>
- Ahmed F, Fanning K, Netzel M, Turner W, Li Y, Schenk PM. 2014. Profiling of carotenoids and antioxidant capacity of microalgae from subtropical coastal and brackish waters. *Food Chem.* 165:300-306. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.107>
- Aranda-Burgos JA, da Costa F, Nóvoa S, Ojea J, Martínez-Patiño D. 2014. Effects of microalgal diet on growth, survival, biochemical and fatty acid composition of *Ruditapes decussatus* larvae. *Aquaculture.* 420–421:38-48. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.10.032>
- Azimirad M, Meshkini S, Ahmadifard N, Hoseinifar SH. 2016. The effects of feeding with synbiotic (*Pediococcus acidilactici* and fructooligosaccharide) enriched adult *Artemia* on skin mucus immune responses, stress resistance, intestinal microbiota and performance of angelfish (*Pterophyllum scalare*). *Fish Shellfish Immunol.* 54:516-522. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.05.001>
- Bhattacharjya R, Marella TK, Tiwari A, Saxena A, Singh PK, Mishra B. 2020. Bioprospecting of marine diatoms *Thalassiosira*, *Skeletonema* and *Chaetoceros* for lipids and other value-added products. *Bioresour Technol.* 318:124073. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124073>
- Bhuvaneshwari M, Thiagarajan V, Nemade P, Chandrasekaran N, Mukherjee A. 2018. Toxicity and trophic transfer of P25 TiO₂ NPs from *Dunaliella salina* to *Artemia salina*: effect of dietary and waterborne exposure. *Environ Res.* 160:39-46. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.09.022>
- Bligh EG, Dyer WJ. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.* 37(8):911-917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>
- Carbajal-López A. 2008. Producción en masa del rotífero *Brachionus plicatilis* alimentado con 4 diferentes microalgas, para su uso como alimento vivo de larvas de peces marinos. [Mass production of *Brachionus plicatilis* rotifer fed with 4 different microalgae, for use as live food for marine fish larvae] [BSc thesis]. [Guadalajara (Jalisco, Mexico)]: Universidad de Guadalajara. 48 p.
- Chaisutyakorn P, Praiboon J, Kaewsuralikhit C. 2018. The effect of temperature on growth and lipid and fatty acid composition on marine microalgae used for biodiesel production. *J Appl Phycol.* 30:37-45. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1186-3>
- Chakraborty RD, Chakraborty K, Radhakrishnan EV. 2007. Variation in fatty acid composition of *Artemia salina* nauplii enriched with microalgae and baker's yeast for use in larviculture. *J Agric Food Chem.* 55(10):4043-4051. <https://doi.org/10.1021/jf0636541>
- Cheban L, Khudiyi O, Prusińska M, Duda A, Khuda L, Wiszniewski G, Kushniryk O, Kapusta A. 2020. Survival, proximate composition, and proteolytic activity of *Artemia salina* bioencapsulated with different algal monocultures. *Fish Aquat Life.* 28(4):205-215. <https://doi.org/10.2478/aopf-2020-0025>
- la esperanza de vida, el crecimiento ideal y el sistema inmunológico de los peces (Madkour et al. 2022). En este sentido, los juveniles de *Artemia* enriquecidos con carotenoides provenientes de microalgas, como los evaluados en el presente estudio, también pueden servir como alimento para peces ornamentales, como *Xiphophorus maculatus*, dado que suplementar su dieta con carotenoides mejora la coloración y la respuesta inmune de las mucosas (Abdollahi et al. 2019). Además, Pérez-Rodríguez et al. (2018) estudiaron los efectos de alimentar a larvas de *M. americanum* con una dieta de *Artemia* enriquecida con la microalga *C. calcitrans*, reportando que el crecimiento general, la tasa de crecimiento y la supervivencia mejoraron.
- En conclusión, se observaron efectos positivos en la composición proximal, la concentración de clorofila *a* y *b* y el contenido total de carotenoides de juveniles de *A. franciscana* alimentados con diferentes especies de microalgas después de 6 h. Los organismos alimentados con *Tetraselmis suecica* exhibieron los mejores resultados en términos de composición proximal y contenido de clorofila *b*, mientras que aquellos alimentados con dietas de *Thalassiosira weissflogii* y *Chaetoceros muelleri* presentaron los mejores resultados en términos de contenido total de carotenoides y clorofila *a*.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al CONACYT por la beca (#424079) y el proyecto PRO_A7_041 del Programa de Promoción y Apoyo a Proyectos de Investigación (PROFAP) 2022.

Todos los coautores están de acuerdo con su publicación y realizaron aportes significativos; no hay conflicto de interés.

Traducido al español por MacTavish Scientific Editing.

De la Vega-Naranjo M. 2014. Aislamiento, caracterización y manipulación genética de microalgas marinas para la producción de compuestos de alto valor añadido [Isolation, characterization, and genetic manipulation of marine microalgae for the production of high added value compounds] [dissertation]. [Spain]: Universidad de Huelva. 204 p.

Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. 1956. Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. *Anal Chem.* 28(3):350-356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>

Fábregas J, Otero A, Domínguez A, Patiño M. 2001. Growth rate of the microalga *Tetraselmis suecica* changes the biochemical composition of *Artemia* species. *Mar Biotechnol.* 3(3):256-263. <https://doi.org/10.1007/s101260000074>

Franz AK, Danielewicz MA, Wong DM, Anderson LA, Boothe JR. 2013. Phenotypic screening with oleaginous microalgae reveals modulators of lipid productivity. *ACS Chem Biol.* 8:1053-1062. <https://doi.org/10.1021/cb300573r>

García N, López-Eliás JA, Miranda A, Martínez-Porchas M, Huerta N, García A. 2012. Effect of salinity on growth and chemical composition of the diatom *Thalassiosira weissflogii* at three

- culture phases. *Lat Am J Aquat Res.* 40(2):435-440.
<http://doi.org/10.3856/vol40-issue2-fulltext-18>
- Gerken HG, Donohoe B, Knoshaug EP. 2013. Enzymatic cell wall degradation of *Chlorella vulgaris* and other microalgae for biofuels production. *Planta*: 237:239-253.
<https://doi.org/10.1007/s00425-012-1765-0>
- Goiris K, Muylaert K, Fraeye I, Foubert I, de Brabanter J, de Cooman L. 2012. Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. *J Appl Phycol.* 24:1477-1486.
<https://doi.org/10.1007/s10811-012-9804-6>
- Gómez-Loredo A, Benavides J, Rito-Palomares M. 2016. Growth kinetics and fucoxanthin production of *Phaeodactylum tricornutum* and *Isochrysis galbana* cultures at different light and agitation conditions. *J Appl Phycol.* 28:849-860.
<https://doi.org/10.1007/s10811-015-0635-0>
- Guillard RRL, Ryther JH. 1962. Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve). *Rev Microbiol.* 8:229-325.
<https://doi.org/10.1139/m62-029>
- Hamed I. 2016. The evolution and versatility of microalgal biotechnology: a review. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 15(6):1104-1123.
<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12227>
- Hindersin S, Leupold M, Kerner M, Hanelt D. 2014. Key parameters for outdoor biomass production of *Scenedesmus obliquus* in solar tracked photobioreactors. *J Appl Phycol.* 26:2315-2325.
<https://doi.org/10.1007/s10811-014-0261-2>
- Jeffrey SW, Wright SW. 2005. Photosynthetic pigments in marine microalgae: insights from cultures and the sea. In: Subba-Rao DV (ed.), *Algal Cultures, Analogues of Blooms and Applications*. New Hampshire (USA): Science Publishers. p. 33-90.
- Ju ZY, Forster IP, Dominy WG. 2009. Effects of supplementing two species of marine algae or their fractions to a formulated diet on growth, survival and composition of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture.* 292:237-243.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.04.040>
- Léger P, Bengston DA, Simpson KL, Sorgeloos P. 1986. The use and nutritional value of *Artemia* as a food source. *Oceanogr Mar Biol Annu Rev.* 24:521-623.
- Lichtenthaler HK, Wellburn AR. 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. *Biochem Soc Trans.* 11(5):591-592.
<https://doi.org/10.1042/bst0110591>
- Long M, Tallec K, Soudant P, Le Grand F, Donval A, Lambert C, Sarthou G, Jolley DF, Hégaret H. 2018. Allelochemicals from *Alexandrium minutum* induce rapid inhibition of metabolism and modify the membranes from *Chaetoceros muelleri*. *Algal Res.* 35:508-518.
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.09.023>
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RL. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193(1):265-275.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
- Madkour K, Dawood MAO, Sewilam H. 2022. The use of *Artemia* for aquaculture industry: An updated overview. *Ann Anim Sci.* 23(1):3-10.
<https://doi.org/10.2478/aoas-2022-0041>
- Maldonado-Montiel TDNJ, Rodríguez-Canché LG. 2005. Biomass production and nutritional value of *Artemia* sp. (Anostraca: Artemiidae) in Campeche, México. *Rev Biol Trop.* 53(3-4):447-454.
<https://doi.org/10.15517/rbt.v53i3-4.14613>
- Marella TK, Tiwari A. 2020. Marine diatom *Thalassiosira weissflogii* based biorefinery for co-production of eicosapentaenoic acid and fucoxanthin. *Bioresour Technol.* 307:123245.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123245>
- Martínez-Córdova LR, Martínez-Porchas M, López-Elías JA, Enríquez-Ocaña LF. 2014. Uso de microorganismos en el cultivo de crustáceos = Use of microorganisms in crustacean culture. *Biotechnia.* 16(3):50-55.
<https://doi.org/10.18633/bt.v16i3.141>
- Méndez-Martínez Y, García-Guerrero MU, Lora-Vilchis MC, Martínez-Córdova LR, Arcos-Ortega FG, Alpuche JJ, Cortés-Jacinto E. 2018. Nutritional effect of *Artemia* nauplii enriched with *Tetraselmis suecica* and *Chaetoceros calcitrans* microalgae on growth and survival on the river prawn *Macrobrachium americanum* larvae. *Aquac Int.* 26:1001-1015.
<https://doi.org/10.1007/s10499-018-0264-0>
- Millán-Almaraz MI, Nieves-Soto M, López-Peraza DJ, Peraza-Yee MM. 2021. Effect of light and feed density on ingestion rate, protein and lipid content of *Artemia franciscana* juveniles. *Lat Am J Aquat.* 49(5):717-724.
<https://doi.org/10.3856/vol49-issue5-fulltext-2695>
- Paliwal C, Ghosh T, George B, Pancha I, Maurya R, Chokshi K, Ghosh A, Mishra S. 2016. Microalgal carotenoids: Potential nutraceutical compounds with chemotaxonomic importance. *Algal Res.* 15:24-31.
<http://doi.org/10.1016/j.algal.2016.01.017>
- Pande SV, Khan RP, Venkatasubramanian TA. 1963. Microdetermination of lipids and serum total fatty acid. *Anal Biochem.* 6(5):415-423.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(63\)90094-0](https://doi.org/10.1016/0003-2697(63)90094-0)
- Pangestuti R, Kim, SK. 2011. Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae. *J Funct Foods.* 3(4):255-266.
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.07.001>
- Panis G, Carreon JR. 2016. Commercial astaxanthin production derived by green alga *Haematococcus pluvialis*: a microalgae process model and a techno-economic assessment all through production line. *Algal Res.* 18:175-190.
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.06.007>
- Pérez-Rodríguez JC, Yamasaki-Granados S, García-Guerrero MU, Martínez-Porchas M, Méndez-Martínez Y, Latournerié-Cervera JR, Cortés-Jacinto E. 2018. Growth and survival of juvenile caque river prawn *Macrobrachium americanum* fed with diets containing different protein levels. *Lat Am J Aquat Res.* 46(3):534-542.
<http://doi.org/10.3856/vol46-issue3-fulltext-6>
- Pugkaew W, Meetam M, Yokthongwattana K, Leeratsuwan N, Pokethitiyook P. 2019. Effects of salinity changes on growth, photosynthetic activity, biochemical composition, and lipid productivity of marine microalgae *Tetraselmis suecica*. *J Appl Phycol.* 31:969-979.
<https://doi.org/10.1007/s10811-018-1619-7>
- Ra CH, Sirisuk P, Jung JH, Jeong GT, Kim SK. 2018. Effects of light-emitting diode (LED) with a mixture of wavelengths on the growth and lipid content of microalgae. *Bioprocess Biosyst Eng.* 41:457-465.
<https://doi.org/10.1007/s00449-017-1880-1>
- Ramírez-Mérida LG, Ragagnin de Menezes C, Queiroz Zepka L, Jacob-Lopes E. 2015. Microalgas: potencial para la producción de compuestos bioactivos nanoencapsulados [Microalgae: potential for the production of nanoencapsulated bioactive compounds]. *Ciencia e Natura.* 37(5):7-17.
<https://doi.org/10.5902/2179-460X19690>
- Rasdi NW, Qin JG. 2015. Effect of N:P ratio on growth and chemical composition of *Nannochloropsis oculata* and *Tisochrysis lutea*. *J Appl Phycol.* 27:2221-2230.
<https://doi.org/10.1007/s10811-014-0495-z>

- Renaud SM, Thinh LV, Parry DL. 1999. The gross chemical composition and fatty acid composition of 18 species of tropical Australian microalgae for possible use in mariculture. *Aquaculture* 170(2):147-159.
[https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00399-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00399-8)
- Rigane G, Bouaziz M, Sayadi S, Salem RB. 2013. Effect of storage on refined olive oil composition: stabilization by addition of chlorophyll pigments and squalene. *J Oleo Sci.* 62(12):981-987.
<https://doi.org/10.5650/jos.62.981>
- Ruiz-Soto A. 2017. Implementación de una metodología por cromatografía líquida de alta resolución para la determinación del carotenoide all-trans- β -caroteno en la microalga *Arthrospira platensis* [Implementation of a high performance liquid chromatography methodology for the all-trans- β -carotene carotenoid determination o in the microalgae *Arthrospira platensis*] [Bsc thesis]. [Lima (Peru)]: Universidad Nacional de Ingeniería. 125 p.
- Sainz-Escudero L, López-Estrada EK, Rodríguez-Flores PC, García-París M. 2021. Settling taxonomic and nomenclatural problems in brine shrimps, *Artemia* (Crustacea: Branchiopoda: Anostraca), by integrating mitogenomics, marker discordances and nomenclature rules. *PeerJ.* 9:e10865.
<https://doi.org/10.7717/peerj.10865>
- Sánchez-Saavedra MP, Paniagua-Chávez C. 2017. Potential of refrigerated marine cyanobacterium *Synechococcus elongatus* used as food for *Artemia franciscana*. *Lat Am J Aquat Res.* 45(5):937-947.
<http://doi.org/10.3856/vol45-issue5-fulltext-9>
- Saxena A, Mishra B, Tiwari A. 2022. Cost-effective mass cultivation of marine diatoms with local salts and its impact on growth and productivity. *Bioresour Technol.* 352:127128.
<http://doi.org/10.2139/ssrn.4035281>
- Shanmugam S, Rajendran R. 2018. Influence of different diets on the growth, survival, fecundity and proximate composition of brine shrimp *Artemia franciscana* (Kellog, 1906). *Aquac Res.* 50(2):1-14.
<https://doi.org/10.1111/are.13882>
- Sorgeloos P, Lavens P, Leger P, Tackaert W, Versichele D. 1986. Manual for the culture and use of brine shrimp *Artemia* in aquaculture. Belgium: Belgian Development Agency; FAO. 319 p.
- Trusty MF, Goldstein JS, Fiore DR. 2005. Hatchery performance of early benthic juvenile American lobsters (*Homarus americanus*) fed enriched frozen adult *Artemia* diets. *Aquac Nutr.* 11(3):191-198.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2005.00339.x>
- Vizcaino-Ochoa V, Lazo JP, Barón-Sevilla B, Drawbridge MA. 2010. The effect of dietary docosahexaenoic acid (DHA) on growth, survival and pigmentation of California halibut *Paralichthys californicus* larvae (Ayres, 1810). *Aquaculture.* 302:228-234.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.02.022>
- Wang X, Miao J, Pan L, Li Y, Lin Y, Wu J. 2019. Toxicity effects of p-chloroaniline on the growth, photosynthesis, respiration capacity and antioxidant enzyme activities of a diatom, *Phaeodactylum tricornutu*. *Ecotoxicol Environ Saf.* 169:654-661.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.11.015>
- Whyte JNC. 1987. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture.* 60(3-4):231-241.
[https://doi.org/10.1016/0044-8486\(87\)90290-0](https://doi.org/10.1016/0044-8486(87)90290-0)
- Wongrat L. 1995. Phytoplankton. Bangkok (Thailand): Faculty of Fisheries, Kasetsart University.
- Zapata M, Garrido JL, Jeffrey SW. 2006. Chlorophyll *c* pigments: current status. In: Grimm, B, Porra RJ, Rüdiger W, Scheer, H. (eds.), *Chlorophylls and Bacteriochlorophylls: Biochemistry, Biophysics, Functions and Applications*. Dordrecht (The Netherlands): Springer: p. 39-53.
https://doi.org/10.1007/1-4020-4516-6_3
- Zar JH. 2010. *Biostatistical analysis*. New Jersey (USA): Prentice Hall. 663 p.
- Zazueta-Patrón IE. 2016. Crecimiento, biomasa y composición proximal de microalgas cultivadas en medios limitantes de nitrógeno [Growth, biomass, and proximal composition of microalgae cultured in limiting nitrogen media] [MSc thesis]. [Mazatlan (Sinaloa, Mexico)]: Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Autónoma de Sinaloa (FACIMAR-UAS). 55 p.